Frakcionacija složenih smjesa peptida na kationskom izmjenjivaču radi poboljšane identifikacije proteina spektrometrijom masa visoke rezolucije

Prišćan, Dominik

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:473613

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-24**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Dominik Prišćan

Frakcionacija složenih smjesa peptida na kationskom izmjenjivaču radi poboljšane identifikacije proteina spektrometrijom masa visoke rezolucije

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra kemije

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za Biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marka Močiboba.

Zahvale

Zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Marku Močibobu na pruženoj prilici da radim i učim, na ukazanom povjerenju i strpljenju te na brojnim korisnim savjetima prilikom izrade i pisanja ovog rada

Zahvaljujem i drugim članovima Zavoda za biokemiju na ugodnoj, poticajnoj i prijateljskoj atmosferi

Zahvaljujem prijateljima na savjetima i podršci koja je uvijek bila prisutna kada mi je najviše trebala

Zahvaljujem roditeljima na podršci i pomoći tijekom studija

Sadržaj

SAŽETAK IX
ABSTRACT XI
§ 1. UVOD 1
§ 2. LITERATURNI PREGLED 3
2.1. Proteomika 3
2.1.1. Karakterizacija proteoma 4
2.2. Spektrometrija masa 7
2.2.1. Ionski izvori 7
2.2.2. Analizatori masa 9
2.2.3. Tandemna spektrometrija masa 10
2.3. Tekućinska kromatografija 13
2.3.1. Kromatografija ionske izmjene 14
2.3.2. Razdjelna kromatografija 15
2.4. Bioinformatička analiza i identifikacija peptida 15
2.5. Zanimljive aminoacil–tRNA–sintetaze 18
§ 3. MATERIJALI I METODE 20
3.1. Materijali 20
3.1.1. Standardne kemikalije 20
3.1.2. Enzimi i proteini 20
3.1.3. Bakterije i stanične linije 20
3.1.4. Uređaji 20
3.1.5. Kromatografske kolone i filteri 21
3.2. Metode 21
3.2.1. Liza stanica sonikacijom pri denaturirajućim uvjetima 21
3.2.2. Taloženje proteina metanolom i kloroformom 21
3.2.3. Određivanje koncentracije proteina 22
3.2.4. Razgradnja proteina tripsinom 22
3.2.5. Pročišćavanje proteinskih digesta 23
3.2.6. Frakcionacija peptida 23
3.2.7. Analiza peptida na nanoLC–MS/MS 24
3.2.8. Obrada podataka 24
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 27

4.1. Uvod u rezultate 27
4.2. Optimizacija gradijenta kromatografije jake kationske izmjene 27
4.3. Optimizacija sastava mobilnih faza 44
4.4. Optimizacija trajanja kromatografskog odjeljivanja pomoću sustava nanoLC–MS/MS i broja prikupljenih frakcija 52
4.5. Primjena optimizirane metode 56
4.6. Perspektiva budućih istraživanja 58
§ 5. ZAKLJUČAK 60
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA 61
§ 7. LITERATURNI IZVORI 63
§ 8. DODATAK XV
§ 9. ŽIVOTOPIS XXI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

FRAKCIONACIJA SLOŽENIH SMJESA PEPTIDA NA KATIONSKOM IZMJENJIVAČU RADI POBOLJŠANE IDENTIFIKACIJE PROTEINA SPEKTROMETRIJOM MASA VISOKE REZOLUCIJE

Dominik Prišćan

Danas je u proteomici za identifikaciju i kvantifikaciju proteina najviše zastupljena metoda temeljena na vezanom sustavu tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa, odnosno *shotgun*–proteomika. Radi poboljšane identifikacije proteina, postupak može uključivati korak predfrakcionacije peptida. U sklopu ovog rada, napravljena je optimizacija koraka predfrakcionacije peptida, pri čemu je optimiziran gradijent elucije, sastav mobilne faze i broj prikupljenih frakcija. Također, optimizirano je trajanje kromatografskog odjeljivanja pomoću vezanog sustava tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa. Optimizirana metoda primijenjena je za predfrakcionaciju realnih uzoraka, pri čemu je metoda korištena za provjeru ekspresije dupliciranih gena za aminoacil–tRNA–sintetaze pronađenih u genomu *H. aurantiacus* i *H. geysericola*. Nadalje, metoda je korištena za provjeru ekspresije gena za proteine–nosače i homologe aminoacil–tRNA–sintetaza pronađenih u genomu bakterija *A. fabrum*, *B. diazoefficiens*, *B. thuringiensis* 4AJ1 i 4CC1 te za analizu ekspresije gena koji pokazuju sinteniju s genima proteina–nosača i homologa aminoacil–tRNA–sintetaza.

(65+XXI stranica, 44+VII slika, 9+II tablica, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: aminoacil–tRNA–sintetaze, kromatografija ionske izmjene, LC-MS/MS, proteomika, UHPLC

Mentor: doc. dr. sc. Marko Močibob

Ocjenitelji:
1. doc. dr. sc. Marko Močibob
2. prof. dr. sc. Nives Galić
3. izv. prof. dr. sc. Đani Škalamera

Zamjena: doc. dr. sc. Morana Dulić

Datum diplomskog ispita: 20 veljače 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

PEPTIDE FRACTIONATION BY STRONG CATION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY FOR ENHANCED PROTEIN IDENTIFICATION BY HIGH RESOLUTION MASS SPECTROMETRY

Dominik Prišćan

The modern proteomic analyses rely on the coupled system of liquid chromatography and tandem mass spectrometry for comprehensive peptide separation and identification. To further increase the number of identified peptides, improve the identification of proteins and their sequence coverage, the analysis workflow may include a step of pre–fractionation of peptides. In this thesis, an optimisation of the peptide pre–fractionation step was conducted, which included the optimisation of the elution gradient, the composition of the mobile phases and the number of fractions collected. In addition, the duration of the chromatographic step in the coupled liquid chromatography–tandem mass spectrometry system was optimised. The optimised method was applied for the pre–fractionation of authentic samples, wherein the method was utilized to verify the expression of duplicated genes for aminoacyl–tRNA synthetases in the genomes of *H. auratiacus* and *H. geysericola*. Furthermore, the method was employed to determine the expression of genes for carrier proteins and homologues of aminoacyl–tRNA synthetases in the genomes of the *bacteria A. fabrum*, *B. diazoefficiens*, *B. thuringiensis* 4AJ1 and 4CC1 as well as to analyse the expression of genes that show synteny with genes for carrier proteins and homologues of aminoacyl–tRNA–synthetases.

(65+XXI pages, 44+VII figures, 9+II tables, 45 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: aminoacyl-tRNA-synthetases, ion exchange chromatography, LC-MS/MS, proteomics, UHPLC

Mentor: Dr. Sc. Marko Močibob, Associate Professor

Reviewers:
1. Dr. sc. Marko Močibob, Assistant Professor
2. Dr. sc. Nives Galić, Professor
3. Dr. sc. Đani Škalamera, Associate Professor

Substitute: Dr. sc. Morana Dulić, Assistant Professor

Date of exam: February 20th, 2024.

§ 1. UVOD

Proteini su sastavni dio svakog organizma i ključni su u svim biološkim funkcijama na razini staničnih procesa. Budući da se proteom mijenja ovisno o genetskim i vanjskim čimbenicima, identifikacija proteina i utvrđivanje njihovih svojstava, interakcija i funkcija ključno je za razumijevanje fiziološkim i patoloških procesa. Razvoj instrumenata i analitičkih metoda, poput elektroforeze, tekućinske kromatografije i spektrometrije masa, uz razvoj bioinformatike omogućio je istodobnu identifikaciju velikog broja proteina.[1-3]

Danas se u proteomici za mapiranje, identifikaciju i kvantifikaciju proteina najviše koristi spektrometrija masa, temeljena na dva pristupa: *top–down* i *bottom–up* spektrometrija masa proteina. Ukratko, *top–down* pristup se temelji na analizi intaktnih proteina, dok se *bottom–up* pristup temelji na analizi smjese peptida dobivenih proteolitičkom razgradnjom proteina. Smjesa peptida se analizira koristeći tandemnu spektrometriju masa, pri čemu dolazi do fragmentacije peptida. Peptidi se identificiraju usporedbom spektara cjelovitih peptida i spektara fragmentiranih peptida s predikcijama iz proteinskih baza podataka *in silico*.[1-6]

Primjenom *bottom–up* pristupa za karakterizaciju proteoma dobiva se vrlo složena smjesa peptida, zbog čega je nemoguće detektirati sve peptide u spektrometru masa. Korištenjem vezanog sustava tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa smanjuje se broj različitih peptida koji se odvaja u analizatoru masa u danom trenutku i zatim fragmentira, čime se povećava broj identificiranih peptida. Nadalje, broj identificiranih peptida može se dodatno povećati predfrakcionacijom, pri čemu se značajno smanjuje kompleksnost uzorka jer se smjesa peptida dijeli u više frakcija jednostavnijeg sastava. U vezanom sustavu LC–MS/MS separacija peptida temelji se na kromatografiji obrnutih faza u kiselim uvjetima, zbog čega se za predfrakcionaciju koriste kromatografske metode koje su ortogonalne kromatografiji obrnutih faza. Za predfrakcionaciju se često koristi kromatografija ionske izmjene, a može se koristiti i kromatografija obrnutih faza u bazičnim uvjetima. [1-6]

Cilj istraživanja bio je razviti i optimizirati metodu identifikacije proteina koja uključuje frakcionaciju koristeći tekućinsku kromatografiju vrlo visoke učinkovitosti na kationskom izmjenjivaču te identifikaciju proteina koristeći vezani sustav nanoLC–MS/MS u svrhu poboljšanja identifikacije proteina. Istraživanje je bilo usmjereno na optimizaciju koraka frakcionacije peptida, pri čemu se optimizirao gradijent elucije, sastav mobilne faze i broj

prikupljenih frakcija. Osim toga, optimizirano je vrijeme trajanja kromatografije obrnutih faza tijekom analize sustavom nanoLC–MS/MS.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Proteomika

Proteomika vuče svoje korijenje od 1975. godine kada su znanstvenici O'Farell, Klose i Scheele primjenom dvodimenzijske elektroforeze mapirali proteine iz *E. coli*, miša i zamorca.[7-9] Proteomika obuhvaća karakterizaciju i analizu ekspresije gena i svih proteina koji se nalaze u staničnoj liniji, tkivu ili organizmu. Pojam proteom potječe od pojmova genom i protein, a obuhvaća sve proteine i proteinske oblike koje organizam sintetizira tijekom životnog ciklusa.[11,11]

Potreba za proteomikom javila se s obzirom da fenotip stanice ponajviše ovisi o prisutnim proteinima. Iako je proučavanje DNA i RNA metodološki lakše, postoji više razloga zašto analizom DNA i RNA nije moguće dobiti informacije o količina proteina, trodimenzionalnoj strukturi i aktivnosti proteina. Neki od razloga uključuju alternativno izrezivanje (engl. *splicing*) mRNA, posttranslacijske modifikacije, translokacija proteina u organele i proteolitičko cijepanje signalnih sekvenci. Proteomika nema takva ograničenja, što čini proteomiku idealnom za proučavanje fenotipa stanica. Međutim, zbog svojstava proteoma proteomika je metodološki kompleksnija od genomike.[12]

Primjena proteomike se može podijeliti u četiri područja: karakterizacija proteoma, komparativna proteomika, mapiranje međuproteinskih mreža interakcija i mapiranje proteinskih modifikacija.

Najjednostavnija primjena proteomike je karakterizacija proteoma, kojoj je cilj identificirati sve proteine u uzorku u svrhu karakterizacije proteoma. Temelji se na separaciji proteina ili peptida te identifikaciji istih koristeći spektrometriju masa i pripadne baze podataka i softverske alate.[10–13]

U komparativnoj proteomici prati se ekspresija više proteina u određenom uzorku, u ovisnosti o razvojnom stanju organizmi ili stanice, ili u ovisnosti o izloženosti uzorka lijekovima, kemijskim spojevima ili primijenjenoj fizičkoj sili. Najčešće se koristi za usporedbu dva stanja u određenom sustavu. Na primjer, može se pratiti razlika u ekspresija proteina u inficiranom tkivu i normalnom tkivu.

U mapiranju međuproteinskih mreža interakcija istražuju se interakcije protein–protein u živoj stanici. Većina proteina odrađuje svoju funkciju blizu drugih proteina, pri čemu dolazi do

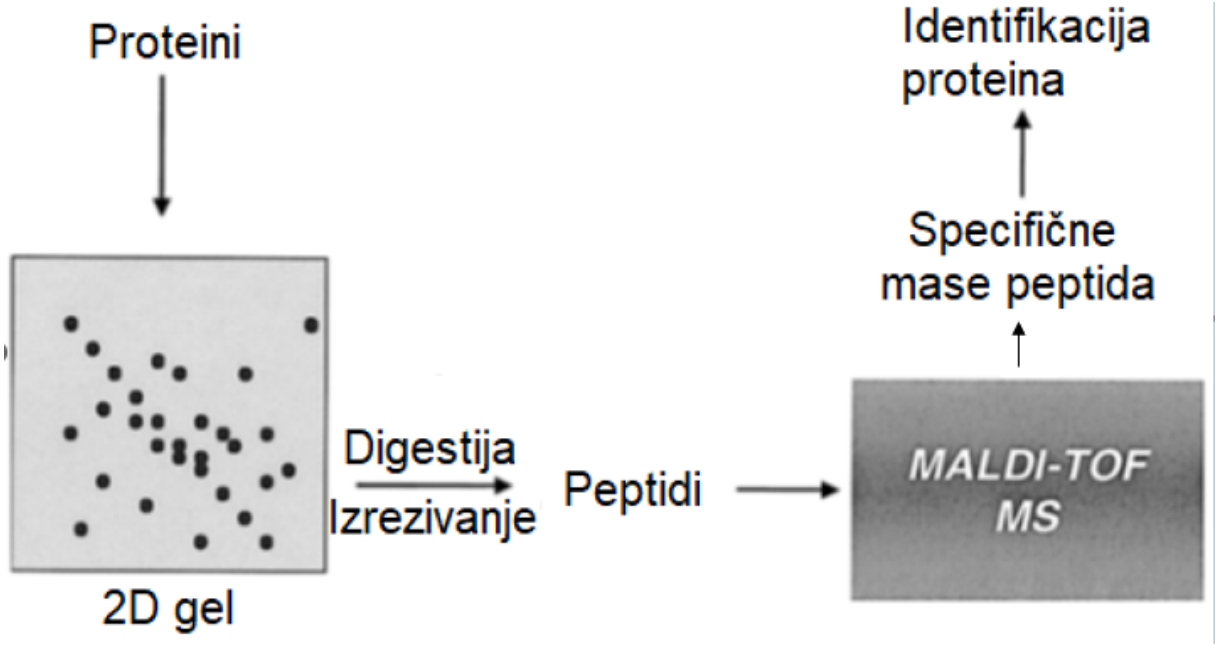
stvaranja interakcija protein–protein. Proučavanjem upravo tih interakcija moguće je odrediti funkciju svih proteina u nekom signalnom ili metaboličkom putu. U odnosu na prijašnje pristupe praćenja proteinskih interakcija, glavna prednost ovog pristupa je metoda koja uključuje povezivanje afinitetne kromatografije i spektrometrije masa.

Cilj mapiranja proteinskih modifikacija je odrediti gdje i kako su proteini modificirani. Razvijene su razne metode za identifikaciju modificiranih proteina te za identifikaciju same modifikacije, međutim teško je odrediti točno mjesto određenje modifikacije. Proteomika omogućuje određivanje svega navedenog i specifičnost posttranslacijske modifikacije za određenu aminokiselinsku sekvencu.[13]

2.1.1. Karakterizacija proteoma

Po definiciji proteom obuhvaća sve proteine sintetizirane u životnom ciklusu organizma, no nijedna stanica u organizmu ne sadrži sve proteine kodirane pripadnim genima zajedno u jednom trenutku. Na primjer, u bilo kojem trenutku čak trećina genoma kvasca nije eksprimirana. Kod viših organizama, različiti geni i proteini su eksprimirani u različitim tkivima i u različitim dijelovima životnog ciklusa. Zbog čega je odabir određene stanice ili tkiva važan prvi korak u karakterizaciji proteoma. Uzorak stanice ili tkiva mora biti homogen i reprezentativan za tip stanice ili tkiva koji se analizira. Međutim, postupci izolacije stanice ili tkiva mogu uzrokovati stanični stres, pri čemu može doći do promjene sastava proteoma.

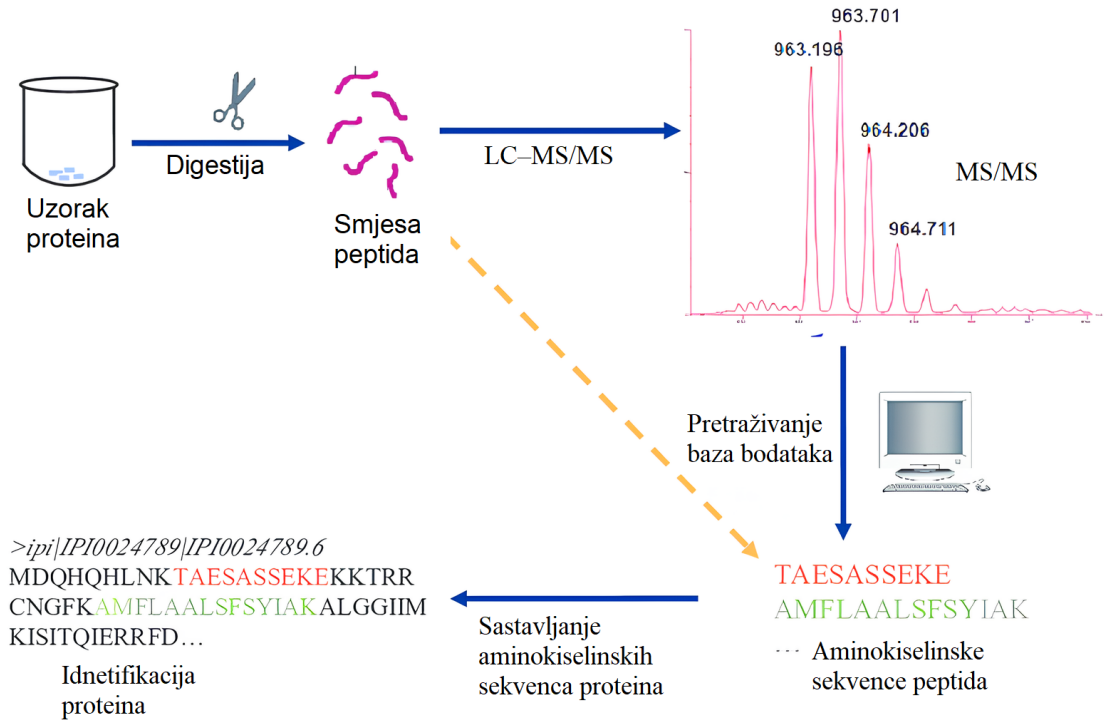
U karakterizaciji proteoma najzastupljenija su dva pristupa. Stariji pristup započinje separacijom proteina primjenom dvodimenzijske elektroforeze (2D–SDS–PAGE). Nakon separacije pojedini proteini se izrežu iz gela te se podvrgnu digestiji unutar gela. U sljedećem koraku peptidi se analiziraju u spektrometru masa, koristeći matricom potpomognutu ionizaciju uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* – MALDI) te analizator vremena leta (engl. *Time of Flight* – TOF). Proteini se identificiraju analizom spektara masa peptida koristeći algoritme koji se temelje na specifičnoj masi peptida (engl. *peptide mass fingerprint*). Na slici 1 prikazana je shema pristupa.[14,14]



Slika 1 Shema pristupa za karakterizaciju proteoma, slika je preuzeta i prilagođena iz ref. 13

Najveće prednosti ovog pristupa su separacijska moć 2D gel elektroforeze te osjetljivost i brzina analize MALDI–TOF spektrometra masa. Međutim, primjenom ovog pristupa u prosječnoj analizi identificira se svega od 50 do 75% proteina. Jedan od problema ovog pristupa predstavljaju proteinski paralozi. Naime, digestijom proteinskih paraloga mogu se dobiti identični peptidi koji posljedično smanjuju pouzdanost identifikacije proteina koji su identificirani na temelju jednog ili dva jedinstvena peptida. Iako je separacijska moć 2D gel elektroforeze velika, nije moguće razdvojiti sve proteine u pojedine točke na gelu. Pokazano je da u ovisnosti o prirodu uzorka te poziciji točke na gelu postoji više točaka koje sadrže od 2 do 5 proteina. Digestijom takvih točaka dobiva se smjesa peptida iz dva ili više proteina, što negativno utječe na pouzdanost identifikacije odgovarajućih proteina.

Noviji pristup se temelji na pristupu analize proteina odozdol nagore (engl. *bottom–up*), a naziva se *shotgun*–proteomika. U prvom koraku smjesa proteina je podvrgnuta digestiji, nakon koje se peptidi separiraju. Peptidi se separiraju na temelju kromatografije obrnutih faza koristeći vezani sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Ionizirani peptidi se analiziraju u tandemnom spektrometru masa. Proteini se identificiraju usporedbom dobivenih spektara cjelovitih peptida i spektara fragmentiranih peptida s predikcijama iz proteinskih baza podataka *in silico*. Pretraživanje baza podataka obavljaju algoritmi poput *Sequest*–a. Na slici 2 prikazana je shema *shotgun* proteomike.[6,13,15–17]



Slika 2 Shema *shotgun*–proteomike, slika je preuzeta i prilagođena iz ref. 16

Prednost *shotgun*-proteomike je što preskače korak separacije proteina složenim tehnikama poput 2D gel elektroforeze, čime se ujedno povećava reproducibilnost pristupa. Također, pouzdanost rezultata dobivenih *shotgun*–proteomikom je velika jer se identifikacija proteina temelji na MS/MS spektrima, koji sadrže informacije o aminokiselinskim sekvencama peptida. Međutim, smjesa peptida dobivena digestijom proteoma vrlo je složena, zbog čega je nemoguće detektirati sve peptide u spektrometru masa, što onemogućuje istodobnu identifikaciju velikog broja proteina. Korištenjem vezanog sustava tekućinske kromatografije i spektrometra masa smanjuje se broj različitih peptida koji se u pojedinom trenutku uvodi u spektrometar masa, čime se povećava broj identificiranih peptida. Nadalje, uvođenjem koraka predfrakcionacije nakon digestije proteina može se dodatno povećati broj identificiranih peptida. Predfrakcionacijom se značajno smanjuje kompleksnost uzorka jer se smjesa peptida dijeli u više frakcija jednostavnijeg sastava. Budući da se u vezanom sustav LC–MS/MS separacija peptida temelji na kromatografiji obrnutih faza, za predfrakcionaciju se koriste kromatografske metode koje su ortogonalne kromatografiji obrnutih faza, poput kromatografije ionske izmjene.

2.2. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je analitička metoda u kojoj se proučavaju ioni nastali ionizacijom atoma ili molekula i njihove interakcije i reakcije unutar instrumenta spektrometra masa. Spektrometar masa sastoji se od tri osnovna dijela: ionskog izvora, analizatora masa i detektora. U ionizacijski izvor uzorak se uvodi u čvrstom, tekućem ili plinovitom agregatnom stanju, pri čemu se uzorak prevodi u plinovito stanje i ionizira. Nastali ioni uvlače se u analizator masa gdje se razdvajaju na temelju omjera mase i naboja u prostoru ili vremenu. Na detektoru se očitava broj iona i omjer mase i naboja iona. Obradom signala na računalu dobiva se spektar masa.[4,18]

Spektrometrija masa nalazi svoju primjenu u gotovo svim područjima prirodnih znanosti uključujući kemiju, biologiju, biotehnologiju, biomedicinu, farmaceutiku i ekologiju. Otkrićem ionizacijskih tehnika poput ionizacije elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*, ESI) i matricom potpomognute ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*, MALDI) omogućena je ionizacija termolabilnih, nehlapljivih i velikih molekula. Mjerenje točne mase proteina, peptida i njihovih fragmenata tehnikama spektrometrije masa omogućuje određivanje slijeda aminokiselina i posttranslacijskih modifikacija. [4,20,19]

Koriste se dva pristupa u analizi proteina tehnikom spektrometrije masa: odozgor nadolje (engl. *top–down*) i odozdol nagore (engl. *bottom–up*). Pristup odozgor nadolje podrazumijeva analizu proteina koji se u spektrometar masa uvodi u cijelosti, bez enzimske razgradnje. Ovisno o sposobnosti spektrometra masa, odnosno točnosti izmjerene mase i razlučivosti, moguće je odrediti točnu masu intaktnog proteina ili je protein potrebno dodatno pocijepati u tandemnom spektrometru masa. Mjerenjem masa nasumičnih peptidnih fragmenata dobivaju se informacije o građi proteina. Glavne prednosti ovog pristupa su izvrsna detekcija posttranslacijskih modifikacija i određivanje cjelokupne primarne strukture proteina. Potreba za spektrometrom masa visokog razlučivanja ujedno čini i najveći nedostatak ovog pristupa. Naime, spektrometri masa visokog razlučivanja poput spektrometra masa ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju su skupi i kompleksni, zbog čega su slabo zastupljeni u znanosti i industriji.

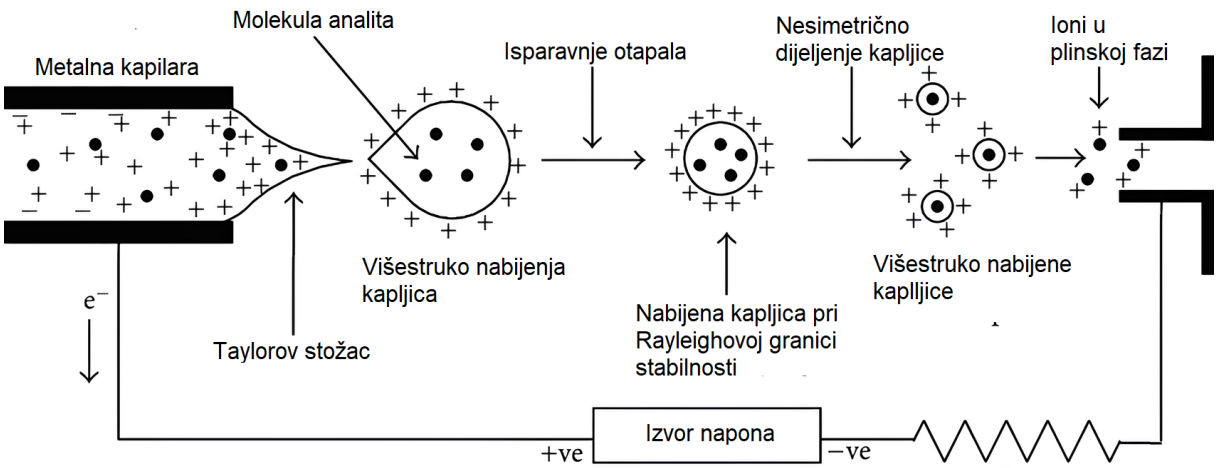
2.2.1. Ionski izvori

Kako bi se uzorci analizirali u spektrometru masa potrebno ih je prevesti u ione u plinskoj fazi. Unutarnja energija koja se prenosi na uzorak tijekom ionizacije i fizikalno–kemijska svojstva

uzorka određuju najprikladniju tehniku ionizacije. Tehnike ionizacije se najlakše mogu podijeliti po količini energije koja se prenosi na uzorak. Kod jakih tehnika ionizacije dolazi do gotovo potpune fragmentacije uzoraka, dok kod blagih tehnika ionizacije fragmentacija izostaje i nastaju samo molekulski ioni. Za analizu peptida i proteina prikladne su blage tehnike ionizacije poput ionizacije elektroraspršenjem i MALDI.

Ionizacija elektroraspršenjem je blaga tehnika ionizacije koja omogućuje ionizaciju uzorka direktno iz otopine te direktno povezivanje tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Također, ESI omogućava analizu molekula neovisno o veličini i naboju, zbog čega se koristi za analizu malih iona poput peptida i velikih makromolekula. Moguće je dodatno povećati osjetljivost tehnike koristeći mikro ili nanoelektroraspršenje, odnosno smanjenjem protoka analizirane otopine.[19,20]

Mehanizam elektroraspršenja može se opisati na sljedeći način. Otopina uzorka uvodi se u metalnu kapilaru pri atmosferskom tlaku. Na kapilaru se djeluje s jakim električnim poljem (2–3 kV), zbog kojeg dolazi do odvajanja pozitivnog i negativnog naboja u otopini. Kada je kapilara priključena na pozitivan kraj izvora napona, pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi i skupljaju se na površini otopine. Pri kritičnoj jakosti polja, na vršku kapilare, formira se Taylorov stožac u kojem se kontinuirano proizvode kapljice s pozitivno nabijenim ionima, koje pod utjecajem gradijenta potencijala i tlaka putuju prema analizatoru masa. Promjenom polariteta izvora napona moguće je proizvesti kapljice koje sadrže negativno nabijene ione. Otapalo isprava zbog utjecaja temperature i struje dušika, zbog čega se smanjuje veličina kapljice, dok naboj ostaje konstantan. Kada se sila elektrostatskog odbijanja izjednači s površinskom napetošću postiže se Rayleighova granica stabilnosti. Daljnjim otparavanjem otapala volumen kapljice se nastavlja smanjivati, pri čemu dolazi do nesimetričnog dijeljenja kapljice. Nastaju dvije vrste kapljica: velike kapljice koje nose neželjene sparene ione elektrolita i male kapljice iz kojih nastaju ioni u plinskoj fazi. Na slici 3 prikazana je shema mehanizma elektroraspršenja.[19,20]



Slika 3 Shema mehanizma elektroraspršenja, slika je preuzeta i prilagođena iz ref. 20

2.2.2. Analizatori masa

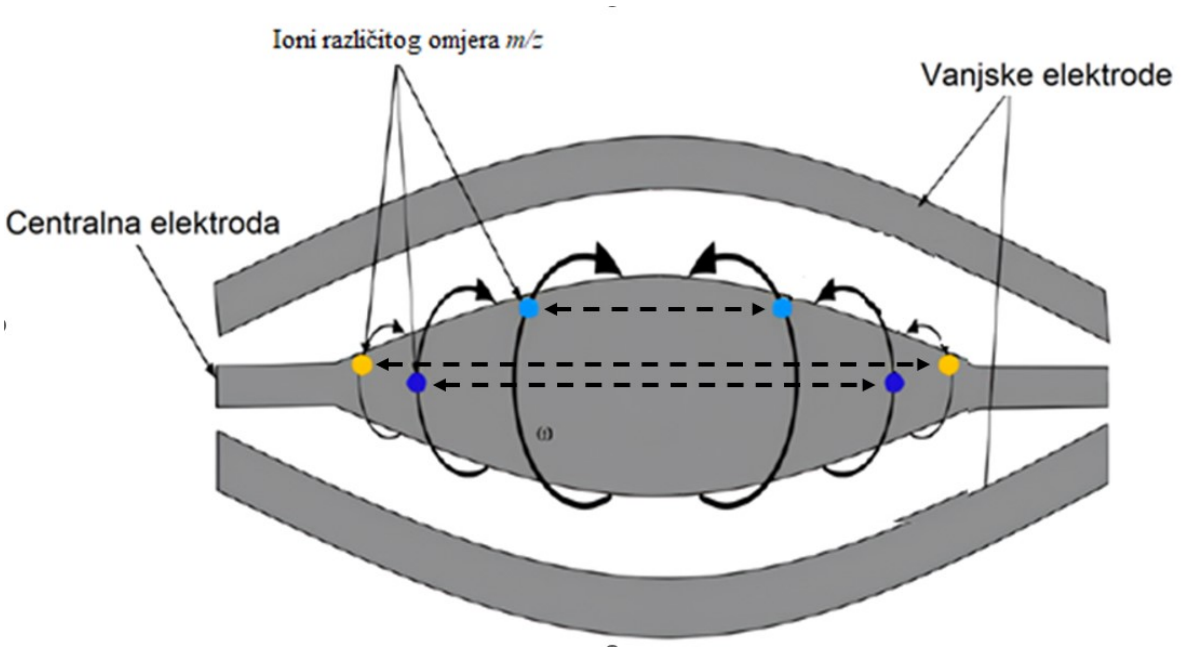
Nakon ionizacije formirani ioni dolaze do analizatora gdje se odjeljuju na temelju omjera mase i naboja *m/z*. Najčešće korišteni analizatori masu su kvadrupolni analizator masa (engl. quadrupole), ionska stupica, analizator koji mjeri vrijeme leta (engl. *Time of flight*, TOF) i orbitrap. Kvadrupolni analizator masa sastoji se od četiri cilindrične paralelene elektrode u vakuumu. Elektrode su spojene u paru te se na njih primjenjuje promjenljiv istosmjerni i izmjenični potencijal s pomakom u fazi od 180°. Ioni prolaze kroz oscilirajuće električno polje, koje propušta samo ione određenog *m/z*, odnosno ione koji se gibaju stabilnom putanjom. Odlikuje se jednostavnom konstrukcijom i održavanjem, a zbog velike brzine snimanja, kvadrupol je prikladan analizator masa u vezanim sustavima tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Najveći nedostatak kvadrupolnog analizatora masa je njegova niska rezolucija koja iznosi svega 0,3 *m/z*. [19]

Analizator masa orbitrap sastoji se od dvije vanjske elektrode te jedne centralne elektrode. U orbitrapu ioni su zarobljeni zbog elektrostatskog privlačenja između centralne elektrode i iona, pri čemu ioni kruže oko centralne elektrode. Također, ioni osciliraju aksijalno duž osi centralne elektrode, pri čemu se i razdvajaju. Frekvencija oscilacije iona opisuje se izrazom:

$$\omega = \sqrt{\frac{k \cdot z}{m}}$$

pri čemu ω odgovara frekvenciji oscilacije iona, m odgovara masi iona, z odgovara naboju iona, a k odgovara konstanti sile potencijala, odnosno konstanti opruge. Detektori na vanjskim

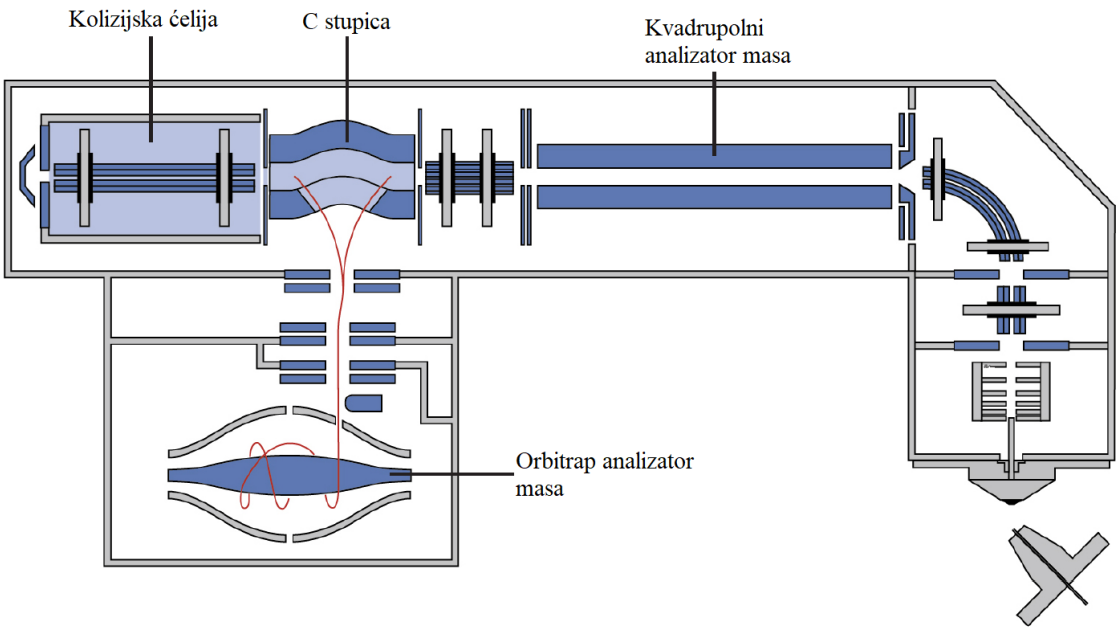
elektrodama mjere frekvencije oscilacije iona iz kojih se, koristeći Fourierove transformacije, dobivaju spektri masa visoke rezolucije. Orbitrap kao jedan od novijih analizatora masa ima više prednosti uključujući visoku osjetljivost i visoku razlučivost. Na slici 4 prikazana je shema orbitrap analizatora masa.[19,21]



Slika 4 Shema orbitrap analizatora masa, slika je preuzeta i prilagođena iz ref. 21

2.2.3. Tandemna spektrometrija masa

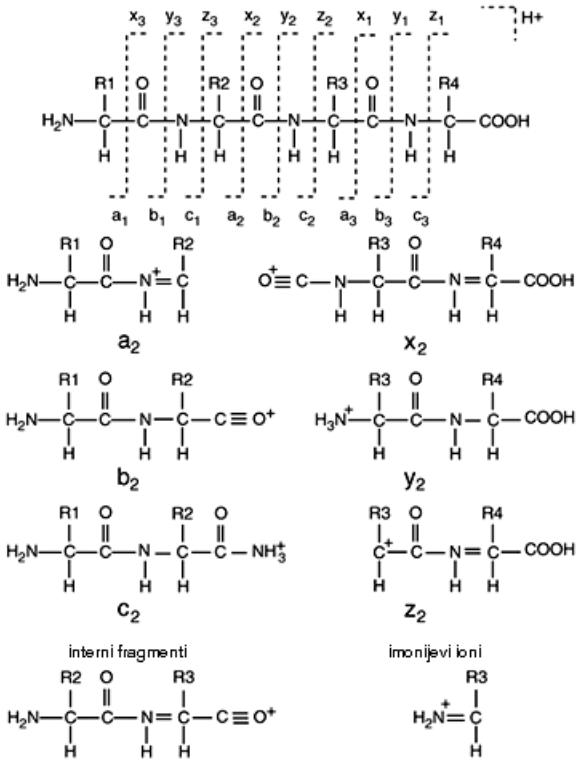
Tandemni spektrometri masa sastoje se od dva analizatora masa povezanih s kolizijskom ćelijom. Prvi analizator služi za filtriranje prekursorskih iona koji se dodatno fragmentiraju u kolizijskoj ćeliji te se nastali fragmenti analiziraju u drugom analizatoru masa. Filtriranje iona ne zahtijeva visoku razlučivost analizatora, ali zahtijeva visoku brzinu propuštanja iona, zbog čega je kvadrupol idealan prvi analizator u tandemnom spektrometru masa. Nasuprot tome, drugi analizator masa mora imati visoku razlučivost, zbog čega se koriste analizatori masa poput TOF, ionske stupice i orbitrap analizatora masa. Jedan od spektrometra masa koji se često koristi u proteomici i sadrži orbitrap analizator masa je Q Exactive (*Thermo Scientific*) (slika 5).[24-24]



Slika 5 Shema spektrometra masa Q Exactive, slika je preuzeta i prilagođena iz ref. 22

Jedna od najčešće korištenih metoda fragmentacije iona je kolizijom aktivirana disocijacija (engl. *collision induced dissociation*, CID). Temelji se na sudaru iona s inertnim plinom (helij ili argon), pri čemu dolazi do disocijacije iona i nastajanja fragmenata. Razvitkom orbitrap analizatora masa razvijena je nova metoda fragmentacije specifična za orbitrap, temeljena na CID, pod nazivom disocijacija kolizijom visoke energije (engl. *high energy collisional dissociation*, HCD). Najveća prednost HCD je značajno veća energija kolizije, koja poboljšava fragmentaciju većih iona poput peptida i proteina.[23]

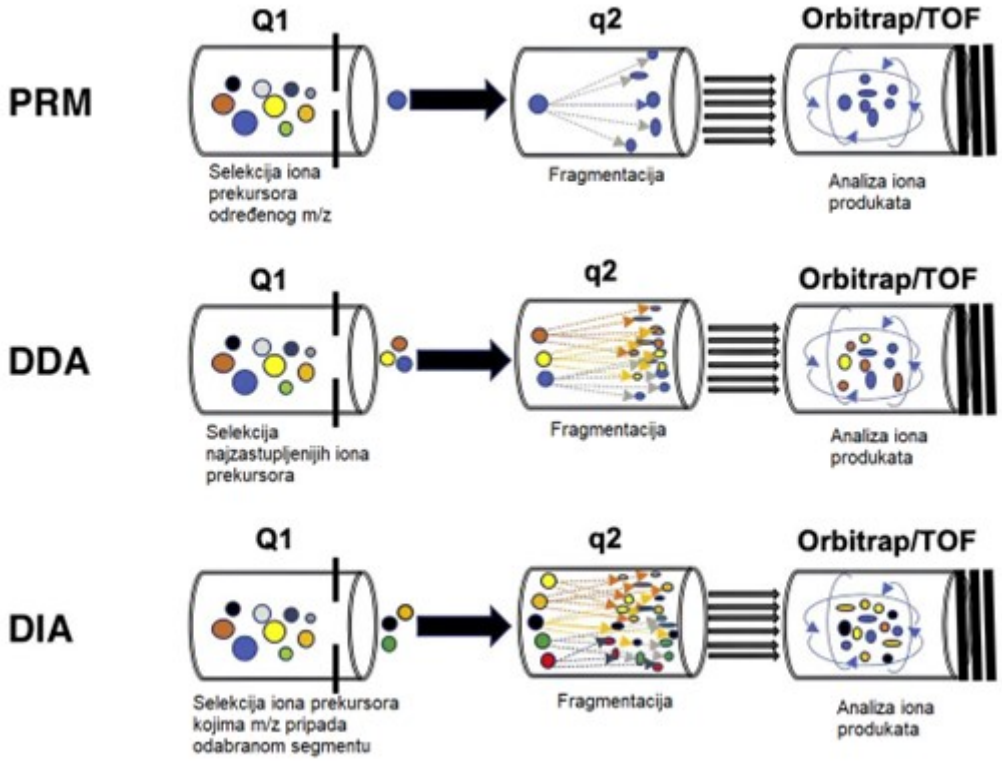
Preduvjet za identifikaciju proteina spektrometrijom masa je generiranje više serija uzastopnih iona fragmenata ili kombinacije više serija iona (a–, b–, c– i x–, y–, z– serije) u svrhu što veće pokrivenosti primarne strukture proteina. Kako bi identifikacija proteina bila točna i pouzdana, potrebno je postići gotovo idealne uvjete fragmentacije. Idealna fragmentacija peptidnih iona uključuje pucanje veza isključivo peptidne okosnice. Intenziteti iona fragmenata moraju biti reproducibilni i karakteristični za određenu strukturu i molekulski sastav. Serije peptidnih iona razlikuju se po mjestu na kojem je lokaliziran naboj. Ioni kojima je naboj na N–kraju označuju se oznakama a_n, b_n i c_n, a ioni kojima je naboj na C–kraju označuju se oznakama x_n, y_n i z_n, pri čemu n označava broj aminokiselina sadržanih u ionu (slika 6).[24]



Slika 6 Nomenklatura fragmentacije peptida, slika je preuzeta iz ref. 24

Ionizacijom peptida nastaje velik broj iona te nije moguće fragmentirati sve ione istodobno, zbog čega je potrebno odabrati ione koji će se fragmentirati. Tehnike koje se koriste za odabir iona uključuju paralelno praćenje odabranih iona (engl. *Parallel Reaction Monitoring*, PRM), odabir ovisan o podacima (engl. *Data Dependent Acquisition*, DDA) i odabir neovisan o podacima (engl. *Data Independent Acquisition*, DIA). Tehnika PRM se koristi za praćenje prethodno odabranog peptida ili skupine peptida, zbog čega se najviše koriste u ciljanoj kvantitativnoj proteomici. U tipičnom eksperimentu prvi analizator propušta samo ione koji odgovaraju odabranim peptidima. Ioni se zatim fragmentiraju u kolizijskoj ćeliji i analiziraju u drugom analizatoru. Prvi korak u tehnici DDA je snimanje cijelog spektra masa uzorka bez fragmentacije iona. Temeljem intenziteta iona na spektru masa cijelog uzorka, za fragmentaciju se odabiru najviše zastupljeni ioni. Ioni prekursori su ioni koji sudjeluju u fragmentaciji, pri čemu se iz njih dobivaju fragmentirani ioni koji se nazivaju ioni produkti. Tehnika DIA također započinje snimanjem cijelog spektra uzorka. Dobiveni spektar se podijeli na više segmenata, pri čemu segmenti mogu biti jednake ili različite širine. Segmenti se analiziraju sekvencijalno, pri čemu se fragmentiraju svi ioni prekursori kojima omjer *m/z* pripada određenom segmentu. Tehnika DDA je manje računalno zahtjevna u kasnijoj računalnoj analizi MS-spektara od

tehnike DIA, međutim tehnika DDA se fokusira na detekciju visoko zastupljenih peptida, što dovodi do zanemarivanja nisko zastupljenih peptida. S druge strane, tehnike DIA omogućuje detekciju gotovo svih peptida i samim time omogućuje identifikaciju nisko zastupljenih proteina. Međutim, istovremenom analizom velikog broja iona dobivaju se spektri masa koji se preklapaju, zbog čega ih je potrebno pojednostaviti prije nego što se koriste u pretrazi baza podataka. Na slici 7 prikazan je shema sve tri tehnike.[25,26]



Slika 7 Shema tehnika odabira iona za fragmentaciju, slika je preuzeta i prilagođena iz ref. 25

2.3. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*, LC) je analitička metoda koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju kemijskih komponenti u smjesi. Do razdvajanja dolazi uslijed različitih interakcija komponenta smjese s nepokretnom i mobilnom fazom. Tekućinska kromatografija se može podijeliti prema vrsti interakcije između analita i nepokretne faze na adsorpcijsku kromatografiju, kromatografiju ionske izmjene, kromatografiju isključenjem, afinitetnu kromatografiju i razdjelnu kromatografiju koja se još dijeli na kromatografiju normalnih faza i kromatografiju obrnutih faza.[27,28]

Moderne metode tekućinske kromtografije uključuju tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) i tekućinsku kromatografiju vrlo visoke djelotvornosti (engl. *Ultra High Perfomance Liquid Chromatography*, UHPLC). HPLC sustav sastoji se od spremnika mobilne faze, visokotlačne pumpe, injektora, kolone i detektora. Mobilna faza mora biti vrlo čista te ne smije sadržati otopljene plinove i krute čestice. Kolona je ispunjena kuglicama na koje je vezana nepokretna faza, a veličina kuglica je u rasponu od 1,8 do 5 µm. Uz kolonu, neki sustavi sadrže i pretkolonu, kojoj je svrha zaštita kolone od tvari koje mogu oštetiti ili začepiti kolonu. U tekućinskoj kromatografiji koriste se više vrsta detektora, primjerice apsorpcijski detektori i fluorimetrijski detektori. Detekcija u apsorpcijskim detektorima se temelji na mjerenju apsorpcije UV i vidljivog svijetla u mobilnoj fazi koja se po izlasku s kolone uvodi u protočnu kvarcnu ćeliju. Apsorpcijski detektor koristi volframovu i deuterijevu žarulju kao izvor zračenja, a u novije vrijeme koristi se i ksenonska žarulja. Jedan od najviše korištenih apsorpcijskih detektora je detektor s nizom fotodioda (engl. *Diode Array Detector,* DAD) koji omogućava skeniranje cijelog UV spektra analita. Fluorimetrijski detektori prikladni su za detekciju analita koji fluoresciraju, pri čemu su 1000 puta osjetljivi od apsorpcijskih detektora. U fluorimetrijskom detektoru izvor zračenja može biti živina lampa ili ksenonov luk.[27,28]

2.3.1. Kromatografija ionske izmjene

Kromatografija ionske izmjeni koristi se za razdvajanje anorganskih iona i nabijenih organskih molekula, poput organskih kiselina, aminokiselina, peptida i proteina. U kromatografiji ionske izmjene razdvajanje se temelji na reverzibilnoj adsorpciji nabijenih otopljenih molekula na funkcionalne skupine nepokretne faze suprotnog naboja. Ovisno o korištenoj nepokretnoj fazi, kromatografija ionske izmjene dijeli se na kationsku ionsku izmjenu i anionsku ionsku izmjenu. Nadalje, nepokretne faze se dijele na jake i slabe, ovisno o kapacitetu vezanja iona. U jakoj kationskoj ionskoj izmjeni koriste se izmjenjivači poput sulfonatnih i karboksilatnih izmjenjivača, a u slaboj kationskoj izmjeni izmjenjivači sadrže karboksimetilcelulozu ili dekstran-sulfat. Vrijeme zadržavanja analita na koloni ponajviše ovisi o sastavu mobilne faze, točnije o koncentraciji soli i pH mobilne faze.[28-30]

2.3.2. Razdjelna kromatografija

Razdjelna kromatografija se temelji na različitoj topljivosti molekula analita u mobilnoj i nepokretnoj fazi. Ovisno o polarnosti nepokotrene faze, razdjelna kromatografija se dijeli na kromatografiju normalnu fazu i kromatografiju obrnutih faza. U kromatografiji normalnih faza, mobilna faza je manje polarna od nepokretne faze pa se tako kao mobilna faza koriste organska otapala. Kao nepokretna faza može se koristi silikagel ili se polarna tekućina (voda, trietilenglikol) imobilizira fizičkom adsorpcijom na čvrsti nosač od silikagela ili aluminijeva oksida.

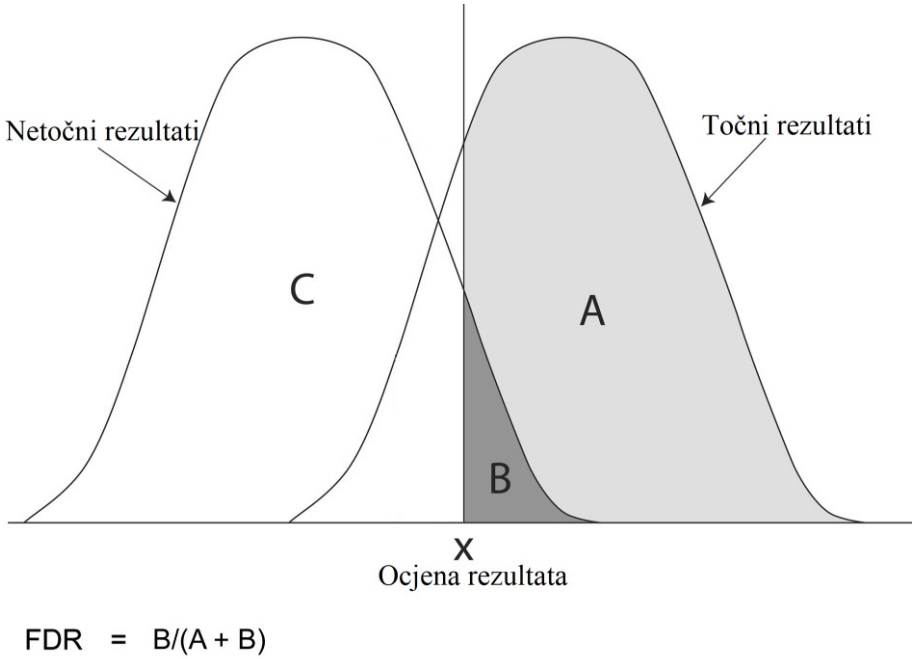
U kromatografiji obrnutih faza, nepokretna fazu čine lanci ugljikovodika poput C_8 i C_{18} koji su kemijski vezani na silikagel koji djeluje kao nosač. Mobilnu fazu čine dvije otopine, A i B, pri čemu je otopina A vodena otopina, a otopina B sadrži organska otapala. Tijekom razvoja kromatografije obrnutih faza, tri najviše korištena organska otapala bila su acetonitril, metanol i tetrahidrofuran, no zbog toksičnosti tetrahidrofuran se više ne koristi. Od preostalih, acetonitril imaju najveću elucijsku moć te zbog niske viskoznosti postiže visoku učinkovitost razdvajanja na koloni. Kako bi se povećala učinkovitost miješanja otopine B i otopine A, često otopina B sadrži vodu pa je tako najčešće sastav otopine B 80% ili 90%–tni acetonitril u vodi. Otopina A može biti čista voda, ali može i sadržavati male količine pufera i soli koji kontroliraju pH i ionsku jakost otopine. Dodatkom kiseline postiže se niski pH koji suzbija ionizaciju slabih kiselina, čime produljuje vrijeme zadržavanja, i suzbija se ionizacija rezidualnih silanolnih skupina na koje se mogu vezati polarni spojevi. Razvojem metoda koje su kompatibilne s spektrometrijom masa, razvila se potreba za hlapljivim puferima. U tu svrhu su korišteni puferi amonijevih soli hlapljivih kiselina, od kojih se najviše koristi pufer amonijeva formijata i mravlje kiseline.[31]

2.4. Bioinformatička analiza i identifikacija peptida

Podatci dobiveni analizom peptida u spektrometru masa prikazuju se na kromatogramu, gdje pikovi odgovaraju omjeru mase i naboja detektiranih iona, a visina pika odgovara relativnom intenzitetu signala. U svrhu identifikacije peptida koriste se dva pristupa, pretraživanje baze podataka i sekvenciranje peptida *de novo*. Pristup *de novo* sekvenciranja peptida koristi se kada nije moguće identificirati protein pretraživanjem baza podataka. Peptidi se identificiraju interpretacijom spektra fragmentiranih peptida koristeći programe poput MASCOT, PEAKS i PepNovo. Baze podataka sadrže teoretske spektre cjelovitih i fragmentiranih peptida, dobivenih digestijom proteina *in silico*, koji se uspoređuju s eksperimentalno dobivenim spektrima peptida

i spektrima fragmentiranih peptida, čime se identificiraju peptidi. Baze podataka pretražuju se koristeći programe poput *Sequest*, MS Amanda, Andromeda i PEAKS DB.[32-35]

Svaki od navedenih programa koristi drugu strategiju za pretraživanje baza podataka, no najviše se razlikuju u funkciji bodovanja kojom se određuje pouzdanost preklapanja između eksperimentalno dobivenih spektara i spektara u bazama podataka. Program pronalazi spektar u bazi podataka koji odgovara eksperimentalno dobivenom spektru fragmentiranog peptida, što se naziva *Peptide Spectrum Match* (PSM). Nadalje, računa se p vrijednost PSM–a koja odgovara vjerojatnosti da je preklapanje spektara nasumično. Ali, p vrijednost nije dovoljna za procjenu pouzdanosti rezultata, zbog čega programi koriste funkcije bodovanja. Funkcije bodovanja svakom PSM–u pridodaju ocjenu pouzdanosti, no nisu svi PSM–ovi s visokom ocjenom točni. Zbog čega ih je potrebno validirati, točnije postaviti graničnu vrijednost za odbacivanje rezultata. *False Discovery Rate* (FDR) predstavlja količinu lažno pozitivnih rezultata u svim dobivenim rezultatima. Drugim riječima, FDR vrijednost jednaka je omjeru broja lažno pozitivnih rezultata s ocjenom većom od granične vrijednosti i broja svih rezultata s ocjenom većom od granične vrijednosti. (slika 8).[36-38]



Slika 8 Prikaz rezultata i granične vrijednosti (X), pri čemu A predstavlja sve točne rezultate s ocjenom višom od granične vrijednosti, B predstavlja sve netočne rezultate s ocjenom višom od granične vrijednosti, a C predstavlja sve rezultate s ocjenom nižom od granične vrijednosti. Slika je preuzeta i prilagođena iz ref. 38

Zadaća validacijskog koraka je odrediti prag prema kojem će se odbacivati krivi rezultati, odnosno prihvaćati točni rezultati. Pri odabiru granične p vrijednosti cilj je maksimizirati količinu točnih rezultata i minimizirati količinu lažnih pozitiva. Za određivanje granične vrijednosti koriste se različite tehnike i algoritmi uključujući empirijski odabir granične vrijednosti, tehniku ciljnog peptida i lažnog peptida (engl. *Target Decoy validation*, TD) i algoritam *Percolator*. Kada se granična vrijednost određuje empirijski radi se o validaciji fiksne vrijednosti (engl. *Fixed value validation*). Empirijski izračun granične vrijednosti zahtjeva izračun p vrijednosti koji se temelji na funkciji bodovanja koju koristi program, na primjer funkcija XCorr koju koristi *Sequest*, zbog čega je izračun računalno zahtjevan. Stoga se empirijsko određivanje granične vrijednosti koristi samo u slučajevima kada uzorak sadrži mali broj proteina ili kada je baza podataka koja se pretražuje vrlo mala ili kada je snimljen mali broj spektara.

Pojam ciljni peptidi odnosi se na peptide koje se mogu pronaći u bazama podataka i odgovaraju proteinima u uzorku, dok se pojam lažni peptidi odnosi na peptide koje program stvara te se ti peptidi ne nalaze u uzorku. Prvi korak TD metode je sastavljanje liste lažnih peptida. Lažni peptidi moraju imati sličnu raspodjelu aminokiselina kao i ciljni peptidi, sličnu raspodjelu duljina peptida kao i ciljni peptida, sličnu količinu peptida te nijedan lažni peptid ne smije odgovarati ciljnom peptidu. Lista lažnih peptida dobiva se na više načina uključujući izokretanje aminokiselinskog slijeda ciljnih peptida, miješanje aminokiselinskog slijeda ciljnih peptida i stvaranje nasumičnih peptida. U sljedećem koraku program za pretraživanje koristi listu ciljnih peptida i listu lažnih peptida u analizi te se usporedbom rezultata dolazi do praga FDR–a.[36-38]

Cilj algoritma *Percolator* je rangirati skup potencijalnih PSM-ova kako bi maksimizirao broj identificiranih peptida za odabrani FDR. *Percolator* koristi polu–nadzirano strojno učenje (engl. *semi–supervised machine learning*) za razlikovanje točnih i lažnih identifikacija. U prvom koraku prikupljeni spektri analiziraju se dva puta, tipično koristeći program *Sequest*, jednom koristeći nepromijenjenu bazu podataka, a drugi put koristeći bazu podataka dobivenu izokretanjem ili miješanjem originalne baze podataka. Rezultati se boduju prema XCorr funkciji, pri čemu se visoko bodovani PSM–ovi koriste za učenje algoritma. PSM–ovi iz nepromijenjene baze podataka koriste se kao pozitivan poticaji, a PSM–ovi iz promijenjene baze podataka koriste se kao negativni poticaniji za učenje algoritma. Nakon više iteracija, algoritam se koristi za rangiranje svih PSM-ova, čime se povećava pouzdanost identifikacija.[39]

2.5. Zanimljive aminoacil–tRNA–sintetaze

Aminoacil–tRNA–sintetaze (aaRS) su enzimi koji kataliziraju specifičnu aminoacilaciju tRNA, nakon čega aminoacilirana tRNA sudjeluje u reakciji biosinteze proteina. Uz primarnu ulogu u aminoacilaciji tRNA, neke aaRS sudjeluju u procesima koji nisu direktno povezani s biosintezom proteina. Proučavanjem genoma više organizama uočeno je da uz gene koji kodiraju za aaRS, postoje i geni koji kodiraju za proteine koji su slični aaRS. Prvi primjer su bakterije *Agrobacterium fabrum*, *Bacillus thuringiensis* i *Bradyrhizobium diazoefficiens* koje u genomu sadrže gene koji kodiraju za homologe SerRS. Ovi homolozi SerRS su skraćeni te ne sadrže tRNA–vezujuću domenu, zbog čega nisu u sposobnosti vršiti primarnu ulogu aaRS. Međutim, skraćene SerRS kataliziraju reakciju aktivacije određenih aminokiselina te njihov prijenos na fosfopanteteinsku protetičku skupinu koja je kovalentno vezana na protein nosač. Nadalje, geni koji kodiraju za te hipotetske proteine nosače pokazuju veliki stupanj sintenije s genima za skraćene SerRS. Genom *A. fabrum* sadrži jedan takav klaster proteina–nosača i homologa SerRS, pri čemu se u klasteru nalaze i geni koji kodiraju za acil–CoA dehidrogenazu, β–manozidazu i hipotetski protein. Genom *B. diazoefficiens* sadrži dva klastera proteina–nosača i homologa SerRS, pri čemu se u prvom klasteru nalaze i geni koji kodiraju za acil–CoA dehidrogenazu i dva hipotetska proteina, a u drugom klasteru se nalaze geni koji kodiraju za acil–CoA dehidrogenazu, *O*–acetilhomoserin sulfhidralazu i homoserin *O*–sukciniltransferazu. Klasteri u genomima *B. thuringiensis* 4AJ1 i 4CC1 sadrže samo gene za proteine–nosače i homolog SerRS, pri čemu genom soja 4AJ1 sadrži dva klastera, a genom soja 4CC1 sadrži jedan klaster.[41,41]

Sljedeći primjer su bakterije *Herpetosiphon aurantiacus* i *Herpetosiphon geysericola*. *H. aurantiacus* i *H. geysericola* su predatorske bakterije, odnosno hrane su drugim bakterijama. Pretpostavljeno je da se hrane strategijom 'vučjeg čopora' u kojoj više predatorskih bakterija okruži plijen te izlučuju hidrolitičke enzime koji razgrađuju plijen. *H. aurantiacus* i *H. geysericola* u svojim genomima sadrže duplikate gena koji kodiraju za ArgRS, CysRS i ProRS. Aminoacil–tRNA–sintetaze kodirane dupliciranim genima razlikuju se od bakterijskih aaRS u motivima u aktivnom mjestu, a ProRS kodirana dupliciranim genom nema domenu za popravak. Alanin ima manji bočni ogranak od prolina, zbog čega lagano ulazi u aktivno mjesto ProRS te ostvaruje interakcije s enzimom. Posljedično, ProRS sadrži domenu za popravak koja djeluje prije prijenosa aminokiseline na tRNA i poslije prijenosa aminokiseline na tRNA.

Domena za popravak može hidrolizirati Ala–AMP i brzo deacilirati Ala–$tRNA^{Pro}$. Zbog čega je za očekivati da će razina ekspresije ProRS bez domene za popravak biti niska.[42-45]

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

2-(*N*–Morfolino)etansulfonska kiselina (MES) (*Sigma*), acetonitril (*Merck*), amonijev hidrogenkarbonat (NH_4HCO_3) (*Sigma*), amonijev formijat (NH_4HCO_2) (*Carlo Erba reagents*), *Coomassie Brilliant Blue G–250* (*Merck*), ditiotreitol (DTT) (*AppliChem*), etanol (*Gram–mol*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Kemika*), fosforna kiselina (H_3PO_4) (*T.T.T.*) jodoacetamid (*AppliChem*), kloroform (*Carlo Erba reagents*), metanol (*Gram–mol*), metanska kiselina (HCOOH) (*Honeywell*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (Sigma), natrijev hidroksid (*Kemika*), *Pierce™ LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution* (*Thermo Scientific*), tiourea ($SC(NH_2)_2$) (*Kemika*), trifluoroctena kiselina (CF_3COOH) (*Honeywell*), Tris(hidroksimetil)-aminometan (TRIS) (*Sigma*), urea ($CO(NH_2)_2$) (*Kemika*).

Sve standardne kemikalije bile su razine čistoće *pro analysis* ili bolje, pri čemu su otapala korištena za frakcionaciju bila najviše dostupne čistoće. Otapala korištena u sustavu nanoLC–MS/MS bila su razine čistoće LC/MS razreda ili najviše dostupne čistoće.

3.1.2. Enzimi i proteini

Albumin goveđeg seruma (BSA), hemoglobin, leucil–tRNA–sintetaza (LeuRS), mioglobin, seril–tRNA–sintetaza (SerRS), tripsin (*Promega*)

3.1.3. Bakterije i stanične linije

Agrobacterium fabrum, Bradyrhizobium diazoefficiens, Bacillus thuringiensis 4AJ1, *Bacillus thuringiensis* 4CC1, HeLa–stanice, *Herpetosiphon aurantiacus*, *Herpetosiphon geysericola*, ljudske embrionalne bubrežne stanice (engl. *Human embryonic kidney cells*, HEK).

3.1.4. Uređaji

Centrifuga *Micro star 17R* (*VWR*), elektronska vaga (*A&D*), magnetska miješalica *Cimarec+* (*Thermo Scientific*), pH metar *Five Easy* (*Mettler Toledo*), sonikator *Vibra cell* (*Bioblock Scientific*), spektrometar masa *Q Exactive Plus* (*Thermo Scientific*), spektrofotometar *Evolution*

60S (*Thermo Scientific*), uređaj za tekućinsku kromatografiju *EASY-nLC 1200* (*Thermo Scientific*), uređaj za tekućinsku kromatografiju vrlo visoke učinkovitosti (UHPLC) *1290 Infinity II* (*Agilent*), uređaj za uparavanje *DNA 120 SpeedVac* (*Thermo Scientific*), uređaj za vorteksiranje *Vortex genie 2* (*Scientific Industries*).

3.1.5. Kromatografske kolone i filteri

Filtracijski sustav *Sartorius,* filteri od celuloza–acetata (0,22 µm), kationsko–izmjenjivačka kolona za ionsku izmjenu *BioResolve SCX mAb* 3 µm (*Waters*), kolona za ekstrakciju na čvrstoj fazi *Empore C18* (*Thermo Scientific*), kolona za kromatografiju obrnutih faza *Acclaim PepMap 100 C18* 3 µm (*Thermo Scientific*), kolona za kromatografiju obrnutih faza *PepMap RSLC C18* 2 µm (*Thermo Scientific*).

3.2. Metode

3.2.1. Liza stanica sonikacijom pri denaturirajućim uvjetima

Stanice su razorene u dva koraka. Prvo su podvrgnute sonikaciji 4 puta po 30 sekundi, nakon čega su proteini denaturirani u otopini 1%-tnog natrijevog dodecil sulfata (SDS) i etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA) koncentracije 10 mmol dm^{-3}.

3.2.2. Taloženje proteina metanolom i kloroformom

Proteini su izolirani precipitacijom s metanolom i kloroformom. Korištena metoda se temelji na separaciji vodene faze koju čini voda, i organske faze koju čine kloroform i metanol. Proteini se zadržavaju na granici faza zbog hidrofilnih i hidrofobnih interakcija pri čemu precipitiraju. Ovim postupkom proteini se odvajaju od soli i ostalih nečistoća koje su nepoželjne ili bi mogle interferirati s razgradnjom proteina tripsinom, te analizom na MS-u.

U alikvot staničnog lizata dodan je jednak volumen kloroforma, četverostruki volumen metanola i trostruki volumen ultračiste vode. Otopina je vorteksirana, nakon čega je centrifugirana 5 minuta na 16 000 × g pri sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, vodena i organska faze su uklonjene, a precipitat proteina je osušen pod vakuumom u uređaju *SpeedVac* unutar 30 minuta. Zatim su proteini otopljeni u puferu za denaturaciju (10 mmol dm^{-3} Tris (pH = 8,0), 6 mol dm^{-3} $CO(NH_2)_2$, 2 mol dm^{-3} $SC(NH_2)_2$). Početni volumen staničnog lizata je najčešće iznosio 100 µL.

3.2.3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu. Metoda se temelji na vezanju boje *Coomassie Brilliant Blue G–250* na polipeptide u kiselim uvjetima pri čemu dolazi do promjene apsorpcijskog maksimuma boje s valne duljine od 465 nm na 595 nm. Za konstrukciju baždarnog pravca pripremljeno je 7 kiveta u koje je redom dodano 0, 1, 2, 3, 5, 9, 12 μg BSA te je u svaku kivetu dodano po 1 mL Bradfordovog reagensa (50 mg dm^{-3} *Coomassie Blue G-250*, φ = 5% metanol, φ = 8,5% H_3PO_4). Istovremeno su pripremljene i otopine proteina kojima se određivala koncentracija tako da je 1 μL 10 × razrijeđene otopine proteina dodan 1 mL Bradfordovog reagensa. Spektrofotometar je anuliran standardnom otopinom koja sadrži 0 mg BSA, nakon čega je mjerena apsorbancija pri 595 nm, konstruiran baždarni dijagram iz kojeg se linearnom regresijom odredila koncentracija proteina.

3.2.4. Razgradnja proteina tripsinom

Korištene su dvije metode triptičke digestije proteina s različitom udjelima redukcijskog i alkilacijskog reagensa. Alikvot otopine proteina razrijeđen je u puferu za denaturaciju do koncentracije od 2 μg μL^{-1}. Zatim je u otopinu dodan redukcijski reagens (1 mol dm^{-3} ditiotreitol (DTT), 50 mmol dm^{-3} NH_4HCO_3) do konačne koncentracije DTT–a od 1 mmol dm^{-3}. Otopina je inkubirana u termobloku 1 sat pri sobnoj temperaturi uz potresanje brzinom od 850 okretaja u minuti. Nakon inkubacije u otopinu je dodan alkilacijski reagens (550 mmol dm^{-3} jodoacetamid (IAA), 50 mmol dm^{-3} NH_4HCO_3) do konačne koncentracije IAA od 5,5 mmol dm^{-3}. Zatim je otopina ponovno inkubirana u termobloku 1 sat pri sobnoj temperaturi uz potresanje brzinom od 850 okretaja u minuti. U drugoj metodi digestije konačna koncentracija DTT–a iznosila je 5 mmol dm^{-3}, a konačna koncentracija IAA iznosila je 16,5 mmol dm^{-3}.

Nakon inkubacije otopina je razrijeđena s 4 volumena amonijeva hidrogenkarbonata koncentracije 20 mmol dm^{-3}. Zatim je u otopinu dodan 1 μg tripsina po 50 μg proteina, i smjesa je inkubirana u termobloku preko noći pri sobnoj temperaturi uz brzinu potresanja od 850 okretaja u minuti. Sljedeće jutro u otopinu je dodan 1 μg tripsina po 100 μg proteina, nakon čega je otopina inkubirana još nekoliko sati. Reakcija je zaustavljena dodatkom trifluoroctene kiseline do konačne koncentracije od 1%. Tipično je razgradnji tripsinom podvrgnuto 100 μg proteina.

3.2.5. Pročišćavanje proteinskih digesta

Nakon zaustavljanja reakcije digestije, peptidi su pročišćeni na *StageTip*–u. Za pročišćavanje je korištena kolona za ekstrakcija na čvrstoj fazi koja je prvo aktivirana propuštanjem 2 × 100 µL metanola. Zatim je napravljena ekvilibracija kolone propuštanjem 2 × 200 µL mobilne faze C* (2% acetonitril, 1% HCOOH), nakon čega je na kolonu nanesena otopina peptida. Zatim je kolona isprana propuštanjem 2 × 200 µL mobilne faze C (0,1% HCOOH), nakon čega su peptidi eluirani propuštanjem 120 µL mobilne faze D (80% acetonitril, 0,1% HCOOH). Prikupljeni eluat bio je osušen pod vakuumom u uređaju *SpeedVac* do konačnog volumena od 5 µL unutar 15 minuta. Nakon uparavanja otopina je razrijeđena s mobilnom fazom A (20 mmol dm^{-3} NH_4HCOO, 0,1% HCOOH) do željene koncentracije. Tijekom optimizacije sastav mobilne faze A je modificiran pa je tako osim navedenog sastava korištena mobilna faza koja sadrži 20 mmol dm^{-3} NH_4HCOO, 0,5% HCOOH

3.2.6. Frakcionacija peptida

Peptidi su frakcionirani na temelju kromatografije jake kationske izmjene koristeći uređaj za tekućinsku kromatografiju vrlo visoke učinkovitosti (UHPLC). Prije same frakcionacije, mobilne faze su filtrirane i degazirane korištenjem sustava za filtraciju *Sartorius*, a uzorak peptida je centrifugirana 5 do 15 minuta pri 16 000 × g radi uklanjanja sitnih čestica i netopivih nečistoća. Kolona *BioResolve SCX mAb* 3 µm (*Waters*) ekvilibrirana je propuštanjem 10 volumena kolone mobilne faze A, nakon čega su peptidi injektirani u sustav. Peptidi su eluirani mobilnom fazom B (500 mmol dm^{-3} NH_4HCOO, 0,5% HCOOH). Tijekom optimizacije modificiran je udio mravlje kiseline u mobilnoj fazi B pa je tako korištena i mobilna faza koja sadrži 500 mmol dm^{-3} NH_4HCOO, 0,25% HCOOH. Peptidi su detektirani na temelju fluorescencije triptofana, koristeći fluorimetrijski detektor s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm.

Korišten je protok od 0,3 mL min^{-1} te je korištena gradijentna elucija. Frakcionacija je trajala 10 minuta pri čemu je svaka frakcija skupljana 1 minutu. Obično je skupljano po 9 frakcija, no kroz optimizaciju je broj prikupljenih frakcija povećan na 16. Kada je skupljano 16 frakcija, prva i zadnja frakcija su skupljane u periodu od jedne minute, dok su ostale frakcije skupljane u periodu od 30 sekundi. Skupljene frakcije su osušene pod vakuumom u uređaju *SpeedVac* unutar 2 sata. Nakon uparavanja frakcije su otopljene u otopini 0,18%–tne mravlje

kiseline i 0,18%–tnog acetonitrila. Kolona je skladištena u puferu sastava: 20% metanol, 40 mmol dm^{-3} MES, NaOH (pH = 6,0).

3.2.7. Analiza peptida na nanoLC–MS/MS

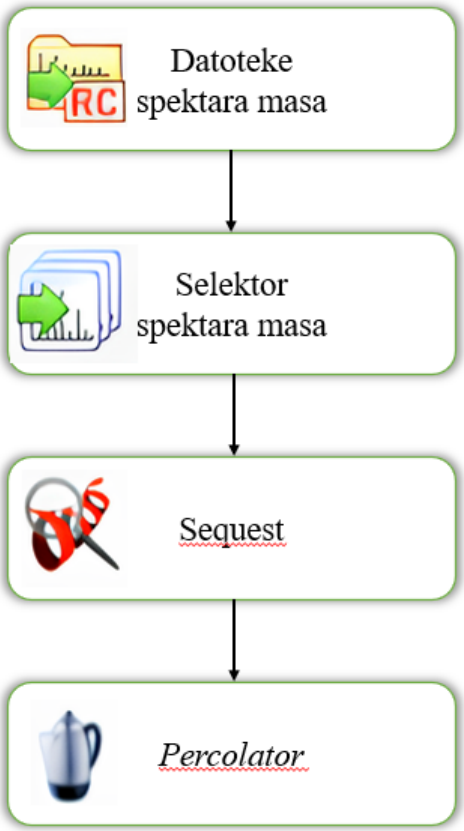
Peptidi su razdvojeni na temelju kromatografije obrnutih faza koristeći pretkolonu *Acclaim PepMap 100 C18* 3 µm (*Thermo Scientific*) i kolonu *PepMap RSLC C18* 2 µm (*Thermo Scientific*). Prije injektiranja u sustav, uzorak peptida bio je centrifugirana 5 do 15 minuta pri 16 000 × g. Za ekvilibraciju kolona korišten je mobilna faza C (0,1% HCOOH), nakon čega su peptidi injektirani u sustav. Peptidi su eluirani u gradijentu mobilne faze D (80% acetonitril, 0,1% HCOOH), pri čemu je korišten protok od 200 nL min^{-1} te je gradijent elucije prikazan u tablici 1. Separacija peptida kromatografijom obrnutih faza trajala je jedan sat, no kroz optimizaciju vrijeme trajanja kromatografije se mijenjalo. NanoLC bio je povezan na spektrometar masa s međuspojem za ionizaciju elektroraspršenjem (1,8 kV). Ioni su odabrani za fragmentiranje na temelju DDA tehnike te su bili fragmentirani tehnikom disocijacije kolizijom visoke energije.

Tablica 1 Gradijent elucije peptida korišten u analizi vezanim sustavom nanoLC–MS/MS

***t* / min**	**Udio pufera D / %**
0	5
4	10
37	25
44	40
48,5	100
60	100

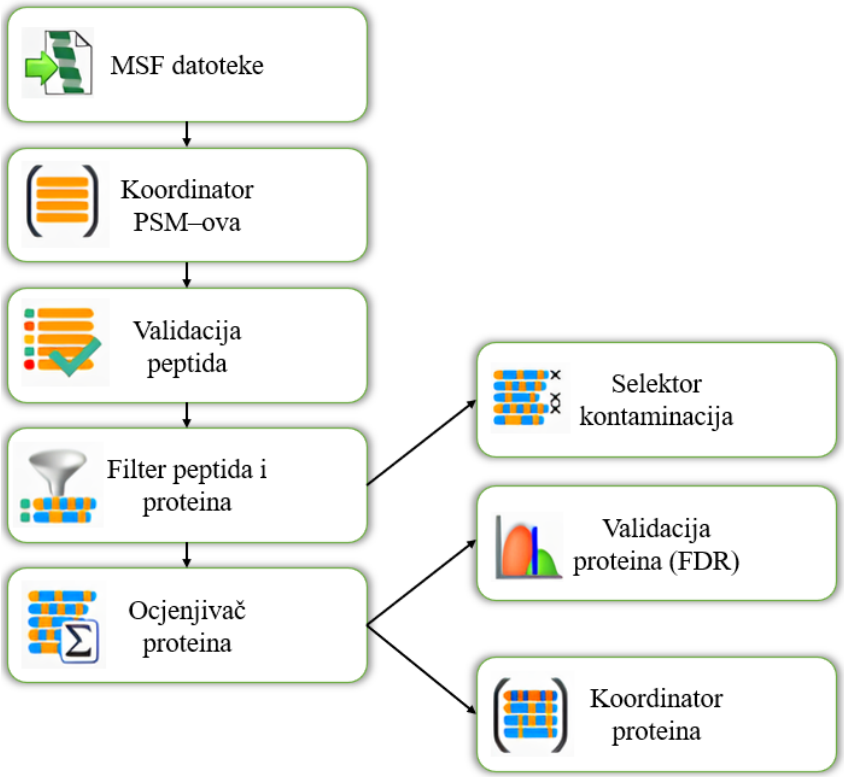
3.2.8. Obrada podataka

Dobiveni spektri masa obrađeni su u programu *Proteome Discoverer 2.4.* Na slici 9 prikazan je slijed čvorova korištenih za procesiranje spektara masa.



Slika 9 Shema slijeda čvorova korištenih za procesiranje spektara masa

Čvor datoteka spektara korišten je se za odabir spektara masa koji su dalje poslani nizvodno u slijed čvorova. Ovaj čvor sadrži i korak rekalibracije rezultata, pri čemu se algoritam *Sequest* koristi za preliminarnu pretragu baza podataka. Preliminarnom pretragom identificiraju se PSM–ovi visoke pouzdanosti. Čvor selektor spektara masa korišten je za odabir spektara iz baza podataka na temelju unesenih podataka poput vrste analizatora masa, tehnike fragmentacije i naboja iona. Čvor *Sequest* korišten je za pretragu baza podataka algoritmom *Sequest*, a čvor *Percolator* korišten je za validaciju podataka. Na slici 10 prikazan je slijed čvorova korišten za obrada rezultata dobivenih procesiranjem.



Slika 10 Shema slijeda čvorova za obradu rezultata dobivenih procesiranjem

Čvor MSF datoteke korišten je za odabir datoteka koje su poslane nizvodno u slijed čvorova za obradu rezultata dobivenih procesiranjem. Čvor koordinator PSM–ova korišten je za grupiranje PSM–ova u grupe koje dijele istu aminokiselinsku sekvencu. Nadalje, čvor validacija peptida korišten je za procjenu pouzdanosti PSM–ova i peptida na temelju vrijednosti dobivenih koristeći algoritam *Percolator* i odabrane FDR vrijednosti. Koristeći čvor filter peptida i proteina iz rezultata su odbačeni svi PSM–ovi kojima je pouzdanost bila niža od zadane. Također, čvor je korišten za odbacivanje proteina i peptida koji nisu zadovoljavali specifične kriterije poput duljine peptida ili proteina. Čvor ocjenjivač proteina korišten je za određivanje pouzdanosti identifikacije proteina zbrajanjem bodova koji odgovaraju pouzdanosti individualnih peptida. Čvor koordinator proteina korišten je za grupiranje proteina na temelju specifične aminokiselinske sekvence proteina. Čvor validacija proteina korišten je za procjenu broja lažno identificiranih proteina među svim identificiranim proteinima, a čvor selektor kontaminacija korišten je za pretragu bazu podataka kontaminacija, pri čemu su u rezultatima proteini koji odgovaraju kontaminacijama označeni.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod u rezultate

U svrhu optimizacije metode izabrani su proteomi različite složenosti, pri čemu je proteom iz *E. coli* predstavljao jednostavan proteom, dok su proteomi iz staničnih kultura HEK i HeLa predstavljali složene proteome. Uz optimizaciju, metoda je korištena za analizu proteoma iz bakterija *A. fabrum*, *B. diazoefficiens*, *B. thuringiensis*, *H. aurantiacus i H. geysericola*. Optimizacija metode je rađena u više ciklusa. Ciklus se sastojao od lize stanica, denaturacije i izolacije proteina, nakon čega im je određena koncentracija. Zatim su proteini podvrgnuti razgradnji tripsinom, nakon koje su pročišćeni na tzv. StageTip–ovima. Zbog kontrole kvalitete, dio pročišćenih peptida bio je analiziran sustavom nanoLC–MS/MS bez prethodne frakcionacije, a ostatak je frakcioniran korištenjem uređaja UHPLC. Optimizacija je bila usredotočena na korak frakcionacije peptida, pri čemu su modificirani gradijent elucije, sastav mobilne faze i broj prikupljenih frakcija. Također je optimizirano vrijeme trajanja kromatografije tijekom analize vezanim sustavom nanoLC–MS/MS.

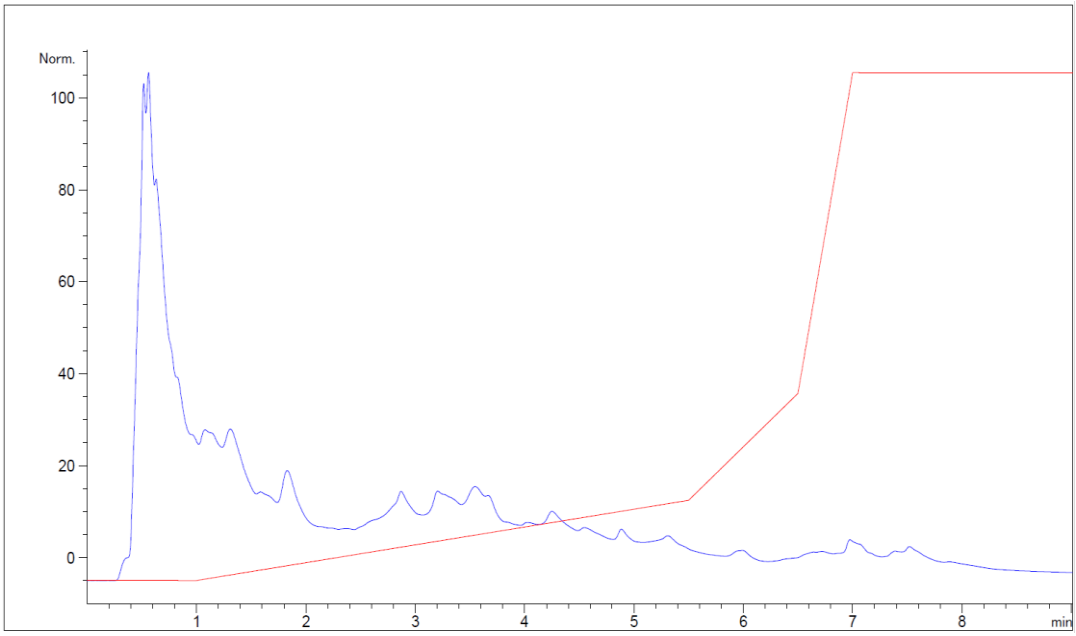
Cilj koraka frakcionacije bio je raspodjela složene smjese peptida u frakcije podjednake količine peptida, pri čemu su tijekom frakcionacije peptidi praćeni mjerenjem fluorescencije triptofana. Peptidi su praćeni fluorescencijom triptofana jer je specifična za peptide te ima visoku osjetljivost i dinamički raspon. Udio peptida u frakcijama je također praćen integracijom kromatograma dobivenim analizom frakcije sustavom nanoLC–MS/MS. Broj identificiranih proteina, jedinstvenih peptida i PSM–ova dobivene su procesiranjem podataka dobivenim analizom pomoću sustava nanoLC–MS/MS koristeći program Proteome Discoverer 2.4. Kroz rezultate broj identificiranih proteina i peptida prikazani su relativno, prema ukupnom broju identificiranih proteina i peptida.

4.2. Optimizacija gradijenta kromatografije jake kationske izmjene

Optimizacija je započeta analizom proteoma *E. coli*, pri čemu je korišten gradijent SCX 01 (tablica 2). Na slici 11 prikazan je kromatogram frakcionacije peptida iz *E. coli*.

Tablica 2 Gradijent SCX 01

t / min	Udio B / %
0	0
1	5
6,5	20
7,5	40
8	100
9	100



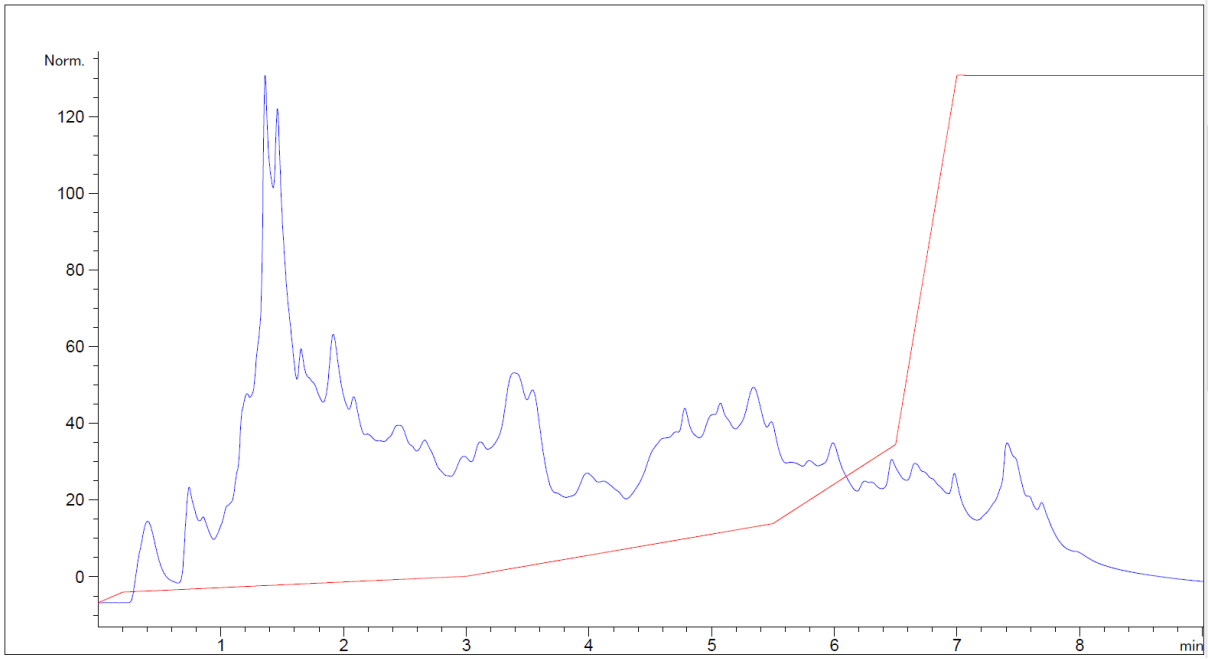
Slika 11 Kromatogram frakcionacije peptida iz *E. coli* gradijentom SCX 01 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

Na kromatogramu se može vidjeti da su gotovo svi peptidi eluirani u prvoj i drugoj frakciji, unatoč tome broj identificiranih peptida povećao se za 38%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 87%, a broj PSM–ova povećao se za 273% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije.

Sljedeći gradijent je imao blaži nagib na početku gradijenta, čime se htjelo postići bolje razlučivanje najintenzivnijeg pika. Gradijent SCX 02 korišten je za frakcionaciju peptida iz *E. coli* te je prikazan u tablici 3, a kromatogram frakcionacije peptida iz *E. coli* prikazan je na slici 12.

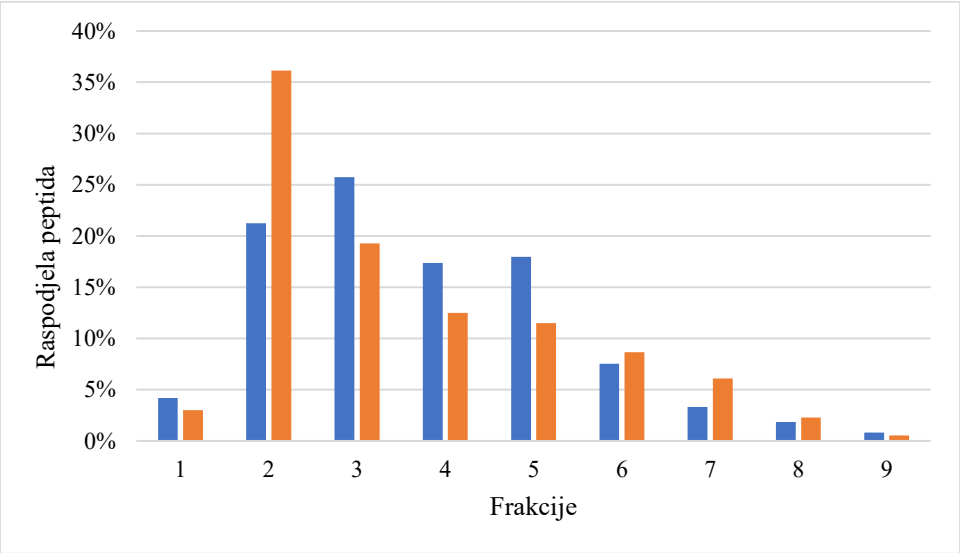
Tablica 3 Gradijent SCX 02

t / min	Udio B / %
0	0
0,2	2
3	5
5,5	15
6,5	30
7	100
9	100



Slika 12 Kromatogram frakcionacije peptida iz *E. coli* gradijentom SCX 02 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

Usporedbom kromatograma frakcionacije peptida iz *E. coli* prikazanim na slikama 12 i 13 može se primijeti da je gradijent SCX 02 imao velik utjecaj na profil kromatograma. Točnije primijećeno je da došlo do boljeg razlučivanja najintenzivnijeg pika kada je korišten gradijent SCX 02. Unatoč tome nije primijećena značajna razlika u rezultatima analize između SCX 01 i SCX 02. Broj identificiranih proteina povećao se za 40%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 97%, a broj PSM–ova povećao se za nešto više od 340% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Međutim, korištenjem gradijenta SCX 02 dobivena je lošija raspodjela peptida po frakcijama (slika 13).



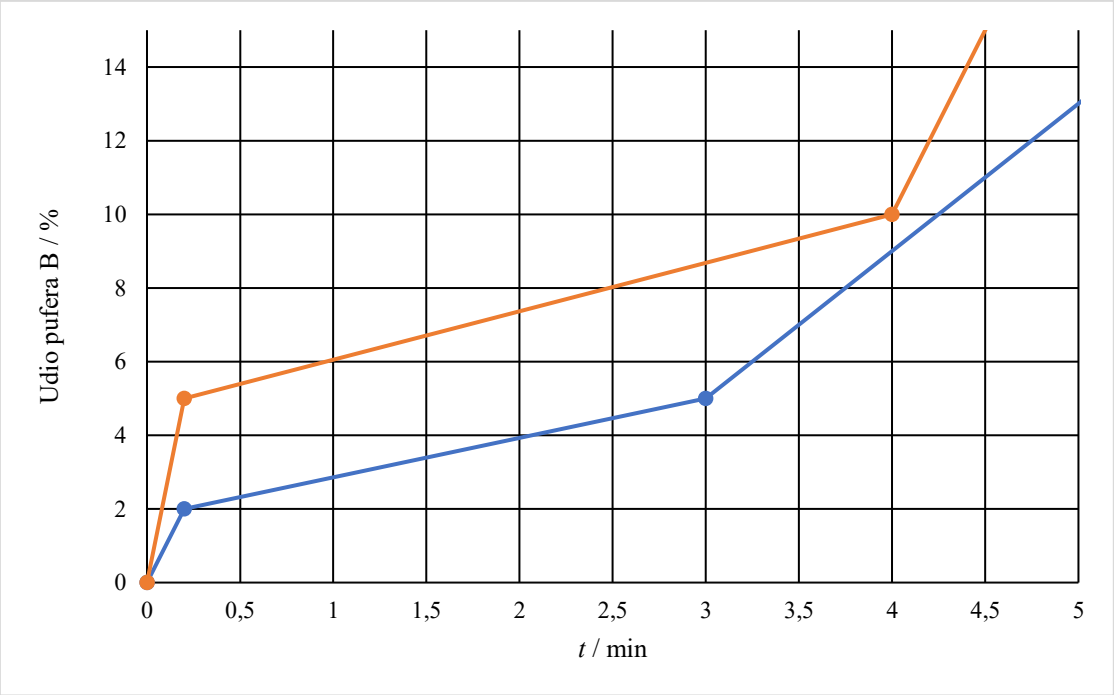
Slika 13 Raspodjela peptida iz *E. coli* u frakcijama prikupljenim korištenjem gradijenata SCX 01 (plavo) i SCX 02 (narančasto)

Važno je primijetiti da se udio peptida u frakcijama, dobiven integracijom kromatograma analize frakcija sustavom nanoLC–MS/MS, sa slike 14 ne poklapa s kromatogramima frakcionacije peptida. Naime, triptofan je aminokiselina koja je najrjeđe zastupljena u primarnim sekvencama proteina, zbog čega nakon digestije proteina mali udio peptida sadrži triptofan. Praćenjem fluorescencije triptofana mogu se detektirati samo oni peptidi koji sadrže triptofan, a većina peptida se eluira u frakcije bez detekcije, zbog čega se praćenjem fluorescencije triptofana ne može dobiti točan udio peptida u frakcijama.

Sljedećim gradijentom htjelo se postići bolje razlučivanje peptida koji su u prijašnjim gradijentima bili eluirani u drugoj frakciji pa je tako osmišljen gradijent SCX 04 (tablica 4). Na slici 14 je prikazana usporedba početnog dijela gradijenata SCX 02 i SCX 04.

Tablica 4 Gradijent SCX 04

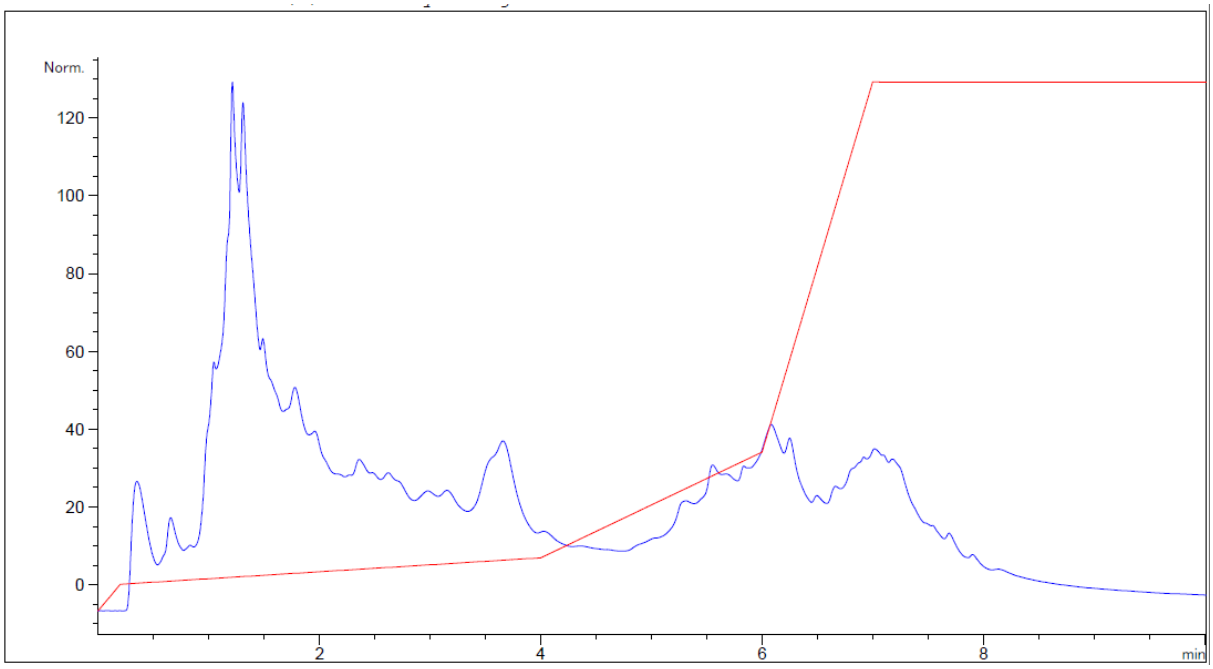
***t*/min**	**Udio B/%**
0	0
0,2	5
4	10
6	30
7	100
10	100



Slika 14 Početni dio gradijenata SCX 02 (plavo) i SCX 04 (narančasto)

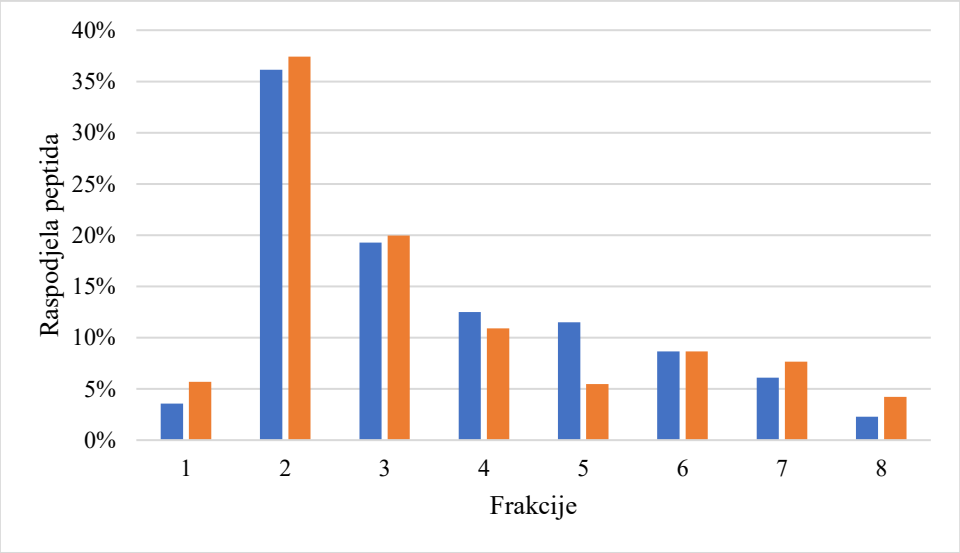
Na slici 14 se može primijetiti da se udio pufera B kod gradijenta SCX 04 strmo penje do 5% te je gradijent SCX 04 većeg nagiba od gradijenta SCX 02. Nagib gradijenta je povećan kako bi se peptidi bolja raspodijelili između prve i druge frakcije.

Gradijent SCX 04 korišten je za frakcionaciju peptida iz *E. coli* i HeLa–stanica. Na slici 15 prikazan je kromatogram frakcionacije peptida iz *E. coli*, a na slici 17 je prikazan kromatogram frakcionacije peptida iz HeLa–stanica.

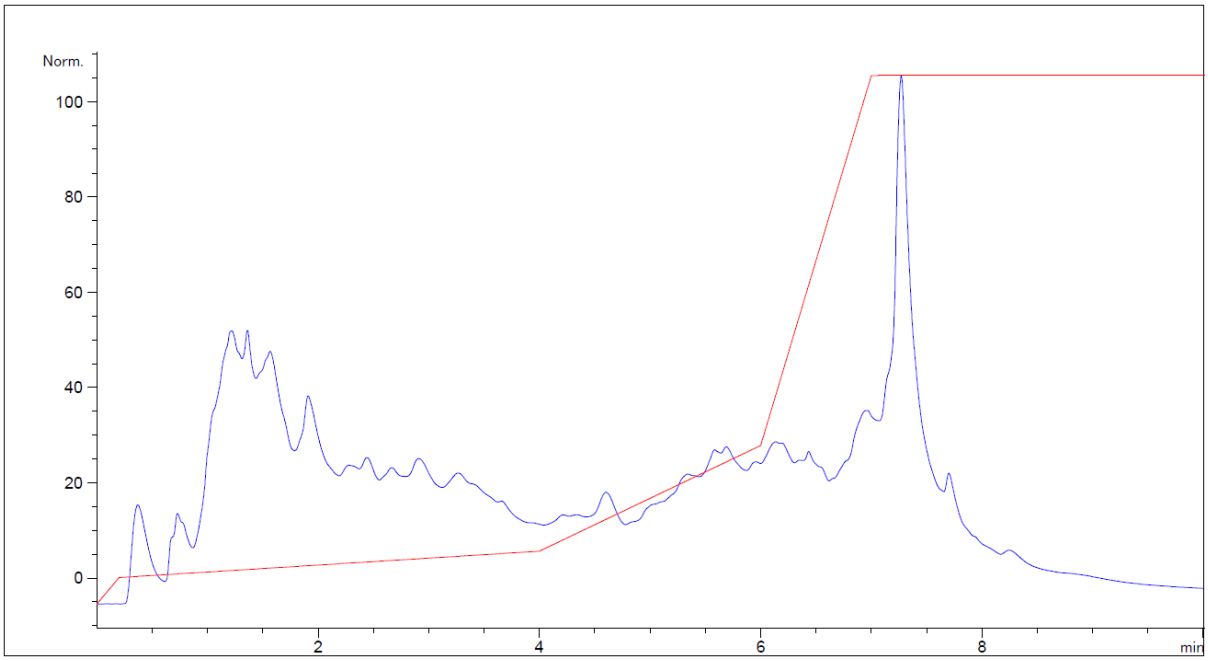


Slika 15 Kromatogram frakcionacije peptida iz *E. coli* gradijentom SCX 04 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

Usporedbom kromatograma frakcionacije peptida iz *E. coli* prikazanim na slikama 13 i 16 može se primijetiti da gradijent SCX 04 nije imao velik utjecaj na profil kromatograma. Međutim rezultati analize su bolji, točnije broj identificiranih proteina iz *E. coli* povećao se 45%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 103%, a broj PSM–ova povećao se za 242% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Kao što je očekivano iz usporedbe kromatograma sa slika 12 i 15, nije došlo do poboljšanja raspodjele peptida po frakcijama (slika 16).



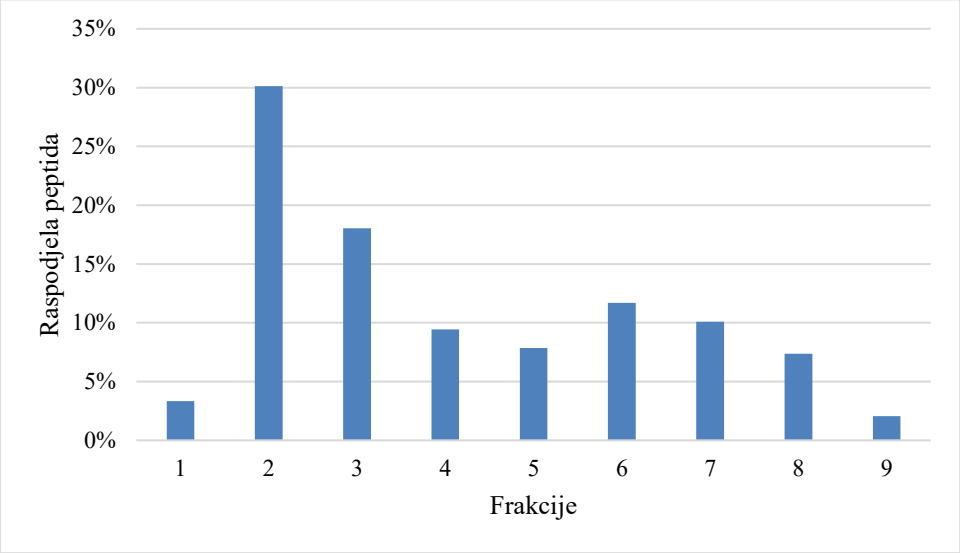
Slika 16 Raspodjela peptida iz *E. coli* u frakcijama prikupljenim korištenjem gradijenata SCX 02 (plavo) i SCX 04 (narančasto)



Slika 17 Kromatogram frakcionacije peptida iz HeLa–stanica gradijentom SCX 04(crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

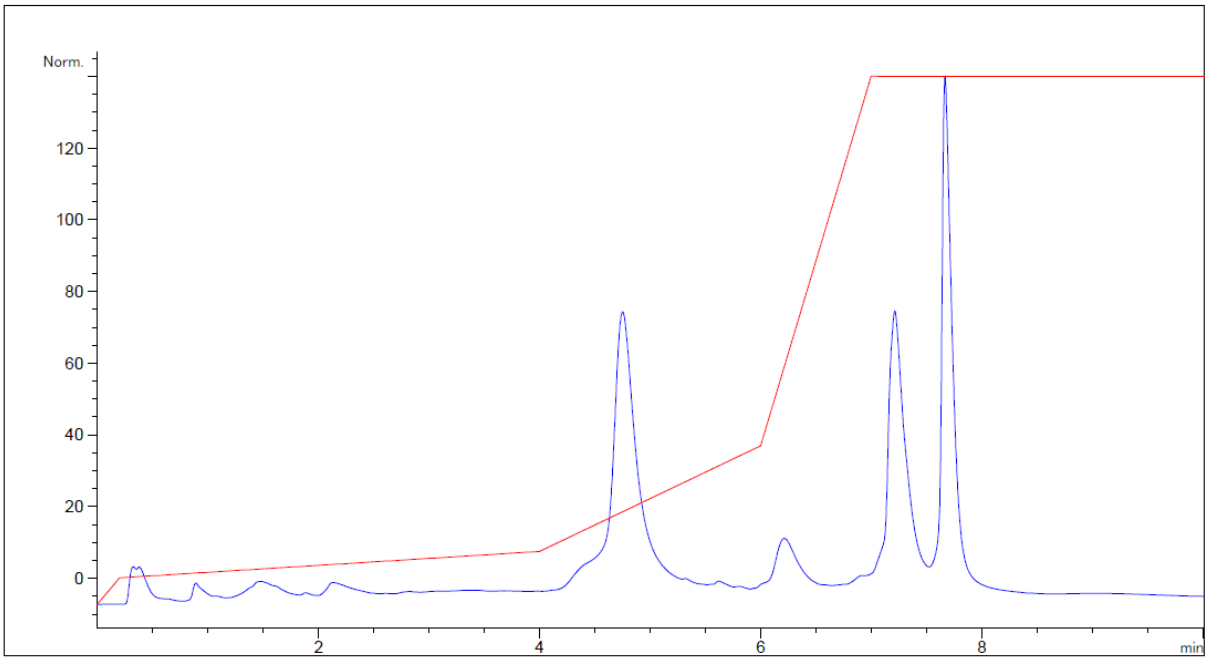
Zbog složenosti proteoma HeLa–stanica, kromatogrami frakcionacije peptida iz HeLa–stanica zahtjevniji su za interpretaciju. Iako je najintenzivniji pik pri kraju kromatograma, većina peptida se eluirala u drugoj i trećoj frakciji, što se može vidjeti na raspodjeli peptida po frakcijama prikazanoj na slici 18. U odnosu na analizu peptida iz HeLa–stanica bez prethodne

frakcionacije identificirano je 36% više proteina, 36% više jedinstvenih peptida i 50% PSM–ova.

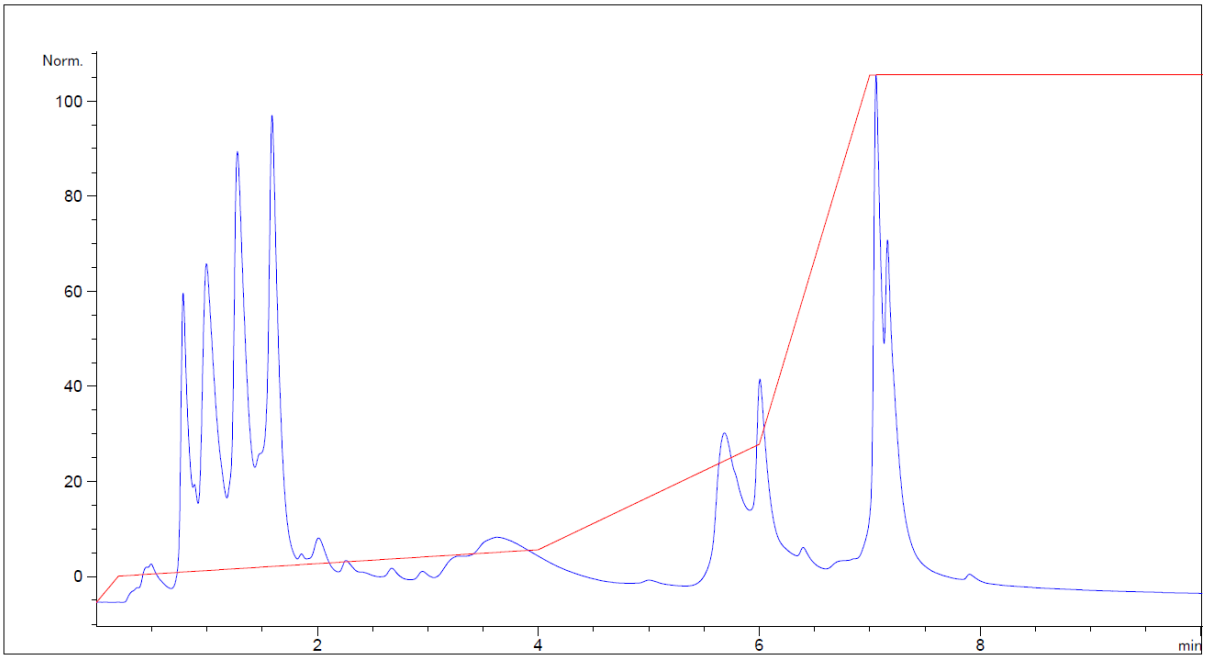


Slika 18 Raspodjela peptida iz HeLa–stanica u frakcijama prikupljenim korištenjem gradijenata SCX 04

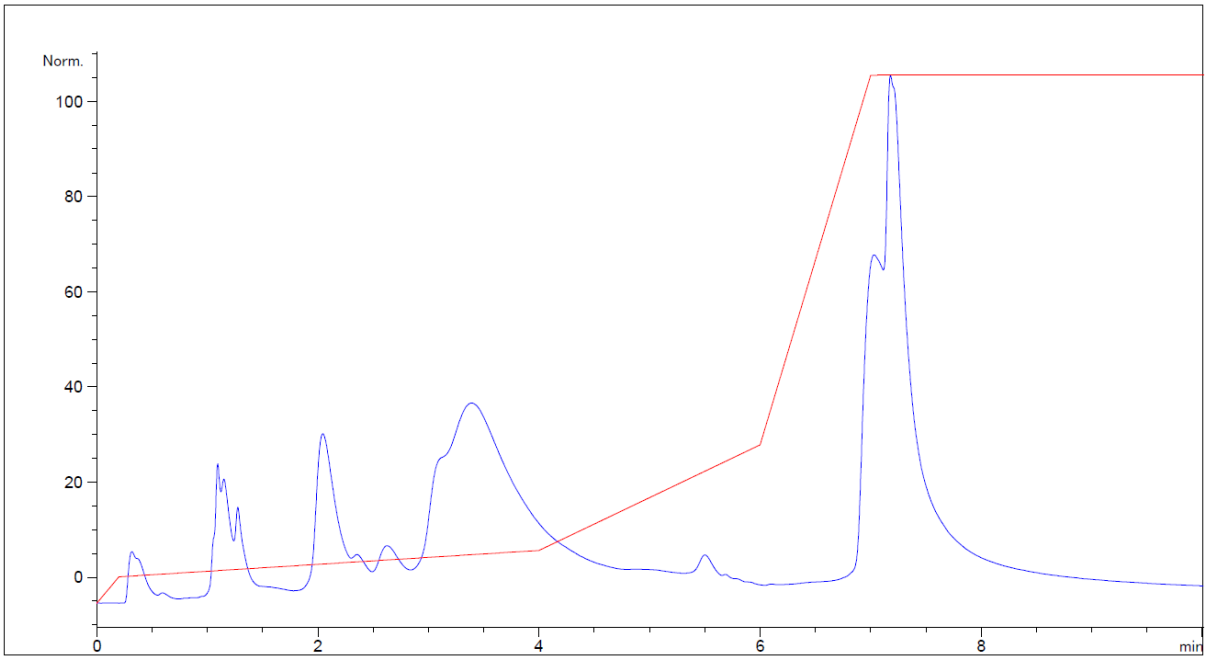
Nadalje, kako bi optimizirali oštrinu pika frakcionirani su modelni proteini. Korišteni modelni proteini bili su BSA, hemoglobin, LeuRS, mioglobin i SerRS. Na slikama 19–21 prikazani su kromatogrami frakcionacije BSA, LeuRS i SerRS, dok su u dodatku prikazani kromatogrami frakcionacije hemoglobina i mioglobina.



Slika 19 Kromatogram frakcionacije peptida iz BSA gradijentom SCX 04 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji



Slika 20 Kromatogram frakcionacije peptida iz LeuRS gradijentom SCX 04 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji



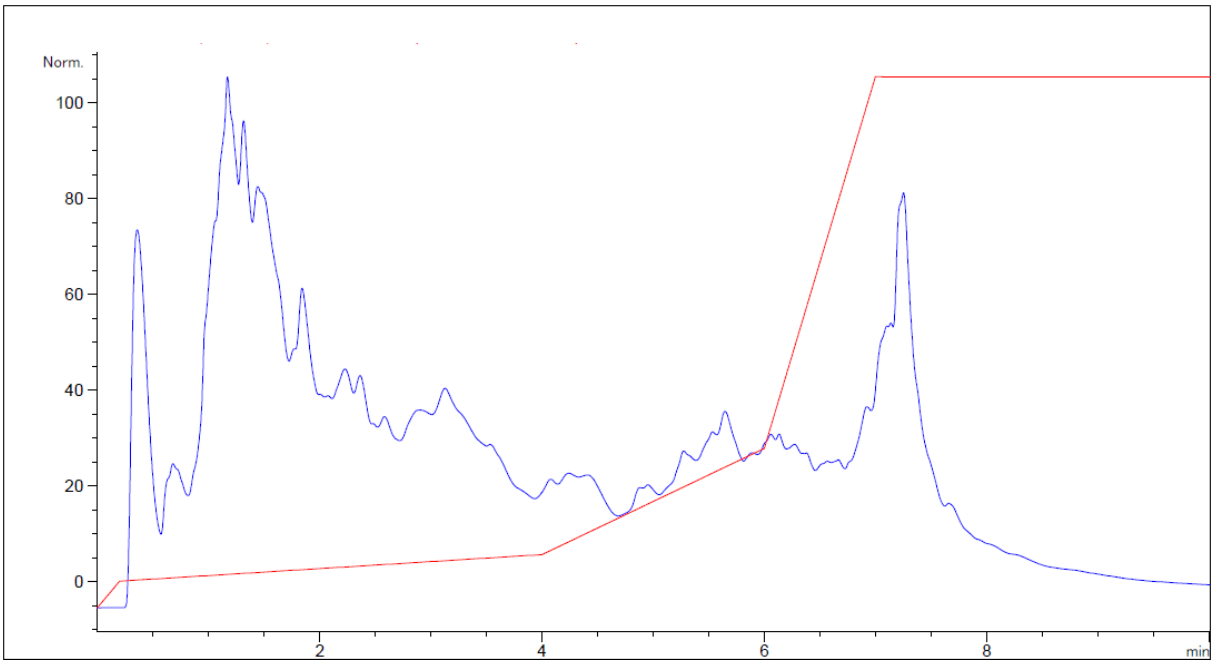
Slika 21 Kromatogram frakcionacije peptida iz SerRS gradijentom SCX 04 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

Modelni proteini izabrani su na temelju udjela triptofana u peptidnoj smjesi nakon digestije. Primjer u kojem je udio triptofana u peptidnoj smjesi nizak predstavlja BSA, koji u primarnoj sekvenci sadrži tri triptofana. Na kromatogramu frakcionacije peptida iz BSA mogu se primijeti tri intenzivna i oštra pika koji odgovaraju peptidima koji sadrže triptofan. Ostali pikovi vjerojatno odgovaraju peptidima koji su rezultat nepotpunog cijepanja tijekom digestije. Primjer u kojem je udio triptofana u peptidnoj smjesi osrednji predstavlja SerRS. SerRS sadrži šest triptofana te se na slici mogu primijetiti svi pikovi koji odgovaraju tim peptidima. Primjer u kojem je udio triptofana u peptidnoj smjesi visok predstavlja LeuRS. LeuRS sadrži 21 triptofan, no vjerojatno uslijed preklapanja pikova na kromatogramu se ne mogu primijetiti svi maksimumi koji odgovaraju peptidima koji sadrže triptofan.

Tijekom analize rezultata primijećena je niska pokrivenost sekvence BSA. Daljnjom analizom rezultata primijećeno je da većina peptida koji sadrže cistein nisu detektirani, što upućuje da nije došlo do cijepanja disulfidnih veza tijekom digestije. Primarna sekvenca BSA sadrži 35 cisteina od kojih samo jedan ne sudjeluje u stvaranju disulfidnih veza, zbog čega je nepotpuna redukcija disulfidnih veza i alikilacija tiolnih skupina cisteina imala velik učinak na pokrivenost sekvence BSA. Zbog toga je promijenjen protokol digestije, odnosno povećane su

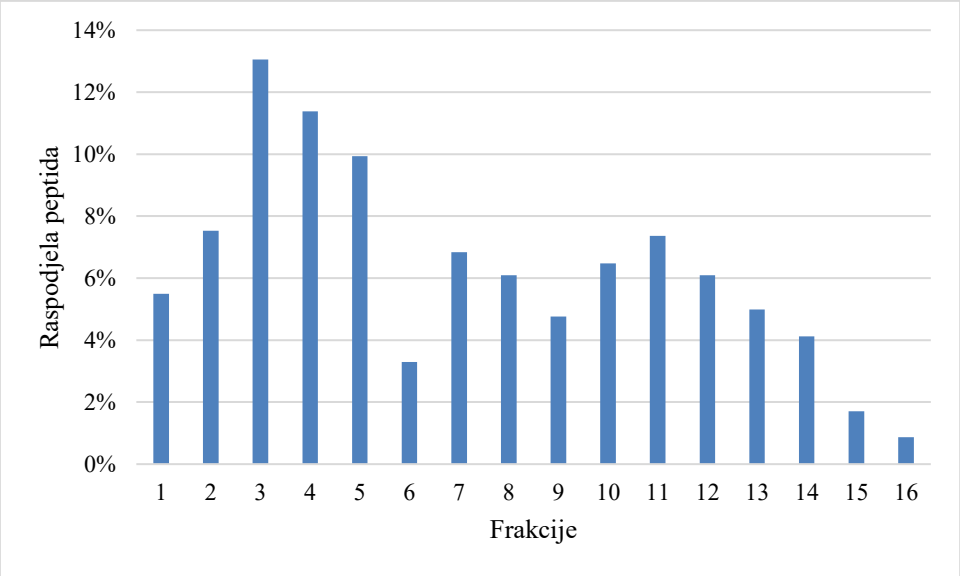
koncentracije ditiotreitola i jodoacetamida u protokolu. Korištene koncentracije odnose se na drugu metodu digestije opisanoj u poglavlju materijali i metode.

Novi protokol digestije korišten je za ponovnu analizu proteina iz HeLa–stanica, pri čemu je skupljano 16 frakcija. Na slici 22 prikazan je kromatogram frakcionacije peptida iz HeLa–stanica.



Slika 22 Kromatogram frakcionacije peptida iz HeLa–stanica gradijentom SCX 04 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

Usporedbom kromatograma frakcionacije peptida iz HeLa–stanica prikazanih na slikama 17 i 22 može se primijetiti da su na slici 22 pikovi na početnom dijelu kromatograma značajno intenzivniji, što sugerira da je promjena protokola digestije imala utjecaj na frakcionaciju. Dobiveni rezultati značajno su bolji od rezultata dobivenih prije promjene protokola digestije, točnije broj identificiranih proteina povećao se za 61%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 126% i broj PSM–ova povećao se za 226% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Međutim, nije došlo do značajne promjene u raspodjeli peptida po frakcijama te se i dalje većina peptida nalazi u početnim frakcijama (slika 23).

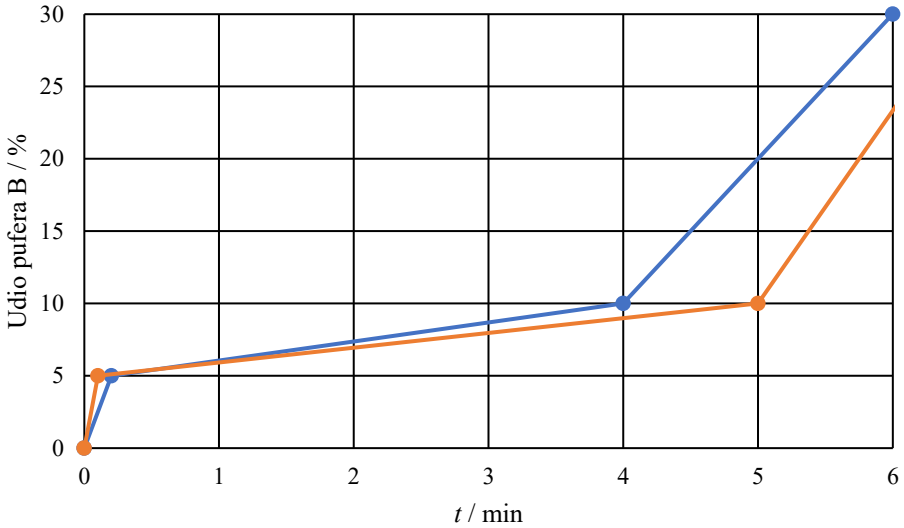


Slika 23 Raspodjela peptida iz HeLa–stanica u frakcijama prikupljenim korištenjem gradijenta SCX 04

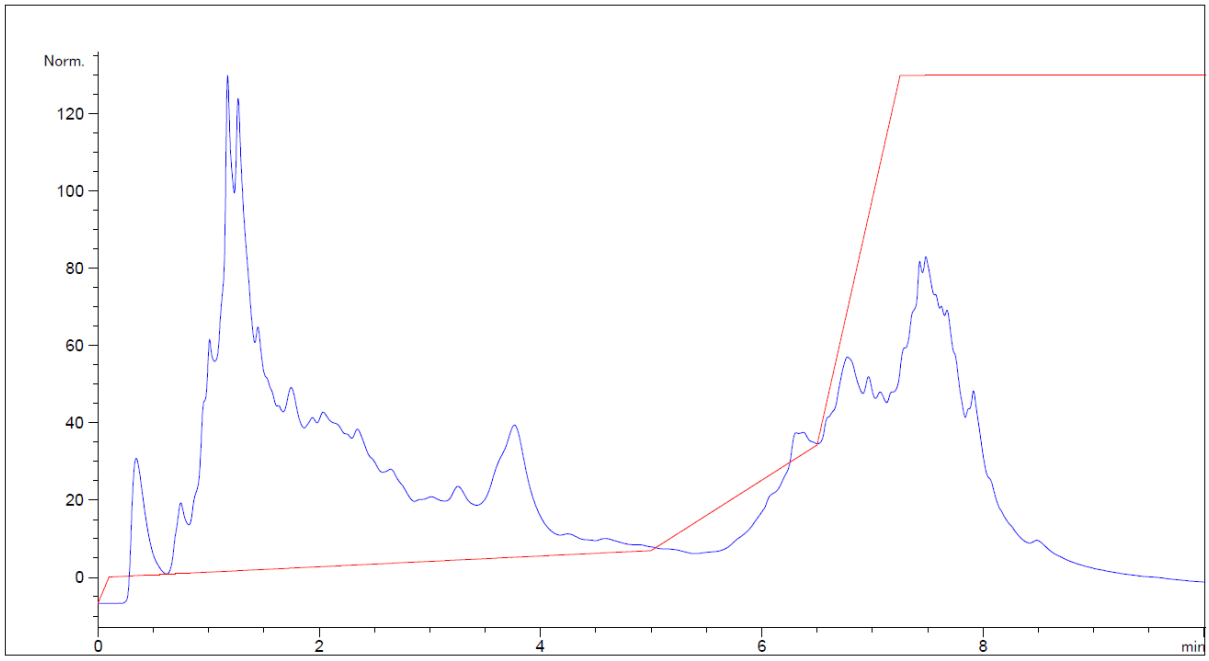
Gradijent SCX 04 imao je značajan utjecaj na broj identificiranih proteina i peptida, no nije postignuta željena raspodjela peptida, zbog čega je osmišljen gradijent SCX 05 (tablica 5). Gradijent SCX 05 se najviše razlikuje od gradijenta SCX 04 u početnom dijelu, gdje je gradijent SCX 05 blaži (slika 24). Time se htjelo postići bolje razlučivanje u početnom dijelu frakcionacije. Gradijent SCX 05 korišten je za frakcionaciju peptida iz *E. coli* te je kromatogram prikazan na slici 25.

Tablica 5 Gradijent SCX 05

***t* / min**	**Udio B / %**
0	0
0,1	5
5	10
6,5	30
7,25	100
10	100



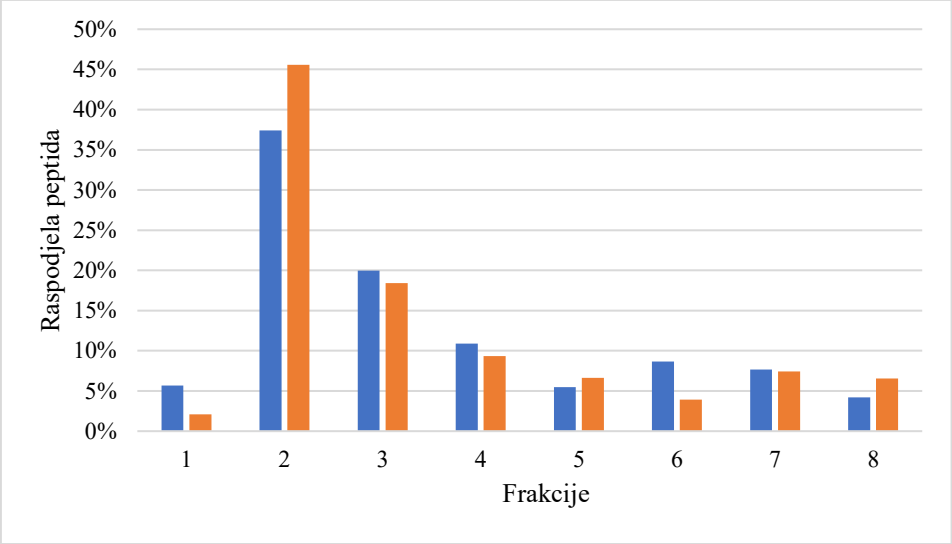
Slika 24 Početni dio gradijenata SCX 04 (plavo) i SCX 05 (narančasto)



Slika 25 Kromatogram frakcionacije peptida iz *E. coli* gradijentom SCX 05 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

Usporedbom kromatograma frakcionacije peptida iz *E. coli* prikazanim na slikama 15 i 25 može se primijetiti da je profil kromatograma na početku frakcionacije sličan, no u ostatku kromatograma je profil drugačiji, što upućuje da korištenjem gradijenta SCX 05 nije postignuto željeno razlučivanje u početnom dijelu frakcionacije. Broj identificiranih peptida povećao se za

31%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 58%, a broj PSM–ova povećao se za 298% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Broj identificiranih peptida je iznenađujuće nizak, čak je manji nego kada je korišten gradijent SCX 01. Također, nije došlo do poboljšanja raspodjele peptida po frakcijama (slika 26).

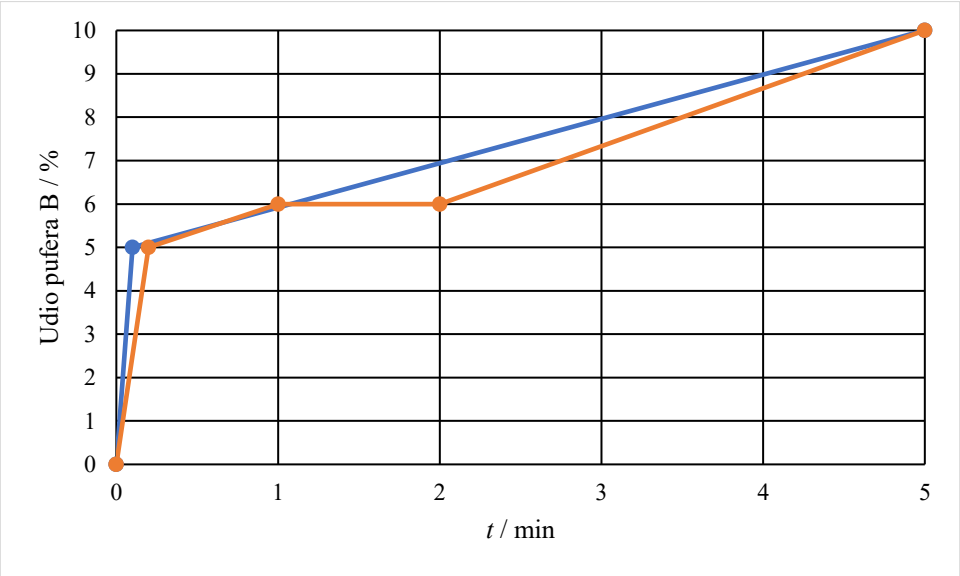


Slika 26 Raspodjela peptida iz *E. coli* u frakcijama prikupljenim korištenjem gradijenta SCX 04 (plavo) i SCX 05 (narančasto)

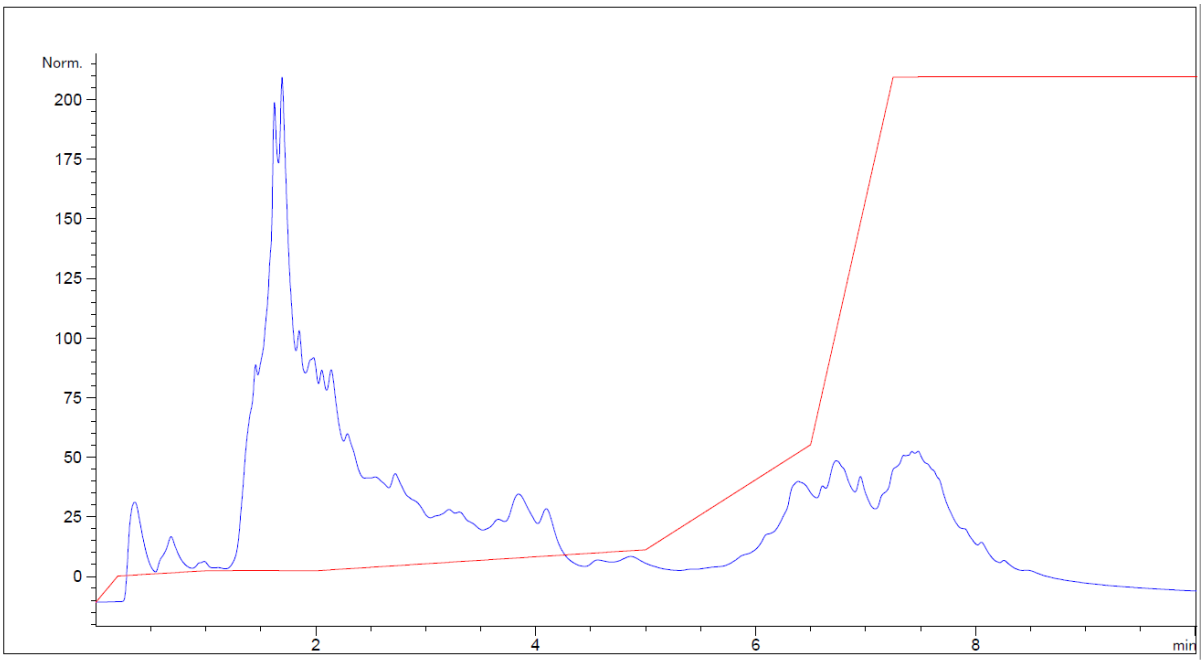
Iako je gradijent SCX 05 blagog nagiba u početnom dijelu frakcionacije, nisu dobiveni željeni rezultati, zbog čega je osmišljen gradijent SCX 06 (tablica 6). Gradijent SCX 06 se najviše razlikuje od gradijenta SCX 05 u početnom dijelu gradijenta, točnije u drugoj minuti gdje se nagib gradijenta SCX 06 jednak nuli (slika 27). Zadržavanjem konstantnog udjela mobilne faze B u drugoj minuti, htjelo se postići da se dio peptida eluira kasnije, čime se povećava razlučivanje. Gradijent SCX 06 korišten je za frakcionaciju peptida iz *E. coli* i HeLa–stanica (slike 28 i 30).

Tablica 6 Gradijent SCX 06

t / min	Udio B / %
0	0
0,2	5
1	6
2	6
5	10
6,5	30
7,25	100
10	100

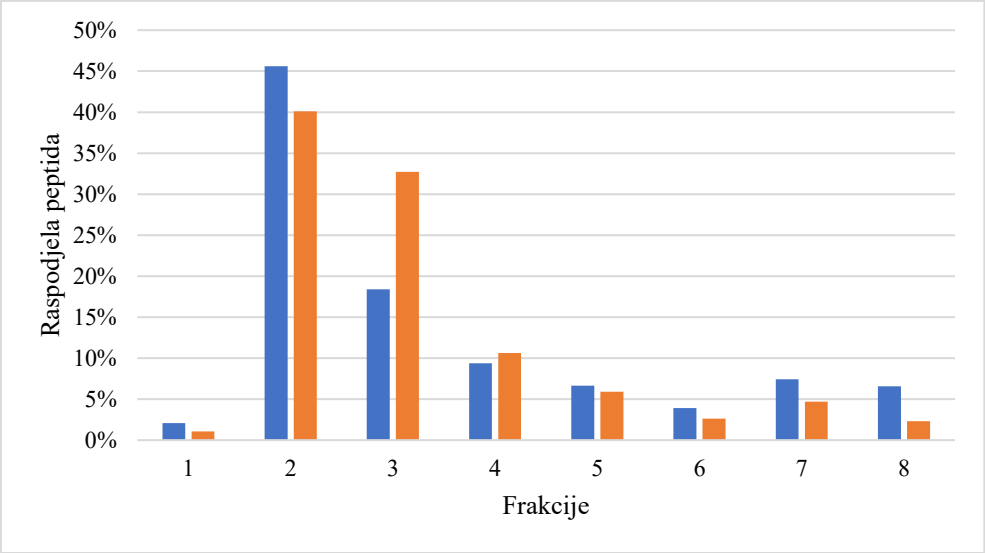


Slika 27 Početni dio gradijenata SCX 05 (plavo) i SCX 06 (narančasto)

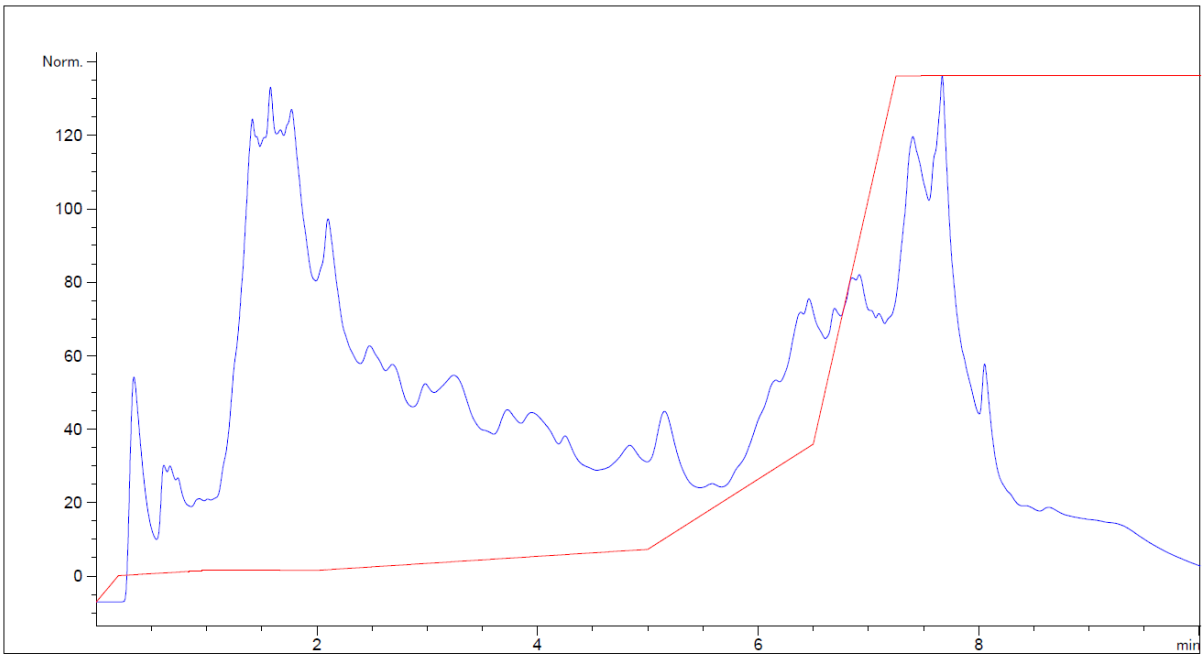


Slika 28 Kromatogram frakcionacije peptida iz E. coli gradijentom SCX 06 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

Usporedbom kromatograma frakcionacije peptida iz *E. coli* prikazanim na slikama 25 i 28 može se primijetiti da je došlo do pomaka najintenzivnijeg pika, no nije došlo do boljeg razlučivanja pika, što upućuje da korištenjem gradijenta SCX 06 nije postignuto željeno razlučivanje u početnom dijelu frakcionacije. Broj identificiranih proteina iz *E. coli* povećao se za 22%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 23%, a broj PSM–ova povećao se za 277% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Broj identificiranih proteina još je manji nego kada je korišten gradijent SCX 05, što sugerira da su posljednje dvije promjene gradijenta bile usredotočene u krivom smjeru. Također, nije došlo do poboljšanja raspodjele peptida po frakcijama (slika 29).



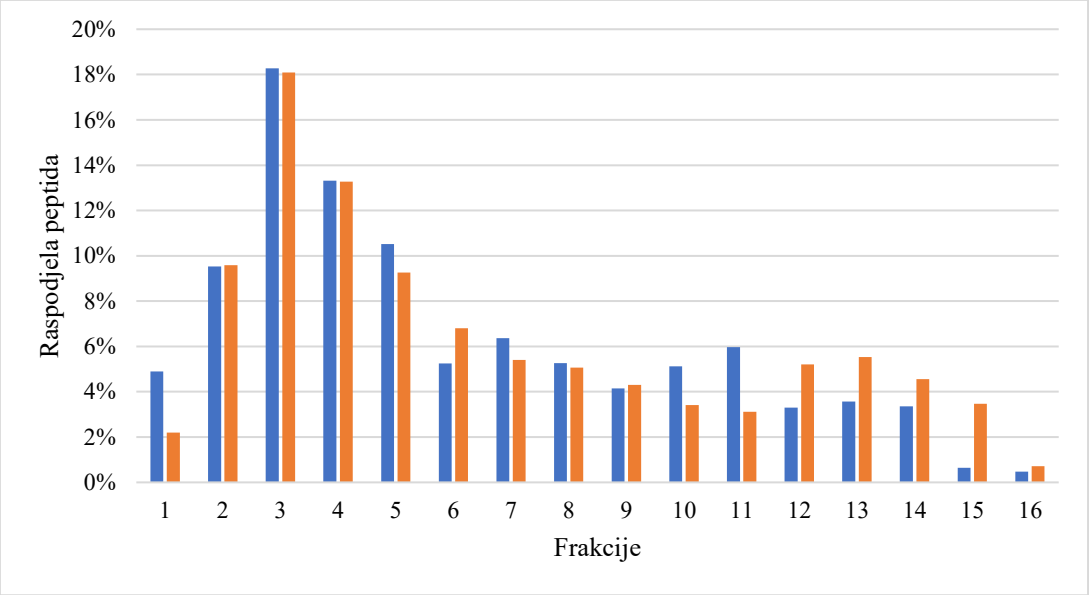
Slika 29 Raspodjela peptida iz *E. coli* u frakcijama prikupljenim korištenjem gradijenta SCX 05 (plavo) i SCX 06 (narančasto)



Slika 30 Kromatogram frakcionacije peptida iz HeLa–stanica gradijentom SCX 06 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

Usporedbom kromatograma frakcionacije peptida iz HeLa–stanica prikazanim na slikama 22 i 30 može se primijetiti da je gradijent SCX 06 imao značajan utjecaj na profil kromatograma, točnije korištenjem gradijenta SCX 06 došlo je do značajnog povećanja broja pikova na kromatogramu, što upućuje da je došlo do boljeg razlučivanja. Broj identificiranih proteina iz

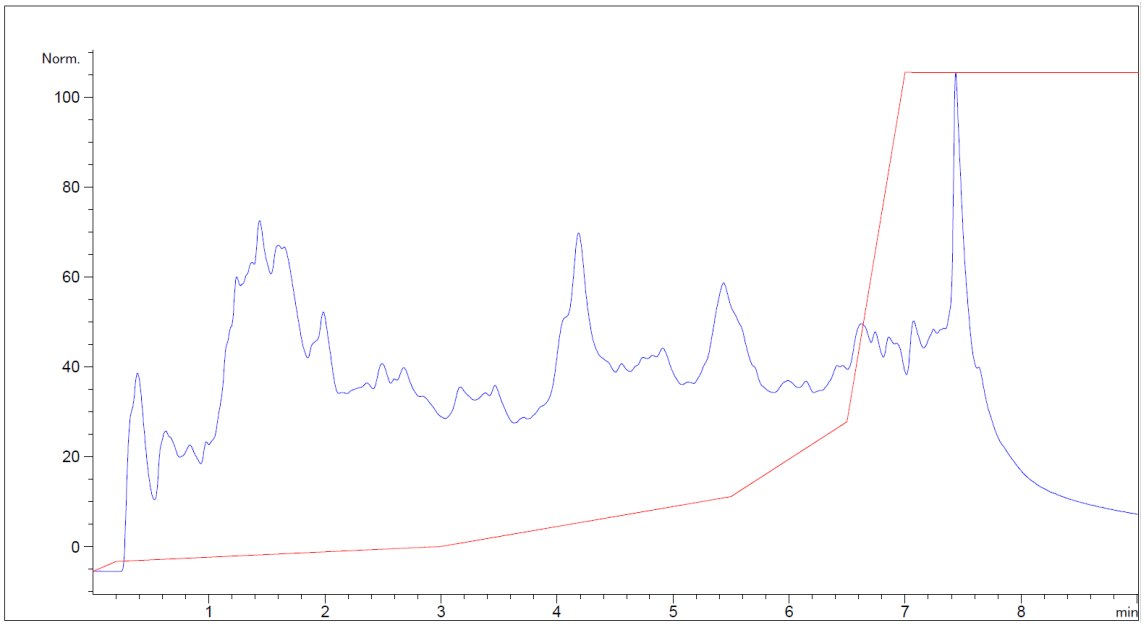
HeLa–stanica povećao se za 89%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 230%, a broj PSM–ova povećao se za 503% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Broj identificiranih proteina veći je nego kada je korišten gradijent SCX 04, što sugerira da je gradijent SCX 06 bolje odgovara složenijoj smjesi peptida. Štoviše, raspodjela peptida po frakcijama se poboljšala (slika 31).



Slika 31 Raspodjela peptida iz HeLa–stanica u frakcija prikupljenim korištenjem gradijenata SCX 04 (plavo) i SCX 06 (narančasto)

4.3. Optimizacija sastava mobilnih faza

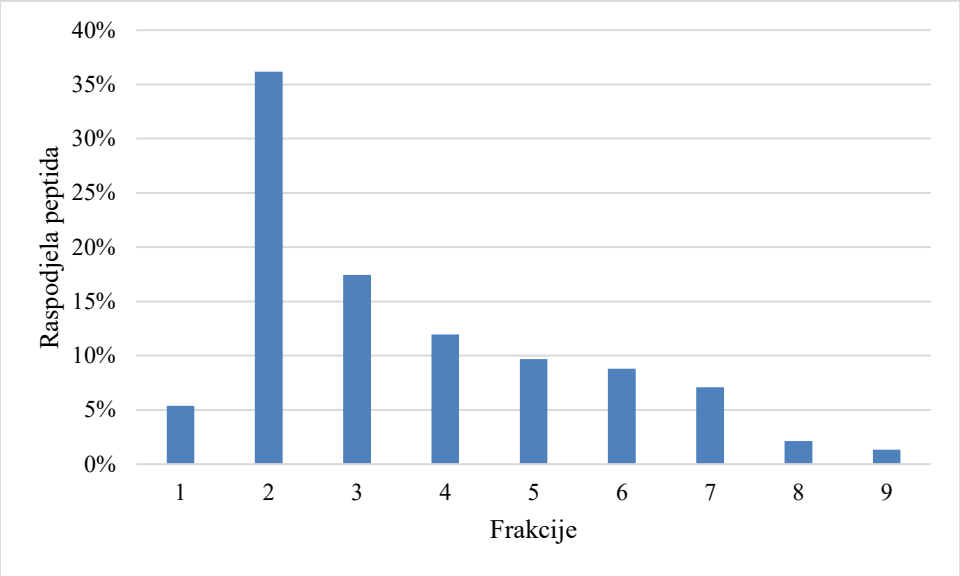
Optimizacija sastava mobilnih faza A i B započeta je frakcionacijom peptida iz HEK–stanica koristeći gradijent SCX 02 (slika 32).



Slika 32 Kromatogram frakcionacije peptida iz HEK–stanica gradijentom SCX 02 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

Proteom HEK–stanica je vrlo složen zbog čega je teže interpretirati kromatogram frakcionacije peptida. Primijećeno je više intenzivnih pikova te su pikovi ravnomjerno raspoređeni kroz cijeli kromatogram što sugerira dobru raspodjelu peptida.

U odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije broj identificiranih proteina povećao se za 78%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 142%, a broj PSM–ova povećao se za 324%. Iako je kromatogram ukazivao na dobru raspodjelu peptida, rezultati analize su pokazali da je raspodjela loša to jest da se većina peptida eluirala u drugoj i trećoj frakciji (slika 33).

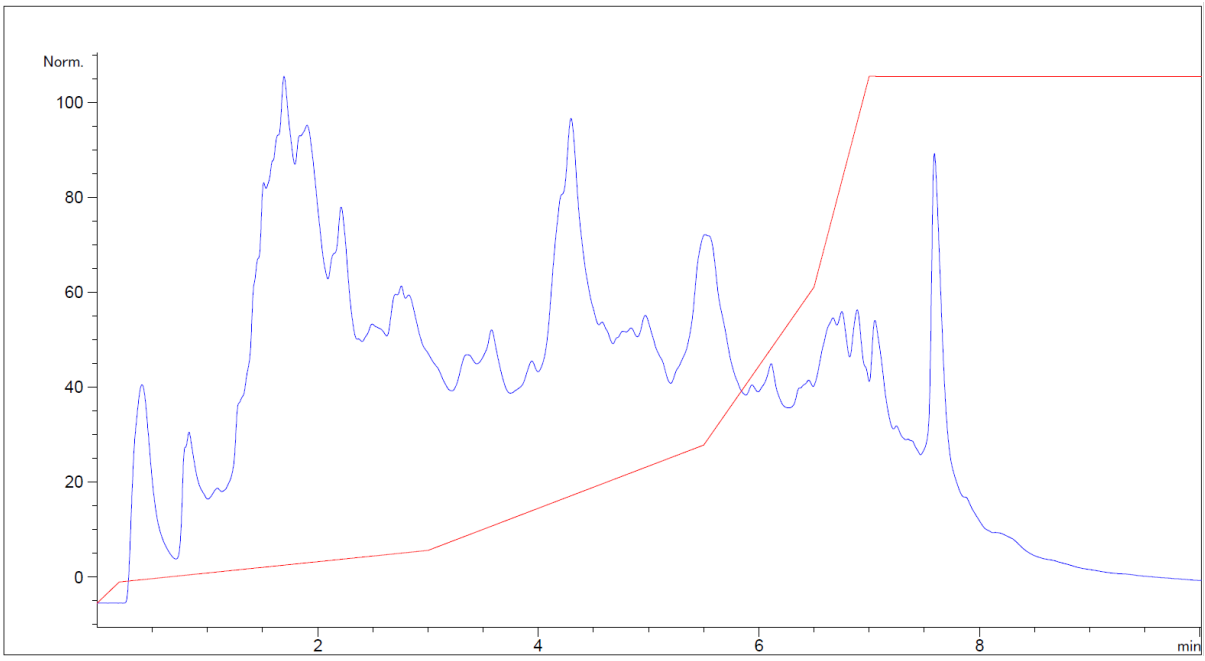


Slika 33 Raspodjela peptida iz HEK–stanica u frakcijama prikupljenim koristeći gradijent SCX 02

U svrhu poboljšanja raspodjele peptida po frakcijama promijenjen je sastav mobilne faze B, točnije udio metanske kiseline je smanjen na 0,25% te je prema promijeni gradijent SCX 02 modificiran u gradijent SCX 03. Gradijent SCX 03 je prikazan u tablici 7 te je korišten za frakcionaciju peptida iz HEK–stanica (slika 34).

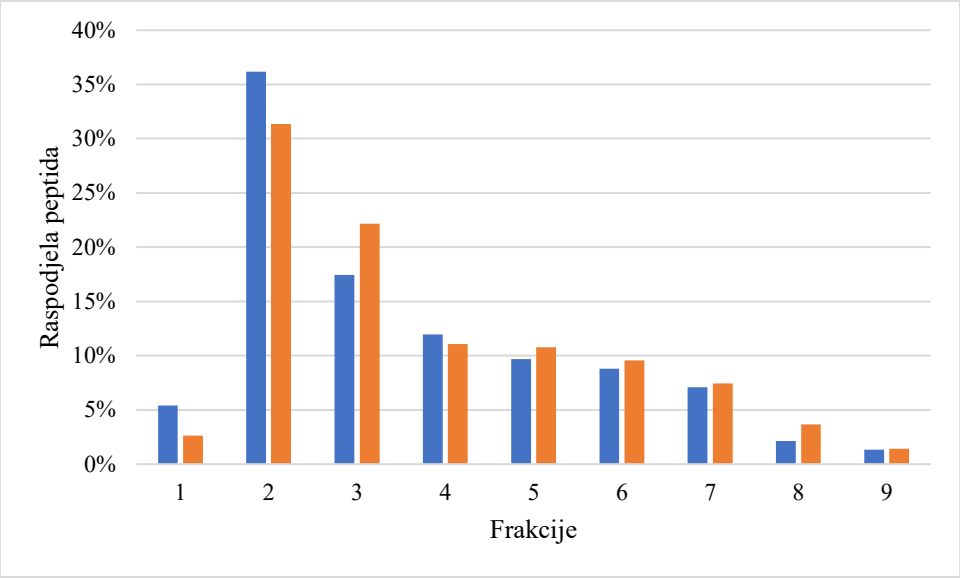
Tablica 7 Gradijent SCX 03

***t* / min**	**Udio B / %**
0	0
0,2	4
3	10
5,5	30
6,5	60
7	100
10	100



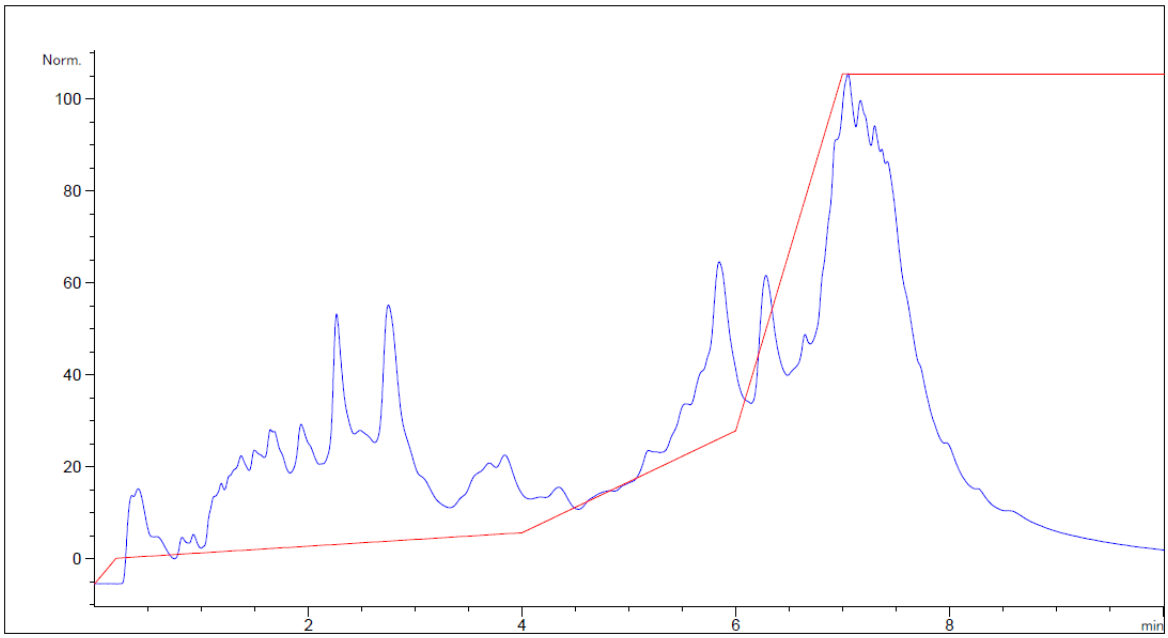
Slika 34 Kromatogram frakcionacije peptida iz HEK–stanica gradijentom SCX 03 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

Usporedbom kromatograma frakcionacije peptida iz HEK–stanica prikazanim na slikama 32 i 34, može se primijetit da je promjena sastava mobilne faze B imala velik učinak na profil kromatograma. Točnije na slici 34 primijećeno je više intenzivnih pikova, što upućuje da je postignuto bolje razlučivanje. U odnosu na rezultate bez prethodnog frakcioniranja broj identificiranih proteina povećao se za 56%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 104%, a broj PSM–ova povećao se za 201%. Dobiveni rezultati lošiji su od rezultata prije promjene sastava mobilne faze B, što sugerira da je promjena sastava ipak imala negativan utjecaj na frakcionaciju. Međutim, postignuta je bolja raspodjela peptida po frakcijama, zbog čega je promjena sastava otopine B zadržana tijekom optimizacije ostalih gradijenta (slika 35).

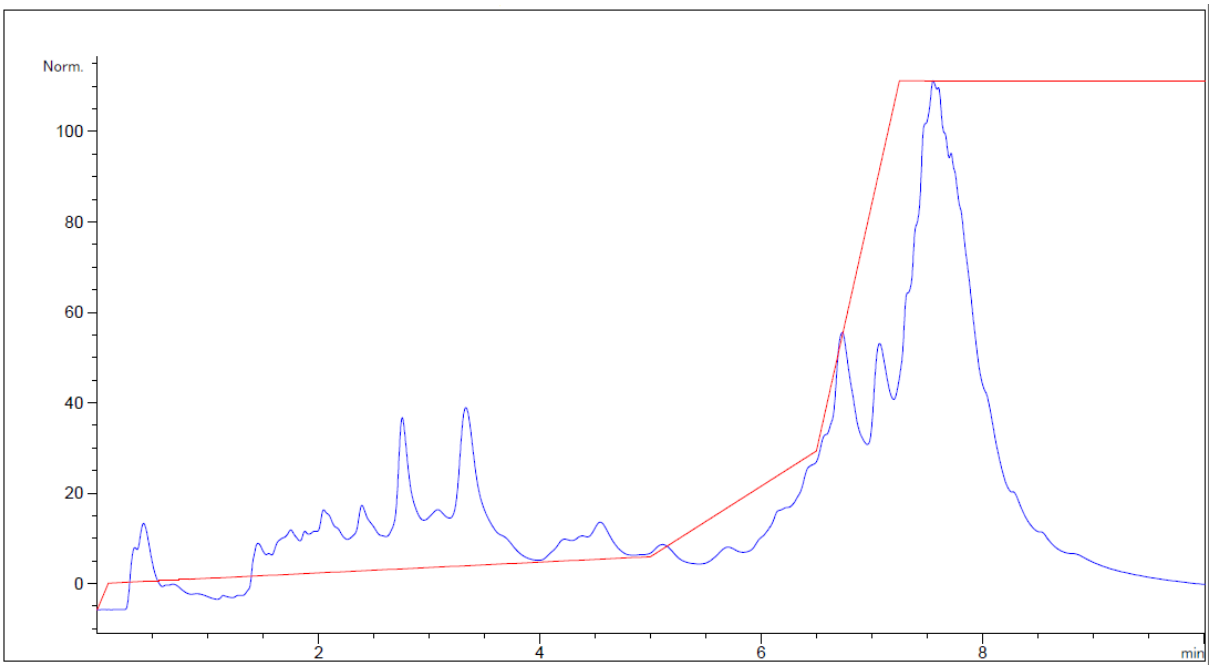


Slika 35 Raspodjela peptida iz HEK–stanica koji su eluirani mobilnom fazom B; 0,5% metanska kiselina (plavo), 0,25% metanska kiselina (narančasto)

Primijećeno je da se većina peptida eluira brzo, odnosno imaju kratko vrijeme zadržavanja na koloni te se loše razlučuju. Kako bi povećali razlučivanje potrebno je povećati vrijeme zadržavanja peptida. Zbog čega je promijenjen sastav mobilnih faza A i B, točnije udio mravlje kiseline promijenjen je na 0,5% u obje mobilne faze. Modificirane mobilne faze korišteni su za frakcionaciju peptida iz *E. coli* i HeLa–stanica koristeći gradijente SCX 04 i SCX 05. Kromatogrami frakcionacije koristeći gradijent SCX 04 prikazani su na slikama 36 i 39, a kromatogrami frakcionacije koristeći gradijent SCX 05 prikazani su na slikama 37 i 40.



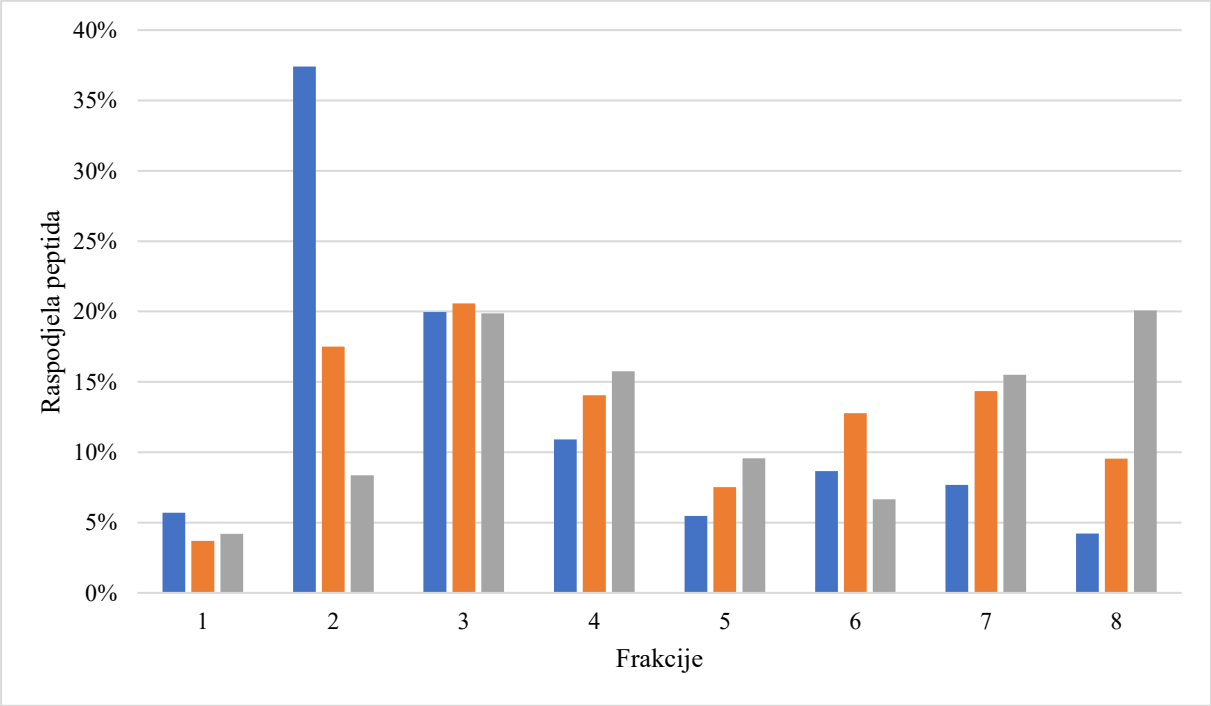
Slika 36 Kromatogram frakcionacije peptida iz E. coli gradijentom SCX 04 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji



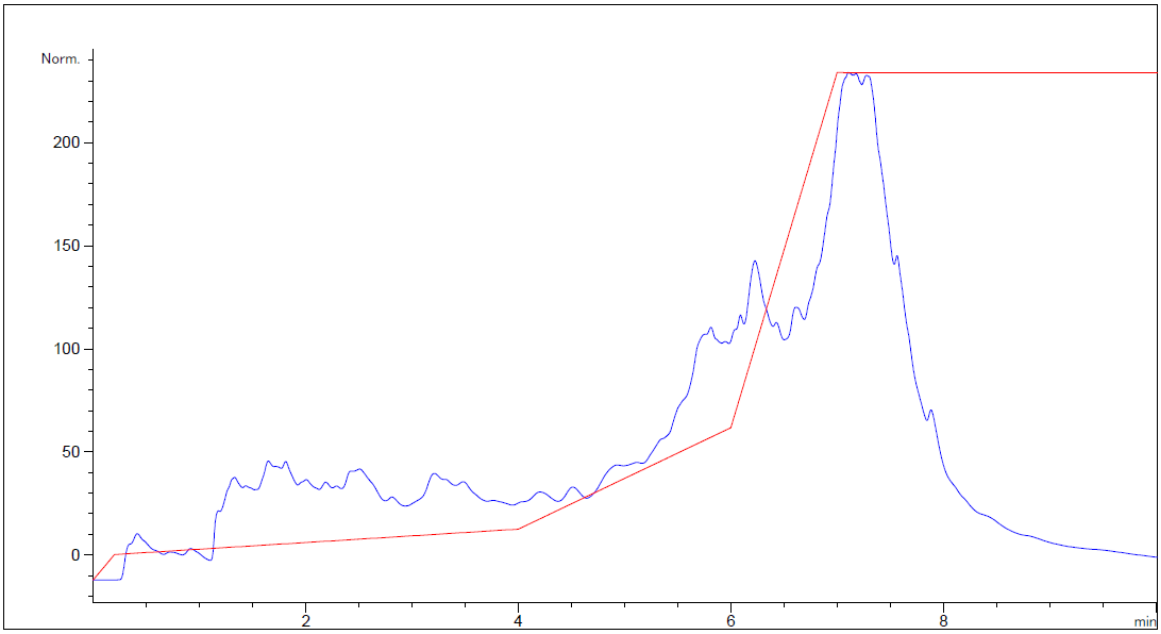
Slika 37 Kromatogram frakcionacije peptida iz E. coli gradijentom SCX 05 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

Kromatogrami prikazani na slikama 36 i 37 su vrlo slični, ali je najbitnije što se značajno razlikuju od ostalih kromatograma frakcionacije peptida iz *E. coli*. Točnije, najintenzivniji pik se ne pojavljuje na početku kromatograma, već pri samom kraju što upućuje da se više peptida eluiralo u potonje frakcije. Takva razlika upućuje da je promjena sastava mobilnih faza A i B imala velik utjecaj na frakcionaciju peptida.

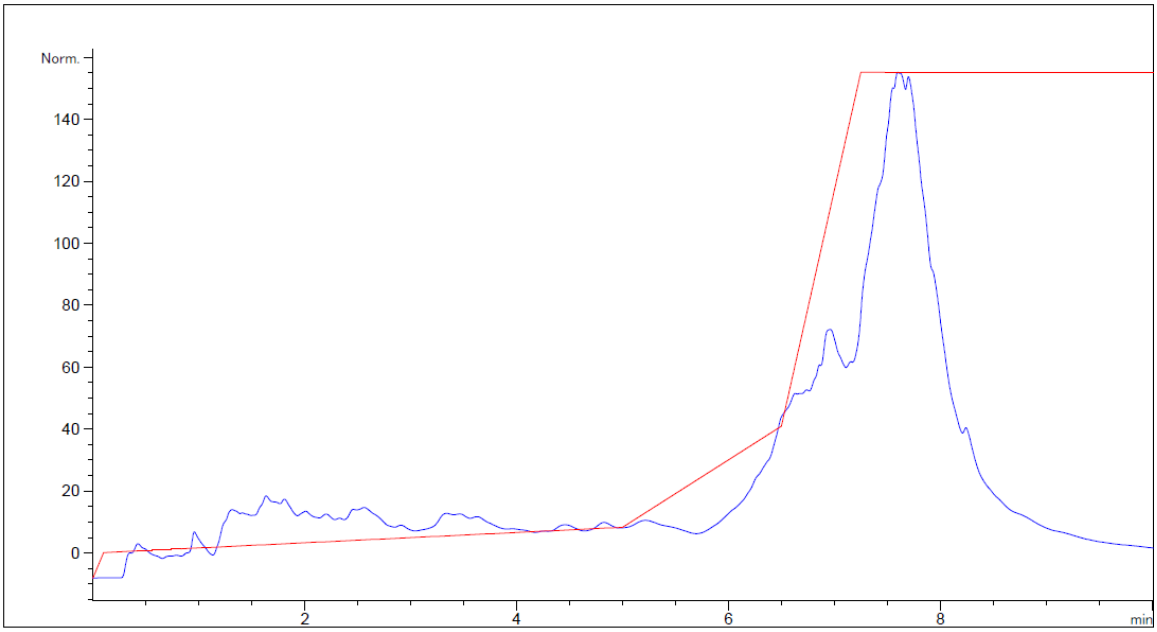
Korištenjem gradijenta SCX 04 za frakcionaciju peptida iz *E. coli* broj identificiranih proteina povećao se za 50%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 107%, a broj PSM–ova povećao se za 257% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Dok se korištenjem gradijenta SCX 05 broj identificiranih proteina povećao za 50%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 99%, a broj PSM–ova povećao se za 245% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Najveća promjena u rezultatima vidi se u raspodjeli peptida po frakcijama. Na slici 38 se može primijetiti da je raspodjela peptida značajno bolja kada su korišteni mobilne faze koje sadrže 0,5% mravlje kiseline.



Slika 38 Raspodjela peptida iz *E. coli* eluiranim s 0,25%–tnom metanskom kiselinom koristeći gradijent SCX 04(plavo) te peptida eluiranim s 0,5%–tnom metanskom kiselinom koristeći gradijent SCX 04 (narančasto) i SCX 05 (sivo)



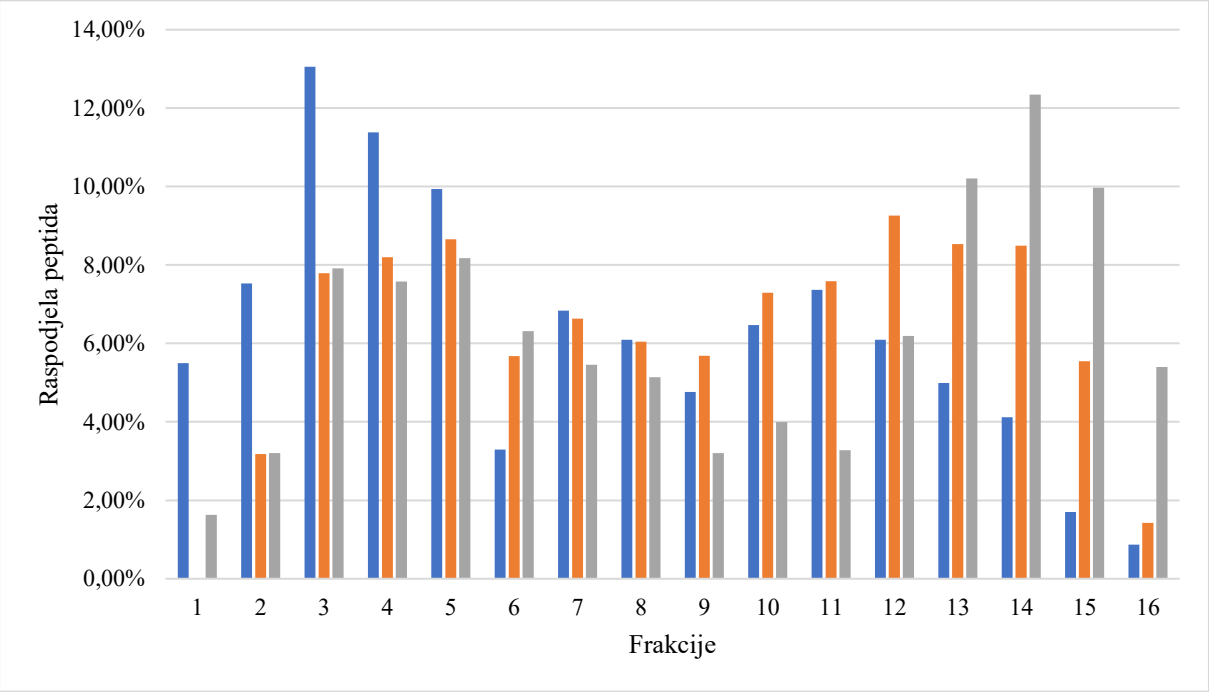
Slika 39 Kromatogram frakcionacije peptida iz HeLa–stanica gradijentom SCX 04 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji



Slika 40 Kromatogram frakcionacije peptida iz HeLa–stanica gradijentom SCX 05 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

Kromatogrami na slikama 39 i 40 imaju sličan profil, no pikovi na kromatogramu sa slike 39 su intenzivniji. Oba kromatograma se razlikuju od prijašnjih kromatograma frakcionacije peptida iz HeLa–stanica. Točnije na kromatogramima se svi najintenzivniji pikovi nalaze pri kraju kromatograma, što upućuje da se više peptida eluiralo u potonje frakcije.

Korištenjem gradijenta SCX 04 za frakcioniranje peptida iz HeLa–stanica broj identificiranih proteina povećao se za 92%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 193%, a broj PSM–ova povećao se za 439% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Dok se korištenjem gradijenta SCX 05 broj identificiranih proteina povećao za 92%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 200%, a broj PSM–ova povećao se za 412% u odnosu na analizu bez prethodnog frakcioniranja. Došlo je i do značajnog poboljšanja raspodjele peptida po frakcijama, što potvrđuje pozitivan utjecaj promjene sastava mobilnih faza A i B (slika 41).



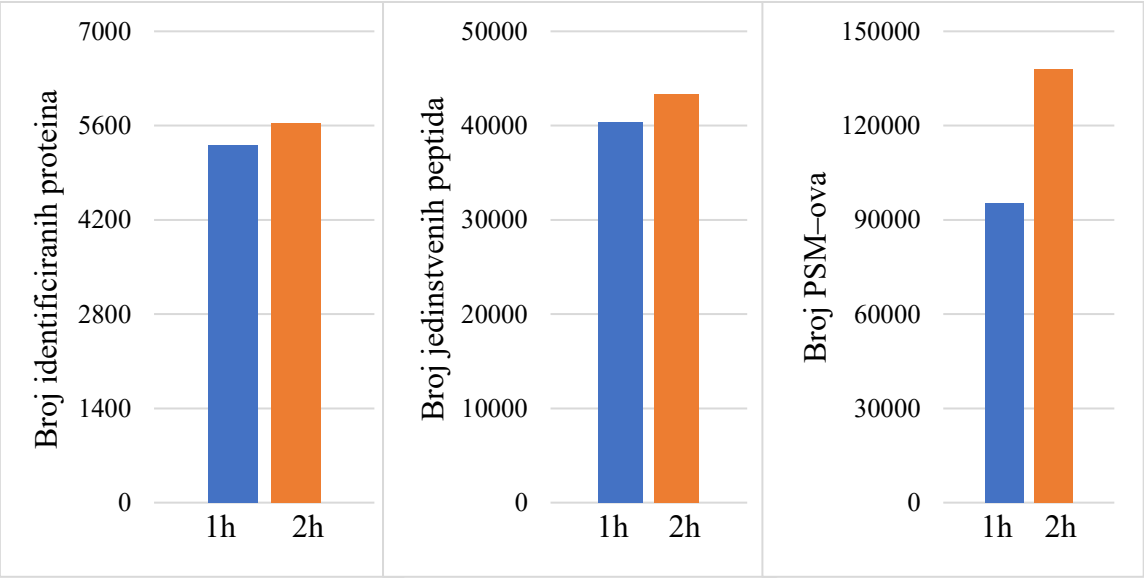
Slika 41 Raspodjela peptida iz HeLa–stanica eluiranim s 0,25%–tnom metanskom kiselinom koristeći gradijent SCX 04(plavo) te peptida eluiranim s 0,5%–tnom metanskom kiselinom koristeći gradijent SCX 04 (narančasto) i SCX 05 (sivo)

4.4. Optimizacija trajanja kromatografskog odjeljivanja pomoću sustava nanoLC–MS/MS i broja prikupljenih frakcija

Uz frakcionaciju peptida uređajem UHPLC, razdvajanje peptida vezanim sustavom nanoLC–MS/MS ključno je za identifikaciju proteina. Povećanjem trajanja kromatografskog odjeljivanja

pomoću sustava nanoLC–MS/MS moguće je detektirati više peptida jer se peptidi bolje separiraju. U metodi je najviše vremena utrošeno na analizu uzoraka sustavom nanoLC–MS/MS, zbog čega je važno odrediti optimalan omjer broja identificiranih proteina i vremena utrošenog na analizu. Analizirani su peptidi iz staničnih linija HEK i HeLa, pri čemu su peptidi iz HEK–stanica frakcionirani koristeći gradijent SCX 03, a peptidi iz HeLa–stanica su frakcionirani koristeći gradijent SCX 04. U svakoj frakcionaciji je skupljano po 9 frakcija, a odabrana vremena trajanja analize sustavom nanoLC–MS/MS bila su 1 sat i 2 sata.

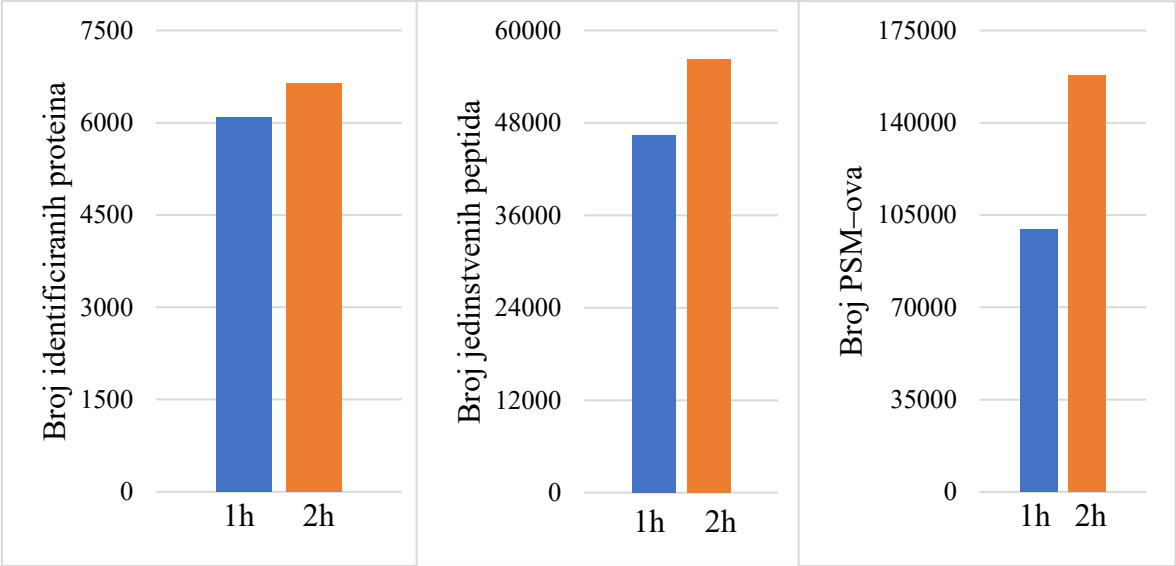
Analizom peptida iz HEK–stanica koji su separirani 1 sat broj identificiranih proteina povećao se za 56%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 104%, a broj PSM–ova povećao se za 201% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Dok se analizom peptida koji su separirani 2 sata broj identificiranih proteina povećao za 66%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 119%, a broj PSM–ova povećao se za 335% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Na slici 42 prikazana je usporedba rezultata analize peptida iz HEK–stanica s vremenom trajanja kromatografije od 1 sat i 2 sata.



Slika 42 Usporedba rezultata analize peptida iz HEK–stanica koji su separirani pomoću sustava nanoLC–MS/MS kromatografijom u trajanju od od 1h (plavo) i 2h (narančasto). Uzorci su prethodno razdijeljeni na 9 frakcija frakcionacijom na kationskom izmjenjivaču.

Analizom peptida iz HeLa–stanica koji su separirani u 9 frakcija te 1 sat pomoću sustava nanoLC–MS/MS broj identificiranih proteina povećao se za 36%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 36%, a broj PSM–ova povećao se za 50% u odnosu na analizu bez prethodne

frakcionacije. Dok se analizom peptida koju su separirani 2 sata broj identificiranih proteina povećao se za 48%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 65%, a broj PSM–ova povećao se za 138% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Na slici 43 prikazana je usporedba rezultata analize peptida iz HeLa–stanica koji su separirani u 9 frakcija s vremenom trajanja kromatografije od 1 sat i 2 sata.

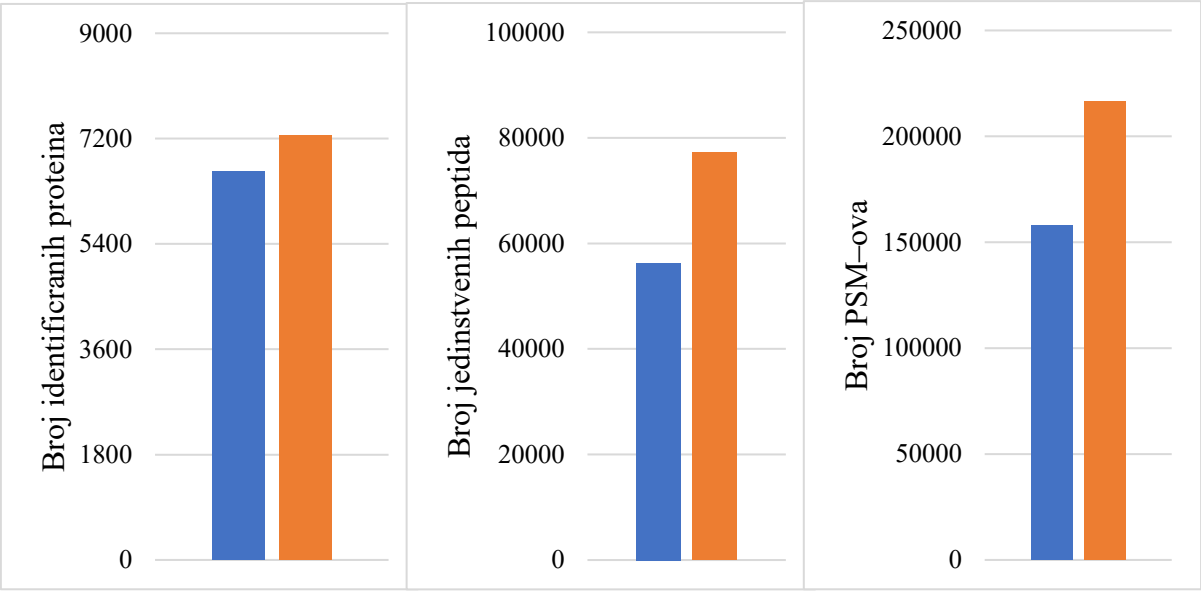


Slika 43 Usporedba rezultata analize peptida iz HeLa–stanica koji su separirani sustavom nanoLC–MS/MS kromatografijom u trajanju od 1h (plavo), 2h (narančasto). Uzorci su prethodno razdijeljeni na 9 frakcija frakcionacijom na kationskom izmjenjivaču.

Kao i što je očekivano, udvostručenjem vremena separacije peptida identificirano je više proteina. Međutim, očekivano je da će produljenje vremena kromatografije imati veći utjecaj na broj identificiranih proteina. Naime, genomi staničnih linija HEK i HeLa sadrže više od 20000 gena koji kodiraju za proteine te je za očekivati da će u bilo kojem trenutku biti eksprimirano više proteina nego što je identificirano, odnosno više od 8000 proteina. Manji broj identificiranih proteina iz HEK–stanica može se objasniti time što je za frakcionaciju korišten manje optimalni gradijent. Budući da je proteom HeLa–stanica vrlo složen vjerojatno je smjesa peptida u pojedinim frakcijama i dalje složena, čime se može objasniti manji broj identificiranih proteina. Mala razlika u broju identificiranih proteina upućuje da produljenje vremena trajanja kromatografije pomoću sustava nanoLC–MS/MS nije učinkovito.

Kako bi se dodatno pojednostavila smjesa peptida povećan je broj prikupljenih frakcija. Broj prikupljenih frakcija je povećan na 16 te su analizirani peptida iz HeLa–stanica koji su sustavom nanoLC–MS/MS separirani 1 sat. Broj identificiranih proteina povećao se za 61%,

broj jedinstvenih peptida povećao se za 126%, a broj PSM–ova povećao se za 226% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Na slici 44 prikazana je usporedba rezultata analize peptida iz HeLa–stanica koji su separirani u 9 frakcija koje su separirane uređajem nanoLC–MS/MS kromatografijom u trajanju od 2 sata i peptida koji su separirani u 16 frakcija koje su separirane uređajem nanoLC–MS/MS kromatografijom u trajanju od 1 sat.



Slika 44 Usporedba rezultata analize peptida iz HeLa stanica koji su frakcionacijom na kationskom izmjenjivaču razdijeljeni u 9 frakcija koje su separirane uređajem nanoLC–MS/MS kromatografijom u trajanju od 2h (plavo) i peptida koji su razdijeljeni u 16 frakcija koje su separirane uređajem nanoLC–MS/MS kromatografijom u trajanju od 1h (narančasto)

Na slici 44 se može primijeti da povećanje broja frakcija ima veći utjecaj na broj identificiranih proteina i peptida od produljenja trajanja kromatografije pomoću sustava nanoLC–MS/MS. Budući da je kromatografija pomoću sustava nanoLC–MS/MS trajala 1 sat, analiza svih 16 frakcija trajala je kraće od analize 9 frakcija koje su pomoću sustava nanoLC–MS/MS separirane 2 sata. Drugim riječima, analizom 16 frakcija je u manje vremena identificirano više proteina, čime je postignut bolji omjer broja identificiranih proteina i vremena utrošenog na analizu sustavom nanoLC–MS/MS. Iako povećanje broja frakcija ima velik utjecaj na broj identificiranih proteina složenog proteoma HeLa–stanica, povećanje broja prikupljenih frakcija nema jednak utjecaj na broj identificiranih proteina kada se analiziraju jednostavni proteomi. Zbog čega je u daljnjim analizama bakterijskih proteoma skupljano po 9 frakcija te je kromatografija pomoću sustava nanoLC–MS/MS trajala 2 sata. Budući da je u prošlim

analizama bakterijskih proteoma pokazano da prva i deveta frakcija sadrže najmanje peptida, u daljnjim analizama bakterijskih proteoma sadržaj prve i devete frakcije je spojen prije analize sustavom nanoLC–MS/MS, čime je smanjeno ukupno vrijeme analize.

4.5. Primjena optimizirane metode

U optimiziranoj metodi za frakcionaciju je korišten gradijent SCX 04 te mobilne faze A (20 mmol dm^{-3} NH_4HCOO, 0,5% HCOOH) i B (500 mmol dm^{-3} NH_4HCOO, 0,5% HCOOH), pri čemu je tijekom frakcionacije jednostavnih proteoma skupljano po 9 frakcija, a tijekom frakcionacije složenih proteoma skupljano je po 16 frakcija. Svaka od frakcija jednostavnog proteoma analizirana je pomoću sustava nanoLC–MS/MS 2 sata, a svaka od frakcija složenog proteoma analizirana je 1 sat. Optimizirana metoda korištena je za provjeru ekspresije dupliciranih gena koji kodiraju za aaRS iz *H. aurantiacus* i *H. geysericola* te za provjeru ekspresije homologa aaRS i proteina nosača te analizu ekspresije gena koji pokazuju sintetiju s genima proteina nosača i homologa aaRS iz *A. fabrum*, *B. diazoefficiens*, *B. thuringiensis* 4AJ1 i 4CC1.

Kromatogrami frakcionacije peptida iz *H. aurantiacus* i *H. geysericola* prikazani su u dodatku, uz njih navedeni su i brojevi identificiranih proteina, jedinstvenih peptida i PSM–ova. Analizom proteoma *H. aurantiacus* identificirane su sve aaRS anotirane u genomu, uključujući i aaRS koji su kodirane dupliciranim genima (paralozi). Pokrivenost ArgRS iznosila 61%, dok je pokrivenost duplikata ArgRS iznosila 19%. Pokrivenost CysRS iznosila je 39%, dok je pokrivenost duplikata CysRS iznosila je 30%. Pokrivenost ProRS iznosila je 32%, dok je pokrivenost duplikata ProRS iznosila 46%. Bitno je napomenuti da su geni koji kodiraju dupliciranе aaRS često inducibilne ekspresije, odnosno nisu nužno oba paraloga eksprimirana. Zanimljivo je što je pokrivenost sekvenci gotovih svih duplikata aaRS niska, dok je pokrivenost duplikata ProRS, koja ne sadrži domenu za popravak, veća od pokrivenosti kanonske ProRS. Analizom proteoma *H. geysericola* dobiveni su slični rezultati, pri čemu je pokrivenost ArgRS iznosila 57%, a pokrivenost duplikata ArgRS iznosila je 21%. Pokrivenost CysRS iznosila je 39%, dok je pokrivenost duplikata CysRS iznosila 33%. Pokrivenost ProRS iznosila je 27%, dok je pokrivenost duplikata ProRS iznosila 36%. Niža pokrivenost sekvenca sugerira nisku razinu ekspresije, što je u skladu s očekivanjima jer paralozi aaRS vjerojatno obavljaju vrlo specifične zadatke, zbog čega i nije potrebna velika razina ekspresije duplikata aaRS.

Rezultati analize peptida iz *A. fabrum*, *B. diazoefficiens*, *B. thuringiensis* 4AJ1 i 4CC1 navedeni su u dodatku, uz njih prikazani su kromatogrami frakcionacije peptida. Analizom

proteoma *A. fabrum* identificirani su svi proteini koji pripadaju genskom klasteru, pri čemu je pokrivenost sekvence proteina–nosača iznosila 34% te je identificiran na temelju 7 jedinstvenih peptida, a pokrivenost sekvence homologa SerRS iznosila je 27% te je identificiran na temelju 8 jedinstvenih peptida (tablica 8). Na temelju ovih rezultata ne može se točno odrediti razina ekspresije gena koji pripadaju genskom klasteru, no može se zaključiti da je genski klaster eksprimiran u uvjetima analize.

Tablica 8 Rezultati analize proteina koji pripadaju klasteru proteina nosača i homologa SerRS iz *A. fabrum*

Protein	Pokrivenost sekvence / %	N (jedinstveni peptid)
Protein–nosač	34	7
Homolog SerRS	27	8
Acil–CoA dehidrogenaza	18	7
Hipotetski protein	19	6
β–manozidaza	18	12

Analizom proteoma *B. thuringiensis* 4AJ1 identificirani su protein–nosač i homolog aaRS iz prvog klastera, ali iz drugog klastera detektiran je samo homolog aaRS. Pokrivenost sekvence proteina–nosača iznosila je 17%, no identificiran je na temelju samo 2 jedinstvena peptida. Pokrivenost sekvence homologa aaRS iz istog klastera iznosila je 24% te je homolog identificiran na temelju 11 jedinstvenih peptida. Nadalje, pokrivenost sekvence homologa aaRS iz drugog klastera iznosila je 12%, ali je identificiran na temelju samo 4 jedinstvena peptida. Iz navedenih rezultata može se zaključiti da je prvi klaster eksprimiran u uvjetima analize. Uzevši u obzir da protein–nosač iz drugog klastera nije detektiran, te da je broj peptida koji pripadaju homologu aaRS iz drugog klastera značajno niži, može se zaključiti da je ekspresija gena koji sačinjavaju drugi klaster značajno niža.

Analizom proteoma *B. thuringiensis* 4CC1 detektirana su oba proteina koja pripadaju klasteru, pri čemu je pokrivenost sekvence proteina–nosača iznosila 39% te je identificiran na temelju 4 jedinstvena peptida, a pokrivenost sekvence homologa aaRS iznosila je 28% te je identificiran na temelju 14 jedinstvenih peptida. Prema navedenim rezultatima može se zaključiti da je klaster eksprimiran.

Analizom proteoma *B. diazoefficiens* detektirani su proteini samo iz prvog klastera, a iz drugog klastera nije detektiran niti jedan protein. Pokrivenost sekvence proteina–nosača iz prvog klastera iznosila je 19% te je identificiran na temelju jednog jedinstvenog peptida, a pokrivenost sekvence homologa SerRS iznosila je 27% te je identificiran na temelju 7 jedinstvenih peptida (tablica 9). Navedeni rezultati sugeriraju da je prvi klaster eksprimiran u uvjetima analize, a drugi klaster je vjerojatno eksprimiran u specifičnim, zasad nepoznatim uvjetima.

Tablica 9 Rezultati analize proteina koji pripadaju klasteru proteina nosača i homologa SerRS iz *B. diazoefficiens*

Protein	Pokrivenost sekvence / %	N (jedinstveni peptid)
Protein–nosač	19	1
Acil–CoA dehidrogenaza	37	13
Homolog SerRS	27	7
Hipotetski protein	13	3
Hipotetski protein	0	0

4.6. Perspektiva budućih istraživanja

Optimizacijom koraka predfrakcionacije peptida dobiveni su zadovoljavajući rezultati, no broj identificiranih proteina moguće povećati na još nekoliko načina. Broj identificiranih proteina moguće je dodatno povećati korištenjem druge tehnike odabira iona za fragmentaciju, poput DIA. U tehnici DIA fragmentiraju se svi ioni iz uzorka, pri čemu se dobivaju preklapajući spektri masa što otežava pretragu baza podataka algoritmima poput *Sequest*–a. Nedavno je razvijen algoritam *Chimerys*, koji je specijaliziran za pojednostavljenje preklapajućih spektra masa. Algoritam *Chimerys* također omogućuje istodobnu analizu podataka prikupljenim koristeći tehnike DDA i DIA. Povećavanjem broja prikupljenih frakcija dovelo bi do smanjenja složenosti smjese peptida u pojedinoj frakciji, što bi dovelo do većeg broja identificiranih peptida. Međutim, povećavanjem broja prikupljenih frakcija značajno se povećava vrijeme trajanja analize.

Nedavno je na tržište izašao spektrometar masa nazvan *Orbitrap Astral Mass Spectrometer*, koji uz orbitrap koristi novi analizator masa naziva Astral. U ovom spektrometru masa Orbitrap analizator masa se koristi samo za snimanje spektra mase cijelog uzorka, dok se Astral analizator masa koristiti za snimanje fragmentiranih iona. Budući da Astral analizator masa u puno kraćem vremenu snima MS-2 spektre, drastično se povećava brzina i skraćuje vrijeme analize pojedinog uzorka. Spektrometar masa *Orbitrap Astral* omogućuje identifikaciju gotovo cijelog proteoma u kraćem vremenu od metode koja je opisana u ovom radu. Međutim to ne umanjuje vrijednost ovog rada i prezentiranih rezultata, jer je spektrometar masa *Orbitrap Astral* vrlo skup te još uvijek nedostupan široj znanstvenoj i istraživačkoj zajednici.

§ 5. ZAKLJUČAK

Uspješno je razvijena i optimizirana metoda za identifikaciju proteina temeljena na predfrakcionaciji peptida i analizi peptida pomoću vezanog sustava nanoLC–MS/MS. Najbolji rezultati dobiveni su korištenjem gradijenta oznake SCX 04 (0 – 5% B 0,2 min; 5 – 10% B 3,8 min; 10 – 30% B 2 min; 30 – 100% B 1 min; 100% B 3 min) te mobilnih faza A (20 mmol dm^{-3} NH_4HCOO, 0,5% HCOOH) i B (500 mmol dm^{-3} NH_4HCOO, 0,5% HCOOH). Bakterijski proteomi bili su razdijeljeni u 9 frakcija te je svaka frakcija analizirana 2 sata sustavom nanoLC–MS/MS, a eukariotski proteomi bili su razdijeljeni u 16 frakcija te je svaka frakcija analizirana 1 sat, čime je dobiven optimalan omjer broja identificiranih proteina i vremena utrošenog na analizu.

Primjenom optimizirane metode broj identificiranih proteina iz *E. coli* povećao se za 50% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije, dok se broj jedinstvenih peptida i PSM–ova povećao za 107% i 257% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Frakcionacija je imala još veći utjecaj na analizu proteoma HeLa–stanica gdje se broj identificiranih proteina povećao za 92%, broj jedinstvenih peptida povećao se za 193%, a broj PSM–ova povećao se za 439% u odnosu na analizu bez prethodne frakcionacije. Najveći utjecaj na povećanje broja identificiranih proteina imala je optimizacija mobilnih faza A i B, pri čemu je složena smjesa peptida uspješno raspodijeljena u frakcije podjednake količine peptida.

Pokazano je da se paralozi aaRS iz *H. aurantiacus* i *H. geysericola* eksprimiraju, pri čemu je razina ekspresije svih homologa aaRS niska, osim ProRS koji pokazuje visoku razinu ekspresije. Također je pokazano da se svi geni u klasteru gena iz *A. fabrum*, *B. diazoefficiens*, *B. thuringiensis* 4AJ1 i 4CC1 eksprimiraju, iako je u nekim slučajevima pokrivenost sekvence pojedinačnih proteina niska. Međutim, kod *B. diazoefficiens* samo je jedan od genskih klastera bio aktivan, a drugi je vjerojatno inducibilan ili je aktivan samo pri zasad nepoznatim uvjetima.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Popis aminokiselina

Simbol	aminokiselina
Ala (A)	alanin
Cys (C)	cistein
Asp (D)	asparaginska kiselina
Glu (E)	glutaminska kiselina
Phe (F)	fenilalanin
Gly (G)	glicin
His (H)	histidin
Ile (I)	izoleucin
Lys (K)	lizin
Leu (L)	leucin
Met (M)	metionin
Asn (N)	asparagin
Pro (P)	prolin
Gln (Q)	glutamin
Arg (R)	arginin
Ser (S)	serin
Thr (T)	treonin
Val (V)	valin
Trp (W)	triptofan
Tyr (Y)	tirozin

aaRS – aminoacil–tRNA–sintetaza

BSA – albumin goveđeg seruma, engl. *Bovine Serum Albumine*

CID – kolizijom aktivirana disocijacija, engl. *Collision Induced Dissociation*

DAD – detektor s nizom fotodioda, engl. *Diode Array Detector*

DIA – engl. *Data Independent Acquisition*

DDA – engl. *Dana Dependent Acquisition*

ESI – ionizacija elektroraspršenjem, engl. *Electrospray Ionization*

FDR – engl. *False Discovery Rate*

HCD – disocijacija kolizijom visoke energije, engl. *Higher–Energy Collisional Dissociation*

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

LC–MS/MS – vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa

MALDI – matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem, engl. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

PRM – engl. *Parallel Reaction Monitoring*

PSM – engl. *Peptide Spectrum Match*

SDS – natrijev dodecilsulfat

SDS–PAGE – elektroforeza na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata

SCX – kromatografija jake kationske izmjene, engl. *Strong Cation Exchange*

TD – engl. *Target Decoy Validation*

UHPLC – tekućinska kromatografija vrlo visoke djelotvornosti

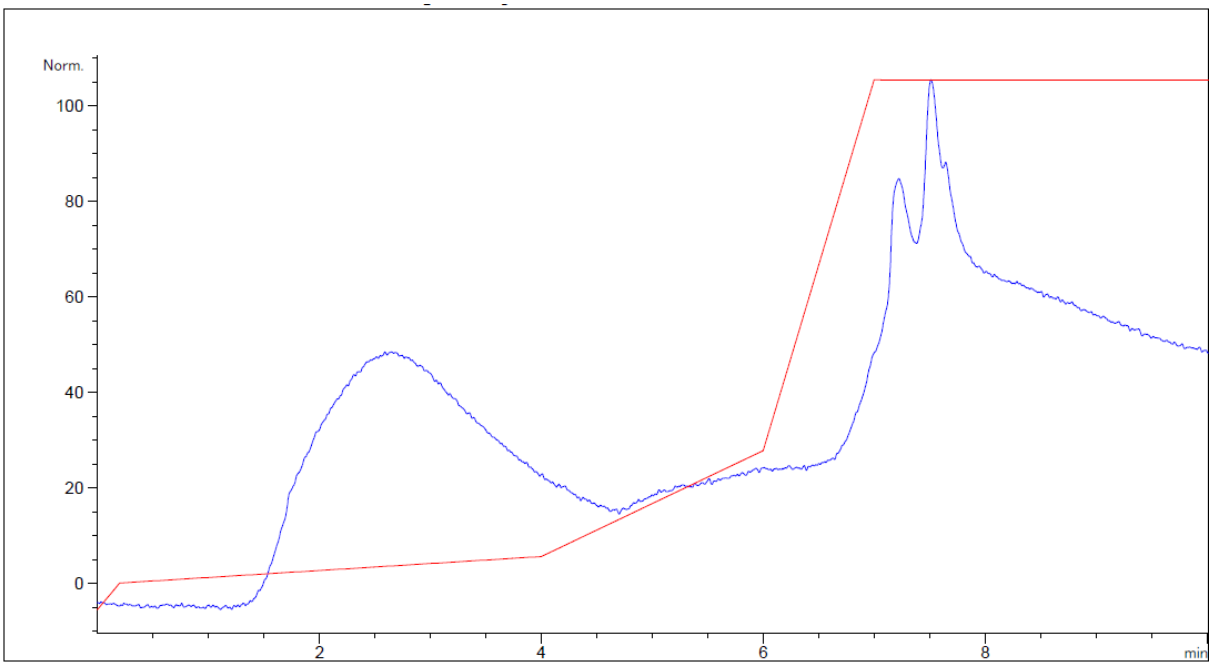
§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. R. Aebersold, M. Mann *Nature* **537** (2016) 347–355.
2. A. Martinez–Val, U. H. Guzmán, J. V. Olsen *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **121** (2022) 99–124.
3. J. B. Müller, P. E. Geyer, A. R. Colaco, P. V. Treit, M. T. Strauss, M. Oroshi, S. Doll. S. V. Winter, J. M. Bader, N. Köhler, F. Theis, A. Santos, M. Mann *Nature* **582** (2020) 592–596.
4. V. H. Wysocki, K. A. Resing, Q. Zhang, G. Cheng *Methods* **35** (2005) 211–222.
5. J. R. Wisniewski, A. Zougman, M. Mann *J. Proteome Res.* **8** (2009) 5674–5678.
6. Y. Zhang, B. R. Fonslow, B. Shan, M. C. Baek, J. R. Yates III *Chem. Rev.* **113** (2013) 2343–2394.
7. P. H. O-Farrel *JBC* **250** (1975) 4007–4027.
8. J. Klose *Humangenetik* **26** (1975) 231–234.
9. G. A. Scheele *JBC* **250** (1975) 5375–5385.
10. B. Aslam, M .Basit, M. A. Nisar, M. Khurshid, M. H. Rasool *JCS* **55** (2017) 182–196.
11. W. C. S. Cho *Genomics, Proteomics Bioinf.* **5** (2007) 77–85.
12. A. L. Richards, A. E. Merrill, J. J. Coon *Curr. Opin. In Chemical Biology* **24** (2015) 11–17.
13. D. C. Liebler, *Introduction to Proteomics Tools for the New Biology*, Humana Press, Totowa, (2002) str. 25–137.
14. M. P. Washburn, D. Wolters, J. R. Yates III *Nat. Biotechnol.* **19** (2001) 242–247.
15. D. B. Bekker–Jensen, C. D. Kelstrup, T. S. Batth, S. C. Larsen, C. Haldrup, J. B. Bramsen, K. D. Sørensen, S. Høyer, T. F. Ørntoft, C. L. Andersen, M. L. Nielsen, J. V. Olsen *Cell Syst.* **4** (2017) 587–599.
16. T. Huang, J. Wang, W. Yu, Z. He *Briefings Bioinf.* **13** (2012) 586–614.
17. N. A. Kulak, P. E. Geyer, M. Mann *Mol. Cell. Protemics* **16** (2017) 694–705.
18. Y. He, E. Shishkova, T. M. Peters–Clark, D. R. Brademan, M. S. Westphall, D. Bergen, J. Huang, R. Huguet, M. W. Senko, V. Zabruskov, G. C. McAlister, J. J. Coon *Anal. Chem.* **95** (2023) 10655–10663.

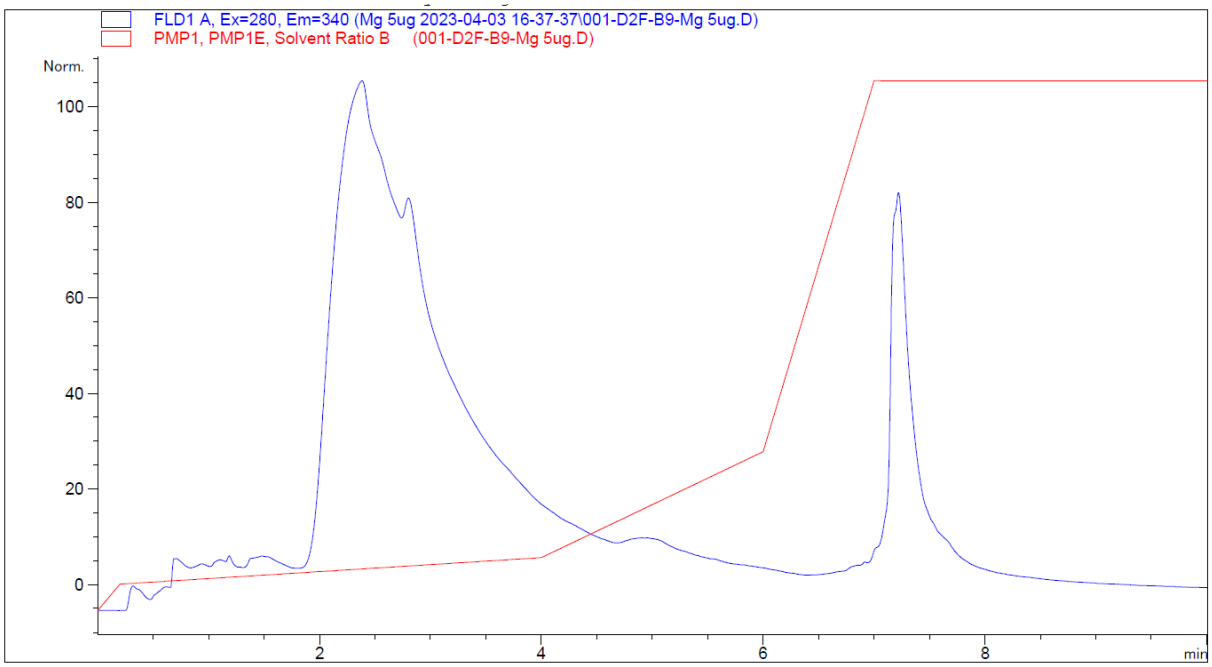
19. N. Galić *Spektrometrija Masa,* Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2004
20. S. Banerjee, S. Mazudmar *Int. J. Anal. Chem.* **2012** (2012) 1–41.
21. https://www.researchgate.net/publication/321319230_Insights_about_Advances_in_Chromatographic_Analysis_in_Complex_Environmental_Analytical_Matrices (datum pristupa 8. prosinca 2023.)
22. A. Michalski, E. Damoc, J. P. Hauschild, O. Lange, A. Wieghaus, A. Makarov, N. Nagaraj, J. Cox, M. Mann, S. Horning *Mol. Cell. Proteomics* **10** (2011) 1–13.
23. A. R. Johnson, E. E. Carlson *Anal. Chem.* **87** (2015) 10668–10678.
24. A. Horvatić, *Spektrometrija masa fragmenata peptidnih iona nastalih djelovanjem radikala*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 3–18.
25. J. Li, L. S. Smith, H. J. Zhu *Drug Discovery Today: Technol.* **39** (2021) 49–56.
26. https://www.creative-proteomics.com/blog/index.php/data-dependent-acquisition-and-data-independent-acquisition-mass-spectrometry/ (datum pristupa 8. prosinca 2023.)
27. N. Galić, V. Drevenkar *Kromatografija,* Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2006
28. B. Manadas, V. M. Mendes, J. English, M. J. Dunn *Expert Rev. Proteomics* **7** (2010) 655–663.
29. A. Jungbauer, R. Hahn *Methods Enzymol.* **463** (2009) 349–371.
30. T. L. Bihan, H. S. Duewel, D. Figeys *J. Am. Soc. Mass Spectrometry* **14** (2003) 719–727.
31. B. E. Boyes, M. W. Dong *LCGC North Am.* **36** (2018) 752–768.
32. J. K. Eng, B. Fischer, J. Grossmann, M. J. MacCoss *J. Proteome Res.* **7** (2008) 4598–4602.
33. J. Zhang, L. Xin, B. Shan, W. Chen, M. Xie, D. Yuen, W. Zhang, Z. Zhang, G. A. Lajoie, B. Ma *Mol. Cell. Proteomics* **11** (2011) 1–8.
34. V. Dorfer, P. Pichler, T. Stranzl, J. Stadlmann, T. Taus, S. Winkler, K. Mechtler *J. Proteome Res.* **13** (2014) 3679–3684.
35. J. Cox, N. Neuhaser, A. Michalski, R. A. Scheltema, J. V. Olsen, M. Mann *J. Proteome Res.* **10** (2011) 1794–1805.
36. R. J. Chalkley *J. Proteome Res.* **12** (2013) 1062–1064.
37. J. E. Elias, S. P. Gygi *Methods Mol. Biol.* **604** (2010) 55–71.

38. L. Käll, J. D. Storey, M. J. MacCoss, W. S. Noble *J. Proteome Res.* **7** (2008) 40–44.
39. L. Käll, J. D. Canterbury, J. Weston W. S. Noble, M. J. MacCoss *Nat. Methods* **4** (2007) 923–925.
40. M. A. R. Gomez, M. Ibba *Banbury Rep.* **26** (2020) 910–936.
41. M. Močibob, N. Ivić, S. Bilokapić, T. Maier, M. Luić, N. Ban, I. Weygand–Đurašević *PNAS* **107** (2010) 14585–14590.
42. H. Kiss, M. Nett, N. Domin, K. Martin, J. A. Maresca, A. Copeland, A. Lapidus, S. Lucas, K. W. Berry, T. G. Del Rio, E. Dalin, H. Tice, S. Pitluck, P. Richardson, D. Bruce, L. Goodwin, C. Han, J. C. Detter, J. Schmutz, T. Brettin, M. Land, L. Hauser, N. C. Kyrpides, N. Ivanova, M. Göker, T. Woyke, H. P. Klenk, D. A. Bryant *Stand. Genomic Sci.* **5** (2011) 356–370.
43. J. G. Holt, R. A. Lewin *J. Bacteriol.* **95** (1968) 2407–2408.
44. L. M. Ward, J. Hemp, L. A. Pace, W. W. Fischer *Microbiol. Resour. Announce.* **3** (2015) 1–2.
45. M. Ibba, C. Francklyn, S. Cusak, *The Aminoacyl–tRNA Synthetases*, Landes Bioscience, Georgetown, (2005), str. 149–162.

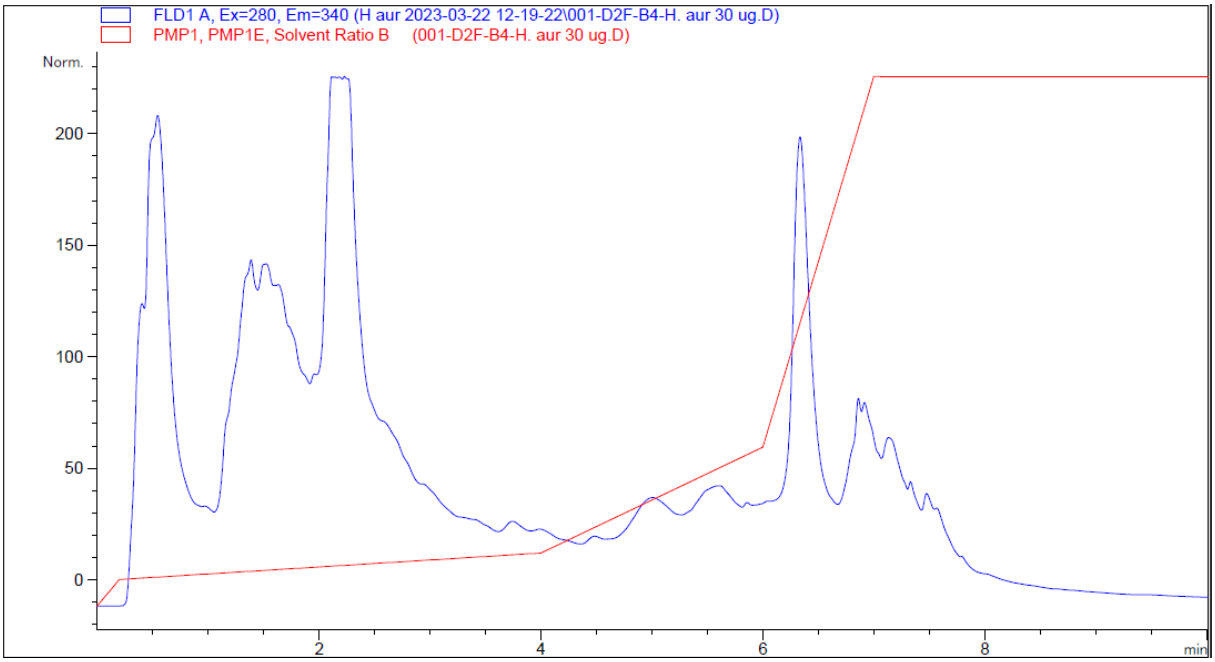
§ 8. DODATAK



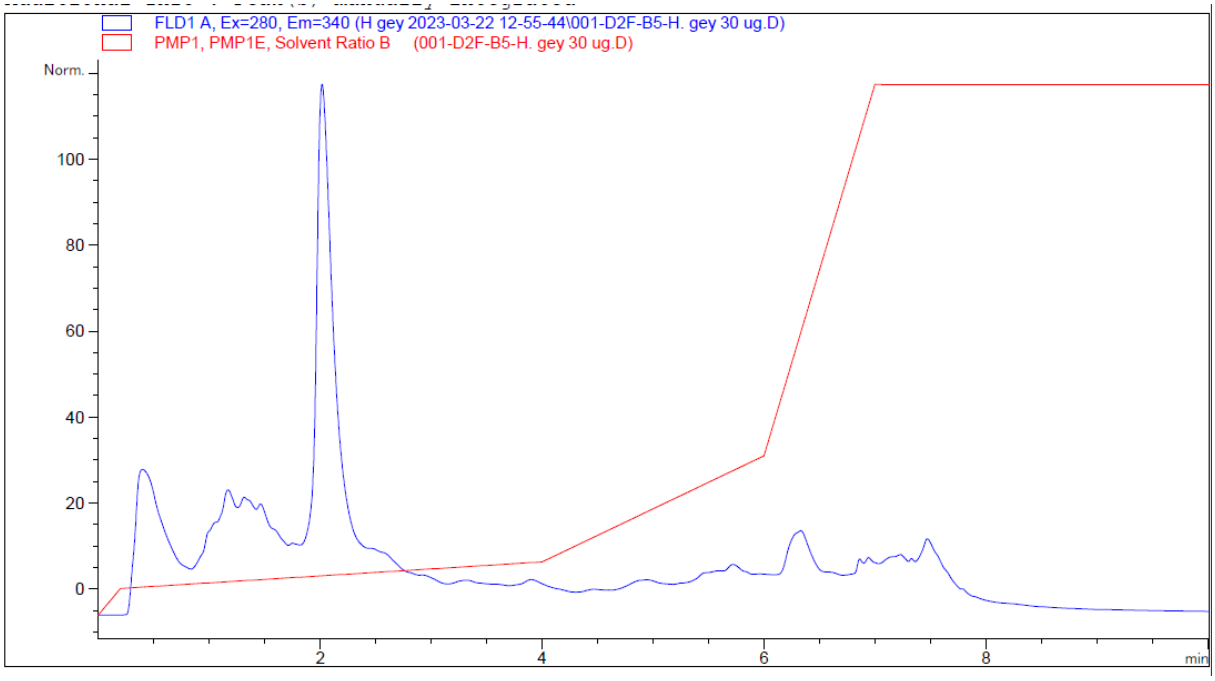
Slika D 1 Kromatogram frakcionacije peptida iz hemoglobina gradijentom SCX 04 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji



Slika D 2 Kromatogram frakcionacije peptida iz mioglobina gradijentom SCX 04 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji



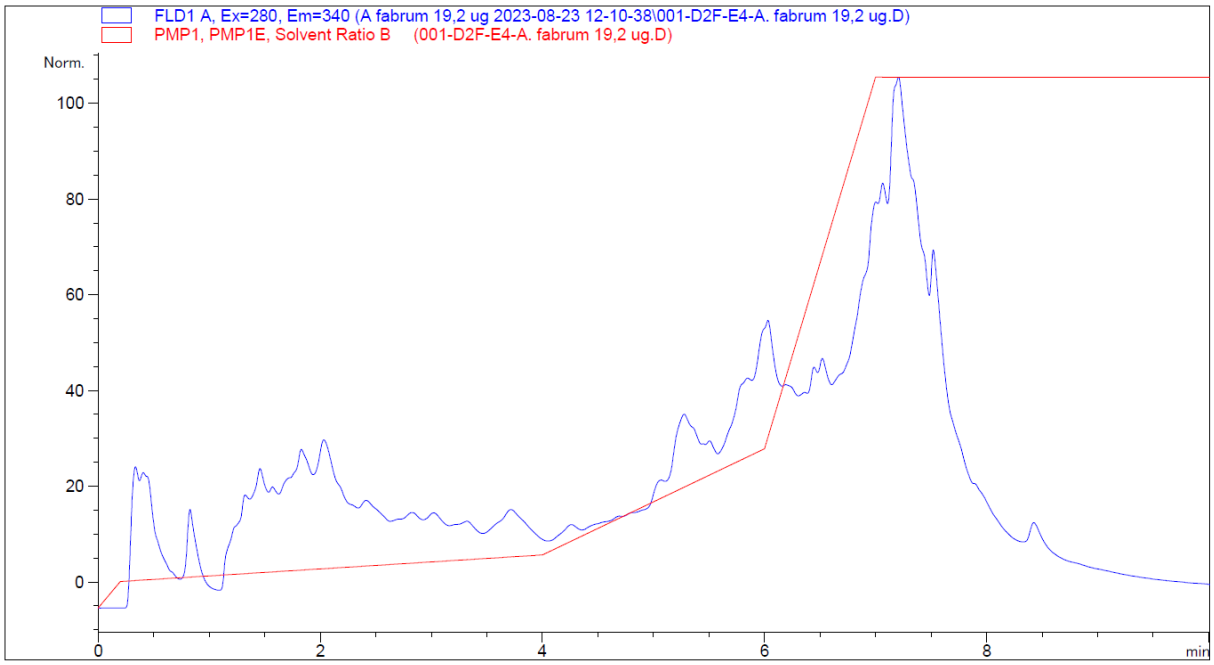
Slika D 3 Kromatogram frakcionacije peptida iz *H. aurantiacus* gradijentom SCX 04(crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji



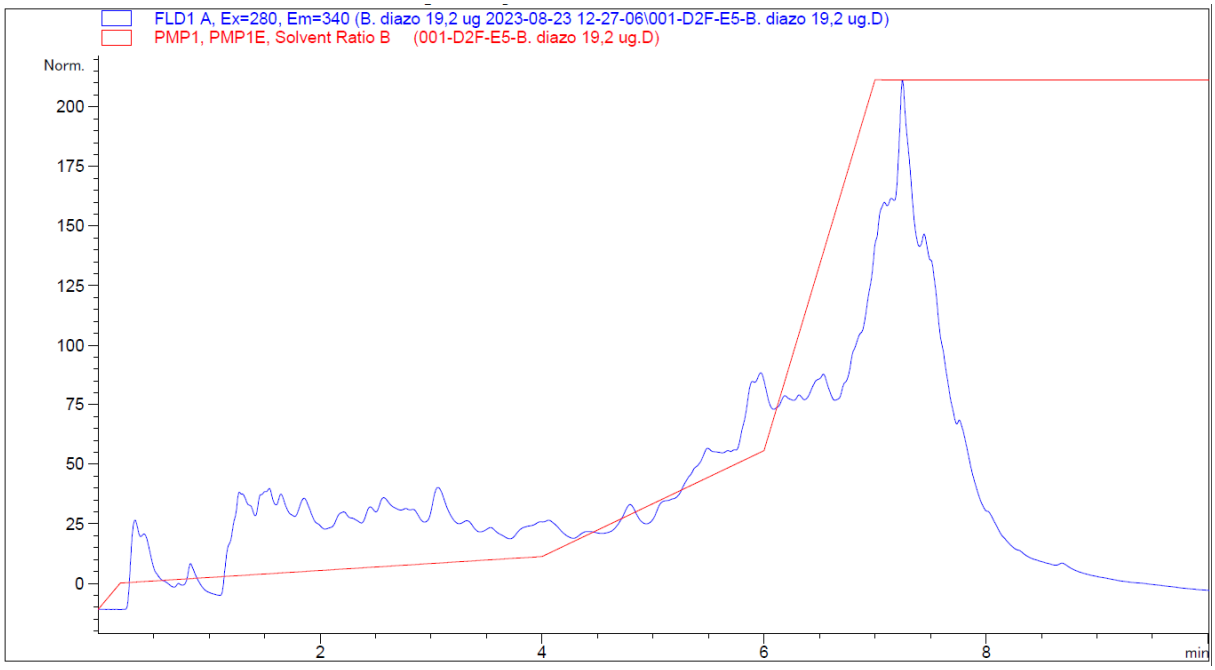
Slika D 4 Kromatogram frakcionacije peptida iz *H. geysericola* gradijentom SCX 04(crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

Tablica D 1 Rezultati analize peptida iz *H. aurantiacus* i *H. geysericola*

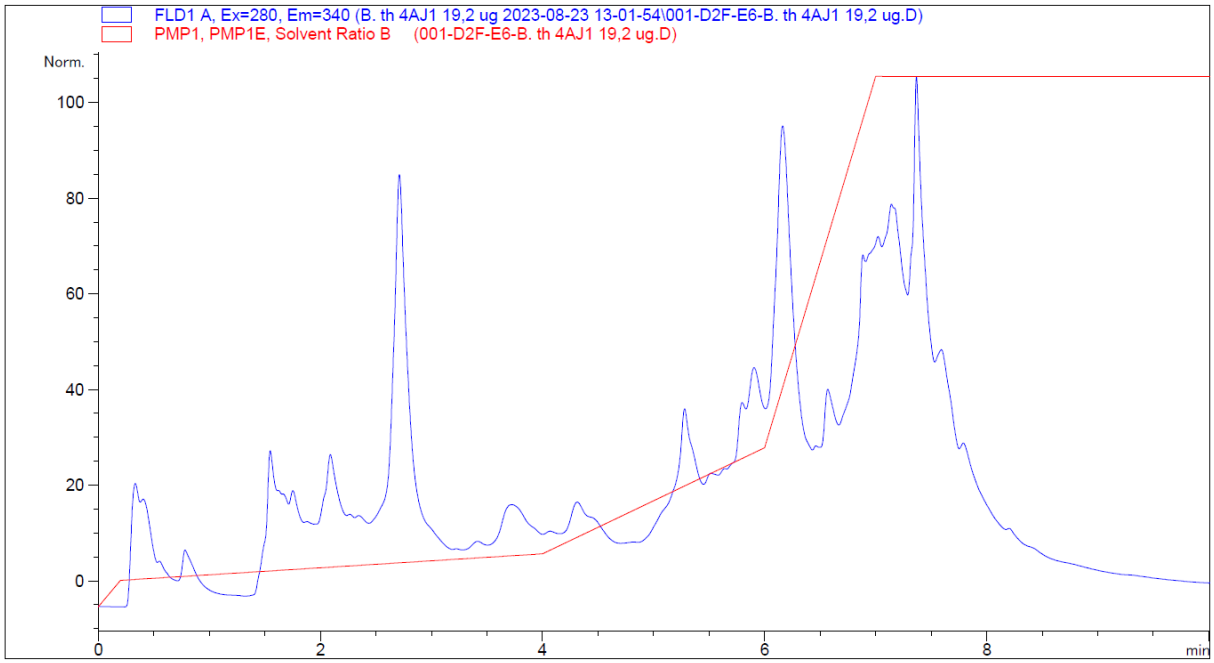
	N (identificirani proteini)	**N (jedinstveni peptidi)**	**N (PSM)**
H. aurantiacus	3352	25726	68177
H. geysericola	3451	25733	67134



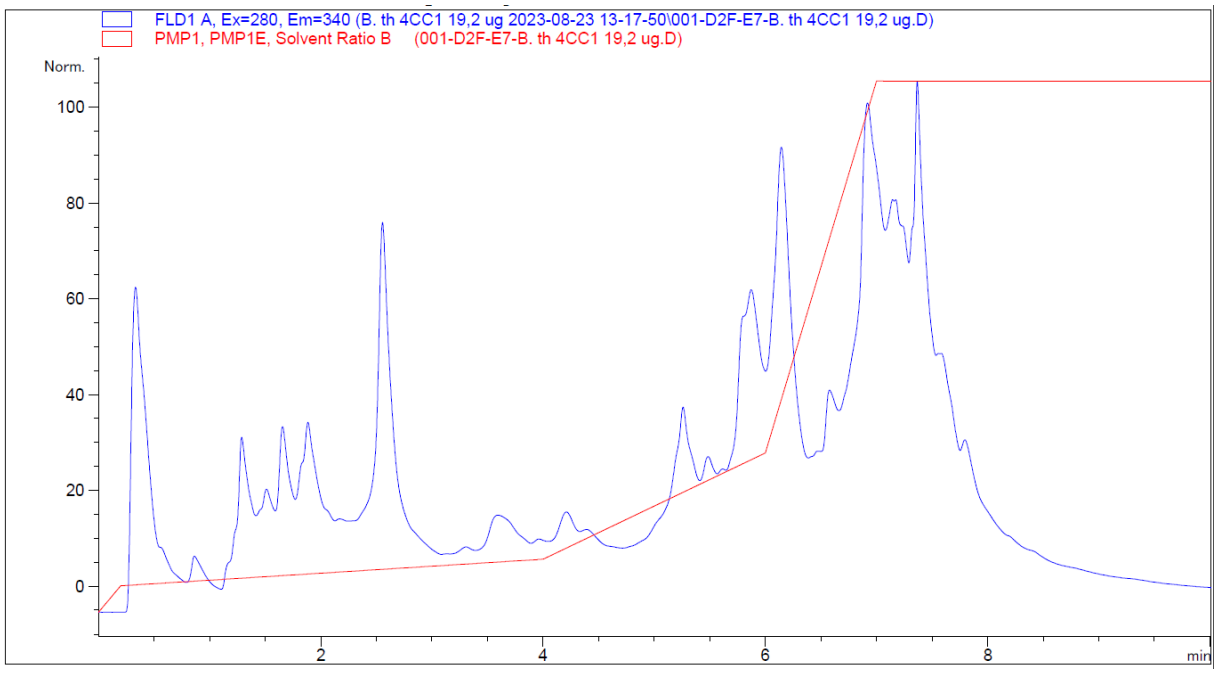
Slika D 5 Kromatogram frakcionacije peptida iz *A. fabrum* gradijent SCX 04(crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji



Slika D 6 Kromatogram frakcionacije peptida iz *B. diazoefficiens* gradijentom SCX 04 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji



Slika D 7 Kromatogram frakcionacije peptida iz *B. thuringiensis* 4AJ1 gradijentom SCX 04 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji



Slika D 8 Kromatogram frakcionacije peptida iz *B. thuringiensis* 4CC1 gradijentom SCX 04 (crveno), signal fluorimetrijskog detektora s valnom duljinom pobude od 280 nm i valnom duljinom emisije od 340 nm prikazan je u plavoj boji

	N (identificirani proteini)	N (jedinstveni peptidi)	N (PSM)
A. fabrum	3579	32116	165830
B. diazoefficiens	5135	51083	191282
***B. thuringiensis* 4AJ1**	3125	26464	141790
***B. thuringiensis* 4CC1**	2911	25776	138835

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Dominik Prišćan

Datum rođenja: 24. travnja 1997.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2004–2012	Osnovna škola Vladimira Nazora, Zagreb
2012–2016	Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb
2016–2021	Preddiplomski studij Kemija, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015	Znanstveni piknik
2017–2019	Otvoreni dan kemije

Sudjelovanja na edukacijskim i znanstvenim radionicama

1. *Proteome Discoverer Workshop*, *Thermo Scientific*, 17–19. siječnja 2023.
2. *Native Mass Spectometry for Structural Biology*, *Protein Society*, 15. ožujka 2023.
3. *Proteome Discoverer Training Workshop*, *Thermo Scientific*, 5–7 rujna 2023.