

UNIVERZITA OBRANY  
FAKULTA VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ  
HRADEC KRÁLOVÉ

Využití proteomické analýzy pro identifikaci potenciálních  
biomarkerů u onemocnění kardiovaskulárního systému

Dizertační práce



## **BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE**

Jméno a příjmení: Alena Fučíková

Název dizertační práce: Využití proteomické analýzy pro identifikaci  
potenciálních biomarkerů u onemocnění  
kardiovaskulárního systému

Studijní program: Infekční biologie

Studijní obor: Infekční biologie

Školitel: PharmDr. Juraj Lenčo, PhD.

Rok obhajoby: 2013



## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování práce čerpala a na které se odkazuji, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Všechny převzaté obrazové a informační materiály jsou použity se souhlasem vlastníka autorských práv.

V Hradci Králové

Mgr. Alena Fučíková



## PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli PharmDr. Juraji Lenčovi, PhD. za odborné vedení a cenné rady během mého postgraduálního studia. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Martinu Hubálkovi, PhD. za předání mnoha zkušeností při práci na vývoji metod cílené proteomické analýzy, za jeho trpělivost, přínosné diskuse a kritické pohledy na studovanou problematiku. Mgr. Heleně Řehulkové PhD. a RNDr. Pavlu Řehulkovi, PhD. děkuji za vynikající spolupráci a za podnětné diskuse a pomoc při zpracování dat. PharmDr. Jiřímu Dreslerovi děkuji za nezapomenutelnou spolupráci při údržbě hmotnostního spektrometru. Děkuji celému kolektivu Ústavu molekulární patologie a Centra pokročilých studií za výjimečnou pracovní atmosféru a zejména pak našemu řediteli prof. MUDr. Jiřímu Stulíkovi, CSc. Díky nim mi bylo poskytnuto výborné vědecké a lidské zázemí pro studium. Moje největší poděkování ale patří rodině a blízkým, kteří se nejvyšší měrou zasadili o mé vzdělání.





## **GRANTY**

Tato dizertační práce byla podpořena následujícími granty a projekty:

Grant Ministerstva zdravotnictví České republiky č. NR/9253

Grant Ministerstva zdravotnictví České republiky č. NT/13721

Specifický výzkum Fakulty vojenského zdravotnictví 2010/2011



# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST – LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>ANALÝZA KRVE .....</b>	<b>21</b>
2.1.1	PROBLÉMY SPOJENÉ S ANALÝZOU PLAZMY A JEJICH ŘEŠENÍ .....	21
<b>2.2</b>	<b>POUŽÍVANÉ PROTEINOVÉ MARKERY KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ.....</b>	<b>26</b>
<b>2.3</b>	<b>HYPERTROFICKÁ KARDIOMYOPATIE .....</b>	<b>28</b>
2.3.1	CHARAKTERISTIKA ONEMOCNĚNÍ .....	28
2.3.2	VYBRANÉ MARKERY ONEMOCNĚNÍ .....	37
<b>2.4</b>	<b>PROTEOMIKA V KLINICKÉ DIAGNOSTICE – STATUS QUO.....</b>	<b>40</b>
<b>2.5</b>	<b>HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V PROTEOMICE .....</b>	<b>43</b>
2.5.1	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETR.....	43
2.5.2	TANDEMOVÁ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE .....	47
2.5.3	SRM A JEHO VYUŽITÍ V KVANTIFIKACI PEPTIDŮ .....	51
2.5.4	POŽADAVKY NA VÝVOJ A VALIDACI METODY CÍLENÉ PROTEOMICKÉ ANALÝZY .....	58
<b>3</b>	<b>CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIÁL .....</b>	<b>65</b>
<b>4.2</b>	<b>CHEMIKÁLIE .....</b>	<b>65</b>
<b>4.3</b>	<b>PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ .....</b>	<b>67</b>
<b>4.4</b>	<b>PROGRAMOVÉ VYBAVENÍ .....</b>	<b>69</b>
<b>4.5</b>	<b>VZORKY .....</b>	<b>70</b>
4.5.1	CHARAKTERISTIKA SKUPINY PACIENTŮ .....	70
4.5.2	CHARAKTERISTIKA KONTROLNÍ SKUPINY .....	71
4.5.3	PREANALYTICKÁ FÁZE PŘÍPRAVY VZORKU.....	71
<b>4.6</b>	<b>METODY .....</b>	<b>73</b>
4.6.1	DETEKCE PŘÍTOMNÝCH PATOGENŮ POMOCÍ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE .....	73

4.6.2	IMUNOAFINITNÍ ODSTRANĚNÍ VYBRANÝCH PROTEINŮ PLAZMY POMOCÍ HPLC KOLONY MARS HU-14 ....	74
4.6.3	IMUNOAFINITNÍ ODSTRANĚNÍ VYBRANÝCH PROTEINŮ PLAZMY POMOCÍ CENTRIFUGAČNÍCH KOLONEK.....	76
4.6.4	SNÍŽENÍ KONCENTRAČNÍHO ROZPĚTÍ POMOCÍ HEXAPEPTIDOVÉ KNIHOVNY.....	77
4.6.5	ENZYMATICKÉ ŠTĚPENÍ.....	78
4.6.6	LC-MALDI-MS/MS ANALÝZA A IDENTIFIKACE PROTEINŮ.....	79
4.6.7	iTRAQ MAPOVACÍ STUDIE .....	80
4.6.8	TVORBA SRM METODY PRO KVANTITATIVNÍ ZHODNOCENÍ ZASTOUPENÍ POTENCIÁLNÍCH MARKERŮ HYPERTROFICKÉ KARDIOMYOPATIE V PERIFERNÍ PLAZMĚ .....	81
4.6.9	OPTIMALIZACE A VALIDACE KVANTIFIKAČNÍ SID-SRM-MS METODY .....	87
4.6.10	PŘÍPRAVA VZORKŮ S IZOTOPICKY ZNAČENÝMI PEPTIDY.....	86
4.6.11	KVANTIFIKACE POTENCIÁLNÍCH PROTEINOVÝCH MARKERŮ.....	89
4.6.12	ELISA STANOVENÍ VYBRANÝCH MARKERŮ .....	91
<b>5</b>	<b><u>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</u></b>	<b>93</b>
5.1	OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY VZORKU .....	95
5.2	iTRAQ POROVNÁVACÍ STUDIE .....	102
5.3	TVORBA A OPTIMALIZACE KVANTIFIKAČNÍ SRM METODY .....	105
5.4	KVANTIFIKACE PEPTIDŮ METODOU SRM.....	122
5.5	VERIFIKACE VYBRANÝCH UKAZATELŮ POMOCÍ IMUNOSTANOVENÍ.....	128
<b>6</b>	<b><u>ZÁVĚR .....</u></b>	<b>133</b>
<b>7</b>	<b><u>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</u></b>	<b>135</b>
<b>8</b>	<b><u>PŘEHLED SOUVISEJÍCÍ PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI .....</u></b>	<b>149</b>

## SOUHRN

Hypertrofická kardiomyopatie se řadí mezi nejčastější geneticky podmíněná onemocnění kardiovaskulárního systému. Ačkoliv je toto onemocnění známé dlouhou dobu, zatím neexistují snadno použitelné diagnostické postupy, které by odhalily chorobu v raných stádiích, což je zásadní zejména u jedinců s negativní nebo neznámou rodinnou anamnézou.

Tvorba metody cílené proteomické analýzy spolu s kvantifikací vybraných potenciálních markerů hypertrofické kardiomyopatie pomocí izotopicky značených standardů byla hlavním cílem předkládané dizertační práce. Touto metodou lze odhalit již velmi malá množství hledaných potenciálních markerů v minimálním množství biologického materiálu. V kombinaci s vhodně použitými standardy navíc umožňuje přesnou kvantifikaci velkého počtu analytů v relativně krátkém čase.

Pomocí cíleného proteomického přístupu bylo kvantifikováno několik proteinových markerů hypertrofické kardiomyopatie, které byly již dříve uvedeny v literatuře. Zároveň byl v rámci dizertační práce popsán plazmatický fibronektin jako nový potenciální marker tohoto onemocnění. Koncentrace několika vybraných proteinů byly závěrem stanoveny pomocí enzymoimunoanalytické metody a porovnány s výsledky cílené proteomické analýzy.

V rámci předkládané dizertační práce byla vytvořena a ověřena metoda cílené proteomické analýzy umožňující sledování hladin několika potenciálních markerů hypertrofické kardiomyopatie během jedné časově nenáročné analýzy. Z pohledu naplnění cílů dizertační práce byly tyto experimenty úspěšné. Studium problematiky kvantifikace proteinů ale ukázalo další možné úhly pohledu na námi aplikované postupy, které je třeba dále kriticky zvažovat, rozvíjet a zejména vhodně interpretovat.

**Klíčová slova:** hypertrofická kardiomyopatie, proteinové markery, cílená proteomická analýza, kvantifikace



## SUMMARY

Hypertrophic cardiomyopathy is one of the most common inherited diseases of the cardiovascular system. Although this disease is known for a long time, a suitable diagnostic procedure uncovering its early stages in patients with negative or unknown family history is still lacking.

A development of the method for targeted proteomic analysis in combination with subsequent quantification of chosen hypothetical markers of hypertrophic cardiomyopathy was the main aim of this thesis. This method is able to detect very small amounts of chosen markers in the minimum amount of complex biological material. Moreover, in combination with properly used standards, targeted proteomic analysis enables quite precise quantification of many analytes in a relatively short time.

Several previously described protein markers of hypertrophic cardiomyopathy were assayed and quantified using unique proteomic technique. Concurrently, a new potential protein marker – soluble fibronectin – was described. Protein concentrations were validated using enzymeimmunoanalytical method and obtained results were compared with targeted proteomic analysis findings.

In the presented thesis, a new short method was developed for detection and quantification of potential markers of hypertrophic cardiomyopathy. The main objectives of this dissertation thesis were successfully fulfilled. Nevertheless, an area of the protein quantification using mass spectrometry offers many points of view on these targeted analyses, which should be further studied, critically considered, developed and correctly interpreted.

**Key words:** hypertrophic cardiomyopathy, protein markers, targeted proteomic analysis, quantification





## POUŽITÉ ZKRATKY

ANP	atriální natriuretický peptid ( <b>atrial natriuretic peptide</b> )
AUC	plocha pod křivkou ( <b>area under the curve</b> )
BNP	mozkový natriuretický peptid ( <b>brain natriuretic peptide</b> )
bTG	<b>β-tromboglobulin</b>
CE	kolizní energie ( <b>collision energy</b> )
CID	kolizí indukovaná disociace ( <b>collision-induced dissociation</b> )
CK-MB	kreatinkináza MB ( <b>creatine kinase MB</b> )
CV	koeficient variace ( <b>coefficient of variation</b> )
DP	deklasterizační potenciál ( <b>declustering potential</b> )
DT	doba měření jednoho přechodu ( <b>dwell time</b> )
DTT	Clelandovo činidlo ((2S,3S)-1,4-bis(sulfanyl)butan-2,3-diol)
ELISA	heterogenní enzymová imunoanalýza ( <b>enzyme-linked immunosorbent assay</b> )
ESI	elektrosprejová ionizace ( <b>electrospray ionization</b> )
FA	kyselina mravenčí ( <b>formic acid</b> )
FABP	protein vázající mastné kyseliny ( <b>fatty-acid binding protein</b> )
FDR	podíl falešně pozitivních výsledků ( <b>false discovery rate</b> )
FN	<b>fibronektin</b>
FT	procházející frakce ( <b>flow through</b> )
GP-BB	glykogenfosforylázy BB ( <b>glycogen phosphorylase BB</b> )
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie ( <b>high performance liquid chromatography</b> )
CHAPS	3-[(3- <b>Cholamidopropyl</b> )dimethylamonium]-1-propansulfonát
IGF-1	somatomedin C ( <b>inzulin-like growth factor 1</b> )
LIT	lineární iontová past ( <b>linear ion trap</b> )
MALDI	desorpce/ionizace laserem za účasti matrice ( <b>matrix-assisted laser desorption/ionization</b> )
MIDAS	MRM-iniciovaná detekce a sekvenace ( <b>MRM-initiated detection and sequencing</b> )
MMP	matrixmetaloproteáza ( <b>matrix metalloprotease</b> )

MMTS	S- <b>methyl methanthiosulfonát</b>
MRM	monitorování vícenásobných reakcí ( <b>m</b> ultiple <b>r</b> eaction <b>m</b> onitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie ( <b>m</b> ass <b>s</b> pectrometry)
PTM	posttranslační modifikace ( <b>p</b> ost- <b>t</b> ranslational <b>m</b> odification)
Q	kvadrupól ( <b>q</b> uadrupole)
RT	retenční čas ( <b>r</b> etention <b>t</b> ime)
sCD40L	rozpuštěný ligand molekuly CD40 (soluble <b>CD40</b> ligand)
SDS	dodecylsulfát sodný (sodium <b>d</b> odecyl sulfate)
SID	stabilní izotopové ředění (stable <b>i</b> sotope <b>d</b> ilution)
SRM	monitorování vybraných reakcí (selected <b>r</b> eaction <b>m</b> onitoring)
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfan ( <i>tris</i> (2- <b>c</b> arboxyethyl) <b>p</b> hosphine)
TFA	kyselina trifluoroctová ( <b>t</b> rifluoroacetic <b>a</b> cid)
TFE	2,2,2- <b>t</b> rifluoroethanol
TIMP	tkáňový inhibitor metaloproteáz ( <b>t</b> issue <b>i</b> nhibitor of <b>m</b> etallo <b>p</b> roteases)
TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$ ( <b>t</b> umor <b>n</b> ecrosis <b>f</b> actor <b><math>\alpha</math></b> )
TOF	doba letu ( <b>t</b> ime <b>o</b> f <b>f</b> light)
XIC	extrahovaný iontový chromatogram ( <b>e</b> xtracted <b>i</b> on <b>c</b> hromatogram)

## 1 Úvod

Kardiovaskulární choroby zaujímají stabilní pozici v čele celosvětového žebříčku nejčastějších příčin úmrtí. Jen v Evropské unii tvoří kolem 40 % úmrtí ročně (cca 2 mil.).<sup>1</sup> Převážná většina onemocnění kardiovaskulárního systému je úzce spjata s životním stylem a jejich problematika bývá aktivně řešena v rámci různých preventivních programů. Významná část těchto onemocnění je ovšem genetického původu (např. arytmogenní dysplazie pravé komory, Brugadaův syndrom, familiární dilatační kardiomyopatie, syndrom dlouhého QT intervalu). Jedním z nich je též hypertrofická kardiomyopatie. Toto onemocnění je nečastější vrozenou chorobou srdce s relativně vysokou prevalencí v populaci (1 : 500 živě narozených dětí).<sup>2</sup> Vyskytuje se ve formě obstrukční nebo neobstrukční a bývá charakterizováno jinak nevysvětlitelnou hypertrofií zejména levé části srdce. Patogeneze hypertrofické kardiomyopatie není zatím plně objasněna. Samotná hypertrofie vzniká pravděpodobně v důsledku kompenzačních reakcí myokardu na poškozenou funkci srdeční sarkomery. Postižena je zejména diastolická funkce srdce, protože zbytnělá srdeční svalovina lokalizovaná nejčastěji v septu levé komory je hůře relaxovatelná a vytváří odpor toku krve. Kvůli značné variabilitě v genotypovém i fenotypovém projevu této choroby je její diagnostika nesnadná. I když u většiny pacientů může onemocnění probíhat bezpříznakově nebo jen s mírnými symptomy celý život, část postižených, zejména mladých lidí, se nachází v riziku náhlé smrti (10 až 20 % nemocných). U včasné diagnostikovaných pacientů se známou rodinnou anamnézou lze tomuto riziku předcházet. Bohužel není zdaleka výjimkou, že náhlé úmrtí je prvním příznakem choroby. Ve Spojených státech amerických se hypertrofická kardiomyopatie řadí k nejčastějším příčinám úmrtí mladých sportovců. V dnešní době zatím neexistuje diagnostický nástroj, který by byl schopen v rámci rutinního screeningu spolehlivě odhalit toto závažné onemocnění.

Nejpoužívanější metodou diagnostiky u rozvinutých forem hypertrofické kardiomyopatie je echokardiografie. Často je využíván též ultrazvuk a vyšetření EKG. Histologické metody, například endomyokardiální biopsie, se používají spíše pro diferenciální diagnostiku, jelikož charakteristické znaky choroby nebývají přítomné ve všech případech a mnohdy bývají ložiska hypertrofie mimo dosah bioptomu. Naděje na

snadný diagnostický postup byly před časem vkládány do genetických metod. Po výzkumu v této oblasti se ukázalo, že jednoduchý screening není možný jednak vzhledem k velkému počtu dosud odhalených mutací a také vzhledem k faktu, že u zhruba 40 % případů hypertrofické kardiomyopatie zůstává konkrétní genetický defekt neodhalen.

Zajímavé možnosti pro vývoj screeningové metody nabízí klinická proteomika. Je ale možné u tak složitého onemocnění použít pro diagnostiku nebo sledování vlivu léčebných intervencí proteinové markery? Je jen velmi málo chorob, u kterých lze najít unikátní molekulu, jejíž přítomnost ji přímo charakterizuje. Většinou dochází spíše ke kvantitativním změnám několika proteinů přímo či nepřímo se účastnících patologického procesu. Cenným zdrojem informací bývají mapovací proteomické experimenty, při kterých jsou sledovány kvantitativní změny celého spektra detekovaných proteinů v komplexním biologickém materiálu. Protože v praxi není možné provádět takto rozsáhlé analýzy na velkém počtu vzorků a hodnotit všechny změny celého proteinového profilu, je výhodné vybrat kandidátní proteiny, jejichž kvantitativní charakteristiky jsou statisticky významné, a sledovat je například pomocí metody cílené proteomické analýzy označované jako monitorování vybraných reakcí (SRM, Selected Reaction Monitoring).

Cesta od objevu potenciálního markeru ke klinicky používané metodě laboratorní diagnostiky je velmi dlouhá a často z různých důvodů (analytických i biologických) předčasně končí. V oblasti diagnostiky hypertrofické kardiomyopatie nejsou zatím proteinové markery využívány, i když je již popsána řada perspektivních kandidátů. Pomocí proteomických nástrojů jsme dnes schopni vybrané potenciální ukazatele onemocnění poměrně rychle stanovit. Dobře sestavená a charakterizovaná metoda cílené proteomické analýzy by mohla významnou měrou přispět právě v oblasti laboratorní diagnostiky a kontroly průběhu tohoto onemocnění.

## 2 Teoretická část – literární přehled

### 2.1 Analýza krve

Největší předností krve je její přímá komunikace s buňkami celého organismu, tedy včetně buněk patologicky pozměněných. Z takovýchto buněk se následkem jejich odumírání a současného nespecifického nebo specifického uvolňování mohou dostávat do cirkulující krve proteiny a peptidy, charakteristické pro vzniklý patologický stav. Jednoznačným pozitivem je také její snadná dostupnost a minimální invazivita odběru. Zpracování krve na plazmu nebo sérum patří k denní rutině klinických pracovišť.

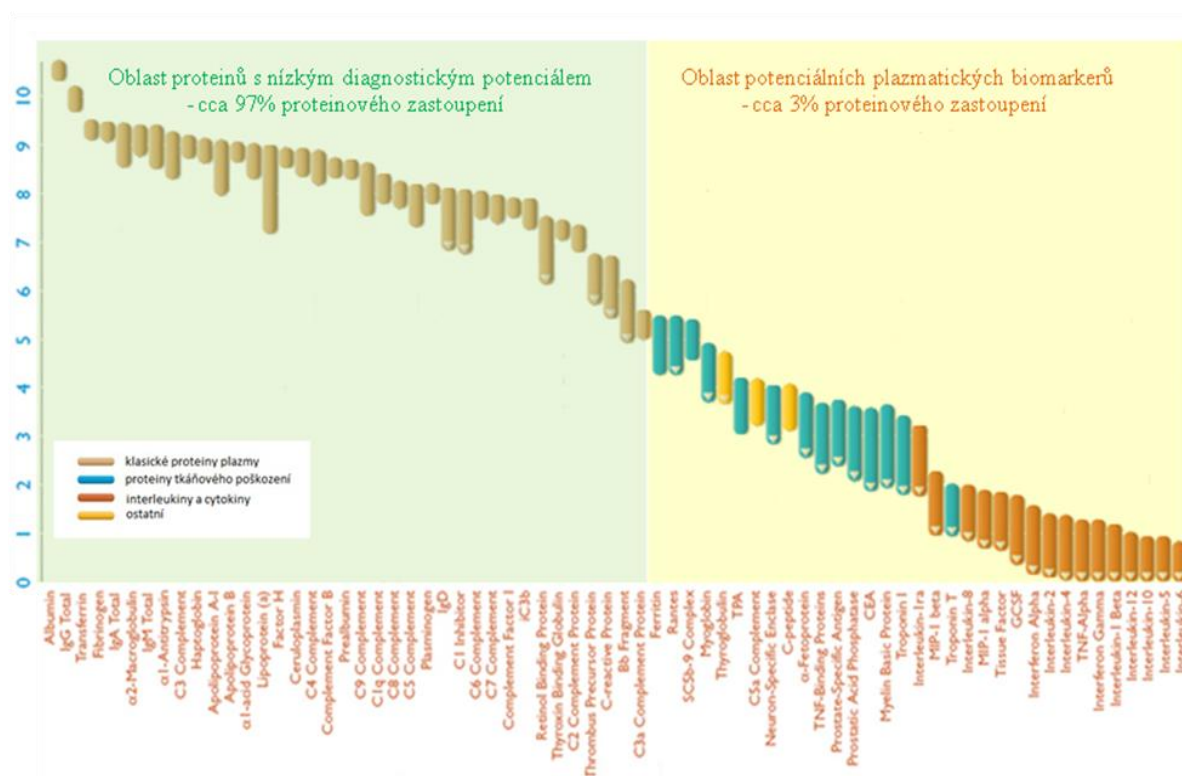
Při proteomické analýze krve je důležitou otázkou, zda použít jako výchozí materiál sérum nebo plazmu. Při aktivaci systému srážení dochází ke kaskádové enzymatické reakci mnoha složek krve, jejímž výsledkem je tvorba nerozpustné fibrinové sítě, v které dochází k zachycování krevních elementů, zejména erytrocytů a trombocytů. Trombocyty adherují a uvolňují obsah svých cytoplazmatických granul do okolí. Sérum tedy nemá shodné složení jako plazma. Koagulační faktory jsou vyčerpané, v séru je jiný poměr iontů než v plazmě a může docházet k nespecifickému navázání některých diagnosticky zajímavých proteinů na krevní sraženinu. Je tedy na pečlivém zvážení, jaký výchozí materiál použít pro plánovanou studii.<sup>3,4</sup>

V současnosti je na našem pracovišti preferován odběr krve do uzavřeného systému, který je tvořen evakuovanou zkumavkou, obsahující antikoagulant a inhibitory proteáz. Tím je zajištěno odebrání přesně stanoveného objemu krve, nedojde k aktivaci systému srážení a díky přidaným inhibitorům proteáz nedochází k enzymatické degradaci proteinů přítomných ve vzorku odebrané krve. Kromě výše uvedených substancí obsahuje zkumavka ještě separační ventil, který je během centrifugace tlačěn odstředivou silou ke dnu zkumavky a pomocí vloženého filtru bezpečně oddělí buněčné součásti krve od plazmy.<sup>5</sup>

#### 2.1.1 Problémy spojené s analýzou plazmy a jejich řešení

Plazma tvoří zhruba jednu čtvrtinu celkového objemu tělních tekutin a její převážnou část představuje voda. Proteinová část zaujímá asi 7 % hmotnosti. Zbytek připadá na látky nebílkovinné povahy, tedy lipidy, cukry a mnoho organických a

anorganických látek, účastnících se rozmanitých fyziologických funkcí. Vzhledem k velkému objemu krve je konečná koncentrace diagnosticky zajímavých proteinů v plazmě velmi nízká (řádově pg až ng/ml),<sup>6</sup> což významně ovlivňuje jejich analýzu. Mezi další překážky, které podstatně znesnadňují jejich detekci a identifikaci, patří komplexní charakter složení plazmy, k němuž velkou měrou přispívá alternativní splicing, různé posttranslační modifikace (PTM) a jiné modifikující procesy.



Obr. 2.1 Znázornění koncentračního rozpětí proteinů plazmy. Převzato a upraveno dle Leigha Andersona, *The Plasma Proteome Institute, Washington, DC, USA, Mol. Cell Proteomics* 1, 845–847, 2002

Při proteomické analýze plazmy bývá významným limitujícím aspektem široký rozsah koncentrací obsažených proteinů odhadovaný na více než deset dekadických řádů. To má za následek zastínění diagnosticky zajímavých molekul několika málo vysoce zastoupenými proteiny.<sup>6</sup> K těm patří zejména albumin, imunoglobuliny, transferin, antitrypsin, lipoproteiny aj., dohromady tvořící až 95 % celkového proteinu plazmy (obr. 2.1). Mezi níže zastoupené proteiny s diagnostickým potenciálem patří například interleukiny a cytokiny, proteiny uvolněné z poškozených tkání či buněk nebo hormony. Bez dalšího zpracování je analýza plné plazmy značně obtížná. Dnešní klinická proteomika

disponuje řadou přístupů, kterými se problém komplexity biologických vzorků a odstranění vysoce zastoupených proteinů snaží řešit.<sup>7,8</sup>

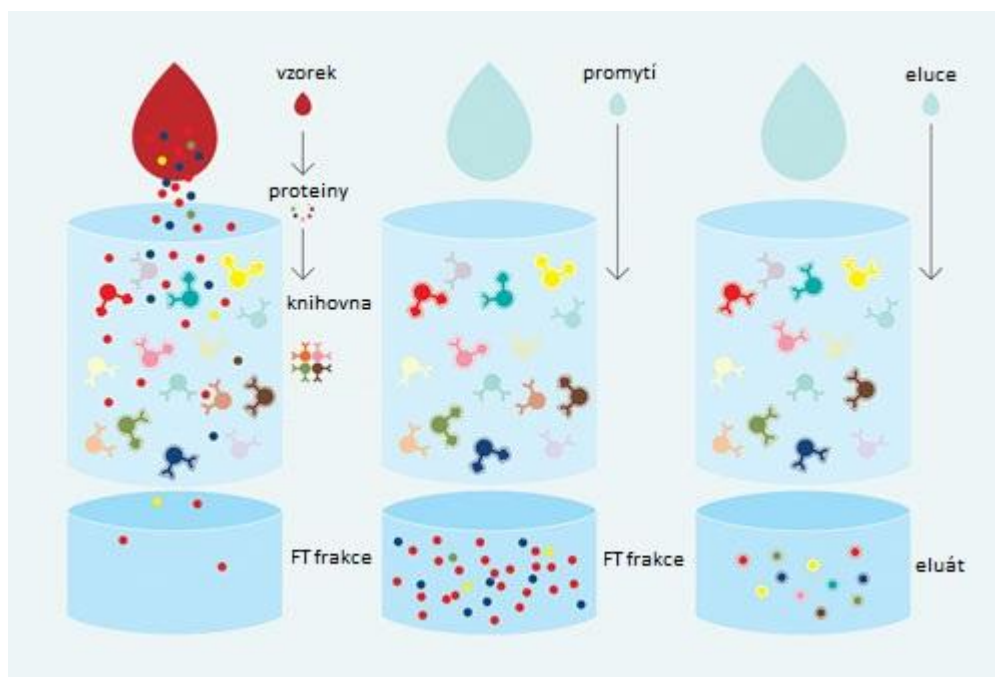
### **2.1.1.1 Afinitní odstranění majoritních proteinů**

Účinným přístupem je afinitní odstranění, které využívá sloučenin s vysokou vazností k nejvíce zastoupeným proteinům plazmy. Hlavním cílem tohoto kroku je odstranění albuminu a imunoglobulinů ze vzorků před jejich vlastní analýzou pomocí gelové elektroforézy nebo hmotnostní spektrometrie. Běžně komerčně dostupné jsou sety pro odstranění i jiných proteinů.

Příkladem může být Cibacron blue, chlorotriazinové barvivo s vysokou afinitou k lidskému sérovému albuminu.<sup>9</sup> Jde o jednu z prvních zavedených metod, které se používají k odstranění velkého podílu albuminu z biologického materiálu. Vazba albuminu je však nespecifická a albumin bývá odstraněn jen asi z 90 %, což pro analýzy klinických markerů nebývá dostačující. Ačkoliv patří metody afinitního odstranění k tradičním postupům, z důvodu nedostatečné specifity nebo komplikované přípravy vzorku se výrazněji nerozšířily.

### **2.1.1.2 Hexapeptidové knihovny**

Zcela originální řešení pro snížení rozpětí koncentrací proteinů v biologickém vzorku představuje použití vazebných ligandů ve formě hexapeptidů. Jádrem metody je hexapeptidová knihovna ukotvená na drobných chromatografických nosičích, která je připravena kombinatorní syntézou z běžných aminokyselin. Knihovna obsahuje populaci až 64 milionů ( $20^6$ ) různých hexapeptidů. Díky unikátní technologii přípravy nese každý nosič na svém povrchu jiné hexapeptidy, které jsou schopné vázat své ligandy různými nekovalentními interakcemi. Pomocí těchto vazeb jsou z plazmy těmito hexapeptidy vychytávány pouze s nimi interagující proteiny (obr 2.2). Po kompletním nasycení všech vazebných míst se další proteiny již nemohou zachytit. Proto hexapeptidová knihovna se stejným zastoupením všech ligandů produkuje teoreticky podobná množství rozdílných proteinů nezávisle na jejich původních koncentracích ve vzorku.<sup>10,11</sup>



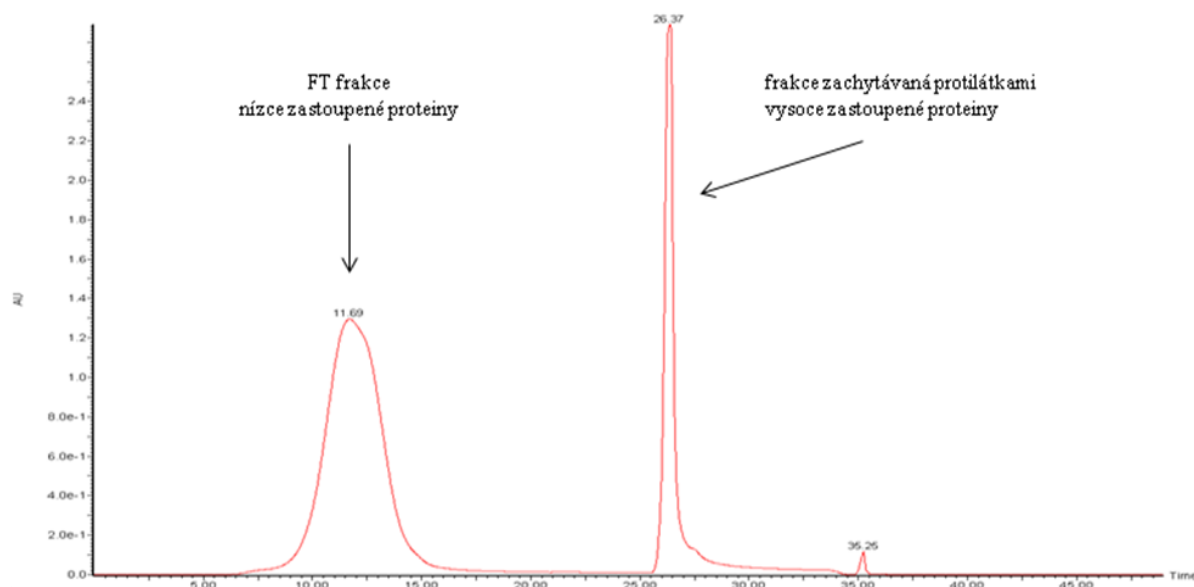
Obr. 2.2 Znárodnění technologie peptidových knihoven. FT frakce = procházející frakce. Převezato z [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com), upraveno.

Nevýhodou metody je, že ze své podstaty stírá kvantitativní rozdíly mezi proteiny v různých vzorcích. V případě analýzy zaměřené na hledání kvantitativních rozdílů musí být proto metoda kombinována s jinými technikami.<sup>12,13</sup>

### 2.1.1.3 Odstranění majoritních proteinů imunoafinitní technikou

Třetí přístup zachovává výchozí koncentrační poměry ve studovaném biologickém materiálu za současného odstranění vysoce zastoupených proteinů. Běžně lze pomocí komerčně dostupných chromatografických kolon pro imunoafinitní separaci odstranit frakci nejvíce zastoupených proteinů a získat tak podstatně méně komplikovaný vzorek. Tyto kolony obsahují imobilizované polyklonální protilátky proti určitým proteinům a jejich různým formám. Nevýhodou může být riziko ztráty těch proteinů, které využívají odstraňované proteiny jako přenašeče a jsou schopné se na ně vázat.<sup>14</sup> Určitým řešením může být použití pufru s mírným denaturačním účinkem, který přeruší vazby mezi těmito proteiny, ale nepoškodí navázané protilátky.<sup>15</sup>





Obr. 2.3 Chromatografický záznam imunoafinitní separace pomocí HPLC kolony MARS Hu-14. FT frakce = procházející frakce.

Z takto ošetřené plazmy nebo séra lze identifikovat výrazně vyšší počet proteinů, za současného zachování kvantifikačních charakteristik hledaných markerů. V naší studii jsme zvolili práci s imunoafinitní kolonou MARS (Multiple Affinity Removal System) Hu-14 (Agilent Technologies, Wilmington, USA), která obsahuje navázané polyklonální protilátky proti 14 nejvíce zastoupeným proteinům plazmy (albumin, IgG, antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobin, fibrinogen,  $\alpha$ -2-makroglobulin,  $\alpha$ -1-kyselý glykoprotein, IgM, apolipoprotein A1, apolipoprotein A3, C3 složka komplementu, transthyretin). Při jedné chromatografické separaci tak dojde k odstranění zhruba 95 % celkového proteinového obsahu vzorku (viz obr. 2.3).

### 2.2 Používané proteinové markery kardiovaskulárních onemocnění

Markery srdečního poškození lze zjednodušeně rozdělit jednak na strukturní součásti myokardu, kam zahrnujeme kromě kardiomyocytů i cévy, dále látky hormonální povahy, jejichž biologická aktivita má významný vliv na kardiovaskulární systém a v neposlední řadě na látky nehormonální povahy, zejména bílkoviny, které jsou společně různým zánětlivým a ischemickým stavům v celém organismu.

V dnešní laboratorní diagnostice kardiovaskulárních chorob jsou nejpoužívanějšími markery proteiny popisující svými kvantitativními vlastnostmi míru poškození myokardu během akutních koronárních syndromů. Stěžejní u stanovení těchto markerů je sledování charakteristického vzestupu jejich koncentrace v krevním řečišti. Mezi nejpoužívanější laboratorní vyšetření v této oblasti patří určení aktuální hladiny srdečních troponinů v séru, kde jsou za normálních okolností téměř neprokazatelné. Jejich zvýšená koncentrace tedy jasně ukazuje na akutní poškození kardiomyocytu. Nejspecifičtější ukazatel infarktu myokardu z této skupiny je srdeční troponin I.<sup>16,17</sup> Alternativou k troponinům je pak stanovení hmotnostní koncentrace MB izoenzymu kreatinkinázy, tzv. CK-MB mass.<sup>18,19</sup> Tento izoenzym je pro myokard specifický. V kosterním svalstvu se vyskytuje jen ve velmi nízkých hladinách a vzrůstá při jeho poškození (operace, zhmožděny, křečové stavy, svalová dystrofie aj.) Při vysokých hladinách tohoto proteinu v krvi je tedy zároveň nutné vyloučit poškození kosterního svalu. Výhodou oproti dříve prováděnému stanovení jeho aktivity je možnost průkazu i částečně degradovaných molekul, které již ztratily enzymovou aktivitu. Nevýhodou tohoto stanovení je, že k signifikantnímu zvýšení hladiny CK-MB dochází až při srdeční nekróze většího rozsahu. Nespecifické avšak stále používané je též stanovení myoglobinu.<sup>20</sup> Tento hemoprotein je přítomen ve všech svalových buňkách a jeho hlavní funkcí je intracelulární vazba kyslíku. Do krevního oběhu se uvolňuje už při velmi malém poškození buněk a vykazuje tudíž vysokou citlivost při akutním infarktu myokardu. Bohužel jeho biologický poločas se pohybuje jen kolem 20 minut, což není pro laboratorní analýzu vždy dostatečné. Vyšší koncentraci tohoto ukazatele v séru může ale způsobovat i nedostatečná funkce glomerulárního aparátu, kde je tento protein přirozeně eliminován.

Další zajímavou skupinou používaných srdečních markerů jsou natriuretické peptidy, čítající k dnešnímu dni 4 zástupce (atriální natriuretický peptid ANP, mozkový

natriuretický peptid BNP, natriuretické peptidy typu C a D, CNP a DNP).<sup>21,22</sup> Jde o peptidové hormonálně aktivní látky, významně zasahující do hospodaření s vodou a ionty. Jako antagonisté sympatiku blokují systém renin-angiotenzin-aldosteron, podporují diurézu a mají prokazatelné vazodilatační účinky. Tyto hormony jsou uvolňovány do oběhu v reakci na zvýšený tlak krve. V krvi se současně vyskytují i jejich prekurzory a fragmenty. Lze je detekovat téměř okamžitě a používají se nejčastěji jako markery monitorující selhávání srdce. Nejvhodnější pro laboratorní diagnostiku se ukázal být BNP, respektive jeho N-terminální propeptid, jehož zvýšené hodnoty pozitivně korelují s klasifikací vytvořenou Newyorskou kardiologickou asociací (NYHA).<sup>23,24</sup>

Z ostatních dnes používaných laboratorních markerů lze jmenovat C-reaktivní protein, jehož význam je především prognostický, dále například myeloperoxidázu, vybrané interleukiny, solubilní ligand molekuly CD40, s těhotenstvím asociovaný plazmatický protein A PAPP-A, BB izoenzym glykogenfosforylázy GP-BB, ischemií modifikovaný albumin nebo vazebný protein pro mastné kyseliny FABP. Samostatnou skupinu pak tvoří lipoproteinové částice. Stanovení jejich profilu se používá k odhadu aterogenního rizika. V diagnostice kardiovaskulárních chorob se též využívají různé markery zánětu.<sup>25</sup>

Do dříve často používaných biochemických stanovení kardiálních markerů již nedostačujících citlivostí nebo specificitou a charakterizovaných pozdějším nástupem bychom dnes zařadili stanovení aspartátaminotransferázy, laktátdehydrogenázových izoenzymů nebo hydroxybutyrátdehydrogenázy.

### 2.3 Hypertrofická kardiomyopatie

#### 2.3.1 Charakteristika onemocnění

Hypertrofická kardiomyopatie je závažné dědičné onemocnění kardiovaskulárního systému. Byla popsána poprvé v roce 1957 americkým patologem Donaldem Tearem na základě pozorování shodných pitevních nálezů u osmi náhle zemřelých osob ve věku 14 až 44 let. Tento lékař později svá data publikoval jako do té doby nepopsané pozorování difuzních tumorů myokardu.<sup>26</sup> Protože jde o onemocnění poměrně časté, v dalších letech postupně rostl zájem o přesné informace o této chorobě. S rozvojem lékařských zobrazovacích technik a následně i metod molekulární biologie a genetiky docházelo k prohlubování poznatků, a tím také k častým změnám úhlu pohledu na celou problematiku. Tento složitý vývoj odráží velké množství různých dříve používaných pojmenování choroby, poukazujících nejčastěji na její familiární výskyt (např. familiární idiopatická subaortální stenóza, hypertrofická familiární kardiomyopatie, aj.) nebo na neznalost přesné příčiny choroby (např. idiopatická hypertrofie myokardu, aj.).<sup>27</sup> Dnešní používané označení, tedy hypertrofická kardiomyopatie, se ustálilo během 80. let ve Velké Británii a USA. U nás jej použil poprvé v 90. letech prof. MUDr. Pavel Gregor DrSc. ve své monografii *Hypertrofická kardiomyopatie*.<sup>28</sup>

Dnes je hypertrofická kardiomyopatie po právu v centru zájmu mnoha výzkumných a lékařských týmů. Jedná o nejčastější vrozené kardiovaskulární onemocnění, vyskytující se v populaci v prevalenci 0.2 % (zhruba 1 : 500).<sup>29</sup> V České republice se tedy předpokládá výskyt 20 000 až 50 000 osob, trpících touto chorobou, přičemž asi 10 až 20 % těchto pacientů se nachází v riziku náhlé smrti.<sup>30</sup> Mortalita se pohybuje kolem 1 % ročně, mladší pacienti (pod 30 let) jsou náhlou smrtí ohroženi překvapivě více. S rostoucím věkem toto riziko významně klesá. U osob ve zvýšeném riziku (rodinní příslušníci) a při potvrzeném nosičství rizikové genové mutace je prováděn pravidelný monitoring zdravotního stavu, protože hypertrofická kardiomyopatie se může projevit v jakémkoliv věku nezávisle na typu mutace.<sup>31</sup> Největším problémem je záchyt a diagnostika osob bez pozitivní rodinné anamnézy.

### 2.3.1.1 Genetické pozadí

Hypertrofická kardiomyopatie je autosomálně dominantně dědičné onemocnění. Její výskyt je shodně vázán na obě pohlaví. Příbuzní 1. stupně mají 50% riziko přítomnosti stejně poškozené alely. *De novo* mutace (sporadická forma hypertrofické kardiomyopatie) se v populaci objevují vzácně. K dnešnímu dni je známo více jak 1 400 mutací a to převážně v genech pro sarkomerické proteiny.<sup>32</sup> Prvním objeveným a zároveň nejvíce postiženým mutacemi je gen pro  $\beta$ -myozin,<sup>33</sup> dalším je pak gen pro myozinový vazebný protein C.<sup>34,35</sup> Zastoupení ostatních poškozených genů již není tak časté, stejně tak mutace extrasarkomerických proteinů jsou mnohem sporadičtější (viz tab. 2.1). V populaci se vyskytují též případy mnohočetných mutací, jejichž frekvence je významně vyšší (kolem 5 %) ve srovnání s běžnou četností výskytu spontánních mutací v populaci.<sup>36</sup> Fenotypový projev v těchto případech bývá těžší než u pacientů nesoucích jednu mutaci.<sup>37</sup> Bohužel vzhledem k záhytu mutace pouze asi u 60 % prokázaných nositelů se dá předpokládat, že značná část genových defektů ještě nebyla odhalena (tab. 2.1).

Protein	Gen	Lokus	Frekvence*
Těžký řetězec $\beta$ - myozinu	<i>myh7</i>	14q12	20 - 25 %
Myozinový vazebný protein C	<i>mypb-c</i>	11p11	15 - 20 %
Srdeční troponin T	<i>tnt2</i>	1q32	3 - 5 %
Srdeční troponin I	<i>ttni2</i>	19p13	1 - 2 %
$\alpha$ -tropomyozin	<i>tpm1</i>	15q22	1 - 2 %
$\alpha$ -aktin	<i>actc</i>	15q11-14	pod 1 %
Titin	<i>ttn</i>	2q24	pod 1 %
Esenciální podjednotka lehkého řetězce myozinu	<i>myl3</i>	3p21	pod 1 %
Regulační podjednotka lehkého řetězce myozinu	<i>myl2</i>	12q23-24	1 - 2 %
$\gamma$ 2 podjednotka svalové cAMP-dependentní proteinkinázy	<i>prkag2</i>	7q3	pod 1 %
Svalový LIM protein	<i>mpl</i>	15q22	pod 1 %
T-cap/telethonin protein	<i>tcap</i>	17q11-12	pod 1 %
<b>Celkem úspěšně identifikovaných</b>			<b>50 - 60%</b>

Tab. 2.1 Popsané mutace stojící za rozvojem hypertrofické kardiomyopatie, jejich lokalizace a relativní četnost. Převzato z monografie Veselka et al. *Hypertrofická kardiomyopatie a příbuzná témata*, Galén, 2006.

\*podíl výskytu poruch na daném genu z celkového počtu vyšetřovaných osob.

Absolutní míra hypertrofie, která slouží jako srovnávací hodnota, se značně liší u postižení jednotlivých genů. Například u poškození troponinu T se často hypertrofie téměř nevyskytuje, naopak riziko náhlé smrti bývá zvýšené.<sup>38</sup> Neexistuje tedy hraniční

hodnota tloušťky myokardu, která by vylučovala nebo potvrzovala přítomnost onemocnění. Byl prokázán i určitý vztah mezi typem mutace a výskytem prvních klinických projevů hypertrofické kardiomyopatie.<sup>39</sup> Dokonce bylo vybráno několik takzvaně maligních genů, jejichž postižení vede v častější míře k náhlé smrti.<sup>40</sup> Stratifikace rizika pouze na podkladě určeného genového poškození se nepoužívá, jelikož variabilita příznaků i v rámci jedné rodiny (tedy při předpokladu shodného defektu) je značná.

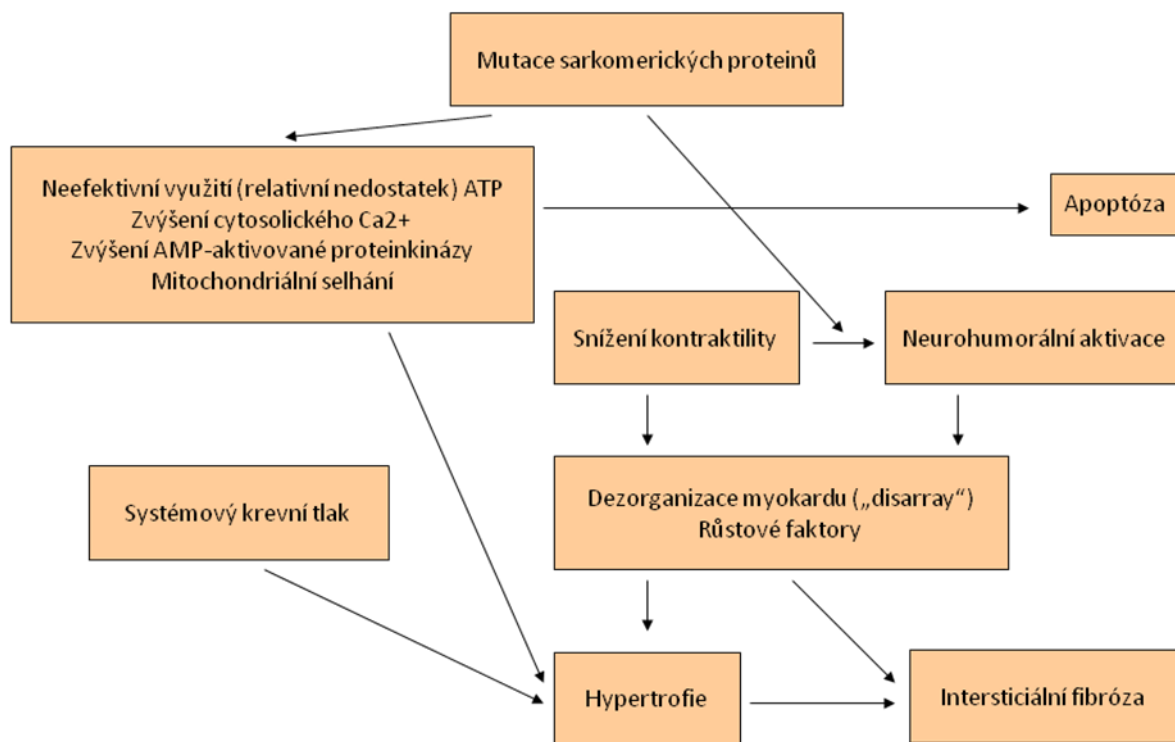
Možnosti diagnostiky hypertrofické kardiomyopatie na podkladě genetických nástrojů jsou omezené. Vyšetření je prováděno u rodin, kde byla přítomnost hypertrofické kardiomyopatie již prokázána. Primární genetický screening populace, s cílem odhalit zejména náhodně vzniklé mutace, by byl vzhledem k obrovskému počtu známých mutací velmi náročný a rutinně se neprovádí.<sup>41,42</sup> V současnosti je cílem zejména odlišení tzv. maligních mutací od benigních variant.

### 2.3.1.2 *Patofyziologické aspekty*

Přesný mechanismus vzniku a rozvoje hypertrofie na podkladě genetického defektu není znám, existuje ale několik teorií. Jednou z nich, studovanou na zvířecím modelu, je souvislost mezi mutací na těžkém řetězci  $\beta$ -myozinu a sníženou kontraktilitou myokardu.<sup>43</sup> Díky této poruše dochází následně ke zvýšené produkci růstových faktorů a postupné aktivaci některých genů pro fetální izoformy proteinů.<sup>44</sup> Tyto proteiny je ale možné nalézt i u jiných chorob spojených s tlakovým přetížením. Nitrokomorový tlak je zřejmě jedním z rozhodujících faktorů při vzniku hypertrofie, protože lze předpokládat, že mutované formy proteinů jsou přítomné v celém srdci. Hypertrofie u tohoto onemocnění se ovšem v 80 až 90 % rozvíjí pouze v levé komoře jako kompenzace její porušené kontraktility, která ve výsledku snižuje ejekční frakci levého srdce. Tuto teorii podporují výsledky chirurgických zásahů vedoucích k redukci obstrukce ve výtokovém traktu levého srdce.

Dalším mechanismem, díky kterému by mohlo docházet k rozvoji hypertrofie, je neefektivní využívání energetických zdrojů.<sup>42,45</sup> Mutované proteiny mají vyšší spotřebu ATP, čímž následně vzniká jeho relativní nedostatek. V buňkách díky tomu zůstává vyšší množství  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytosolu, jelikož jeho odčerpání do sarkoplazmatického retikula je energeticky velmi náročný proces. Vyšší koncentrace vápenatých iontů v cytosolu je

jedním ze stimulátorů vzniku hypertrofie a následované apoptózou buňky podmíněnou mitochondriálním selháním (obr. 2.4).<sup>30,46,47</sup>



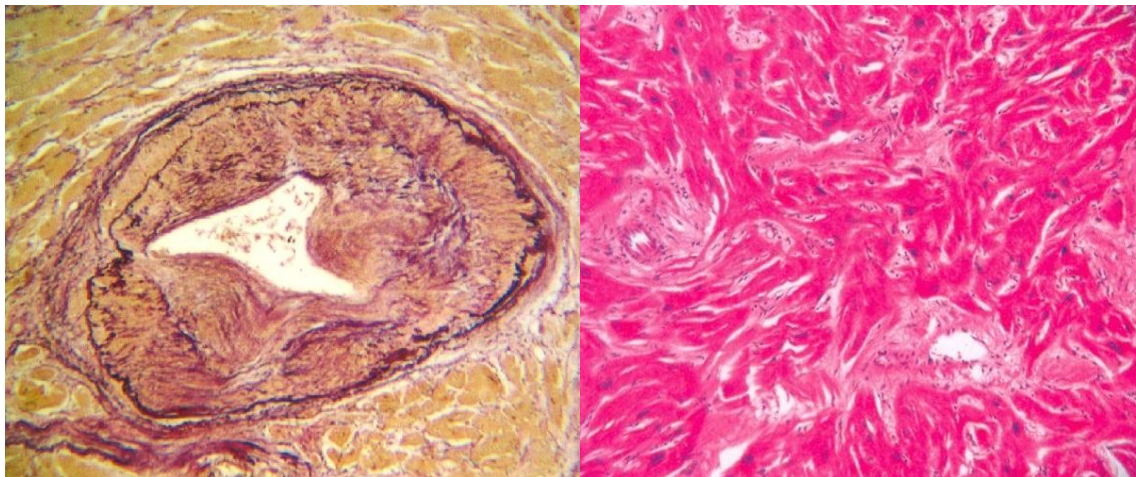
Obr. 2.4 Možné schéma patogeneze hypertrofie. Převzato z monografie Veselka et al. *Hypertrofická kardiomyopatie a příbuzná témata*, Galén, 2006, a upraveno. ATP = adenosintrifosfát, AMP = adenosinmonofosfát.

Patofyziologie hypertrofické kardiomyopatie je komplexní problematika, zahrnující kromě procesu vzniku samotné hypertrofie i další děje, přispívající k celkovému obrazu choroby. K těmto procesům se řadí vznik a rozvoj systolické a diastolické dysfunkce, účast nitrokomorové obstrukce a mechanismus jejího vzniku, dále příčiny ischemie myokardu a arytmií, rozvoj funkční poruchy mitrálního aparátu a v neposlední řadě často pozorovaná porucha regulace krevního tlaku a postižení kosterního svalstva.<sup>48</sup> Popis jednotlivých procesů by však byl nad rámec předkládané práce.

### 2.3.1.3 Patologie hypertrofické kardiomyopatie

Abnormální morfologie srdce postiženého hypertrofickou kardiomyopatií je dobře patrná na všech úrovních patologického pozorování (makroskopický, mikroskopický a elektronmikroskopický obraz). Jejimi charakteristickými znaky jsou hypertrofie myokardu,

myocytární disarray, intersticiální fibróza a charakteristické postižení intramyokardiálních arterií (obr 2.5).



*Obr. 2.5 Vlevo silnostěnná intramyokardiální arterie se ztlustělou intimou a médií a nepravidelně rozvlákněnou vnitřní i zevní laminou (tmavá). Barveno na elastická vlákna (van Gieson, 400x zvětšení). Vpravo „disarray“ svalových vláken hypertrofického myokardu se světlými ložisky fibrózy (hematoxylin-eozin, 100x zvětšení). Převzato z monografie Veselka et al. Hypertrofická kardiomyopatie a příbuzná témata, Galén, 2006.*

Postižené srdce mívá zvýšenou hmotnost (u dospělých průměrně 500 – 800 g) při zachovalé obvyklé velikosti. To je dáno restriktivním charakterem onemocnění, kdy dutina levé komory bývá značně zmenšená (obr. 2.6). Samotná hypertrofie je orientována většinou asymetricky v levokomorovém septu a je často spojena s obstrukcí výtokového traktu (obstrukční hypertrofická kardiomyopatie),<sup>49</sup> ovšem může postihnout jakoukoliv část myokardu v jakémkoliv rozsahu.<sup>29</sup>

Makroskopicky lze dále často nalézt postnekrotické jizvy a nápadnou fibrózu stěny myokardu, která vzniká v místě mechanického dráždění předním cípem mitrální chlopně. Až u jedné poloviny případů jsou pozorovatelné tzv. myokardiální můstky,<sup>50</sup> které by mohly stlačením věnčité tepny přispívat ke vzniku ischemie s následkem náhlé smrti.





Obr. 2.6 Schematické porovnání zdravého srdce (vpravo) a srdce postiženého hypertrofickou kardiomyopatií (vlevo). Převzato z <http://stanfordhospital.org/>.

Na mikroskopické úrovni je jasně viditelná hypertrofie jednotlivých myocytů o velikosti až 90  $\mu\text{m}$  (normální velikost je 10 – 15  $\mu\text{m}$ ) a změny jejich jader (hyperchromázie, změna tvaru). Nejspecifičtějším znakem je neuspořádanost svalových snopců, myocytů a myofibril, tzv. disarray.<sup>49,51</sup> Lze ji nalézt i mimo hypertrofované úseky myokardu a je podkladem kontrakčních a arytmiických poruch. Součástí komplexního histologického obrazu je i intersticiální fibróza,<sup>52</sup> která pravděpodobně vzniká primárně a s rostoucím věkem objem kolagenu v postiženém srdci postupně narůstá. Kompletní nález u většiny případů uzavírá nález intramyokardiálních arterií se ztlustělou intimou a medií, pravděpodobně důsledkem zmožení hladkosvalových buněk a kolagenu.<sup>53</sup> Tyto cévy se vyskytují nejčastěji v hypertrofovaných úsecích a přispívají ke vzniku ischemie. Zda jsou primární nebo sekundární změnou, zůstává neobjasněno. Při studiu ultrastruktury postižené tkáně lze zjistit zmnožení sarkomer, mitochondrií a poruchu desminu,<sup>54</sup> který se podílí na formování tvaru buněk.

Všechny uvedené patologické aspekty nejsou pro hypertrofickou kardiomyopatii zcela specifické. Podobné změny jsou pozorovatelné i u jiných geneticky podmíněných chorob, jako například Fabryho choroba,<sup>55</sup> Friedrichova ataxie,<sup>56</sup> syndrom Noonanové,<sup>57</sup> aj. Podobná hypertrofie je patrná i u tzv. atletického srdce, pro které je ale charakteristický jiný histologický obraz.<sup>58,59</sup> Biopstické vyšetření má u hypertrofické kardiomyopatie omezenou výpovědní hodnotu.<sup>60,61</sup> Výše uvedené patologické změny se často nachází mimo dosah bioptomu a vzhledem k jejich nespecifitě nelze pozitivní nález jednoznačně

zhodnotit bez ohledu na klinická a echokardiografická data. Pro diagnózu hypertrofické kardiomyopatie je tedy nutno shrnout všechna dostupná data, nejen histologická, a posoudit je jako celek s přihlédnutím k aktuálnímu stavu.

### 2.3.1.4 *Klinický obraz*

Projevy hypertrofické kardiomyopatie jsou minimálně stejně rozmanité, jako její genetické a histologické pozadí. Většina (až 70 %) nositelů mutace zůstane celý život bezpříznaková. Řada nemocných si svá omezení vůbec neuvědomuje, protože je postupně úspěšně kompenzovala. Pokud dojde k fenotypovému projevu choroby, děje se tak nejčastěji v období mezi 12 až 18 rokem života. Jsou ovšem známy mutace, jejichž projevy nastupují až v pozdějším věku a bývají obvykle mírnějšího rázu.<sup>62</sup> I když mají pacienti s rozvinutými symptomy horší prognózu, asymptomatictí nosiči mutace nejsou v žádném případě chráněni před náhlou smrtí. Častá nevědomá automatická kompenzace mírných příznaků spolu s dobrou trénovaností organismu dělají z hypertrofické kardiomyopatie nejčastější příčinu náhlých úmrtí mladých sportovců, což je velmi varovný ukazatel pro všechny sportovní lékaře.<sup>63</sup>

Nejčastějším příznakem tohoto onemocnění je dušnost, vznikající mimo jiné v souvislosti s diastolickou dysfunkcí. Nelze vyloučit ani další vlivy včetně svalové slabosti způsobené postižením kosterního svalstva u určitých typů mutací.<sup>64</sup> Dalším častým příznakem bývá angina pectoris a palpitace. Nejzávažnějším příznakem z hlediska stratifikace budoucího rizika pro pacienta jsou synkopy a presynkopy. Jejich příčin může být opět mnoho, včetně supraventrikulární tachykardie, ventrikulární tachykardie nebo poruchy v regulaci systémového tlaku. Opakované, jinak nevysvětlitelné synkopy bývají hlavním rizikovým faktorem náhlých úmrtí, zejména mladých lidí.

Náhlá smrt je nejvíc devastujícím a často bohužel také prvním příznakem hypertrofické kardiomyopatie. Probíhá pod obrazem náhlé tachykardie nebo fibrilace komor a jejím podkladem je zřejmě větší ischemické ložisko. Rizikové faktory jsou zejména nízký věk (10 – 35 let), pozitivní rodinná anamnéza a výrazná hypertrofie myokardu. V nadpoloviční většině případů k ní dochází v klidu nebo jen při mírné námaze, zbytek pak připadá na výraznou zátěž, například během sportu. Je zajímavé, že s vyšším věkem riziko náhlé smrti klesá, zřejmě v souvislosti s kompenzačními změnami.

Hypertrofická kardiomyopatie může vzniknout v jakémkoliv věku, s rozmanitou symptomatologií a těžko určitelnou prognózou. Pacienti nesoucí mutaci asociovanou s hypertrofickou kardiomyopatií a osoby ve zvýšeném riziku jsou tedy vázáni nutností celoživotních lékařských kontrol.<sup>65</sup>

### **2.3.1.5 Diagnostika a možnosti léčby**

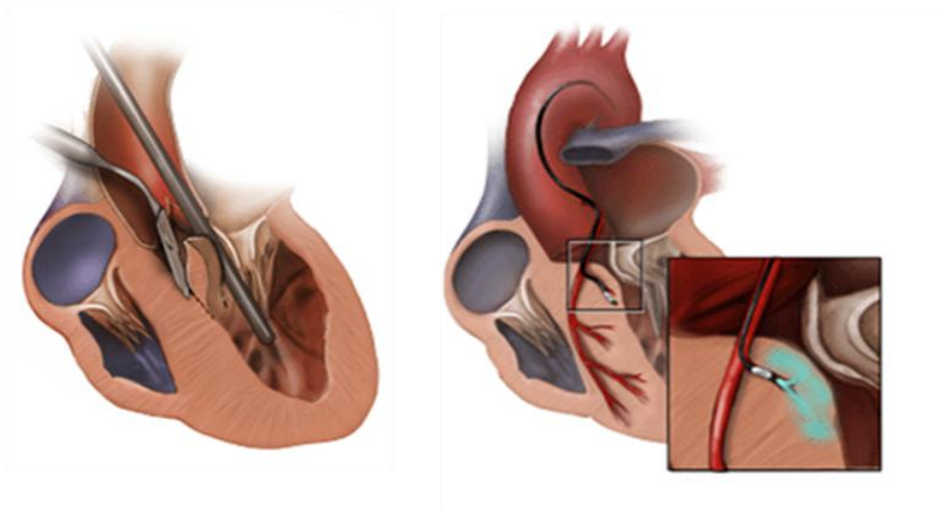
Diagnostika hypertrofické kardiomyopatie je založena především na anamnéze a fyzikálním vyšetření. Při sestavování rodinné anamnézy jsou cenné zejména informace o náhlých a jinak nevysvětlitelných úmrtích, zejména v mladém věku. Zcela dominantní postavení má u diagnostiky hypertrofické kardiomyopatie echokardiografické vyšetření, které dokáže s vysokou mírou spolehlivosti zmapovat míru hypertrofie a posoudit závažnost nitrokomorové obstrukce. Nejpoužívanější je dvourozměrná echokardiografie, často též dopplerovská echokardiografie v kombinaci s tkáňovým zobrazením.<sup>66</sup> Kontrastní echokardiografie se používá jako pomůcka při alkoholové septální ablacii, kde zvyšuje bezpečnost léčebného výkonu.<sup>67</sup> Magnetická rezonance a trojrozměrná echokardiografie nejsou vzhledem k náročnosti a cenovému hledisku rozšířené techniky.<sup>68</sup> Pro běžné screeningové vyšetření je využívána i klasická EKG metoda, nicméně její výsledky nekorelují s velikostí obstrukce ani s klinickými projevy. Při posuzování chronotropie má význam 24hodinové monitorování EKG dle Holtera, které může přispět ke stratifikaci rizika náhlé smrti. V této indikaci se používají i klasické zátěžové testy, kdy může být odhalena neschopnost odpovídající regulace krevního tlaku, což je významný rizikový faktor, hlavně u mladších pacientů. Laboratorní markery nejsou při vyšetřování hypertrofické kardiomyopatie používané, slibně se jeví využití určování plazmatických hladin natriuretických peptidů, které vykazují jistou korelaci s tíží obstrukce ve výtokovém traktu levé komory.<sup>69,70</sup>

Diferenciální diagnostika hypertrofické kardiomyopatie není v mnoha ohledech jednoduchá. U neobstrukčních forem je nutné vyloučit zejména tzv. atletické srdce, střídatavé choroby, primární hypertenzi aj. U obstrukčních forem je pak nutné vyloučit především aortální stenózu.

Terapie hypertrofické kardiomyopatie se v současné době zaměřuje na dva hlavní cíle, kterými jsou potlačení klinických projevů nemoci a snížení rizika náhlé smrti. Zhruba

10 až 20 % pacientů je zařazeno do skupiny se zvýšeným rizikem náhlé smrti, díky výskytu alespoň jednoho z rizikových faktorů. Těmito se rozumí zejména rodinná anamnéza náhlé smrti spojená s nízkým věkem pacienta, proběhlá synkopa nebo presynkopa, prodělaná resuscitace, výrazná hypertrofie stěn levé komory (neplatí vždy, jsou známy genotypy, u kterých je i přes vysoké riziko náhlé smrti hypertrofie minimální), časté záchvaty komorové tachykardie a neschopnost adekvátní regulace krevního tlaku při zvýšené námaze (často až hypotenzní reakce). Při přítomnosti více jak jednoho rizikového faktoru je indikována implantace kardioverteru-defibrilátoru. Nesprávné odhadnutí rizika může mít fatální následky.

Medikamentózní léčba zaměřená na zmírnění projevů onemocnění u symptomatických pacientů ovlivňuje zejména tepovou frekvenci a diastolické parametry ve smyslu prodloužení plnicí části diastoly levé komory. Nejčastějším lékem volby bývají betablokátory, verapamil, inhibitory angiotenzin-konvertujícího enzymu, spironolakton a statiny. Tyto léky ovlivňují též vývoj ischemie a dopad nitrokomorové obstrukce. U pacientů pod plnou medikací s přetrvávajícími symptomy může být provedena septální myektomie, kdy dochází k chirurgickému odstranění části myokardu v oblasti interventrikulárního septa. Dalším účinným zákrokem je alkoholová septální ablace, při které je do postižené oblasti myokardu, resp. do septální větve zásobující část myokardu zodpovědnou za obstrukci, vstříknut pomocí katetru koncentrovaný alkohol. Tím dojde k řízenému infarktu požadované části srdečního svalu (obr. 2.7). Obě techniky významně snižují obstrukci ve výtokovém traktu levé komory a u převážné většiny nemocných minimalizují příznaky onemocnění.<sup>71,72</sup>



Obr. 2.7 Schematické naznačení chirurgické septální myektomie (vlevo) a alkoholové septální ablace (vpravo). Převzato z <http://stanfordhospital.org/>.

### 2.3.2 Vybrané markery onemocnění

Zatím popsané patofyziologické aspekty hypertrofické kardiomyopatie nabízejí řadu různých mechanismů, jejichž přičiněním mohou vzniknout v krvi charakteristické kvantitativní i kvalitativní změny v zastoupení jednotlivých proteinů. Charakterizací těchto změn bychom mohli lépe odhadnout míru rizika pro konkrétního pacienta nebo například určit cíl pro medikamentózní léčbu. Námi zvolené potenciální markery hypertrofické kardiomyopatie lze rozdělit funkčně do několika skupin, jejichž přehled a stručná charakteristika jsou uvedeny níže.<sup>73</sup>

#### 2.3.2.1 Matrixmetaloproteázy a jejich inhibitory

Matrixmetaloproteázy (MMP) jsou endopeptidázy s želatinázovou a/nebo kolagenázovou aktivitou, jejichž kofaktorem jsou zinečnaté ionty. Tyto proteiny mohou degradovat všechny typy extracelulární matrix a jejich aktivita je regulována odpovídajícími inhibitory. Rodina matrixmetaloproteáz může být rozdělena do několika skupin vzhledem k evoluční příbuznosti nebo funkci. K dnešnímu dni je popsáno 25 zástupců. Tkáňové inhibitory matrixmetaloproteáz (TIMP) tvoří rodinu o čtyřech zástupcích, TIMP-1 až TIMP-4.

U hypertrofické kardiomyopatie je pozorována změna v metabolismu kolagenu ve smyslu posunu syntézy k fetálním formám (od kolagenu typu I ke kolagenu typu III).

Během tohoto významného remodelačního procesu hrají matrixmetaloproteázy a jejich inhibitory esenciální roli. Narušení jejich vzájemných hladin by mohlo vysvětlovat zvýšený výskyt fibrotických ložisek u hypertrofické kardiomyopatie. Matrixmetaloproteázy i jejich inhibitory mohou být ovlivňovány řadou dalších molekul a procesů, jako například endotelin-1, TNF $\alpha$ , oxidační stres, a další.

V souvislosti s hypertrofickou kardiomyopatií byly popsány kvantitativní změny u plazmatických/sérových proteinů MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 a TIMP-4.<sup>74,75</sup>

### **2.3.2.2 Markery aktivace destiček**

Jednou z abnormalit, která částečně charakterizuje hypertrofickou kardiomyopatii, je hyperplazie intimy a medie intramyokardiálních cév. Potenciál k rozvoji těchto změn může mít růstový faktor produkovaný destičkami. Zatím nebyla publikována žádná práce, která by tuto problematiku blíže popisovala, nicméně byly pozorovány změny ve tvaru a funkci destiček u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií.<sup>76</sup> Popisované trombocyty mají obvykle větší tvar, zvýšenou permeabilitu membrány a jsou náchylnější k proagregačním signálům. Nález pozitivně koreluje s tloušťkou hypertrofovaného myokardu.<sup>77</sup> V souvislosti s jejich zvýšeným potenciálem k aktivaci byly popsány změny v koncentracích několika proteinů – markerů aktivace destiček (P-selektin, sCD40L a bTG).<sup>78</sup> U pacientů s neobstrukční formou byla významně změněna jen sérová hladina P-selektinu.<sup>73</sup>

### **2.3.2.3 Markery endoteliální dysfunkce**

Další v řadě poruch cév u hypertrofické kardiomyopatie je dysfunkce endotelu. Ten vykazuje abnormální vazokonstrikční odpověď na různé provokační podněty. Porucha vazomotorické funkce se následně projeví hypoperfuzí a nezávisle koreluje s tloušťkou stěny.<sup>73</sup> Přesný mechanismus vzniku není znám. Bylo popsáno několik molekul, jejichž koncentrace v periferní krvi je zvýšená (endotelin 1, inhibitor tkáňového faktoru, solubilní trombomodulin, asymetrický a symetrický dimetylarginin).<sup>79</sup> V nedávné době byly popsány statisticky významné změny v koncentraci von Willebrandova faktoru, který je v dnešní době nejpoužívanějším ukazatelem endoteliální dysfunkce.<sup>80</sup>

### 2.3.2.4 *Markery tlakového přetížení*

Velmi významnými molekulami v laboratorní diagnostice kardiovaskulárních chorob jsou natriuretické peptidy. Tyto peptidové hormony jsou syntetizovány predominantně v kardiomyocytech (ANP, BNP, NT-proBNP) nebo endotelem cév (CNP), jako reakce na tlakové nebo objemové přetížení. Tvoří protipól k ose renin-angiotenzin-aldosteron, snižují aktivitu sympatiku. Jejich biologické účinky zahrnují zejména vazodilataci, zvýšenou diurézu a inhibici buněčného růstu. Plazmatické hladiny ANP, BNP a NT-proBNP pozitivně korelují s výší srdečních plnicích tlaků a jsou tedy výbornými ukazateli přítomnosti dysfunkce levé komory.<sup>81,82</sup>

Ostatní proteiny zahrnuté v naší studii se řadí mezi markery zánětu a apoptózy,<sup>83,84</sup> protrombotické markery,<sup>78,85</sup> růstové faktory,<sup>86,87</sup> hormony,<sup>88</sup> markery myonekrózy<sup>89</sup> a jiné diagnosticky zajímavé proteiny asociované s hypertrofickou kardiomyopatií.

### 2.4 Proteomika v klinické diagnostice – *status quo*

Včasně rozpoznání nemoci je zásadním faktorem, který ovlivňuje šanci pacientů na úspěšné vyléčení. Současná medicína se při stanovení diagnózy opírá v čím dál větší míře o specializovaná laboratorní vyšetření, která vychází ze znalosti převážně proteinových a peptidových molekul, jejichž koncentrace v krvi, moči nebo jiném biologickém materiálu více či méně koreluje s výskytem konkrétního patologického procesu.<sup>90</sup> Sledování přítomnosti nebo změn koncentrací těchto molekul může odhalit již velmi brzká stadia onemocnění.

Proteiny přítomné v tělesných tekutinách a zejména v krvi, spoluvytváří obraz aktuálního zdravotního stavu organismu. S trochou nadsázky se dá říci, že jakákoliv vnitřní či vnější změna dokáže v těle zanechat po různě dlouhou dobu jakýsi proteinový „otisk palce“. V této souvislosti se pojmy biomarker, ukazatel patologického stavu, marker a klinická proteomika v posledních letech stali jedněmi z nejfrekventovanějších termínů v oblasti biomedicínského výzkumu. Dle definice americké vládní agentury pro potraviny a léčiva, FDA (Food and Drug Administration, USA), je marker charakteristika, která je objektivně měřitelná, použitelná jako indikátor normálního biologického procesu, patologického procesu nebo odpovědi na farmakologickou intervenci (<http://www.fda.gov/>). Z bioanalytického hlediska je pak marker molekula, jejíž přítomnost, případně kvantitativní charakteristika je stanovitelná nejčastěji pomocí specifických monoklonálních protilátek automatizovanými systémy, a která má popsany vztah ke sledovanému onemocnění.

Existuje mnoho různých definic markerů. Všem je ale společné, že ideální marker by měl nabídnout především jasné stanovení a posouzení diagnózy, zejména u pacientů, kteří nemají specifické klinické příznaky. Měl by dále splňovat několik základních požadavků: především vysokou specifčnost vzhledem k předpokládanému onemocnění, vysokou orgánovou/tkáňovou specifčnost a dostatečnou míru citlivosti. Poměrně důležitým aspektem při mnoha vyšetřeních je také korelace sledovaného laboratorního parametru s rozsahem poškození tkáně nebo orgánu. S tímto výčtem ještě úzce souvisí přijatelná dynamika daného markeru v čase a možnost spolehlivého stanovení jeho hraničních hodnot. Některé molekuly mají příliš krátký poločas výskytu v krvi či tkáni nebo je jejich koncentrace významně ovlivňována jinými faktory a nelze je tedy jako



klinické indikátory použít. Nezanedbatelným požadavkem oblasti klinické diagnostiky je též možnost standardizace stanovení s přijatelnou mírou variability, snadná interpretace získaných výsledků a srozumitelnost výstupů pro lékaře i pacienta.

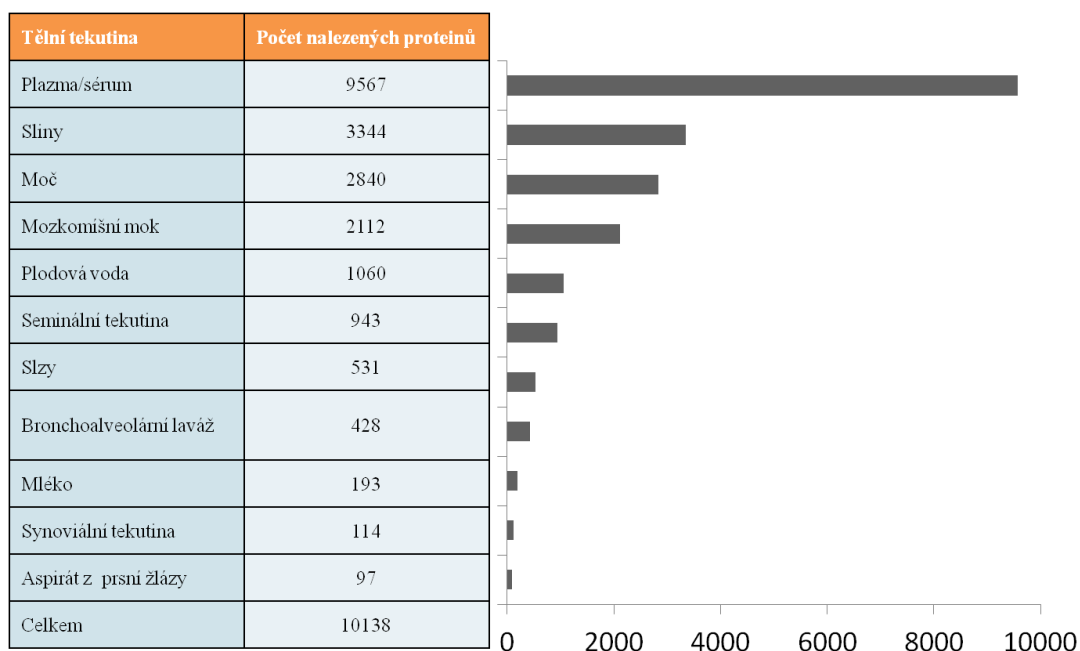
Ačkoliv proteomika stála dlouhou dobu ve stínu genetického výzkumu, postupně se díky významné progresi v oblasti instrumentálních metod dostala do popředí zájmu mnoha vědeckých a dnes i klinických pracovišť. Bylo by ale chybou se domnívat, že se podobor klinická proteomika zrodil až v posledních letech. Dnes běžně používané metody klinické biochemie jako například stanovení bílkoviny v moči, elektroforéza sérových proteinů, ale i různé imunochemické metody jsou výsledkem aplikace proteomických poznatků získaných experimentální cestou do praxe. Tento trend stále zůstává hlavním směrem klinické proteomiky, protože zájem o identifikaci nových markerů, které by umožnily odhalit onemocnění ještě v bezsymptomatických stádiích neustále roste.

Proteinové markery se staly lákavým cílem řady nových studií zabývajících se hledáním biologických ukazatelů různých chorob zejména pak nádorových či kardiovaskulárních. Jednou ze základních otázek každého proteomického projektu z oblasti klinických markerů je volba výchozího biologického materiálu. Ačkoliv jsou zdroje potenciálních proteinových markerů velmi pestré, za nejperspektivnější je považována krev, resp. krevní plazma nebo sérum. Krev přichází do kontaktu se všemi buňkami těla, tedy i s těmi patologicky změněnými, které mohou produkovat množství různých více či méně specifických molekul. Ty je pak možné v krvi nalézt a kvantifikovat často dlouhou dobu před nálezem patologického ložiska. Mezi další využívané zdroje patří moč, plodová voda, sliny, cerebrospinální tekutina, komorová voda, synoviální tekutina,<sup>91</sup> bronchoalveolární laváž nebo aspirát z prsní žlázy.<sup>92</sup> Tyto zdroje již nemohou poskytnout tak široké spektrum proteinů k analýze jako krev, nicméně jejich vypovídající hodnota oproti krvi markantně vzrůstá v případě, že se onemocnění týká specificky oblasti jejich výskytu (obr. 2.8). Jasným příkladem může být analýza moče při podezření na nádorové onemocnění močového měchýře.<sup>93,94</sup> Analýza tělních tekutin, zejména krve, může být v mnoha případech vhodnou alternativou histologického vyšetření bioptického vzorku, jehož odběr nemusí být vždy snadno proveditelný a představuje pro pacienta podstatně větší zátěž ve srovnání s klasickým odběrem periferní krve.

Proteomické přístupy vedoucí k odhalení nového ukazatele lze zpravidla rozdělit do tří kroků:

1. v souhrnu všech identifikovaných proteinů určit ty, které mají prokazatelný vztah k dané chorobě
2. kandidátní proteiny porovnat a vybrat zástupce, kteří budou nejlépe odpovídat požadavkům kladeným na klinické markery
3. vytvořit jednoduchou metodu pro stanovení tohoto markeru a klinicky ověřit vhodnost postupu

Většina potenciálních markerů není z různých důvodů schopna splnit vysoké požadavky na ně kladené. Často není vytipovaná molekula dostatečně specifická pro zkoumané onemocnění, nebo je přítomna v tak malé koncentraci, že není možné ji dnešními technikami spolehlivě identifikovat a kvantifikovat. I proto po rychlém vzestupu zájmu o markery došlo k jistému vystřízlivění. Klinická proteomika ale nadále poskytuje účinnou platformu pro studium kvalitativních i kvantitativních charakteristik biologických vzorků. Výsledky získané touto cestou mohou ukázat na nové terapeutické cíle a naplňovat požadavky tzv. personalizované medicíny.



Obr. 2.8 Počty všech identifikovaných proteinů v lidských tělních tekutinách (zdroj [www.biosino.org](http://www.biosino.org)).

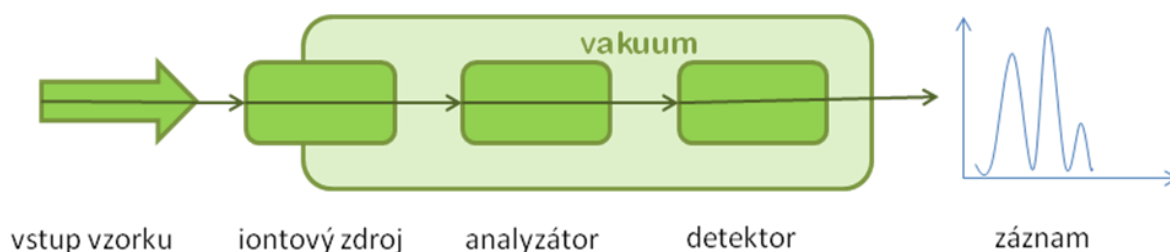
## 2.5 Hmotnostní spektrometrie v proteomice

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika, která umožňuje velmi přesně určit molekulovou hmotnost analyzovaných látek a jejich fragmentů po jejich převedení na ionty. Získané informace jsou zpracovány do podoby hmotnostního spektra, kde na ose x je uvedena efektivní molekulová hmotnost  $m/z$  (mass-to-charge ratio) a na ose y relativní zastoupení jednotlivých iontů ve studované směsi, měřené pomocí součtu jejich dopadů na detektor hmotnostního spektrometru. Z dat získaných touto technikou lze určit primární strukturu analyzovaných molekul, resp. jejich fragmentů, případně lze charakterizovat přítomné modifikace jejich struktury a určit jejich kvantitativní charakteristiky.

Významnými událostmi usnadňujícími využití MS v proteomice byly práce Johna Bennetta Fenna na vývoji elektrosprejové ionizace (ESI, electrospray ionization)<sup>95</sup> a Koichiho Tanaky, Franze Hillenkampa a Michaela Karase na rozvoji jemné laserové desorpce a techniky ionizace/desorpce laserem za účasti matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization),<sup>96,97</sup> které byly oceněny Nobelovou cenou. Obě šetrné ionizační techniky našly okamžitě uplatnění v tomto dynamicky se rozvíjícím mladém oboru.<sup>98</sup> Dnes se vývoj hmotnostních spektrometrů, nejen v proteomice, soustřeďuje zejména na zlepšování rozlišovacích schopností, zvyšování dynamického rozsahu měření, určení přesné hmoty a optimalizaci rychlosti jednotlivých analýz, což má význam například v rutinní klinické diagnostice.

### 2.5.1 Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr je složen ze tří základních komponent - iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detekčního systému (obr. 2.9).



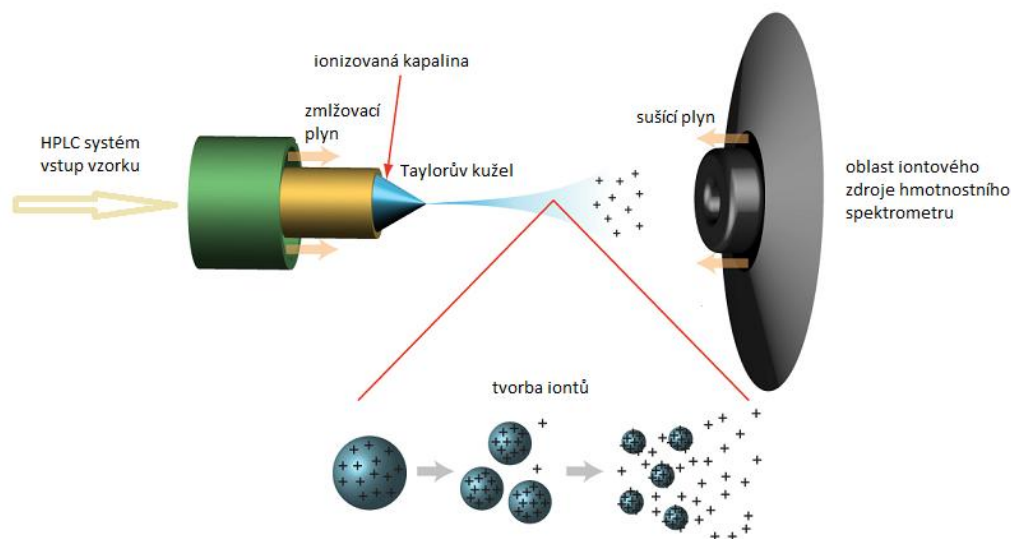
Obr. 2.9 Schéma hmotnostního spektrometru.

### 2.5.1.1 Iontové zdroje - typy ionizace

V iontovém zdroji jsou analyzované látky převedeny na ionty v plynném skupenství, které jsou dále usměrněny do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k jejich separaci na základě rozdílného  $m/z$ . Typů iontových zdrojů je celá řada a jejich využití je určeno charakterem analyzovaných látek. V proteomice patří mezi téměř výhradně používané měkké iontové zdroje ESI a MALDI.

#### Elektrosprejová ionizace

ESI je v proteomice obecně nejrozšířenější ionizační technikou, která se téměř výhradně používá ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Její předností je zejména šetrnost ke struktuře analytu, jelikož téměř nedochází ke vzniku fragmentových iontů.<sup>99</sup> Další významnou vlastností je produkce vícenásobně nabitých iontů  $[A+nH]^{n+}$ , což umožňuje charakterizaci větších molekul. K ionizaci elektrosprejem dochází za atmosférického tlaku, kdy je vzorek v polárním rozpouštědle přiváděn do zdroje kapilárou, na níž je aplikováno vysoké napětí (3 – 5 kV) a pomocný zmlžovací plyn. Zároveň je na elektrodu vstupní štěrby hmotnostního analyzátoru připojen opačný pól napětí. Přítomné elektrické pole umožňuje vznik tzv. Taylorova kuželu<sup>100</sup> (obr. 2.10). Anionty analytu se pohybují směrem ke sprejovací kapiláře, kationty se pak koncentrují ve špičce kuželu a díky proudu zmlžovacího plynu jsou nesené ve formě aerosolu ke vstupu do analyzátoru. S postupným odpařováním molekul rozpouštědla se koncentrace povrchového kladného náboje v kapkách zvyšuje, až dojde k tzv. Coulombické explozi a vzniknou kapky výrazně menší. Nakonec dojde k uvolnění molekulárního iontu zbaveného rozpouštědla a tento je uveden do evakuované části hmotnostního spektrometru – hmotnostního analyzátoru.



Obr. 2.10 Schéma elektrosprejového iontového zdroje. HPLC = vysokoučinná kapalinová chromatografie.

### Desorpce/ionizace laserem za účasti matrice

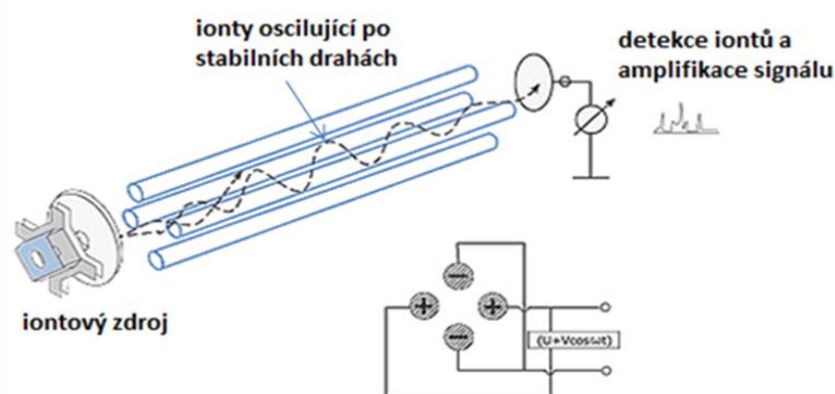
Při MALDI ionizaci vznikají zejména jednou nabitě ionty  $[A+H]^+$  nebo  $[A-H]^-$ , ke vzniku fragmentových iontů dochází ve velmi omezené míře.<sup>101</sup> Při vlastní ionizaci jsou směsné krystaly vzorku a matrice na vhodném nosiči (kovová destička) ozářeny krátkým výbojem laseru. Dochází k absorpci energie matricí a jejímu rozpadu za současného uvolnění a ionizace molekul vzorku.<sup>102</sup> Vzniklé ionty jsou silným elektrickým polem urychleny k evakuovanému analyzátoru, kterým je nejčastěji analyzátor doby letu (TOF, Time-of-Flight).

#### 2.5.1.2 Analyzátory hmotnostních spektrometrů

Po ionizaci ve zdroji analyty v podobě nabitých částic vstupují do hmotnostních analyzátorů. Ty slouží zejména k jejich separaci na základě rozdílných hodnot  $m/z$ . V současné době lze hmotnostní analyzátory rozdělit do několika skupin na základě jednotlivých principů separace iontů. Jedním z hlavních parametrů hmotnostních analyzátorů je jejich rozlišovací schopnost. Ta se dnes nejčastěji určuje pomocí definice založené na hodnotě šířky píku v polovině jeho výšky. V níže uvedeném stručném přehledu budou popsány jen analyzátory využívané v naší studii.

### Kvadrupólový analyzátor

Separace iontů podle hodnoty  $m/z$  v iontovém filtru typu kvadrupól je dosaženo při jejich průchodu mezi čtyřmi kovovými tyčemi umístěnými do čtverce, na které je vloženo stejnosměrné napětí vždy tak, že protilehlé páry tyčí jsou navzájem spojeny. Na jeden pár je přivedeno kladné napětí, na druhý záporné a na všechny zároveň je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí (obr. 2.11).<sup>103</sup> Při vstupu iontu do středu osy kvadrupólu, začne iont oscilovat v závislosti na velikosti střídavého napětí, které jej odkloňuje z přímé dráhy. Tyto oscilace jsou pro ionty stabilní jen při určité hodnotě  $m/z$  pro daný poměr  $U/V$ . Plynulou změnou hodnot amplitudy  $V$  a stejnosměrného napětí  $U$  dochází ke skenování celého hmotnostního rozsahu kvadrupólu a na detektor jsou postupně puštěny přítomné ionty. Citlivost detekce souvisí s rozsahem skenovaného spektra. Při snížení tohoto rozsahu se zvýší citlivost detekce. Některé používané kvadrupóly mívají rozsah až do 4 000  $m/z$ .



Obr. 2.11 Schéma kvadrupólového hmotnostního filtru.

### Iontová past

Iontová past (IT, ion trap) je v podstatě kvadrupólem v trojrozměrném uspořádání, kdy uvnitř jsou zadržovány příchozí ionty, přivedené krátkým napěťovým pulzem, které jsou následně pomocí změny vysokofrekvenční amplitudy postupně vypuzovány ze svých stabilních drah na detektor v závislosti na jejich  $m/z$ . Dnes je častěji používaná lineární iontová past (LIT, linear ion trap), která má vyšší iontovou kapacitu, zachycuje ionty s vyšší efektivitou, má vyšší citlivost, větší dynamický rozsah aj.<sup>104,105</sup>

### Analyzátor doby letu

TOF je jednoduchý analyzátor, jehož hlavní část tvoří letová trubice. Iontům vystupujícím ze zdroje je nejprve krátkým napěťovým pulzem udělena stejná kinetická energie. Následně vstupují do vakuové letové trubice a po určitém čase daném několika parametry ( $m/z$ , délka letové části, aj.) dopadají na detektor. Nevýhodou tohoto typu analyzátoru je jeho omezená rozlišovací schopnost v lineárním uspořádání. Lze ji však významným způsobem zlepšit použitím zpožděné pulzní extrakce,<sup>106</sup> která eliminuje počáteční rozdílnou distribuci kinetické energie, spojenou s laserovou ionizací. U TOF analyzátorů lze rovněž s výhodou použít tzv. reflektory,<sup>107</sup> což jsou iontová zrcadla, která odráží letící ionty po mírně odkloněné dráze směrem k detektoru. Ionty s vyšší kinetickou energií pronikají hlouběji do odrazového elektrického pole reflektoru, čímž se adekvátně prodlouží jejich dráha a na detektor dopadnou ve stejnou dobu jako ionty s nižší kinetickou energií, ale se stejným poměrem  $m/z$ . Nedochází tedy k výraznějšímu rozšiřování píků na záznamu a hmotnostní spektrum dosáhne rozlišení až 20 000. Měření v reflektronovém módu je ovšem omezeno pouze na peptidy, pro analýzu proteinů je třeba použít lineární mód. Velkou výhodou TOF analyzátorů je jejich vysoká citlivost, hmotnostní rozsah a rychlost analýzy.<sup>108,109</sup>

#### 2.5.1.3 Detektory v hmotnostní spektrometrii

Detektory používané v hmotnostní spektrometrii pro detekci iontů analyzovaného vzorku pracují často na principu fotonásobiče nebo elektronásobiče.<sup>110,111</sup> Iont dopadající na konverzní dynodu vyvolá emisi sekundárních elektronů, které dále dopadají na další dynody, a děj se kaskádovitě opakuje. V případě fotonásobiče elektrony interagují s fosforem a emitují fotony. Výsledkem je v obou případech výrazné zesílení odezvy, která je přímo úměrná počtu dopadajících iontů. Vzniklý pulz je zpracován předzesilovačem a digitalizován. U analyzátorů s Fourierovou transformací (Orbitrap, iontový rezonanční cyklotron) dochází k detekci formou indukce přímo v analyzátoru.<sup>112</sup>

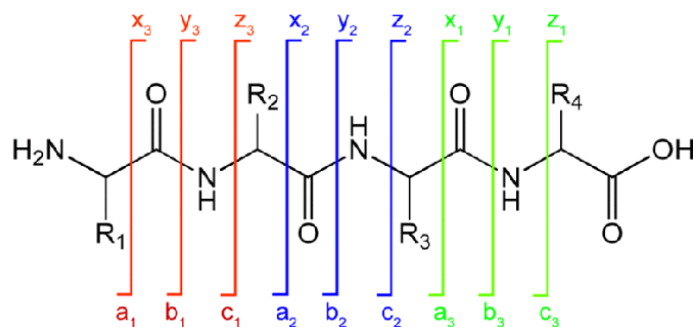
#### 2.5.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie je stěžejní technika pro zjišťování primární struktury peptidů, přesnou identifikaci proteinů a charakterizaci jejich posttranslačních modifikací. Kvantitativní aspekt tomuto přístupu dodávají různé techniky využívající

značení vzorků (izotopické, izobarické, aj.) nebo pracující na principu porovnávání získaných dat (plocha pod píkem, výška píku, atd.). Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS;  $MS^2$ ) zahrnuje alespoň dvě etapy hmotnostní analýzy, přičemž počet kroků může být zvýšen až na  $MS^n$ , kde  $n$  je počet vytvořených generací iontů. MS může být tandemová v čase, kdy např. v iontové pasti probíhá výběr i fragmentace iontů na jednom místě v různých časových úsecích nebo v prostoru, kdy se využívá zařazení dvou hmotnostních analyzátorů za sebou. Tyto analyzátoři mohou být oddělené kolizní celou, ve které dochází k fragmentaci iontů vybraných v prvním analyzátoru na tzv. produktové ionty (fragmenty). Fragmentačních metod je několik druhů a jejich použití závisí na typu hmotnostního spektrometru. Výsledné fragmenty jsou dále separovány v druhém analyzátoru a dopadají na detektor. Analyzátoři, použité pro tandemovou hmotnostní spektrometrii, mohou být buď stejného typu, např. TOF/TOF nebo trojitý kvadrupól QqQ<sup>113,114</sup> nebo mohou být sestavené z analyzátorů různého typu (hybridní hmotnostní spektrometry), např. QTOF, LIT/FT-ICR, IT-Orbitrap.<sup>115,116</sup>

### 2.5.2.1 Využití tandemové hmotnostní spektrometrie k určení sekvence peptidů

Při fragmentaci peptidů v kolizní cele dochází k přerušení vazeb mezi jednotlivými aminokyselinami a vznikají fragmentové ionty, které jsou zaznamenávány ve formě fragmentačních spekter. V peptidu lze nalézt tři typy vazeb, které je možno přerušit během fragmentace. Jsou to CO-NH, NH-CH a CH-CO (obr. 2.12). Značení jednotlivých fragmentů peptidů vychází ze zavedené nomenklatury.<sup>117,118</sup> Fragmenty, nesoucí náboj na C-konci, jsou označovány „x“, „y“ a „z“, fragmenty s nábojem na N-konci jako „a“, „b“ a „c“. Typy pozorovaných fragmentů se řídí především použitou fragmentační technikou.



Obr. 2.12 Typy peptidových fragmentů.



Při kolizí indukované disociaci (CID, collision induced dissociation) používané zejména u hmotnostních analyzátorů typu QTOF nebo QqQ vznikají nejčastěji „b“ a „y“ ionty. Ne vždy lze ve spektru nalézt oba typy iontů, navíc fragmentace často není úplná. Číslo v dolním indexu u označení fragmentu udává počet obsažených aminokyselin (např.  $y_4$ ,  $b_6$ ). Často jsou pozorovatelné též tzv. interní fragmenty, které vznikají přerušením více než jedné vazby v peptidu. Zvláštním případem interního fragmentu je tzv. immoniový iont, který obsahuje pouze jednu aminokyselinu a jeho přítomnost ve spektru jednoznačně potvrzuje její výskyt ve vybraném peptidu.

Přístup, kdy k separaci vzorku a jeho identifikaci dochází na úrovni peptidů, které byly získány enzymatickým štěpením sekvenčně specifickou proteázou, se nazývá „shotgun“. Peptidová směs je separována s použitím kapalinové chromatografie nejčastěji pomocí reversní stacionární fáze  $C_{18}$ . Chromatograf bývá on-line spojen s tandemovým hmotnostním spektrometrem. Po vyhodnocení fragmentačních spekter jednotlivých peptidů pomocí bioinformatických nástrojů lze určit jejich primární strukturu, případně přítomnost modifikací. „Shotgun“ proteomický přístup je často používán v kombinaci s kvantifikační technikou (např. iTRAQ, Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) během první mapovací fáze projektů.

### 2.5.2.2 *Využití tandemové hmotnostní spektrometrie pro kvantifikaci analytů*

Nejen pro potřeby klinické proteomiky jsou zapotřebí spolehlivé analytické postupy, které by umožnily kvantifikaci vybraných individuů napříč velkým množstvím vzorků v rozumném časovém úseku, spolu se zárukou potřebné senzitivity a reprodukovatelnosti.<sup>119,120</sup> Kvantifikační přístupy se dají rozdělit do dvou oblastí, metody nevyužívající značení, tzv. „label-free“,<sup>121</sup> a metody založené značení.<sup>122</sup> V hmotnostní spektrometrii není vždy intenzita signálu analytu přímo úměrná jeho koncentraci. Aby bylo možné kvantifikovat, musí být použito standardu nebo porovnání.

V případě label-free metod jsou porovnávány chromatografické záznamy jednotlivých vzorků a na základě porovnání intenzit nebo podle počtu nasbíraných spekter lze provádět kvantifikaci (emPAI, exponentially modified protein abundance index; APEX, absolute protein expression).<sup>123,124</sup> Předností tohoto přístupu je jeho časová a

finanční nenáročnost. Jeho použití je výhodné zejména u studií s velkým počtem vzorků, kde jsou očekávány dostatečně velké změny v koncentraci proteinů.

Druhou oblastí kvantifikačních přístupů jsou metody, které využívají značení *in vivo* nebo *in vitro*. Rozlišení analytů je zabezpečeno použitím hmotnostních značek inkorporovaných do jejich struktury. V této kategorii může být v závislosti na typu experimentu použito metabolické značení (SILAC, Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture; Super-SILAC),<sup>125,126</sup> izotopické značení (<sup>18</sup>O; GIST, Global Internal Standard Technology; ICAT, Isotope-Coded Affinity Tag; ICPL, Isotope-Coded Protein Labeling, aj.) nebo izobarické značení (např. iTRAQ; TMT, Tandem Mass Tag).<sup>122</sup> Všechny uvedené metody jsou metodami pro relativní kvantifikaci. Pro absolutní kvantifikaci se využívá cílené proteomické analýzy a standardů v podobě syntetických izotopicky značených peptidů o shodné aminokyselinové sekvenci jako sledovaný analyt (např. SID-SRM-MS).

Při samotné kvantifikaci se zpravidla vychází z určení plochy pod píkem sledovaných analytů a jejich porovnání. Kvantifikace založená na určování výšky píku se používá zejména u méně intenzivních signálů.<sup>127,128</sup> V případě izobarického značení jsou porovnávány intenzity jednotlivých reportérových iontů.

Z uvedených kvantifikačních metod je v prvních fázích studií velmi oblíbená zejména iTRAQ technologie, která je založena na chemickém značení peptidů na aminokyselinách, obsahujících volnou  $\alpha$ -aminoskupinu, tedy na lysinu a N-terminálních aminokyselinách.<sup>129,130</sup> Ke značení může být použito až osmi reagentů. Molekula značky je složena ze tří částí, které zahrnují reportérovou skupinu, balanční skupinu a skupinu reagující s peptidem. Po štěpení a značení jsou jednotlivé vzorky spojeny do jednoho směsného. Během analýzy na hmotnostním spektrometru je vidět v MS módu jeden společný pík každého peptidu, který na sobě ale nese různé značky. Molekulová hmotnost je do této doby pro všechny shodná. Po fragmentaci při MS/MS experimentu dojde k rozpadu značky a její reportérová část nesoucí náboj je zaznamenána. Kvantifikace probíhá na základě porovnání intenzit záznamů reportérové skupiny, jejíž hmotnost se u každé značky mírně liší. Na základě toho lze určit relativní kvantitu sledovaného peptidu/proteinu v jednotlivých vzorcích.

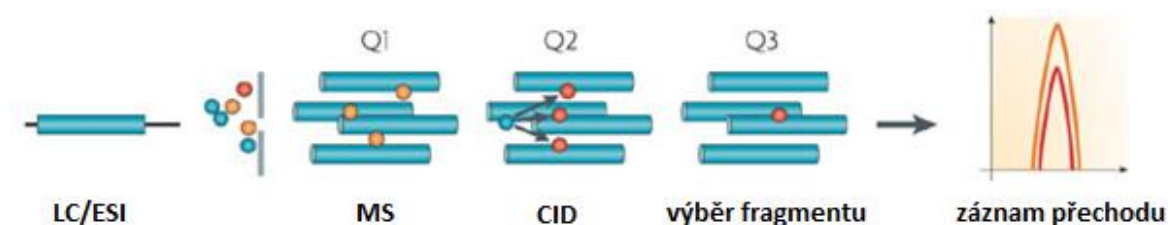
U cílených kvantifikačních analýz je dnes standardní metodou monitorování vybraných reakcí (SRM, Selected Reaction Monitoring) probíhající na hmotnostním spektrometru typu trojitý kvadrupól a využívající izotopicky značených peptidů (SID, stable isotope dilution). Tato metoda byla použita v naší studii a bude podrobně popsána dále. Poměrně novou alternativou k SRM je analýza na přístrojích s vysokým rozlišením (HR/AM, high-resolution/accurate-mass), kde je oproti klasickému trojitému kvadrupólu nahrazen třetí kvadrupól vysoce rozlišujícím analyzátozem (např. Orbitrap). Tato konfigurace pak umožňuje kvantifikaci na základě monitorování vybraných iontů (SIM, Selected Ion Monitoring)<sup>131</sup> v MS módu s následnou MS/MS analýzou, tzv. monitorování paralelních reakcí (PRM, parallel reaction monitoring). Zajímavý směr pro kvantifikaci nabízí také analýzy nezávislé na kritériích pro výběr prekurzoru (DIA, data independent analysis),<sup>132</sup> kde jsou fragmentační spektra peptidů získávána nezávisle na informaci o původním prekurzoru (např. SWATH).<sup>133</sup>

### 2.5.3 SRM a jeho využití v kvantifikaci peptidů

Nejselektivnější známou metodou pro kvantifikaci vybraných analytů je hmotnostně spektrometrická technika cílené proteomické analýzy SRM,<sup>134,135</sup> prováděná na přístrojích typu trojitý kvadrupól s ESI ionizací a předřazenou chromatografickou separací vzorku pomocí gradientové eluce na reverzní fázi. Selektivitu této metody zajišťuje průběžné monitorování předem určené kombinace  $m/z$  prekurzorového peptidu a jeho fragmentu, vzniklého kolizí indukovanou disociací, spuštěnou po záchytu hledaného prekurzoru v první části analyzátoru. Dvojice  $m/z$  prekurzor/fragment je nazývána jako přechod (transition) a je vysoce specifická pro hledaný analyt. Vylepšením této metody je zahrnutí informace o předpokládaném retenčním čase analytu, tzv. časově závislá SRM analýza (scheduled SRM).<sup>136</sup> V takovém případě jsou specifické přechody hledány jen v předem určených časových oknech, čímž se zvýší kapacita měření a v daleko menší míře dochází k záchytu falešně pozitivních signálů. SRM je metoda tandemové hmotnostní spektrometrie, která ideálním způsobem spojuje výhody shotgun proteomické analýzy s možností kvantifikace vybraných analytů v komplexním vzorku i při femtomolových koncentracích.<sup>137,138</sup>

Separované a ionizované peptidy prochází prvním kvadrupólem  $Q_1$ , který funguje jako hmotnostní filtr. Zde dochází k selektivnímu výběru hmoty  $m/z$  prekurzorového iontu.

Tento je následně zachycen v druhém kvadrupólu  $Q_2$ , kde dojde k CID fragmentaci a vzniklé fragmenty pokračují do třetího kvadrupólu  $Q_3$ , který funguje podobně jako  $Q_1$  a vybírá pouze hledané fragmenty korespondující s mateřským prekursorovým iontem (obr. 2.13).



Obr. 2.13 Schéma SRM experimentu. LC = kapalinová chromatografie, ESI = elektrostatická ionizace, CID = kolizí indukovaná disociace,  $Q$  = kvadrupól.

V jednom měření je možné pozorovat stovky přechodů. Kvantifikace analyzovaných peptidů je možná na základě vyhodnocení jejich extrahovaných iontových chromatogramů (XIC). Někdy lze v literatuře narazit na termín „pseudo“ SRM, který je používán v souvislosti s podobným měřením na jiných typech analyzátorů.<sup>134</sup> Tyto zaznamenávají celé MS/MS spektrum a výsledný SRM záznam je vytvořen *in silico* výběrem požadovaných fragmentů.

SRM analýza se na rozdíl od klasického shotgun experimentu zaměřuje na konkrétní proteiny a peptidy. Prvním krokem úspěšné tvorby SRM metody je tedy pečlivý výběr potenciálních cílových markerů následovaný definováním setu korespondujících peptidů a jejich fragmentů, optimalizací parametrů analýzy a závěrečnou validací vytvořené metody.

### 2.5.3.1 Volba proteinů pro SRM

Volba cílových proteinů vychází z požadavků prováděné studie. Většinou využíváme dat získaných v předchozích experimentech, případně velkou část informací poskytnou již publikované výsledky. Vhodně vybraný protein se nemá vyskytovat v mnoha izoformách a mutacích, výskyt jeho PTM je stabilní a dobře charakterizovaný a samotný protein se v biologické matici dá s jistotou identifikovat.<sup>139</sup> Důležitým hlediskem je i přítomnost využitelných peptidů v sekvenci.

### 2.5.3.2 Výběr peptidů

Pro úspěšnou kvantifikaci je žádoucí zvolit alespoň dva reprezentativní peptidy.<sup>140,141</sup> V drtivé většině případů volíme peptidy tzv. tryptické, které mají optimální délku 5 – 20 aminokyselin. Ačkoliv tryptický digest poskytuje celé spektrum peptidů, v MS experimentech bývá viditelná jen určitá část.<sup>142</sup> Částečně je to dáno použitou ionizační technikou nebo podmínkami chromatografické separace. Proto je výhodné pro výběr peptidů použít informace z již naměřených dat, ať vlastních nebo přístupných na internetu.<sup>143</sup> Existuje několik online úložišť obsahujících informace o hledaných proteinech a peptidech, která navíc mohou shromažďovat i naměřená spektra vložená uživateli. Většina takto přístupných dat nepodléhá žádné kontrole, proto je žádoucí k nim přistupovat obezřetně a počítat s potvrzujícím experimentem. Příkladem takových úložišť může být PeptideAtlas<sup>144</sup> (<http://www.peptideatlas.org/>) nebo PRIDE (<http://www.ebi.ac.uk/pride/>).

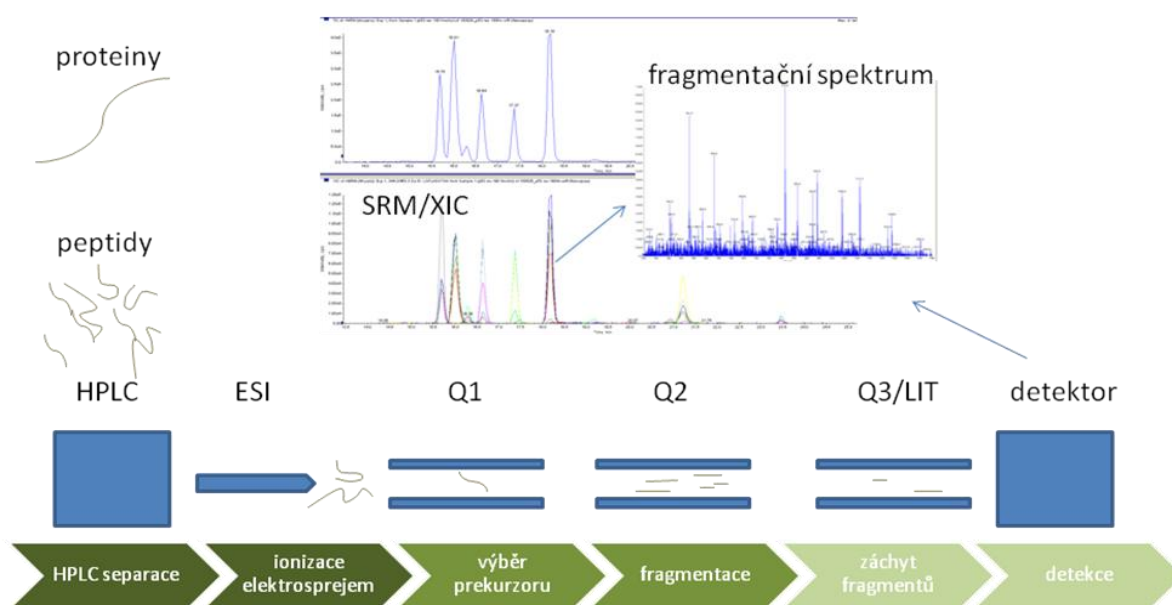
Lze nalézt publikované postupy, které popisují predikci proteotypických peptidů.<sup>145</sup> Tyto empirické přístupy pracují mimo jiné s primární sekvencí peptidů, jejich acidobazickými vlastnostmi, s délkou peptidu aj. Při SRM experimentech bývá velkou výhodou přítomnost prolinu v sekvenci. Díky svojí struktuře poskytují fragmenty s N-koncovým prolinem často velmi intenzivní signál. Naopak je lépe vyhnout se peptidům obsahujícím místa variabilního štěpení (arginin a lysin vedle sebe, přítomnost prolinu C-terminálně za R nebo K), jelikož u nich může dojít k rozdělení signálu mezi několik různých fragmentů, což znemožňuje přesnou kvantifikaci námi hledaného přechodu.

Klíčovou vlastností zvoleného peptidu je zejména jeho unikátnost pro zvolený protein či jeho izoformu. Tuto informaci lze poměrně snadno ověřit například pomocí nástroje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pokud bychom vycházeli z pravidel pravděpodobnosti a kombinatoriky, pak by platilo, že čím delší peptid, tím jistější je potvrzení jeho unikátnosti. Stejně pravidlo platí přeneseně i pro jeho fragment. V neposlední řadě je též potřeba vzít v úvahu shodnou molekulovou hmotnost leucinu a izoleucinu.<sup>146</sup> Důležitou roli hraje i přítomnost posttranslačních a chemických modifikací. Při analýze peptidů nesoucího jednu nebo více modifikací je tu vždy riziko výskytu nemodifikovaného peptidu. Při optimalizaci SRM metody je lépe se vyhnout peptidům

obsahujícím methionin a tryptofan, které jsou náchylné k oxidaci, dále glutamin a asparagin, které mohou konvertovat na glutamát a aspartát a konečně N-terminální glutamin může podléhat přeměně na pyro-glutamát.<sup>134</sup> Naopak karbamidometylace cysteinu je stabilní modifikace a peptidy obsahující cystein není třeba z analýzy vyřazovat. Zde naznačená pravidla nemusí platit absolutně. Někdy může mít cílový protein nedostatek vhodných peptidů a je na uvážení, zda pro analýzy použít i peptidy, které ve své sekvenci sporné aminokyseliny obsahují. Peptid, který je vzhledem ke všem výše uvedeným podmínkám vhodný pro analýzu na hmotnostním spektrometru, je označován jako proteotypický.<sup>145</sup>

### 2.5.3.3 Výběr SRM přechodů

Vhodně zvolená kombinace  $m/z$  prekurzorového a fragmentového iontu a optimalizace parametrů jejich analýzy jsou dalším krokem při tvorbě nové SRM metody. Nejprve je nutné vybrat převažující nábojový stav prekurzoru. Ionizace elektrospřejem ve spojení s trypsinovým štěpením poskytuje většinou dvoj- a trojnásobně nabitě peptidy, kdy jeden z těchto nábojových stavů zpravidla výrazně převažuje. V kombinaci s CID v kolizní cele trojitého kvadrupólu následně vznikají predominantně jednou nabitě y ionty, b ionty nemívají takovou intenzitu.<sup>147</sup> Pro SRM kvantifikační metodu volíme zpravidla dva až čtyři nejintenzivnější fragmenty, jejichž poměr  $m/z$  je větší než  $m/z$  prekurzoru a z důvodu interference signálu je rozdíl obou poměrů hmot větší než 20. Pokud nemáme k dispozici data z předchozích experimentů, je možné získat informace o fragmentačním spektru pomocí SRM asociované MS/MS analýzy MIDAS (MRM Initiated Detection and Sequencing).<sup>148</sup> Při takovéto analýze je v okamžiku záchytu hledaného prekurzorového iontu v  $Q_1$  spuštěna jeho fragmentace v kolizní cele a v  $Q_3$ , který v tomto módu pracuje jako lineární iontová past, je zaznamenáno celé spektrum vzniklých fragmentů, které lze následně vyhodnotit (obr. 2.14). Méně používanou alternativou je provedení nové SRM analýzy na celém spektru teoreticky vypočtených přechodů. Algoritmy pro tuto predikci jsou volně dostupné na internetu (např. Proteomic Tools <http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/>) nebo jsou součástí programů, určených pro práci se SRM daty (volně dostupné - TIQAM, Skyline; komerční produkty - MRM Pilot, Optimizer aj.).<sup>143</sup>



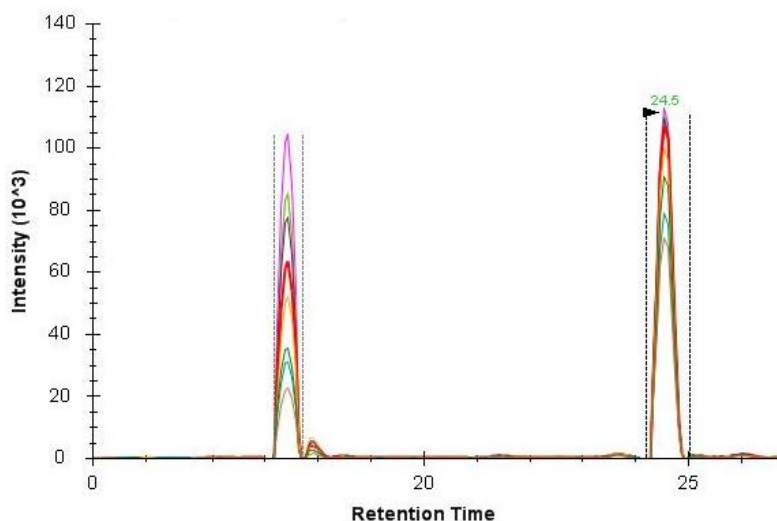
Obr. 2.14 Schéma SRM asociované MS/MS analýzy (MIDAS). HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie, ESI = elektrosprejová ionizace, Q = kvadrupól, LIT = lineární iontová past, SRM = monitoring vybraných reakcí, XIC = extrahovaný iontový chromatogram.

Při proměřování fragmentačních spekter vybraných peptidů je možné použít již zmíněný mód časově závislé SRM analýzy, který předpokládá znalost retenčních časů jednotlivých analytů. Při absenci takových informací lze využít *in silico* predikci pomocí nástroje SSRCalc (<http://hs2.proteome.ca/SSRCalc/SSRCalcX.html>).<sup>149</sup> Vhodnou pomůckou zejména při přenosu metody na jinou délku gradientu je použití běžně dostupných tzv. RT-kitů. Ty obsahují definované syntetické peptidy a díky jednoduchému kalkulátoru lze z jejich retenčních časů odvodit čas eluce ostatních analyzovaných peptidů.<sup>150</sup>

Podstatnou součástí výběru přechodů je optimalizace parametrů analyzátoru.<sup>134,147</sup> V praxi se nejčastěji určuje hodnota kolizní energie (CE, Collision Energy). V programech pro práci se SRM daty bývá CE vypočítána na základě experimentálně sestavených rovnic. Nicméně zhruba v pětině případů dokáže optimalizace této hodnoty zvýšit intenzitu fragmentu 2 až 5krát.<sup>147,151</sup> Dále je možné u některých analyzátorů nastavit optimální hodnotu deklasterizačního potenciálu (DP, Declustering Potential), který působí ve zdroji na molekuly analytu a podporuje jejich desolvataci a disociaci na jednotlivé ionty. Pokud je tato hodnota pro daný prekurzor příliš vysoká, dochází k fragmentaci peptidu již ve zdroji. Hodnota DP je pro všechny přechody jednoho prekurzoru stejná. K její optimalizaci

v praxi moc nedochází, jelikož přínos pro další analýzu není až tak velký. Oba procesy lze provádět manuálně při přímé analýze vzorku nebo s použitím metody vytvořené *in silico* (např. program Skyline). Efektivitu, rychlost a zejména kapacitu analýzy lze zlepšit i volbou vhodné délky času, po který je určitý iont sledován v rámci jednoho cyklu tzv. dwell time (DT). Alternativně k tomuto nastavení lze upravit i délku celého cyklu při zachování fixního DT, a tím zvýšit počet sledovaných přechodů.

I přes pečlivý výběr proteinů, peptidů i jejich fragmentů a precizně provedenou optimalizaci všech parametrů analýzy se může stát, že na SRM záznamu, resp. XIC záznamu uvidíme v různých časech dva a více píků s částečně shodnými přechody (obr. 2.15). Toto riziko se zvyšuje s klesajícím počtem měřených přechodů pro jeden peptid a se zkracující se délkou fragmentu. Potvrzením přítomnosti hledaného páru  $m/z$  hodnot, nejsme schopni s jistotou říci, že jde o náš hledaný peptid. Nedílnou součástí tvorby SRM metody je tedy ověření sledovaných přechodů pomocí identifikace odpovídajících peptidových MS/MS spekter získaných výše uvedenou MIDAS analýzou. K tomu můžeme využít již vytvořených databází z předchozích experimentů, dostupných databází na internetu, porovnáním s teoreticky vypočítanými hodnotami očekávaných fragmentů (Proteomic Tools – Fragment ion calculator) nebo použitím shodných syntetických peptidů (viz dále).



Obr. 2.15 XIC záznam přechodů peptidu  $SDGLPW\text{C}STTANYDTDD$ . MS/MS experiment potvrdil správnost piku nacházejícího se vpravo.



Při tvorbě SRM přechodů lze také využít program SRM Collider (<http://www.srmcollider.org/srmcollider/srmcollider.py>), umožňující nalezení možných interferencí námi vybraných přechodů se zvoleným pozadím. Závěrem by SRM metoda měla být validována v souladu s požadavky na validaci analytické metody (kap. 2.5.4).

### **2.5.3.4 Využití syntetických peptidů pro tvorbu SRM metody**

Při analýze biomarkerů pomocí techniky SRM často vycházíme z velmi komplexní biologické matrice. I po provedení imunoafinitní separace a separace pomocí kapalinové chromatografie je peptidová směs stále hodně složitá. Dochází k interferenci a k překrývání signálů jednotlivých iontů. Jen s obtížemi lze v takovémto vzorku vybrat relevantní fragmenty, případně optimalizovat podmínky analýzy. Jedním z řešení je využití syntetických peptidů pro tvorbu SRM metody. Jejich aminokyselinová sekvence je totožná s vybranými nativními peptidy.<sup>152,153</sup> Všechny výše zmíněné kroky optimalizace výběru fragmentů a parametrů analýzy jsou prováděny na směsi těchto peptidů. Nedochází k interferencím s dalšími analyty a celý proces vývoje metody se podstatně urychlí a zjednoduší. Významným přínosem při použití těchto peptidů je přesné určení retenčního času každého z nich. V komplexní biologické směsi se vyskytuje velké množství peptidů o shodném  $m/z$ . I když SRM zaručuje selektivitu výběrem jak prekurzoru, tak fragmentu, může docházet k výše zmíněnému záchytu několika různých peptidů se stejnou hmotností. Lze odhalit i případy, kdy dochází k záchytu shodných hmotností fragmentů, i když aminokyselinové složení je rozdílné.<sup>146</sup> Sledování více přechodů pro jeden peptid, jejich intenzit a určení přesného retenčního času může být v takových případech klíčové (viz obr. 2.15).

### **2.5.3.5 Využití syntetických peptidů pro kvantifikaci pomocí SRM**

Cílem klinických studií kandidátních molekul bývá ve většině případů popsání jejich kvantitativních rozdílů mezi dvěma definovanými stavy organismu (nejčastěji přítomnost či nepřítomnost určité choroby). SRM analýza umožňuje selektivně sledovat pouze vybrané analyty napříč velkým množstvím vzorků ve velmi krátkém čase.

Jako velmi perspektivní technika pro kvantifikaci ve spojení se SRM se ukázala tzv. SID (Stable Isotope Dilution) kvantifikace, tedy kvantifikace SRM cílenou proteomickou analýzou s využitím stabilního izotopového značení standardních peptidů o

známé koncentraci (SID-SRM-MS).<sup>154</sup> Při ní jsou ke vzorku během jeho přípravy přidány identické syntetické peptidy izotopicky značené na uhlíku a dusíku (C13 N15) koncového lysinu nebo argininu, což způsobuje posun v relativní molekulové hmotnosti peptidu o určitou hodnotu (zpravidla o 6 – 10 Da). Díky tomuto posunu jsou jednotlivé dvojice píků snadno odlišitelné v SRM, resp. XIC záznamu. Vzhledem k identické struktuře se chromatograficky chovají naprosto shodně. Známa koncentrace standardu pak umožňuje kvantifikaci sledovaných analytů, prováděnou na základě porovnání ploch pod píkem lehkého a těžkého peptidu, resp. ploch pod píkem jejich nejintenzivnějšího fragmentu.

Modifikací této metody je použití standardu v podobě celého identického proteinu značeného izotopicky na argininu a lysinu (PSAQ, Protein Standard Absolute Quantification)<sup>155,156</sup> nebo tzv. QconCAT metoda založená na syntéze umělého polypeptidu, který ve své primární struktuře obsahuje všechny sledované tryptické peptidy.<sup>157</sup>

### 2.5.4 Požadavky na vývoj a validaci metody cílené proteomické analýzy

Rychlost objevování nových ukazatelů patologických stavů daleko předčí tempo jejich reálného uvedení do klinického použití. Je to dáno částečně omezenou dostupností drahých protilátek a časovou náročností celého procesu.<sup>158</sup> Z nově publikovaných výsledků lze usuzovat, že by se cílená proteomická analýza SRM mohla stát alternativou používaných imunostanovení.

V současné době **nejsou jasně stanovené požadavky** na proces vývoje, validace a verifikace metod cílené proteomické analýzy pro proteinové markery. Vodítkem mohou být dokumenty a doporučení mezinárodních společností, zabývajících se akreditací, kalibrací, normami a příbuznou problematikou v oblasti klinických a analytických laboratoří, které primárně vychází ze stanovených ISO norem, případně direktiv Evropské unie (IUPAC, EURACHEM, ISO/REMCO, NIST, OECD, apod.). V literatuře věnované proteinovým a peptidovým markerům bývají v lepším případě stanovovány některé základní znaky analytických metod. Mezi ně patří preciznost měření, analytická specifita a selektivita s ní související pojem přenos vzorku, pracovní rozsah a stanovení meze detekce, meze stanovitelnosti a linearity a reprodukovatelnost metody. Níže jsou uvedeny vybrané stručné charakteristiky základních pojmů převzaté z publikace

Metrologická terminologie v klinické a analytické laboratoři, vycházející z Mezinárodního metrologického slovníku (VIM 3)<sup>159,160</sup> vytvořeného organizací JCGM (Joint Committee for Guides in Metrology), a normy ČSN ISO 5725:1997. Text byl použit a upraven se souhlasem majitele autorských práv.

- ✓ **Preciznost měření** je definována jako těsnost shody mezi naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu nebo na podobných objektech za specifikovaných podmínek. Zpravidla je vyjádřena číselně mírami nepřeciznosti, jako například směrodatnou odchylkou, rozptylem nebo variačním koeficientem (CV). Používá se mimo jiné k definování opakovatelnosti a reprodukovatelnosti měření.
- ✓ **Analytická specifita**, někdy zkráceně specifita, je schopnost měřicího postupu stanovovat pouze tu měřenou veličinu, která má být stanovena. Specifita metody nebo postupu udává rozsah měření, ve kterém může být jednotlivý analyt stanoven v komplexní směsi, aniž by došlo k interferenci s ostatními složkami směsi. Specifická metoda nebo analytický postup je ten, který je oproštěn od vlivu matrice.
- ✓ **Selektivita** je taková vlastnost analýzy, stanovení nebo postupu, kdy je stanovení analytu v určité matrici závislé na přítomnosti omezeného množství určitých příměsí za definovaných podmínek reakce. Selektivita se mění s obsahem analytu a někdy i v závislosti na nastavení parametru metody (souvislost s robustností). Mírou selektivity je známý, kvantitativním způsobem vyjádřený vliv matrice. Příkladem je schopnost hmotnostního spektrometru měřit výskyt lehlé a těžké formy peptidu v komplexní směsi bez ovlivnění mezi oběma nebo jinou složkou matrice.
- ✓ **Pracovní rozsah** je uzavřený interval hodnot množství nebo obsahu měřené veličiny ve vzorku, pro který bylo potvrzeno, že metoda je v něm aplikovatelná (nejistota měření udávaná jako např. směrodatná odchylka je v této oblasti přijatelná). Zdola ohraničuje tento interval zpravidla mez stanovitelnosti. Pracovní rozsah metody se stanoví měřením vzorků s různou hodnotou obsahu analytu.

- ✓ **Linearita kalibračního vztahu** je rozsah hodnot koncentrací, ve kterém je analytický signál lineární funkcí hodnot koncentrace. Je zjišťována analýzou vzorků s hodnotami koncentrací analytu, které pokrývají deklarovaný rozsah metody. Vzorky, použité k určení linearity, mají být analyzovány v sériích 3 – 5 replikátů.
- ✓ **Mez detekce** daného analytického postupu je určena jako nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno, ale nemusí být stanovitelné jako exaktní hodnota. Používá se označení  $L_D$  nebo někdy LoD. K odhadu hodnoty meze detekce lze použít několik přístupů. Je tedy nutné vždy uvést, jak probíhal vlastní výpočet hodnot.
- ✓ **Mez stanovitelnosti** ( $L_Q$  nebo LoQ) je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty. I pro mez stanovitelnosti platí, že neexistuje jeden uznávaný postup jejího určení a je tedy nutné vždy uvést cestu výpočtu.
- ✓ **Reprodukovatelnost měření** je charakterizována jako preciznost měření za daných podmínek a přímo souvisí s mezí reprodukovatelnosti, což je hodnota, o níž lze s 95% pravděpodobností předpokládat, že pod ní bude ležet nebo jí bude rovna absolutní hodnota rozdílu mezi dvěma výsledky měření.

SRM metoda byla již dříve úspěšně využívána ve farmaceutickém průmyslu pro stanovení malých molekul. V porovnání s necílenou MS/MS analýzou vyniká zejména dobrou reprodukovatelností a vzhledem ke způsobu sběru dat i větší selektivitou. Byla publikována studie zaměřená na mezilaboratorní srovnání SRM metod, aplikovaných na různé přístroje a různé typy vzorků.<sup>120</sup> Největší zdroj variabilit měření byl odhalen v souvislosti s přípravou vzorků. Přítomnost vhodného vnitřního standardu v podobě proteinu nebo značeného peptidu již od počátku preanalytické fáze se zdá být nezbytností a to zejména v případech, kdy je kvantifikace hledaného markeru cílem prováděné studie. Dalším z významných aspektů je zvážení vlivu biologické variability vybraného ukazatele v populaci. Hladiny typických plazmatických proteinů kolísají okolo 40 % v rámci jednoho roku u jednoho cílového subjektu, v případě srovnání více subjektů může variabilita dosahovat až 60 %.<sup>161,162</sup> U studií zabývajících se detekovatelností kandidátních peptidů

přidávaných do plazmy nebo séra je CV daleko menší<sup>120</sup> a tedy variabilita SID-SRM-MS analýz by neměla limitovat použití této metody v klinické praxi.<sup>163</sup>



### 3 Cíle práce

Hypertrofická kardiomyopatie je velmi komplikované dědičné onemocnění s rozsáhlým genetickým pozadím. Diagnostika na základě určení příčinných mutací není jednoduchou a rychlou analýzou a vzhledem k faktu, že velká část mutací zůstává zatím neodhalena, postrádá i negativní predikční hodnotu. Je zde tedy spousta prostoru pro tvorbu přijatelné laboratorní metody, která by nejen zhodnotila přítomnost či absenci choroby, ale eventuelně i popsala úspěšnost provedeného léčebného zákroku vzhledem k tíži onemocnění.

Tato práce byla zaměřena na tvorbu vhodné metody cílené proteomické analýzy pro potenciální proteinové markery hypertrofické kardiomyopatie, jejichž kvantitativní charakteristiky by mohly pomoci při diagnostice a sledování této nemoci. Z metodického hlediska lze celou studii rozdělit do několika dílčích cílů.

- i. určení kandidátních proteinů na základě srovnávacích experimentů a dříve publikovaných dat
- ii. tvorba SRM metody na vybrané proteiny
- iii. kvantifikace zvolených markerů pomocí metody SRM
- iv. ověření a porovnání výsledků pomocí jiných používaných metod





### 4 Experimentální část

#### 4.1 Materiál

- 0,22 µm spin filtr Ultrafree-MC (Amicon, Millipore Corporation, Bedford, USA)
- Běžné laboratorní sklo (Ehrlenmeyerovy baňky, lahve pro uchovávání roztoků)
- BD P100 odběrové sety (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
- Centrifugační tuby, různé objemy (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- Frity IntegraFrit Capillary (New Objective, Woburn, USA)
- Immobiline DryStrip Gel (GE Healthcare, Buckinghamshire, Velká Británie)
- Indikátorové pH papírky (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Koncentrační a odsolovací filtry Amicon, (různé velikosti Amicon, Millipore Corporation, Bedford, USA)
- Krycí fólie na mikrotitrační destičky (AB Sciex, Foster City, USA)
- Mikropipety, různé objemy (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikrotitrační destičky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- Mikrozkmavky, různé objemy (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Ochranné osobní pomůcky (nitrilové rukavice, obličejový štít)
- Sprejovací jehly PicoTip Emitter (New Objective, Woburn, USA)
- Špičky pro mikropipety, různé objemy (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Vaničky pro multikanálovou pipetu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Vialky pro HPLC (Waters, Milford, USA)

#### 4.2 Chemikálie

- 4700 peptide calibration mix 500 – 3500 Da (AB Sciex, Foster City, USA)
- α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA) (LaserBio laboratories, Sophia-Antipolis Cedex, Francie)
- Acetonitril (ACN) (Merck Group, Darmstadt, Německo)
- Agaróza (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- AQUA peptidy (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Eluční pufr (Sigma-Aldrich, Corp., St. Louis, USA)

- Etidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Hydrogenuhličitan amonný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Hydroxid sodný (Lachema, Neratovice, Česká republika)
- CHAPS (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Jodacetamid (IAA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Kyselina octová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Kyselina trifluoroctová (TFA) (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, USA)
- Methanol (Merck, Darmstadt, Německo)
- Močovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Neutralizační pufr (Sigma-Aldrich, Corp., St. Louis, USA)
- O'RangeRuler, 20 bp DNA ladder, 20 – 300 bp (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Precision Plus protein standard Kaleidoscope (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Pufr A pro MARS (Agilent Technologies, Wilmington, USA)
- Pufr B pro MARS (Agilent Technologies, Wilmington, USA)
- S-methyl methanthiosulfonát (MMTS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- SpikeTides TQL peptidy (JPT Peptide technologies GmbH, Berlín, Německo)
- Stripping pufr (Sigma-Aldrich, Corp., St. Louis, USA)
- TrackIt Cyan/Orange loading buffer (Invitrogen, Life technologies, New York, USA)
- Trifluoroethanol (TFE) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tris(2-karboxyetyl)fosfan (TCEP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tris-HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Trypsin, Sequencing Grade Modified (Promega, Madison, USA)
- Voda LC-MS Chromasolv (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

### Kity

- AMS14 kit pro detekci HCV RNA (Clonit S.r.l., Miláno, Itálie)
- AMS47 kit pro detekci HIV RNA (Clonit S.r.l., Miláno, Itálie)
- AMS92 kit pro detekci HBV (Clonit S.r.l., Miláno, Itálie)
- Bicinchoninic acid (BCA) kit (Sigma, St. Louis, USA)
- iTRAQ Reagents Multiplex Kit (AB Sciex, Foster City, USA)
- Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA)
- NuPAGE Novex 10% Bis Tris gel (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- ProteoMiner Protein Enrichment Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA)
- QuantiMatrix Human Fibronectin ELISA kit (Merck Group, Darmstadt, Německo)
- ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad, Hercules, USA)
- RayBio Human IGF-1 ELISA Kit (RayBiotech, Norcross, USA)
- RayBio Human MMP-1 ELISA Kit (RayBiotech, Norcross, USA)
- RayBio Human MMP-2 ELISA Kit (RayBiotech, Norcross, USA)
- RayBio Human MMP-9 ELISA Kit (RayBiotech, Norcross, USA)
- RayBio Human P-selectin ELISA Kit (RayBiotech, Norcross, USA)
- RayBio Human TIMP-1 ELISA Kit (RayBiotech, Norcross, USA)
- RayBio Human TIMP-2 ELISA Kit (RayBiotech, Norcross, USA)
- RT-kit-WR (Biognosys, Curych, Švýcarsko)
- USCN BNP Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit (USCN Life Science, Wuhan, Čína)
- USCN bTG Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit (USCN Life Science, Wuhan, Čína)
- USCN TFPI Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit (USCN Life Science, Wuhan, Čína)

### 4.3 Přístrojové vybavení

#### Hmotnostní spektrometry

- 4800 MALDI-TOF/TOF (AB Sciex, Foster City, USA)
- QTRAP 4000 (AB Sciex, Foster City, USA)
- QTRAP 5500 (AB Sciex, Foster City, USA)

- TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

### **Kapalinové chromatografy, kolony a příslušenství**

- Alliance 2695 separační modul (Waters, Milford, USA)
- MARS Hu-14 imunoafinitní spin kolona (Agilent Technologies, Wilmington, USA)
- C<sub>18</sub> stacionární fáze Magic AQ, 100 Å, 5 µm (Michrom BioResources, Auburn, USA)
- C<sub>18</sub> stacionární fáze PepMap, 100 Å, 5 µm (Dionex, Sunnyvale, USA)
- MARS Hu-14 imunoafinitní kolona (Agilent Technologies, Wilmington, USA)
- Microspin C<sub>18</sub> kolony (Harvard Apparatus, Holliston, USA)
- NanoEase kolona, 100 Å, 3 µm (Waters, Milford, USA)
- nanoLC ultra 2Dplus system (AB Sciex, Foster City, USA)
- Probot mikrofrakční kolektor (Dionex, Sunnyvale, USA)
- Tempo nano MDLC capLC HPLC systém (AB Sciex, Foster City, USA)
- UltiMate 3000 HPLC systém (Dionex, Sunnyvale, USA)

### **Ostatní přístrojové vybavení**

- Analytické váhy Mettler Toledo AG (Laboratory & Weighing Technologies, Greifensee, Švýcarsko)
- Eppendorf stolní minicentrifuga (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Eppendorf vakuová odparka 5301 (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Hlubokomrazicí box PowerFREEZE -87°C VXE (Jouan SA, Saint Herblain, Francie)
- Infinity VX2 system (Vilber Lourmat SAS, Marne la Vallée, Francie)
- Jouan RC10 09 a RCT60 vakuová odparka (Jouan SA, Saint Herblain, Francie)
- Magnetická míchačka Hotplate & Stirrer JENWAY 1000 (Jenway, Dunmow, Velká Británie)
- Novex Mini-Cell Electrophoresis System (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Paradigm Detection Platform (Beckman Coulter, Brea, USA)
- pH-metr InoLab pH Level 1 (Wiessenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Německo)

- Plnička kolon (Proxeon BioSystems, Odense, Dánsko)
- Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA)
- PTC-200 DNA Engine Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA)
- Sonikační lázeň Ultrasonic LC 30 H (Elma, Německo)
- Spektrofotometr UV-VIS Heliosy (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Stolní centrifuga Jouan B4i/BR4i (Jouan SA, Saint Herblain, Francie)
- Termomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Vac Elut 20 (Varian, Palo Alto, USA)
- Vortex MS2 (IKA Works, Wilmington, USA)

### 4.4 Programové vybavení

- 4000 Series Explorer v3.5 (AB Sciex, Foster City, USA)
- Analyst v1.5.1 (AB Sciex, Foster City, USA)
- GPS Explorer v3.6 (AB Sciex, Foster City, USA)
- GraphPad Prism v5.02 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA)
- Infinity-CAPT Software v15.12 (Vilber Lourmat SAS, Marne la Vallée, Francie)
- mQuest/mProphet v2.0 (Biognosys, Curych, Švýcarsko)
- MultiQuant v1.1 (AB Sciex, Foster City, USA)
- MassLynx v4.0 (Waters, Milford, USA)
- ProteinPilot v2.0.1 (AB Sciex, Foster City, USA)
- Skyline v1.1 (MacCoss Lab, Seattle, USA)
- TIQAM Digestor v1.2.2 (Seattle Proteome Center, Seattle, USA)

### 4.5 Vzorky

#### 4.5.1 Charakteristika skupiny pacientů

Pacienti zahrnutí do studie byli vybráni prof. MUDr. Radkem Pudilem, PhD. na základě stanovené diagnózy obstrukční hypertrofická kardiomyopatie. Diagnóza se opírala o vyšetření lékařem, echokardiografické vyšetření a výsledky získané pomocí srdeční katetrizace.

Studovaná skupina pacientů byla složena ze sedmnácti osob. Medián věku pacientů v době odběru byl 62 let (IQR: 50 – 69). Ve skupině bylo zahrnuto šest žen.

Vzhledem k věkové skladbě skupiny pacientů a prevalenci onemocnění v populaci se nelze vyhnout odběru vzorků od osob, které trpí jiným, často s věkem asociovaným onemocněním. Do skupiny pacientů bylo tedy zahrnuto devět pacientů s *diabetes mellitus* II. typu a dvanáct pacientů bylo léčeno na hyperlipoproteinémii. Dva pacienti byli kuřáci. Ze studie byli vyloučeni pacienti s přidruženým plicním nebo ledvinovým onemocněním, malignitami, neurodegenerativními a autoimunitními chorobami.

Dle srovnání s klasifikací NYHA bylo pět pacientů zařazeno do třídy NYHA I, devět pacientů do NYHA II, dva pacienti do NYHA III a jeden pacient byl na rozhraní NYHA III a IV.

Všichni pacienti byli léčeni vzhledem k tíži onemocnění konvenční léčbou používanou ke zmírnění projevů asociovaných s chorobou. Devět pacientů užívalo v době odběru betablokátory, deset pacientů blokátoy kalciových kanálů, devět pacientů užívalo statiny a u osmi pacientů byla nutná léčba diuretiky. Pěti pacientům byl již dříve implantován kadioverter-defibrilátor a u jedné osoby byla nutná aplikace biventrikulární stimulace.

Všichni pacienti byli o předpokládaném průběhu výzkumu plně informováni a svým podpisem potvrdili informovaný souhlas se zařazením do studie. Výše uvedená data jsou shrnuta v tabulce umístěné za charakteristikou kontrolní skupiny (Tab. 4.1).

#### 4.5.2 Charakteristika kontrolní skupiny

Tuto skupinu tvořilo sedmnáct osob, které prokazatelně netrpěly závažným kardiovaskulárním onemocněním. Vzorky plazmy od kontrolní skupiny byly odebírány od pravidelných dárců krve nebo v několika případech od pacientů docházejících na autologní odběry krve před plánovanou operací.

Dotazníky zaměřené na zjišťování přítomnosti různých onemocnění nebyly od této skupiny požadovány, jelikož je jakékoliv námi sledované onemocnění kontraindikací k dobrovolnému dárcovství krve. V případě autologních odběrů šlo o starší pacienty čekající na ortopedické operace a i v tomto případě byla přítomnost jiné choroby vyloučena při určování požadavků na odběr vzorku na transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK). V rámci skupiny byly odebrány tři vzorky od žen. Medián věku v době odběru byl 54 roků (IQR: 45 – 57).

Souhrnná data				
	n	muži	ženy	medián věku (IQR)
<b>pacienti</b>	17	11	6	62 (50 – 69)
<b>kontrola</b>	17	14	3	54 (45 – 57)

Onemocnění a NYHA klasifikace					
	<i>diabetes mellitus II. typu</i>	hyperlipoproteinémie	NYHA I	NYHA II	NYHA III a IV
<b>pacienti</b>	9	12	5	9	3

Léčba					
	$\beta$ blokátory	blokátory Ca <sup>2+</sup> kanálů	statiny	diuretika	ICD
<b>pacienti</b>	9	10	9	8	5

Tab. 4.1 Souhrnná data získaná od pacientů a kontrolní skupiny. ICD = kardioverter-defibrilátor, n = počet vzorků.

#### 4.5.3 Preanalytická fáze přípravy vzorku

##### 4.5.3.1 Odběr vzorku

Vzorky od pacientů byly odebírány vždy po vyplnění dotazníku a po podpisu informovaného souhlasu, na jehož základě byl pacient zařazen do studie pod kódovým označením. Odběry vzorků od pacientů a kontrolní skupiny probíhaly v období mezi zářím 2007 a lednem 2008 ve spolupráci s FN HK. Samotný odběr plné krve probíhal v dopoledních hodinách na centrálním odběrovém sále pavilonu interních oborů FN HK

pověřenou sestrou do zkumavek BD P100 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Pacient při odběru vždy ležel, nebyl vyžadován odběr nalačno. Odpovědným lékařem byl prof. MUDr. Radek Pudil, PhD. z I. interní kardiologické kliniky.

Na základě charakteristik skupiny pacientů (viz Tab. 4.1) byly stanoveny požadavky na skladbu kontrolní skupiny. Odběr vzorků pro kontrolní skupinu zajišťovalo transfuzní oddělení FN HK. Podmínky odběru byly shodné s výše uvedeným postupem. Odpovědným lékařem byl MUDr. Vít Řeháček.

Celkem bylo odebráno 29 vzorků v kontrolní skupině a 30 vzorků od pacientů.

### **4.5.3.2 Zpracování odebraných vzorků**

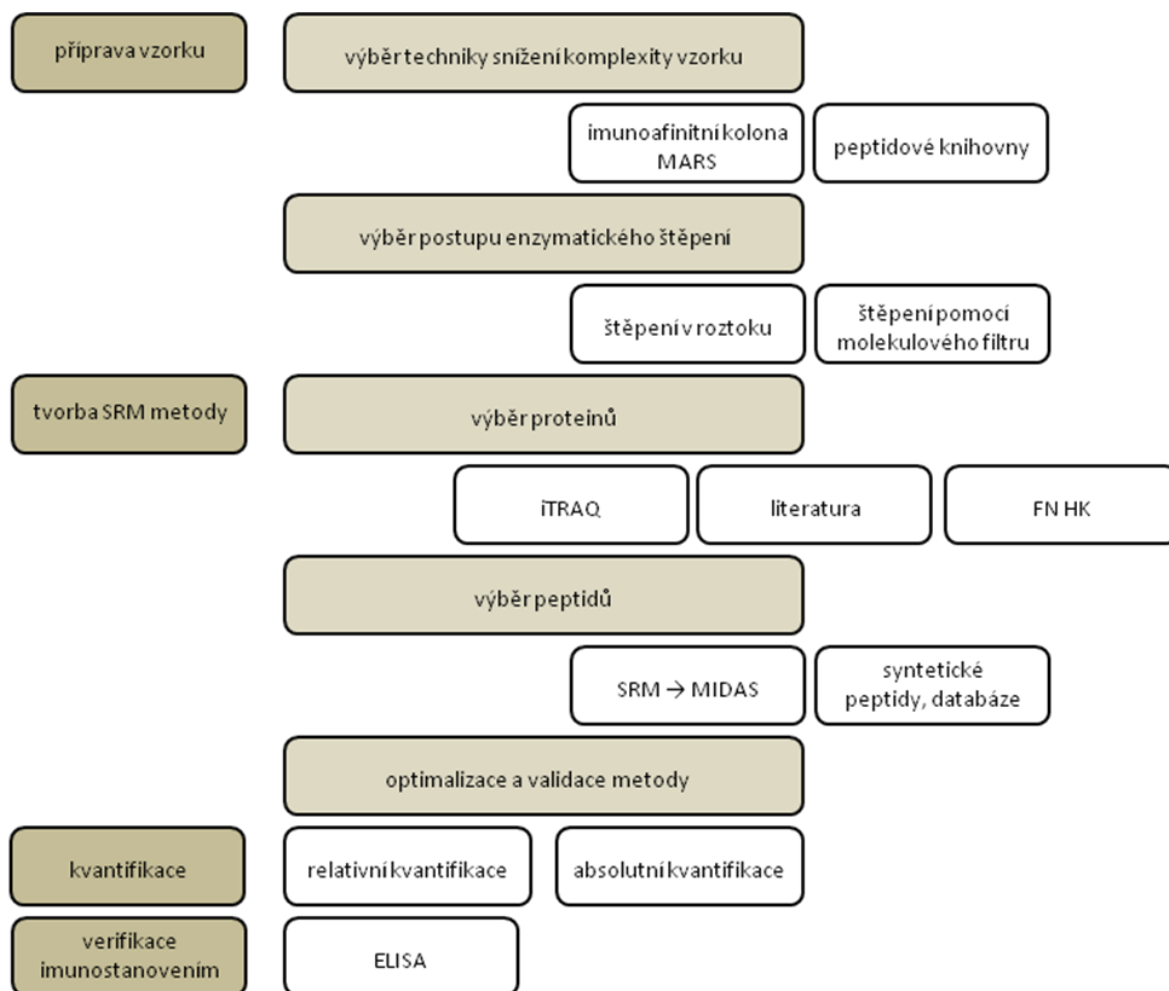
Zkumavky, do kterých byly odběry prováděny, obsahují separátor s filtrem, který během centrifugace oddělí buněčné součásti plné krve a plazmatickou frakci. Zkumavka obsahuje antikoagulant K<sub>2</sub>EDTA a také inhibitory proteáz, nutné pro zajištění proteinové stability odebraného vzorku.

Ihned po odběru byly vzorky transportovány k dalšímu zpracování. Zkumavky byly centrifugovány v úhlovém rotoru po dobu 5 minut při 2 500 x g za laboratorní teploty. Výsledná plazma oddělená separátorem byla přenesena do nové označené zkumavky a znovu centrifugována za stejných podmínek. Vzniklý supernatant byl rozdělen do několika zkumavek a uložen při teplotě -80 °C k dalšímu zpracování.

Některé vzorky byly vzhledem k vysoké chylozitě plazmy nebo přítomnosti hemolýzy vyřazeny z dalších analýz. Pro konečné kvantitativní měření a ověření metody pomocí ELISA testů bylo použito pouze 17 vzorků od pacientů a 17 vzorků od kontrolní skupiny.



## 4.6 Metody

Schéma prováděných experimentů

## 4.6.1 Detekce přítomných patogenů pomocí polymerázové řetězové reakce

U vzorků plazmy pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií byla provedena detekce virů hepatitidy B a C a viru HIV pomocí polymerázové řetězové reakce z důvodu ověření bezpečnosti před další manipulací.

Pro amplifikaci charakteristických úseků nukleových kyselin byly použity komerčně dodávané kity AMS47 pro detekci HIV, AMS92 pro detekci viru hepatitidy typu B a AMS14 pro detekci viru hepatitidy typu C (vše Clonit, Miláno, Itálie). Po amplifikaci byly vzorky spolu se standardem naneseny na 2% agarózový gel obsahující ethidium bromid. Jako zavaděcí roztok byla použita směs xylen cyanolu a Orange G TrackIt

Cyan/Orange loading buffer (Invitrogen, Life technologies, New York, USA). Poté následovala elektroforetická separace probíhající po dobu 30 min při napětí 100 V. Vyhodnocení jednotlivých gelů bylo prováděno v transluminátoru.

Pomocí uvedených kitů nebyla v žádném vzorku detekována přítomnost hledaných patogenů.

### **4.6.2 Imunoafinitní odstranění vybraných proteinů plazmy pomocí HPLC kolony MARS Hu-14**

#### **4.6.2.1 Příprava vzorků před analýzou**

Vzorky plazmy byly pozvolna roztáty na ledu, kde byly zároveň uchovávány do chromatografické analýzy. Před imunoafinitní separací byly vzorky plazmy zbaveny případných sraženin a zbylých buněčných součástí pomocí filtrace přes 0.22  $\mu\text{m}$  spin filtr Ultrafree-MC (Amicon, Millipore Corporation, Bedford, USA). Filtr byl nejprve promyt centrifugací 200  $\mu\text{l}$  deionizované vody při 10 000  $\times g$ , teplotě 4  $^{\circ}\text{C}$ , po dobu 5 minut. Následně byl na filtr nanesen vypočítaný objem plazmy a vzorek byl centrifugován za stejných podmínek, jako v případě promývacího kroku. Po centrifugaci byly vzorky 4krát naředěny MARS pufrém A (Agilent Technologies, Wilmington, USA).

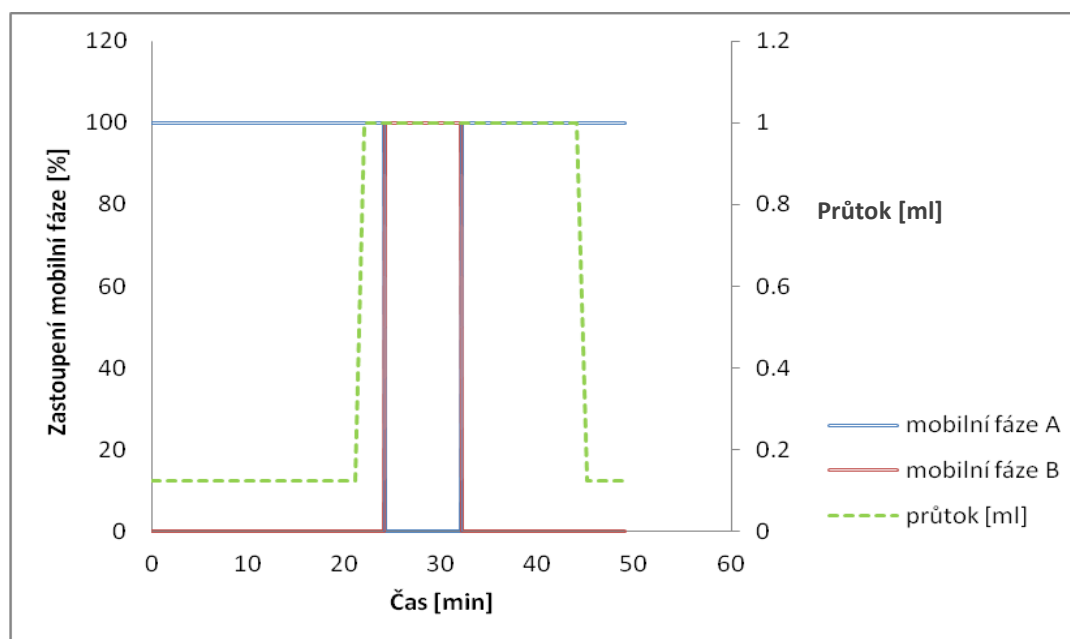
Pro potřeby optimalizace množství nástřiku plazmy na imunoafinitní kolonu byly použity směsné kontrolní vzorky a vzorky pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. Pro následnou analýzu na hmotnostním spektrometru byly depletovány individuální vzorky, které byly připraveny v duplikátu.

#### **4.6.2.2 Imunoafinitní chromatografie**

Pro imunoafinitní separaci vzorků plazmy byla v naší studii použita MARS Hu-14 kolona (4.6 mm ID  $\times$  100 mm), spolu s pufrými dodávanými výrobcem (Agilent Technologies). Analýza probíhala na separačním modulu Alliance 2695 (Waters, Milford, USA) s UV detekcí. Před separací jednotlivých vzorků byla provedena optimalizace objemu plazmy, který byl nanášen na chromatografickou kolonu v rámci jednoho nástřiku. Byly připraveny čtyři směsné vzorky kontrolní plazmy a plazmy pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií, ve kterých byl objem plazmy 25, 30, 35 resp. 40  $\mu\text{l}$ . Vzorky byly 4krát

naředěny ekvilibračním pufrém. Finální objem vzorku nanášeného na kolonu byl 100, 120, 140 resp. 160  $\mu\text{l}$ .

Karusel autosampleru byl temperován na teplotu 4 °C. Po ekvilibraci chromatografického systému byl na kolonu nanesen naředěný vzorek. Cílová frakce proteinů, které nejsou na koloně zachytávány (FT, procházející frakce, flow through), byla eluována zpravidla mezi 10 a 16 minutou při průtoku mobilní fáze A 0.125 ml/min. Po on-line přepnutí průtoku mobilních fází z A (nanášecí a ekvilibrační pufr) na B (eluční pufr) byly z vazby na imobilizované protilátky uvolněny vysoce zastoupené proteiny. V posledním kroku byla kolona ekvilibrována opět mobilní fází A. Průběh chromatografické separace je shrnut v následujícím schématu (obr. 4.1)



Obr. 4.1 Průběh imunoafinitní chromatografické analýzy.

FT frakce byla on-line zachycována pomocí sběrače frakcí Fraction Collector III (Waters). Na základě UV spektrometrické detekce vzorku při jeho průchodu analytickou celou (použitá vlnová délka - 280 nm) bylo stanoveno časové rozmezí sběru FT frakce na 5.5 – 22 minutu. V průběhu separace byly jímány vzorky chlazeny na ledu v karuselu sběrače.

### 4.6.2.3 Zakoncentrování FT frakcí a výměna pufru

Aplikací imunodepleční chromatografie došlo k odstranění zhruba 95 % celkového obsahu bílkovin. Pufry používané pro imunoafinitní separaci pomocí MARS Hu-14 kolony nejsou kompatibilní s následnými analýzami (stanovení bílkoviny, tryptické štěpení). Vzorky tedy bylo třeba zakoncentrovat a vyměnit stávající pufr za vhodnější.

Po imunoafinitní separaci byly vzorky přeneseny na centrifugační molekulový filtr o velikosti pórů 3kDa, Amicon Ultra 3K (Millipore Corporation). Následovala centrifugace při 7 500 x *g* při 4 °C po dobu 15 min. Po zakoncentrování vzorku na cca 500 µl byl stávající pufr vyměněn za 4M močovinu ve 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pětinasobným promytím a následnou centrifugací za výše uvedených podmínek. Po výměně pufru byly vzorky odpařeny do sucha na vakuové odparce a uloženy při -80 °C do dalšího zpracování.

Stanovení obsahu proteinů ve vzorcích bylo provedeno pomocí standardní BCA metody na mikrotitrační destičce.

### 4.6.3 Imunoafinitní odstranění vybraných proteinů plazmy pomocí centrifugačních kolonek

Pro imunoafinitní separaci menších množství vzorků byla použita MARS Hu-14 centrifugační kolonka a odpovídající pufry, dodávané výrobcem (Agilent Technologies).

Vzorky plazmy byly ponechány na ledu do úplného roztátí a následně upraveny stejným způsobem, jako v kapitole 4.6.2.1 MARS Hu-14 centrifugační kolonka byla před použitím ekvilibrována na laboratorní teplotu. Pro separaci bylo odebráno 10 µl vzorku a smícháno se 190 µl pufru A pro MARS analýzy. Vzorek byl navrstven na připravenou kolonku a centrifugován při 100 x *g*, za laboratorní teploty po dobu 1 min. Po promytí zbytku FT frakce byly vázané proteiny eluovány pomocí pufru B.

Proteiny FT frakce byly zpracovány stejným způsobem, jaký je popsán v kapitole 4.6.2.3.

### 4.6.4 Snížení koncentračního rozpětí pomocí hexapeptidové knihovny

Pro snížení koncentračního rozpětí proteinů lidské plazmy bylo testováno použití technologie hexapeptidových knihoven (ProteoMiner Protein Enrichment Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

Kolonka s hexapeptidovou knihovnou byla před použitím ekvilibrována. Nejprve byl z kolonky odstraněn skladovací roztok centrifugací při 10 000 x g po dobu 2 minut při teplotě 4 °C. V dalším kroku byl na kolonku navrstven 1 ml deionizované vody, obsah byl promícháván 5 minut a opět odstraněn centrifugací za stejných podmínek. Třetí ekvilibrační krok probíhal totožně s předchozími, pouze byl místo deionizované vody použit promývací roztok o pH 7.4 (150mM NaCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> v deionizované vodě).

Pro testování metody byl použit směsný vzorek obou skupin. Před navrstvením na kolonku byl vzorek centrifugován při 10 000 x g po dobu 10 min při 4 °C, čímž došlo k odstranění lipidové vrstvy (horní část) a případných sraženin (spodní peleta). Na kolonku byl nanesen vždy 1 ml směsného vzorku. Kolonka byla ponechána za velmi mírného míchání při laboratorní teplotě 2 hodiny. Nenavázaná frakce proteinů byla odstraněna centrifugací 1 000 x g po dobu 3 min při laboratorní teplotě. Kolonka byla následně promyta 3 x 1 ml promývacího roztoku. Po jeho přidání byla kolonka vždy mírně míchána po dobu 5 min a následně centrifugována za podmínek popsanych výše. Závěrečným krokem této části bylo promytí kolonky 1 ml deionizované vody.

Eluce navázaných proteinů z hexapeptidové knihovny byla prováděna pomocí 100 µl rehydratovaného elučního roztoku (8M močovina, 2% CHAPS v 5% kyselině octové), který byl navrstven na kolonku. Inkubace a eluce se třikrát opakovala. Po navrstvení elučního roztoku byla kolonka 5 min extenzivně míchána a následně 15 min mírně míchána při laboratorní teplotě. Po centrifugaci při 1 000 x g po dobu 2 min za laboratorní teploty byly jednotlivé eluáty spojeny a uchovány při -80 °C do dalšího zpracování.

Získaný vzorek byl porovnáván pomocí jednorozměrné gelové elektroforézy se směsným vzorkem z imunoafinitní separace pomocí MARS Hu-14 kolony a s neupravovanou plazmou. Elektroforéza probíhala na komerčně dostupném gelu NuPAGE Novex 10% Bis Tris gel (Invitrogen). Celkem bylo pro analýzu použito 20 µg každého

vzorku. Jako standard byl zvolen Precision Plus protein standard Kaleidoscope (Bio-Rad). Zároveň byl s využitím LC-MALDI-MS/MS srovnáván počet identifikovaných proteinů/peptidů v obou depletovaných vzorcích. Identifikace naměřených dat byla prováděna pomocí programu Protein Pilot (AB Sciex) algoritmem Paragon s použitím FDR analýzy (false discovery rate), v rámci které byla vytvořena tzv. reverzní decoy databáze. Hraniční hodnota pro výběr proteinů byla stanovena na hladině 5% globálního FDR.

### 4.6.5 Enzymatické štěpení

Pro analýzu na hmotnostním spektrometru byly vzorky plazmy enzymaticky štěpeny pomocí sekvenčně specifické proteázy trypsin. Výsledná definovatelná směs peptidů byla následně odsolena na kolonkách s C<sub>18</sub> stacionární fází a odpařena do sucha. Vzorky byly takto uchovány při teplotě -80 °C do dalšího zpracování.

#### 4.6.5.1 Štěpení v roztoku

Vzorky plazmy byly naředěny 8M guanidin-hydrochloridem a následně 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Redukce probíhala v přítomnosti 5mM TCEP při teplotě 37 °C po dobu 60 min. Následná alkylace pak probíhala v prostředí 15mM MMTS (S-methyl methanthiosulfonát) v temnu za laboratorní teploty po dobu 10 min za stálého míchání. Proteiny byly štěpeny trypsinem v poměru zhruba 1:50 trypsin : protein (w/w). Reakce byla zastavena po 16 hodinách přidávkem 10% kyseliny mravenčí.

#### 4.6.5.2 Štěpení pomocí molekulového filtru

Pro štěpení pomocí molekulového filtru (10kDa MWCO, Amicon, Millipore Corporation) byly použity některé kroky, popsané v tzv. FASP technice enzymatického štěpení.<sup>164</sup>

Vzorky byly naředěny 8M močovinou ve 100mM TrisHCl (pH 8.5) a nanášeny na molekulový filtr. Pro alkykaci byl použit 5mM TCEP (30 min, 37 °C). Redukce probíhala pomocí 15mM IAA (5 min, 37 °C) v temnu. Nadbytečná močovina byla odmyta a nahrazena 100mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Vzorky byly štěpeny trypsinem v poměru 1:50 trypsin : protein (w/w). Štěpení bylo zastaveno po 16 hodinách přidáním 10% kyseliny mravenčí.

Po štěpení byly vzorky odsoleny centrifugací pomocí kolonek pro extrakci na pevné fázi (SPE, UltraMicroSpin Column, Harvard Apparatus, Holliston, USA) a odpařeny do sucha na vakuové odparce Jouan RCT60 (Jouan SA, Saint Herblain, Francie). Pokud byly vzorky následně kvantifikovány pomocí cílené proteomické analýzy, byly ke vzorku přidány ve známé koncentraci izotopicky značené syntetické peptidy.

### 4.6.6 LC-MALDI-MS/MS analýza a identifikace proteinů

Pro separaci odsolené směsi peptidů imunoafinitně ošetřené plazmy z MARS Hu-14 kolony a hexapeptidové knihovny byla použita chromatografie na reverzní fázi v uspořádání koncentrační předkolonka – kolona. HPLC separace probíhala na systému UltiMate 3000 (Dionex, Sunnyvale, USA). Jako koncentrační předkolonka byla použita 300  $\mu\text{m}$  x 5 mm kolonka, naplněná  $\text{C}_{18}$  PepMap stacionární fází (100 Å, 5  $\mu\text{m}$ , Dionex), separace probíhala na analytické 100  $\mu\text{m}$  x 150  $\mu\text{m}$  NanoEase koloně, naplněné  $\text{C}_{18}$  Atlantis stacionární fází (100 Å, 3  $\mu\text{m}$ , Waters). Jako mobilní fáze byly použity roztoky A (5% ACN, 0.1% TFA) a B (80% ACN, 0.1% TFA). Kolona byla temperována na teplotu 25 °C. UV detekce probíhala při 215 nm. Po zakoncentrování vzorku na předkoloně po dobu 5 min při průtoku mobilní fáze A 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  byla směs peptidů separována na koloně pomocí lineárního gradientu tvořeného mobilními fázemi A a B. Eluce probíhala po dobu 90 min za plynulé změny zastoupení mobilních fází z 0 % B do 90 % B při průtoku 360  $\text{nl}/\text{min}$ .

V průběhu separace byl eluát vycházející z kolony mísen s CHCA matricí (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis Cedex, Francie) o koncentraci 3  $\text{mg}/\text{ml}$  v 70% ACN, 0.1% TFA v poměru 1 : 4 (vzorek : matrice). Sběr jednotlivých frakcí probíhal pomocí sběrače frakcí Probot (Dionex, Sunnyvale, USA) v intervalech po 12 s. Jednotlivé frakce byly ihned nanášeny na vzorkovou destičku OptiTOF LC-MALDI (AB Sciex, Foster City, USA).

Analýza byla prováděna na hmotnostním spektrometru 4800 MALDI-TOF/TOF (AB Sciex). Hmotnostní spektra byla zaznamenávána v rozsahu 800 až 4 000  $m/z$  v reflektoru pozitivním módu, počet dopadů laseru byl nastaven na 625 pulzů při intenzitě 3 150 (Nd:YAG laser, 355 nm). Fragmentační spektra vybraných prekurzorů byla zaznamenávána v 1kV MS/MS pozitivním módu. Automaticky bylo z jedné frakce

vybráno maximálně 15 nejintenzivnějších prekurzorů, jejichž intenzita přesáhla stanovenou hranici poměru signálu k šumu. Tyto prekurzory byly fragmentovány postupně od nejméně intenzivního s použitím laseru o fixní intenzitě 4 100. Celá analýza byla řízena pomocí programu 4000 Series Explorer v3.5 (AB Sciex).

Identifikace proteinů na základě získaných MS/MS dat probíhala za pomoci programu ProteinPilot v2.0.1 (AB Sciex). Data byla vyhodnocována algoritmem Paragon s použitím FDR funkce. Pro identifikaci byla použita aktuální UniProtKB/Swiss-Prot databáze (verze dostupná v říjnu 2008) v kombinaci s *in silico* vytvořenou reverzní databází. Nastavení charakteristik identifikace a popisu vzorku shrnuje následující tabulka (tab. 4.2).

Popis vzorku v nastavení Paragon	
Sample type	Identification
Cys alkylation	Iodoacetamid
Digestion	Trypsin
Special factors	bez výběru
Species	<i>Homo sapiens</i>
Database	UniProt-SwissProt

Parametry zpracování dat	
ID Focus	Biological modification
Search Effort	Thorough ID
Detected Protein Treshold	0.05 (10 %)
PSPEP	Reversed

Tab. 4.2 Nastavení parametrů vyhledávání pomocí programu Protein Pilot (AB Sciex).

#### 4.6.7 iTRAQ mapovací studie

Pro souhrnnou analýzu kvantitativních rozdílů mezi vzorky pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií a kontrolní skupinou byly použity směsné vzorky. Z každého vzorku byly vytvořeny dva replikáty a tyto byly následně podrobeny imunoseparační chromatografii na MARS Hu-14 koloně. Postup je uveden v kapitole 4.6.2. Vzorky o přibližné koncentraci 1 µg/µl byly podrobeny enzymatickému štěpení v roztoku dle postupu popsáno výrobce iTRAQ Reagents Multiplex kitu (AB Sciex). Štěpeno bylo 25 µg každého vzorku. Naštěpené vzorky byly následně značeny pomocí jednotlivých iTRAQ značek rozpuštěných v 70% etanolu. Kontrolní vzorky byly značeny



značkami 114 a 116, vzorky hypertrofické kardiomyopatie značkami 115 a 117. Vzorky obsahující jednotlivé reagenty byly promíchány a inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Poté byla odpovídající část každého vzorku odebrána a smíšena s ostatními v poměru 1:1:1:1.

Výsledný vzorek byl separován izoelektrickou fokusací na Immobiline DryStrip Gel stripu (GE Healthcare, Buckinghamshire, Velká Británie) s ukotveným lineárním pH gradientem v rozmezí 3 – 10 na přístroji Protean IEF Cell (Bio-Rad). Délka použitého stripu byla 17 cm. Pro fokusaci bylo odebráno 10 µg vzorku, naředěného rehydratačním puřem (8M močovina, 2% CHAPS, 50mM DTT) do finálního objemu 300 µl. Pro překrytí stripu byl použit parafínový olej. Po rehydrataci byly nastaveny fokusační podmínky na startovní napětí 0 V a maximální koncové napětí 10 000 V nebo celkových 60 000 V.h při teplotě 20 °C. Strip byl po fokusaci rozdělen na 34 stejných dílků a z každého byly vyextrahovány přítomné peptidy. Extrakce probíhala dvoukrokově nejprve pomocí 120 µl 0.1% TFA a následně pomocí stejného objemu 0.1% TFA v 50% ACN. V obou případech následovala sonikace po dobu 10 min. Oba extrakty byly spojeny do jednoho vzorku, který byl následně odpařen na vakuové odparce Jouan RCT50. Získané peptidové frakce byly rozpuštěny v mobilní fázi A (5% ACN, 0.1% TFA). Následovala LC-MALDI-MS/MS analýza a identifikace proteinů dle postupu popsáném v kapitole 4.6.7. Výsledná data byla statisticky hodnocena, statistická významnost byla stanovena na hladině  $p \leq 0.05$ .

### **4.6.8 Tvorba SRM metody pro kvantitativní zhodnocení zastoupení potenciálních markerů hypertrofické kardiomyopatie v periferní plazmě**

Příprava SRM kvantitativní metody hmotnostní spektrometrie sestává z několika navazujících postupů, shrnutých v následujícím popisu.

#### **4.6.8.1 Výběr proteinů a jejich proteotypických peptidů**

Potenciální markery hypertrofické kardiomyopatie zahrnuté v této práci byly vytipovány pomocí aktuálně dostupných literárních údajů. Vybrané proteiny byly popsány v souvislosti s hypertrofickou kardiomyopatií. Jedinou výjimku tvořil fibronectin, který byl zahrnut do studie na základě iTRAQ mapovacích experimentů (kap. 4.6.7). Jednotlivé peptidy pak byly vybírány buď na základě pozorování v předchozích experimentech, nebo pomocí dostupných databází a analýzy jejich syntetických ekvivalentů (viz níže).

### Výběr peptidů a vhodných fragmentů pomocí SRM a následné MIDAS analýzy

FASTA formáty vybraných proteinů byly vloženy do programu TIQAM Digestor v1.2.2 (Targeted Identification for Quantitative Analysis by MRM, Seattle Proteome Center, Seattle, USA), který vytváří SRM metodu na základě vložených údajů. Přesné nastavení použitých parametrů shrnuje následující tabulka (tab. 4.3).

Parametry nastavené v programu TIQAM Digestor		
Generate peptides		Popis
Enzyme	trypsin	Štěpící enzym
Pep lenght >	5	Minimální délka peptidu
Pep mass >	500	Nejnižší hmota peptidu
Pep mass <	5000	Nejvyšší hmota peptidu
Exclude patterns	[M], N_[ST]	Vyloučení peptidů obsahujících metionin a glykosylační motiv
Generate transitions		
Q <sub>1</sub> >	300	Rozsah hmot pro přechody s m/z vyšším než hmota prekurzoru
Q <sub>3</sub> <	1600	
Q <sub>3</sub> > Q <sub>1</sub>	20	Nejmenší povolený rozdíl mezi hmotou fragmentu a prekurzoru
Q <sub>1</sub> >	300	Rozsah hmot pro přechody s m/z nižším než hmota prekurzoru
Q <sub>3</sub> >	300	
Q <sub>1</sub> > Q <sub>3</sub>	20	Nejmenší povolený rozdíl mezi hmotou fragmentu a prekurzoru
Transition per precursor ion	8	Počet přechodů na jeden peptid
Z1	+2 +3	Nábojové stavy prekurzorů
Ion series	y+ b+	Typy fragmentových iontů a jejich náboj
Modification	Cys_CAM	Možná modifikace
Save to file	Full, Q-trap	Typ exportovaných souborů

Tab. 4.3 Nastavené parametry použité programem TIQAM Digestor.

Takto získané metody pro následnou SRM analýzu obsahovaly sekvence všech peptidů zadaných proteinů, splňujících přednastavená kritéria. Automaticky byly vypočítány parametry kolizní energie a deklasterizačního potenciálu pro každý peptid. Vytvořené metody byly aplikovány na směsné vzorky imunodepletované plazmy obou skupin. Celkově byl pro jednu chromatografickou a následnou SRM analýzu použit 1 µg plazmy naštěpené v roztoku.

Prvním krokem analýzy byla separace vzorku pomocí chromatografie na reverzní fázi, probíhající na HPLC systému Tempo nano MDLC capLC (AB Sciex) spojeném s autosamplerem Tempo Autosampler (AB Sciex). Jako předkolona byla použita 300  $\mu\text{m}$  ID x 5 mm kolona Acclaim PepMap100, naplněná  $\text{C}_{18}$  stacionární fází (100 Å, 5  $\mu\text{m}$ , Dionex), vlastní separace probíhala na analytické 75  $\mu\text{m}$  ID x 15 cm koloně Acclaim PepMap100, naplněné  $\text{C}_{18}$  stacionární fází (100 Å, 3  $\mu\text{m}$ , Dionex). Jako mobilní fáze byly použity pufrы A (2% ACN, 0.1% FA) a B (98% ACN, 0.1% FA). Po zakoncentrování vzorku na předkoloně po dobu 5 min při průtoku mobilní fáze A o rychlosti 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  byla směs peptidů separována na koloně a eluována pomocí lineárního gradientu tvořeného mobilními fázemi A a B. Celkový čas analýzy byl 45 min, lineární gradient trval 30 min za plynulé změny zastoupení mobilních fází z 0 % B do 40 % B při průtoku 250  $\text{nl}/\text{min}$ .

SRM analýza probíhala online na připojeném hmotnostním spektrometru QTRAP 4000 (AB Sciex), který byl opatřen ionizačním zdrojem Nanospray III se sprejovací jehlou PicoTip Emitter SilicaTip s vnitřním průměrem špičky 15  $\mu\text{m}$  (New Objective, Woburn, USA). V jenom SRM měření bylo cíleno cca 200 – 300 přechodů při nastaveném DT 10 ms na jeden přechod. Celkový čas jednoho cyklu nepřesáhl 5 s. Velikost napětí v iontovém zdroji bylo 2 500 V, rozlišení v kvadrupólech  $\text{Q}_1$  a  $\text{Q}_3$  bylo nastaveno jako jednotkové (unit). Parametry zmlžovacího a pomocného plynu (ion source gas 1 a 2, GS1 a GS2), clonícího plynu (curtain gas, CUR) a teplota vyhřívání rozhraní (interface heater temperature, IHT) byly nastaveny na hodnoty 18, 0, 12 a 150. Analýza na spektrometru QTRAP 4000 byla řízena pomocí programu Analyst v1.5.1 (AB Sciex).

XIC chromatogramy ze získaných SRM záznamů byly manuálně vyhodnoceny a unikátnost peptidů, jež byly úspěšně detekovány, byla ověřena nástrojem BLAST. Poté byla z detekovaných peptidů vytvořena nová metoda, která byla znova ověřována v dalším měření při 60 min lineárním gradientu metodou MIDAS. Celkový čas analýzy byl 85 min, DT byl prodloužen na 15 ms, ostatní parametry zůstaly shodné s předchozími SRM metodami. Fragmentace probíhala vždy u dvou v daném okamžiku nejintenzivnějších peptidů, jejichž intenzita signálu přesáhla nastavenou hodnotu. Tolerance rozdílné hmoty byla nastavena na 250 mDa, jednotlivé fragmenty byly zaznamenávány v rozmezí hmot 250 až 1 400 Da. Rychlost skenování byla nastavena na 4 000 Da/s. Získaná fragmentační spektra byla porovnána s  $m/z$  hodnotami vypočítanými teoreticky pomocí volně

dostupného webového nástroje MS/MS Fragment Ion Calculator (<http://db.systemsbio.net:8080/proteomicsToolkit/>). Po manuálně provedeném vyhodnocení všech fragmentačních spekter a vybrání pěti nejintenzivnějších přechodů pro každý peptid a jeho dominantní nábojový stav byla vytvořena souhrnná SRM metoda, použitá dále pro relativní kvantifikaci pomocí srovnání celkových ploch pod píkem mezi směsným kontrolním vzorkem a směsným vzorkem od pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií (kap. 4.6.11).

### **Výběr peptidů a vhodných fragmentů pomocí databáze SRM záznamů a analýzy syntetických ekvivalentů**

Alternativou k tvorbě SRM metody pomocí naštěpených vzorků plazmy je postup, využívající dat, získaných pomocí analýzy syntetických peptidů, jejichž sekvence se shodují se sekvencemi námi hledaných peptidů. Tato fáze práce probíhala ve spolupráci s Institutem molekulární systémové biologie v Curychu (IMSB, Curych, Švýcarsko) a společností Biognosys (Schlieren, Švýcarsko). Seznam společně vybraných peptidů cílových proteinů byl porovnán s jejich databázi už vytvořených a ověřených SRM přechodů. Pro peptidy nalezené v databázi byla extrahována potřebná data (jednotlivé přechody, kolizní energie, předpokládaný retenční čas aj.). Peptidy, které nebyly v databázi ještě zahrnuty, byly zadány k syntéze v neznámé formě (JPT Peptide technologies, Berlín, Německo). Unikátnost vybraných peptidů byla ověřena nástrojem BLAST. Přechody pro nově syntetizované peptidy a výpočet parametrů kolizní energie probíhal v programu TIQAM Digestor, podle předem nastavených podmínek. Vybrané peptidy byly analyzovány v několika následných krocích.

V prvním kole byly směsné vzorky syntetických peptidů analyzovány metodou MIDAS. Pro každý peptid a oba jeho hlavní nábojové stavy byl sledován jeden y fragment, jehož  $m/z$  byla minimálně o 20 větší než hmota prekurzoru. Vzniklá fragmentační spektra byla zaznamenána. Zároveň byly sledovány i přechody vytvořené pro peptidy s reverzní aminokyselinovou sekvencí (decoy přechody), z důvodu zabezpečení správnosti identifikace. Analýza probíhala na hmotnostním spektrometru QTRAP 5500 s iontovým zdrojem Nanospray III (AB Sciex) a s předřazenou on-line nanoLC separací, prováděnou na přístroji Tempo nano LC system (AB Sciex). Vzorek, temperovaný na teplotu 4 °C byl na kolonu nanášen pomocí Tempo autosampleru (AB Sciex). Kolonu tvořila *in situ*

vytvořená sprejovací kapilára o průměru 75  $\mu\text{m}$ , naplněná cca 15 cm  $\text{C}_{18}$  stacionární fází Magic AQ, o velikosti částic 5  $\mu\text{m}$  (Michrom BioResources, Auburn, USA). Separace probíhala pomocí lineárního gradientu, tvořeného mobilními fázemi A a B (složení viz výše). Celkový čas analýzy byl 45 min, lineární gradient trval 30 min a probíhal za plynulé změny zastoupení mobilních fází z 2% do 30% ACN při průtoku 300 nl/min. Sběr SRM dat byl prováděn při jednotkovém rozlišení v kvadrupólech  $\text{Q}_1$  i  $\text{Q}_3$ . Celkem bylo monitorováno cca 300 přechodů v jedné analýze, dwell time na jeden přechod byl 10 ms. MS/MS spektra byla získávána v EPI módu (Enhanced Product Ion) při  $\text{Q}_1$  rozlišení nastaveném na low. Rozsah  $m/z$  byl 300 až 1 400, rychlost skenování 4 000 amu/s. Pro LIT byl nastaven dynamický plnicí čas (dynamic fill time). Pomocí prohledávacího algoritmu MASCOT (Protein Pilot software, Matrix Science, Boston, USA) byla získaná data porovnána s uměle vytvořenou databází obsahující kromě hledaných peptidů i jejich reverzní, tzv. decoy sekvence pro vyloučení chybné identifikace. Hmotnostní tolerance  $m/z$  prekursoru byla nastavena na 2.0 Da, resp. 0.8 Da u fragmentu. Byly potvrzovány pouze plně tryptické peptidy bez tolerance variabilního štěpení. Peptidy, které takto nebyly potvrzeny, byly analyzovány znovu stejným postupem s větším počtem cílených přechodů. Pokud ani poté nebyly nalezeny, byly vyřazeny z dalšího měření. Z potvrzených peptidů byla vytvořena knihovna jejich spekter, obsahující údaje o retenčním čase peptidu, relativních intenzitách fragmentů a použitých kolizních energiích. V případě výskytu více odpovídajících spekter u jednoho peptidu bylo jako referenční záznam vybráno spektrum s nejlepší hodnotou tzv. ion score.

Pro potvrzovací časově závislou SRM analýzu v druhém kroku bylo vybráno až 8 nejintenzivnějších přechodů na jeden peptid a jeho zvolený dominantní nábojový stav, použity byly fragmenty y i b série. Pro porovnání byly použity v jedné metodě také shodné izotopicky značené ekvivalenty peptidů a měřeny byly zároveň i tzv. decoy obrácené přechody všech sledovaných peptidů (na jeden peptid bylo měřeno 5 klasických přechodů a 5 těžkých přechodů a 10 decoy přechodů). Pro sledování případných odchylek v retenčním čase byla v každém měření použita specifická peptidová směs, tzv. RT peptidy (RT calibration kit, Biognosys). Měření probíhala na přístroji QTRAP 5500 (AB Sciex) nebo TSQ Vantage (Thermo). Parametry měření byly shodné s výše uvedenými daty, oba kvadrupóly pracovaly v jednotkovém rozlišení. Časové okno časově závislé SRM analýzy bylo nastaveno na 300 s. Data byla zpracována v platformě mProphet/mQuest (Biognosys

AG, Schlieren, Švýcarsko),<sup>165</sup> umožňující komplexní analýzu SRM dat. Získané záznamy peptidů a jejich odpovídajících fragmentů byly porovnány s knihovnou spekter, vytvořenou při předchozím měření v MIDAS módu. Sledovány byly zejména retenční časy, poměry intenzit odpovídajících fragmentů, tvary jednotlivých píků a další parametry, které ve výsledku vytvořily tzv. souhrnné diskriminační d-skóre, hodnotící celkovou kvalitu záznamu. Po celkovém vyhodnocení všech naměřených dat byla vytvořena souhrnná SRM metoda, která byla v posledním kroku testována na komplexní matici.

### 4.6.8.2 Ověření SRM metody na biologické matici

Jako komplexní biologický materiál byly použity směsné vzorky imunodepletované kontrolní plazmy a plazmy pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií, připravené štěpením trypsinem v roztoku (viz kapitola 4.6.6). Odpařené vzorky naštěpené plazmy byly rozpuštěny v pufru A (2% ACN, 0.1% FA). Ke vzorku byly přidány RT peptidy v koncentraci 1:10. Celkově bylo analyzováno 0.1 µg vzorku v jedné analýze. Sledováno bylo 5 nejintenzivnějších přechodů na jeden peptid. Měření probíhala na hmotnostním spektrometru TSQ Vantage (Thermo) v časově závislém SRM měřícím módu. Separace probíhala na on-line připojeném kapalinovém chromatografu nanoLC 2Dplus system (Eksigent) s kolonou o délce 10 cm, vnitřním průměrem 75 µm, plněnou Magic C<sub>18</sub> AG 5 µm stacionární fází (Michrom BioResources). Analýza probíhala za lineární změny gradientu ACN (5% - 35%) ve vodě obsahující 0.1% FA po dobu 45 min při průtoku 300 nl/min. Rozlišení v Q<sub>1</sub> a Q<sub>3</sub> bylo nastaveno na parametr unit, časové okno pro jeden prekurzor bylo nastaveno na 240 s, čas cyklu byl 2 s.

Naměřená data byla zpracována pomocí platformy mProphet/mQuest. Všechny naměřené záznamy byly manuálně validovány a zhodnoceny pomocí d-skóre. Závěrem byla vytvořena finální SRM metoda, testovaná v dalších krocích pro použití ke kvantitativní analýze potenciálních markerů hypertrofické kardiomyopatie v plazmě.

### 4.6.9 Příprava vzorků s izotopicky značenými peptidy

Pro SID kvantifikaci byly použity peptidy SpikeTides TQL (JPT Peptide technologies) a peptidy AQUA (Sigma Aldrich). Peptidy byly dodány v množství 5 x 1 nmol, izotopicky značené na uhlíku a dusíku C-koncového argininu nebo lysinu (13C,

15N). JPT peptidy ve své struktuře nesly navíc kvantifikační značku, tzv. JPT tag, který bylo nutné před SRM analýzou trypticky odstranit (obr. 4.2)



Obr. 4.2 Odštěpení JPT tagu z peptidu Spike Tides TQL. K\*/R\* = izotopicky značený Arg nebo Lys.

Pro ověření přítomnosti jednotlivých peptidů a revizi jejich fragmentačních spekter byl vytvořen směsný vzorek syntetických peptidů. Zkumavka obsahující 1 nmol JPT peptidu, byla rozpuštěna ve 100  $\mu$ l 1M močoviny v 100mM hydrogenuhličitanu amonném. Následně byly zkumavky míchány 60 min a poté na 10 min vloženy do ultrazvukové lázně. Takto rozpuštěné vzorky byly centrifugovány 5 min/4000 x  $g$ /25  $^{\circ}$ C. Poté z nich byl vytvořen směsný vzorek, jehož objem byl zredukován na cca 100  $\mu$ l odpařením ve vakuové odparce. Takto připravený vzorek byl štěpen trypsinem v poměru 1:50 (trypsin : protein) přes noc při teplotě 37  $^{\circ}$ C. Vzorek byl následně přečištěn pomocí centrifugačních kolonek (UltraMicroSpin Column, Harvard Apparatus) a odpařen do sucha na vakuové odparce. Pro další analýzu na hmotnostním spektrometru byl vzorek rozpuštěn v 2% ACN, 0.1% FA. Takto připravené peptidy byly ve známém množství přidávány k připraveným vzorkům plazmy. Peptidy AQUA nevyžadují před použitím tryptické štěpení a proto byly po naředění ihned přidávány ke vzorku.

#### 4.6.10 Optimalizace a validace kvantifikační SID-SRM-MS metody

Optimalizace a validace metody pro kvantifikaci potenciálních biomarkerů ve vzorcích plazmy probíhala s využitím izotopicky značených syntetických peptidů o aminokyselinové sekvenci shodné s cílenými nativními peptidy. Pro ověření identity značených peptidů a získání jejich fragmentačních spekter byla použita data z finální SRM metody vytvořené v Curychu. Směsný vzorek těchto peptidů byl podroben MIDAS analýze na hmotnostním spektrometru QTRAP 4000 (AB Sciex) s předřazenou kapalinovou chromatografií. Analýza probíhala podle výše popsaných podmínek (DT 15 ms, gradient 30 min). Naměřená data byla identifikována v programu ProteinPilot s využitím nově vytvořené databáze obsahující sekvence syntetických peptidů. Po analýze byla tato data zpracována v programu Skyline v1.1 (MacCoss Lab, Seattle, USA). Všechna měření

probíhala na hmotnostním spektrometru QTRAP 4000 AB Sciex) za výše uvedených podmínek, data byla vyhodnocována v programu Skyline.

Podle zadaných parametrů (step size 1, step count 4) byla v programu Skyline vytvořena SRM metoda pro **optimalizaci kolizní energie** vycházející z obecně platných rovnic pro výpočet kolizní energie v závislosti na nábojovém stavu a  $m/z$  prekursoru. Tato metoda byla následně aplikována na vzorek obsahující izotopicky značené peptidy. Na základě výsledků byly optimalizovány její hodnoty pro každý peptid.

Míra shody (**preciznost měření**) mezi jednotlivými měřeními byla zjišťována v rámci analýz technických replikátů finálních vzorků (viz dále). U jednotlivých peptidů shodných replikátů byl sledován poměr L/H. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány a byla vypočtena směrodatná odchylka a příslušný CV, který hodnotil míru preciznosti.

V rámci určování pracovního rozsahu byly zjišťovány parametry **linearity odezvy** použitých syntetických peptidů ve sledované oblasti. Komplexní matici pro odhad těchto parametrů tvořila naštěpená imunodepletovaná směsná plazma o koncentraci 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  nebo naštěpená směsná plazma o koncentraci 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , do které byly přidávány izotopicky značené peptidy o výsledných koncentracích 0.8; 4; 20; 100 a 200  $\text{fmol}/\mu\text{g}$ . Pro určení lineárního rozsahu koncentrací byl každý koncentrační bod analyzován metodou SRM ve třech technických replikátech. Z poměrů ploch pod píkem nejintenzivnějšího přechodu syntetického standardu a nativního peptidu a jejich známých koncentrací byla vytvořena grafická závislost charakterizovaná regresní rovnicí a hodnotou spolehlivosti  $R$ .<sup>166</sup> Pomocí získané regresní rovnice byla vypočtena koncentrace sledovaných peptidů.

**Stabilita připravených vzorků** před jejich analýzou je jednou z klíčových otázek průběhu celého analytického postupu. Výchozím materiálem byla nedepletovaná plazma, ve které byly sledovány dva vybrané endogenní peptidy a jejich syntetické ekvivalenty (VDVIPVNLPGHEGQR, STTPDITGYR). Bylo určeno několik proměnných: časový úsek od štěpení k samotné analýze (ihned, týden, dva týdny, tři týdny), počet rozmrazovacích cyklů (bez zmražení při 8 °C, jedno až tři zmražení/rozmražení) a otázka okamžiku přidavku syntetických peptidů, tj. zda přidat peptidy ke vzorku hned po štěpení nebo až před vlastní analýzou. Pro každý sledovaný bod byly naměřeny dva analytické a z nich tři technické replikáty. Získaná data byla statisticky hodnocena pomocí programu GraphPad



Prism v5.02 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). U získaných proměnných byla testována normalita rozložení pomocí D'Agostino-Pearsonova testu, dále byly prováděny párové i nepárové t-testy, u neparametrických dat Mann-Whitneyho test. U opakovaných měření byla provedena analýza rozptylu včetně *post hoc* Tukeyho testu pro porovnání více skupin. Statistická významnost byla stanovena na hladině  $p \leq 0.05$ .

**Přenos vzorku do následných analýz** (označovaný jako carry over) je jedním z problémů při analýzách nejen biologického materiálu. Při analýze slepého vzorku (pufr A) jsme metodou použitou pro kvantifikaci sledovaných peptidů byli schopni detekovat některé peptidy z předchozí analýzy a to až do výše 5 % předchozí odezvy. V rámci testování metody tedy byla charakterizována míra tohoto přenosu pomocí třech měření vzorků imunodepletované štěpené plazmy s přidavkem syntetických peptidů o známé koncentraci, po kterých vždy následovala analýza slepého vzorku stejnou metodou, použitou v předchozím experimentu. Ze zjištěných ploch pod píkem nejintenzivnějších přechodů peptidů obou forem (nativní i syntetický) byla vypočítána jejich průměrná procenta přenosu. Zároveň byly testovány kroky vedoucí ke snížení tohoto přenosu popsané v literatuře.<sup>167</sup> Mezi jednotlivé vzorky byl vkládán krátký chromatografický krok, při kterém bylo na předkolonu aplikováno 5  $\mu$ l 50% roztoku trifluoroetanolu (TFE) v acetonitrilu.

### 4.6.11 Kvantifikace potenciálních proteinových markerů

Pro relativní kvantifikaci potenciálních markerů hypertrofické kardiomyopatie byly použity imunoafinitně separované směsné vzorky kontrolní skupiny a skupiny pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. Pro jednu analýzu byl použit vždy 1  $\mu$ g naštěpené peptidové směsi (kap. 4.6.5.1). Vzorek byl rozpuštěn v 2% ACN, 0.1% FA. Analýza a separace probíhala na hmotnostním spektrometru QTRAP 4000 (AB Sciex) s připojenou nanokapalinovou chromatografií podle dříve uvedených parametrů (kap. 4.6.8.1 - *Výběr peptidů a vhodných fragmentů pomocí SRM a následné MIDAS analýzy*). Data byla získána z analýzy dvou technických replikátů. Vyhodnocení analýz probíhalo pomocí programu MultiQuant v1.1 (AB Sciex, Foster City, USA) a programu Microsoft Excel.

Pro absolutní kvantifikaci potenciálních markerů hypertrofické kardiomyopatie byly použity neseparované (kvantifikace fibronektinu) i imunoafinitně separované (ostatní

proteiny) vzorky plazmy pacientů a kontrolní skupiny, naštěpené pomocí postupu, popsaného v kapitole 4.6.5.2. Rozpuštěny byly v 2% ACN, 0.1% FA. Koncentrace peptidů plazmy a koncentrace přidanych izotopicky značených peptidů byla závislá na předchozích experimentech.

Kvantifikační analýza metodou SID-SRM-MS probíhala na hmotnostním spektrometru QTRAP 4000 podle dříve uvedených parametrů. Separace probíhala na *in situ* plněné koloně PicoTip Emmiter (75  $\mu\text{m}$ , 100 mm, stacionární fáze  $\text{C}_{18}$ , velikost částic 3  $\mu\text{m}$ , velikost pórů 100  $\text{\AA}$ ) zakončené sprejovací jehlou, které byla předřazena 2.5 cm dlouhá koncentrační předkolonka plněná stejnou stacionární fází, tvořená kapilárou IntegraFrit (New Objective) s vnitřním průměrem 100  $\mu\text{m}$ . Jako mobilní fáze byly použity pufry A (2% ACN, 0.1% FA) a B (98% ACN, 0.1% FA).

Po zakoncentrování vzorku na předkoloně po dobu 10 min při průtoku mobilní fáze A rychlostí 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  byla směs peptidů separována na koloně a eluována pomocí lineárního gradientu tvořeného mobilními fázemi A a B. Celkový čas analýzy byl 45 min, lineární gradient trval 30 min za plynulé změny zastoupení mobilních fází z 0 % B do 40 % B při rychlosti průtoku 360  $\text{nl}/\text{min}$ . Celkem byly sledovány tři nejintenzivnější přechody pro daný peptid.

Od každého vzorku byly připraveny dva analytické replikáty, u nichž byly nezávisle na sobě měřeny tři technické replikáty. Celkem tedy bylo na jeden vzorek provedeno šest shodných analýz. Získaná data byla zpracována v programu Skyline, kde byly záznamy upraveny pomocí Sawitzky-Golay transformace. Po zpracování v tomto programu byly extrahovány informace o ploše pod píkem nejintenzivnějšího přechodu y fragmentu každého peptidu a o L/H poměru korespondujících přechodů. Takto získaná data byla v programu Microsoft Excel dále zpracována (průměrné hodnoty, směrodatné odchylky, CV). Vzhledem ke známému množství přidaneho syntetického peptidu bylo možné určit i kvantitu jednotlivých sledovaných peptidů v analyzovaných vzorcích. Hodnoty průměrných koncentrací nativních peptidů byly statisticky zpracovány v programu GraphPad Prism. Parametrická data byla hodnocena nepárovým t-testem, výsledné hodnoty jsou uváděny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Data s neparametrickým rozdělením byla testována pomocí Mann-Whitney statistického testu a výsledné hodnoty jsou prezentovány jako medián (IRQ). Ze statistického hodnocení byly

vyřazeny vzorky, jejichž CV mezi jednotlivými replikáty přesáhl hodnotu 0.25. Statistická významnost byla stanovena na hladině  $p \leq 0.05$ .

#### 4.6.12 ELISA stanovení vybraných markerů

Část vybraných proteinů byla stanovována v plazmě pacientů i kontrolní skupiny pomocí metody ELISA s cílem porovnat výsledky stanovení s daty získanými kvantitativní metodou cílené proteomické analýzy.

Pro vybrané proteiny byly použity komerčně dostupné kity QuantiMatrix Human ELISA Kit (Millipore Corporation), RayBio Human ELISA Kit (RayBiotech, Norcross, USA) nebo USCN Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit (USCN Life Science, Wuhan, Čína) (tab. 4.6).

Přehled použitých ELISA kitů		
Protein	Výrobce	Rozsah kitu
<b>BNP</b>	USCN Life Science	31.2 – 2 000 pg/ml
<b>TIMP-2</b>	RayBiotech	1.6 – 1 200 pg/ml
<b>TIMP-1</b>	RayBiotech	24.69 – 18 000 pg/ml
<b>MMP-1</b>	RayBiotech	24.69 – 18 000 pg/ml
<b>MMP-9</b>	RayBiotech	8.24 – 6 000 pg/ml
<b>FN</b>	Millipore Corporation	3 – 1 000 ng/ml
<b>bTG</b>	USCN Life Science	46.88 – 3 000 pg/ml
<b>P-sel</b>	RayBiotech	0.041 – 30 ng/ml
<b>TFPI</b>	USCN Life Science	78 – 5 000 pg/ml
<b>IGF-1</b>	RayBiotech	0.25 – 60 ng/ml
<b>MMP-2</b>	RayBiotech	3.3 – 800 ng/ml

Tab. 4.6 Přehled použitých ELISA kitů. BNP = mozkový natriuretický peptid, TIMP-1 a 2 = tkáňový inhibitor metaloproteáz 1 a 2, MMP-1, 2 a 9 = matrixmetaloproteáza 1, 2 a 9, FN = fibronektin, bTG =  $\beta$ -tromboglobulin, P-sel = P selektin, TFPI = inhibitor tkáňového faktoru, IGF-1 = somatomedin C.

Koncentrace vzorků byla upravena deionizovanou vodou nebo přiloženým ředícím roztokem podle informací výrobce nebo podle dostupných literárních zdrojů. Konkrétní postup stanovení se řídil protokolem výrobce. Každý bod kalibrační křivky byl analyzován ve třech replikátech, jednotlivé vzorky byly stanovovány v duplikátu. Absorbance jednotlivých vzorků byla odečítána při 450 nm na přístroji Paradigm Detection Platform (Beckman Coulter, Fullertone, USA) s využitím programu Multimode Analysis Software (Beckman Coulter).

Tvorba kalibračních křivek a následná interpolace naměřených dat byly prováděny pomocí statistického programu GraphPad Prism. Statistická analýza dat jednotlivých vzorků byla prováděna též pomocí výše zmíněného programu. Nejprve byla hodnocena normalita rozložení testovaných hodnot pomocí D'Agostino-Pearsonova testu. Parametrická data byla hodnocena nepárovým t-testem a výsledné hodnoty jsou uváděny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Data s neparametrickým rozdělením byla testována pomocí Mann-Whitney statistického testu a výsledné hodnoty jsou prezentovány jako medián (IRQ). Ze statistického hodnocení byly vyřazeny vzorky, jejichž CV mezi jednotlivými replikáty přesáhl hodnotu 0.25. Statistická významnost byla stanovena na hladině  $p \leq 0.05$ . Při korelační analýze dat cílené proteomické analýzy a ELISA stanovení byly použity průměrné hodnoty obou biologických replikátů. Pro statisticky významné výsledky byly vytvořeny ROC křivky charakterizující vzájemný vztah senzitivity a specifčnosti použité metody.

### 5 Výsledky a diskuse

Problematika hledání proteinů využitelných jako laboratorní markery různých patologických stavů a zejména využití proteomických technologií v oblasti biomedicíny je stále velmi diskutovaným tématem ve vědeckých i lékařských kruzích. Na jedné straně stojí základní proteomický výzkum, na straně druhé požadavky klinických pracovníků na vysokou senzitivitu a selektivitu nových metod a v neposlední řadě potřeby správné laboratorní praxe. Klinická proteomika balancuje na tenké hranici mezi těmito dvěma oblastmi. V posledních letech je popisováno stále více proteinů s definovaným vztahem k určitému onemocnění nebo stavu organismu. Vybrat z této dlouhé řady kandidátů opravdu validní ukazatele se stalo pro metody založené na detekci protilátek problémem, jelikož jejich vývoj a uvedení do praxe je v mnoha případech nemožné a hlavně časově a finančně náročné. Naopak pro klinickou proteomiku, pracující s metodami hmotnostní spektrometrie, je to výzvou. Zejména technika přesné kvantifikace SID-SRM-MS, založená na detekci hledaného analytu pomocí záznamu kombinace hmot  $m/z$  peptidu a jeho fragmentu, ve spojení s paralelní detekcí odpovídajícího identického analytu značeného izotopicky, nabízí zajímavou alternativu ke stanovením pomocí imunoanalýzy. Nespornou výhodou této metody je možnost současné detekce a kvantifikace až stovek analytů během jednoho měření.

Cílem předkládané práce bylo nalézt a vybrat vhodné proteiny s popsáním vztahem ke kardiovaskulárnímu onemocnění hypertrofická kardiomyopatie a pomocí dostupných proteomických metod vytvořit kvantifikační metodu, schopnou charakterizovat rozdíly mezi pacienty a kontrolní skupinou. Hypertrofická kardiomyopatie představuje velmi komplikované onemocnění, úzce související s vrozenými defekty určitých genů, jejichž fenotypový projev bývá často modifikován vnějšími podmínkami. Bohužel, mnoho neobjasněných patofyziologických souvislostí a neúplně popsané genetické pozadí velmi komplikuje přesnou charakterizaci proteinových změn. Získané unikátní výsledky mohou v budoucnu pozitivně přispět k lepšímu sledování jejího rozvoje či vlivu léčebných intervencí.

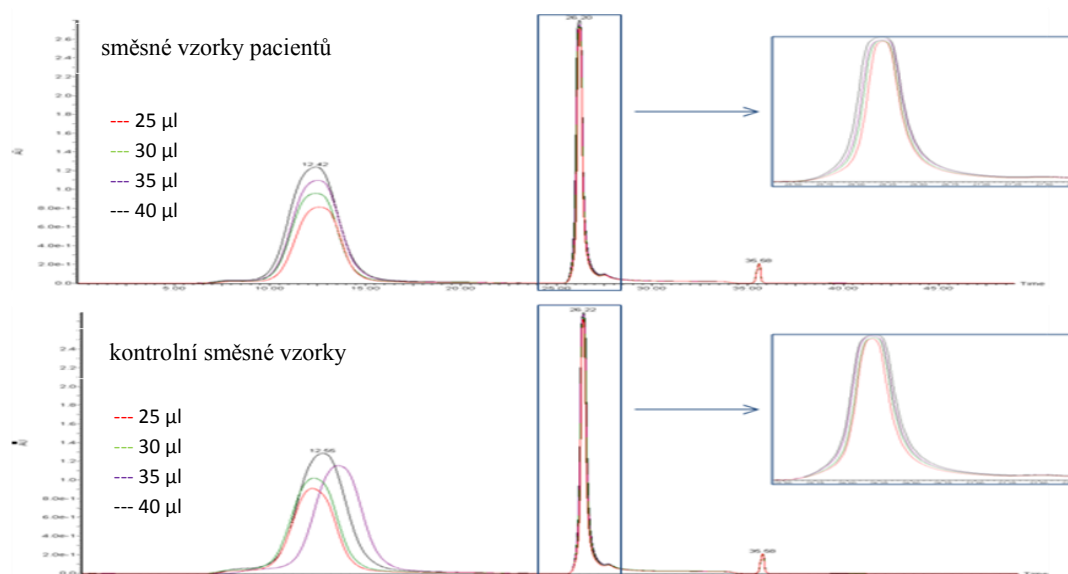
Kapitola *Výsledky a diskuse* je tematicky rozdělená do pěti podkapitol. V první podkapitole *Optimalizace přípravy vzorku* jsou diskutovány zejména různé postupy jeho

zpracování pro účely kapalinové chromatografie a navazující analýzy na hmotnostním spektrometru. Druhá kapitola se věnuje výsledkům získaným kvantitativní iTRAQ analýzou na směsných vzorcích (*iTRAQ porovnávací studie*), která měla za cíl nalézt další využitelné proteinové indikátory. Zde je zároveň více rozvedena problematika nového potenciálního markeru – plazmatického fibronektinu. Ve třetí kapitole *Tvorba a optimalizace SRM metody* jsou shrnuty cesty, vedoucí k výběru vhodných peptidů a jejich fragmentů a použité optimalizační a validační postupy. Čtvrtá podkapitola *Kvantifikace peptidů* se věnuje dvěma oblastem, a to jednak relativní kvantifikaci založené na porovnávání ploch pod píkem mezi směsnými vzorky pacientů a kontrol, a jednak absolutní kvantifikaci prováděné technikou SID-SRM-MS. Závěrečná kapitola *Verifikace vybraných ukazatelů pomocí imunostanovení* prezentuje a komentuje data, získaná pomocí ELISA stanovení vybraných markerů.

## 5.1 Optimalizace přípravy vzorku

Velkou překážkou při analýze biologických vzorků je obrovská komplexita proteinového složení, spojená s několikařádrovými rozdíly v koncentracích obsažených proteinů. Jak již bylo zmíněno v úvodní části, diagnosticky zajímavé proteiny o koncentracích v řádu ng/ml bývají zpravidla zastíněny přítomností několika málo vysoce zastoupených proteinů, které téměř znemožňují jejich analýzu. V případě vzorků plazmy, u kterých dominuje zejména albumin a imunoglobuliny, se v mnoha případech osvědčilo jejich odstranění technikou imunoafinitní separace na chromatografické koloně.

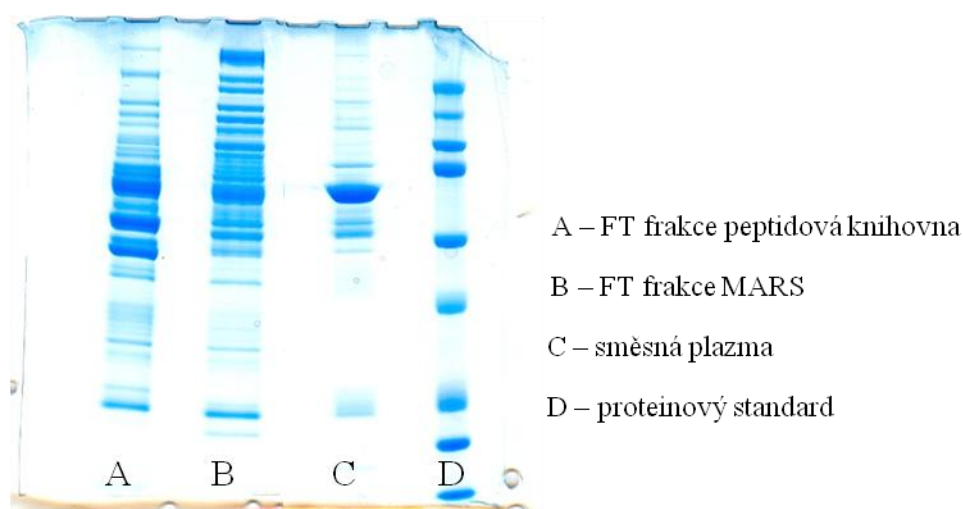
V našem případě jsme pro snížení komplexity plazmy testovali použití kolony MARS Hu-14 (Agilent) a technologii peptidových knihoven. V případě kolony MARS Hu-14 bylo nejprve optimalizováno množství plazmy použité pro jednu imunoafinitní separaci. Z připojených chromatogramů (obr. 5.1) je patrné zvyšující se množství procházející i vázané frakce proteinů u obou druhů směsných vzorků (kontrolní i vzorek od pacientů s kardiomyopatií). Nanáška s největším obsahem plazmy (40  $\mu$ l) je maximum doporučené výrobcem kolony. Vzhledem k poměrně rozdílné koncentraci proteinů plazmy v jednotlivých vzorcích byl určen maximální objem plazmy pro tuto chromatografii na 37.5  $\mu$ l plazmy, resp. 150  $\mu$ l celkového objemu naředěného vzorku v jedné analýze.



Obr. 5.1 Optimalizace separovaného množství plazmy. Byly použity směsné vzorky plazmy kontrolní skupiny a plazmy nemocných hypertrofickou kardiomyopatií.

Dalším krokem bylo orientační ověření obsahu proteinů ve směsném vzorku, který byl použit pro imunoafinitní separaci i pro otestování technologie peptidových knihoven. Metodou mikroBCA byla stanovena koncentrace výchozí plazmy, FT a vázané frakce z imunoafinitní separace pomocí MARS Hu-14 kolony a koncentrace vzorku po aplikaci peptidových knihoven. Získané hodnoty byly přepočítány na celkový výtěžek z výchozího plazmatického vzorku. Obsah bílkoviny u směsného vzorku byl stanoven na 74.8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (100 %). Technikou peptidových knihoven bylo získáno zhruba 8.1 % původního vzorku, u FT frakce z imunodepleční kolony byl zjištěn zisk zhruba 4.6 % původního vzorku a u vázané frakce byl obsah celkové bílkoviny vypočítán na 95.4 % původního vzorku.

Pro orientační porovnání získaných vzorků byla provedena jednorozměrná SDS gelová elektroforéza získaných vzorků. Na výsledném gelu je patrné odstranění velké části vysoce zastoupených proteinů, zároveň je zejména u FT vzorku vidět nárůst počtu ostatních proteinů přítomných v plazmě, jejichž detekce by v přítomnosti vysoce zastoupených proteinů byla značně omezená (obr. 5.2).



Obr 5.2 1D SDS elektroforetický gel se vzorky připravenými technikou peptidových knihoven (A), imunoafinitní separací pomocí HPLC kolony MARS Hu-14 (B) a vzorkem směsné plazmy (C).

Vzorek získaný technikou peptidových knihoven byl spolu s FT vzorkem získaným pomocí imunoafinitní separace HPLC kolonou MARS Hu-14 podroben LC-MALDI-MS/MS analýze na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF/TOF. Celkem bylo v obou vzorcích identifikováno 113 proteinů. Ve vzorku zpracovaném pomocí peptidových knihoven bylo identifikováno celkem 66 proteinů. Ve vzorku připraveném



pomocí imunoafinitní separací bylo identifikováno celkem 85 proteinů. Shodně bylo v obou vzorcích identifikováno 38 proteinů. V případě imunoafinitní separace pomocí MARS Hu-14 kolony bylo tedy identifikováno navíc 47 proteinů, ve vzorku získaném pomocí peptidových knihoven 28 proteinů. Přehled identifikovaných proteinů v jednotlivých vzorcích je uveden v následující tabulce (tab. 5.1). Rozdíly v absolutních počtech identifikovaných proteinů v jednotlivých vzorcích jsou nezanedbatelné. Navíc i s ohledem na principy obou použitých metod byla pro úpravu koncentračního rozpětí plazmy s následnou kvantitativní analýzou jako vhodnější technika zvolena imunoafinitní separace pomocí MARS Hu-14 HPLC kolony.

### Proteiny shodně identifikované v obou vzorcích

n	Identifikační číslo v UniProt databázi	Název proteinu
1	Q15848	Adiponectin
2	P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein
3	P02647	Apolipoprotein A-I
4	P02652	Apolipoprotein A-II
5	P06727	Apolipoprotein A-IV
6	P04114	Apolipoprotein B-100
7	P02656	Apolipoprotein C-III
8	P02649	Apolipoprotein E
9	P04003	C4b-binding protein alpha chain
10	P20851	C4b-binding protein beta chain
11	P00450	Ceruloplasmin
12	P10909	Clusterin
13	P05160	Coagulation factor XIII B
14	P02745	Complement C1q subcomponent subunit A
15	P02746	Complement C1q subcomponent subunit B
16	P02747	Complement C1q subcomponent subunit C
17	P00736	Complement C1r subcomponent
18	P09871	Complement C1s subcomponent
19	P01024	Complement C3
20	POCOL5	Complement C4-B
21	P02748	Complement component C9
22	P08603	Complement factor H
23	Q03591	Complement factor H-related protein 1
24	P02671	Fibrinogen alpha chain
25	P02675	Fibrinogen beta chain
26	P02679	Fibrinogen gamma chain
27	P02751	Fibronectin
28	P02790	Hemopexin
29	P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2
30	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1
31	P00747	Plasminogen
32	P02760	Protein AMBP
33	P00734	Prothrombin
34	P02753	Retinol-binding protein 4
35	P02743	Serum amyloid P-component
36	P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1
37	P07225	Vitamin K-dependent protein S
38	P04004	Vitronectin

---



---

**Proteiny identifikované pouze ve vzorku po imunoafinitní separaci**


---



---

<b>n</b>	<b>Identifikační číslo v UniProt databázi</b>	<b>Název proteinu</b>
1	P43652	Afamin
2	P01011	Alpha-1-antichymotrypsin
3	P04217	Alpha-1B-glycoprotein
4	P08697	Alpha-2-antiplasmin
5	P01019	Angiotensinogen
6	P01008	Antithrombin-III
7	O75882	Attractin
8	P02749	Beta-2-glycoprotein 1
9	P07814	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase
10	Q96IY4	Carboxypeptidase B2
11	P15169	Carboxypeptidase N catalytic chain
12	P22792	Carboxypeptidase N subunit 2
13	P00742	Coagulation factor X
14	P00748	Coagulation factor XII
15	P06681	Complement C2
16	P01031	Complement C5
17	P13671	Complement component C6
18	P10643	Complement component C7
19	P07357	Complement component C8 alpha chain
20	P07358	Complement component C8 beta chain
21	P07360	Complement component C8 gamma chain
22	P00751	Complement factor B
23	Q02985	Complement factor H-related protein 3
24	P05156	Complement factor I
25	P08185	Corticosteroid-binding globulin
26	Q9H1D9	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC6
27	P06396	Gelsolin
28	P05546	Heparin cofactor 2
29	P04196	Histidine-rich glycoprotein
30	Q14520	Hyaluronan-binding protein 2
31	P35858	Insulin-like growth factor-binding protein complex
32	P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1
33	Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3
34	Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
35	P29622	Kallistatin
36	P01042	Kininogen-1
37	P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein
38	P51884	Lumican
39	Q9NYL2	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase MLT
40	Q96PD5	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
41	P36955	Pigment epithelium-derived factor
42	P03952	Plasma kallikrein
43	P05155	Plasma protease C1 inhibitor
44	P27918	Properdin
45	P05452	Tetranectin
46	P05543	Thyroxine-binding globulin
47	P02774	Vitamin D-binding protein

<b>Proteiny identifikované pouze ve vzorku získaném technikou peptidových knihoven</b>		
<b>n</b>	<b>Identifikační číslo v UniProt databázi</b>	<b>Název proteinu</b>
1	P03950	Angiogenin
2	P03973	Antileukoproteinase
3	P02654	Apolipoprotein C-I
4	P05090	Apolipoprotein D
5	P49747	Cartilage oligomeric matrix protein
6	P12259	Coagulation factor V
7	P00488	Coagulation factor XIII A chain
8	Q12805	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
9	P23142	Fibulin-1
10	Q15485	Ficolin-2
11	Q08380	Galectin-3-binding protein
12	P22352	Glutathione peroxidase 3
13	P04196	Histidine-rich glycoprotein
14	P01876	Ig alpha-1 chain C region
15	P01857	Ig gamma-1 chain C region
16	P01859	Ig gamma-2 chain C region
17	P01860	Ig gamma-3 chain C region
18	P01761	Ig heavy chain V-I region SIE
19	P01768	Ig heavy chain V-III region CAM
20	P01834	Ig kappa chain C region
21	P04208	Ig lambda chain V-I region WAH
22	P0CG05	Ig lambda-2 chain C regions
23	P01871	Ig mu chain C region
24	P48740	Mannan-binding lectin serine protease 1
25	P59666	Neutrophil defensin 3
26	P02768	Serum albumin
27	P02766	Transthyretin
28	P04070	Vitamin K-dependent protein C

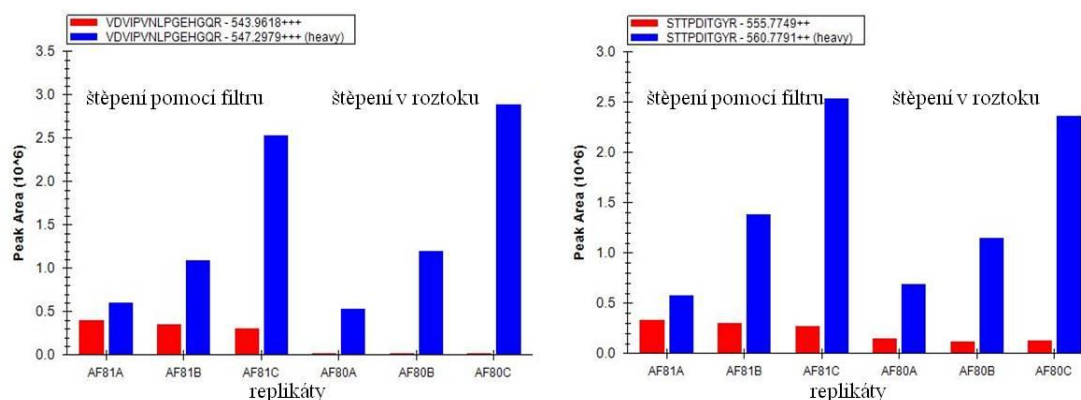
Tab. 5.1 Souhrn identifikovaných proteinů ve vzorcích získaných technikou imunoafinitní separace a metodou peptidových knihoven.

Dalším krokem preanalytické fáze, který bylo nutno zvážit, byla volba optimálního postupu trypsinového štěpení vzorků. Byly srovnávány dva přístupy; tzv. štěpení v roztoku a postup vycházející z tzv. FASP protokolu (viz kap. 4.6.5). Pro hodnocení účinnosti jednotlivých postupů bylo použito sledování koncentrací plazmatického proteinu fibronektinu pomocí srovnání ploch pod nejintenzivnějším přechodem vybraných nativních peptidů s jejich izotopicky značenými ekvivalenty. Pro test byla použita směsná neseparovaná kontrolní plazma. Byly sledovány dva vybrané tryptické peptidy VDVIPVNLPGEGHQQR a STTPDITGYR. Celkově byly analyzovány metodou SRM tři vzorky z každého štěpícího postupu. Při samotné analýze bylo použito vždy 0.1 µg peptidové směsi a rostoucí koncentrace jednotlivých izotopicky značených peptidů (10 fmol, 20 fmol a 50 fmol, resp. 5 fmol, 10 fmol a 20 fmol). Získaná data byla vyhodnocena v programu Skyline. Pro porovnání byly použity hodnoty průměrných ploch

pod píkem nejintenzivnějšího přechodu nativního peptidu (pro oba peptidy y7) a jejich L/H poměry.

Rozdíl v koncentraci STTPDITGYR peptidu v nativním vzorku připraveném metodou štěpení na filtru (vzorky A; B; C) byl ve srovnání s peptidem ze vzorku připraveného pomocí štěpení v roztoku více než dvojnásobný. V případě peptidu VDVIPVNLPGEGHQQR byl dokonce čtrnáctinásobný (vzorky D; E; F) (obr. 5.3, tab. 5.2). Štěpení pomocí molekulového filtru je snadno aplikovatelné na větší skupiny vzorků a jeho výhodou je získání čisté peptidové směsi v několika málo krocích, bez nutnosti dalšího odsolování a čištění vzorku. V případě fibronektinu byla navíc experimentálně prokázána větší výtěžnost analytu při použití této metody štěpení.

Ačkoliv tyto závěry nelze zobecňovat pro ostatní proteiny, vzhledem k získaným výsledkům byla pro další přípravu vzorků pro SRM kvantifikační analýzu zvolena tato metoda. V případě jiných proteinů ovšem může například vlivem vyšší afinity k molekulovému filtru docházet k jejich ztrátám. Protože ale neexistuje jedna ideální metoda, je důležité zvolit takovou, u které benefity aktuálně převažují nad negativy, jež je ovšem nutno vést v patrnosti.



Obr. 5.3 Porovnání celkových ploch pod píkem peptidů VDVIPVNLPGEGHQQR a STTPDITGYR ve vzorcích získaných štěpením pomocí molekulového filtru a štěpením v roztoku. Červené sloupce znázorňují nativní peptidy plazmy, modré jsou jejich izotopicky značené ekvivalenty.

Peptid	c značeného peptidu [fmol]	Vzorek	Plocha pod píkem	L/H	Filtr/ v roztoku
STTPDITGYR	5	A	140883	0.58	2.7
STTPDITGYR	10	B	125007	0.22	2.1
STTPDITGYR	20	C	115256	0.11	1.9
STTPDITGYR	5	D	65429	0.22	
STTPDITGYR	10	E	51301	0.11	
STTPDITGYR	20	F	55742	0.06	
VDVIPVNLPGEHGQR	10	A	308647	0.66	13.7
VDVIPVNLPGEHGQR	20	B	276642	0.33	16.7
VDVIPVNLPGEHGQR	50	C	239528	0.12	12.9
VDVIPVNLPGEHGQR	10	D	19968	0.05	
VDVIPVNLPGEHGQR	20	E	18396	0.02	
VDVIPVNLPGEHGQR	50	F	21300	0.01	

Tab. 5.2 Souhrn zjištěných ploch pod píkem a L/H poměrů jednotlivých peptidů v měřených vzorcích.

## 5.2 iTRAQ porovnávací studie

Během počáteční fáze experimentů byly porovnávány pomocí „shot-gun“ proteomické strategie spojené s iTRAQ kvantifikací směsné imunoafinitně separované vzorky pacientů a kontrolní skupiny. Cílem bylo identifikovat nové potenciální proteinové ukazatele hypertrofické kardiomyopatie.

Provedené srovnávací studie odhalily významné rozdíly v kvantitativních profilech obou skupin vzorků. Z celkového počtu 234 jednoznačně identifikovaných proteinů na hladině 5% globálního FDR jich zhruba pětina vykazuje změny v plazmatické koncentraci (tab. 5.3). Značná část těchto proteinů se účastní lipidového metabolismu nebo procesu srážení krve. Vzhledem k časté hypolipidemické a antikoagulační léčbě pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií se dá očekávat, že hladiny těchto proteinů budou významně ovlivněné použitou medikací a nejsou tedy vhodné pro další fáze studie potenciálních proteinových ukazatelů stavu onemocnění. Jedním ze zajímavých výsledků je signifikantně snížená hladina solubilního fibronektinu u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. Na základě níže uvedených informací byl tento protein zahrnut do dalších experimentů založených na cílené proteomické analýze. O zařazení fibronektinu do skupiny potenciálních markerů hypertrofické kardiomyopatie rozhodla i skutečnost, že byly v rámci dizertační práce sledovány proteiny MMP-2, MMP-9 a jejich inhibitory TIMP-1 a TIMP-2, které mohou mít na jeho hladiny v plazmě značný vliv.

Název proteinu	115/114	p hodnota	117/116	p hodnota
Apolipoprotein B-100	0.77	0.00	0.82	0.00
<b>Fibronectin 1 isoform 4 preprotein</b>	0.80	0.00	0.86	0.00
Ceruloplasmin	1.7	0.01	1.22	0.00
Complement C5	1.3	0.01	1.4	0.00
Prothrombin	0.89	0.00	0.92	0.00
Apolipoprotein A1	0.72	0.00	0.76	0.00
Complement component C7	1.39	0.00	1.44	0.00
Heparin cofactor 2	0.92	0.00	0.95	0.02
Coagulation factor XIII B chain	0.92	0.00	0.93	0.00
Complement component C9	1.6	0.00	1.10	0.00
Isoform 2 of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	1.15	0.00	1.21	0.00
Apolipoprotein E2	0.80	0.00	0.77	0.00
Isoform 1 od Pregnancy zone protein	0.86	0.00	0.84	0.00
Insulin-like growth factor binding protein	0.95	0.02	0.91	0.00

Isoform F of Proteoglycan 4	0.87	0.00	0.84	0.00
Apolipoprotein A-II	0.74	0.00	0.75	0.00
Alpha-2-glycoprotein 1, zinc	0.76	0.00	0.76	0.00
Thyroxine-binding globuline	1.16	0.05	1.21	0.01
Apolipoprotein M	0.64	0.00	0.64	0.00
IgGFC-binding protein	1.23	0.00	1.21	0.00
Coagulation factor XIII A1 subunit precursor	0.77	0.00	0.82	0.00
Serum amyloid P component	0.93	0.01	0.94	0.00
Corticosteroid-binding globulin	1.12	0.01	1.19	0.00
Isoform 1 of Sex hormone-binding globulin	1.34	0.00	1.34	0.00
Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin	1.37	0.00	1.42	0.00
Apolipoprotein C-III variant 1	0.64	0.00	0.67	0.00
Thrombospondin-1	0.77	0.00	0.72	0.00
Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	1.18	0.00	1.22	0.00
Isoform 1 of Serum albumin	1.25	0.00	1.26	0.00
Carbonic anhydrase I	1.29	0.02	1.29	0.00
Apolipoprotein C-I	0.67	0.00	0.70	0.00
Apolipoprotein C-II	0.63	0.00	0.67	0.00
Cystatin-C	1.20	0.04	1.17	0.00
Adiponectin	1.16	0.00	1.21	0.00
Beta-2-microglobulin	1.25	0.00	1.25	0.00
Platelet basic protein	0.72	0.00	0.74	0.00
Alpha-2-macroglobulin	2.68	0.00	2.79	0.00
Mannose-binding protein C	1.44	0.00	1.31	0.00
Apolipoprotein C-IV	0.72	0.01	0.73	0.02
Platelet factor 4	0.66	0.01	0.75	0.05

Tab. 5.3 Seznam proteinů identifikovaných v rámci iTRAQ mapovací studie rozdílně zastoupených ve vzorcích plazmy pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií a v kontrolních vzorcích. Statistická významnost byla stanovena na hladině  $p \leq 0.05$ . Vzorky pacientů byly značeny značkami 115 a 117, vzorky kontrolní skupiny značkami 114 a 116.

Fibronectin je poměrně velký glykoprotein (~440 kDa) vyskytující se v organismu ve dvou hlavních formách, plazmatické a buněčné. Plazmatická forma je produkována zejména hepatocyty a její koncentrace v plazmě se pohybuje kolem 300  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>168</sup> Nerozpustná buněčná forma tvoří hlavní složku extracelulární matrice a je sekretována různými typy buněk (např. fibroblasty, epiteliální buňky). Tento protein se vyskytuje nejčastěji v heterodimerní formě, kde jsou řetězce k sobě spojeny v blízkosti karboxylového konce proteinu pomocí dvou disulfidických můstků. Jednotlivé monomery (~240 kDa) jsou složeny ze tří typů opakujících se jednotek: FN repeat type I – III, a jsou produktem stejného genu. Výsledný počet až dvaceti známých izoform fibronektinu je

důsledkem alternativního sestřihu jedné mRNA molekuly, který probíhá v závislosti na typu produkující buňky.<sup>169</sup> Fibronektin hraje významnou úlohu v procesech buněčné diferenciaci, růstu, migrace, proliferace a buněčné adheze.<sup>170</sup> Jeho rozmanité funkce vyplývají z velkého počtu vazebných míst pro různé molekuly a receptory. Významná jsou zejména vazebná místa pro integriny, zprostředkující vazbu intracelulárního cytoskeletu na extracelulární matrix a buněčnou signalizaci. Dalšími vazebnými místy jsou například domény pro heparin, kolageny a fibrin, které jsou schopné vázat různé další molekuly jako například chondroitinsulfát, glykosaminoglykany nebo interagovat s bakteriální buňkou. Fibronektin může být proteolyticky štěpen na definované fragmenty, které mají zpravidla zachovanou vazebnou aktivitu a vykonávají další biologicky významné funkce. Fibronektinové fragmenty se pak například účastní procesu hojení ran, kdy zesilují adhezi buněk a pozitivně ovlivňují celkovou kontrakci okolní matrice.<sup>171</sup> Velmi zajímavá je též antagonistická aktivita intaktního fibronektinu a jeho fragmentů při ovlivňování sekrece matrixmetaloproteázy 9 monocytů a jejich další role v zánětem postižené tkáni.<sup>172</sup> Z hlediska hypertrofické kardiomyopatie jsou zajímavé kolagen-vázající domény fibronektinu, které vykazují vysokou vaznost k denaturovanému kolagenu, respektive k místům na jeho molekule, kde dochází k rozvolňování jeho struktury trojitě šroubovice. Dříve se předpokládalo, že biologický význam této vazby spočívá zejména v odstraňování degradovaného kolagenu z krevního oběhu nebo tkáně. Poslední studie ale ukazují, že kolagen je schopen svoji terciální strukturu rozvolňovat lokálně a přecházet zpět do nativního stavu.<sup>173</sup> Fibronektin tedy může s molekulou kolagenu volně interagovat a účastnit se tak aktivně jeho metabolismu v postiženém myokardu. Dříve se předpokládalo, že tvorba fibrotických ložisek u hypertrofické kardiomyopatie se objevuje až v pozdnějších fázích onemocnění a byla považována za důsledek patofyziologických změn srdeční svaloviny. Poslední studie ale naznačují, že markery zvýšené syntézy kolagenu typu I lze nalézt v periferní krvi už ve fázi, kdy ještě není pozorovatelná hypertrofie myokardu.<sup>174</sup> Příčiny tohoto procesu nejsou zatím uspokojivě objasněny a je otázkou, jakou roli zde hraje plazmatický fibronektin.



### 5.3 Tvorba a optimalizace kvantifikační SRM metody

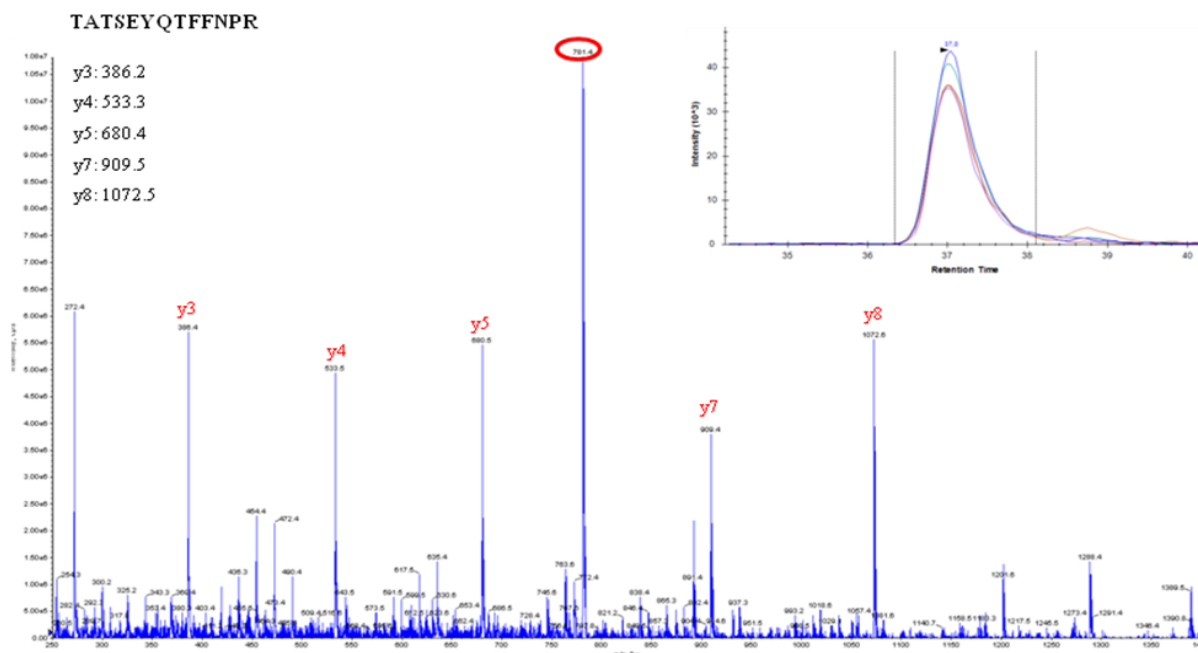
Převážná část cílové skupiny proteinů byla vybrána pomocí studia dostupných literárních zdrojů. Druhou část skupiny tvoří biochemické markery (kreatinkináza MB, myoglobin, glykogenfosforyláza izoforma BB, protein vázající mastné kyseliny, karboanhydráza III, srdeční troponin I), vybrané ve spolupráci s klinickými pracovníky FN HK. Žádný z těchto proteinů druhé skupiny není specifický pro hypertrofickou kardiomyopatii, jde ale o proteiny signalizující poškozením myokardu.<sup>175</sup> Jako poslední byl na základě výsledků iTRAQ mapovací studie vybrán protein fibronectin. Celkem bylo pro cílenou proteomickou analýzu vytipováno 35 proteinů vyskytujících se v plazmě, u nichž byly popsány nebo experimentálně zjištěny kvantitativní rozdíly při porovnání skupiny pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií a kontrolní skupiny nebo u nichž se tento rozdíl předpokládá vzhledem k charakteru onemocnění (tab. 5.4). Základním cílem bylo vytvoření SRM metody pro tyto proteiny, která by v rámci jedné analýzy umožnila jejich identifikaci a kvantifikaci.

Ukazatel	UniProt číslo	Charakteristika, výskyt	Reference
Angiotenzinogen, ANGT	P01019	trofický faktor, vazokonstrikce	Pan <i>et al.</i> (2008) Dimitrow <i>et al.</i> (2007)
Antitrombin III, ATN3	P01008	trombóza, tromboembolické příhody	Friedecký <i>et al.</i> (2008)
Atriový natriuretický peptid, ANP	P01160	tlakové a objemové přetížení	Hasegawa <i>et al.</i> (1996)
Endotelin, ENDO1	P05305	porušená funkce endotelu cév, hypertenze	Yamamoto <i>et al.</i> (1995)
Fibrinogen $\alpha$ řetězec, FPA	P02671	trombóza, tromboembolické příhody	
Fibronectin, FN	P02751	porucha metabolismu kolagenu, fibróza	iTRAQ studie
Glykogenfosforyláza izo BB, GP-BB	P11216	ischemie myokardu	Pudil <i>et al.</i> (2010)
IGF vazebný protein 1, IGFBP1	P08833	růstový faktor	Saeki <i>et al.</i> (2002) Dimitrow <i>et al.</i> (2007)
Inhibitor tkáňového faktoru, TFPI	P10646	dysfunkce endotelu	Zen <i>et al.</i> (2005)
Interleukin 6, IL6	P05231	zánětlivé procesy, apoptóza	Horáková <i>et al.</i> (2010)
Karboanhydráza III, CA3	P07451	nespecifický marker srdečního poškození	
Kolagen typu I $\alpha 1$ řetězec, PICP	P02452	porucha metabolismu kolagenu	Fassbach <i>et al.</i> (2005) Lombardi <i>et al.</i> (2008)
Kolagen typu III $\alpha 1$ řetězec, P3NP	P02461	porucha metabolismu kolagenu	Friedecký <i>et al.</i> (2008)
Kreatinkináza izoforma MB, CK-MB	P12277	marker nekrózy myocytu	
Matrixmetaloproteáza 1, MMP-1	P03956	porucha metabolismu kolagenu	Fassbach <i>et al.</i> (2005) Lombardi <i>et al.</i> (2008)
Matrixmetaloproteáza 2, MMP-2	P08253	porucha metabolismu kolagenu	
Matrixmetaloproteáza 9, MMP-3	P14780	porucha metabolismu kolagenu	Noji <i>et al.</i> (2004)
Mozkový natriuretický peptid, BNP	P16860	tlakové a objemové přetížení	Orgino <i>et al.</i> (2004)

Myoglobin, MYO	P02144	nespecifický marker srdečního poškození	Schneiderka (2006) Friedecký <i>et al.</i> (2008)
Protein vázající mastné kyseliny, FABP	P05413	marker ischemie/nekrózy myokardu	Dimitrow <i>et al.</i> (2007)
Protrombin, TROMB	P00735	trombóza, tromboembolické příhody	Dimitrow <i>et al.</i> (2007)
P-selektin, PSEL	P16109	porucha funkce a morfologie trombocytů	Friedecký <i>et al.</i> (2008)
Solubilní CD 40 receptor, sCD40L	P29965	protein aktuální trombogenní aktivity	Zen <i>et al.</i> (2005)
Solubilní Fas6, sFAS6	P25445-1	apoptóza	Penicka <i>et al.</i> (2001)
Solubilní receptor TNF1, sTNFR1	P19438	zánětlivé procesy, apoptóza	Dimitrow <i>et al.</i> (2007)
Solubilní trombomodulin, sTM	P07204	porušená funkce endotelu cév	Marian (2000)
Somatomedin C, IGF-1A	P01343-1	růstový hormon, metabolismus myokardu	Friedecký <i>et al.</i> (2008)
Srdeční troponin I, TnI	P19429	mutace genu, poškození myokardu	Friedecký <i>et al.</i> (2008)
Srdeční troponin T6, TnT	P45379-6	mutace genu, poškození myokardu	Friedecký <i>et al.</i> (2008)
Tkáňový inhibitor metaloproteáz 1, TIMP-1	P01033	porucha metabolismu kolagenu	Roldán <i>et al.</i> (2008)
Tkáňový inhibitor metaloproteáz 2, TIMP-2	P16035	porucha metabolismu kolagenu	Noji <i>et al.</i> (2004)
Tkáňový inhibitor metaloproteáz 4, TIMP-4	Q99727	porucha metabolismu kolagenu	Stroud <i>et al.</i> (2005)
Transformující růstový faktor $\beta$ 1, TGF $\beta$ 1	P01137	profibrotický faktor	Patel <i>et al.</i> (2000)
Tumor-nekrotizující faktor $\alpha$ , TNF $\alpha$	P01375	zánětlivé procesy, apoptóza	Buzas <i>et al.</i> (2004)
$\beta$ -tromboglobulin, bTG	P02775	porucha funkce a morfologie trombocytů	Dimitrow <i>et al.</i> (2007)

Tab. 5.4 Přehled vybraných potenciálních markerů hypertrofické kardiomyopatie.

Zásadním krokem procesu tvorby SRM metody je volba vhodných proteotypických peptidů, tedy takových peptidů, které jsou pro daný protein unikátní a jejichž charakteristiky umožňují spolehlivou detekci používanými analytickými postupy. Námi původně použitý přístup se zakládal na analýze všech tryptických peptidů každého proteinu splňujících stanovená kritéria (kap. 4.6.8.1). Fragmentační spektra získaná MIDAS analýzou byla srovnávána s teoreticky vypočítanými hodnotami fragmentů jednotlivých peptidů a manuálně hodnocena (obr. 5.4). Celkem bylo tímto přístupem nalezeno 13 peptidů ze šesti proteinů (shrnutí v kap. 5.4, tab. 5.9).



Obr. 5.4 Příklad fragmentačního spektra peptidu proteinu **trombin**. V levém horním rohu jsou uvedeny vybrané nejintenzivnější fragmenty, v pravém rohu je SRM záznam peptidu. Červeným oválem je zvýrazněna hmota prekurzorového peptidu.

Tento postup přinesl několik výsledků, které byly dále využity pro kvantifikaci na základě srovnání ploch pod píkem nejintenzivnějšího přechodu (kap. 5.4). Lze jej s výhodou použít u studií s minimálním počtem cílových proteinů, kdy je možné získaná data detailně procházet a hodnotit. Výběr peptidů není nijak ovlivněn predikčními algoritmy a záleží na zkušenostech analytika. Výhodou je současná přítomnost hmoty prekurzorového peptidu ve spektru, její absence ale nesnižuje kvalitu záznamu. Naopak pokud je intenzita tohoto iontu příliš vysoká, je třeba zvážit optimalizaci použité kolizní energie. Nevýhodou tohoto postupu je časová náročnost. Protože se často jedná o komplexní směsi peptidů, je třeba zvážit případné interference signálu s ostatními fragmenty.

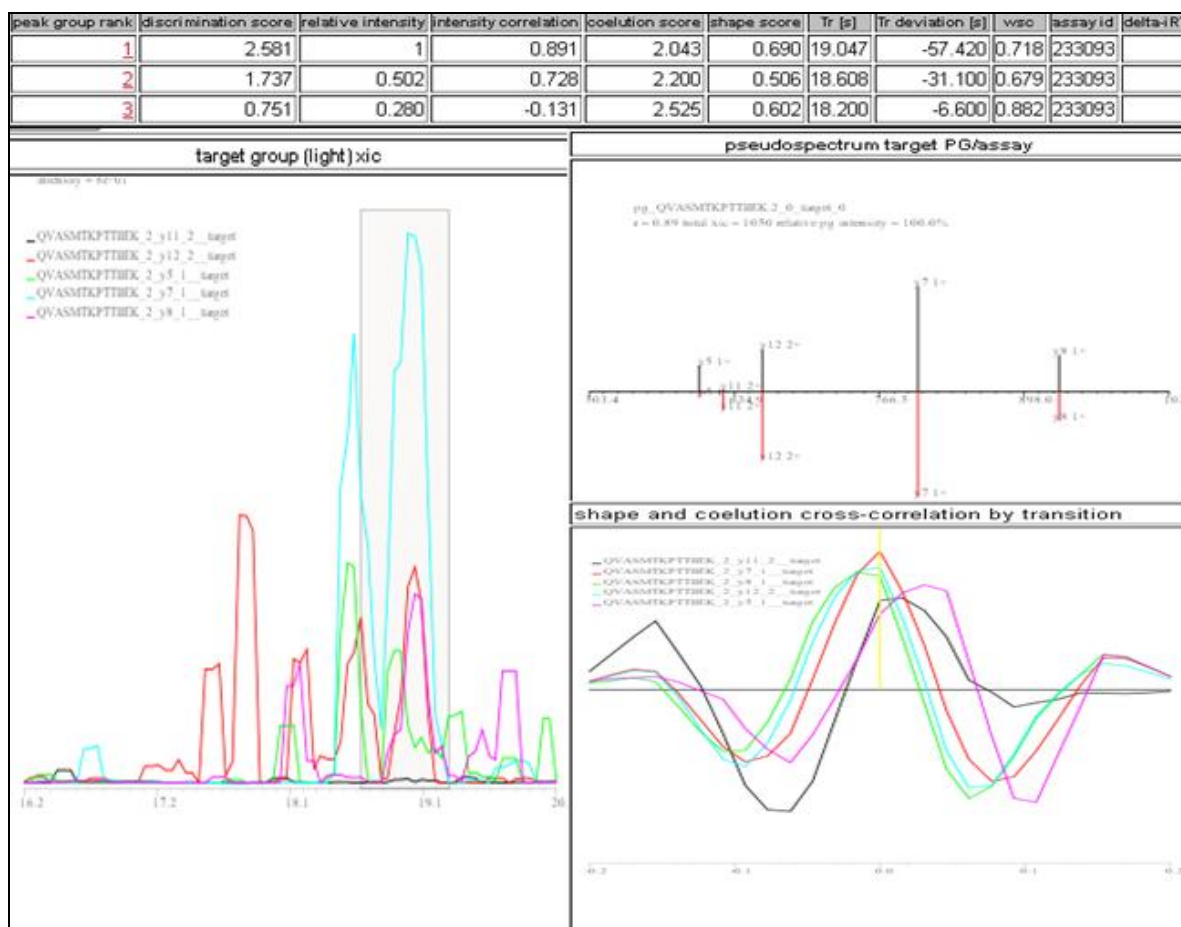
Novou alternativou, která se v době dokončování těchto analýz objevila, byla možnost kvantifikace peptidů metodou SID (kap. 4.6.9). Ve spolupráci s Institutem molekulární systémové biologie (ISMB, ETH Curych, Švýcarsko), který se problematikou proteinových markerů intenzivně zabývá, jsme následně zcela odlišným postupem vyvinuli novou metodu cílené proteomické analýzy zaměřenou na ty samé proteinové ukazatele cílené v předchozím experimentu.

Výchozí seznam unikátních peptidů byl sestaven firmou Biognosys a čerpal zejména z výsledků jejich předchozích experimentů směřujících k vytvoření volně přístupného SRM atlasu fragmentačních spekter. Část informací byla získána z predikčních algoritmů (kombinace výsledků ze SRM Collideru, SSRCalc programu, PeptideCutter programu aj.). Každý protein z našeho seznamu byl zastoupen několika peptidy, které byly nasyntetizovány v neznačené formě. Z těchto peptidů byl následně vytvořen směsný vzorek a ke každému detekovanému peptidu bylo naměřeno jeho fragmentační spektrum. Podle postupu popsaného v kapitole 4.6.9 jsme získali první metodu, aplikovatelnou na komplexní směsný vzorek imunodepletované plazmy. Na základě výsledků byly vybrány vždy alespoň dva peptidy pro každý protein, které měly být použity pro jejich kvantifikaci v individuálních vzorcích (tab. 5.5). V tabulce 5.5 jsou barevně odlišeny peptidy s různým kvantifikačním potenciálem, přičemž zeleně zvýrazněné peptidy jsou pro kvantifikaci nejvhodnější. Ačkoliv červeně označené peptidy jsou ke kvantifikaci málo vhodné z důvodu nízké detekovatelnosti, byly zahrnuty do finálních experimentů, aby byla splněna podmínka detekce a kvantifikace alespoň dvou peptidů na jeden protein. Ve směsných vzorcích dochází ke stírání individuálních rozdílů mezi jednotlivými hladinami analytů, a tudíž tu byl předpoklad, že by tyto peptidy u části vzorků mohly být využitelné. Výběr jednotlivých peptidů probíhal na základě manuálního vyhodnocení a s ohledem na d-skóre programu mProphet, popisující detekovanou skupinu přechodů. Toto skóre pod sebou shrnuje několik parametrů (shape score, delta iRT, intensity-correlation-with-assay-score, transition-coelution score, total-intensity score) popisujících jednotlivě například tvar píku, retenční čas, přítomnost koelucí nebo jeho intenzitu vzhledem k uloženým referenčním datům (obr. 5.5).

Popis		Subjektivní hodnocení		Diskriminační d-skóre	
Protein	Peptid	Hypertrofičná kardiomyopatie	Kontrola	Hypertrofičná kardiomyopatie	Kontrola
angiotenzinogen	DPTFIPAPIQAK	1	1	2.999	2.998
	LQAILGVFWK	1	1	2.975	2.972
atriový natriuretický peptid	MVLYTLR	3	2	1.761	1.000
	MVQSGCFGR	1	2	2.950	1.640
antitrombin	DDLYVSDAFK	1	1	2.993	2.997
	EQLQDMGLVDLFSPEK	1	1	2.987	2.986
	LQPLDFK	1	1	2.998	2.987
	EESLSDLYAELR	3	2	0.963	1.107
$\beta$ -tromboglobulin	NIQSLEVIQK	1	1	2.986	2.993
	ADSGEGFLAEGGVR	1	1	2.667	2.822
fibrinogen	HPDEAAFFDTASTGK	1	1	2.980	2.963
	MKPVVDLVPGNFK	1	1	2.971	2.969
	HLDHVAALFPGDVDR	1	1	2.722	2.767
glykogenfosforyláza BB	TCFEIFPDK	1	1	2.063	1.967
	GFYFNKPTGYGSSSR	1	2	2.886	2.706
somatomedin C	LEMVYCAPLKPAPK	1	1	2.977	2.112
matrixmetaloproteáza 1	ANSWFNCR	1	1	2.425	2.691
	CGVPDVAQFVLTEGNPR	2	2	2.780	1.311
matrixmetaloproteáza 2	FQGTSYDSCITEGR	1	1	2.676	2.865
	QDIVFDGIAQIR	2	2	2.352	2.292
matrixmetaloproteáza 9	FQIFEGDLK	2	3	2.805	0.920
	LWCATTSNFDSDK	1	1	2.696	2.654
	SDGLPWCSTTANYDIDDDR	3	3	2.132	1.757
fibronektin	STTPDITGYR	n	n	n	n
	VDVIPVNLPGHEHGQR	n	n	n	n
kolagen	DVVKPEPCR	2	3	2.720	1.242
	LMSTEASQNITYCK	3	3	2.399	2.163

Popis		Subjektivní hodnocení		Diskriminační d-skóre	
Protein	Peptid	Hypertrofičná kardiomyopatie	Kontrola	Hypertrofičná kardiomyopatie	Kontrola
P-selektin	FECQGYR	1	1	2.673	2.449
	LEGNVVECTTSGR	2	3	2.457	1.863
	MANCQLAILYQR	1	3	1.391	1.278
solubní receptor proTNF $\alpha$	DITDSENSNFR	3	3	1.817	1.670
	NGVNEAK	1	1	2.963	2.969
inhibitor tkáňového faktoru	FFNFIFTR	1	1	2.722	2.878
	YGGGLGNMNNFETLEECK	1	2	1.302	0.878
transformující růstový faktor 1	DNTLQVDINGFTTGR	3	2	1.683	1.764
	VEQLSNMIVR	2	2	1.096	2.269
tkáňový inhibitor metaloproteáz 1	EPGLCTWQSLR	1	1	2.921	2.958
	GFQALGDAADIR	2	1	2.482	2.649
tkáňový inhibitor metaloproteáz 2	EYLIAGK	2	2	2.602	2.295
	SDGSCAWYR	1	1	2.614	2.566
tumor nekrotizující faktor $\alpha$	ANALLANGVELR	2	2	2.456	2.082
	DVELAEEALPK	2	2	1.635	1.553
	GQGCPSIHVLLIHTISR	1	3	0.970	1.588
trombin	ELLESYIDGR	1	1	2.904	2.910
	HQDFNSAVQLVENFCR	1	1	2.985	2.962
	YGFYTHVFR	1	1	2.993	2.982

Tab. 5.5 Seznam peptidů pro kvantifikační experimenty vybraných ve spolupráci s IMSB ETH v Curychu. Zeleně označené peptidy byly určeny s nejvyšší jistotou, červeně jsou na hranici detekovatelnosti, žlutě označené vykazovaly průměrné výsledky. U subjektivního hodnocení jsou vhodné peptidy označena číslem 1, méně vhodné jako 2 a nevhodné číslem 3. Peptidy FN byly vybrány později na podkladě ITRAQ experimentu.

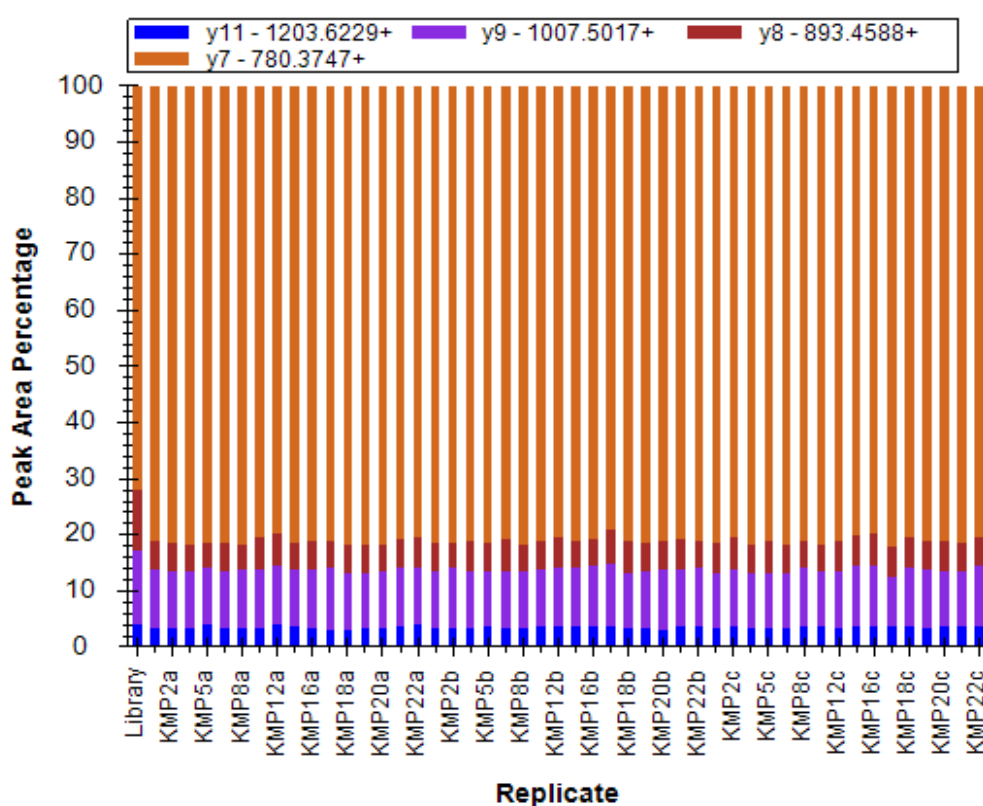


Obr. 5.5 Příklad výstupu z programu mProphet. Tabulka shrnuje vyhodnocení použitých parametrů. Vlevo je extrahovaný iontový chromatogram daného peptidu v očekávaném retenčním čase, vpravo nahoře je záznam srovnání uloženého fragmentačního spektra s nově naměřeným (poměr intenzit by měl zůstat zachován), Vpravo dole je vyhodnocení tvaru jednotlivých záznamů spolu s vyhodnocením potenciálních koelujících složek.

K těmto vybraným peptidům byly nasyntetizovány jejich izotopicky značené ekvivalenty. Po přenesení vytvořené metody na hmotnostní spektrometr QTRAP 4000 a po proměření směsných vzorků pacientů a kontrolní skupiny bylo ke kvantifikačním experimentům vybráno 10 peptidů zastupujících 7 proteinů plazmy (tab. 5.6).

Selektivita SRM stanovení je dána samotným principem této metody a vychází zejména z pečlivého výběru proteotypických peptidů a jejich fragmentů (kap. 4.6.8.1). V některých případech jsme ovšem zvolili i peptid, který ve své struktuře obsahuje sporné aminokyseliny. Důvodem byl nedostatek jiných peptidů splňujících podmínku unikátnosti

vzhledem ke studovanému proteomu, které by byly detekovatelné námi použitou technikou. Pomocí izotopicky značených peptidů byly vybrány tři nejintenzivnější fragmenty dominantního nábojového stavu a postupně optimalizovány podmínky pro vývoj kvantifikační metody. Ačkoliv v současné době neexistují striktně daná pravidla pro ověřování metod cílené proteomické analýzy, rozhodli jsme se řídit doporučeními, která vychází z platných evropských norem, a která se týkají validací bioanalytických metod stanovení malých molekul v klinických laboratořích (viz kap. 4.6.9).



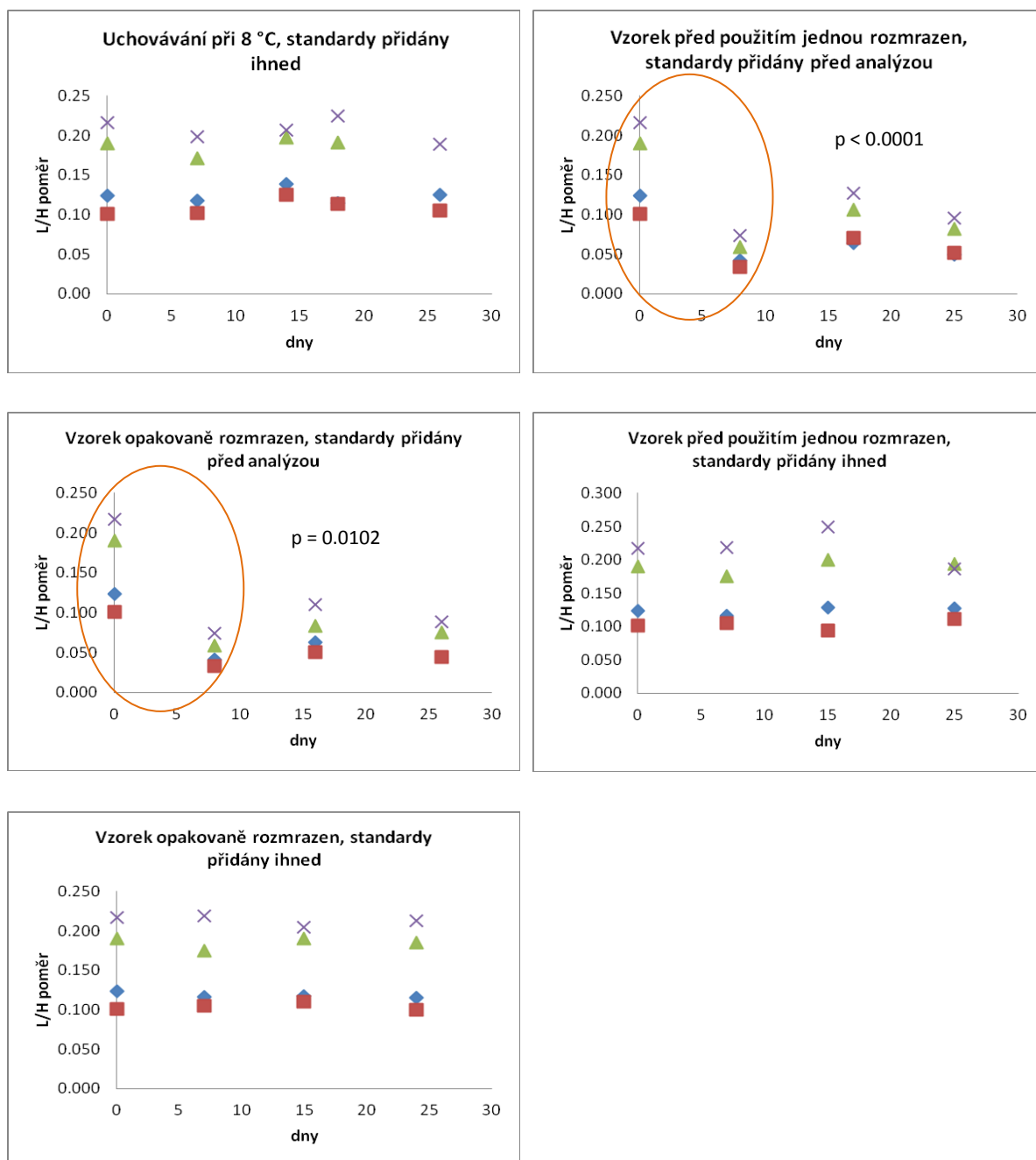
Obr. 5.6 Příklad grafického znázornění vzájemného procentuálního zastoupení ploch pod pikem sledovaných přechodů peptidu VDVIPVNLPGEHGQR u jednotlivých replikátů vzorků pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií (výstup z programu Skyline). KMP = označení vzorku plazmy pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií.

Z hlediska přítomnosti interferujících složek ve vzorku bylo důležité sledovat přesné pořadí intenzit jednotlivých fragmentů, které by mělo odpovídat naměřeným referenčním MSMS spektrům syntetických izotopicky značených peptidů, nemělo by tedy docházet ke změnám jejich vzájemného procentuálního zastoupení o více než 15 % (obr. 5.6). Tato podmínka byla ověřena manuálně výpočtem. Pro ověření lze též využít volně



dostupný program AuDIT (<http://www.genepattern.org/modules/AuDIT.html>).<sup>176</sup> Fragmenty používané pro kvantifikaci, které tyto podmínky nesplnily, byly vyřazeny.

Před začátkem samotných kvantifikačních analýz byl studován vliv preanalytické fáze, konkrétně stabilita enzymaticky štěpených vzorků během jejich uchování, na kvalitu kvantifikačních měření (viz kap. 4.6.9). Zjištěný CV poměrů ploch pod píkem nejintenzivnějšího přechodu měřených peptidů nepřesáhl 20 % u 93.3 % měření peptidu VDVIPVNLPGEGHQQR, resp. 86.7 % měření peptidu STTPDITGYR. Byly porovnávány poměry ploch nativního a izotopicky značeného peptidu pod nejintenzivnějším přechodem. Ze statisticky hodnocených výsledků je patrné, že zejména u peptidu VDVIPVNLPGEGHQQR má na kvalitu zásadní vliv první rozmrazení (obr. 5.7). Druhý sledovaný peptid neukázal statisticky významné rozdíly. Ačkoliv se zdá, že skladování při 8 °C nebo okamžitý přídavek syntetických peptidů tento problém dokáže vyřešit, je nutné zde poznamenat, že i když se poměr L/H s postupující dobou uchování neměnil, kvalita SRM záznamů a detekovatelnost jednotlivých peptidů postupně klesala. Po třech týdnech nebylo ve většině vzorků možné nalézt použitelný záznam obou peptidů.

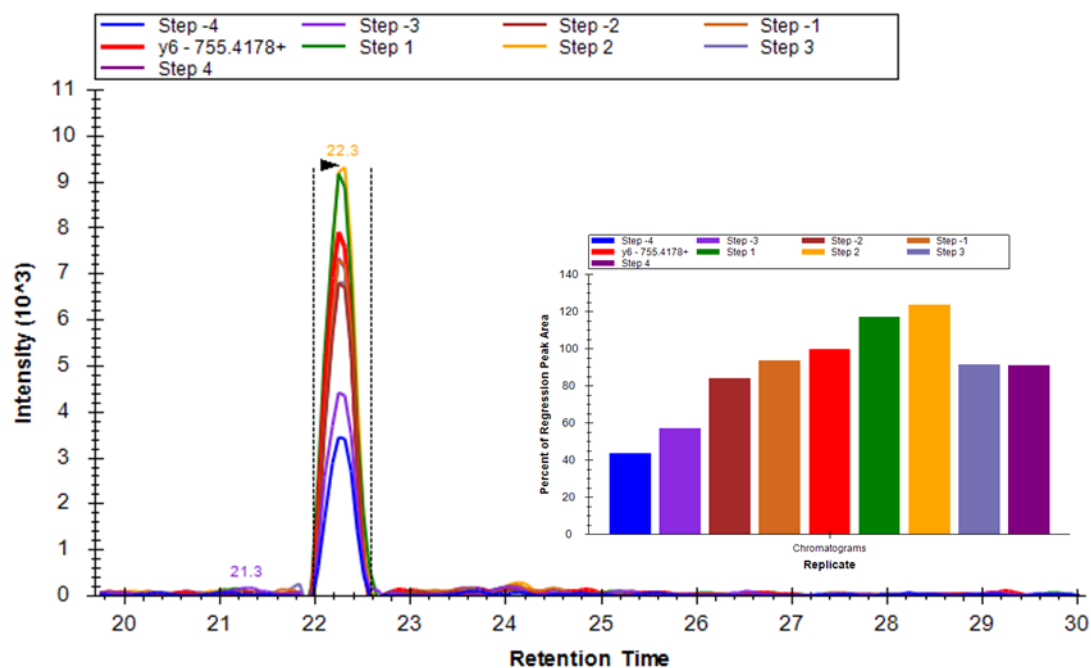


Obr. 5.7 Grafická ukázka hodnocení vlivu přípravy a uchovávání vzorku před analýzou. V oválech jsou zvýrazněné statisticky významné rozdíly mezi koncentracemi sledovaného peptidu VDVIPVNLPGEHGQR.

Ideální postup přípravy a uchovávání vzorku neexistuje. Je ovšem nutné, pokud to jde, předcházet známým úskalím při jeho přípravě a skladování, případně zvolit aktuálně nejvhodnější strategii. V našem případě byly syntetické peptidy o známé koncentraci přidávány do vzorku po štěpení, a pokud vzorky nebyly použity k analýze ihned, byly na

nezbytně dlouhou dobu zamrazeny a uchovávány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a po dalším rozmrazení analyzovány.

Poté byla provedena optimalizace CE pro vybrané přechody sledovaných peptidů (obr. 5.8; tab. 5.6). Takto stanovené hodnoty CE byly nadále výlučně používány.



Obr. 5.8 Příklad optimalizace CE jednoho z vybraných peptidů. Vlevo je XIC vybraného peptidu, resp. jeho y6 fragmentu. Původní automaticky vypočítaná CE je zobrazena jako jasně červený záznam (výstup z programu Skyline).

protein	peptid	náboj	Q1	Q3	fragment	CE
ANGT	DPTFIPAPIQAK	2+	649.36	724.43	y7	32.7
			649.36	837.52	y8	32.7
			649.36	556.34	y5	32.7
	DPTFIPAPIQAK (heavy)		653.37	732.45	y7	32.7
			653.37	845.53	y8	32.7
			653.37	564.36	y5	32.7
ANT3	DDLVSDAFK	2+	655.31	704.34	y6	33.1
			655.31	803.4	y7	33.1
			655.31	966.47	y8	33.1
	DDLVSDAFK (heavy)		659.31	712.35	y6	33.1
			659.31	811.42	y7	33.1
			659.31	974.48	y8	33.1
	LQPLDFK	2+	430.75	619.34	y5	20.3
			430.75	567.31	b5	20.3
			430.75	747.42	y6	20.3
	LQPLDFK (heavy)		434.75	627.35	y5	20.3
			434.75	567.31	b5	20.3
			434.75	755.42	y6	20.3
bTG	NIQSLEVIGK	2+	550.82	873.5	y8	27.1
			550.82	745.44	y7	27.1
	NIQSLEVIGK (heavy)		554.83	881.51	y8	27.1
			554.83	753.46	y7	27.1
FIB	ADSGEGDFLAEGGGVR	2+	768.85	1077.53	y11	27.1
			768.85	645.33	y7	27.1
			768.85	445.25	y5	39.6
	ADSGEGDFLAEGGGVR (heavy)		773.85	1087.56	y11	39.6
			773.85	655.34	y7	39.6
			773.85	455.26	y5	39.6
FIB	HPDEAAFFDTASTGK	3+	531.91	679.33	y7	39.6
			531.91	826.4	y8	39.6
			531.91	564.3	y6	23.6
	HPDEAAFFDTASTGK (heavy)		534.58	687.34	y7	23.6
			534.58	834.4	y8	23.6
			534.58	572.3	y6	23.6
FN	STTPDITGYR	2+	555.77	821.42	y7	23.6
			555.77	496.25	y4	23.6
			555.77	609.33	y5	37.4
	STTPDITGYR (heavy)		560.77	831.42	y7	31.4
			560.77	506.25	y4	37.4
			560.77	619.34	y5	37.4

<b>FN</b>	VDVIPVNLPGHEGQR	3+	543.96	780.37	γ7	33.9
			543.96	1007.5	γ9	33.9
			543.96	893.46	γ8	33.9
	VDVIPVNLPGHEGQR (heavy)		547.29	790.37	γ7	33.9
			547.29	1017.5	γ9	33.9
			547.29	903.46	γ8	33.9
<b>TROMB</b>	ELLESYIDGR	2+	597.8	710.35	γ6	29.8
			597.8	839.39	γ7	29.8
			597.8	952.37	γ8	29.8
	ELLESYIDGR (heavy)		602.81	720.35	γ6	29.8
			602.81	849.4	γ7	29.8
			602.81	962.48	γ8	29.8
<b>TIMP-2</b>	EYLIAGK	2+	397.23	275.17	γ3	18.4
			397.23	501.34	γ5	18.4
	EYLIAGK (heavy)		401.23	283.18	γ3	18.4
			401.23	509.35	γ5	18.4

Tab. 5.6 Vybrané peptidy a jejich charakteristiky, použité pro kvantifikační experimenty pomocí SID SRM MS.

Dále byla u všech sledovaných peptidů experimentálně zjišťována linearita jejich odezvy na pozadí biologické matrice v rozsahu předpokládaného využití ke kvantifikační analýze (viz kap. 4.6.9). Pomocí tří technických replikátů pro každý koncentrační bod byla vytvořena pětibodová lineární závislost poměrů ploch pod píkem nejintenzivnějšího přechodu syntetického standardu a nativního peptidu na použité koncentraci syntetického peptidu, charakterizovaná regresní rovnicí a hodnotou spolehlivosti R. Na základě těchto měření byla určena koncentrace syntetických peptidů ve vzorku použitých pro kvantifikaci na 4 fmol (DPTFIPAPIQAK, DDLYVSDAFK, LQPLDFK, NIQSLEVIGK, ADSGEGDFLAEGGGVR, HPDEAAFFDTASTGK, EYLIAGK, ELLESYIDGR), 5 fmol (STTPDITGYR) a 10 fmol (VDVIPVNLPGHEGQR). Koncentrace plazmy pro kvantifikaci fibronektinu byla stanovena na 0.1 μg proteinů plazmy dále štěpených trypsinem, u ostatních peptidů byl použit 1 μg proteinů imunoafinitně separované plazmy dále štěpené trypsinem na jednu analýzu.

V rámci ověřování metody bylo také určováno procento přenosu vzorků mezi dvěma analýzami. Zároveň byly testovány kroky vedoucí k eliminaci tohoto jevu a tím ke snížení potenciální falešné pozitivita výsledků (viz kap. 4.6.9). Bylo zjištěno, že všechny peptidy, použité následně ke kvantifikaci, vykazují míru přenosu mezi jednotlivými vzorky

pod 4 % v případě izotopicky značených standardů a pod 3 % v případě nativních peptidů (tab. 5.7).

Průměrná hodnota přenosu [%]		
Sledované peptidy	Standardní peptid	Nativní peptid
DPTFIPAPIQAK	1.83	0.47
DDLYVSDAFHK	0.71	1.49
LQPLDFK	1.98	0.04
NIQSLEVIGK	1.16	2.12
ADSGEGDFLAEGGVR	2.77	-
HPDEAAFFDASTGK	1.57	0.22
ELLESYIDGR	3.58	0.11
EYLIAGK	1.75	1.85
STTPDITGYR	1.25	0.96
VDVIPVNLPGHEGQR	1.97	0.88

Tab. 5.7 Průměrné procentuální hodnoty přenosu vzorku mezi dvěma analýzami, hodnoty byly získány ze tří shodných replikátů.

Ačkoliv jsou tyto výsledky přijatelné pro další analýzy, rozhodli jsme se míru přenosu ještě snížit pomocí postupu, popsaného v literatuře.<sup>167</sup> Mezi jednotlivé vzorky byl vkládán krátký chromatografický krok, při kterém bylo na předkolonu aplikováno 5  $\mu$ l 50% roztoku TFE v ACN. Ačkoliv došlo ke snížení přenosu vzorku pod 2 % v obou případech, i přes následný extenzivní promývací krok byla v dalším vzorku významně narušena separace na chromatografické koloně a tím i následná kvantifikace. V našem uspořádání nanoHPLC nelze dosáhnout takových průtoků, které by efektivně TFE ze systému odstranily při zachování akceptovatelné časové náročnosti celého postupu. Při dalších analýzách byla tedy mezi vzorky vkládána vždy jedna analýza standardního roztoku peptidů  $\beta$ -galaktosidázy. Jednak tím bylo sníženo procento přenosu vzorků a zároveň jsme mohli průběžně sledovat kvalitu analýz ze strany výkonu kapalinové chromatografie i hmotnostního spektrometru.

Přesnost vytvořené metody mezi jednotlivými technickými replikáty definovaná koeficientem variace byla sledována během konečné kvantifikace vybraných peptidů. Pro každý z analytických replikátů byly sledovány tři technické replikáty a z průměrů zjištěných poměrů L/H nejintenzivnějších fragmentů jednotlivých peptidů byly počítány jednotlivé CV [%] (tab. 5.8). Ze získaných dat je patrné, že u převážné většiny vzorků (92.5 %) nepřesahuje CV pro jejich replikáty 15 %.

vzorek	DLVSDAFHK		LQPLDFK		MIOSEVIGK		ADSGEGFLAEGGVV		DPTFRPAPIQAK		HPDEAFFDASTGK		ELLESYDGR		EVLIAKG		VDVLPVNLPGEHGQR		STPDPITGVR	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
K1	1.2	0.6	5.0	9.3	5.2	4.5	1.5	1.1	12.0	7.3	2.0	3.4	4.8	2.9	12.8	11.7	3.5	1.9	7.3	2.3
K2	0.5	4.7	1.1	2.7	2.0	7.9	4.2	3.8	0.7	6.0	20.1	5.0	3.9	5.3	12.2	9.0	6.9	3.8	5.9	9.2
K4	1.7	5.7	0.3	6.7	2.9	10.9	2.8	4.5	1.7	1.9	0.2	3.6	5.0	2.0	3.8	17.3	3.2	1.0	8.2	0.7
K6	4.9	8.1	6.8	7.8	4.3	9.3	2.5	1.4	4.2	1.3	6.9	8.7	2.7	3.8	4.4	7.5	4.3	1.3	6.8	0.9
K7	2.4	7.2	12.4	2.1	15.4	1.1	1.1	2.3	4.8	5.0	7.9	2.2	2.7	6.0	6.0	15.5	3.7	1.1	8.5	1.5
K10	1.6	7.8	1.6	2.8	4.8	10.8	7.3	4.8	9.4	6.1	5.5	3.5	0.6	6.9	3.5	19.5	14.2	1.7	17.3	1.2
K11	4.8	2.1	4.1	2.9	3.5	5.5	2.0	3.5	3.7	2.3	2.5	5.9	0.4	3.5	1.2	9.2	3.5	1.5	7.8	2.6
K12	12.7	6.5	1.2	2.9	1.2	32.2	1.4	5.3	2.3	8.2	10.5	7.8	7.0	5.3	2.8	5.5	16.0	1.5	21.5	2.4
K13	2.5	2.6	3.7	12.8	0.1	7.4	7.5	2.3	10.2	9.2	5.3	2.9	6.6	5.3	7.5	3.1	8.6	2.7	5.9	1.0
K15	0.1	5.9	4.1	6.3	1.3	3.0	2.0	6.5	2.9	5.6	8.3	7.1	2.4	3.0	11.2	17.3	10.6	0.3	11.2	2.0
K17	7.4	7.0	1.3	3.6	14.4	5.1	3.4	3.4	22.3	10.3	3.3	4.2	5.4	1.7	10.4	8.2	7.8	1.4	7.3	1.5
K18	n	2.2	n	5.1	n	4.7	n	3.8	n	16.7	n	4.1	n	4.1	n	3.3	5.3	4.9	2.0	1.9
K19	3.9	4.6	2.9	6.5	0.5	12.4	0.1	4.2	2.6	2.3	5.9	13.3	8.6	5.5	1.9	8.1	2.0	4.1	3.0	1.0
K21	0.8	3.5	0.5	6.4	2.7	9.5	7.7	1.7	5.2	10.7	9.7	3.3	3.2	6.4	4.9	8.5	5.2	1.3	3.6	2.5
K22	1.9	3.3	2.6	7.4	3.3	8.3	1.6	0.4	1.3	7.2	6.6	7.1	1.2	4.9	0.7	5.8	3.0	3.1	4.6	3.1
K24	7.6	6.4	0.6	6.3	0.2	10.6	2.5	3.0	1.5	8.2	9.6	6.9	3.1	3.2	0.9	7.5	8.0	1.6	2.9	1.1
K25	5.0	7.8	1.8	9.9	3.7	14.8	1.6	3.4	1.6	0.4	2.0	15.5	4.5	4.8	0.8	10.3	4.7	0.2	2.9	2.4
KMP1	0.0	11.6	4.5	6.8	10.2	11.1	5.0	1.4	1.6	16.1	2.2	9.4	2.2	7.4	9.7	11.6	2.7	3.0	1.0	0.5
KMP2	2.2	16.8	3.7	1.0	1.8	7.2	8.6	4.8	6.3	7.3	3.3	6.8	2.3	4.5	14.9	16.8	1.2	3.3	2.4	2.4
KMP3	3.0	9.7	10.9	6.9	14.7	2.2	5.6	3.0	0.2	3.9	0.3	8.1	8.1	5.5	5.0	9.7	n	n	n	n
KMP4	3.7	2.1	4.9	9.2	9.5	3.7	2.9	6.6	3.6	7.2	2.1	5.9	7.4	2.7	1.2	2.1	0.8	0.9	0.8	1.7
KMP5	3.5	21.7	0.9	1.7	5.4	7.4	2.4	5.8	12.5	3.7	0.6	5.6	2.0	3.0	11.6	21.7	9.6	3.0	3.4	2.4
KMP6	0.1	27.8	3.1	2.9	8.9	20.9	2.5	3.4	7.1	7.1	1.2	7.0	0.3	3.6	3.8	27.8	1.1	0.7	1.9	1.4
KMP8	3.0	40.2	4.8	4.5	6.4	5.2	4.3	9.4	2.0	22.3	1.9	3.1	6.9	2.6	10.0	40.2	4.6	2.0	2.4	1.7
KMP9	0.5	4.4	7.7	6.5	6.7	5.4	3.4	6.3	4.5	15.4	3.7	7.2	2.1	9.5	18.4	4.4	1.2	1.7	1.9	1.0
KMP12	8.5	6.8	8.4	1.4	7.8	10.5	5.2	6.3	8.0	4.1	12.6	8.7	4.4	4.1	2.6	6.8	2.1	1.6	3.5	1.6
KMP15	0.2	5.5	2.2	6.9	3.5	7.6	1.9	4.4	0.5	20.1	4.3	3.9	7.2	0.7	13.9	5.5	5.4	0.9	1.4	1.6
KMP16	0.3	9.3	0.7	11.0	6.1	7.2	9.8	3.3	7.6	2.8	16.7	13.9	6.3	4.1	2.3	9.3	1.8	1.0	2.9	1.2
KMP17	0.8	8.4	3.0	7.0	10.7	21.5	1.5	3.9	3.6	7.9	2.2	10.3	7.1	1.7	6.2	8.4	4.4	2.3	3.4	2.8
KMP18	5.5	17.0	3.8	8.7	9.0	4.5	1.5	2.5	4.0	8.4	8.4	10.6	4.2	2.0	0.7	17.0	3.4	2.2	1.2	1.4
KMP19	7.9	13.2	4.7	4.8	7.2	4.5	1.7	1.9	3.5	13.1	20.2	7.6	4.9	1.8	13.3	13.2	1.1	2.1	2.2	3.3
KMP20	4.2	26.3	6.8	2.6	21.3	31.8	2.3	4.7	8.3	7.2	9.2	14.3	1.7	1.3	4.1	26.3	3.6	2.7	1.2	2.0
KMP21	0.8	16.9	1.6	3.1	13.7	4.7	5.2	4.2	2.6	4.4	11.1	6.3	6.6	5.9	2.0	16.9	1.8	0.9	3.1	0.2
KMP22	0.3	0.2	2.5	3.8	8.7	2.3	0.1	7.4	10.1	19.8	2.6	7.6	11.3	0.5	4.2	0.2	0.7	0.6	2.1	1.1

Tab. 5. S Průměrné koeficienty variace [%] kvantifikačních měření určované z poměrů L/H ploch pod píkem nejintenzivnějších přechodů (A1, A2 = analytické replikáty, K = kontrolní vzorek, KMP = vzorek pacientů s hypertrofií kardiomyopatií)

Definice a analytické hodnocení jevů, které by mohly mít zásadní vliv na úspěšnou kvantifikaci metody cílené proteomické analýzy, ještě dalece přesahuje rámec použitých ověřovacích postupů. Výsledek může být ovlivněn nejen chybou v samotné analýze, ale i biologickou variabilitou měřeného parametru nebo dalšími vlivy souvisejícími se zpracováním vzorku. Z hlediska ověření požadavků na selektivitu, kalibrační rozmezí nebo vlivy matrice lze předkládanou metodu považovat za vhodnou ke kvantifikačním experimentům a jako taková byla též použita na malém souboru vzorků (kap. 5.4). Nicméně významné se zdají být odchylky v přesnosti metody, konkrétně porovnání vzorků v rámci obou analytických replikátů dohromady. Separátně v rámci jednoho analytického replikátu ukazují vypočítané CV poměrně dobrou přesnost měření (viz tab. 5.8). V okamžiku, kdy jsme porovnali všech šest teoreticky shodných analýz mezi sebou (dva analytické a z každého tři technické replikáty), CV dramaticky narostl. Problém s největší pravděpodobností není v samotném postupu cílené analýzy, ale v některém z předcházejících kroků. Po zvážení všech možností jsme došli k závěru, že největším zdrojem variabilit je enzymatické štěpení vzorku a imunoafinitní separace, pokud je prováděna. V případě, že předmětem kvantifikace je protein, jehož koncentrace v plazmě je dostatečně vysoká na to, aby překonala interferenční vliv vysoce zastoupených proteinů; imunoafinitní separaci ani frakcionaci vzorku není nutné provádět. Tuto výhodu má ovšem jen velmi málo proteinů a většinou nejsou diagnosticky zajímavé. Princip cílené proteomické analýzy sice zaručuje vysokou selektivitu stanovení, ale v přítomnosti velkého množství interferujících složek zdaleka nedosahuje často publikované efektivity v řádech fmol až amol hledaného analytu. Pokud se tedy zajímáme o proteiny v plazmě nízce zastoupené, imunodepleční krok je i se všemi svými negativy nevyhnutelný.

Kvantifikace proteinů na úrovni peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie s sebou nese určitá rizika. Jedním z nich je proces enzymatického štěpení proteinové směsi. I za přesně definovaných podmínek není proteolýza snadno reprodukovatelným postupem. Ideou kvantifikace pomocí izotopicky značených peptidů je předpoklad, že nativní peptid i peptid synteticky připravený a izotopicky značený mají stejné chromatografické vlastnosti. Tento fakt velmi usnadňuje detekci a identifikaci nativního peptidu v komplexních vzorcích. Oba peptidy eluují ve stejném retenčním čase, mají shodné ionizační vlastnosti, jejich nábojový stav se neliší. Kvantifikace založená na principu porovnávání ploch pod píkem jejich nejintenzivnějších přechodů ovšem předpokládá, že sledovaný nativní peptid



bude stechiometricky ekvivalentní ke svému proteinu, což žádným způsobem zajistit nelze. Aby tedy byla kvantifikace co nejpřesnější, objevila se myšlenka na přidání standardního peptidu ještě před zahájením proteolýzy. Otázkou je, zda je toto vhodným řešením pro absolutní kvantifikaci. V našem případě vzhledem k použitému postupu štěpení musely být peptidy přidávány až k výsledné peptidové směsi. Nicméně jedině v tomto případě jsme si byli zcela jisti, že zjištěná hodnota plochy pod píkem standardu opravdu odpovídá jeho udávané použité koncentraci a není nijak ovlivněna předchozími kroky. Dalším publikovaným pokusem o minimalizaci vlivu proteolýzy na kvantifikaci je metoda QconCAT, u které je standard je přidáván do vzorku a podléhá stejnému procesu štěpení. Ovšem účinnost proteolýzy určují též okolní aminokyseliny a posttranslační modifikace. Tato metoda nerespektuje tento tzv. kontext okolní sekvence a tudíž se proteázová účinnost může lišit a opět narušovat ideu absolutní kvantifikace cílenou proteomickou analýzou. Řešením by bylo zřejmě pouze použití standardního proteinu shodného s nativním stanovovaným markerem (metoda PSAQ), který by byl izotopicky značený na všech teoretických štěpících místech (s ohledem na použitou proteázu). Toto řešení by ovšem bylo neporovnatelně nákladnější než námi testované využití syntetických peptidů pro absolutní kvantifikaci proteinů metodou SID-SRM-MS.

Jak je uvedeno výše a v následující kapitole (kap. 5.4), proces kvantifikace proteinů pomocí izotopického značení peptidů je zatížen několika podstatnými nedostatky. I přesto, že počáteční nadšení pro tuto metodu kvantifikace poněkud opadlo a je nutné dobře zvážit její výstupy, stále zůstává jednou z nejslibnějších proteomických aplikací směřujících ke klinickému využití.

#### 5.4 Kvantifikace peptidů metodou SRM

Kvantifikace peptidů pomocí SRM cílené proteomické analýzy probíhala dvěma odlišnými způsoby (kap. 4.6.11). První experimenty zahrnovaly relativní kvantifikaci porovnáním ploch pod píkem nalezených peptidů ve směsných vzorcích kontrolní skupiny a vzorcích pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. Pomocí relativní kvantifikace byly porovnány a zhodnoceny peptidy, shrnuté v tabulce 5.9.

Protein	Peptid	KMP/K	CV [%]
<b>antitrombin</b>	FATTFYQHLADSK	2.5	5.2
	LQPLDFK	2.0	6.1
	VAEGTQVLELPFK	1.9	2.0
	IEDGFSLK	2.4	1.2
<b>β-tromboglobulin</b>	NIQSLEVIGK	1.5	5.2
<b>fibrinopeptid A</b>	ADSGEGDFLAEGGGVR	3.9	3.8
<b>matrixmetaloproteáza 2</b>	ESCNLFVLK	2.4	17.9
<b>matrixmetaloproteáza 9</b>	FQTFEGDLK	4.6	52.3
<b>trombin</b>	TATSEYQTFNPR	2.6	0.7
	ETAASLLQAGYK	1.7	4.1
	VTGWGNLK	1.8	4.5
<b>troponin I</b>	NITEIADLTQK	2.0	12.5

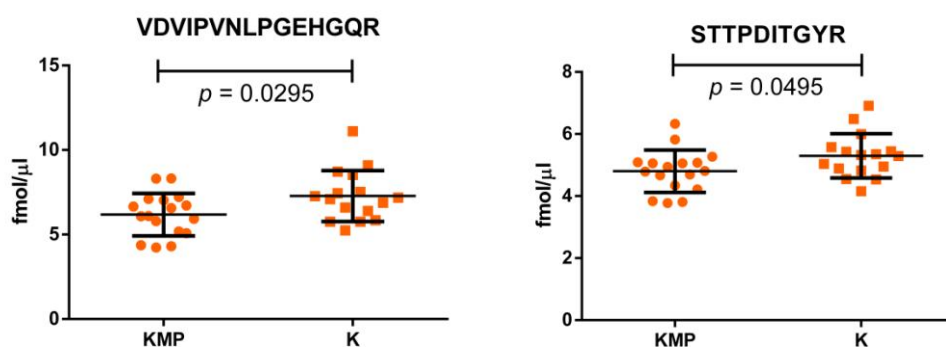
Tab. 5.9 Výsledky relativní kvantifikace směsných vzorků pomocí cílené proteomické analýzy. KMP = hypertrofická kardiomyopatie, K = kontrola. KMP/K = poměr ploch pod nejintenzivnějším přechodem.

V druhé části kvantifikačních experimentů byla prováděna absolutní kvantifikace vybraných peptidů nově vytvořenou metodou SID-SRM-MS. Stanovení peptidů plazmatického fibronektinu bylo prováděno odděleně, protože byly k analýze použity jinak zpracované vzorky. Výsledná průměrná koncentrace stanovovaných peptidů je uváděna v jednotkách fmol/μl analyzovaného vzorku, tj. v 1 μg trypticky štěpené imunoafinitně separované plazmy, resp. u stanovení fibronektinu v 0.1 μg trypticky štěpené plazmy. Získané hodnoty koncentrací byly zpracovány v programu GraphPad Prism, kde byly podrobeny statistické analýze hodnotící kvantitativní charakteristiky sledovaných peptidů ve skupině vzorků od pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií a v kontrolní skupině (tab 5.10).

Souhrn výsledků SID-SRM-MS analýz						
Protein	Peptid	R	KMP [fmol/μl]	K [fmol/μl]	p	počet vzorků KMP/K
ANGT	DPTFIPAPIQAK	A1	5.4±3.3	5.8±3.0	0.7820	16/15
		A2	6.9±5.1	3.6±2.7	0.0473	12/14
ANT3	DDLIVSDAFK	A1	4.8±0.9	8.2±2.2	<0.0001	16/12
		A2	5.7±0.3	5.4±0.1	0.5448	14/17
	LQPLDFK	A1	4.6±5.3	3.0±2.2	0.2731	16/15
		A2	8.1±7.3	3.0±2.4	0.0218	15/13
bTG	NIQSLEVIGK	A1	8.9±6.3	9.3±10.7	0.9536	11/6
		A2	11.2±9.8	8.4±11.9	0.5532	12/10
FIB	ADSGEGDFLAEGGGVR	A1	3.0 (2.1-3.8)	3.5 (3.0-4.5)	0.1312	17/9
		A2	3.1 (2.0-5.1)	3.4 (2.2-4.5)	0.9800	17/17
	HPDEAAFFDTASTGK	A1	2.6±1.8	7.1±3.9	0.0059	9/10
		A2	3.9±3.6	2.2±1.8	0.1713	11/12
FN	STTPDITGYR	A1	4.8±0.7	5.3±0.7	0.0485	17/16
		A2	5.0±0.9	5.3±0.9	0.4533	17/16
	VDVIPVNLPGEHGQR	A1	6.2±1.3	7.3±1.5	0.0295	17/16
		A2	6.6±1.8	7.5±2.1	0.1953	17/16
TROMB	ELLESYIDGR	A1	6.4±2.5	4.8±1.2	0.0626	16/11
		A2	5.2±1.6	5.2±1.5	0.9937	17/17
TIMP-2	EYLIAGK	A1	3.8±5.2	1.9±1.8	0.2535	8/12
		A2	1.6±1.5	2.3±1.6	0.2804	10/11

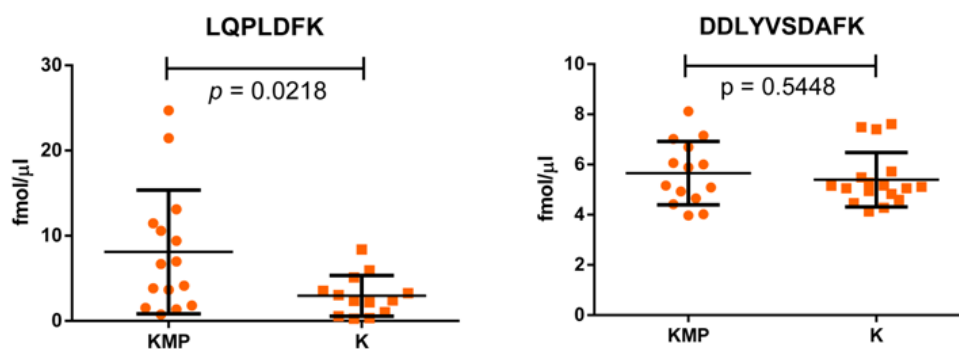
Tab. 5.10 Koncentrace vybraných peptidů ve vzorcích pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií a kontrolních vzorcích stanovené metodou SID SRM MS. R = označení replikátu, K = kontrolní skupina, KMP = hypertrofická kardiomyopatie. Koncentrace je vyjádřena jako průměr ± SD nebo medián (IQR). ANGT = angiotenzinogen, ANT3 = antitrombin, bTG = β-tromboglobulin, FIB = fibrinogen, FN = fibronectin, TROMB = trombin, TIMP-2 = tkáňový inhibitor metaloproteáz 2.

Statisticky významné rozdíly byly nalezeny pro peptidy proteinu fibronectin (peptid VDVIPVNLPGEHGQR, hypertrofická kardiomyopatie  $6.2 \pm 1.3$  fmol/μl, vs. kontrolní skupina  $7.3 \pm 1.5$  fmol/μl,  $p = 0.0295$ ; peptid STTPDITGYR, hypertrofická kardiomyopatie  $4.8 \pm 0.7$  fmol/μl, vs. kontrolní skupina  $5.3 \pm 0.7$  fmol/μl,  $p = 0.0495$ ; obr. 5.9).



Obr. 5.9 Grafy výsledků kvantifikačních analýz peptidů fibronektinu. KMP = hypertrofická kardiomyopatie, K = kontrola. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku od průměrné hodnoty.

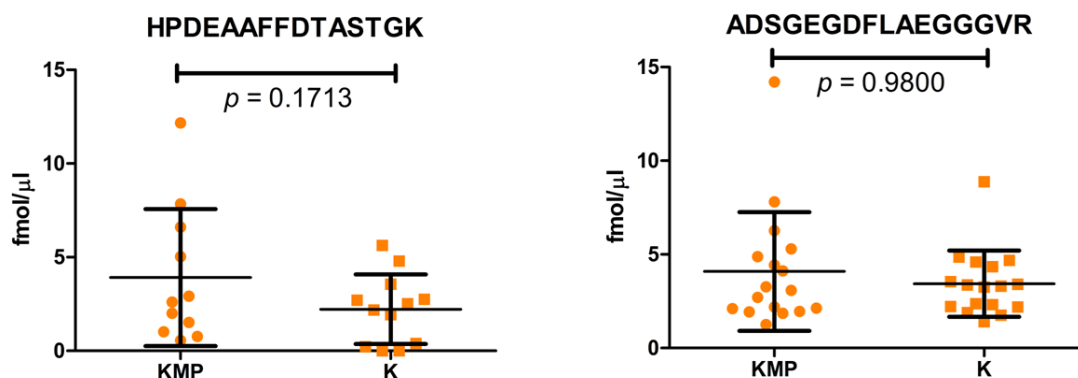
Další statisticky významný rozdíl ( $p = 0.0218$ ) mezi měřenými skupinami vzorků byl nalezen u peptidu LQPLDFK proteinu antitrombin (hypertrofická kardiomyopatie  $8.1 \pm 7.2$  fmol/μl, vs. kontrolní skupina  $2.9 \pm 2.3$  fmol/μl). U druhého antitrombinového peptidu nebyl nalezen statisticky významný rozdíl (peptid DDLYVSDAFK, hypertrofická kardiomyopatie  $5.7 \pm 1.3$  fmol/μl, vs. kontrolní skupina  $5.4 \pm 1.1$  fmol/μl,  $p = 0.5448$ ), nicméně výsledky vykazují stejný trend jako v případě prvního peptidu (obr. 5.10).



Obr. 5.10 Grafy výsledků kvantifikačních analýz. KMP = hypertrofická kardiomyopatie, K = kontrola. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku od průměrné hodnoty.

Statisticky významný rozdíl byl pozorován také u proteinu angiotenzinogen, konkrétně peptidu DPTFIPAPIQAK (hypertrofická kardiomyopatie  $6.9 \pm 5.1$  fmol/μl, vs. kontrolní skupina  $3.6 \pm 2.7$  fmol/μl,  $p = 0.0473$ ). U proteinu fibrinogenu byl sledován peptid HPDEAAFFDTASTGK, který je součástí jeho  $\alpha$ -řetězce, i samotný fibrinopeptid A (ADSGEGDFLAEGGGVR) vznikající odštěpením pomocí trombinu při přeměně fibrinogenu na nerozpustný fibrin. Ačkoliv oba sledované peptidy vykazovaly shodný

trend v koncentraci u analyzovaných vzorků (obr. 5.11), jejich rozdíly mezi hypertrofickou kardiomyopatií a kontrolní skupinou nebyly statisticky významné (hypertrofická kardiomyopatie  $3.9 \pm 3.7$  fmol/ $\mu$ l, vs. kontrolní skupina  $2.2 \pm 1.9$  fmol/ $\mu$ l,  $p = 0.1713$ ; resp. hypertrofická kardiomyopatie  $3.1$  fmol/ $\mu$ l, IQR:  $2.0 - 5.1$  fmol/ $\mu$ l, vs. kontrolní skupina  $3.3$  fmol/ $\mu$ l IQR:  $2.2 - 4.5$  fmol/ $\mu$ l,  $p = 0.9800$ ).



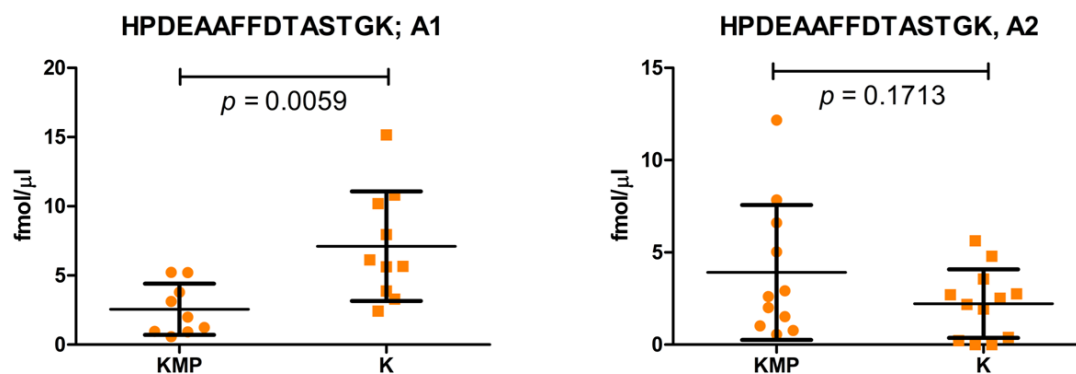
Obr. 5.11 Grafy výsledků kvantifikačních analýz. KMP = hypertrofická kardiomyopatie, K = kontrola. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku od průměrné hodnoty.

Stejně tak peptid  $\beta$ -tromboglobulinu NIQSLEVIGK (hypertrofická kardiomyopatie  $11.0 \pm 9.8$  fmol/ $\mu$ l, vs. kontrolní skupina  $8.4 \pm 12.0$  fmol/ $\mu$ l,  $p = 0.5532$ ), peptid trombinu ELLESYIDGR (hypertrofická kardiomyopatie  $5.2 \pm 1.5$  fmol/ $\mu$ l, vs. kontrolní skupina  $5.2 \pm 1.5$  fmol/ $\mu$ l,  $p = 0.9937$ ) a peptid tkáňového inhibitoru matrixmetaloproteáz 2 EYLIAGK (hypertrofická kardiomyopatie  $1.6 \pm 1.5$  fmol/ $\mu$ l, vs. kontrolní skupina  $2.4 \pm 1.6$  fmol/ $\mu$ l,  $p = 0.2804$ ) neukázaly statisticky významné rozdíly mezi svými koncentracemi v plazmě pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií a v plazmě kontrolní skupiny.

Problémem, který vyvstal po zpracování získaných dat, byly rozdílné trendy ve výsledcích u jednotlivých analytických replikátů peptidů DDLYVSDAFK, HPDEAAFFDTASTGK a EYLIAGK (viz příklad peptidu HPDEAAFFDTASTGK, obr. 5.12).

Pokud budeme vycházet z předpokladu, že samotná analýza na hmotnostním spektrometru s předřazenou separací pomocí kapalinové chromatografie v nano uspořádání probíhala bez problémů (což dokládá velmi nízký CV mezi jednotlivými technickými

replikáty), může být příčina tohoto rozdílu v koeluci interferenčního signálu, přípravě vzorků pro kvantifikační analýzu, v nejednotnosti procesu tryptického štěpení jednotlivých vzorků nebo v imunoafinitní separaci plazmy.



Obr. 5.12 Grafy výsledků kvantifikačních analýz, porovnání dvou odlišných analytických replikátů A1 a A2. KMP = hypertrofická kardiomyopatie, K = kontrola. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku od průměrné hodnoty.

Domníváme se, že přítomnost interference lze vyloučit na základě porovnání poměrů intenzit fragmentových iontů, které se ani v tomto případě nelišily od ostatních analýz a zároveň měření standardního peptidu. Navíc je patrné, že ke změně muselo dojít u všech vzorků v tomto konkrétním analytickém replikátu. Je pravděpodobné, že se v individuálním vzorku může interferenční signál objevit, ale není reálné, aby k tomu došlo u celé skupiny. Následující otázkou tedy je, zda se tento problém mohl objevit během přípravy vzorku pro analýzu, konkrétně během kroku, kdy je ve vialce mísená směs tryptických peptidů se standardními peptidy. Pro analýzu na hmotnostním spektrometru v našem uspořádání je potřeba pouze velmi malé množství analytu v řádu mikrolitrů. Během prvních měření byla pipetována množství nepřesahující 2  $\mu\text{l}$ . Ačkoliv je přesnost analytických pipet velmi dobrá, výsledky získané z těchto analýz nebyly reprodukovatelné. Při ověřování správnosti pipetování jsme prokázali, že při přenášení takto malých objemů, i při snaze o maximální přesnost, není problémem vyrobit statisticky významné rozdíly. Přenášený objem naštěpené plazmy byl tedy u finálních vzorků vždy minimálně 5  $\mu\text{l}$  a standardní peptidy byly přidávány ve formě směsi, tedy ne každý separátně, což by opět podstatně zvyšovalo nepřesnost analýz. Pokud bychom připustili, že pozorované rozdíly pochází z této části přípravy vzorků, vyvstává zde otázka, proč nejsou ovlivněny i jiné

peptidy, pocházející ze stejných vzorků. Třetím a nejvýznamnějším zdrojem variabilit je proces enzymatického štěpení. Problematika tohoto kroku byla nastíněna v předchozí kapitole. Pro minimalizaci vlivu rozdílného tryptického štěpení by v ideálním případě měly být vzorky naštěpeny všechny naráz v jedné směsi. To ovšem není reálné. Reálné je připravovat vzorky ve stejný časový okamžik, pomocí stejných chemikálií a jedné šarže štěpícího enzymu. Všechny tyto kroky byly dodrženy, a přesto jsme pozorovali výše uvedené nepřesnosti. Posledním uvažovaným zdrojem variabilit může být krok imunoafinitní separace. V závěru předchozí kapitoly již zazněla obhajoba tohoto postupu. Dokud se neobjeví vhodnější alternativa pro snížení komplexity vzorků plazmy, bude imunoafinitní separace i nadále prováděna.

Pravá příčina těchto rozdílů zůstává neodhalena, přikláníme se ale nejspíše k možnosti, že tyto rozdíly vznikly během enzymatického štěpení. Vzhledem k tomu, že studované skupiny vzorků byly poměrně malé a z hodnocení byly vyřazeny vzorky, jejichž CV u poměrů L/H přesahoval 15 %, bylo by minimálně vhodné tato pozorování ověřit na větších skupinách vzorků.

### 5.5 Verifikace vybraných ukazatelů pomocí imunostanovení

Většina námi analyzovaných proteinů byla vybrána na základě informací získaných z literárních zdrojů. V některých případech se koncentrace jednotlivých proteinů v různých publikacích významně lišily. Proto jsme na vybrané skupině několika proteinů ověřili pomocí ELISA stanovení jejich koncentraci v plazmě v rámci našeho souboru vzorků. V případě fibronektinu,  $\beta$ -tromboglobulinu a tkáňového inhibitoru metaloproteáz 2 byla získaná data korelována s daty získanými SID-SRM-MS analýzou.

BNP byl vzhledem ke svému diagnostickému potenciálu při tlakovém přetížení srdce zvolen za ukazatel relevantnosti použitých vzorků. V té samé souvislosti byl vybrán i protein somatomedin C (IGF-1), který je popisován jako marker buněčného stresu a růstový faktor s mnohostranným vlivem na srdeční funkce. Analýza fibronektinu byla prováděna na základě výsledků získaných v iTRAQ studii. Souvislost plazmatické koncentrace fibronektinu s dynamikou extracelulární matrice a zejména s probíhajícími fibrotickými změnami v srdeční tkáni u hypertrofické kardiomyopatie předznamenala i analýzu několika ostatních proteinů – metaloproteáz a jejich inhibitorů, účastnících se metabolismu kolagenu (MMP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2). Dalším stanovovaným proteinem byl inhibitor tkáňového faktoru (TFPI), který se podílí na správné funkci endotelu cév a účastní se koagulační kaskády. Jeho rozdílné plazmatické hladiny byly očekávány vzhledem k častým mikrovaskulárním endotelovým poruchám vazodilatace cév myokardu pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. S poruchami koagulace souvisí i P selektin zmiňovaný jako marker aktivace krevních destiček.

Při ELISA stanovení byly porovnávány plazmatické koncentrace proteinů mezi skupinou pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií a kontrolní skupinou. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0.0001$ ) v plazmě byly nalezeny u koncentrací BNP (hypertrofická kardiomyopatie  $86.0 \pm 51.2$  pg/ml, resp. kontrolní skupina  $7.4 \pm 6.4$  pg/ml) a TIMP-2, který vykazoval stejný trend jako BNP (hypertrofická kardiomyopatie  $91.9 \pm 23.8$  ng/ml, resp. kontrolní skupina  $69.6 \pm 16.1$  ng/ml;  $p = 0.0180$ ). Zároveň byly statisticky významné ( $p < 0.0001$ ) i rozdíly v hladinách fibronektinu v plazmě (hypertrofická kardiomyopatie  $210.0$   $\mu$ g/ml, IQR:  $177.1 - 245.6$   $\mu$ g/ml vs kontrolní skupina  $365.3$   $\mu$ g/ml, IQR:  $289.2 - 443.0$   $\mu$ g/ml). Ostatní stanovované proteiny neukázaly statisticky významné rozdíly v koncentracích v plazmě mezi těmito dvěma skupinami vzorků. Byly stanoveny



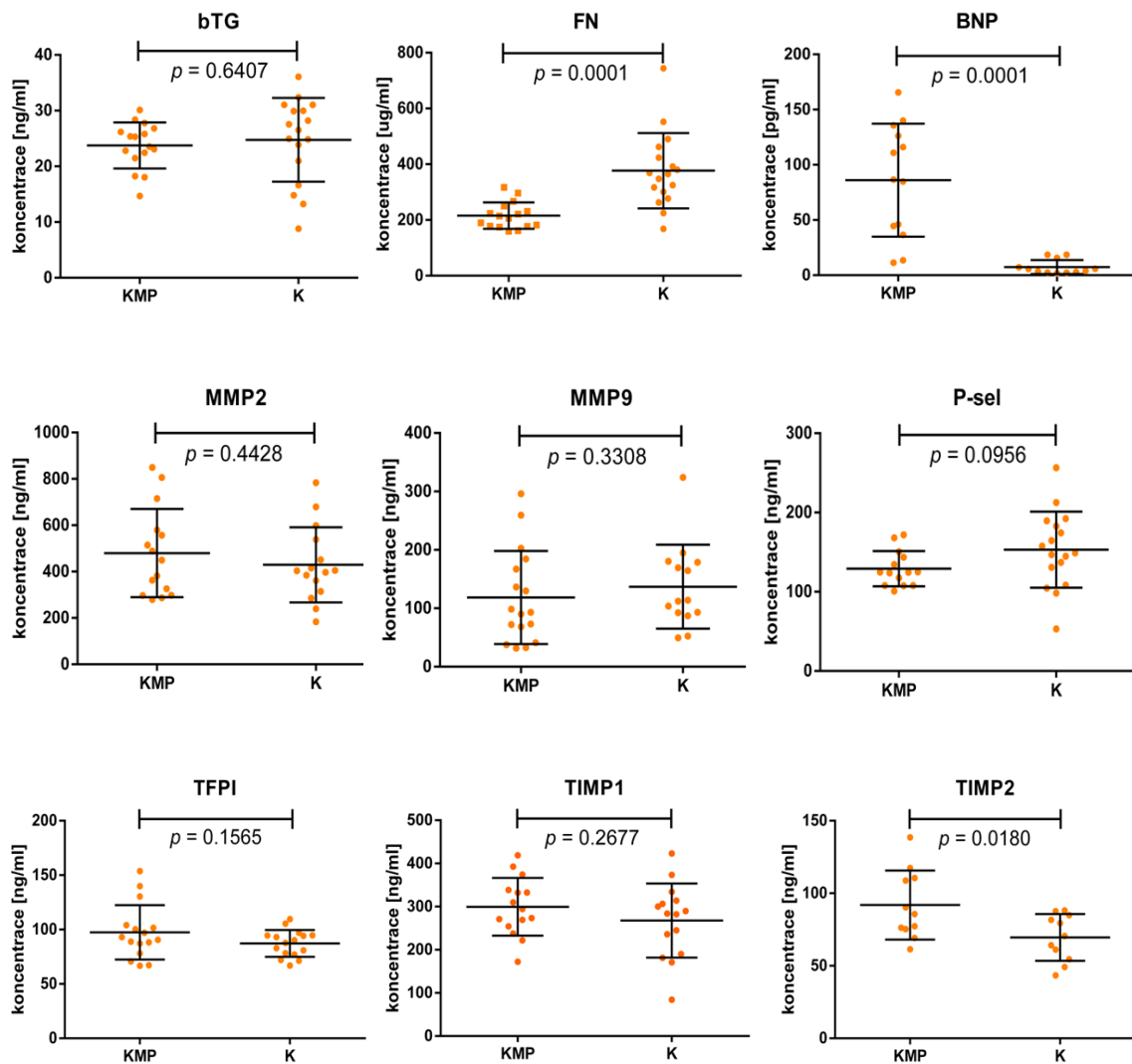
koncentrace MMP-2 (hypertrofická kardiomyopatie  $479.6 \pm 190.4$  ng/ml, kontrolní skupina  $429.3 \pm 162.3$  ng/ml,  $p = 0.4428$ ), TIMP-1 (hypertrofická kardiomyopatie  $299.6 \pm 67.0$  ng/ml, kontrolní skupina  $267.8 \pm 85.9$  ng/ml,  $p = 0.2677$ ), MMP-9 (hypertrofická kardiomyopatie  $93.2$  ng/ml, IQR:  $54.9 - 175.8$  ng/ml vs kontrolní skupina  $113.0$  ng/ml, IQR:  $91.1 - 179.3$  ng/ml;  $p = 0.3308$ ), bTG (hypertrofická kardiomyopatie  $23.8 \pm 4.1$  ng/ml, kontrolní skupina  $24.8 \pm 7.5$  ng/ml,  $p = 0.6407$ ), P-selektin (hypertrofická kardiomyopatie  $129.2 \pm 22.2$  ng/ml, kontrolní skupina  $153.2 \pm 47.9$  ng/ml,  $p = 0.0956$ ) a TFPI (hypertrofická kardiomyopatie  $97.4 \pm 25.0$  ng/ml, kontrolní skupina  $87.3 \pm 12.3$  ng/ml,  $p = 0.1565$ ). Koncentrace proteinů IGF-1 a MMP-1 se pohybovaly pod pracovním rozsahem použitých kitů. Získaná data jsou uvedena v tab. 5.11, grafické znázornění výsledků je na obr. 5.13. Pro statisticky významné výsledky byly vytvořeny ROC křivky a zjištěna hodnota jejich ploch pod křivkou (AUC) a statistická signifikance  $p$  (obr. 5.14).

Souhrn výsledků ELISA analýz			
Protein	Hypertrofická kardiomyopatie	Kontrolní skupina	$p$
Mozkový natruretický peptid [pg/ml]	$86.0 \pm 51.2$	$7.4 \pm 6.4$	0.0001
Tkáňový inhibitor metaloproteáz 2 [ng/ml]	$91.9 \pm 23.8$	$69.5 \pm 16.1$	0.0180
Tkáňový inhibitor metaloproteáz 1 [ng/ml]	$299.6 \pm 67.0$	$267.8 \pm 85.9$	0.2677
Matrixmetaloproteáza 2 [ng/ml]	$479.6 \pm 190.4$	$429.3 \pm 162.3$	0.4428
Matrixmetaloproteáza 9 [ng/ml]	$93.2 (54.9-175.8)$	$113.0 (91.1-179.3)$	0.3308
Fibronektin [ $\mu$ g/ml]	$210.0 (177.1-245.6)$	$365.3 (289.2-443.0)$	0.0001
$\beta$ -tromboglobulin [ng/ml]	$23.98 \pm 4.1$	$24.8 \pm 7.5$	0.6407
P-selektin [ng/ml]	$129.2 \pm 22.2$	$153.2 \pm 47.9$	0.0956
Inhibitor tkáňového faktoru [ng/ml]	$97.4 \pm 25.0$	$87.3 \pm 12.3$	0.1565
Somatomedin C [pg/ml]	mimo rozsah	mimo rozsah	n
Matrixmetaloproteáza 1 [ng/ml]	mimo rozsah	mimo rozsah	n

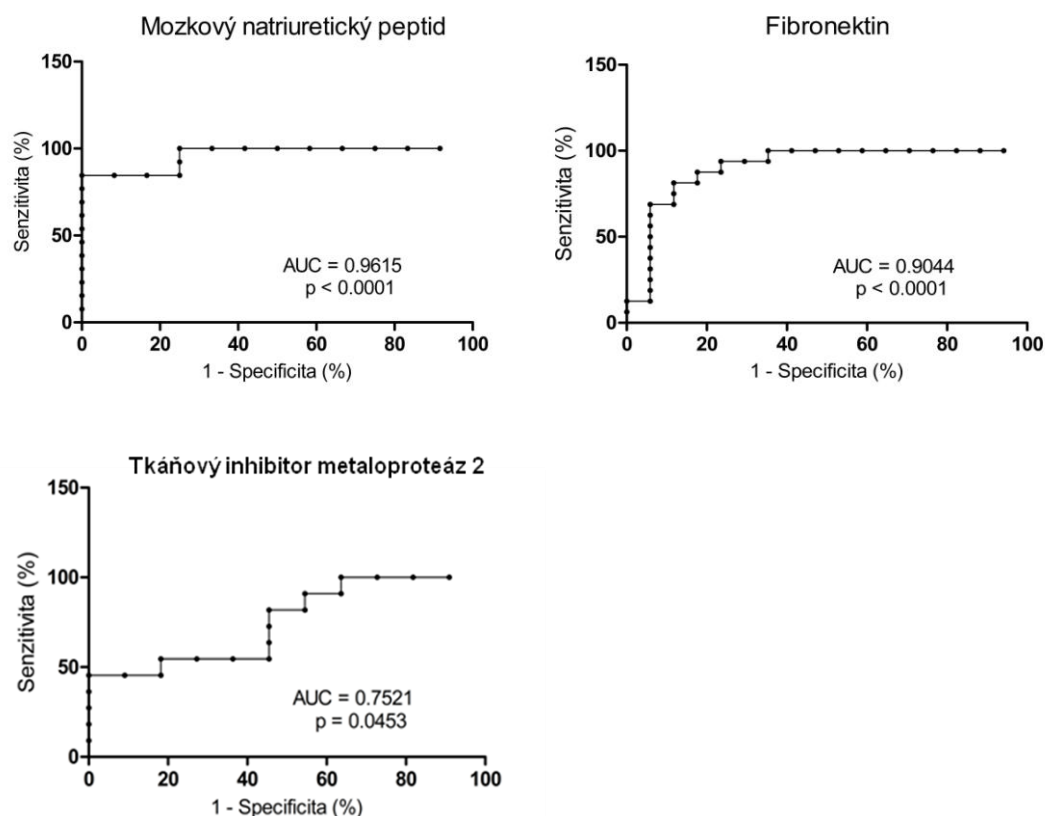
Tab. 5.11 Hladiny potenciálních markerů hypertrofické kardiomyopatie v plazmě stanovené metodou ELISA.

Vzhledem k omezené velikosti studovaných skupin bylo stanovení rozdílných hladin BNP pozitivním signálem v souvislosti s otázkou relevantnosti souboru vzorků. Velmi zajímavým výsledkem je stanovení hladin plazmatického fibronektinu, markeru navrhnutého na základě iTRAQ mapovací studie. Ostatní stanovované proteiny kromě TIMP-2 nevykazovaly statisticky významné rozdíly mezi oběma skupinami. U některých z nich je ovšem jistý rozdíl patrný a v případě matrixmetaloproteáz a jejich inhibitorů by mohly tyto rozdíly podporovat status solubilního fibronektinu jako nového potenciálního

proteinového ukazatele hypertrofické kardiomyopatie. Pro ověření těchto výsledků by bylo vhodné v budoucnu použít větší skupiny vzorků.



Obr. 5.13 Grafy výsledků ELISA analýz. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku od průměrné hodnoty.



Obr. 5.14 ROC křivky pro ELISA stanovení mozkového natriuretického peptidu ( $AUC = 0.9615$ ,  $p < 0.0001$ ), fibronektinu ( $AUC = 0.9044$ ,  $p < 0.0001$ ) a tkáňového inhibitoru metaloproteáz 2 ( $AUC = 0.7521$ ,  $p = 0.0453$ ).

Korelace metod SRM a ELISA byly provedeny u třech proteinů (FN, bTG a TIMP-2). Výsledky neukázaly statisticky významnou korelaci mezi daty získanými metodou absolutní kvantifikace pomocí SID-SRM-MS a verifikačním ELISA stanovením. Nicméně díky výsledkům ELISA stanovení, zejména pak stanovení markeru BNP, můžeme konstatovat, že i když jsou námi porovnávané skupiny vzorků poměrně malé, lze na nich nalézt signifikantní rozdíly, a tudíž je jejich použití pro SRM analýzy relevantní.

Ačkoliv se tento výsledek může zdát překvapivý a na první pohled by mohl metodu cílené proteomické analýzy odsoudit k nezdaru na poli kvantitativní proteomiky, je třeba si uvědomit jeden zásadní aspekt tohoto porovnávání. Při kvantifikaci vybraného proteinu pomocí ELISA metody je stanovován zpravidla celý protein ve své nativní konformaci. Reakce hledaného antigenu s protilátkou probíhá na specifických epitopech souvisejících s prostorovým uspořádáním proteinu. Pokud tedy dojde k degradaci proteinu jeho naštěpením nebo ke změně jeho konformace, nemusí být ELISA metodou stanoven.

Naopak SRM analýza je založená na peptidech, tedy potažmo na primární struktuře a je to metoda absolutní kvantifikace peptidů, nikoliv proteinů. Pomocí SRM mohou být samozřejmě detekovány i peptidy z degradovaných částí molekuly. Z hlediska kvantifikace metodou SID-SRM-MS může nastat mnoho odlišných situací. Za předpokladu, že nedochází během degradace k rozštěpení peptidu, který sledujeme a pokud se tvorba cílového proteinu v organismu nemění (pouze třeba rychlost nebo způsob jeho degradace), nebude rozdíl v hladinách sledovaných proteinů u nemocných a zdravých detekovatelný. Může se ale stát, že i když bude tvorba proteinu nezměněna, může docházet vlivem onemocnění k jeho degradaci odlišným způsobem, který může a nemusí porušit primární strukturu sledovaného peptidu a tím opět dojde ke vzniku falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků ve srovnání s ELISA stanovením. Podobných příkladů by se dalo nalézt mnoho, včetně chyb vzniklých nesprávnou manipulací se vzorkem, kdy jsou například inhibitory proteáz přidány v nedostatečném množství nebo s delší časovou prodlevou.

Provádění kvantitativních experimentů cílenou proteomickou analýzou nezahrnuje tedy pouze precizně zvládnutou přípravu metody nebo výběr nejvhodnějšího postupu tryptického štěpení vzorku. Stejně nebo možná i více záleží na porozumění biologické stránce experimentu a na způsobu hodnocení získaných výsledků v celkovém kontextu.

## 6 Závěr

Hypertrofická kardiomyopatie je komplikované onemocnění považované v dnešní době spíše za soubor mnoha geneticky podmíněných poruch než za jednu nosologickou jednotku. Jeho obrovská genotypová i fenotypová heterogenita umožňuje pozorovat širokou škálu individuálních příznaků od úplné absence hypertrofických změn levé komory až po extrémní tloušťku stěny dosahující až 65 mm, přičemž riziko nejzávažnější komplikace – náhlé smrti je u obou forem stejně pravděpodobné. Kromě dědičných forem hypertrofické kardiomyopatie se mohou vyskytnout i sporadicky vzniklé nové mutace. Vzhledem k tomu, že jde o velmi časté kardiovaskulární onemocnění a jeho první projevy mohou být fatální, je zde nutnost zavést do klinické praxe metodu, s jistotou odhalující toho onemocnění již v jeho raných fázích nebo u bezsymptomatických jedinců.

Vyšetřování pomocí genetických metod je u hypertrofické kardiomyopatie ve větším měřítku zatím nereálné. Díky progresi v oblasti instrumentace mohla přijít ke slovu proteomika. Naším cílem nebylo najít primárně nové potenciální markery tohoto onemocnění, ačkoliv se to nakonec v jednom případě podařilo. Chtěli jsme vyvinout metodu cílené proteomické analýzy schopnou kvantifikace vybraných a již publikovaných markerů hypertrofické kardiomyopatie. Z vybraných proteinů se zde podařilo na část z nich tuto metodu vytvořit, charakterizovat a ověřit její účinnost na malé skupině reálných vzorků. Z hlediska naplnění cílů vytyčených na začátku postgraduálního studia lze uvést, že jednotlivé body byly úspěšně realizovány. Na základě publikovaných prací o markerech hypertrofické kardiomyopatie byly vybrány kandidátní proteiny, jejichž seznam byl obohacen o protein, nalezený pomocí srovnávacích proteomických experimentů. Několik dalších kandidátů bylo přidáno po konzultaci s klinickými pracovníky FN HK. Pro studium koncentrace těchto vybraných proteinů resp. jejich proteotypických peptidů byla vytvořena metoda cílené proteomické analýzy, která byla následně aplikována na dostupný soubor klinických vzorků zahrnující vzorky od pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií a vzorky kontrolní, pocházející ve většině od dobrovolných dárců krve. Pro srovnání a určení relevantnosti těchto dvou skupin byla provedena též enzymoimunoanalytická stanovení několika vybraných proteinů.

Metoda cílené proteomické analýzy využívající hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólem a lineární iontovou pastí v kombinaci s nanoelektrosprejovou ionizací byla v počátku řešení dizertační práce na naše pracoviště zaváděna a v rámci České republiky byla a dodnes v několika ohledech je unikátní technikou. Během řešení této práce byly získány nejen soubory originálních dat, ale hlavně nedocenitelné zkušenosti v oblasti používané instrumentace. Dnes je metoda cílené proteomické analýzy běžně používána i na několika dalších pracovištích. I když jsou analýzy tohoto typu díky vývoji hmotnostních spektrometrů a souvisejícího programového vybavení dnes mnohem jednodušší, nejdůležitější podmínkou stále zůstává dobře zvážit, co konečný výsledek ve své podstatě znamená. Pravda o výsledku měření není pouze číslo na obrazovce přístroje.

## 7 Seznam použité literatury

1. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. *European cardiovascular disease statistics*. Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis: European Heart Network and European Society of Cardiology; 2012.
2. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation*. 1995;92(4):785–789.
3. Yu Z, Kastenmüller G, He Y, et al. Differences between Human Plasma and Serum Metabolite Profiles. *PLoS One*. 6(7).
4. Barelli S, Crettaz D, Thadikkaran L, Rubin O, Tissot J-D. Plasma/serum proteomics: pre-analytical issues. *Expert Rev Proteomics*. 2007;4(3):363–370.
5. Matheson LA, Duong TT, Rosenberg AM, Yeung RSM. Assessment of sample collection and storage methods for multicenter immunologic research in children. *J. Immunol. Methods*. 2008;339(1):82–89.
6. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell Proteomics*. 2002;1(11):845–867.
7. Keshishian H, Addona T, Burgess M, Kuhn E, Carr SA. Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol. Cell Proteomics*. 2007;6(12):2212–2229.
8. Anderson NL, Anderson NG, Haines LR, et al. Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). *J. Proteome Res*. 2004;3(2):235–244.
9. Bellei E, Bergamini S, Monari E, et al. High-abundance proteins depletion for serum proteomic analysis: concomitant removal of non-targeted proteins. *Amino Acids*. 2011;40(1):145–156.
10. Righetti PG, Boschetti E. Sherlock Holmes and the proteome--a detective story. *FEBS J*. 2007;274(4):897–905.
11. Sennels L, Salek M, Lomas L, et al. Proteomic analysis of human blood serum using peptide library beads. *J. Proteome Res*. 2007;6(10):4055–4062.
12. Mouton-Barbosa E, Roux-Dalvai F, Bouyssié D, et al. In-depth exploration of cerebrospinal fluid by combining peptide ligand library treatment and label-free protein quantification. *Mol. Cell Proteomics*. 2010;9(5):1006–1021.

13. Rivers J, Hughes C, McKenna T, et al. Asymmetric proteome equalization of the skeletal muscle proteome using a combinatorial hexapeptide library. *PLoS ONE*. 2011;6(12):e28902.
14. Yocum AK, Yu K, Oe T, Blair IA. Effect of immunoaffinity depletion of human serum during proteomic investigations. *J. Proteome Res.* 2005;4(5):1722–1731.
15. Liu T, Qian W-J, Mottaz HM, et al. Evaluation of Multiprotein Immunoaffinity Subtraction for Plasma Proteomics and Candidate Biomarker Discovery Using Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2006;5(11):2167–2174.
16. Diercks DB, Peacock WF 4th, Hollander JE, et al. Diagnostic accuracy of a point-of-care troponin I assay for acute myocardial infarction within 3 hours after presentation in early presenters to the emergency department with chest pain. *Am. Heart J.* 2012;163(1):74–80.e4.
17. Twerenbold R, Reichlin T, Reiter M, Müller C. High-sensitive cardiac troponin: friend or foe? *Swiss Med Wkly*. 2011;141:w13202.
18. Vikenes K, Melberg T, Farstad M, Nordrehaug JE. Long-term prognostic value of CK-MB and the troponins after angioplasty in patients with stable angina. *Scand. Cardiovasc. J.* 2011;45(3):146–152.
19. Alhadi HA, Fox KAA. Validity of Cardiac Markers as Diagnostic and Prognostic Indicators of Complications in Patients undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2010;10(1):31–40.
20. Collinson P, Goodacre S, Gaze D, Gray A. Very early diagnosis of chest pain by point-of-care testing: comparison of the diagnostic efficiency of a panel of cardiac biomarkers compared with troponin measurement alone in the RATPAC trial. *Heart*. 2011. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22076016>. Accessed January 18, 2012.
21. Kafkas N, Patsilidakos S, Makris K, et al. Brain natriuretic peptide: a marker of cardiac dysfunction with ventricular or dual-chamber pacing. *Acta Cardiol.* 2011;66(5):589–594.
22. van der Zee PM, Cornel JH, Bholasingh R, et al. N-terminal pro B-type natriuretic peptide identifies patients with chest pain at high long-term cardiovascular risk. *Am. J. Med.* 2011;124(10):961–969.
23. Tsutamoto T, Sakai H, Nishiyama K, et al. Direct comparison of transcardiac increase in brain natriuretic peptide (BNP) and N-terminal proBNP and prognosis in patients with chronic heart failure. *Circ. J.* 2007;71(12):1873–1878.
24. Russell SD, Saval MA, Robbins JL, et al. New York Heart Association functional class predicts exercise parameters in the current era. *Am. Heart J.* 2009;158(4 Suppl):S24–30.
25. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement



for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003;107(3):499–511.

26. Teare D. ASYMMETRICAL HYPERTROPHY OF THE HEART IN YOUNG ADULTS. *Br Heart J*. 1958;20(1):1–8.

27. Maron BJ, Epstein SE. Hypertrophic cardiomyopathy: a discussion of nomenclature. *Am. J. Cardiol*. 1979;43(6):1242–1244.

28. Gregor. *Hypertrofická kardiomyopatie*. Scientia Medica; 1992.

29. Ommen SR. Hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Probl Cardiol*. 2011;36(11):409–453.

30. Veselka et al. *Hypertrofická kardiomyopatie a příbuzná témata*. Galén; 2006.

31. Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Proposal for contemporary screening strategies in families with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2004;44(11):2125–2132.

32. Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2012;60(8):705–715.

33. Van Driest SL, Jaeger MA, Ommen SR, et al. Comprehensive analysis of the beta-myosin heavy chain gene in 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2004;44(3):602–610.

34. Flashman E, Redwood C, Moolman-Smook J, Watkins H. Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ. Res*. 2004;94(10):1279–1289.

35. Van Driest SL, Ommen SR, Tajik AJ, Gersh BJ, Ackerman MJ. Sarcomeric genotyping in hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin. Proc*. 2005;80(4):463–469.

36. Kelly M, Semsarian C. Multiple mutations in genetic cardiovascular disease: a marker of disease severity? *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(2):182–190.

37. Ingles J, Doolan A, Chiu C, et al. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J. Med. Genet*. 2005;42(10):e59.

38. Curila K, Benesova L, Penicka M, et al. Low prevalence and variable clinical presentation of troponin I and troponin T gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009;13(5):647–650.

39. Taylor MRG, Carniel E, Mestroni L. Familial hypertrophic cardiomyopathy: clinical features, molecular genetics and molecular genetic testing. *Expert Rev. Mol. Diagn*. 2004;4(1):99–113.

40. Larsen MK, Nissen PH, Berge KE, et al. Molecular autopsy in young sudden cardiac death victims with suspected cardiomyopathy. *Forensic Sci Int*. 2011. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22177269>. Accessed January 19, 2012.

41. Judge DP. Use of Genetics in the Clinical Evaluation of Cardiomyopathy. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2009;302(22):2471–2476.
42. Ashrafian H, Watkins H. Reviews of translational medicine and genomics in cardiovascular disease: new disease taxonomy and therapeutic implications cardiomyopathies: therapeutics based on molecular phenotype. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007;49(12):1251–1264.
43. Lankford EB, Epstein ND, Fananapazir L, Sweeney HL. Abnormal contractile properties of muscle fibers expressing beta-myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 1995;95(3):1409–1414.
44. Kai H, Muraishi A, Sugi Y, et al. Expression of proto-oncogenes and gene mutation of sarcomeric proteins in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ. Res.* 1998;83(6):594–601.
45. Crilley JG, Boehm EA, Blair E, et al. Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003;41(10):1776–1782.
46. Ashrafian H, Redwood C, Blair E, Watkins H. Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet.* 2003;19(5):263–268.
47. Kimura A. Molecular basis of hereditary cardiomyopathy: abnormalities in calcium sensitivity, stretch response, stress response and beyond. *J. Hum. Genet.* 2010;55(2):81–90.
48. Marian AJ. Pathogenesis of diverse clinical and pathological phenotypes in hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet.* 2000;355(9197):58–60.
49. Hughes SE. The pathology of hypertrophic cardiomyopathy. *Histopathology.* 2004;44(5):412–427.
50. Basso C, Thiene G, Mackey-Bojack S, et al. Myocardial bridging, a frequent component of the hypertrophic cardiomyopathy phenotype, lacks systematic association with sudden cardiac death. *Eur. Heart J.* 2009;30(13):1627–1634.
51. Kuribayashi T, Roberts WC. Myocardial disarray at junction of ventricular septum and left and right ventricular free walls in hypertrophic cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 1992;70(15):1333–1340.
52. Shirani J, Pick R, Roberts WC, Maron BJ. Morphology and significance of the left ventricular collagen network in young patients with hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000;35(1):36–44.
53. Camici PG, Olivetto I, Rimoldi OE. The coronary circulation and blood flow in left ventricular hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21924273>. Accessed January 19, 2012.

54. Francalanci P, Gallo P, Bernucci P, Silver MD, d' Amati G. The pattern of desmin filaments in myocardial disarray. *Hum. Pathol.* 1995;26(3):262–266.
55. Wu JC, Ho CY, Skali H, et al. Cardiovascular manifestations of Fabry disease: relationships between left ventricular hypertrophy, disease severity, and alpha-galactosidase A activity. *Eur. Heart J.* 2010;31(9):1088–1097.
56. Koeppen AH. Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J. Neurol. Sci.* 2011;303(1-2):1–12.
57. Altamirano E, Drut R. Arrhythmogenic cardiomyopathy in a patient with Noonan syndrome. *Fetal Pediatr Pathol.* 2010;29(3):158–164.
58. Corrado D, Basso C, Thiene G. Sudden cardiac death in athletes: what is the role of screening? *Curr. Opin. Cardiol.* 2012;27(1):41–48.
59. Godon P, Griffet V, Vinsonneau U, et al. Athlete's heart or hypertrophic cardiomyopathy: usefulness of N-terminal pro-brain natriuretic peptide. *Int. J. Cardiol.* 2009;137(1):72–74.
60. Tian Z, Zeng Y, Cheng K-A, et al. Importance of endomyocardial biopsy in unexplained cardiomyopathy in China: a report of 53 consecutive patients. *Chin. Med. J.* 2010;123(7):864–870.
61. Cunningham KS, Veinot JP, Butany J. An approach to endomyocardial biopsy interpretation. *J. Clin. Pathol.* 2006;59(2):121–129.
62. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA.* 2002;287(10):1308–1320.
63. Link MS. Prevention of sudden cardiac death: return to sport considerations in athletes with identified cardiovascular abnormalities. *Br J Sports Med.* 2009;43(9):685–689.
64. Overeem S, Schelhaas HJ, Blijham PJ, et al. Symptomatic distal myopathy with cardiomyopathy due to a MYH7 mutation. *Neuromuscul. Disord.* 2007;17(6):490–493.
65. Pellnitz C, Geier C, Perrot A, et al. [Sudden cardiac death in familial hypertrophic cardiomyopathy. Identification of high-risk patients]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2005;130(18):1150–1154.
66. Williams LK, Frenneaux MP, Steeds RP. Echocardiography in hypertrophic cardiomyopathy diagnosis, prognosis, and role in management. *Eur J Echocardiogr.* 2009;10(8):iii9–14.
67. Faber L, Seggewiss H, Welge D, et al. Echo-guided percutaneous septal ablation for symptomatic hypertrophic obstructive cardiomyopathy: 7 years of experience. *Eur J Echocardiogr.* 2004;5(5):347–355.
68. To ACY, Dhillon A, Desai MY. Cardiac magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011;4(10):1123–1137.

69. Panou FK, Kotseroglou VK, Lakoumentas JA, et al. Significance of brain natriuretic peptide in the evaluation of symptoms and the degree of left ventricular diastolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Hellenic J Cardiol.* 2006;47(6):344–351.
70. Ommen SR, Shah PM, Tajik AJ. Left ventricular outflow tract obstruction in hypertrophic cardiomyopathy: past, present and future. *Heart.* 2008;94(10):1276–1281.
71. Fifer MA, Sigwart U. Controversies in cardiovascular medicine. Hypertrophic obstructive cardiomyopathy: alcohol septal ablation. *Eur. Heart J.* 2011;32(9):1059–1064.
72. Alam M, Dokainish H, Lakkis NM. Hypertrophic obstructive cardiomyopathy-alcohol septal ablation vs. myectomy: a meta-analysis. *Eur. Heart J.* 2009;30(9):1080–1087.
73. Cambronero F, Marín F, Roldán V, et al. Biomarkers of pathophysiology in hypertrophic cardiomyopathy: implications for clinical management and prognosis. *Eur. Heart J.* 2009;30(2):139–151.
74. Roldán V, Marín F, Gimeno JR, et al. Matrix metalloproteinases and tissue remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 2008;156(1):85–91.
75. Fassbach M, Schwartzkopff B. Elevated serum markers for collagen synthesis in patients with hypertrophic cardiomyopathy and diastolic dysfunction. *Z Kardiol.* 2005;94(5):328–335.
76. Yarom R, Lewis BS, Lijovetzky G, Havivi Y, Chandler JA. Platelet studies in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 1982;16(6):324–330.
77. Riazanov AS, Gabbasov ZA, Iurenev AP. [Platelet aggregation in patients with hypertrophic cardiomyopathy]. *Ter. Arkh.* 2000;72(8):36–38.
78. Dimitrow PP, Undas A, Bober M, Tracz W, Dubiel JS. Obstructive hypertrophic cardiomyopathy is associated with enhanced thrombin generation and platelet activation. *Heart.* 2008;94(6):e21.
79. Dimitrow PP, Undas A, Bober M, Tracz W, Dubiel JS. Plasma biomarkers of endothelial dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Pharmacol Rep.* 2007;59(6):715–720.
80. Cambronero F, Vilchez JA, García-Honrubia A, et al. Plasma levels of von Willebrand factor are increased in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Thromb. Res.* 2010;126(1):e46–50.
81. Mizuno Y, Yoshimura M, Harada E, et al. Plasma levels of A- and B-type natriuretic peptides in patients with hypertrophic cardiomyopathy or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 2000;86(9):1036–1040, A11.
82. Nishigaki K, Fujiwara H. [Natriuretic peptides and cardiomyopathy]. *Nippon Rinsho.* 2004;62 Suppl 9:95–100.

83. Buzás K, Megyeri K, Hőgye M, et al. Comparative study of the roles of cytokines and apoptosis in dilated and hypertrophic cardiomyopathies. *Eur. Cytokine Netw.* 2004;15(1):53–59.
84. Zen K, Irie H, Doue T, et al. Analysis of circulating apoptosis mediators and proinflammatory cytokines in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy: comparison between nonobstructive and dilated-phase hypertrophic cardiomyopathy. *Int Heart J.* 2005;46(2):231–244.
85. Yamamoto K, Ikeda U, Furuhashi K, et al. The coagulation system is activated in idiopathic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1995;25(7):1634–1640.
86. Li G, Li RK, Mickle DA, et al. Elevated insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta 1 and their receptors in patients with idiopathic hypertrophic obstructive cardiomyopathy. A possible mechanism. *Circulation.* 1998;98(19 Suppl):II144–149; discussion II149–150.
87. Saeki H, Hamada M, Hiwada K. Circulating levels of insulin-like growth factor-1 and its binding proteins in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ. J.* 2002;66(7):639–644.
88. Tsybouleva N, Zhang L, Chen S, et al. Aldosterone, through novel signaling proteins, is a fundamental molecular bridge between the genetic defect and the cardiac phenotype of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 2004;109(10):1284–1291.
89. Sato Y, Taniguchi R, Nagai K, et al. Measurements of cardiac troponin T in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart.* 2003;89(6):659–660.
90. Stastna M, Van Eyk JE. Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery. *Proteomics.* 2012. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247067>. Accessed January 18, 2012.
91. Xu L, Zhu G-B, Wang L, Wang D-F, Jiang X-R. Synovial Fluid Omentin-1 Levels Are Inversely Correlated With Radiographic Severity of Knee Osteoarthritis. *J Investig Med.* 2012. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22222234>. Accessed January 18, 2012.
92. Pavlou MP, Kulasingam V, Sauter ER, Kliethermes B, Diamandis EP. Nipple aspirate fluid proteome of healthy females and patients with breast cancer. *Clin. Chem.* 2010;56(5):848–855.
93. Lindén M, Lind SB, Mayrhofer C, et al. Proteomic analysis of urinary biomarker candidates for nonmuscle invasive bladder cancer. *Proteomics.* 2012;12(1):135–144.
94. Zoidakis J, Makridakis M, Zerefos PG, et al. Profilin 1 is a potential biomarker for bladder cancer aggressiveness. *Mol Cell Proteomics.* 2011. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22159600>. Accessed January 18, 2012.

- 
95. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64–71.
96. Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.* 2012;57(14):2935–2939.
97. Tanaka K, Waki H, Ido Y, et al. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1988;2(8):151–153.
98. James P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q. Rev. Biophys.* 1997;30(4):279–331.
99. Wang H, Ouyang Z, Xia Y. Peptide fragmentation during nanoelectrospray ionization. *Anal. Chem.* 2010;82(15):6534–6541.
100. Mann M, Wilm MS. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 1994;136(2-3):167–180.
101. Knochenmuss R. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst*. 2006;131(9):966–986.
102. Beavis RC, Chaudhary T, Chait BT.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*. 1992;27(2):156–158.
103. de Hoffmann & Edmond. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Second. Toronto: John Wiley & Sons, Ltd. 2003.
104. Douglas DJ, Frank AJ, Mao D. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2005;24(1):1–29.
105. Schwartz JC, Senko MW, Syka JEP. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2002;13(6):659–669.
106. Brown RS, Lennon JJ. Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem.* 1995;67(13):1998–2003.
107. Alikhanov SG. *A NEW IMPULSE TECHNIQUE FOR ION MASS MEASUREMENTS*. 1957.
108. Cotter RJ, Cotter, Robert J. *Time-of-flight mass spectrometry*. Columbus, OH: American Chemical Society; 1994.
109. Mamyrin & Boris. Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). *International Journal of Mass Spectrometry*. 2001;206(3):251–266.

110. Park MA, Callahan JH, Vertes A. An inductive detector for time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1994;8(4):317–322.
111. Dubois F, Knochenmuss R, Zenobi R, et al. A comparison between ion-to-photon and microchannel plate detectors. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1999;13(9):786–791.
112. Makarov A. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* 2000;72(6):1156–1162.
113. Morrison JD. Personal reminiscences of forty years of mass spectrometry in Australia. *Organic Mass Spectrometry*. 1991;26(4):183–194.
114. Yost RA, Enke CG. Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer. *J. Am. Chem. Soc.* 2012;100(7):2274–2275.
115. Glish &#32;G, McLuckey &#32;S, Ridley &#32;T, Cooks &#32;R. A new “hybrid” sector/quadrupole mass spectrometer for mass spectrometry/mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*. 1982;41(3):157.
116. Glish GL, Burinsky DJ. Hybrid mass spectrometers for tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2008;19(2):161–172.
117. Roepstorff P, Fohlman J. Letter to the editors. *Biological Mass Spectrometry*. 1984;11(11):601–601.
118. Johnson RS, Martin SA, Biemann K, Stults JT, Watson JT. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal. Chem.* 2012;59(21):2621–2625.
119. Yan W, Luo J, Robinson M, et al. Index-ion triggered MS2 ion quantification: a novel proteomics approach for reproducible detection and quantification of targeted proteins in complex mixtures. *Mol. Cell Proteomics*. 2011;10(3):M110.005611.
120. Addona TA, Abbatiello SE, Schilling B, et al. Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nat. Biotechnol.* 2009;27(7):633–641.
121. Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, et al. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol. Cell Proteomics*. 2005;4(10):1487–1502.
122. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem.* 2007;389(4):1017–1031.
123. Vogel C, Marcotte EM. Calculating absolute and relative protein abundance from mass spectrometry-based protein expression data. *Nat Protoc.* 2008;3(9):1444–1451.

- 
124. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell Proteomics*. 2005;4(9):1265–1272.
125. Geiger T, Cox J, Ostasiewicz P, Wisniewski JR, Mann M. Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nat Meth*. 2010;7(5):383–385.
126. Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1(5):376–386.
127. Zhu W, Smith JW, Huang C-M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J. Biomed. Biotechnol*. 2010;2010:840518.
128. Becker CH, Bern M. Recent developments in quantitative proteomics. *Mutat. Res*. 2011;722(2):171–182.
129. Aggarwal K, Choe LH, Lee KH. Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2006;5(2):112–120.
130. Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, Warscheid B. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*. 2007;7(3):340–350.
131. Wells G, Huston C. High-Resolution Selected Ion Monitoring in a Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer. *Anal. Chem*. 2012;67(20):3650–3655.
132. Levin Y, Hradetzky E, Bahn S. Quantification of proteins using data-independent analysis (MSE) in simple and complex samples: A systematic evaluation. *PROTEOMICS*. 2011;11(16):3273–3287.
133. Gillet LC, Navarro P, Tate S, et al. Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(6). Available at: <http://www.mcponline.org/content/11/6/O111.016717>. Accessed July 3, 2013.
134. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol*. 2008;4:222.
135. Elschenbroich S, Kislinger T. Targeted proteomics by selected reaction monitoring mass spectrometry: applications to systems biology and biomarker discovery. *Mol Biosyst*. 2011;7(2):292–303.
136. Fillâtre Y, Rondeau D, Jadas-Hécart A, Communal PY. Advantages of the scheduled selected reaction monitoring algorithm in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry multi-residue analysis of 242 pesticides: a comparative approach with classical selected reaction monitoring mode. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2010;24(16):2453–2461.



137. Surinova S, Schiess R, Hüttenhain R, et al. On the development of plasma protein biomarkers. *J. Proteome Res.* 2011;10(1):5–16.
138. Stahl-Zeng J, Lange V, Ossola R, et al. High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites. *Mol. Cell Proteomics.* 2007;6(10):1809–1817.
139. Kitteringham NR, Jenkins RE, Lane CS, Elliott VL, Park BK. Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009;877(13):1229–1239.
140. Brönstrup M. Absolute quantification strategies in proteomics based on mass spectrometry. *Expert Rev Proteomics.* 2004;1(4):503–512.
141. Kirkpatrick DS, Gerber SA, Gygi SP. The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods.* 2005;35(3):265–273.
142. Picotti P, Aebersold R, Domon B. The implications of proteolytic background for shotgun proteomics. *Mol. Cell Proteomics.* 2007;6(9):1589–1598.
143. Cham Mead JA, Bianco L, Bessant C. Free computational resources for designing selected reaction monitoring transitions. *Proteomics.* 2010;10(6):1106–1126.
144. Deutsch EW, Lam H, Aebersold R. PeptideAtlas: a resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows. *EMBO Rep.* 2008;9(5):429–434.
145. Mallick P, Schirle M, Chen SS, et al. Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat. Biotechnol.* 2007;25(1):125–131.
146. Sherman J, McKay MJ, Ashman K, Molloy MP. How specific is my SRM?: The issue of precursor and product ion redundancy. *Proteomics.* 2009;9(5):1120–1123.
147. Holstein Sherwood CA, Gafken PR, Martin DB. Collision energy optimization of b- and y-ions for multiple reaction monitoring mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2011;10(1):231–240.
148. Lange V, Malmström JA, Didion J, et al. Targeted Quantitative Analysis of *Streptococcus pyogenes* Virulence Factors by Multiple Reaction Monitoring. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7(8):1489–1500.
149. Krokhin OV, Craig R, Spicer V, et al. An improved model for prediction of retention times of tryptic peptides in ion pair reversed-phase HPLC: its application to protein peptide mapping by off-line HPLC-MALDI MS. *Mol. Cell Proteomics.* 2004;3(9):908–919.
150. Escher C, Reiter L, MacLean B, et al. Using iRT, a normalized retention time for more targeted measurement of peptides. *PROTEOMICS.* 2012;12(8):1111–1121.

- 
151. Maclean B, Tomazela DM, Abbatiello SE, et al. Effect of collision energy optimization on the measurement of peptides by selected reaction monitoring (SRM) mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2010;82(24):10116–10124.
152. Picotti P, Rinner O, Stallmach R, et al. High-throughput generation of selected reaction-monitoring assays for proteins and proteomes. *Nat. Methods.* 2010;7(1):43–46.
153. Anderson NL. Libraries of specific assays covering whole proteomes: from yeast to man. *Clin. Chem.* 2010;56(10):1521–1522.
154. Keshishian H, Addona T, Burgess M, et al. Quantification of Cardiovascular Biomarkers in Patient Plasma by Targeted Mass Spectrometry and Stable Isotope Dilution. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2009;8(10):2339–2349.
155. Huillet C, Adrait A, Lebert D, et al. Accurate Quantification of Cardiovascular Biomarkers in Serum Using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ&trade;) and Selected Reaction Monitoring. *Mol. Cell Proteomics.* 2012;11(2):M111.008235.
156. Lebert D, Dupuis A, Garin J, Bruley C, Brun V. Production and use of stable isotope-labeled proteins for absolute quantitative proteomics. *Methods Mol. Biol.* 2011;753:93–115.
157. Pratt JM, Simpson DM, Doherty MK, et al. Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes. *Nat Protoc.* 2006;1(2):1029–1043.
158. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* 2006;24(8):971–983.
159. Anon. [http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM\\_200\\_2012.pdf](http://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_200_2012.pdf).
160. Milde D PZ. Názvosloví v oblasti metrologie a zabezpečování kvality. *Chem. listy.* 2012;106:41 – 44.
161. McIntosh M, Fitzgibbon M. Biomarker validation by targeted mass spectrometry. *Nat Biotech.* 2009;27(7):622–623.
162. Schratzenholz A, Groebe K. What does it need to be a biomarker? Relationships between resolution, differential quantification and statistical validation of protein surrogate biomarkers. *Electrophoresis.* 2007;28(12):1970–1979.
163. Paulovich AG, Whiteaker JR, Hoofnagle AN, Wang P. The interface between biomarker discovery and clinical validation: The tar pit of the protein biomarker pipeline. *Proteomics Clin Appl.* 2008;2(10-11):1386–1402.
164. Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Meth.* 2009;6(5):359–362.
165. Reiter L, Rinner O, Picotti P, et al. mProphet: automated data processing and statistical validation for large-scale SRM experiments. *Nat Meth.* 2011;8(5):430–435.

166. Domanski D, Percy AJ, Yang J, et al. MRM-based multiplexed quantitation of 67 putative cardiovascular disease biomarkers in human plasma. *Proteomics*. 2012;12(8):1222–1243.
167. Mitulović G, Stingl C, Steinmacher I, et al. Preventing Carryover of Peptides and Proteins in Nano LC-MS Separations. *Anal. Chem.* 2009;81(14):5955–5960.
168. To WS, Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011;4:21.
169. White ES, Muro AF. Fibronectin splice variants: understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models. *IUBMB Life*. 2011;63(7):538–546.
170. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*. 2002;115(20):3861–3863.
171. White ES, Baralle FE, Muro AF. New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J. Pathol.* 2008;216(1):1–14.
172. Marom B, Rahat MA, Lahat N, et al. Native and fragmented fibronectin oppositely modulate monocyte secretion of MMP-9. *J. Leukoc. Biol.* 2007;81(6):1466–1476.
173. Leikina E, Merts MV, Kuznetsova N, Leikin S. Type I collagen is thermally unstable at body temperature. *PNAS*. 2002;99(3):1314–1318.
174. Ho CY, López B, Coelho-Filho OR, et al. Myocardial fibrosis as an early manifestation of hypertrophic cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(6):552–563.
175. Zima T. *Laboratorní diagnostika*. Galén; 2007.
176. Abbatiello SE, Mani DR, Keshishian H, Carr SA. Automated detection of inaccurate and imprecise transitions in peptide quantification by multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2010;56(2):291–305.



### 8 Přehled související publikační činnosti

Tambor V., Fucikova A., Lenco J., et al. Application of Proteomics in Biomarker Discovery: a Primer for the Clinician. *Physiological Research*, 59 (4), 471-497 (2010).

Pudil, R., Tichý, M., Lenčo, J., Horáček, J.M., et al., Hladiny markerů poruchy struktury myokardu u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. *Intervenční a akutní kardiologie* 2009, 8, 286–290.

Pudil R., Vasatova M., Lenco J., Fucikova A., et al. Plasma glycogen phosphorylase BB is associated with pulmonary artery wedge pressure and left ventricle mass index in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48 (8), 1193-1195 (2010).

Faktor J., Struharova I., Fucikova A., et al. Mass-Spectrometry Quantification of Protein Biomarkers by Selected Reaction Monitoring. *Chemické listy*, 105 (11), 846-850 (2011).

