

# Razvoj metode spektrometrije masa temeljene na podatkovno neovisnoj akviziciji za identifikaciju serumskih biomarkera lišmanioze u pasa

---

Popović, Marin

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:333060>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Marin Popović

**Razvoj metode spektrometrije masa temeljene  
na podatkovno neovisnoj akviziciji za  
identifikaciju serumskih biomarkera lišmanioze  
u pasa**

**Diplomski rad**

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

Zagreb, 2018.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za proteomiku Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom Dr. sc. Anite Horvatić. Nastavnica imenovana od strane Kemijskog odsjeka je Doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Europske komisije pod nazivom FP7 ERA Chair projekt „VetMedZg”, Upgrading the research performance in molecular medicine at the Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb (#621394).



## Zahvale

*Zahvaljujem se Prof. dr. sc. Vladimiru Mrljaku, koji je odobrio izradu ovog diplomskog rada u Laboratoriju za proteomiku Veterinarskog fakulteta.*

*Najviše se zahvaljujem, mojoj mentorici, Dr. sc. Aniti Horvatić, na pomoći i savjetima od prvog pipetiranja do ispravka ispravka diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se djelatnicima Laboratorija za proteomiku na ugodnom društvu.*

*Zahvaljujem se Doc. dr. sc. Franji Martinkoviću na pribavljenim arhivskim uzorcima i serološkoj obradi uzoraka, kao i na korisnim savjetima tijekom pisanja rada.*

*Zahvaljujem se Doc. dr. sc. Marku Močibobu i Doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec na pronalasku laboratorija za izradu diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se Doc. dr. sc. Aleksandri Maršavelski na detaljnom ispravku i savjetima pri pisanju završne verzije rada.*

*Zahvaljujem se mami i tati.*

*Posebno se zahvaljujem teti Mariji i tetku Ljudevitu na osiguranom smještaju tijekom studiranja.*

*Na kraju, se zahvaljujem dragim kolegicama i kolegama, koji su mi uljepšali i olakšali studiranje.*



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Kromatografske tehnike u proteomici .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Osnove.....	3
2.1.2. Tekućinska kromatografija obrnutih faza .....	4
2.1.3. Kromatografija na jakim kationskim izmjenjivačima .....	5
<b>2.2. Spektrometrija masa u proteomskim istraživanjima .....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Spektrometar masa.....	5
2.2.2. Elektoraspršenje i njegova primjena u vezanom sustavu LC-MS.....	6
2.2.3. Fragmentacija peptida.....	8
2.2.4. Analizatori masa .....	10
2.2.5. Spektrometri masa temeljeni na Orbitrap tehnologiji.....	11
<b>2.3. Proteomski pristupi temeljeni na spektrometriji masa .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4. Priprava uzorka za proteomska istraživanja temeljena na spektrometriji masa .....</b>	<b>13</b>
2.4.1. Digestija proteina .....	14
2.4.2. Upotreba (mikro)ekstrakcije na čvrstoj fazi u pročišćavanju uzoraka .....	15
2.4.3. ProteoMiner.....	16
<b>2.5. Identifikacija proteina spektrometrijom masa.....</b>	<b>16</b>
2.5.1. Strategije identifikacije proteina.....	16
2.5.2. Predobrada spektra masa i pretraživanje baza podataka .....	17
2.5.3. Podjela kvantifikacijskih metoda obzirom na vrstu kvantifikacije.....	18
<b>2.6. Podatkovno neovisna akvizicija (DIA) .....</b>	<b>19</b>
2.6.1. Kratka povijest DIA-e .....	19
2.6.2. Osnove.....	19
<b>2.7. Analiza podataka dobivenih podatkovno neovisnom akvizijom.....</b>	<b>21</b>
2.7.1. Spectronaut .....	21
2.7.1. Prikaz rezultata kvantitativne proteomske analize.....	22
2.7.2. Bioinformatička analiza proteomskih rezultata primjenom genske ontologije.....	23
<b>2.8. Biomarkeri.....</b>	<b>24</b>
2.8.1. Definicija biomarkera .....	24



2.8.2. <i>Plazma kao izvor biomarkera</i> .....	24
<b>2.9. Lišmanioza</b> .....	<b>25</b>
2.9.1. <i>Općenito i značaj bolesti</i> .....	25
2.9.2. <i>Razvojni ciklus uzročnika</i> .....	26
2.9.3. <i>Simptomi lišmanioze</i> .....	26
2.9.4. <i>Dijagnoza, liječenje, prevencija i kontrola bolesti</i> .....	27
2.9.5. <i>Lišmanioza u Republici Hrvatskoj</i> .....	28
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1. Kemikalije, setovi, instrumenti i ostala pomagala</b> .....	<b>29</b>
3.1.1. <i>Kemikalije</i> .....	29
3.1.2. <i>Komercionalni setovi</i> .....	29
3.1.3. <i>Instrumenti</i> .....	31
3.1.4. <i>Računalni programi za obradu podataka</i> .....	31
3.1.5. <i>Ostala pomagala</i> .....	31
3.1.6. <i>Otopina za kalibraciju spektrometra masa</i> .....	31
<b>3.2. Arhivski uzorci plazme pasa</b> .....	<b>32</b>
<b>3.3. Priprava uzoraka za povećanje broja proteina u spektralnim knjižnicama</b> .....	<b>33</b>
3.3.1. <i>Plan pripreme smjese uzorka</i> .....	33
3.3.2. <i>ProteoMiner</i> .....	35
3.3.3. <i>Microcon<sup>®</sup> 10</i> .....	35
3.3.4. <i>Digestija uzorka nakon ProteoMiner-a i analiza spektrometrijom masa</i> .....	36
3.3.5. <i>Kromatografija obrnutih faza primjenom punila C18</i> .....	36
3.3.6. <i>SCX</i> .....	37
<b>3.4. Određivanje koncentracije proteina analizom BCA</b> .....	<b>37</b>
3.4.1. <i>Priprava razrijeđenih standarda albumina iz goveđeg seruma (BSA)</i> .....	38
3.4.2. <i>Procedura na mikropločama</i> .....	39
<b>3.5. Digestija proteina</b> .....	<b>39</b>
<b>3.6. Analiza DDA</b> .....	<b>39</b>
<b>3.7. Analiza DIA</b> .....	<b>41</b>
<b>3.8. Kreiranje spektralnih knjižnica</b> .....	<b>43</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1. Glavni rezultati</b> .....	<b>44</b>
<b>4.2. Kreiranje spektralnih knjižnica</b> .....	<b>44</b>
<b>4.3. Razvoj DIA metode</b> .....	<b>46</b>
4.3.1. <i>Odabir raspona masa</i> .....	46
4.3.2. <i>Optimizacija ostalih parametara analize MS</i> .....	48

---

<b>4.4. Primjena metode DIA na kliničkim arhivskim uzorcima .....</b>	<b>50</b>
<i>4.4.1. Analiza podataka primjenom programa Spectronaut .....</i>	<i>50</i>
<i>4.4.2. Bioinformatička analiza podataka .....</i>	<i>52</i>
<b>4.5. Uloga potencijalnih biomarkera lišmanioze u pasa .....</b>	<b>54</b>
<b>4.6. Rasprava o potencijalnim biomarkerima lišmanioze .....</b>	<b>56</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>61</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>63</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>66</b>
<b>§ 8. DODATAK.....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXIV</b>





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

Razvoj metode spektrometrije masa temeljene na podatkovno neovisnoj akviziciji za identifikaciju serumskih biomarkera lišmanioze u pasa

Marin Popović

Lišmanioze su u mnogim krajevima svijeta postale zaboravljene tropske bolesti, no ponajviše klimatske promjene uzrokuju širenje bolesti na nova područja gdje do sada nisu bile zabilježene. Uzročnici ovih bolesti su različite vrste bičaća iz roda *Leishmania*, a prenose ih različite vrste sitnih insekata, koji se u Hrvatskoj zovu papatači. Težina bolesti varira od subkliničkih do vrlo teških oblika, a vrlo rijetko invazije mogu završiti i smrtno. Psi su rezervoari uzročnika, a ljudi slučajne žrtve. Zbog toga je važno je pravovremeno dijagnosticirati bolest i liječiti invadirane životinje.

Imajući na umu navedeno, kvantitativni proteomski pristup visoke rezolucije primijenjen je za profiliranje proteoma seruma pasa. Razvijena je metoda spektrometrije masa temeljena na podatkovno neovisnoj akviziciji (DIA) te testirana na kliničkim arhivskim uzorcima seruma kontrolne skupine (zdravih) i bolesnih pasa (kojima je serološkim metodama dijagnosticirana lišmanioza). Nova metoda DIA je brza, jednostavna i osjetljivija te omogućuje identifikaciju potencijalnih biomarkera lišmanioze u pasa.

(72+XXIV stranica, 13 slika, 10+11 tablica, 100 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: biomarkeri, lišmanioza pasa, podatkovno neovisna akvizicija, proteomika, spektrometrija masa temeljena na Orbitrap tehnologiji

Mentorica: Dr. sc. Anita Horvatić, zn. sur.

Nastavnica (imenovana od strane Kemijskog odsjeka): Doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Ocjenitelji:

1. Doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
2. Izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
3. Prof. dr. sc. Davor Kovačević

Zamjena: Doc. dr. sc. Morana Dulić

Datum diplomskog ispita: 26. rujna 2018., u Zagrebu





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

Development of mass spectrometry method based on data independent acquisition for identification of serum biomarkers in canine leishmaniasis

Marin Popović

Leishmaniasis is one of the most dangerous neglected tropical diseases which has (re)-emerged in many geographic regions, mostly due to climatic changes. It is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, transmitted by the bite of a female phlebotomine sandfly. The severity of disease may vary from non-symptomatic to fatal. Infected dogs are the main reservoir for human infection. Due to its zoonotic potential, it is very important to diagnose the disease, and treat infected animals.

Within this aim, the high-resolution quantitative proteomic approach has been employed for canine serum proteome profiling. The mass spectrometry (MS) method based on data independent acquisition (DIA) was developed and tested using clinical samples - serum of healthy and *Leishmania*-infected dogs. The new DIA MS method is simple, fast and more sensitive, and provides a detailed insight into canine serum proteome, enabling the identification of potential biomarkers for canine leishmaniasis.

(72+XXIV pages, 13 figures, 10+11 tables, 100 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: biomarkers, canine leishmaniasis, data independent acquisition, mass spectrometry based on Orbitrap technology, proteomics

Mentor: Dr. Anita Horvatić, Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor
2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
3. Dr. Davor Kovačević, Professor

Substitute: Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Date of exam: on September 26<sup>th</sup> 2018., in Zagreb

**Marin Popović**

*Diplomski rad*



## § 1. UVOD

Otac proteomike Marc Wilkins 1994. definirao je proteom kao proteinski komplement genomu i time simbolično označio pomak s proučavanja uloge gena na proteine i njihove modifikacije tijekom definiranja svojstava fenotipa u zdravlju i bolesti.<sup>1</sup> Proteomika se može podijeliti na proteomiku koristeći poliakrilamidni gel i proteomiku bez upotrebe gela. Najzastupljenija metoda proteomike bez upotrebe gela temelji se na upotrebi vezanog sustava tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti povezane s tandemnom spektrometrijom masa, (UHP)LC-MS/MS.<sup>2</sup> Navedena metoda se zasniva na razdvajanju peptida na kromatografskoj koloni, nakon čega se ioniziraju elektroraspršenjem te uvode u spektrometar masa.<sup>3,4</sup> Peptidni ioni se fragmentiraju u kolizijskoj čeliji, da bi se u konačnici dobio spektar masa koji sadrži intenzite signala te omjer mase i naboja ( $m/z$ ) fragmenta peptidnih iona. Dobiveni spektar masa se potom analizira upotrebom specijaliziranih računalnih programa.<sup>5</sup>

Postupkom podatkovno ovisne akvizicije (DDA, engl. *Data Dependent Acquisition*) provodi se većina kvalitativnih i kvantitativnih proteomskih analiza tehnikama spektrometrije masa. Navedenim pristupom se iz spektra masa (MS1) odabire određeni broj peptidnih iona najjačeg intenziteta, nakon čega samo odabrani ioni budu podvrgnuti daljnoj fragmentaciji.<sup>6</sup> Pristupom DDA najčešće se ne mogu detektirati nisko zastupljeni peptidi i proteini bez kompleksnih metoda pripreme uzoraka ili multidimenzionalne tehnologije za identifikaciju proteina, što otežava identifikaciju serumskih biomarkera koji su najčešće proteini niske zastupljenosti.<sup>7,8</sup> Za razliku od DDA, primjenom podatkovno neovisne akvizicije (DIA, engl. *Data Independent Acquisition*) dolazi do fragmentacije svih iona u spektru masa MS1 neovisno o njihovoj zastupljenosti, što omogućava znatno bržu i efikasniju identifikaciju i kvantifikaciju većeg broja proteina uz jednostavniju pripremu uzorka.<sup>9,10</sup>

Lišmanioze su bolesti od izrazitog značaja u humanoj i veterinarskoj medicini koje su proširene po cijelom svijetu. Uzročnici su različite vrste bičasa iz roda *Leishmania* (porodica Trypanosomatidae), a prenose ih različite vrste sitnih insekata, tj. papatača.<sup>11</sup> Autohtoni uzročnik lišmanioze na području Republike Hrvatske je *Leishmania infantum* od koje obolijevaju ljudi i psi, pri čemu su psi i rezervoari uzročnika. Kako bi se spriječio pobol pasa i ljudi, važno je pravovremeno dijagnosticirati bolest, liječiti sero-pozitivne i bolesne životinje



te primjenjivati preventivu. Primjena kvantitativne analize proteoma seruma zdravih i oboljelih pasa doprinjet će pronalasku potencijalnih serumskih biomarkera za dijagnostiku i kontrolu terapije te boljem razumijevanju same bolesti.<sup>12</sup>

Cilj rada je razvoj nove metode primjenom vezanog sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije masa za analizu proteina seruma pasa proteomskim pristupom temeljenim na podatkovno neovisnoj akviziciji, koja će biti korištena za pronalazak potencijalnih biomarkera lišmanioze u pasa, a provest će se u nekoliko koraka. Prvi korak je kreiranje spektralnih knjižnica koje će sadržavati tandemne spektre masa peptidnih iona identificiranih pristupom DDA (podatke o ionima fragmentima, intenzitetima, relativnom retencijskom vremenu i sl.) iz uzoraka koji će se koristiti u istraživanju. Drugi korak je identifikacija i relativna kvantifikacija proteina seruma kontrolne skupine (zdravih) i bolesnih pasa (kojima je serološkim metodama dijagnosticirana lišmanioza) koristeći proteomski pristup DIA. Treći korak je bioinformatička analiza rezultata (genska ontologija) u svrhu identifikacije potencijalnih biomarkera lišmanioze u pasa.

U svrhu kreiranja spektralnih knjižnica, proteini seruma bez uklanjanja najzastupljenijih proteina, kao i oni separirani afinitetnom kromatografijom te kromatografijom ionske izmjene, bit će analizirani spregnutim sustavom tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS) pristupom DDA. Optimizacijom parametara analize LC-MS/MS bit će kreirana metoda DIA koja će se koristiti za identifikaciju potencijalnih biomarkera lišmanioze usporedbom uzoraka seruma zdravih (N=5) i bolesnih pasa (N=5). Obrada podataka obuhvaćat će automatiziranu dekonvoluciju, identifikaciju, relativnu kvantifikaciju i statističku analizu. Bioinformatička analiza proteomskih rezultata, točnije genska ontologija, bit će provedena koristeći javno dostupne bioinformatičke alate (The Database for Annotation, Visualization and Integrate Discovery, DAVID).

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kromatografske tehnike u proteomici

#### 2.1.1. Osnove

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga se kreće u određenom smjeru. S obzirom na mehanizam odvajanja, najzastupljeniji je mehanizam razdjelne kromatografije (kromatografija obrnutih faza) koji se primjenjuje za separaciju peptida. Za pripravu uzoraka proteomskim pristupom najčešće se koriste ionsko-izmjenjivačka kromatografija, kromatografija isključenjem i afinitetna kromatografija.<sup>13</sup>

U proteomici se većinom koristi kolonska tekućinska kromatografija [(tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *High-Performance Liquid Chromatography*)] ili [tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC, engl. *Ultra High Performance Liquid chromatography*)], jer je plinska kromatografija nepovoljna za nehlapljive termički nestabilne molekule kao što su peptidi i proteini. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti se provodi pri tlakovima do 400 bara i brzini protoka od 0,1 do 10 mL/min, uporabom pumpi i specifičnog sustava za unošenje uzoraka. Kolone za ovu vrstu kromatografije izrađene su od čeličnih cijevi duljine 10 do 30 cm s promjerom zrna punila 5 do 10  $\mu\text{m}$ . Upotreba mikrokolona punjenih zrcima promjera 3-5  $\mu\text{m}$  omogućavabržu analizu i manju potrošnju otapala. Punilo može biti silikagel, glinica, porozni polimer ili ionski izmjenjivač.<sup>13</sup> Kod tehnike UHPLC, koja se koristi u „omičkim” studijama, čestice punila su znatno manje (od 2  $\mu\text{m}$ ), a dozvoljeni tlakovi na koloni iznose 9000 do 15000 psi (600-1000 bara)<sup>14</sup> (moguće do 1400 bara)<sup>14,15</sup> čime se dobiva veća kromatografska rezolucija u usporedbi s HPLC-om. UHPLC pokazuje značajne prednosti naspram HPLC, kao što su brzina te veća osjetljivost.<sup>16</sup> Oznaku UPLC (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*) nose instrumenti tvrtke Waters koja je 2004. patentirala ovaj naziv. UPLC i UHPLC su zapravo dva naziva za istu kromatografsku tehniku.<sup>17</sup>

Instrument za HPLC ili UHPLC sastoji se od spremnika mobilne faze i sustava za obradu otapala, crpnog sustava, sustava za unošenje uzorka, pretkolone, kolone, detektora i sustava za obradu podataka.<sup>13</sup>

Separacija se u kromatografskom sustavu odvija procesom elucije. Eluiranje može biti izokratno, gradijentno ili stupnjevito. Izokratno eluiranje se u principu ne koristi u proteomskom istraživanjima. Rezultati kromatografske analize mogu se pokazati u obliku kromatograma koji se može koristiti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Položaj pika na vremenskoj osi može poslužiti za identifikaciju sastojaka, a iz površine ispod pika može se izračunati količina svakog pojedinog sastojka.<sup>13,18</sup>

### *2.1.2. Tekućinska kromatografija obrnutih faza*

Tekućinska kromatografija obrnutih faza je vrsta razdjelne kromatografije koja se odlikuje nepolarnom stacionarnom fazom, dok je mobilna faza polarna. Najpolarnijakomponenta se eluira prva, a povećanjem polarnosti mobilne faze produžuje se vrijeme elucije. Navedena metoda je reproducibilna, dobre rezolucije, visoke separacije i efikasnosti. Eluens se može analizirati direktno ako je tekućinski kromatograf spojen sa spektrometrom masaupotrebom elektroraspršenja, ili se eluat skuplja zasebno radi kasnije analize.<sup>5,13</sup>

Stacionarna faza se obično sastoji od modificiranog silikagela. Silanolne skupine na površini silikagela mogu reagirati s alkilklorosilanima pri čemu nastaju siloksani (Si-O-Si) kao kemijski vezane faze. Najčešće alkilne skupine vezane na silikagel su C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> i C<sub>18</sub>. C<sub>18</sub> se najčešće koristi za kromatografiju obrnutih faza peptida u proteomskoj analizi. Za razliku od silanolnih, mogu se koristiti i fenilne grupe.<sup>5,13</sup>

Kao mobilna faza se u kromatografiji obrnutih faza koristi mješavina dvije otopine, koje se prema konvenciji zovu A i B. Otopina A je obično voda s malom količinom organske kiseline (najčešće 0,1% mravlja kiselina ako se koristi vezani sustav LC-MS). Otopina B je uglavnom organsko otapalo (npr. 80% acetonitril, 0,1% mravlja kiselina i voda). Peptidi se eluiraju povećanjem udjela organskog otapala (pri oko 60% organskog otapala svi peptidi su eluirani sa stacionarne faze).<sup>5</sup>

### 2.1.3. Kromatografija na jakim kationskim izmjenjivačima

Kromatografija na jakim kationskim izmjenjivačima (SCX, engl. *Strong Cation Exchange Chromatography*) je vrsta kromatografije ionske izmjene i temelji se na različitom afinitetu sastojaka smjese prema ionskoj izmjeni. SCX obuhvaća anionsku stacionarnu fazu, najčešće modificiranu skupinu sulfonske kiseline ( $-\text{SO}_3\text{H}^+$ ). Uzorak peptida se uvodi u kolonu pri niskom pH otopine (pH 3-3,5). Peptidi će biti pozitivno nabijeni i reagirat će s negativno nabijenom stacionarnom fazom. Nenabijeni peptidi i druge komponente uzorka neće se vezati na stacionarnu fazu i bit će isprani s kolone. Separacija peptida postiže se povećanjem ionske jakosti (dodatkom soli) uz konstantan pH. Alternativno se može provesti gradijentna promjena pH mobilne faze. Time se mijenja naboj peptida i pri određenom pH povećan broj negativnih naboja. Smanjen broj pozitivnih naboja uzrokovat će otpuštanje peptida sa stacionarne faze.<sup>5</sup>

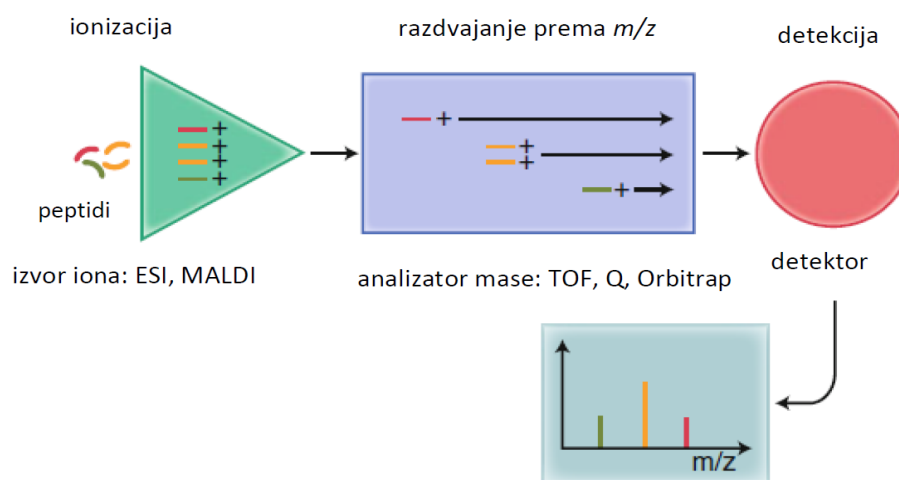
Za razliku od kromatografije obrnutih faza, kromatografija na jakim kationskim izmjenjivačima ne spaja se direktno na spektrometar masa zbog toga što mobilna faza sadrži soli koje ometaju ionizaciju.<sup>5</sup>

## 2.2. Spektrometrija masa u proteomskim istraživanjima

### 2.2.1. Spektrometar masa

Spektrometar masa se smatra najmanjom vagom na svijetu, zbog toga što mjeri masu molekula, točnije iona pri čemu nastaje spektar masa – prikaz odnosa intenziteta iona u odnosu na omjer mase i naboja,  $m/z$ . Spektrometrijom masa moguće je odrediti točnu masu analita, a time i elementarni sastav istog. Također je moguće generirati i detektirati fragmente molekulskih iona koji odgovaraju određenim grupama atoma i predstavljaju određene strukturne elemente. Spektrometrija masa se uspješno primjenjuje u slučajevima kada su za analizu dostupne male količine uzorka, kao što je najčešće slučaj u proteomici.<sup>19,20</sup>

Spektrometar masa (Slika 1.) se sastoji se od izvora iona, analizatora masa i detektora. U izvoru iona dolazi do ionizacije molekula u plinovitom stanju u molekularne ione koji se u analizatoru masa odvajaju na temelju razlike u omjeru mase i naboja. Detektor pretvara broj iona pri svakoj vrijednosti omjera  $m/z$  u električni signal, koji se zatim pretvara u digitalni signal i pohranjuje na računalo.<sup>19,20</sup>



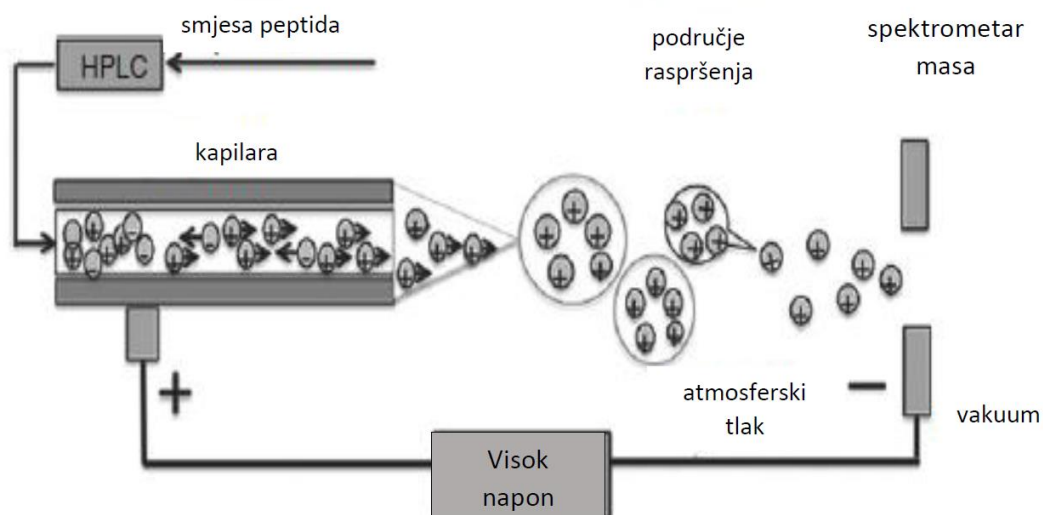
**Slika 1.** Shema spektrometra masa<sup>1</sup>

Spektrometar masa ne mjeri direktno mase molekula, nego se mase molekula određuje mjerenjem omjera  $m/z$ . Omjer  $m/z$  je bezdimenzijska veličina, ali se za istu koriste veličine kao što su thomson (Th) ili dalton (Da).<sup>5</sup> Spektrometrom masa se mogu detektirati samo ioni (nabijene čestice), dok se sve ostale čestice bez naboja uklanjaju kontinuiranim pumpanjem koje održava vakuum. Niski tlak, zbog kojeg u spektrometru masa ne dolazi do sudara molekula ili iona, je glavni preduvjet za očuvanje rezolucije analizatora. Mehaničke pumpe u spektrometru masa omogućavaju tlak do  $10^{-3}$  torra, nakon čega se uključuju drugi pumpni sustavi, kao što su difuzijski, kriogeni i turbomolekularni, čime sepostišu tlakovi do  $10^{-11}$  torra. Iako procesom ionizacije nastaju pozitivni i negativni ioni te se oba tipa mogu detektirati u spektrometru masa, u proteomici se najčešće analiziraju pozitivni ioni jer peptidni ioni pozitivnog naboja nastaju u većem broju od negativnih iona.<sup>19</sup>

### 2.2.2. Elektroraspršenje i njegova primjena u vezanom sustavu LC-MS

U proteomskim istraživanjima se najčešće koriste ionizacijske tehnike matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI, engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) i elektroraspršenje (ESI, engl. *Electro-Spray Ionization*). ESI može generirati i pozitivne i negativne ione, a proteini se gotovo isključivo analiziraju kao pozitivni ioni.<sup>5</sup> Lako se povezuje s tekućinskom kromatografijom, pa tako peptidni ioni u kapilaru ovog izvora dolaze u tekućem stanju. Kako je prikazano na Slici 2., peptidi iz kolone za tekućinsku

kromatografiju dopijevaju u grijanu kapilaru (1-5 mm) pod naponom (1500-2500 V) pri atmosferskom tlaku, pri čemu se na vrhu izlaza iz kapilare tekućina formira specifičan oblik nazvan Taylorov stožac. Pozitivno nabijeni ioni se nakupljaju na kraju kapilare, nakon čega dolazi do raspršenja u fine kapljice. Svaka kapljica sastoji se od peptidnih iona i molekula otapala. Kako se kapljice sve više približavaju negativno nabijenom ulazu u spektrometar masa, otapalo sve više isparava, a kapljice postaju sve manje. Time se naboji peptida približavaju jedan drugome što dovodi do njihova odbijanja. U istom trenutku sila odbijanja prevlada silu površinske napetosti, pri čemu ioni izlaze iz kapljica i time smanjuju odbijanje naboja. Nastali ioni nadalje nastavljaju prema regiji visokog vakuuma spektrometra masa.<sup>21</sup>



Slika 2. Elektoraspršenje<sup>21</sup>

Obično se ESI koristi u tandemnoj spektrometriji masa, pri čemu pH mora biti nizak. Tipična mjesta na koja se vežu protoni su na aminokiselinama koje imaju bazične bočne ogranke (Arg, Lys, His) i amino skupine na N-kraju. U analizi odozdol-nagore proteini su pocijepani tripsinom koji cijepa arginina i lizina, čime se dobivaju dva mjesta za vezanje protona i minimalni naboj +2. Ionizacija elektoraspršenjem ovisi o omjeru iona uzorka i molekula otapala koje dođu u ionizacijsku kapilaru, a ne o koncentraciji uzorka.<sup>21</sup>

Elektoraspršenje se najčešće koristi u analizama LC-MS, a omogućava direktno spajanje tekućinske kromatografije obrnutih faza sa spektrometrijom masa. Analiza se obavlja „on

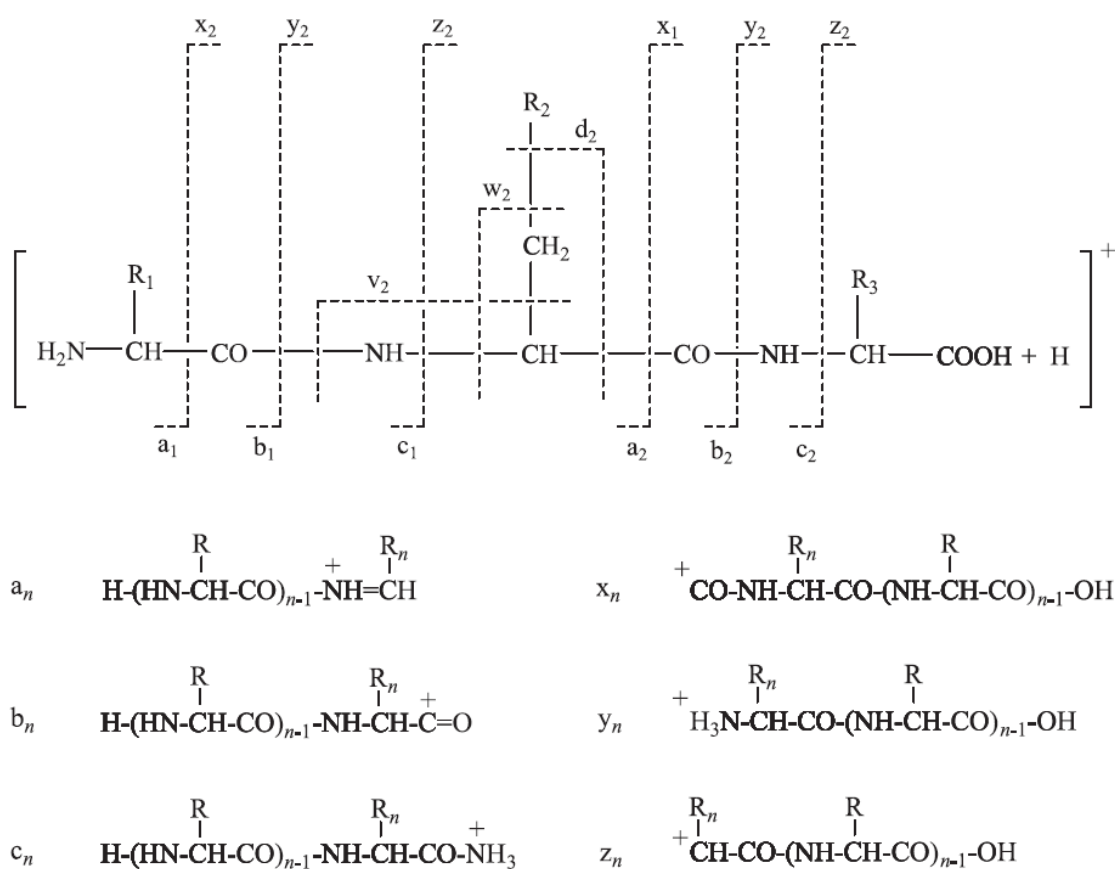
*line*”, što znači da nema zastoja između prijenosa uzorka iz jednog instrumenta u drugi.<sup>3</sup> U suvremenim proteomskim istraživanjima se koristi nanoelektoraspršenje (nESI) koje karakteriziraju protoci smanjeni na nanolitar po minuti, pri čemu se smanjuje osjetljivost analize. Kao nanoESI emiter se u proteomici koristi kapilara obložena silicijem, koja nije izrađena od metala, promjera oko 360 µm, na čijem se kraju nalazi igla promjera 5-10 (30) µm, a nalazi se 1-5 na mm udaljenosti od ulaza u spektrometar masa.<sup>22</sup> Velika prednost elektoraspršenja je stvaranje iona pri atmosferskom tlaku, nakon čega se ioni transportiraju u spektrometarmasa u kojem je vakuum.<sup>5</sup>

### 2.2.3. Fragmentacija peptida

Fragmentacija se u spektrometriji masa koristi kako bi se dobili podaci o strukturi uzorka ili redoslijedu aminokiselina u peptidima. Peptidi najčešće nemaju dovoljno energije za uspješnu fragmentaciju, pa se zbog toga fragmentiraju u zasebnom djelu spektrometra masa, primjenom različitih tehnika fragmentacije. Kolizijom inducirana disocijacija (CID, engl. *Collision-Induced Dissociation*) je najčešće korištena fragmentacijska tehnika, primarno u kombinaciji s elektoraspršenjem. Podrazumijeva bimolekularni raspad i ovisi o dvije molekule koje se sudaraju. Fragmentacija se provodi u kolizijskoj ćeliji koja sadrži inertan plin (npr. dušik ili argon), a potencijalna energija iona prekursorase povećava ponovljenim sudarima molekula plina. Kada ion prekursor dostigne energetske prag za fragmentaciju, fragmentirat će u ion produkt i/ili neutralni gubitak. Fragmentacija ovisi i o broju molekula koje se trebaju fragmentirati te o molekulama plina s kojima se sudaraju. U upotrebi su dvije razine kolizijske enrgije, niska (< 100 eV) i visoka (> 1000 eV) energija. Visokoenergetski CID (HCD, engl. *Higher-energy Collision Dissociation*) može disocirati prekursora velike mase i producirati više fragmenata ionskog tipa, ali se takvi spektri teže interpretiraju. Za fragmentaciju peptida obično se koriste niske energije u intervalu od 25-70 eV, ovisno o veličini i naboju očekivanog peptida. HCD daje bolju kvalitetu podataka MS2 od CID-a, ali je potrebno više iona i vremena da bi se generirao spektar HCD-om u usporedbi s CID-om.<sup>5</sup>

Ioni peptida nastali fragmentacijom dijele se u dvije osnovne skupine; na ione nastale cijepanjem jedne ili više veza okosnice peptidnog lanca i na ione nastale cijepanjem okosnice peptidnog lanca i cijepanjem bočnog ogranka. Nomenklaturu nastalih fragmentnih iona (Slika 3.) predložili su *Roepstorff* i *Fohlmann*, a kasnije ju je modificirao *Biemann*.<sup>23</sup> Cijepanje okosnice peptidnog lanca može se dogoditi na jednoj od tri tipa veze, CH-CO, CO-NH ili

NH-CH, pri čemu može nastati šest tipova fragmentnih iona. Fragmentni ioni koji zadržavaju N-kraj iona prekursora i na njemu imaju naboj označavaju se s  $a_n$ ,  $b_n$ , i  $c_n$ , dok se ioni fragmenti koji zadržavaju C-kraj iona prekursora i na njemu imaju naboj označavaju sa  $x_n$ ,  $y_n$ , i  $z_n$ . Indeks  $n$  označava broj amino kiselina u fragmentiranom ionu. Aminokiselinski slijed se može odrediti pomoću razlike masa između dva konsektivna iona iste serije, osim kod leucina i izoleucina koji su izomeri i kod glutamina i lizina, koji su mogući izobari (ovise o rezoluciji i točnosti mjerenja masa instrumenta.)<sup>21,23</sup>



Slika 3. Vrste iona<sup>23</sup>

Ioni nastali cijepanjem okosnice peptidnog lanca i cijepanjem bočnog ogranka nastaju u visokoenergetskim tandemnim spektrima, pri fragmentiranju višestruko protoniranih peptida, a označavaju se oznakama  $d$ ,  $v$  i  $w$ . Fragmentacija bočnog lanca služi za razlikovanje leucina od izoleucina, jer nastali fragmenti imaju različite mase.<sup>5</sup>

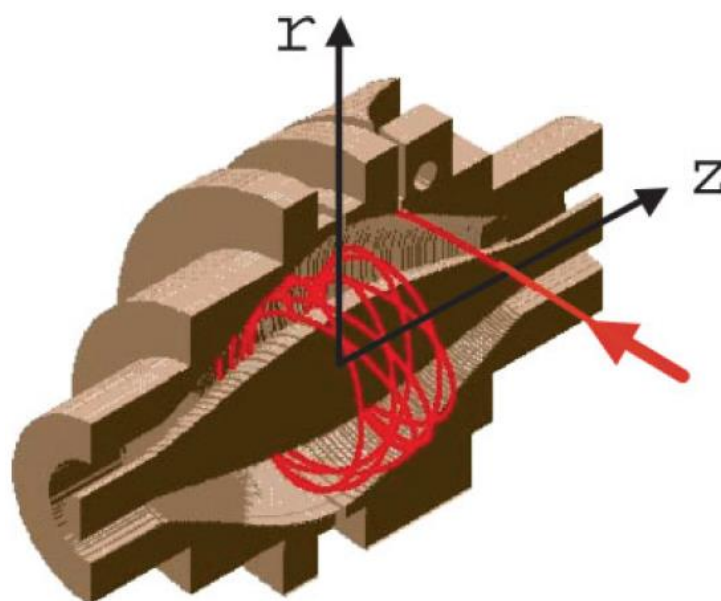


#### 2.2.4. Analizatori masa

Analizatori masa koriste za se razdvajanje iona prema njihovom omjeru mase i naboja ( $m/z$ ) u električnom i/ili magnetskom polju.<sup>19</sup> Analizator masa odvaja peptide, izabire ione odgovarajućeg raspona  $m/z$  za daljnju fragmentaciju, fragmentira izabrane ione prekursore i mjeri  $m/z$  nastalih iona fragmenata. Mehanizam kojim se mjere  $m/z$  vrijednosti iona ovisi o tipu analizatora, a može biti baziran na vremenu leta iona, njihovim magnetskim ili elektrostatskim svojstvima, orbitalnoj frekveciji ili stabilnosti puta.<sup>5</sup> Svojstva analizatora masa definiraju se osobinama kao što su točnost, rezolucija, raspon masa, sposobnost tandemnog udruživanja i brzina snimanja. Svojstva određenih analizatora masa nalaze su u Tablicama D1. i D2., a njihova njačešća primjena u Tablici D3. (u Dodatku).<sup>19,24</sup>

Analizatori mase se mogu podjeliti u dvije kategorije; prva su skenirajući i analizatori masa koji koriste struju iona (tzv. spektrometri masa „ion-beam”), a druga su analizatori masa koji hvataju ione. Prvoj skupini pripadaju analizator masa koji mjeri vrijeme leta (TOF, engl. *Time of Flight*) i kvadrupol (Q, engl. *Quadrupole*), a analizatori masa koji hvataju ione su ionske stupice (IT, engl. *Ion Trap*), Orbitrap i Fourier-transformirana ionsko-ciklotronska rezonancija (FT-ICR, engl. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*). Skenirajući analizatori masa kao TOF, uparuju se s pulsanim izvorima iona kao što je MALDI, dok se analizatori koji koriste struju iona ili hvataju elektrone uparuju se kontinuiranim izvorima kao što je ESI.<sup>25</sup>

Analizator masa koji je postao nezamjenjiv u proteomskim istraživanjima je Orbitrap (Slika 4.). Orbitrap isključivo koristi elektrostatsko polje za zarobljavanje iona (bez radiofrekventnog ili magnetskog polja). Ioni u gibanju su zarobljeni oko centralne elektrode djelovanjem elektrostatske interakcije na koju kao protusila djeluje centrifugalna sila. Vanjska elektroda usmjeruje ione aksijalno. Kontrolna frekvencija oscilacija (aksijalnih) dobije se kontrolom oblika/geometrije elektroda.<sup>26</sup>



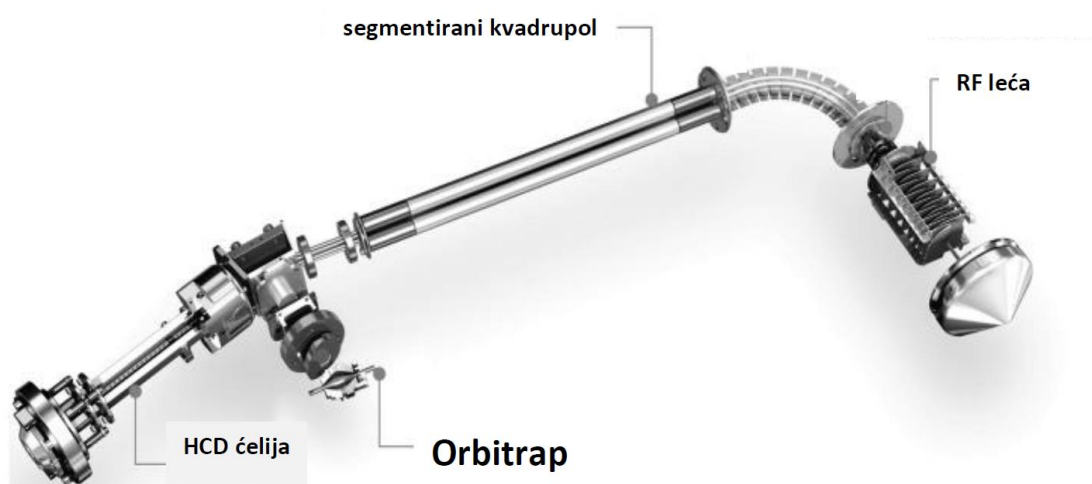
Slika 4. Građa Orbitrapa<sup>26</sup>

Ioni se u električno polje između specifično oblikovanih elektroda ubacuju tangencionalno i budu zarobljeni zbog ravnoteže električne i centrifugalne sile. Ioni se ipak oko centralne elektrode gibaju rotacijskim gibanjem u obliku krugova (eliptične orbitale). Osim toga, gibaju se i naprijed - nazad uzduž osi centralne elektrode (aksijalno gibanje). Zbog toga se ioni specifičnog omjera mase i naboj gibaju u prstenovima koji osciliraju oko centra vretenaste elektrode. Frekvencija harmonijskih oscilacija je nezavisna o brzini iona i obrnuto proporcionalna korijenu omjera mase i naboja. Snimanjem ionskih oscilacija (detekcija struje iona), stupica se može koristiti kao analizator masa. Prednosti Orbitrapa naspram ostalih analizatora su visoka rezolucija (do 200 000), povećani prostorni kapacitet za hvatanje iona pri većim masama, velika točnost izmjerene mase (2-5 ppm unutarnje i vanjske kalibracije), velik dinamički raspon i gornja granica mjerenja mase, velika osjetljivost i stabilnost. Orbitrap je analizator koji ne treba značajnije održavanje.<sup>27</sup>

#### 2.2.5. Spektrometri masa temeljeni na Orbitrap tehnologiji

Suvremena proteomska istraživanja sve su više temeljena na primjeni sofisticirane Orbitrap tehnologije koju je 2000. godine usavršio Alexander Makarov, a komercijalizirala tvrtka Thermo Fisher Scientific. Instrument Q Exactive Plus posebno je osmišljen za proteomiku jer je postignuta fragmentacija neovisna o masi u cijelom rasponu  $m/z$  poznatija kao „All Ion

*fragmentation*“.<sup>28</sup> Naveden instrument se također može koristiti i u analizi malih molekula (npr. u metabolomici). Konstrukcija instrumenta (Slika 5.) je zakrivljena (za 90° stupnjeva) jer se između ionskog izvora i kvadrupola nalaze savinute elektrode, tzv. "flatpole". U Orbitrapu se koristi jači napon za fragmentaciju iona u kolizijskoj ćeliji i moguća je samo HCD.<sup>29</sup>



**Slika 5.** Shema Q Exactive Plus instrumenta.<sup>29</sup>

Nakon ionizacije ioni putuju kroz transfernu cijev, S-leću, injekcijski multipol do savijenog flatpola. Flatpol ima dvije funkcije: separacija ispravno formiranih klastera ion i njihovo hlađenje. Nakon toga ioni kroz leću dolaze u hiperbolični kvadrupol u kojem se događa daljnja izolacija, nakon čega putuju u oktapol koji ih vodi u C-stupicu, HCD-kolizijsku ćeliju. Fragmentacija iona provodi se u kolizijskoj ćeliji pri čemu željena populacija iona može biti poslana natrag u C-stupicu ili izbačena u Orbitrap i analizirana u detekcijskom ciklusu Orbitrapa, što otvara put multipleksiranju. Raspon masa pokriven ovim instrumentom je 50-4000  $m/z$ .<sup>28</sup>

### 2.3. Proteomski pristupi temeljeni na spektrometriji masa

Proteomska analiza počinje pripravom uzoraka u kojoj su proteini, ili enzimatski razgrađeni u peptide [pristup odozdol-nagore (engl. *bottom-up*)], ili analizirani u cijelosti bez razgradnje

[pristup odozgor-nadolje (engl. *top-down*)].<sup>25</sup> Također je uveden novi pristup odsredine-nadolje (engl. *middle-down*).<sup>30,31,32</sup> Prema oblicima akvizicijetehnike spektrometrije masa mogu se podijeliti na podatkovno ovisnu akviziciju (DDA, engl. *Data Dependent Acquisition*) i podatkovno neovisnu akviziciju [DIA, (engl. *Data Independent Acquisition*) koja je ujedno i vrsta globalne akvizicije te metoda usmjerene ekstrakcije podataka.<sup>33,34,35</sup> DIA se dijeli na ciljanu podatkovno neovisnu akviziciju,<sup>34,35</sup> neciljanu podatkovno neovisnu akviziciju (uDIA, engl. *untargeted* DIA)<sup>36</sup> i multipleksiranje(MSX).<sup>7</sup> Usmjerena podatkovno neovisna akvizicija ili akvizicija usmjerena podacima [(engl. *Targeted Data Acquisition*) dijeli se na metode praćenja višestrukih reakcija (fragmentiranja) (MRM, engl. *Multiple Reaction Monitoring*) ili praćenja odabranih reakcija (fragemitiranja) (SRM, engl. *Selected Reaction Monitoring*) i paralelnog praćenja reakcija (fragnetiranja) (PRM, eng. *Parallel Reaction Monitoring*).<sup>34,35</sup> Neusmjerena podatkovno neovisna akvizicija dijeli se na metode koje za fragmetaciju koriste određeni dio raspona  $m/z$  u kojem su ioni prekursori podjeljeni u manje izolacijske prozore  $m/z$  i metode koje koriste jedan prozor koji se sastoji od cijelog raspona masa, pri čemu u jedan MS2 spektar ulaze svi ioni koji uđu u instrument.<sup>10</sup>

DDA, još poznata pod imenom IDA (engl. *information-dependent acqicition*)<sup>37</sup> je klasična strategija i primarni odabir u tzv. proteomici, „*shotgun*“ (bez upotrebe gela), kojom se provodi većina analiza spektrometrijom masa.<sup>6,38</sup> U DDA izgled spektra MS2 ovisi o rezultatu spektra MS1.<sup>6</sup> DDA proteomske studije pomiče prema visoko zastupljenim peptidima, čime se gube nisko zastupljeni peptidi, stohastičnost i reproducibilnost analize.<sup>6,39</sup> Podaci dobiveni analizom DDA nisu najbolji izbor u analizi biomarkera iz krvi (točnije, seruma ili plazme), jer su biomarkeri obično proteini niske zastupljenosti, a serumski proteom ima veliki dinamički raspon koncentracija.<sup>40</sup> DIA je alternativna metoda DDA jer omogućava fragmentaciju svih iona snimljenih u spektru MS1, neovisno o njihovoj zastupljenosti.<sup>21</sup>

## 2.4. Priprava uzorka za proteomska istaživanja temeljena na spektrometriji masa

Spektrometrijom masa moguće je analizirati jedan protein, kompleksne smjese proteina ili cijeli proteom iz vrlo male količine uzorka. Prije analize, uzorke je potrebno odsoliti i prevesti u pufer, koji je optimalan za djelovanje tripsina. Ako se u uzorku nalaze acetonitril ili trikloroetena kiselina, potrebno ih je odstraniti korištenjem vakuumske centrifuge. Kako bi

pH uzorka bio optimalan za djelovanje tripsina (oko 8), uzorku se dodaje otopina amonijeva bikarbonata ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), a potom ditiotreitol (DTT) ili tris(2-karboskietil)fosfin hidroklorid (TCEP) za redukciju disulfidnih veza. DTT je reduksijsko sredstvo koje prevodi cisteinske disulfidne veze u slobodne cisteinske sulfhidrilne grupe. DTT optimalno djeluje pri pH od 7 do 9, dok TCEP ima širi raspon optimalnih vrijednosti pH od 2 do 11. Nakon redukcijese uzorku dodaje alkilirajuće sredstvo poput jodoacetoamida (IAA) ili kloroacetoamida (CAA). IAA reagira sa slobodnim sulfhidrilnim skupinama cisteinskog bočnog lanca pri čemu nastaje S-karboksiamidometil-cistein koji se ne može reoksidirati, što je važno jer pruža tripsinu veću mogućnost prilaska mjestima cijepanja duž proteina. Naposljetku slijedi razgradnja tripsinom.<sup>41</sup>

#### 2.4.1. Digestija proteina

Digestija je cijepanje proteina u peptide. Može se provesti enzimatski (enzimima koji se zovu proteaze) ili kemijski. Postoje mnoge proteaze od kojih se samo neke rutinske koriste.<sup>5</sup> Najčešći kemijski reagensi za razgradnju proteina su cijanogenbromid i hidrosilamin. U Tablici 1. nalaze se različiti reagensi injihova mjesta cijepanja.<sup>5,23,38</sup>

**Tablica 1.** Mjesta cijepanja proteina djelovanje proteaza ili kemijskih reagensa<sup>23,38</sup>

Proteaza/ kemijski reagens	Specifično mjesto cijepanja
Tripsin	Iza Lys i Arg ako iza njih nema Pro
Kimotripsin	Iza aromatskih aminokiselina (Phe, Tyr, Trp)
Glu-C	Ispred Asp i Glu ako iza njih nema Glu ili Pro
Lys-C	Iza Lys ako iza njega nema Pro
Asp-N	Ispred Asp
Lys-N	Ispred Lys
Cijangenbromid	Iza Met
Hidrosilamin	Između Asn i Gly

Proteolitički enzimi razlikuju se svojom specifičnošću za cijepanje amidne veze između određenih aminokiselina u strukturi proteina. Cijepanje se događa hidrolitički. Tripsin je najupotrebljiviji enzim za cijepanje proteina i postao je zlatni standard proteinske digestije primjenom pristupa odozdol nagore. On je serinska proteaza koja cijepa glavni lanca proteina

iza arginina ili lizina, ako iza njih nema prolina.<sup>38</sup> Tripsin je visoko specifičan, daje malo krivih rezova i rijetko cijepa na neočekivanim pozicijama. Digestija tripsinom omogućava nastanak peptidnih fragmenata optimalne duljine jer se između arginina i lizina u prosjeku nalazi 11 drugih aminokiselina. Tripsin se može koristiti za cijepanje proteina u otopini, gelu ili apsorbiranih na površini.<sup>5</sup>

Tripsin je posebno pogodan za spektrometriju masa u pozitivnom načinu rada, jer cijepa iza bazičnih aminokiselina, što omogućava ionizaciju zadržavanjem protona.<sup>5</sup> Tripsin najbolje djeluje pri pH 8 te se digestija provodi na 37 °C tijekom 4 do 18 sati.<sup>41</sup>

#### 2.4.2. Upotreba (mikro)ekstrakcije na čvrstoj fazi u pročišćavanju uzoraka

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE, engl. *Solid-Phase Extraction*) se u proteomici koristi za uklanjanje soli i detergenata iz bioloških uzorka i ukoncentriravanje proteina i peptida. U ekstrakciji na čvrstoj fazi molekule od interesa se vežu određenim mehanizmom (razdjeljivanje na obrutim ili normalnim fazama, ionska izmjena) na površinu specifičnog punila (C18, C4, jaki kationski izmjenjivač). Neželjene kemikalije i soli će se ukoniti ispiranjem određenim otapalom, dok će se molekule od interesa obogatiti i pročistiti.<sup>42,43</sup>

U proteomici se u preparativne svrhe koriste nastavci za pipete od 10 µL, u kojima se nalazi specifično imobilizirano kromatografsko punjenje u mikrovolumenu (0,6 µL). Zbog volumena punjenja ekstrakcija na čvrstoj fazi se naziva mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (µSPE). Najpoznatiji ovakvi nastavci su ZipTip<sup>®</sup> tvrtke Millipore, ali postoje i drugi nastavci ostalih tvrtki kao što su TopTip, OMIX tips tvrtke Agilent bound, StageTips i drugi.<sup>42-45</sup>

Tri vrste punjenja su najzastupljenije: C18, C4 i SCX. Punjenja reverzne faze C18 i C4, koja se upotrebljavaju za odsoljavanje i ukoncentriravanje peptida i proteina. Punjenje C18 preporučuje se za peptide i proteine niske molekulske mase, a punjenje C4 za proteine male ili srednje molekulske mase jer se veliki proteini apsorbiraju za hidrofobno punjenje C4.<sup>44</sup>

Mehanizam ionske izmjene na jakom ionskom izmjenjivaču (SCX) se u proteomici koristi za uklanjanje neionskih detergenata i soli te koncentriranje uzorka. Učinkovitost kromatografije SCX ovisi o naboju peptida, a posebno dobro djeluje na triptičke peptide koji imaju minimum od dva pozitivna naboja po molekuli (daju bočni ogranci arginina, lizina i histidina) pri kiselom pH. Pri pH 2,7-3 ukupni naboj triptičkog peptida je +2 (protonirani N-krajevi i C-krajevi). SCX se također koristi za pročišćavanje peptida nakon digestije u gelu ili otopini i iz kromatografskih frakcija koje sadrže ≤ 45 acetonitrila.<sup>46</sup>

### 2.4.3. *ProteoMiner*

*ProteoMiner* služi za smanjivanje koncentracije visokozastupljenih proteina, kako bi se obogatili i detektirali srednje do manje zastupljeni proteini u kompleksnim uzorcima. Tehnologija *ProteoMinera* koristi kombinatorne heksapeptidne knjižnice (koja broji 64 milijuna nasumično nastalih heksapeptida) vezane na kromatografske nosače (perle) (engl. *beads*). Kada se kompleksni biološki uzorak doda nosačima, proteini se vežu za specifične heksapeptidne ligande, kombinacijom različitih tipova interakcija uključujući ionsku interakciju, hidrofobnu interakciju, vodikove veze i van der Waalove veze, tako da proteini visoke zastupljenosti zasite specifične ligande, pri čemu dolazi do ispiranja viška proteina. Za razliku od visokozastupljenih proteina, srednje ili malo zastupljeni proteini ne zasićuju svoje specifične ligande i većinom ostaju vezani na svojim peptidnim ligandima. Time se relativno obogaćuju naspram proteina visoke zastupljenosti. Kao rezultat javlja se redukcija u dinamičkom rasponu koncentracija proteina koja omogućuje detekciju srednje ili nisko zastupljenih proteina.<sup>47</sup>

## 2.5. Identifikacija proteina spektrometrijom masa

### 2.5.1. *Strategije identifikacije proteina*

Spektar masa peptida prikazan je u obliku pikova koji se protežu preko određenog raspona vrijednosti  $m/z$ , a sadrži vrijednosti  $m/z$ , retencijska vremena i ionski intenzitet.<sup>5,48</sup> Spektar se snima u programu koji prati rad spektrometra masa u obliku sirovih („*raw*“) podataka.<sup>48</sup>

Za početak, u svrhu identifikacije proteina iz spektara MS/MS treba odabrati jedan od četiri pristupa kojim će se provoditi sekvenciranje, točnije pretraživanje baze podataka, usporedbu spektralnih knjižnica, sekvenciranje *de novo* ili hibridni pristup korištenjem sekvencijske oznake nakon čega slijedi pretraga baze podataka.<sup>49</sup>

Ako je za identifikaciju odabrana strategija pretrage baze podataka, analiza eksperimentalnih podataka će se sastojati od nekoliko opcionalnih koraka. Prvi korak je analiza proteoma *in silico*. Drugi korak je konverzija podataka iz formata „*raw*“ u format prilagođen određenom specijaliziranom računalnom programu. Treći korak je predobrada spektra masa, nakon čega slijedi identifikacija peptida i proteina. Nakon toga slijedi postidentifikacijska obrada, kvantifikacijska analiza, spremanje podataka i objava u javnim reperizorijima. Identifikacija proteina se provodi primjenom specijaliziranih računalnih programa kao što su

Mascot, X!Tandem, Sequest, Andromeda i drugi.<sup>44</sup> Integracijom bioinformatičkih alata u tzv. proteomske hodograme i dobro opremeljene softverske pakete (npr. Integrated Proteomics Pipeline, pFind Studio, ProteoIQ, Proteome Discoverer, Scaffold, MaxQuant i Transproteomics Pipeline), standardizira se i pojednostavljuje proteomska analiza.<sup>38</sup>

### 2.5.2. Predobrada spektra masa i pretraživanje baza podataka

Baze podataka, uz ostale podatke o proteinima, sadrže ono najvažnije za identifikaciju: njihov aminokiselinski slijed. Dvije najpoznatije baze podataka su UniProt i NCBI.<sup>5</sup> Navedene baze se mogu pretraživati prema različitim organizmima.<sup>50</sup>

Identifikacija proteina koristeći pretraživanje baza podataka temelji se na usporedbi teoretskih masa peptida dobivenih digestijom *in silico* s eksperimentalno dobivenim masama. Digestija *in silico* proteinskih sekvenci se provodi skeniranjem sekvenci sa svrhom pronalaska mjesta cijepanja proteazom, nakon čega se računa masa nastalih peptida. Tijekom digestije *in silico*, važni parametri su enzim korišten za digestiju, (posttranslacijske) modifikacije, maksimalni broj mjesta krivog cijepanja te cijepanje koje se događa na neplaniranim mjestima.<sup>5</sup>

Prije samog pretraživanja baza podataka potrebno je provesti predobradu spektara masa. Predobrada spektra masa temelji se na korištenju algoritama koji mogu povećati broj indentificiranih peptida i popraviti pouzdanost identifikacije peptida. Cilj predobrade je pretvorba podataka iz sirovog oblika u oblik podatka koji omogućuje lakši pristup karakteristikama promatranog iona (vrijednost  $m/z$ , vrijeme zadržavanja, ionski intenzitet) i ekstrakciju dodatnih podataka, kao što je izotopna raspodjela. U širokoj upotrebi su pet tipova predobrade spektra masa: spektralna normalizacija, spektralno udruživanje (engl. *clustering*), određivanje naboja prekursora, smanjenje buke u spektru i procjena kvalitete spektra.<sup>48</sup>

Kako bi se sekvence dobivene iz tandemnih spektra masa mogle usporediti s onima u bazi podataka, potrebno je definirati parametre pretraživanja. Oni su: taksonomija (odabir određene vrste i ili taksonomske grane),<sup>51</sup> tipovi iona koji nastaju fragmentacijom, odabir monoizotopne (za instrumente visoke rezolucije) ili prosječne (za instrumente niske rezolucije) mase, naboj peptida, tolerancija mase iona prekursora (2-3 Da za ionsku stupicu; 0,1 Da za TOF; 0,05 Da za uređaje s Fourierovom transformacijom), odabir enzima za digestiju, postojanje kemijskih ili posttranslacijskih modifikacija.<sup>50</sup>



Identitet proteina predstavlja računalni rezultat kojim je određen udio sličnosti između eksperimentalnih teoretskih spektra peptida kandidata.<sup>50</sup> Algoritmi za identifikaciju i statističko vrednovanje mogu se podijeliti na četiri skupine: deskriptivni (SEQUEST i Sonar), interpretativni (PeptideSearch, MS-Seq), stohastički (Scope, Olav) i bazirani na vjerojatnosti (Mascot, OMSSA).<sup>51</sup> Od navedenih algoritama najpopularniji su SEQUEST i Mascot.<sup>38</sup>

SEQUEST je računalni program za identifikacije tandemnih spektra masa koji se danas rutinski koristi u proteomskim istraživanjima. SEQUEST koristi algoritam sličan ručnoj interpretaciji spektra MS/MS, tako što simultano uspoređuje sve eksperimentom dobivene fragmente iona s teoretski generiranim fragmentima iona na spektralnoj razini. SEQUEST omogućuje dva ključna izračuna koji definiraju pouzdanost identifikacije: Xcorr (engl. *cross correlation score*) i  $\Delta$ CN. Xcorr je statistička kalkulacija korelacije teoretskog i eksperimentalnog spektra.<sup>38</sup> Kako bi se dobio usporediv rezultat, vrši se predobrada spektra u vidu normalizacije intenziteta pikova eksperimentalnog spektra, uklanjanja pikova niskog intenziteta i zaokruživanje vrijednosti  $m/z$  na prvi cijeli broj.<sup>50</sup>  $\Delta$ CN je razlika između najbolje vrijednosti podudaranja peptidnih spektra (PSM, engl. *Peptide Spectrum Match*) i druge najbolje vrijednosti PSM-a.  $\Delta$ CN se koristio kao najbolja mjera točnosti PSM-a, ali danas se statističkim metodama utvrđuje točnost PSM-a. U sličaju triptičke digestije, u odabir PSM-ova iz baze podataka u obzir dolaze samo fragmenti odgovarajuće duljine (6-50 aminokiselina).<sup>38</sup>

### 2.5.3. Podjela kvantifikacijskih metoda obzirom na vrstu kvantifikacije

Kvantifikacija proteina se može podijeliti na kvantifikaciju u gelu i kvantifikaciju iz podataka dobivenih spektrometrijom masa. Za kvantifikaciju proteina može se koristiti izotopno obilježavanje kemijskom reakcijom (ICAT, engl. *Isotope-coded affinity tag*), obilježavanje izotopom  $^{18}\text{O}$  i metaboličko obilježavanje (SILAC engl. *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) i obilježavanje izotopom  $^{15}\text{N}$ . Kvantifikacija se dijeli na apsolutnu i relativnu. Relativna kvantifikacija proteina upotrebom spektrometrije masa dijeli se na kvantifikaciju stabilnim izotopima baziranu na spektru MS1 (ICAT, obilježavanje  $^{18}\text{O}$ , SILAC), kvantifikaciju iz spektra MS2 temeljenu na obilježavanju izobarnim oznakama (TMT i iTRAQ) i kvantifikaciju bez oznake.<sup>38</sup> Apsolutnom kvantifikacijom želi se dobiti točna molarna koncentracija određenog peptida ili proteina u uzorku.<sup>5</sup> U tu se svrhu koriste standardi označeni izotopima koji imaju ograničen broj peptida i poznatu koncentraciju.<sup>38</sup>

## 2.6. Podatkovno neovisna akvizicija (DIA)

### 2.6.1. Kratka povijest DIA-e

Iako se često smatra da je DIA novi način analize u proteomici, to nije točno. Originalnu metodu DIA (akviziciju „koja nije ovisna o podacima”) osmislili su 2004. Venable i suradnici, dok je tehnika poboljšana radom Berna i suradnika iz 2009., koji su pronašli način za dekonvoluciju složenih spektara masa dobivenih metodom DIA na instrumentima s linearanom ionskom supicom.<sup>9,40,52,53,54</sup> U odnosu na postojeće metode DDA, DIA je omogućila peterostruko povećanje u odnosu signala naspram šuma i vremenski konstantnu analizu iona, što je rezultiralo povećanjem osjetljivosti.<sup>54</sup> Uvođenje suvremene Orbitrap tehnologije omogućilo je razvoj novih analitičkih proteomskih pristupa, kao što je PAcIFIC (engl. *Precursor acquisition indenendent from ion count*),<sup>55,56</sup> te novih metoda fragmentacije, točnije fragmentacije svih iona (AIF, engl. *All-ion framnetation*).<sup>57</sup>

Napretkom brzo skenirajuće instumetacije visoke rezolucije, Gillet i suradnici 2012. uvode varijantu metode DIA koja se zove SWATH (engl. *Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical Mass Spectra*) sekvencionalna (uzastopna) prozorska akvizicija cijelog teoretskog spektra masa, a za svoj rad koriste QqTOF instrumente [Triple TOF (TOF/TOF s dva ionska zrcala)], šire izolacijske prozore ( $25m/z$ ) s preklapanjem od  $1 m/z$  i multiplksiranje, čime je postignuta veća brzina akvizicije.<sup>53,54,58</sup>

U današnje vrijeme najčešće korištene metode DIA su modificirana Venableova DIA prilagođena za rad s tehnologijom Orbitrap (ukratko DIA),<sup>54</sup> i metoda SWATH MS koja koristi instrumenti s analizatorima vremena leta, TOF.<sup>21,59,60</sup>

### 2.6.2. Osnove

Podatkovno neovisna akvizicija (DIA) se vrši na zadanom rasponu masa od interesa koji je podijeljen na određen broj sekvencionalnih (dosljednih) prozora (iste ili različite veličine), koji se još zovu DIA prozori. Dobiveni tandemni spektar sadrži fragmente svih iona prekursora iz pojedinog prozora. Time se vidi neovisnost DIA-e. DIA se nije mogla uspješno provoditi na spektrometrima masa starijih generacija s niskom brzinom snimanja i slabom rezolucijom.<sup>61</sup> Tek pojavom spektrometara masa visoke rezolucije, DIA doživljava veću primjenu.<sup>33</sup> Upotrebom DIA-e gubi se povezanost između prekursora peptidnog iona i

njegovog fragmenta, koje je tek omogućena upotrebom specijaliziranih računalnih programa.<sup>61</sup>

Veličina prozora MS1 određuje kompleksnost spektra. Kod velikih prozora (25  $m/z$ ) dolazi do koelucije velikog broja peptida, čime se povećava kompleksnost spektra MS/MS. Kod malih prozora (4  $m/z$ ) dobiju se spektri koji sadrže malo koeuliranih peptida, ali je potrebno više snimaka MS/MS unutar utvrđenog vremenskog ciklusa (između dva MS1 snimka), čime se smanjuje vrijeme za fragmentaciju iona unutar svakog prozora narušavajući kvalitetu kvantitativnih podataka MS/MS.<sup>61</sup>

Zbog složenosti spektra koji nastaju istovremenom fragmentacijom više iona, za identifikaciju proteina je potrebno koristiti spektralne knjižnice. Spektralna knjižnica se sastoji od točnih MS koordinata za svaki traženi peptid:  $m/z$  peptidnog prekursora, izbor vrijednosti  $m/z$  za svaki fragmenti ion zajedno sa njihovim relativnim intenzitetima i normalizirana kromatografska vremena zadržavanja peptida.<sup>53,62</sup> Spektralne knjižnice mogu nastati na dva načina. Iz spektara masa istog uzorka na kojem se kasnije vrši akvizicija DIA nastalih primjenom DDA ili korištenjem i spajanjem velikih knjižnica za pojedine organizme koji su javno dostupni. Na uzorcima koji se analiziraju metodom DDA, prije analize se obično vrši frakcioniranje (HPLC obrnutih faza, SCX ili deplecija)<sup>63</sup> kako bi se uklonili peptidi visoke zastupljenosti. Na taj način se povećava broj peptida u knjižnici.<sup>64</sup> Pretraga spektralnih knjižnica vrši se prema retencijskom vremenu peptida ili ekstrakcijom ionskih kromatograma koji bi mogli odgovarati uzorku. Redoslijed grupa pikova se određuje prema nekoliko faktora kojima se peptid razlikuje od šuma, nakon čega se distribucija pogodaka peptida uspoređuje s distribucijom mamaca kako bi se utvrdila točna frekvencija krivih pogodaka (FDR, engl. *false discovery rate*). Nakon toga se relativna zastupljenost peptida mjeri iz površine ispod odgovarajućeg pika prekursora za svaki ekstrahirani ionski kromatogram (XIC), nakon čega se koristi niz statističkih postupaka kojima se određuje identitet proteina.<sup>65</sup> Programi za pretraživanje spektralnih knjižnica su TPP, ProteoWizard, OpenMS, Spectronaut, Skyline i drugi.<sup>62</sup>

Identifikacija podataka dobivenih analizom DIA se može vršiti pomoću iRT peptida.<sup>66</sup> Indeksirano vrijeme zadržavanja, iRT, označava normalizirana vremena zadržavanja dobivena empirijskim mjerenjem iz seta standardnih peptida. iRT peptidi su peptidi čija se empirijski određena normalizirana vrijednost vremena zadržavanja može koristiti na bilo kojem sustavu LC bez ponovnog empirijskog određivanja vremena zadržavanja. iRT spaja razinu postupka *in*

*silico* i točnost empirijskih mjerenja. Vrijednost iRT peptida je specifičana i stabilna za sve takve peptide na širokom rasponu LC konfiguracija i kromatografskih kolona.<sup>67,68</sup> Skala iRT je isprva bila zamišljena za praćenje višestrukih reakcija (MRM), ali se koncept proširo na akviziciju DIA. Peptidi iRT služe kao čvorišne točke (tzv. „*anchor points*”) za ostale peptide, ubrzavaju analizu i osjetljivost analize; omogućavaju kreiranje spektralnih knjižnica iz heterogenih spektara DDA i njihovo dijeljenje između laboratorija.<sup>66</sup> Na preciznost određenih vrijednosti iRT najviše utječu pH mobilne faze, duljina gradijenta i sastav stacionarne faze. Utjecaj ovih faktora u primjeni je gotovo zanemariv oko 1%.<sup>66</sup> Predviđanjima retencijskih vremena služe se mnogi programi za analizu podataka dobivenih metodom DIA, kao što su: Spectronaut, OpenSWATH, Peak View i Skyline.<sup>66</sup>

Računalni programi klasičnog pristupa za obradu podataka dobivenih analizom DIA su: OpenSWATH, Skyline, Spectronaut, SWATH 2.0, MSPLIT-DIA, mProphet, DIANA, PeakView i drugi. Programi DIA-Umpire i Group-DIA služe za obradu podataka DIA bez knjižnice.<sup>36</sup> Popis programa s kratkim opisom nalazi se u Tablicama D5. i D6. u Dodatku.<sup>36</sup>

## 2.7. Analiza podataka dobivenih podatkovno neovisnom akvizicijom

### 2.7.1. Spectronaut

Spectronaut je program tvrtke Biognosys koji omogućava analizu podataka DIA, stvaranje spektralnih knjižnica (koje mogu koristiti i drugi programi), kvantifikaciju proteina korištenjem iRT peptida, stvaranje dijagrama u kojem su vrijednosti podataka predstavljene kao boje, tzv. „*heatmap*” za provjeru reproducibilnosti analize i stvaranje *Volcano* grafova za određivanje kandidata za biomarkere u post-analizi.<sup>69</sup>

Spectronaut koristi segmentiranu regresiju za konverziju vremena zadržavanja (RT) u iRT, pri stvaranju spektralnih knjižnica, i iRT u vrijeme zadržavanja (RT) pri analizi podataka dobivenih metodom DIA. Korištenjem segmentirane regresije dobiva se iRT visoke preciznosti. Umjesto primjene linearne regresije tijekom cijelog gradijenta metode, korištenjem segmentirane regresije u obzir se uzimaju lokalne fluktuacije i nelinearnosti, koje se ne mogu primjetiti linearnom regresijom. Također segmentirana regresija koristi više čvornih točaka (njih tisuće) nego što ima iRT peptida, jer se Spectronaut koristi svojom bazom podataka čvornih točaka, čime nastaju iRT visoke preciznosti.<sup>66</sup>

Kod segmentirane regresije točke podataka se podijele u bunkere uzduž RT (stvaranje spektralnih knjižnica) ili iRT (analiza DIA) osi. Svaki bunker sadrži maksimalni ( $n/40, 20$ ) točaka podataka, gdje je  $n$  ukupan broj čvornih točaka. Ukupan broj bunkera je  $\max(n/40, 20) * 2 - 1$  jer se bunkeri preklapaju popola. Za svaki bunker provodi se Thiel-Sen-ova regresija. Medijanska  $x$ -vrijednost svakog bunkera je njegova referenca, a  $y$ -vrijednost reference se izračuna Thiel-Sen-ovom regresijom. Nakon što se izračunaju točke reference ( $x, y$ ) za sve bunkere, točke se spajaju korištenjem linija između njih. Vrijednosti na rubovima se linearno ekstrapoliraju.<sup>66</sup>

Uporabom iRT visoke preciznosti, Spectronaut povećava osjetljivost i brzinu usmjerene analize podataka dobivenih DIA-om. Spektronaut omogućava veliku kvalitetu identifikacije i kvantifikacije u usporedbi sa sličnim metodama, čak i kada se promijene eksperimentalni uvjeti između stvaranja spektralnih knjižnica i akvizicije DIA.<sup>66</sup>

### 2.7.1. Prikaz rezultata kvantitativne proteomske analize

*Volcano* graf (grafički prikaz u obliku vulkana) je najčešći način prikaza proteomskih podataka u kojem svaka točka predstavlja određeni protein  $x$  koordinata je logaritama (sa bazom 2) vrijednosti koeficijenta promjene („*fold-change*“, FC) (promjene preklapanja), a  $y$  koordinata je (engl. *t-statistic*)  $t$ -statistike ili  $\log_{10} p$  vrijednosti dobivene kao rezultat statističke obrade,  $t$ -testa.<sup>70</sup> FC procjenjuje omjer između dva stanja (ili prosjek omjera, ako su u pitanju replike) i to tako da kao potencijalni kandidati za biomarkere dolaze u obzir proteini koji imaju veću vrijednost FC od dogovorene granične vrijednosti (engl. *Cut-off value*). FC nije statistički test i ovisi o obradi podataka, točnije normalizaciji.<sup>71</sup>

$T$ -test je jednostavan statistički test. U ponovljenim eksperimentima, varijacija pogreške se može procijeniti za svaki podatak iz logaritamskih omjera i za njih se može provesti  $t$ -test. Korištenjem  $t$ -statistike određuju se kandidati koji su diferencijalno eksprimirani.  $T$ -test se provodi za svaki protein zasebno, a problem može predstavljati mali broj uzoraka unutar skupine.  $P$ -vrijednost je mjera dokaza protiv nulte hipoteze u statističkom testu. U ovom slučaju je to vrijednost koja se dobije rješavanjem statističkog testa i njegovom konverzijom. Ona predstavlja nominalnu vrijednost, ispod koje se nalaze značajni kandidati za biomarkere.<sup>71</sup>

### 2.7.2. Bioinformatička analiza proteomskih rezultata primjenom genske ontologije

Projekt genske ontologije (engl. *The Gene Ontology project*) je najveći servis (u tekstu resurs) za katalogiziranje funkcije gena. Genska ontologija (GO) je kontrolirani rječnik pojmova (engl. *terms*) s kojim je biologija predstavljena na strukturirani način. Pojmovi se dijele u tri udaljene ontologije koje predstavljaju različite biološke aspekte: molekularna funkcija (MF, engl. *Molecular Function*), biološki proces (BP, engl. *Biological Process*) i stanična komponenta (CC, engl. *Cellular Component*). Pojmovi su međusobno vezani tako da tvore hijerarhiju riječnika.<sup>72</sup> Genska ontologija definira „svemir” mogućih funkcija gena, ali ne daje tvrdnje o funkciji svakog zasebnog gena, nego se one zapisuju u obliku pribilješki (engl. *annotations*) i zovu se pribilješke genske ontologije („GO annotations”). GO pribilješka je izjava o funkciji određenog gena. Budući da je naše znanje biologije nepotpuno, sustav GO pribilješki sadrži nepotpune izjave o funkciji gena (samo do sad poznate funkcije).<sup>73</sup> GO konzorcij (engl. *The GO Consortium*) sastoji se od određenog broja velikih baza podataka, koje zajedno rade na standardizaciji ontologija i pribavljanju pribilješke za GO. Konstituirajuća grupa GO konzorcija činila je baze podatka UniProt, Mouse Genome Informatics, *Saccharomyces* Genome Database, Wormbase, Flybase, dictyBase i TAIR, ali broj baza je s vremenom porastao.<sup>72</sup>

U genskoj ontologiji, molekularna funkcija je proces, koji može biti izveden djelovanjem jedne makromolekularne mašine preko fizičke interakcije s ostalim molekulama. Funkcija naglašava akciju koju provodi genski produkt. Stanična komponenta je lokacija, relativna staničnim dijelovima i stukturi, koju zauzima makromolekularna mašina kada provodi molekularnu funkciju (ne odnosi se na proces, nego anatomiju). Biološki procesje najveća i najrazličitija ontologija u genskoj ontologiji, a predstavlja specifični cilj za koji je organizam genetski programiran.<sup>73</sup>

Genska ontologija se koristi za pretraživanje po funkcijma gena ili položaju u stanici, traženje gena s istim karakteristikama, uspostavljanje veza između proteina (metabolički putevi, izoforme...), određivanje funkcija proteina, zaključivanje o funkciji gena kod drugih organizama, provjeru dobivenih rezultata kod visokoprotočnih istraživanja i sl.<sup>73</sup> U tu svrhu razvijen je niz programa, aplikacija i servisa kao što su DAVID, GoMiner, AmiGo, Cytoscape i drugi.<sup>72,74,75</sup>

## 2.8. Biomarkeri

### 2.8.1. Definicija biomarkera

Biomarker je biokemijska osobina koja se može koristiti za dijagnozu bolesti, predviđanje ishoda bolesti, odabir terapije te procjenu djelotvornosti ili toksičnosti lijeka.<sup>76</sup> Biomarker se također definira kao mjeriva molekula u tjelesnim tekućinama ili tkivima koja ukazuje na normalni ili abnormalni proces ili stanje bolesti. Između mnogih potencijalnih biomarkera (proteini, transkripti, metaboliti i dr.), proteinski markeri mogu biti informativni i važni zbog njihove funkcionalne relevantnosti i dostupnosti minimalnim invazivnim metodama. Primjeri takvih proteinskih markera nalaze su u plazmi ili urinu.<sup>10</sup> Postupak definiranja biomarkera sastoji se od otkrića potencijalnog biomarkera, zatim njegove kvantifikacije, verifikacije i validacije te finalno kliničke evaluacije.<sup>77</sup> Za otkriće biomarkera koriste se imunološke metode (ELISA), metode temeljene na spektrometriji masa (analiza DDA i DIA)<sup>78</sup> i nizovi DNA.<sup>79</sup>

### 2.8.2. Plazma kao izvor biomarkera

Krv je reprezentativna tjelesna tekućina čije je korištenje poželjno u većini protemskih istraživanja. Preporučuje se korištenje plazme, te EDTA kao sredstvo izbora protiv zgrušavanja krvi prilikom uzorkovanja.<sup>63</sup> Od svih proteina sadržanih u plazmi i serumu, njih 20-ak imaju visoku zastupljenost te čine oko 99 % ukupnih proteina, dok ostalih tisuću čini oko 1% ukupnih proteina plazme ili seruma.<sup>47,80</sup> Dva najzastupljenija proteina u plazmi i serumu su albumin i IgG čineći 70% ukupnih proteina, što predstavlja problem za dinamički raspon, pa se visoko zastupljeni proteini uklanjaju ciljano prije analize.<sup>63</sup> U serumu i plazmi postoji raspon koncentracija različitih proteina od 11 redova veličine, dok zasebna analitička metoda može pokriti 4 do 5 redova koncentracije.<sup>81</sup> Postoje brojne metode smanjivanja dinamičkog raspona, od kojih su neke uklanjanje albumina i IgG svakog zasebno afinitetnom kromatografijom, tehnike imunodeplecije koje koriste specifična protutijela za uklanjanje najzastupljenijih (6, 12 ili 20 visoko zastupljenih) proteina te korištenje heksapeptidnih knjižnica (ProteoMiner). Deplecija se vrši na kolonama s antitijelima kao bi se povećala osjetljivost analize proteoma.<sup>80</sup>

Problemi deplecije podrazumijevaju korištenje kolona s antitijelima na koje ostali proteini uzorka mogu reagirati i tako dovesti do lažnih pozitivnih rezultata. Također može doći do koimunodeplecije proteina (koji su mogući biomarkeri) s visoko zastupljenim proteinima.<sup>63</sup>

## 2.9. Lišmanioza

### 2.9.1. Općenito i značaj bolesti

Lišmanioze čine skupinu bolesti nastalih invazijom parazitskih protozoa roda *Leishmania* (porodica Trypanosomatidae) mononuklearog fagocitog sustava nositelja sisavca.<sup>11</sup> Primarno ih prenose ženke hematofagnih sitnih insekata (biološki vektor) roda *Phlebotomus* na području Starog svijeta, odnosno roda *Lutzomya* na području Novog svijeta.<sup>11,12</sup> U Hrvatskoj se ti sitni insekti nazivaju papatači. Lišmanioze se s obzirom na rezervoare mogu podijeliti na antropofilne i zoofilne. U antropofilne pripadaju dvije vrste: *L. donovani* i *L. tropica*. Kod njih je rezervoar čovjek koji uzročnika ima u krvi i koži, a vektor prenosi uzročnika s čovjeka na čovjeka. Životinje su ovdje slučajne žrtve, nebitne za održavanje parazita. Zoofilne su sve ostale vrste iz roda *Leishmania*, gdje su rezervoari životinje, a uzročnik u njima slobodno cirkulira i održava se između animalnog rezervoara i kompetentnog vektora, bez potrebe za umnažanjem u čovjeku. Lišmanije su i zoonotske vrste, što znači da mogu invadirati čovjeka pri čemu je čovjek slučajna žrtva nebitna za održavanje parazita. Rezervoari su psi, tobočari, mravojedi, pasanci, pojedine vrste glodavaca i drugi sitni sisavci.<sup>12</sup>

Lišmanioza pasa otkrivena je 1908 u Tunisu.<sup>11</sup> Lišmanioza koju uzrokuje *L. infantum* je endemska zoonoza u mediteranskim zemljama od koje obolijevaju psi (koji su rezervoar), divlje životinje-pripadnici porodice pasa, mačke i ljudi. Zbog globalnog zatopljenja dolazi do širenja papatača iz područja subtropske klime prema sjeveru sve do alpskog područja i Mađarske. Time dolazi do povećanja kompetentnog broja vektora koji šire lišmaniozu među ljudima i psima. Također se povećava prostor na kojem psi mogu biti invadirani kada putuju s vlasnicima. Budući da je bolest kroničnog tijeka, tj. do pojave simptoma može proći nekoliko mjeseci ili čak godina, psi koji se naoko čine zdravi, mogu bit isto tako i invadirani, tj. mogu duže vrijeme biti neotkriveni rezervoari.<sup>12</sup>



### 2.9.2. Razvojni ciklus uzročnika

Procjenjuje se da postoji 800 vrsta papatača, od kojih su 98 dokazani vektori lišmanioze. Prijenos se na vektora događa kada ženka vektora siše krv na invadiranom nositelju, pri čemu ona unese u svoj organizam i amastigote. Oni se u njenom probavnom traktu transformiraju u izduljene promastogotne oblike s bičem gdje se dalje dijele binarnom diobom. Nakon tjedan-dva promastigoti migriraju u prednji dio probavnog trakta invadiranog vektora. Kada ženka papatača ponovno siše krv, u kožu novog nositelja unosi promastigote koje fagocitiraju makrofazi. U makrofazima dolazi do transformacije iz promastigota u amastigote, koji se nastavljaju razmnožavati diobom dok se makrofag ne rasprsne, nakon čega amastigoti fagocitozom ulaze u nove fagocite u tkivima raznih organa kao što su slezena, jetra, koštana srž i limfni čvorovi.<sup>11</sup>

### 2.9.3. Simptomi lišmanioze

Neki psi, na do sada nepoznat način mogu kontrolirati invaziju dugi niz godina bez kliničkih simptoma, a ponekad može doći i do spontanog izlječenja. Neki pak psi pokazuju oblik bolesti progresivnog karaktera, koji, ako se ne liječi, završava letalno. Klinička dijagnoza lišmanioze u pasa je zahtjevna jer 50% invadiranih pasa ne pokazuje kliničke simptome. Bolesni psi mogu pokazivati široki spektar kliničkih nespecifičnih simptoma jer ova bolest može zahvatiti bilo koji organ. Klinički znakovi bolesti mogu se javiti od trećeg mjeseca do nekoliko godina od dana invazije. Na nalazima hematološko-biokemijskih laboratorijskih pretraga vidljiva su sljedeća odstupanja: hipergamaglobulinemija (poliklonalne stimulacije B limfocita), anemija, disproteinemija (proteinska neravnoteža karakterizirana povećanjem ukupnog broja serumskih proteina), hiperalbuminemija (kod otkazivanja jetre i/ili bubrega) i vrijednosti A-G protutijela ispod donjeg limita. Jedan od prvih i najčešćih znakova bolesti je limfadenopatija (povećani potkožni limfni čvorovi). Nakon toga slijede promjene na koži i sluznicama (ispadanje dlake, upala kože, prhutanje i rane, bez svrbeža), zatim promjene na koži oko očiju, oticanje zglobova, ekstremna mršavost, otkazivanje bubrega te neurološki problemi.<sup>11</sup>

Kod ljudi postoje tri tipa lišmanioze s obzirom na kliničku sliku: kožna, kožno-sluznička i visceralna lišmanioza. Kod imunokompetentnih ljudi na mjestu uboda papatača javlja se lokalizirani kožni oblik bolesti. Visceralna lišmanioza ili kala-azar je najozbiljniji progresivni

oblik bolesti, koji je smrtonosan ako se ne liječi. On se javlja kod male djece i imunokompromitiranih osoba.<sup>11,12</sup>

Visceralna lišmanioza u odrasloj populaciji je nerijetko prvi pokazatelj nedostatka imuniteta kod pacijenata za koje se nije znalo da su HIV pozitivni. Kod ljudi oboljelih od AIDS-a i lišmanioze uzrokovane *L. infantum*, uzročnik se nalazi u koži i krvi, što nije uobičajeno kod imunokompetentnih osoba. Lišmanioza uzrokovana s *L. infantum* se zajedno s AIDS-om javlja u narkomana, koji koriste zajedničke igle i tamo gdje nema vektora.<sup>12</sup>

Kod imunokompetentnih ljudi liječenje lišmanioze je uspješno čemu uvelike pridonosi imunološki sustav, a najčešća komplikacija je toksično djelovanje lijeka. Kod pasa i imunokompromitiranih ljudi, unatoč kliničkom poboljšanju ne dolazi do izlječenja, nego se nakon terapije simptomi bolesti nerijetko vraćaju.<sup>12</sup>

#### 2.9.4. Dijagnoza, liječenje, prevencija i kontrola bolesti

Dijagnoza se zbog mnogo asimptomatskih pasa može postaviti temeljem rezultata parazitološke pretrage, te imunološkim i molekularnim metodama. Parazitološka pretraga je jedinstvena konačna metoda, koja se bazira na pronalasku amastigota, prvenstveno u limfatičnim organima kao što su limfni čvorovi, koštana srž i slezena, ali i jetra i koža. Molekularne metode temelje se na lančanoj reakciji polimerazom (PCR engl. *Polymerase Chain Reaction*) koja ima visoku specifičnost i osjetljivost. Od imunoloških metoda koristi se indirektna imunofluorescija (IFAT, engl. *Immunofluorescence Antibody Test*), imunoenzimski test (ELISA, engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) te različiti imunokromatografski testovi.<sup>11</sup>

Svjetska zdravstvena organizacija za liječenje lišmanioza preporuča peterovalentni antimon ( $Sb^V$ ) (npr. meglumin antimonat i natrijev stiboglukonat), miltefozin, liposomsku formulaciju amfotericina B i paromomicin, dok se u veterinarskoj medicini još koristi i alopurinol. Protiv lišmanioze pasa postoje i cjepiva Canileish<sup>®</sup> i Leish-Tec<sup>®</sup> koja daju niski zaštitni učinak, točnije od 68-71 %.<sup>11</sup>

Budući da je gotovo nemoguće spriječiti kontakt vektora i psa, potrebno je cijepiti pse ili koristi repelente.<sup>11</sup> Cjepivo predstavlja financijski trošak za državu i/ili vlasnika, a eutanazija pasa se nije pokazala učinkovitom jer eutanazirane pse zamjenjuju novi invadirani psi (budući da je problem u vektoru).<sup>12</sup> Korištenje repelenata, kao što su sintetički piretroidi (zasebno ili u

kombinaciji s drugim insekticidima) koji su impregnirani u pseće PVC ogrlice pokazalo se djelotvornim u odbijanju papatača u razdoblju od četiri do osam mjeseci.<sup>11</sup>

#### 2.9.5. Lišmanioza u Republici Hrvatskoj

Od više od deset mediteranskih vrsta papatača koje su kompetentni vektori, u Republici Hrvatskoj su dokazane četiri vrste. Te vrste roda *Phlebotomus*, podroda *Larrousius* se hrane na životinjama i ljudima nakon zalaska sunca, nerado ulaze u kuće, osjetljivi su na mikroklimatske uvijete, a legla i mjesta za zaklon su im na tlu i zidovima nastamba životinja.<sup>12</sup>

U Hrvatskoj postoje podaci o pojavljivanju visceralne lišmanioze od 1911. godine. Prvi dobro dokumentirani slučaj u kojem je ljudska lišmanioza mikroskopski potvrđena dogodio se na Splitskom području 1930.<sup>82</sup> Lišmanioza pasa je opisana je tridesetih godina 20. stoljeća u Splitu, a pedesetih godina je ponovno opisana na dubrovačkom području u ljudi i pasa. Tada po preporuci Svjetske zdravstvene organizacije počinje istrebljivanje malarije isušivanjem bara, liječenjem bolesnih jedinki i primjenom diklor-difenil-trikloretana (DDT-a). Papatači su tada stradali kao kolateralne žrtve, pa je lišmanioza postala rijetka bolest i kod ljudi i kod životinja. Prestankom ciljane upotreba DDT-a se do devedesetih godina na čitavom Mediteranu povećava broj oboljelih pasa i ljudi. Na dubrovačkom području je 1997. godine dijagnosticirana lišmanioza u većeg broja pasa, a sljedeće godine je lišmaniza dijagnosticirana u srednjoj i južnoj Dalmaciji. Time je postalo jasno da lišmanioza u Hrvatskoj nije rijetka tropska bolest.<sup>12</sup> Daljnjim istraživanjima u južnoj i srednjoj Dalmaciji pronađeno je još invadiranih pasa, Prema podacima Zavoda za javno zdravstvo, 27 prijavljenih slučajeva visceralne lišmanioze zabilježeno je u razdoblju od 1986. do 2006. na području južne Dalmacije. Navedena istraživanja su ukazala na to da je lišmanioza endemska bolest koja je, od svih hrvatskih regija, prisutna samo u Dalmaciji te zbog klimatskih promjena predstavlja opasnost širenja na ostale regije.<sup>82</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Kemikalije, setovi, instrumenti i ostala pomagala

#### 3.1.1. Kemikalije

U eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- Acetonitril, CH<sub>3</sub>CN, *Honeywell Internacional Inc., Morris-Plains, SAD*, LC-MS čistoće
- Amonijev hidrogen karbonat, (triv. ime amonijev bikromat), NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, *Honeywell Internacional Inc., Morris-Plains, SAD*, P.A. čistoće
- Ditiotreitrol, DTT, HSCH<sub>2</sub>[CH(OH)]<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH, *Sigma, Steinhem, Njemačka*, P.A. čistoće
- Jodoacetoamid, IAA, ICH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, *Sigma, Steinhem, Njemačka*, P.A. čistoće
- Metanska kiselina, HCOOH, *Sigma, Steinhem, Njemačka*, LC-MS čistoće
- MilliQ voda, *Honeywell, Soslze, Njemačka*, LC-MS čistoće
- Tripsin Gold, *Promega, Madison, SAD*, LC-MS čistoće

#### 3.1.2. Komercionalni setovi

Komercionalni setovi (kitovi) korišteni u eksperimentalnom radu:

- iRT kit (*Biognosys AG, Schlieren, Švicarska*)
- Pierce BCA Protein Assay Kit (*Pierce Biotechnology, Rockford, USA*)
- ProteoMiner Protein Enrichment Small Capacity Kit (*Bio-Rad Laboratories, INC., Watford, UK*)

**iRT** kit se sastoji od pufera za stvaranje otopine (engl. *Dissolution Buffer*) koji se nalaze u spremniku s plavim čepom i iRT standarda (11 sintetičkih peptida u zajedničkom uzorku koji se ne pojavljuju u prirodi) koji se nalaze u spremniku s crvenim čepom.

**Tablica 2.** Slijed aminokiselina peptida iRT s pripadajućom vrijednosti iRT<sup>67</sup>

Slijed aminokiselina	Naziv	iRT
LGGNEQVTR	iRT-pep a	-24,92
GAGSSEPVTGLDAK	iRT-pep b	0,00 <sup>a)</sup>
VEATFGVDESNK	iRT-pep c	12,39
YILAGVENS	iRT-pep d	19,79
TPVISGGPYEYR	iRT-pep e	28,71
TPVITGAPYEYR	iRT-pep f	33,38
DGLDAASYAPVR	iRT-pep g	42,26
ADVTPADFSEWSK	iRT-pep h	54,62
GTFIIDPGGVIR	iRT-pep i	70,52
GTFIIDPAAVIR	iRT-pep k	87,23
LFLQFGAQGSPFLK	iRT-pep l	100,00 <sup>a)</sup>

a) Definirane fiksne točke na iRT-C18 skali

Prije analize dodano je 50 µL pufera iz spremnika sa plavim čepom u spremnik s crvenim čepom gdje se nalaze standardi. Dobivenu otopinu potrebno je vorteksirati i sonicirati tijekom pet minuta. Na taj način jedobivena 10x koncentrirana otopina standarada iRT koja je u pripremljeni uzorak peptida dodana u omjeru 1:10. Koncentrirana otopina standarada iRT je čuvanau hladnjaku (2-8°C).

**ProteoMiner Protein Enrichment Small Capacity Kit** se sastoji od: spremnika sa čepovima u kojem se nalazi 20µL smole – nosača heksapeptida, PBS pufera za isparanje (150 mM NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) reagensa za eluiranje (8M urea, 2% CHAPS) i rehidracijskog elucijskog reagensa (5% octena kiselina).

**Pierce BCA Protein Assay Kit** se sastoji od: 500 mL BCA reagensa A (natrijev karbonat, natrijev bikarbonat, bicinchionska kiselinu i natrijev tartarat u 0,1 M otopini natrijeva hidroksida), 25 mL BCA reagensa B (4% bakrov sulfat) i ampula standarda albumina, 2 mg/mL (10·1 mL ampula koje sadrže goveđi serumski albumin (BSA) koncentracije 2 mg/mL u 0,9% otopine NaCl-a i 0,05% natrijeva azida).

### 3.1.3. Instrumenti

Analiza je provedena na spektrometru masa Q Exative Plus (*ThermoScientific, Bremen, Njemačka*), koji je bio spregnut s tekućinskim kromatografom nanoUHPLC Ultimate 3000 RSLCnano System (*ThermoScientific, Bremen, Njemačka*).

Za pripremu uzoraka su korišteni: uređaj za centrifugiranje (Universal 320, *Hettich Zentrifugen, Tuttingen, Njemačka*), vakuum koncentrator Speedvac (DNA Speedvac System, *ThermoScientific Fisher, Waltham, Massachusetts, SAD*), rotator (Wisemix, *Wisd Laboratory Elements, Werdheim, Njemačka*), ultrazvučna kupelj (Wisd, *Wisd Laboratory Elements, Werdheim, Njemačka*) i analitička vaga (WBA-220, *Wisd Laboratory Elements, Werdheim, Njemačka*).

### 3.1.4. Računalni programi za obradu podataka

Za obradu podataka dobivenih spektrometrijom masa, te bioinformatičku obradu podataka korišteni su sljedeći specijalizirani računalni programi:

- Proteome Discoverer, verzija 2.0. (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, SAD*)
- Spectronaut 10 (*Biognosys, Zurich, Švicarska*)
- DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrate Discovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov>)

### 3.1.5. Ostala pomagala

Za pripremu su korišteni:

- nastavci za pipete s kromatografskim punilom SCX: OMIX Tips, SCX 10 µL, *Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornija, SAD*
- nastavci za pipete s kromatografskim slojem C18: Cleanup C18 Pipette tips 10 µL, *Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornija, SAD*
- Centrifugalni filter uređaj Microcon 10, *Merck Millipore Ltd. Cork, Irska*

### 3.1.6. Otopina za kalibraciju spektrometra masa

Za kalibraciju spektrometra masa korištena je otopina LTQ Velos Positive ion calibration solution (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, SAD*), čiji se sastav nalazi u Tablici 3.

**Tablica 3.** Sastav otopine za kalibraciju u pozitivnom načinu rada spektrometra masa

Naziv standarda	<i>m/z</i>
Caffeine (fragment)	138,06619
Caffeine	195,08765
MRFA (Met-Arg-Phe-Ala peptid)	524,26496
Ultramark™ 1621	1221,99064
Ultramark™ 1621	1421,97786
Ultramark™ 1621	1621,96509

### 3.2. Arhivski uzorci plazme pasa

Korišteni su arhivski uzorci plazme pasa od kojih je kontrolna skupina bila serološki negativna trima metodama (imunoenzimskim testom, imunokromatografskim testom i indirektnom imunofluorescencijom) i predstavljala je zdrave pse, dok je druga skupina sadržavala serološki pozitivne uzorke testirane istim metodama korištenim kao i u zdravih, tj. predstavljala je bolesne pse (Tablica 4.). Serološke metode su provedene na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

**Tablica 4.** Podaci o korištenim arhivskim uzorcima

Broj uzorka	Metoda dijagnostike lišmanioze/nalaz		
	IFAT	ELISA	Ostali testovi
2274	1/1280 pozitivan	pozitivan	rK39 (+)
2282	1/640 pozitivan		
2287	1/640 pozitivan		
2304	1/640 pozitivan		
2315	1/ 2560 pozitivan	pozitivan	rK39 (+)
2298	1/40 negativan	negativan	
2303	1/40 negativan	negativan	
2311	1/40 negativan	negativan	rK39 (-)
2317	1/40 negativan	negativan	rK39 (-)
2318	1/40 negativan	negativan	rK39 (-)

Za izradu spektralnih knjižnica DDA odabrano je pet pozitivnih (oznake uzoraka 2274, 2287, 2315, 2282, 2304) i pet negativnih (oznake uzoraka 2311, 2317, 2303, 2318, 2298) uzoraka, kao i smjesa svih uzoraka čiji dio je obogaćen *ProteoMinerom*, dok je ostatak pripremljen koristeći postupak ekstrakcije na čvrstoj fazi. Smjesa uzoraka pripremljena je miješanjem iste količine proteina svih uzoraka seruma pasa u Eppendorf epruvetu.

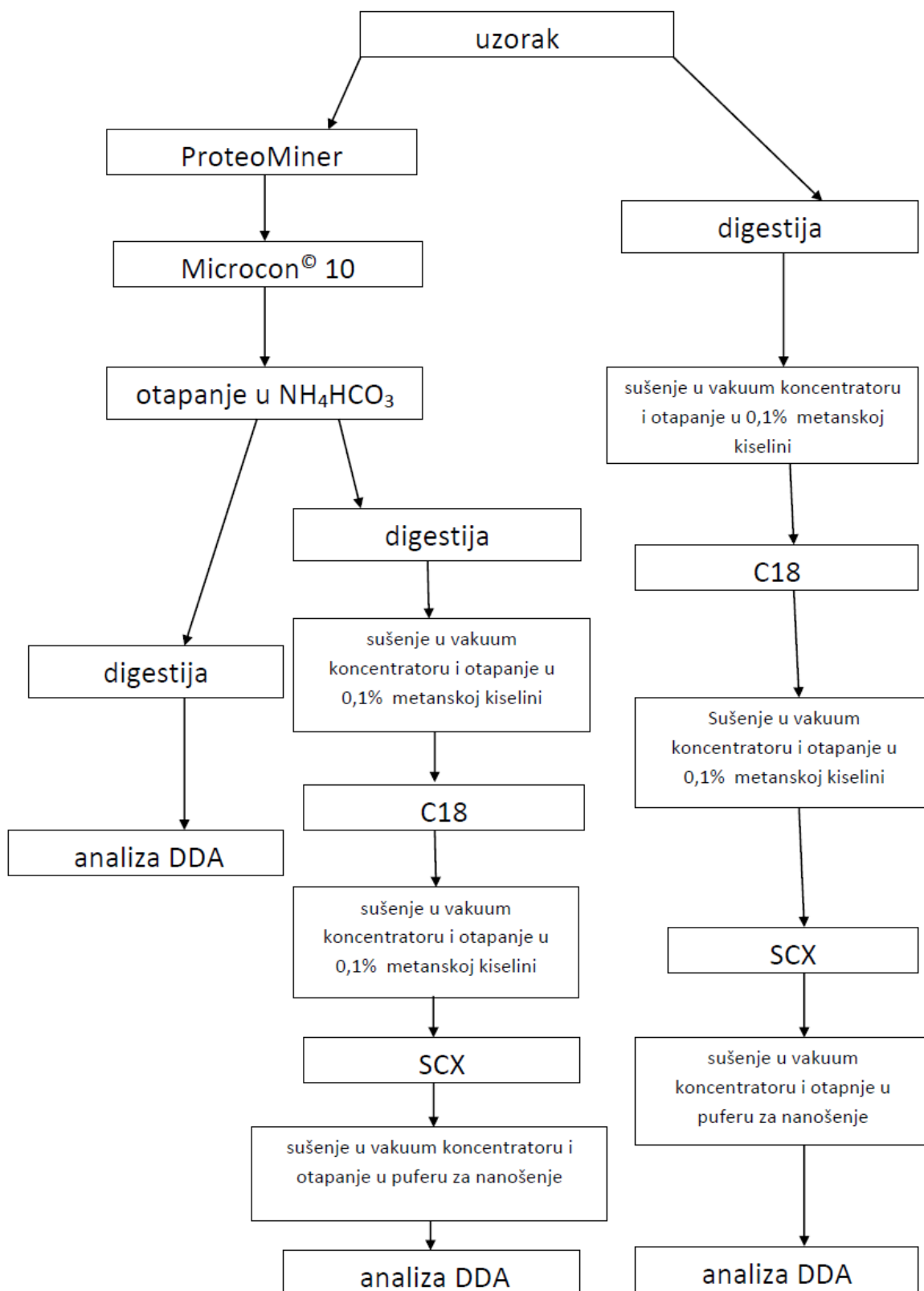
Za analizu pristupom DDA korišteno je pet uzoraka kontrole i pet uzoraka seruma bolesnih pasa te uzorci dobiveni obradom smjese svih uzoraka nakon *ProteoMinera* i ekstrakcije na čvrstoj fazi. Za analizu DIA pristupom korišteno je istih pet uzoraka kontrole i pet uzoraka seruma bolesnih pasa.

### **3.3. Priprava uzoraka za povećanje broja proteina u spektralnim knjižnicama**

#### *3.3.1. Plan pripreme smjese uzorka*

Smjesa uzoraka pripremljena je koristeći set *ProteoMiner* prema protokolu proizvođača, nakon čega se vršilo odsoljavanje na koloni za filtriranje *Microcon* 10. Potom je određena koncentracija proteina u uzorku, provedena digestija tripsinom i snimljen spektar masa pristupom DDA. Radi dobivanja većeg broja proteina u spektralnim knjižnicama, uzorak dobiven nakon odsoljavanja netretirani uzorak (svaki zasebno) su razgrađeni tripsinom, i osušeni u vakuum koncentratoru. Dobiveni talog je otopljen u 0,1%-tnoj otopini metanske (mravlje) kiseline u *MilliQ* vodi. Nakon toga je nad uzorcima, u svrhu pročišćavanja/odsoljavanja provedna mikroekstrakcija na čvrstoj fazi na kromatografskom sloju C18. Dobiveni uzorci su osušeni u vakuum koncentratoru, a talog otopljen u 0,1%-tnoj metanskoj kiselini. Nakon toga je slijedila mikroekstrakcija na čvrstoj fazi primjenom kromatografskog sloja SCX. Uzorci su ponovno osušeni u vakuum koncentratoru i otopljeni upuferu (98,9% H<sub>2</sub>O, 1% ACN i 0,1% metanska kiselina), nakon čega je provedena analiza spektrometrijom masa koristeći pristup DDA. Cijeli plan se nalazi na Shemi 1.





**Shema 1.** Prikaz strategije pripreme uzorka za kreiranje spektralnih knjižnica

### 3.3.2. *ProteoMiner*

Za obogaćivanje nisko zastupljenih proteina u serumu koristio se set malog kapaciteta heksapeptidnih knjižnica. Za postupak je korišteno 200  $\mu\text{L}$  smjese svih uzoraka (tzv. *Pool*). Za *ProteoMiner* su korištene kolone s čepovima na gornjoj i donjoj strani i epruvete za skupljanje eluata.

Najprije je ukolonjen gornji i donji čep i kolona je centrifugirana jednu minutu pri 1000  $xg$  kako bi se uklonila otopina za čuvanje kolone. Tako dobiveni eluat je bačen. U sljedećem koraku je dodano 200  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje kolone. Kolona je rotirana 5 minuta, nakon čega je centrifugirana jednu minutu pri 1000  $xg$ . Eluat je bačen, a korak ponovljen još jednom. U idućem koraku dodano je 200  $\mu\text{L}$  uzorka na kolonu. Kolona je rotirana dva sata pri sobnoj temperaturi na rotatoru nakon čega je centrifugirana 1 minutu na 1000  $xg$ . Dobiveni eluat je bačen. U sljedećem koraku dodano je 200  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje kolone. Kolona je rotirana 5 minuta, a potom centrifugirana jednu minutu na 1000  $xg$ . Eluat je bačen, a korak ponovljen dva puta. U idućem koraku na kolonu je dodano 200  $\mu\text{L}$  deionizirane vode. Kolona je rotirana jednu minutu nakon čega je centrifugirana 1 minutu na 1000  $xg$ . Eluat je bačen. U zadnjem koraku na kolonu je dodano 20  $\mu\text{L}$  rehidratiranog eluacijskog reagensa te je uzorak vorteksiran nekoliko puta tijekom 15 minuta. Eluat je skupljen u čistu epruvetu pri centrifugiranju od 1 minute. Korak je ponovljen dva puta, a eluat skupljen u čistu epruvetu.

### 3.3.3. *Microcon*<sup>®</sup> 10

Dobivenih 60  $\mu\text{L}$  otopine proteina nakon *ProteoMiner-a* bilo je potrebno odsoliti koristeći centrifugalne filter uređajena *Microcon*<sup>®</sup> 10. Filter uređaj je postavi u Eppendorf epruvetu u koju je dodano 200 mL *MilliQ* vode i 60  $\mu\text{L}$  dobivenog uzorka, nakon čega je smjesa centrifugirana 45 minuta pri 8000  $xg$ . U sljedećem koraku koji je ponovljen dva puta dodano je po 100  $\mu\text{L}$  *MilliQ* vode i uzorak je centrifugiran 30 minuta pri 8000  $xg$ . U idućem koraku dodano je 100  $\mu\text{L}$  10 mM Ambic-a (amonijev hidrogenkarbonat) i uzorak je centrifugiran 30 minuta pri 8000  $xg$ . Nakon toga je filter okrenut i eluat je skupljen u čistu Eppendorf epruvetu centrifugiranjem 5 min pri 2800 rpm.

#### 3.3.4. Digestija uzorka nakon ProteoMiner-a i analiza spektrometrijom masa

Određena je koncentracija dobivenog uzorka i ona je iznosila 0,54 mg/mL. U 50  $\mu$ L uzorka dodano je 5  $\mu$ L DTT koncentracije 50 mM i uzorak je inkubiran 30 minuta na 55 °C. Nakon toga je dodano 5  $\mu$ L IAA koncentracije 200 mM i smjesa je inkubirana 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Na kraju je dodan 1  $\mu$ L tripsina (1 mg/mL) i te je digestija provedena na 37° C preko noći (16h).

Za analizu DDA je pripremljeno 20  $\mu$ L smjese koja se sastojala od 10  $\mu$ L uzorka pripremljenog na gore navedeni način, 2  $\mu$ L smjese petida iRT (10x) i 8  $\mu$ L pufera (98,9% H<sub>2</sub>O, 1% ACN i 0,1% metanska kiselina). Injektirano 7  $\mu$ L smjese dok je metoda analize detaljno opisana u poglavlju 3.6. **DDA analiza.**

#### 3.3.5. Kromatografija obrnutih faza primjenom punila C18

Dva uzorka nakon digestije: jedan dobiveni postupkom ProteoMiner-a pročišćen Microcon 10 filtracijskim uređajem i netretirana smjesa uzoraka, svaki zasebno, su osušeni u vakuum koncentratoru i nastali talozi su otopljeni u 10  $\mu$ L 0,1% metanske (mravlje) kiseline. Za pripremu uzorka korišteni su nastavci za automatske pipete skromatografskim slojem C18 (Cleanup C18 Pipette tips 10  $\mu$ L).

U Eppendorf epruvetama od 1,5 mL pripremljene su tri otopine: prva se sastojala od 0,1% metanske kiseline i 99,9% MilliQ vode; druga od 50% acetonitrila 0,1% metanske kiseline i 49,9% MilliQ vode; i treća čiji je sastav bio 80% acetonitril, 0,1 % metanska kiselina i 19,9% MilliQ voda.

Postupak mikroekstrakcije se sastoji od kondicioniranja, uzimanja uzorka, ispiranja i eluiranja. Dok traje postupak otopine se uzimaju do prvog koljena automatske pipete. Pri zadnjem eluiranju automatska pipeta se pritišće do drugog koljena. Automatska pipeta je namještena na 10  $\mu$ L te je kondicionirana uzimanjem otopine (80% ACN). Postupak je ponovljen tri puta. Nakon toga je slijedilo uzimanje i ispuštanje uzorka 10 puta (pri čemu dolazi do vezanja peptida na kromatografsko punjenje C18). Nakon toga je slijedi ispiranje 5 puta u otopini 1 (0,1% mravlja kiselina). Potom je slijedilo eluiranje 10 puta otopinom 3 (80% ACN) pri čemu je skupljen eluat. Skupljeni eluat dva uzorka zasebno osušen je u vakuum koncentratoru i talog je otopljen u 10  $\mu$ L 0,1% metanske kiseline, nakon čega je slijedila mikroekstrakcija na nastavcima za pipete s kromatografskim slojem SCX.

### 3.3.6. SCX

Sastav pufera za ispiranje: 25% ACN, 0,05% metanska kiselina, 74,95% MQ voda.

Sastav pufera za eluaciju: E1 (25% ACN, 0,05% metanska kiselina i 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )

E2 (25% ACN, 0,05% metanska kiselina i 200 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )

E3 (25% ACN, 0,05% metanska kiselina i 400 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ).

Za pripremu uzorka korišteni su nastavci za automatske pipete s SCX kromatografskim slojem SCX (OMIX Tips, SCX 10  $\mu\text{L}$ ).

Prije mikroekstrakcije potrebno je prirediti otopine amonijeva hidrogenkarbonata (Ambic-a) koncentracije 400 mM, 200 mM i 100 mM, koje se koriste za pripremu hlapljivih pufera koji su kompatibilni s analizom MS. Otopinakoncentracije 400 mM pripravljena je u odmjernoj tikvici od 50 mL otapanjem 1,581 g  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  u *MilliQ* vodi nadopunjenoj do oznake. Ostale dvije otopine dobivene su razrjeđivanjem prve otopine.

Postupak SCX se sastoji od ispiranja koji se provodi tri puta, postupka uzimanja uzorka pet puta, postupka ispiranja koji se ponovno obavlja tri puta i postupka eluacije koji se obavlja po dva puta iz tri otopina različitog udjela  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Eluiranje se obavlja po dva puta iz svakog pufera za eluaciju redoslijedom: E1, E2 i E3. Naposljetku slijedi sušenje u vakuumskom koncentratoru.

Osušeni uzorci su otopljeni u 19  $\mu\text{L}$  pufera (za nanošenje) te im je dodan 1  $\mu\text{L}$  peptida iRT (10x). Pripremljeni uzorci su analizirani spektrometrijom masa opisanom u poglavlju 3.6. **DDA analiza.** Za analizu je injektirano 7  $\mu\text{L}$  smjese.

## 3.4. Određivanje koncentracije proteina analizom BCA

Test bicinoninske kiseline (engl. *BCA assay*) koristi se svojstvima BCA za kolorimetrijsku detekciju i kvantifikaciju ukupnog broja proteina. Prvi korak u testu je redukcija  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^{1+}$  peptidima koji sadrže tri ili više aminokiselinskih ostataka u alkalnom mediju (biuretova reakcija). U drugom koraku ioni  $\text{Cu}^{1+}$  reagiraju s korištenjem specifičnog reagensa s bicinoninskom kiselinom. Ljubičasto obojenje produkta reakcije nastaje keliranjem dvije molekule BCA na jedan bakreni ion. Kompleks koji je topljiv u vodi pokazuje veliku apsorbanaciju na 562 nm, koja se linerano povećava unutar širokog raspona rada (20-2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).<sup>83</sup>

## 3.4.1. Priprava razrijeđenih standarda albumina iz goveđeg seruma (BSA)

Za određivanje koncentracije korišten je standard albumina iz goveđeg seruma (BSA), pri čemu je pripremljen niz razrijeđenih otopina poznate koncentracije (Tablica 5.). Ishodišna otopina je 2 mg/mL otopina BSA, a sredstvo za razrjeđivanje je *MilliQ* voda.

Tablica 5. Priprava razrijeđenih otopina BSA

Otopina	Volumen vode / $\mu\text{L}$	Volumen (otopine) potreban za dobivanje konačne koncentracije BSA / $\mu\text{L}$	Konačna masena koncentracija BSA / ( $\mu\text{g/mL}$ )
A	0	300 (ishodišne otopine BSA)	2000
B	125	375 (ishodišne otopine BSA)	1500
C	325	325 (ishodišne otopine BSA)	1000
D	175	175 (otopine B)	750
E	325	325 (otopine C)	500
F	325	325 (otopine E)	250
G	325	325 (otopine F)	125
H	400	100 (otopine G)	25
I	400	0	0 = slijepa proba

Nakon toga potrebno je izračunati volumen BCA radnog reagensa. BCA radni reagens se dobije miješanjem BCA reagensa A s BCA reagensom B u omjeru 50:1. Ukupni volumen radnog reagensa dobije se prema formuli:

$$\begin{aligned}
 & (\text{broj standarda} + \text{broj uzoraka nepoznate koncentracije}) \cdot (\text{broj replika}) \\
 & \quad \cdot (\text{volumen radnog reagensa potreban za jedan uzorak}) \\
 & = \text{ukupni volumen radnog reagensa}
 \end{aligned}$$

Kada se BCA primjenjuje na mikroploče, volumen radnog reagensa potreban za jedan uzorak je 200  $\mu\text{L}$ .

#### 3.4.2. Procedura na mikropločama

Za analizu je potrebno 25  $\mu\text{L}$  svakog standarda ili uzorka nepoznate koncentracije. Uzorcima je dodano 200  $\mu\text{L}$  radnog reagensa u svaku jažicu te je ploča kratko inkubirana na tresilici 30 sekundi. Nakon toga se ploča inkubira na 37 °C u trajanju od 30 minuta.

Kada se ploča ohladi na sobnu temperaturu, mjeri se apsorbancija na 562 nm (ili u rasponu od 540-590 nm) na spektrofotometru. Prilikom izračuna koncentracije od apsorbancija uzoraka se oduzme apsorbancija slijepe probe. Iz rezultata se crta krivulja koja na x-osi sadrži vrijednost koncentracije proteina u ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a na y-osi apsorbanciju. Iz jednadžbe dobivenog pravca, preko apsorbancije može se odrediti koncentracija proteina u nepoznatim uzorcima.

### 3.5. Digestija proteina

Prije digestije uzorcima je određena koncentracija. Pripremljene su otopine: 50 mM amonijeva hidrogenkarbonata (Ambic; otapanje 40 mg  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  u 10 mL *MilliQ* vode), 50 mM DTT-a (otapanje 7,8 mg DTT u 1 mL *MilliQ* vode) i 200 mM IAA (otapanjem 30,85 mg IAA u 1 mL *MilliQ* vode). Uzorak je razrijeđen *MilliQ* vodom u omjeru 1:50, a zatim Ambicom. Ukupni volumen uzorka prije digestije je 50  $\mu\text{L}$  i sadrži 50  $\mu\text{g}$  proteina. Zatim je u tako razrijeđeni uzorak dodano 5  $\mu\text{L}$  DTT-a koncentracije 50 mM i uzorak je inkubiran 30 minuta na 55 °C. Nakon toga je dodano 5  $\mu\text{L}$  IAA koncentracije 200 mM i ostavljeno 20 minuta u mraku. Na kraju je dodan 1  $\mu\text{L}$  tripsina i uzorak je inkubiran na 37°C preko noći (16h). Ovako pripremljeni uzorak pohranjen se na -20°C do analize te mu je neposredno prije analize dodana smjesa peptida iRT (10x).

### 3.6. Analiza DDA

Deset uzorka seruma pasa (Tablica 4.), tj. pet pozitivnih i pet negativnih analizirano je tehnikom podatkovno ovisne akvizicije kako bi se dobili potrebni podaci za kreiranje spektralnih knjižnica. Od svakog uzorka pripremljeno je 10  $\mu\text{L}$  uzorka za injektiranje koji se

sastojao od 2  $\mu\text{L}$  uzorka, 1  $\mu\text{L}$  iRT peptida i 7  $\mu\text{L}$  pufera za nanošenje uzorka. Za analizu je injektirano 5  $\mu\text{L}$  uzorka iz autosamplera termostiranog na  $5^\circ\text{C}$ . Analiza visoke rezolucije LC-MS/MS provedena je korištenjem Ultimate 3000 RSLCnano sustava (Dionex) vezanog sa spektrometrom masa Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific). Peptidi su nanoseni na pretkolonu (C18 PepMap100,  $5\mu\text{m}$ , 100 A,  $300\mu\text{m}\cdot 5\text{mm}$ , Rockford, SAD) ispirani 12 minuta uz protok od  $15\mu\text{L}/\text{min}$  i odvojeni na analitičkoj koloni (PepMap<sup>TM</sup> RSLC C18,  $50\text{cm}\cdot 75\mu\text{m}$ , Thermo Fisher Scientific, Rockford, SAD) pri temperaturi  $35^\circ\text{C}$  korištenjem linearnog gradijenta prikazanog u Tablici 6. Mobilna faza A se sastojala od 0,1% metanske kiseline u vodi, a mobilna faza B od 0,1 % metanske kiseline, 80 % ACN i ostalo MilliQ voda.

**Tablica 6.** Shema gradijenta korištenog za DDA

Vrijeme zadržavanja/ min	Protok / ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	% mobilne faze B
0	0,3	5,0
12	0,3	5,0
132	0,3	55
133	0,3	95
135	0,3	95
136	0,3	5,0
155	0,3	5,0

Ionizacija je postignuta korištenjem nanoraspršenja Felix ion source (Thermo Fisher Scientific, Rockford, SAD), koji sadrži emiter SilicaTip (New Objective) unutarnjeg promjera  $10\mu\text{m}$ . Spektrometrija masa je provedena u pozitivnom načinu rada spektrometra masa koristeći metodu podatkovno ovisne akvizicije DDA Top10. Spektar masa snimljen je u rasponu od  $350,0\text{ m/z}$  do  $1800,0\text{ m/z}$  pri rezoluciji od 70000, injekcijskom vremenu od 120 ms, AGC vrijednošću  $1\cdot 10^6$ , izolacijskom prozoru od 2 Da i dinamičkom isključenju od 30 s. Fragmentacija HCD provedena je pri normaliziranoj energiji sudara (NCE) 29% srezolucijom 17500 i AGC vrijednošću  $2\cdot 10^5$ . Ioni prekursori neodređenog naboja, kao i oni s nabojem +1 i više od +7 isključeni su iz daljnjeg odabira fragmentacije.

Za identifikaciju peptida korištenje algoritam SEQUEST integriran u program Proteome Discover. Provedena je pretraga baze podataka *Canis lupus familiaris* preuzete s UniprotKB,

30.11.2017, koja je sadržavala 29403 unosa, prema sljedećim parametrima: dva mjesta tripsinskog preskočenog cijepanja, tolerancija pogreške izmjerene mase prekursora i fragmenata od 10 ppm i 0,05 Da, zasebno; karbamidometiliranje C-kraja peptida kao trajna modifikacija; deaminacija (N/Q), i oksidacija (M) kao dinamičke modifikacije. Udio krivih pogodaka (FDR, engl. *false discovery rate*) za identifikaciju peptida je automatski izračunat korištenjem algoritma Percolator u Proteom Discover-u, te je maksimalna vrijednost iznosila 1%. Samo proteini s barem dva jedinstvena pepetida i 5% FDR su prikazani kao valjani za identifikaciju.

### 3.7. Analiza DIA

Deset uzorka seruma pasa (Tablica 4.), tj. pet pozitivnih i pet negativnih uzoraka analizirano je tehnikom podatkovno ovisne akvizicije kako bi se dobili potrebni podaci za kreiranje spektralnih knjižnica. Od svakog uzorak pripremljeno je 10 µL uzorka za injektiranje koji se sastojao od 2 µL uzorka, 1 µL iRT peptida i 7 µL pufera za nanošenje uzorka. Za analizu je injektirano 5 µL uzorak iz autosamplera termostatiranog na 5°C. Analiza visoke rezolucije LC-MS/MS povedena je korištenjem Ultimate 3000 RSLC nano sustava (Dionex) vezanog sa spektrometrom masa Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific). Peptidi su nanoseni na pretkolonu (C18 PepMap100, 5µm, 100 Å, 300µm·5mm, Rockofor, SAD) ispirani 12 minuta uz protok od 15 µL/min i odvojeni na analitičkoj koloni (PepMap™ RSLC C18, 50 cm·75 µm, Thermo Fisher Scinetific, Rockford, SAD) pri temperaturi 35 °C korištenjem linearnog gradijenta prikazanog u Tablici 6. Mobilna faza A se sastojala od 0,1% metanske kiseline u vodi, a mobilna faza B od 0,1% metanske kiseline, 80 % ACN i ostalo MilliQ voda.



Tablica 7. Shema gradijenta korištenog za DIA

Vrijeme / min	Protok / ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	% mobilne faze B
0	0,3	5
8	0,3	5
68	0,3	40
69	0,3	95
74	0,3	95
75	0,3	5
95	0,3	5

Ionizacija je postignuta korištenjem nanoraspršenja Felix ion source (Thermo Fisher Scientific, Rockford, SAD), koji sadrži emiter SilicaTip (New Objective) unutarnjeg promjera 10  $\mu\text{m}$ . Spektrometrija masa je provedena na pozitivnom načinu rada spektrometra masa koristeći podatkovno neovisnu akviziciju i podatkovno ovisnu akviziciju „Full MS”. „Full MS“ metoda provedena je tijekom cijelog vremena rada (od 0-95 minute) u rasponu masa od 450  $m/z$  do 1100  $m/z$  pri rezoluciji od 35,000 uz AGC vrijednost  $1 \cdot 10^6$ .

Metoda DIA se provodila od osme do 95 minute vremena rada u rasponu masa od 450  $m/z$  do 1100  $m/z$  (podijeljenom na 26 prozora duljine 25 Da za prvo injektiranje tj. 44 prozora od 15 Da za drugo injektiranje) pri rezoluciji od 17,500 uz AGC vrijednost  $1 \cdot 10^6$  i MSX broj 1 te zadani naboj +2. Fragmentacija HCD provedena je pri normaliziranoj energiji sudara (NCE) 29% s rezolucijom 17500 i AGC vrijednošću  $2 \cdot 10^5$ . Ioni prekursori neodređenog naboja, kao i oni sa nabojem +1 i više od +7 isključeni su iz daljnjeg odabira fragmentacije.

Za razvoj metode na jednom uzorku mijenjane su postavke tzv. „Loop Count“ i AGC vrijednost. U svrhu odabira optimalnih vrijednosti metode DIA, provedena je analiza varirajući sljedeće parametre (prozor, AGC tražet, Loop count): 1.(15 Da, 8,  $1 \cdot 10^6$ ), 2.(15 Da, 15,  $2 \cdot 10^5$ ), 3.(25 Da, 15,  $1 \cdot 10^6$ ), 4.(25 Da, 8,  $1 \cdot 10^6$ ), 5.(25 Da, 15,  $2 \cdot 10^5$ ).

Podaci su obrađeni u programu Spectronaut 10. Za identifikaciju proteina korištene su spektralne knjižnice dobivene analizom DDA navedenih deset uzoraka (Tablica 4.) i uzoraka dobivenog miješanjem svih uzoraka obogaćenih *ProteoMiner-om* i/ili pročišćenih upotrebom mikroekstrakcije na čvrstoj fazi. Uz to je korištena baza podataka *Canis lupus familiaris* preuzeta s UniprotKB, 30.11.2017, koja je sadržavala 29403 unosa i sekvence iRT peptida inkorporirane u spektralnu knjižnicu.

Nakon statističke obrade podaci su prikazani u obliku *Voclano* grafa (grafičkog prikaza u obliku vulkana) i kojega su izdvojeni potencijalni kandidati za biomarkere. Nadalje, dobiveni kandidati su analizirani korištenjem baze podataka DAVID u svrhu određivanja genske ontologije (molekularne funkcije i subcelularne lokalizacije).

### 3.8. Kreiranje spektralnih knjižnica

Izgradnja nove spektralne knjižnice sastoji se od odabira reprezentativnih uzoraka za stvaranje spektralne knjižnice, korištenja referentih peptida za određivanje retencijskog vremena (iRT pepidi), akvizicije spektra fragmentnih iona, konverzije spektra iona fragmenata, pretrage baze podataka i statističkog određivanja PSM-a, stvaranja spektralne knjižnice s poravnanim retencijskim vremenima (uspostavljanje veze između retencijskih vremena i iRT vrijednosti) te uređivanje knjižnice.<sup>62</sup>

Za izradu knjižnica korišteni su računalni programi Proteome Discoverer i Spectronaut te rezultati analize DDA svih deset uzoraka (Tablica 4.) pojedinačno kao i uzoraka dobivenog miješanjem svih uzoraka obogaćenih *ProteoMiner-om* i/ili pročišćenih upotrebom mikroekstrakcije na čvrstoj fazi.

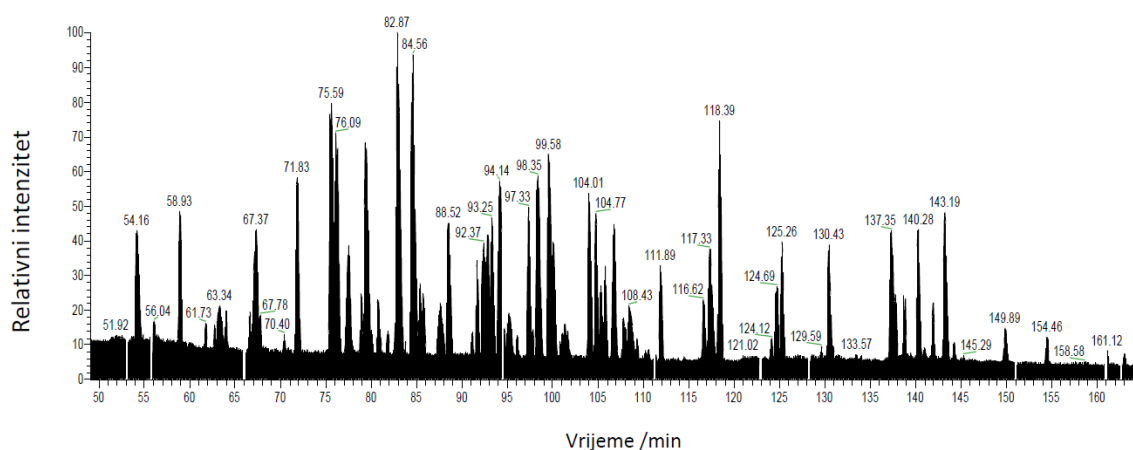
## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Glavni rezultati

Razvijena je metoda spektrometrije masa temeljena na podatkovno neovisnoj akviziciji za identifikaciju potencijalnih sekumskih biomarkera lišmanioze u pasa. Kvantifikacija bez oznake dobivenih podataka provedena je u programu Spectronaut pomoću iRT peptida, dok je odabir potencijalnih biomarkera vizualiziran pomoću *Volcano* grafa sa  $q$  vrijednosti 0,05. Dobiveno je 16 kandidata od kojih je jedan nekarakterizirani protein. Ostalih 15 proteina su: serumski amiloid A protein, pentaksin, leucinom bogati alfa-2-glikoprotein 1, apolipoprotein A-IV, glikozilfosfatidilinozitol specifična fosfolipaza D1, maltaza-glukoamilaza, fibronektin, apolipoprotein B, apolipoprotein E, sulfhidril oksidaza, histidinom bogati glikoprotein, alfa-2-makroglobulin, heptoglobulin, teški lanac 3 inter-alfa-tripsinskog inhibitora te član obitelji teškog lanca 4 inter-alfa-tripsinskog inhibitora.

### 4.2. Kreiranje spektralnih knjižnica

Spektralne knjižnice su nužne za provođenje analize podataka dobivenih podatkovno neovisnom akvizicijom u programu Spectronaut. One se kreiraju iz podataka dobivenih podatkovno ovisnom akvizicijom, a sastoje se od vrijednosti  $m/z$  peptidnog prekursora, vrijednosti  $m/z$  za svaki fragment peptida prekursora zajedno sa njihovim intenzitetima i normaliziranim vremenom zadržavanja peptida. Za normaliziranje vremena zadržavanja peptida koristili su se iRT peptidi.<sup>62,69</sup> Spektri masa dobiveni DDA, čiji je reprezentativan kromatogram prikazan na Slici 6., obrađeni su primjenom programa Proteome Discoverer koji je omogućio pouzdanu identifikaciju peptida i proteina. Dobiveni podaci bili su temelj za kreiranje spektralnih knjižnica pomoću Spectronauta.



**Slika 6.** Tipičan kromatogram ukupne ionske struje dobiven podatkovno neovisnom analizom prema opisanoj metodi

U Tablici 8. nalazi se opis tri dobivene knjižnice s brojem peptida odnosno proteina.

**Tablica 8.** Karakteristike kreiranih spektralnih knjižnica

Knjižnica	Broj prekursora	Broj peptida	Broj proteina	Broj proteinskih grupa
Pool DDA uzorak	1363	1045	197	150
DDA pool + DDA pool <i>ProteMiner</i> /μSPE uzorak	3445	2439	518	340
10 DDA uzorci + DDA pool + DDA pool <i>ProteMiner</i> /μSPE uzorak	4479	3223	994	969

Tijekom rada stvorene su tri knjižnice. Prva je kreirana od rezultata analize od DDA „Pool” (smjesa svih uzoraka plazme pasa korištenih u radu) i sadržavala je 1045 peptida i 197 proteina. Kako bi se povećao broj identificiranih peptida/proteina, provedeno je uklanjanje visoko zastupljenih proteina, korištenjem seta *ProteMiner* i naknadnom mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi „Pool” uzorka. Analizom DDA navedenog uzorka (DDA pool *ProteMiner*/μSPE uzorak) i stavljanjem nove knjižnice zajedno s uzorkom „Pool” dobivena je nova knjižnica koja je sadržavala 518 proteina i 2439 peptida. Treća knjižnica dobivana je spajanjem druge knjižnice sa spektrima DDA dobivenih iz pet uzoraka seruma na lišmaniozu pozitivnih i pet na lišmaniozu negativnih uzorka plazme pasa. Ta knjižnica sadrži 994 proteina i

3223 peptida. U daljnoj analizi podataka dobivenih podatkovno neovisnom akviziciojm korištena je knjižnica s najvećim brojem peptida/proteina, jer se detektirati mogu samo oni peptidi koji se nalaze u spektralnoj knjižnici.

### 4.3. Razvoj DIA metode

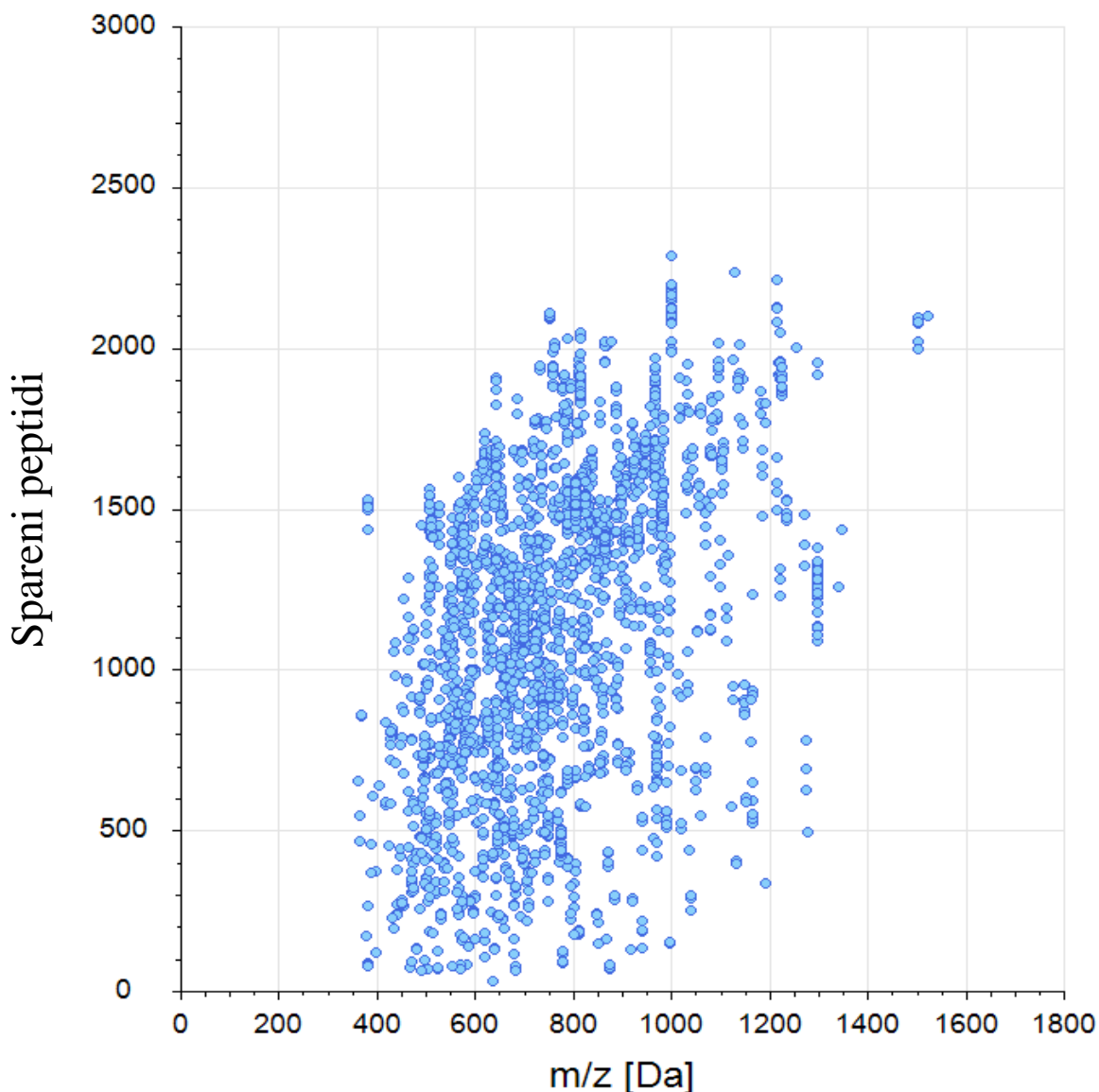
Najvažniji kriterij za što bolju DIA analizu je odabir instrumenta i metode DIA koja će se koristiti.<sup>59</sup> Uspješnost analize DIA može se poboljšati mijenjanjem akvizicijskih parametara kao što su: raspon masa prekursora, dužina izolacijskog prozora prekursora, akumulacijsko vrijeme snimanja iona produkta, ukupan ciklus snimanja spektra (engl. *duty cycle*). Akvizicijski parametri utječu na intenzitete i specifičnost fragmentiranih iona, propusnost, točnost i konzistentnost kvantifikacije. Uz navedeno, mogu se mijenjati varijable obrade podataka, kao što su kriteriji za ekstrakciju određenih elucijskih pikova i veličina spektralne knjižnice.<sup>84</sup> Općenito vrijedi da se odabirom užeg izolacijskog prozora dobije jednostavniji spektar za identifikaciju, iz kojeg se dobije više peptida, ali je potrebno napraviti više akumulacija. Uporabom dužih prozora dobivaju se spektri kompliciraniji za analizu jer sadrže više iona prekursora.<sup>60</sup> Kombinacijom namještanja dužine prozora i zadavanja akumulacijskog vremena također se mogu dobiti podaci s različitim brojem pepida.<sup>84</sup> Brudereer i suradnici su primjenom DIA tehnike na kojoj su optimizirali cikličko vrijeme metode (engl. *method cycle time*) (broj točaka po piku, rezolucija MS1, rezolucija MS2 i broj odabira prekursora za spektar MS2) što je rezultiralo identifikacijom dvostruko većeg broja peptida nego primjenom moderne DDA metode na instrumentu Q Exactive.<sup>85</sup>

#### 4.3.1. Odabir raspona masa

Budući da metode DIA (osobito one koje raspon masa spektra MS1 dijele na uzastopne prozore jednake duljine) nemaju zadani broj iona najvećeg intenziteta u spektru MS1 koji se fragmentiraju, potrebno je odrediti raspon masa spektra MS1 na kojem će se provoditi DIA ne bi li se fragmentirao čim veći broj peptidnih iona. Odabrani raspon masa ovisi ponajprije o uzorku (točnije masama peptida u uzorku), a zatim o parametrima metode LC-MS (gradijentu, broj iona, vremenu analize jednog ciklusa MS). Za neciljane metode DIA najčešći raspon

masa je od 300  $m/z$  (najviše 400  $m/z$ ) za početak akvizicije do 1200  $m/z$  za kraj akvizicije, pri čemu se raspon masa podjeli na prozore.<sup>86</sup>

Kako bi se odredio raspon masa optimalan za analizu DIA proveden je detaljan uvid u raspodjelu omjera  $m/z$  identificiranih peptidnih iona (PSM) duž cijelog raspona masa primjenjenog u analizi DDA te je reprezentativna raspodjela prikazana na Slici 7.



**Slika 7.** Raspodjela omjera  $m/z$  identificiranih peptidnih iona

Temeljem uvida u prethodno opisanu raspodjelu, određen je optimalan raspon masa koji obuhvaća najveći broj (oko 80%) peptidnih iona te iznosi 450 $m/z$ -1100  $m/z$ .

## 4.3.2. Optimizacija ostalih parametara analize MS

Nakon odabira raspona masa, potrebno je odabrati širinu prozora DIA. Dijeljenjem raspona masa na više prozora manje širine dobivaju se manje složeni spektri svakog prozora, jer se na taj način fragmentira manji broj peptidnih iona različitog raspona masa, što omogućuje identifikaciju većeg broja peptida/proteina iz više nastalih spektara masa. Dijeljenjem raspona masa na manji broj prozora veće širine dobiju se složeniji spektri u svakom prozoru, što smanjuje mogućnost identificiranja peptida/proteina zbog složenosti spektra, jer je ukupan broj spektara manji.<sup>60</sup> Uz širinu prozora varirane su vrijednosti AGC (automatskog preuzimanja kontrole, tj. broja iona koji će se analizirati/fragmentirati) i broj petlji (tzv. „*Loop Count*”). Budući da se radi o kvantitativnoj metodi, također je bilo važno utvrditi broj točaka kroz pik radi pouzdane, točne i reproducibilne kvantifikacije. Rezultati optimizacije metode MS nalaze se u Tablici 9.

Tablica 9. Razvoj metode DIA

Metoda / širina prozora	AGC vrijednost	<i>Loop count</i>	Broj peptida	Broj proteina	Broj točaka kroz pik
1./15 Da	$1 \cdot 10^6$	8	1660	394	4
2./15 Da	$2 \cdot 10^5$	15	1591	396	5
3./25 Da	$1 \cdot 10^6$	15	1516	389	8
4./25 Da	$1 \cdot 10^6$	8	1548	377	8
5./25 Da	$2 \cdot 10^5$	15	1392	343	8

Temeljem dobivenih podataka, utvrđeno je da metode koje sadrže širinu prozora 15 Da daju veći broj identificiranih peptida i proteina od metoda koje koriste prozore širine 25 Da. Navedene rezultate je moguće objasniti manje kompleksnim spektrima masa pri čemu je omogućena fragmentacija većeg broja različitih peptidnih iona.<sup>60</sup>

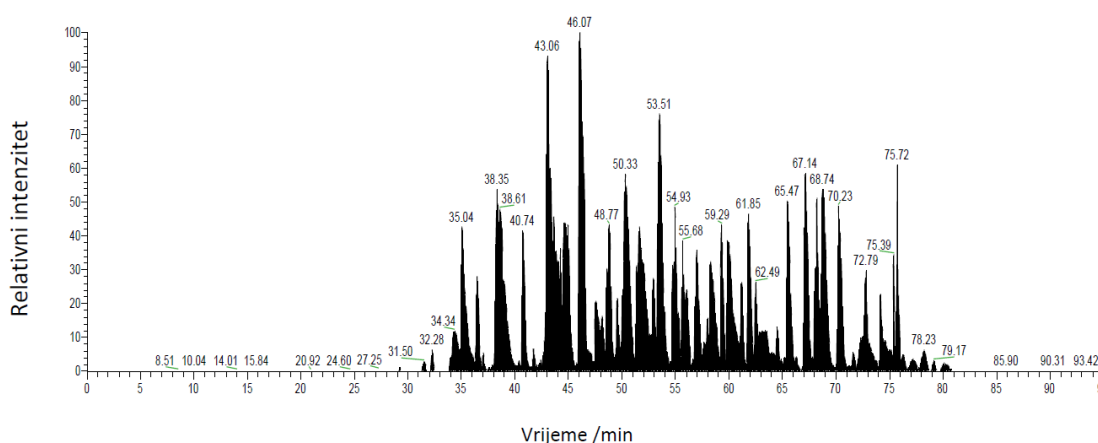
Vezano za broj točaka kroz pik, primjenom (netandemne analize) LC-MS, broj točaka koje definiraju pik treba biti veći od 15 kako bi se omogućila pouzdana kvantifikacija.<sup>87</sup> Za kvantifikaciju temeljenu na podacima iz spektra MS/MS, prihvatljiva vrijednost točaka kroz pik je 7 do 8.<sup>88</sup> Što se tiče kvantifikacije, pouzdanije vrijednosti kvantitativne analize postižu se većim brojem točaka kroz pik, jer se onda površina pika može bolje aproksimirati. Veći broj prozora DIA također daje pouzdanije i točnije rezultate radi smanjenja kompleksnosti spektra,<sup>85</sup> što dovodi do potrebe za balansiranjem između navedenih parametara jer se broj

točaka kroz pik smanjuje povećanjem broja prozora. Broj točaka kroz pik se može povećati i povećanjem vremena trajanja ciklusa snimanje i/ili smanjenjem vremena zadržavanja za svaki prozor. Smanjenje vremena zadržavanja utječe na kvalitetu podataka, jer je moguća nedovoljna akumulacija nisko zastupljenih peptida za postizanje statistički značajnih podataka. Kod razvoja metode u obzir se mora uzeti dinamički raspon i gustoća peptida kako bi se dobili zadovoljavajući podaci,<sup>89</sup> što je vidljivo u Tablici 9. Metode 1 i 2 imaju raspon masa podjeljen na 44 prozora širine 15 Da i broj točaka po pik 4 i 5. Nadalje metode 3, 4 i 5 u istom rasponu masa imaju 26 prozora širine 25 Da i 8 točaka po pik, što dovodi do zaključka da su spektri od 25 Da pogodniji za kvantifikaciju od onih dobivenih iz prozora od 15 Da.

Vrijednost AGC ili usmjerenje automatskog preuzimanja kontrole je vrijednost koja kontrolira broj iona koje se injektiraju u Orbitrap, kako bi se održavala optimalna količina iona za svaki snimljeni spektar masa. Dozvoljene vrijednosti za instrument Q Exactive Plus su  $2 \cdot 10^4$ ,  $5 \cdot 10^4$ ,  $1 \cdot 10^5$ ,  $2 \cdot 10^5$ ,  $5 \cdot 10^5$ ,  $1 \cdot 10^6$ ,  $3 \cdot 10^6$ ,  $5 \cdot 10^6$ . „*Loop count*” ili broj petlji je broj ponavljanja određenog snimka, prije nego se prebaci na drugi snimak u radnom ciklusu. Dozvoljene vrijednosti ovog parametra su od 1 do 100.<sup>89</sup> Iz dobivenih rezultata vidi se da veća vrijednost AGC daje veći broj indentificiranih peptida, što je moguće objasniti kvalitetnijim spektrima, budući da se fragmentira veći broj peptidnih iona.

Temeljem dobivenih rezultata, odabrani su optimalni parametri metoda 3) koji će se koristiti u analizi DIA. Navedena metoda obuhvaća prozore od 25 Da, broj točaka kroz pik koji daje zadovoljavajuću kvantifikaciju u smislu točnosti i najveći broj indentificiranih proteina. Pripadajući kromatogram ukupne ionske struje prikazan je na Slici 8.



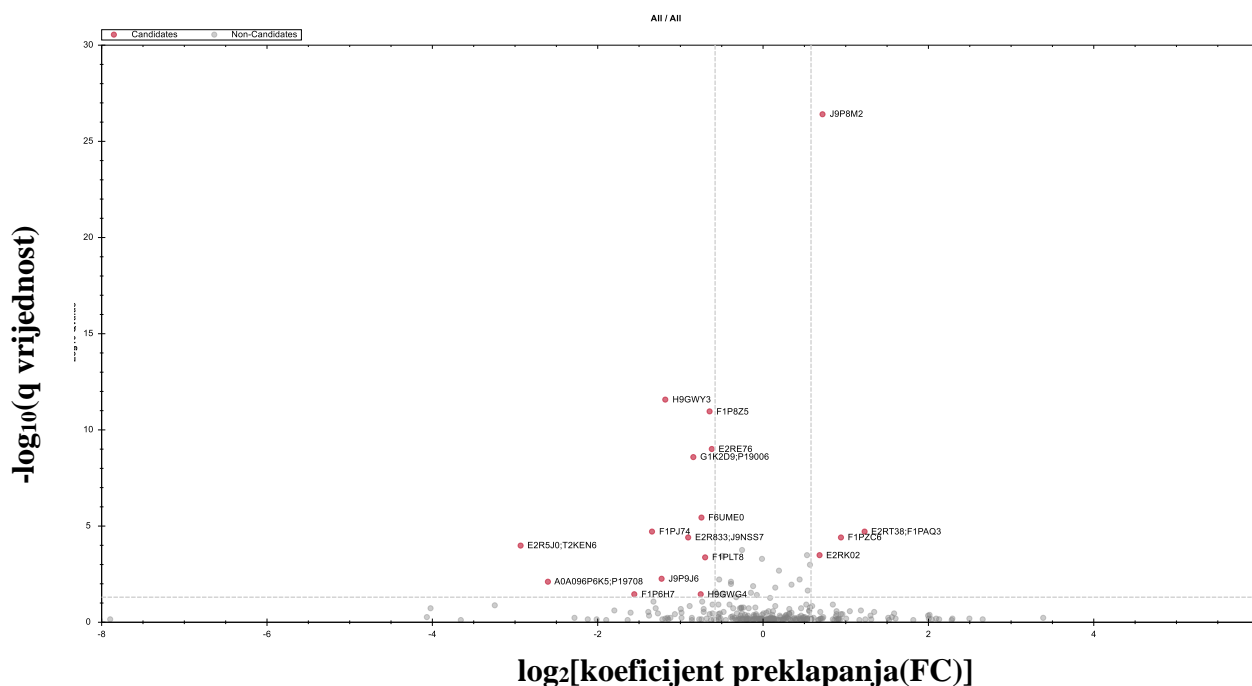


**Slika 8.** Tipičan kromatogram ukupne ionske struje dobiven analizom uzoraka seruma prisupom DIA prema opisanoj metodi

#### 4.4. Primjena metode DIA na kliničkim arhivskim uzorcima

##### 4.4.1. Analiza podataka primjenom programa Spectronaut

Deset uzoraka plazme pasa analizirano je DIA metodom 3 kao što je opisano u poglavlju 3.7. *AnalizaDIA* koristeći prozore od 25 Da. Za analizu podataka korištena je knjižnica koja ima najveći broj unosa (3223 peptida i 994 proteina) dobivena analizom DDA smjese svih uzoraka („pool“), DDA pool *Proteominer*/μSPE uzorka i svih pojedinačnih uzoraka seruma pasa. Tijekom obrade podataka u Spectronautu uzorci su grupirani u skupine; serološki pozitivni (pet uzoraka) ili serološki negativni (pet uzorka) serumi pasa. Zajedničkom analizom identificirano je 2327 peptida i 634 proteina (s nepotpunim profilom), odnosno 671 peptid i 204 proteina (s cjelokupnim profilom). Na temelju statističke analize kreiran je *Volcano* graf (rezultat  $q$  vrijednosti 0,05; FDR 5%; logaritam s bazom dva koeficijenta preklapanja mora biti veći od  $\pm 0,58$ , granični FC 1,5) prikazan na Slici 9.



**Slika 9.** *Volcano* graf s potencijalnim biomarkerima (označeni crvenim točkama)

Iz prikazanog *Volcano* grafa vidljivo je da koncentracija 16 proteina značajno promijenjena kod bolesnih u odnosu na zdrave pse te navedeni proteini predstavljaju potencijalne serumske biomarkere lišmanioze. Spomenuti proteini, navedeni u Tablici 10., su redom: serumski amiloid A protein, pentaksin, leucinom bogati alfa-2-glikoprotein 1, apolipoprotein A-IV, glikozilfosfatidilinozitol specifična fosfolipaza D1, maltaza-glukoamilaza, fibronektin, apolipoprotein B, apolipoprotein E, sulfhidril oksidaza, histidinom bogati glikoprotein, alfa-2-makroglobulin, haptoglobin, teški lanac 3 inter-alfa-tripsinskog inhibitora i član obitelji teškog lanca 4 inter-alfa-tripsinskog inhibitora, dok je jedan nekarakteriziran. Od navedenih proteina, sedam je viskozastupljeno (serumski amiloid A protein, pentaksin, apolipoprotein A-IV, fibronektin, apolipoprotein B, alfa-2-makroglobulin i haptoglobin).<sup>90</sup>

**Tablica 10.** Potencijalni serumski biomarkerilišmanioze dobiveni primjenom programa Spectronaut

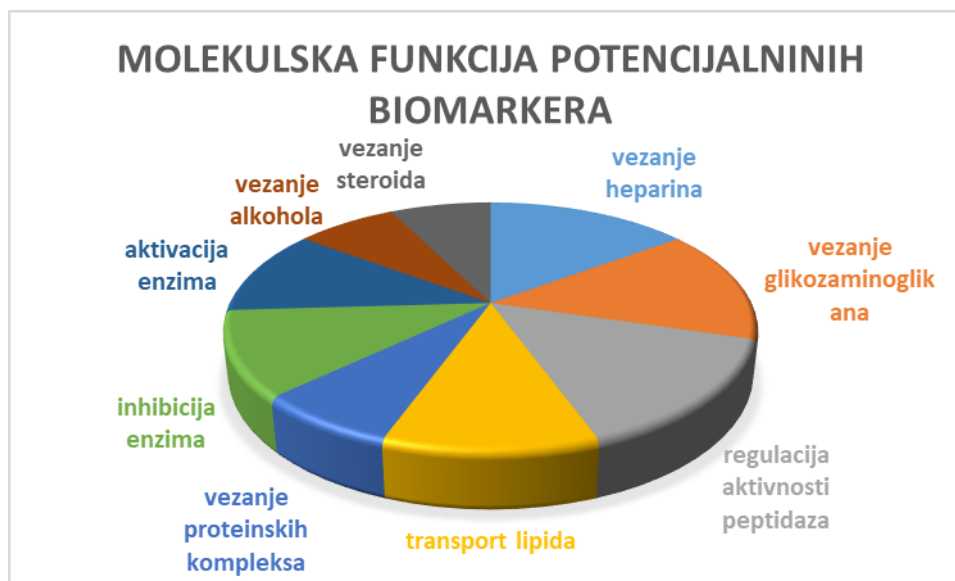
Opis proteina	q vrijednost	FC	Log <sub>2</sub> (FC)	Broj jedinstvenih peptida	Geni	Imena proteina
serumski amiloid A protein	$8,05 \cdot 10^{-3}$	0,165	-2,60	5	LOC476879; SAA1	A0A096P6K5_C ANLF; SAA_CANLF
pentaksin	$1,07 \cdot 10^{-4}$	0,131	-2,93	6	CRP	E2R5J0_CANLF; T2KEN6_CANL F
leucinom bogati alfa-2-glikoprotein 1	$4,06 \cdot 10^{-5}$	0,535	-0,901	8	LRG1	E2R833_CANLF ; J9NSS7_CANLF
apolipoprotein A-IV	$1,05 \cdot 10^{-9}$	0,652	-0,618	23	APOA4	APOA4_CANLF
glikozilfosfatidilinozitol specifična fosfolipaza D1	$3,52 \cdot 10^{-4}$	1,61	0,684	27	GPLD1	E2RK02_CANL F
maltaza-glukoamilaza	$2,05 \cdot 10^{-5}$	2,34	1,23	13	MGAM	E2RT38_CANLF ; F1PAQ3_CANL F
fibronektin	$3,73 \cdot 10^{-2}$	0,341	-1,55	11	FN1	F1P6H7_CANLF
apolipoprotein B	$1,19 \cdot 10^{-11}$	0,640	-0,644	147	APOB	F1P8Z5_CANLF
apolipoprotein E	$2,05 \cdot 10^{-5}$	0,396	-1,34	14	APOE	F1P1J74_CANLF
sulfohidril oksidaza	$4,41 \cdot 10^{-4}$	0,617	-0,696	13	QSOX1	F1PLT8_CANLF
histidinom bogati glikoprotein	$4,06 \cdot 10^{-5}$	1,93	0,945	8	HRG	F1PZC6_CANLF
alfa-2-makroglobulin	$3,80 \cdot 10^{-6}$	0,598	-0,742	51	A2M	F6UME0_CANL F
heptoglobulin	$2,65 \cdot 10^{-9}$	0,559	-0,840	23	LOC479668; HP	G1K2D9_CANL F; HPT_CANLF
teški lanac 3 inter-alfa-tripsinskog inhibitora	$3,80 \cdot 10^{-2}$	0,595	-0,750	12	ITIH3	H9GWW4_CANL LF
član obitelji teškog lanca 4 inter-alfa-tripsinskog inhibitora	$2,80 \cdot 10^{-12}$	0,443	-1,17	29	ITIH4	H9GWY3_CANL LF
Nekarakterizirani protein	$5,76 \cdot 10^{-3}$	0,429	-1,22	10	-	J9P9J6_CANLF

#### 4.4.2. Bioinformatička analiza podataka

Nad dobivenim potencijalnim biomarkerima izvršena je bioinformatička analiza alatom DAVID.<sup>74,91</sup> Pretraga je vršena prema identifikacijskim brojevima iz baze podataka UniProt (UniProtID), pri čemu je završeni protein pronađen pripadajući gen. Haptoglobin (P19006), teški lanac 3 inter-alfa-tripsinskog inhibitora (H9GWW4) i nekarakterizirani protein (J9P9J6) pronađeni su upotrebom alata AmiGO.<sup>92</sup> Koristeći alate za funkcionalnu anotaciju proteina

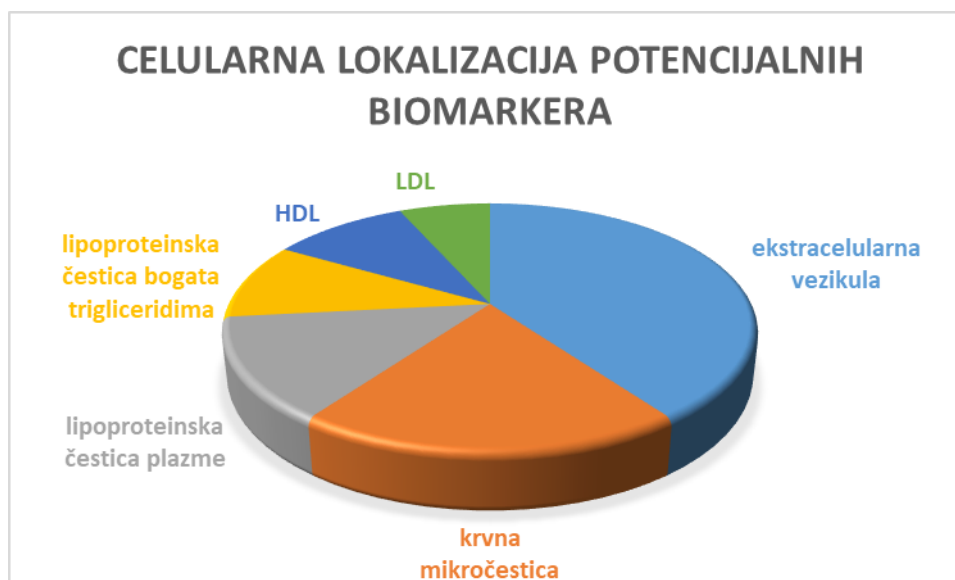
određena je genska ontologija (biološki proces, molekularna funkcija, stanična komponenta) za pojedini protein, a rezultati su prikazani na Slikama 10. i 11.<sup>93</sup>

Kao što je vidljivo na Slici 10., potencijalni biomarkeri imaju razne funkcije: vezanje heparina, vezanje glikozaminoglikana i regulacija aktivnosti peptidaza. Važno je spomenuti i transport lipida, aktivaciju enzima i inhibiciju enzima. Točan broj proteina u pojedinoj funkciji prikazan je u Tablici D10. u Dodatku.



**Slika 10.** Molekularna funkcija potencijalnih serumskih biomarkera lišmanioze dobivena bioinformatičkom analizom primjenom DAVID-a

Celularna lokalizacija potencijalnih biomarkera (Slika 11., Tablica D11. iz Dodatka) ukazuje da je najviše potencijalnih biomarkera lokalizirano u ekstracelularnim vezikulama (12), a zatim u krvnim mikročesticama (6), što je očekivano jer su navedeni proteini uključeni u obrambene procese, apoptozu, autofagiju i fagocitozu. Ti se proteini nalaze u krvi i u njoj imaju još neke funkcije.



**Slika 11.** Celularna lokalizacija potencijalnih serumskih biomarkera lišmanioze dobivena bioinformatičkom analizom primjenom DAVID-a

Ostatak proteina vezan je u lipoproteinske čestice i prienos kolesterola (HDL i LDL), što odgovara funkciji određenih potencijalnih biomarkera.

#### 4.5. Uloga potencijalnih biomarkera lišmanioze u pasa

Uloge proteina koje se smatraju značajnima za biomarkere lišmanioze preuzete su iz baza podataka sadržanih u DAVID-u.<sup>91</sup>

Leucinom bogati alfa-2-glikoprotein 1 (LRG1) ima ulogu u diferencijaciji smeđih masnih stanica, pozitivnoj regulaciji angiogeneze (stvaranja krvnih žila) i pozitivnoj regulaciji transforamacije beta receptora faktora rasta u signalnim putevima. Također je prisutan kod odgovora na bakterijsku infekciju.<sup>91</sup> Može poslužiti kao biomarker sekundarne infekcije, u kombinaciji s biomarkerom lišmanioze.

Pentaksin ili C-reaktivni protein (CRP) ima ulogu ko-faktora, koji veže dva kalcijeva iona po podjedinici. Kod bioloških procesa, između ostalog, negativni je regulator diferencijacije pjenastih stanica dobivenih iz makrofaga, pozitivni regulator nastajanja superoksidnog aniona te regulira izlučivanje interleukina-8.<sup>91</sup>

Serumski amiloid A protein (SAA1) je protein akutne faze i apolipoprotein HDL kompleksa te ima kemoatraktivnu aktivnost.<sup>91</sup>

Sulfohidril oksidaza (QSOX1) ima flavinom usmjerenu oksidativnu aktivnost i negativno regulira makroautofagiju.<sup>91</sup>

Fibronektin 1 (FN1) je dio grupe fibronektina, proteina koje se vežu na površinu stanice i druge spojeve kao što su kolagen, fibrin, heparin, DNA te aktin. Uključen je u adheziju stanice, mobilnost stanice, zacjeljivanje rana i održavanje oblika stanice. Uz mnoge funkcije, fibronektin je uključen u odgovor akutne faze i interakciju sa simbiotima.<sup>91</sup>

Maltaza-glukoamilaza (MGAM) je membranski protein uključen u metaboličke procese ugljikohidrata. Ima hidrolaznu aktivnost koja se sastoji u hidrolizi O-gliko spojeva.<sup>91</sup>

Apolipoprotein E (APOE) ima mnoge funkcije, od kojih pojedine uključuju vezanje beta-amiloida, antioksidativnu aktivnost i prijenos kolesterola. Također negativno regulira odgovor na upalu, prenosi signal preko dušikova oksida, pozitivno regulira endocitozu i sintezu dušičnog (II) oksida te je uključen u odgovor na oksidativni stres.<sup>91</sup>

Glikozilfosfatidilinozitol specifična fosfolipaza D1 (GPLD1) je, uz svoju enzimsku aktivnost, pozitivni regulator apoptoze i citolize.<sup>91</sup>

Član obitelji teškog lanca 4 inter-alfa-tripsinskog inhibitora (ITIH4) je endopeptidazni inhibitor serinskog tipa. Uključen je u odgovor akutne faze, hijaluronski metabolični proces (tzv. „*heat shock*” proteini) i odgovor na citokine.<sup>91</sup>

Apolipoprotein A4 (APOA4) je važan sastojak HDL-a. Uz ostale uključen je u ove procese: neposredan imunološki odgovor u sluzi, leukocitna stanica-stanica adhezija, uklanjanje superoksidnih radikala i metabolizam i transport retinoida.<sup>91</sup>

Alfa-2-makroglobulin (LOC47699) veže interleukin-1 i interleukin-8 proteaznim vezanjem ovisnim o kalciju.<sup>91</sup>

Haptoglobulin (LOC479668) u plazmi veže i kombinira slobodni hemoglobin, što omogućuje „recikliranje” željeza i sprječava oštećenje bubrega. On je antioksidans, ima antibakterijsku aktivnost te važnu ulogu u usklađivanju odgovora akutne faze.<sup>91</sup>

Histidinom bogati glikoprotein (HRG) je inhibitor aktivnosti endopeptidaze cisteinskog tipa. Sudjeluje u vezanju hema, cinka i imunoglobulina. Uključen je u antimikrobni imunski odgovor posredovan antimikrobnim peptidima. Također sudjeluje u citolizi u drugim organizmima. Negativan je aktivator fibrinolize i skupljanja lamelipodija (stanice na barijeri krvi-limfa), a pozitivan procesa programirane stanične smrti.<sup>91</sup>

Apolipoprotein B-100 (APOB) je protein uključen u prijenos kolesterola. Između ostalog uključen je u spermatogenezu, razvoj embrija, oplodnju, mobilnost repa spermija, prijenose,

biosintezu i kataboličke procese lipoproteina, kao i odgovor na viruse i pozitivnu regulaciju diferencijacije pjenastih stanica dobivenih od makrofaga.<sup>91</sup>

Teški lanac 3 inter-alfa-tripsinskog inhibitora (ITIH3) je serinska endopeptidaza koja inhibira hijaluronski metabolički proces.<sup>92</sup>

Nekarakterizirani protein (J9P9J6) je dio IgA C regije IgA teškog lanca. Radi se ili o proteinu IGHA1 ili IGHA2 koji zajedno grade IgA C regiju. Radi se o vrsti imunoglobulina čija je funkcija vezanje antigena. On također sudjeluje u signalnim putevima receptora B stanica, obrani od bakterija, imunološkom odgovoru i fagocitozi.

#### 4.6. Rasprava o potencijalnim biomarkerima lišmanioze

Biomarkere općenito, kao i biomarkere lišmanioze možemo podijeliti na direktne i indirektne markere.<sup>94</sup> Kod direktnih markera, detekcija parazita provodi se identifikacijom određenih dijelova DNA i RNA parazita ili detekcijom antigena.<sup>94,95</sup> Indirektni biomarkeri dijele se na markere povezane sa makrofagima, citokine, molekule na površini stanice i receptore koji cirkuliraju, zatim proteine akutne faze, protutijela i ostale biomarkere.<sup>94</sup>

Kada uzročnik lišmanioze dospije u organizam, na mjesto invazije masovno dolaze fagociti. Fagociti imaju dva načina djelovanja. Jedan je fagocitoza, a drugi je formiranje neutrofilnih ekstracelularnih zamki (NET) i ispuštanje različitih mikrobioloških agensa kojim hvataju i zaustavljaju širenje parazita. NET-ovi djeluju samo na pojedine uzročnike lišmanioze.<sup>96</sup> Kako bi se uzročnici lišmanioze razmnožavali trebaju prvo ući u makrofag gdje moraju biti stvoreni određeni uvjeti, kao što su: smanjenje pH u fagolizosomima, povećana izloženost kisiku i reaktivnim molekulama dušika, intenzivna proteolitička ekstracelularna aktivnost i gladovanje.<sup>97</sup>

Kada promastigoti uđu u makrofag, najprije se diferenciraju u amastigote, jer taj oblik inhibira vezanje fagosoma s lizosomima makrofaga čime nastaju fagolizosomi. Na taj način paraziti izbjegavaju prvi imunološki odgovor. Do pucanja makrofaga dolazi zbog fagocitoze. NADPH oksidaza prenosi proton na molekulu kisika čime nastaje nakoliko visoko reaktivnih molekula kao što su superoksidi, vodikovi peroksidi i hidroksil radikali.<sup>97</sup>

No makrofag ima još jedan obrambeni mehanizam koji se naziva vezikularno zakiseljavanje zbog djelovanja protonske ATP-aze. Zakiseljavanje uzrokuje denaturaciju proteina, što čini parazite podložnima kiseloj hidrolizi. Još jedan obrambeni mehanizam je

korištenje inducibilne sintaze dušikova oksida (iNOS). Ova vrsta dušikove sintaze je zastupljena u makrofazima i uzrokuje oksidaciju L-arginina u citrulin i NO. NO je visoko reaktivna mikrobicidna molekula.<sup>98</sup>

No paraziti su i za to pronašli rješenje. Kako bi se zaštitili od lize stanice oni na površini promastigota posjeduju lipofosfoglikane, a još su i naučili kontrolirati proizvodnju NO tako što kontroliraju omjer Th1 i Th2 citokina imunskog odgovora, ekspimiraju arginazu (koja se natječe sa argininom) i nalaze se u stanju gladovanja.<sup>98</sup>

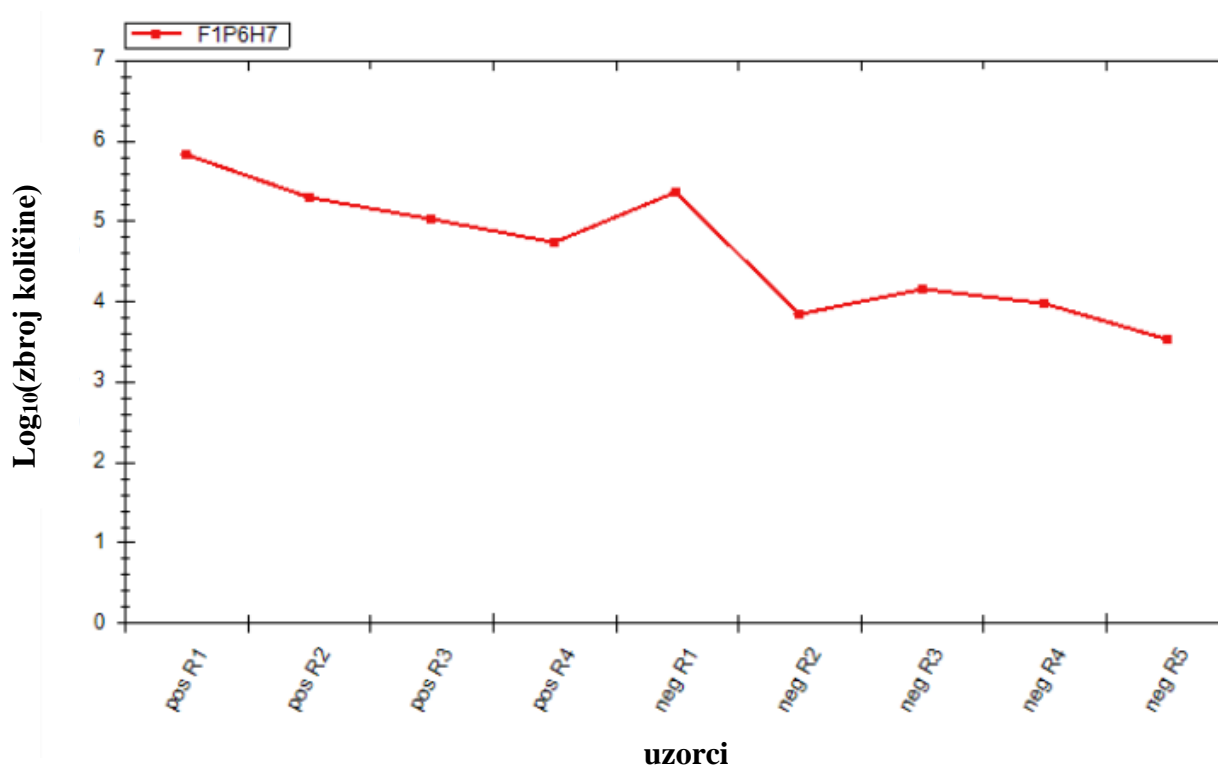
Gore opisani mehanizmi olakšavaju grupiranje i objašnjavaju funkciju potencijalnih biomarkera za lišmaniozu, kao što povezuju ulogu NO i apolipoprotein E. Nadalje u hijaluronskom metaboličkom procesu sudjeluju član obitelji teškog lanca 4 inter-alfa-tripsinskog inhibitora (ITIH4) i teški lanac 3 inter-alfa-tripsinskog inhibitora (ITIH3). Nastajanje iona superoksida reguliraju pentaksin i apolipoprotein A4. U citokinezi sudjeluju pentaksin, član obitelji teškog lanca 4 inter-alfa-tripsinskog inhibitora (ITIH4) i alfa-2-makroglobulin. U odgovoru akutne faze i odgovoru na infekciju sudjeluju: leucinom bogati alfa-2-glikoprotein 1, član obitelji teškog lanca 4 inter-alfa-tripsinskog inhibitora, fibronektin, serumski amiloid A protein, apolipoprotein A4, haptoglobin, histidinom bogati glikoprotein, apolipoprotein B-100 i IGHA1 ili IGHA2 nekarakterizirani protein. Interakciju s hemom/hemoglobiom imaju histidinom bogati glikoprotein i heptoglobin (anemija je simptom lišmanioze). U procese fagocitoze, endocitoze, apoptoze i slične procese uključeni su: fibronektin, pentaksin, sulfhidril oksidaza, apolipoprotein E, glikozilfosfatidilinozitol specifična fosfolipaza D1, histidinom bogati glikoprotein, apolipoprotein B100 i IGHA1 ili IGHA2 nekarakterizirani protein. U metabolizam kolesterola su uključeni: serumski amiloid A protein i apolipoproteini (E, A4 i B-100). Od svih navedenih potencijalnih biomarkera se ističe maltoza-glukoamilaza koja je metabolički membranski protein i na prvi pogled nema veze s lišmaniozom.

U proteomskim istraživanjima kao potencijalni biomarkeri lišmanioze istraživani su: apolipoproteini (APO E, APO A-4, APO C-1 i APO C-2), a pri čemu je najznačajniji APO A1,<sup>99</sup> proteini imunskog odgovora i regulatori inducibilne sintaze dušikova oksida (Th1 i Th2), aktivnost arginaze, sintaze dušikova oksida, proteina akutne faze između ostaloga pentaksina i fibronektina, razne molekule na staničnoj površini i receptori, makrofagni markeri i citokini.<sup>94</sup>



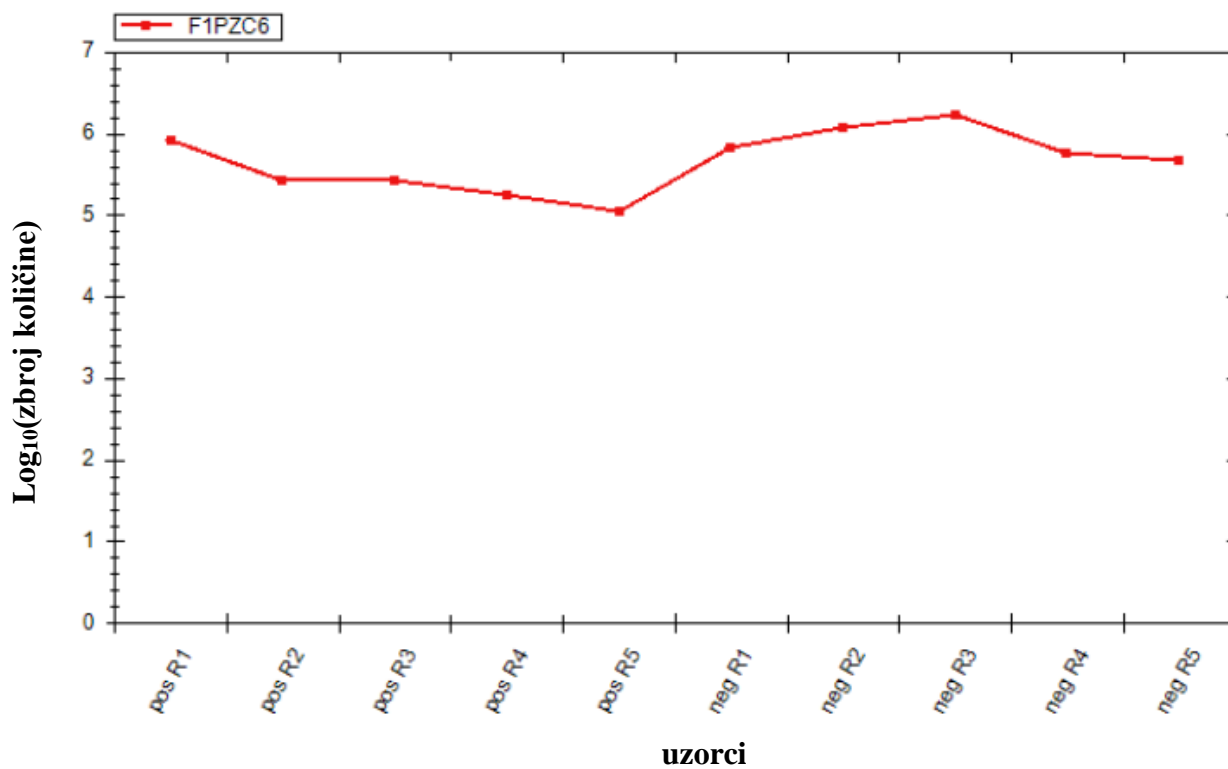
U studiji, djelomično provedenoj u istom laboratoriju kao i ovaj rad, u kojoj se pratio proteom seruma pasa oboljelih od lišmanioze, prije i mjesec dana nakon tretiranja meglumin antimonatom i alopurinolom, TMT-om obilježeni proteini kvantificirani su korištenjem podatkovno ovisne akvizicije. Kvantificirano je ukupno 90 proteina od kojih je 23 bilo statistički značajno deregulirani i razmotreni kao potencijalni biomarkeri praćenja uspješnosti terapije. Od spomenutih 23 proteina, s rezultatima u ovom radu poklapaju se četiri potencijalna biomarkera: IgA C regije IgA teškog lanca, alfa-2-makroglobulin, član obitelji teškog lanca 4 inter-alfa-tripsinskog inhibitora i fibronektin,<sup>100</sup> što je vrlo zanimljivo jer se koncentracije navedenih proteina mijenjaju tijekom invazije parazitom i progresije bolesti, ali i kasnije u procesu liječenja same bolesti.

Od svih potencijalnih biomarkera izdvajaju se dva potencijalna biomarkera: fibronektin i histidnom bogati glikoprotein. Fibronektin je veliki protein izvanstanične matrice. Uključen je u proces endocitoze kod različitih fagocita. Smatra se da je ljuštenje fibronektina dio fiziološkog mehanizma kojim paraziti uzrokuju unutarstaničnu destrukciju stanica nositelja. Kod ljudi s visceralnom lišmaniozom zabilježeno je smanjenje koncentracije fibronektina, koja se povećava nakon liječenja u trajanju od 14 dana.<sup>100</sup> Naši podaci dobiveni relativnom kvantifikacijom spektromerijom masa bez prethodnog kemijskog obilježavanja peptida ukazuju da koncentracija fibronektina u serumima pasa s lišmaniozom raste tijekom bolesti u odnosu na zdrave pse (Slika 12).



**Slika 12.** Prikaz relativne koncentracije fibronektina kroz 10 analiziranih uzoraka dobiven koristeći Spectronaut

Histidinom bogati glikoprotein je visoko zastupljen i dobro karakteriziran protein. Sadrži više domena, što mu omogućuje dobru interakciju s različitim spojevima i molekulama. On je negativan protein akutne faze, a cirkulirajuće razine su mu značajno smanjene tijekom akutne upale, dok mu se koncentracija značajno poveća nakon uspješnog tretmana. Ovo odgovara prikazu na Slici 13.



**Slika 13.** Prikaz relativne koncentracije histidinom bogata glikoproteina kroz 10 analiziranih uzorakadobiven koristeći Spectronaut

## § 5. ZAKLJUČAK

Razvijena je metoda spektrometrije masa temeljena na podatkovno neovisnoj akviziciji za identifikaciju potencijalnih serumskih biomarkera lišmanioze u pasa. Tom metodom je analizirano deset uzoraka seruma pasa (od toga pet serološki pozitivnih, tj. bolesnih pasa i pet serološki negativnih, tj. zdravih pasa), pri čemu je korištena spektralna knjižnica, koja je sadržavala 3223 peptida i 994 proteina, stvorena isključivo za ovu metodu. Nakon relativne kvantifikacije, uz pomoć iRT peptida i analizom uz pomoć programa Spectronaut dobiveno je 16 potencijalnih biomarkera. Podatkovno neovisna akvizicija pokazuje bolja svojstva za otkrivanje biomarkera, posebno onih čija se biološka djelatnost ogleda u smanjenju koncentracije, jer se pri ovoj vrsti akvizicije analiziraju svi peptidi koji se nađu u zadanom rasponu masa. Prednost podatkovno neovisne akvizicije je identifikacija i kvantifikacija nisko zastupljenih proteina bez prethodnog uklanjanja visoko zastupljenih proteina, odnosno kompleksne pripreme uzorka.

Kod podatkovno ovisne akvizicije analiziraju se samo oni peptidi koji u spektru MS1 imaju najjači intenzitet. Podatkovno neovisna akvizicija je reproducibilnija od podatkovno ovisne akvizicije, a njezina najslabija točka su spektralne knjižnice koje se kreiraju od podataka dobivenih podatkovno ovisnom analizom. Također valja napomenuti da postoje i metode podatkovno neovisne akvizicije koje ne koriste spektralne knjižnice, već uključuju primjenu specijaliziranih računalnih programa, čiji je glavni nedostatak relativno visoka cijena.

Nadalje ako se peptid/protein ne nalazi u spektralnoj knjižnici, taj peptid neće biti detektiran. Kako se spektralne knjižnice stvaraju iz podataka prikupljenih podatkovno ovisnom akvizicijom, iz bioloških uzoraka kao što je plazma, potrebno je ukloniti visoko zastupljene proteine, jer će spektri podatkovno ovisne akvizicije sadržavati samo informacije o njima. Kako bi se izbjeglo navedeno i dobilo više spektara nisko zastupljenih proteina, uzorak dobiven miješanjem svih seruma pasa obrađen je setom ProteoMiner, nakon čega su provedene uzastopne mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (C18 i SCX), čime se broj peptida i proteina u spektralnoj knjižnici značajno povećao. Slijedom toga, broj proteina u spektralnoj knjižnici omogućava identifikaciju većeg broja proteina podatkovno neovisnom akvizicijom.

Optimalan raspon masa (od 450  $m/z$ -1100  $m/z$ ) za razvijenu metodu utvrđen je na temelju broja podudaranja peptidnih spektara (PSM) iz podatkovno ovisne analize. Određena je širina prozora od 25 Da kako bi se sačuvao dovoljan broj točaka koje određuju pik (osam) za uspješnu kvantifikaciju.

Nakon razvoja metode podatkovno neovisne akvizicije, provedena je relativna kvantifikacija proteoma seruma deset pasa koristeći program Spectronaut. Statističkom analizom utvrđeno je 16 proteinskih kandidata biomarkera lišmanioze u pasa s  $q$  vrijednosti manjom od 0,05, pri čemu je, između ostalih, tijekom bolesti povećana koncentracija fibronektina, a smanjena koncentracija histidinom bogatog glikoproteina.

Genska ontologija značajno dereguliranih proteina je pokazala da obzirom na njihove funkcije gotovo svi (njih 15) dolaze u obzir kao potencijalni biomarkeri lišmanioze u pasa. Neki od potencijalnih biomarkera sudjeluju u citokinezi, odgovoru akutne faze i odgovoru na infekcije, zatim endocitozi, fagocitozi i apoptozi. Apolipoproteini i proteini akutne faze (od kojih su neki utvrđeni u ovom istraživanju) su u ranijim istraživanjima proučavani kao kandidati za biomarkere lišmanioze.

Od 16 potencijalnih biomarkera, prema literaturnim podacima te u ovom radu utvrđenoj razlici u ekspresiji proteina u serumima serološki pozitivnih i negativnih pasa, najizgledniji kandidati za biomarkere su fibronektin i histidinom bogati glikoprotein. Dobiveni podaci zahtijevaju daljnja istraživanja i validaciju na većem broju uzoraka.

Iz svega navedenog može se zaključiti da je podatkovno neovisna akvizicija pogodna metoda za identifikaciju potencijalnih biomarkera iz seruma pasa.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AGC - automatsko preuzimanje kontrole (engl. *automatic gain control*)

AIF - fragmentacija svih iona (engl. *all-ion fragmentation*)

Ambic - amonijev hidrogen-karbonat

AUC - područje ispod krivulje (engl. *area under the curve*)

BCA - bicinehonska kiselina

BSA – albumin iz goveđeg seruma

CAD, CID - kolizijom aktivirana disocijacija (engl. *Collision Activated Dissociation*)

CL – pseća lišmanioza (engl. *Canine leishmaniosi*)

DC – istosmjerna struja

DDA - podatkovno ovisna akvizicija (engl. *Data Dependent Acquisition*)

DDT – 1,1,1-trikloro-2,2-di-(4klorofenil)etan

DIA - podatkovno neovisna akvizicija (engl. *Data Independent Acquisition*)

DTT - ditiotritol

ECD - disocijacija hvatanjem elektrona(engl. *Electron Capture Dissociation*) i

ELISA - enzimaska imunoanaliza (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*)

ESI – ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*)

ETD - disocijacija prijenosom elektrona ( engl. *Electron Transfer Dissociation*)

FC – promjena preklapanja (engl. *Fold change*)

FDR - frekvencija krivih pogodaka (engl. *false discovery rate*,)

FT–Fourierova transformacija (engl. *Fourier transform*)

GO – genska ontologija (engl. *Gene Ontology*)

HCD – visokoenergetski CID (engl. *Higher-energy Collision Dissociation*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

HR/AM – uređaji koji mogu snimati na visokoj rezoluciji točne masa (engl. *High-resolution accurate-mass*)

HRM – hiper praćenje reakcija (fragmentiranja) (engl. *hyper reaction monitoring*)

IAA - jodoacetoamid

ICR – ionsko ciklotronska rezonancija (engl. *Ion Cyclotron Resonance*)

ICAT - izotopom kodirani afinitetni privjesak (engl. *isotope-coded affinity tag*)  
IFAT – imunoflourescentni test protutijelima (engl. *Immunoflourescence antibody test*)  
iRT – indeksirano vrijeme zadržavanja  
ISD - fragmentacija u izvoru (engl. *In-source decay*)  
IT – ionska stupica  
iTRAQ - izobarni privjesci za apsolutnu i relativnu kvantifikaciju (engl. *Isobaric tags for relative and absolute quantification*)  
LC – tekućinska kromatorgrafija  
LID - Laserski inducirana disocijacija, (engl. *Laser-induced dissociation*)  
LIT – linearna ionska stupica  
 $m/z$  – omjer mase i naboja  
MALDI - matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*)  
MRM – praćenje višestrukih reakcija (fragmentiranja) (engl. *Multiple reaction monitoring*)  
MS – spektrometrija masa  
MS/MS – tandemna spektrometrija masa  
MSX – multipleksiranje (DIA)  
MudPit - multidimenzijsku tehnologiju identifikacije proteina (engl. *Multidimensional protein identification technology*).  
PAI - Indeks zastupljenosti proteina (engl. *protein abundance index*)  
PAcIFIC - akvizicija prekursora neovisna o broju iona (engl. *Precursor acquisition independent from ion count*)  
PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*)  
PMF - metoda otiska prsta (engl. *peptide mass fingerprinting*).  
PRM - paralelno praćenje reakcija (fragmetiranja) (engl. *Parallel reaction monitoring*)  
PSD - fragmentacija nakon izlaska iz izvora (engl. *Post-source decay*)  
PSM - podudaranje peptidnih spektra (engl. *peptide spectrum match*)  
Q - kvadrupol  
QQQ – trostruki kvadrupol  
RIA- radioimunoanaliza (engl. *Radio immunological assey*)  
RT – vrijeme zadržavanja  
SCX – izmjena na jakim kationima

SDS – natrijev dodicilsulfat

SILAC - izotopno obilježavanje amino kiselinama u kulturi stanica (engl. *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*)

SILAM - izotopno obilježavanje aminokiselinama kod sisavaca (engl. *stable isotope labeling of amino acids in mammals*)

SPE – Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid phase extraction*)

SRM - Praćenje odabranih reakcija (fragmentiranja) (engl. *Selected reaction monitoring*).

SWATH-MS– sekvencionalna prozorska akvizicija cijelog teoretskog masenog spektra), (engl. *Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical Mass Spectra*)

TMT - tandemni maseni privjesak (engl. *Tandem mass tag*)

TOF – analizator vremena leta

uDIA – neusmjerena podatkovno neovisna akvizicija (engl. *untargeted DIA*)

UPLC - tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

UHPLC - tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

VL – visceralna lišmanioza

XCorr – korelacijski rezultat križanja (engl. *cross correlation score*)

XDIA – proširena DIA (engl. *extended DIA*)

XIC - ekstrahirani ionski kromatogram (engl. *extracted ion chromatogram*)



## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. G. Agnetti, M. J. Dunn, u G. Agnetti, M. L. Lindsey, D. B. Foster (ur.), *Manual of Cardiovascular Proteomics*, Springer International Publishing Switzerland, Basel, 2016 str. 1-14.
2. D. Rotillio, A. Della Corte, M. D'Imperio, W. Coletta, S. Marcone, C. Silvestri, L. Giordano, M. Di Michele, M. B. Donati, *Thromb. Res.* **129** (2012) 257-262.
3. L. Hu, M. Ye, X. Jing, S. Feng, H. Zou, *Anal. Chim. Acta* **598** (2007) 193-204.
4. S. M. Gonzalez Fernandez-Nino, A. M. Smith-Moritz, L. J. G. Chan, P. D. Adams, J. L. Heazelwood, C. J. Petzold, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3** (2015) 1-7.
5. I. Eidhammer, K. Flikka, L. Martens, S.-O. Mikalsen, *Computational Methods for Mass Spectrometry Proteomics*, John Wiley & Sons, Chichester, 2007, str 1-265.
6. W. Zhang, *Chin. J. Anal. Chem.*, **42** (2014) 1859-1868.
7. M. Sundberg, J. Bergquist, M. Ramström, *Biochem. Biophys. Rep.*, **3** (2015) 68-75.
8. M. Kuljanin, D. Z. Dieters-Castor, D.A. Hess, L.-M. Postovit, G. A. Lajoie, *Proteomics*, **17** (2017) 1600337 (1-9).
9. J. D. Venable, M.-Q. Dong, J. Wohlschlegel, A. Dillin, J. R. Yates, *Nat. Methods* **1** (2004) 1-7.
10. T. Sajic, Y. Liu, R. Aebersold, *Proteomics Clin. Appl.* **9** (2015) 307-321.
11. R. R. Ribeiro, M. S. Marques Michalick, M. E. da Silva, C. C. P. dos Santos, F. J. G. Frezard, S. M. da Silva, *BioMed Res. Int.* **1** (2018), 3296893 (1-12)
12. T. Živičnjak, *Lišmanioza ljudi i pasa u Hrvatskoj - da li je vrijeme za paniku ?*, Veterinarski dani 2017., Opatija, 2017. <http://veterina.com.hr/?p=68172> (datum pristupa 25.srpnja.2018.).
13. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999, str. 621-717.
14. Y.-Y Zhao, R.-C. Lin, *Chem. Biol. Interact.* **215** (2014) 7-16.
15. M. W. Dong, K. Zhang, *Trends Anal. Chem.* **63** (2014), 21-30.
16. Y.-Y. Zhao, S.-P. Wu., S. Liu, Y. Zhang, R.-C. Lin, *Chem. Biol. Interact.* **220** (2014) 181-192.
17. M.E. Swartz, *Sep. Sci. Redefined* **5** (2005) 8-14.
18. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, *Medicina*, **45** (2009) 218-232.

19. J. S. Kang, u J. Prasain (ur.) *Tandem Mass Spectrometry-Application and Principles*, InTech, Shanghai, 2012, 441-493.
20. R. Aebersold, M. Mann, *Nature*, **422** (2003) 198-207.
21. J. Cosme, I. Tchernyshyov, A. Gramolini, u G. Agnetti, M. L. Lindsey, D. B. Foster (ur.), *Manual of Cardiovascular Proteomics*, Springer International Publishing, Švicarska, Basel, 2016 str. 15-32.
22. A. M. Hawkrige, u C. Eyers, S. J. Gaskell (ur.), *Quantitative Proteomics*, New Developments in Mass Spectrometry No. 1, The Royal Society of Chemistry, London, 2014, str. 3-25.
23. N. Galić, M. Cindrić, *Kem. Ind.* **57** (2008) 231-243.
24. X. Han, A. Aslanian, J. R. Yates, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12** (2008) 483-490.
25. J. R. Yates, C. I. Ruse, A. Nakorchevsky, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **11** (2009) 49-79.
26. Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. G. Cooks, *J. Mass Spectrom.* **40** (2005) 430-443.
27. P.J. Amorim Medeira, P. A. Alves, C. M. Borges u S. Salih (ur.), *Fourier Transform – Materials Analysis*, InTech, Shanghai, 2012, str. 25-44.
28. A. Michalski, E. Damoc, J.-P. Hauschild, O. Langer, A. Wieghaus, A. Makarov, N. Nagaraj, J. Cox, M. Mann, S. Horning, *Mol. Cell. Proteomics*, **10** (2011) 1-11.
29. R. A. Scheltema, J.-P. Hauschild, O. Lange, D. Hornburg, E. Denisov, E. Damoc, A. Kuehn, A. Makarov, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics*, **13** (2014) 3698-3708.
30. A. Cristobal, F. Marino, H. Post, H. W. P. van der Toorn, S. Mohammed, A. J. R. Heck, *Anal. Chem.* **89** (2017) 3318-3325.
31. A. Moradian, A. Kalli, M. J. Sweredoski, S. Hess, *Proteomics* **14** (2014) 489-497.
32. C. Wu, J. C. Tran, L. Zamdborg, K. R. Durbin, M. Li, D. R. Ahlf, B. P. Early, P.M. Thomas, J. V. Sweedler, N. L. Kelleher, *Nat Methods.* **9** (2013) 822-824.
33. V. Vidova, Z. Spacil, *Anal. Chim. Acta*, **964** (2017) 7-23.
34. T. Kockmann, C. Trachsel, C. Panse, A. Wahlander, N. Selevsek, J. Grossmann, W. E. Wolski, R. Schlapbach, *Proteomics* **16** (2016) 2183-2192.
35. A. Hu, W. S. Noble, A. Wolf-Yadlin, *F1000Research* **5** (2016):419 (1-12).
36. J. G. Mayer, B. Schilling, *Expert Rev. Proteomics* **14** (2017) 419-429.
37. S. I. Anjo, C. Santa, B. Manadas, *Proteomics* **17** (2017) 1600278 (1-23).

38. Y. Zhang, B. R. Fonslow, B. Shan, M.-C. Baek, J. R. Yates, *Chem. Rev.* **113** (2013) 2343-2394.
39. O. Rinner, *Chimia* **70** (2016) 860-863.
40. T. Shi, E. Song, S. Nie, K. D. Rodland, T. Liu, W.-J Qian, R. D. Smith, *Proteomics* **16** (2016) 2160-2182.
41. R.L. Gundry, M. J. White, C. I. Murray, L. A. Kane, Q. Fu, B. A. Stanly, J. E. Van Eyk, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **90** (2010) 10.25.1-10.25.23.
42. N. Jehmlich, C. Golatowski, A. Murr, G. Salazar, V. M. Dhople, E. Hammer, U. Völker, *Clin. Chim. Acta* **434** (2014) 16-20.
43. *Agilent Bound Elut Omix Pipette Tips for Micro Extraction*, 2011, Agilent Technologies, <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5990-9049EN-Omix-Sept11-lo.pdf> , (datum pristupa 25.srpnja.2018.)
44. *User Guide For Reversed-Phase ZipTip® Pipette Tips for Sample Preparation*, 2005, Millipore Corporation, <http://personal.rhul.ac.uk/upba/211/Zip-tip.pdf> (datum pristupa 25.srpnja.2018.)
45. J. Rappsilber, M. Mann, Y. Ishihama, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 1896-1906.
46. Y. S. Choi, *Arch. Pharm. Res.* **35** (2012) 1861-1870.
47. L.Li u A. Posch (ur.), *Proteomic Profiling: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Vol. 1295, Springer Science + Business Media, New York, 2015, str 99-107.
48. Y. Perez-Riverol, R. Wang, H. Hermjakob, M. Müller, V. Vesada, J. A. Vizcaíno, *Biochim. Biophys. Acta*, **1844** (2014) 63-76.
49. B. R. Fonslow, P. C. Carvalho, K. Academia, S. Freeby, T. Xu, A. Nakorchevsky, A. Paulus, J. R. Yates, *J. Proteome Res.*, **10** (2011) 3690-3700.
50. A. I. Nesvizhskii, u R. Matthisen (ur.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 367, Humana Press Inc. Totowa, 2005 str. 87-119.
51. J. S. Cottrell, *J. Proteomics* **74** (2011) 1842-1851.
52. D. Martins-de Souza, V. M. Faca, F. C. Gozzo, *Proteomics*, **17** (2017) 1700017 (1-2).
53. J. D. Chapamn, D. R. Goodlett, C. D. Masselon, *Mass Spectrom. Rev.* **33** (2014) 452-470.
54. K. P. Law, Y. P. Lim, *Expert Rev. Proteomics* **10** (2013) 551-566.

55. A. Panchaud, A. Scherl, S. A. Schaffer, P. D. Von Haller, H. D. Kulasekara, S. I. Miler, D. R. Goodlett, *Anal. Chem.*, **81** (2009) 6481-6488.
56. A. Panchaud, S. Jung, S. A. Schaffer, J. D. Aitchison, D. R. Goodlett, *Anal. Chem.* **83** (2012) 2250-2257.
57. T. Geiger, J. Cox, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics*, **9** (2010) 2252-2261.
58. L.C. Gillet, P. Navarro, S. Tate, H. Rost, N. Selevsek, L. Reiter, R. Bonner, R. Aebersold, *Mol. Cell. Proteomics*, **11** (2012) 10,174/mcp.O111.016717 (1-17).
59. J. Muntel, Y. Xuan, S. T. Berger, L. Reiter, R. Bachur. A. Kenrsis, H. Steen, *J. Proteome Res.* **14** (2015) 4752-4762.
60. E. N. Nigjeg, R. Chen, R. E. Brand, G. M. Peterson, S. T. Chari, P. D. Von Haller, J. K. Eng, Z. Feng, Q. Yan, T. A. Brentnall, S. Pen, *J. Proteome Res.* **16** (2017) 665-676.
61. G. Chen, G. S. Teo, G. C. Teo, H. Choi, u S. Datta, B. J. A. Mertens (ur.), *Statistical Analysis of Proteomics, Metabolomics and Lipidomics Data Using Mass Spectrometry*, Frontiers in Propability and Statistical Sciences, Springer Internacional Publishing Switzerland, Basel, 2017 str 125-140.
62. O. T. Scubert, L. C. Gilet, B. C. Collins, P. Navarro, G. Rosenberger, W. E. Wolski, H. Lam, D. Amodei, P. Mallick, B. MacLean, R. Aebersold, *Nat. Protoc.* **10** (2015) 426-441.
63. T. Nishimura, H. Tojo, u G. Marko-Varga (ur.), *Gemonics and Proteomics for Cilnical Discovery and Development*, Translational Bioinformatic 6, Springer Science+Business Media , Dordrecht, 2014, str. 69-99.
64. S. J. Parker, V. Venkankatraman, J. E. Van Eyk, *Proteomics*, **16** (2016) 2221-2237.
65. R. J. Holewinski, S.J. Parker, A. D. Matlock, V. Venkatraman, J. E. Van Eyk, u S. Sechi (ur.) *Quantitative Proteomics by Mass spectrometry*, Methodes in molecular biology Vol. 1410, Springer Science+Business Media, New York, 2016, str 265-279.
66. R. Bruderer, O. M. Bernhardt, T. Gandhi, L. Reiter, *Proteomics* **16** (2016) 2246-2256.
67. C. Escher, L. Reiter, B. MacLean, R. Ossola, F. Herzog, J. Chilton, M. J. MacCoss, O. Rinner, *Proteomics* **12** (2012) 1111-1121.
68. S. J. Parker, H. Rost, G. Rosenberger, B. C. Collins, L. Malmström, D. Amodei, V. Venkatraman, K. Raedschelders, J. E. Van Eyk, R. Aebersold, *Mol. Cell. Proteomics* **14** (2015) 2800-2813.

69. Spectronaut™ Pulsar User Manual, 2015, *Biognosys*,  
<https://www.biognosys.com/media.ashx/spectronaut-11-user-manual.pdf> , (datum pristupa 25.srpnja.2018.)
70. W. Li, J. Freudenberg, Y. J. Suh, Y. Yang, *Comput. Biol. Chem.* **48** (2013) 77-83.
71. X. Cui, G. A. Churchill, *Genome Biol.*, **4** (2003) 210(1-10).
72. P. Gaudet, N. Škunca, J. C. Hu, C. Dessimoz, u C. Dessimoz, N. Škunca (ur.), *The Gene Ontology handbook*, Methods in Molecular Biology, Vol 1446, Springer Science+ Business Media LLC, New York, 2017, str. 25-37.
73. P. D. Thomas, u C. Dessimoz, N. Škunca (ur.), *The Gene Ontology handbook*, Methods in Molecular Biology, Vol 1446, Springer Science+ Business Media LLC, New York, 2017, str. 15-24.
74. D. W. Haung, B.T. Sherman, R. A. Lempicki, *Nat. Protoc.* **4** (2009) 44-57.
75. S. Carbon, A. Ireland, C. J. Mungall, S.Q. Shu, B. Marshall, S. Lewis, AmiGO Hub, Web Presence Working Group, *Bioinf.* **25** (2009) 288-289.
76. D. M. Dziuda, *Data Mining for Genomics and Proteomics*, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2010, str 102-103.
77. C. E. Parker, C. H. Borchers, *Mol. Oncol.* **8** (2014) 840-858.
78. Y. Liu, R. Hüttenhain, B. Collins, R. Aebersold, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **13** (2013) 811-825.
79. W. Li, *J Bioinf. Comput. Biol.*, **10** (2012) 1231003 (1-24).
80. S. Freeby, J. Walker, A. Paulus, K. Smith, N.Liu, K. Academia, *Enrichment of Medium- and Low-abundance Proteins in Sample Types, using ProteoMiner™ Technology*, Tech note 5916, 2010.
81. A. Paulus, S. Freeba, K. Academia, V. Thulasiramen, T. Wehr, N. Liu, S. Roth, K. Smith, Accessing Low-Abundance Proteins in Serum And Plasma With a Novel, Simple Enrichment and Depletion Method, tech note 5632, 2009.
82. S. Bosnić, L. Gradoni, C. Khoury, M. Maroli, *Acta Trop.*, **99** (2006) 42-49.
83. J. E. Noble, M. J. A. Bailey, u R. R. Burgess, M. P. Dutscher (ur.), *Methods in Enzymatolgy*, Vol. 463, Elsevier Inc., San Diego, 2009, str. 88-90.
84. S. Li, Q. Cao, W. Xiao, Y. Guo, Y. Yang, X. Duan, W. Shui, *J. Proteome Res.* **16** (2017) 738-747.

85. R. Bruderer, O. M. Bernhardt, T. Gandhi, S. M. Miladinović. L.-Y. Cheng, S. Messner, T. Ehrenberger, V. Zanotelli, Y. Butscheid, C. Escher, O.Vitek, L. Reiter, *Mol. Cell. Proteomics*, **14** (2015) 1400-1410.
86. U. Distler, J. Kuharev, S. Tenzer, *Expert Rev. Proteomics*, **11** (2014) 675-684.
87. D. Guillarme, J.-L. Veuthey u M. Holcapek, W. C. Byrdwell (ur.) *Handbook of Advanced Chromatography-Mass Spectrometry Techniques*, Academic Press and AOCSS Press, Urbana, 2017 str. 1-38.
88. S. J. Parker, R. J. Holewinski, I. Tchernyshoyos, V. Venkatraman, L. Parker, J. E. Van Eyk. u G. Agnetti, M. L. Lindsey, D. B. Foster (ur.), *Manual of Cardiovascular Proteomics*, Springer International Publishing Switzerland, Basel, 2016 str. 227-245.
89. Thermo Fisher Scientific, *Q Exactive™ Plus Software Manual*, Thermo Fisher Scientific, Bremen, 2013, str. (3-66)-(3-68).
90. N.L. Anderson, N. G. Anderson, *Mol. Cell. Proteomics* **1** (2002) 845-867.
91. <http://david.abcc.ncifcrf.gov>, (datum pristupa 19.7.2018.)
92. <http://amigo.geneontology.org/amigo> , (datum pristupa 19.7.2018.)
93. C. M. Carnielli, F. V. Winck, A. F. Paes Leme, *Biochim. Biophys. Acta* **1854** (2015) 46-54.
94. A. E. Kip, M. Balasegarm, J. H. Beijen, J. H. M. Schellens, P. J. De Vries, T. P. C. Dorlo, *Antimicrob. Agents Chemother.* **59** (2015) 1-14.
95. M. Akhoundi, T. Downing, J. Votycka, K. Kuhls, J. Lukes, A. Casnnet, C. Ravel, P. Marty, P. Delaunay, M. Kasbari, B. Granouillac, L. Gradoni, D. Sereno, *Mol. Aspects Med.* **57** (2017) 1-29.
96. F. Bahrami, A. M. Harandi, S. Rafati, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8** (2018) 1-8.
97. J. B. De Jesus, C. Mesquita- Rodrigues, P. Cuervo u A. L. S. Santos, M. H. Branquinha, C.M. d'Avilo-Levy, L. F. Kneipp, C. L. Sorde (ur.) *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma*, Subcellular Biochemistry 74, Springer Science+ Business Media, Dodrecht, 2014, str. 323-349.
98. M. F. L. da Silva, L. M. Floeter-Winter u A. L. S. Santos, M. H. Branquinha, C.M. d'Avilo-Levy, L. F. Kneipp, C. L. Sorde (ur.) *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma*, Subcellular Biochemistry 74, Springer Science+ Business Media, Dodrecht, 2014, str. 103-117.

- 
99. D. Escibano, A. Tvarijonavicute, M. Kocaturk, J. J. Ceron, L. Pardo-Marin, A. Torrecillas, Z. Yilmaz, S. Martinez-Subiela, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **49** (2016) 82-87.
100. S. Martinez-Subiela, A. Horvatić, D. Escibano, L. Pedro-Marin, M. Kocaturk, V. Mrljak, R. Buchmore, J. J. Ceron, Z. Yilmaz, *Vet. Immunological, Immunpathol.* **191** (2018) 60-67.

## § 8. DODATAK

**Tablica D1.** Određena svojstva analizatora masa koji se mogu koristiti u proteomici- prvi dio<sup>24</sup>

Analizator	Rezolucija	Točnost mase	Osjetljivost
QIT	1000	100-1000 ppm	pikomol
LTQ	2000	100-500 ppm	femtomol
Q-q-Q	1,000	100- 1000 ppm	atomol do femtomol
Q-q-LIT	2000	100- 500 ppm	femtomol
TOF	10,000- 20,000	10-20 ppm <sup>a</sup> <5 ppm <sup>b</sup>	femtomol
TOF-TOF	10,000- 20,000	10- 20 ppm <sup>a</sup> <5 ppm <sup>b</sup>	femtomol
Q-q-TOF	10,000- 20,000	10-20 ppm <sup>a</sup> <5 ppm <sup>b</sup>	femtomol
FT-ICR	50,000- 750,000	< 2 ppm	femtomol
LTQ-Orbitrap	30,000- 100,000	< 5ppm	femtomol

<sup>a</sup> s vanjskom kalibracijom, <sup>b</sup> s unutarnjom kalibracijom

**Tablica D2.** Određena svojstva analizatora masa koji se mogu koristiti u proteomici- drugi dio<sup>24</sup>

Analizator	m/z raspon	brzina snimanja	MS/MS sposobnost	Najčešći upareni ionksi izvor
QIT	50- 2000 ; 200- 4000	umjerena	MS <sup>n a</sup>	ESI
LTQ	50- 2000 ; 200- 4000	brza	MS <sup>n a</sup>	ESI
Q-q-Q	10 -4000	umjerena	MS/MS	ESI
Q-q-LIT	5-2800	brza	MS <sup>n a</sup>	ESI
TOF	neograničen	brza	-/+ <sup>b</sup>	MALDI
TOF-TOF	neograničen	brza	MS/MS	MALDI
Q-q-TOF	neograničen	umjerena do brza	MS/MS	MALDI; ESI
FT-ICR	50- 2000 ; 200- 4000	spora	MS <sup>n a</sup>	ESI; MALDI
LTQ-Orbitrap	50- 2000 ; 200- 4000	umjerena do brza	MS <sup>n a</sup>	ESI; MALDI

<sup>a</sup> n> 2 do 13, <sup>b</sup> moguće ako dođe do fragmetacije nakon izlaska iz izvora (PSD)



**Tablica D3.** Najčešća primjena analizatora u proteomici<sup>24</sup>

<b>Analizator</b>	<b>Najčešća primjena</b>
QIT	identifikacija proteina iz manje kompleksnih uzoraka; identifikacija PTM
LTQ	identifikacija kompleksnih peptidnih smjesa upotrebom LC-MS <sup>n</sup> , identifikacija PTM
Q-q-Q	kvantifikacija primjenom SRM; detekcija PTM u ionu prekursoru
Q-q-LIT	kvantifikacija primjenom SRM; detekcija PTM u ionu prekursoru
TOF	identifikacija proteina dobivenih digestijom u gelu
TOF-TOF	identifikacija proteina dobivenih digestijom u gelu
Q-q-TOF	Identifikacija proteina iz kompleksnih peptidnih matrica; analiza intaktnih proteina; identifikacija PTM
FT-ICR	proteomika odozgor nadolje; karakterizacija PTM sa velikom točnosti izmjerene mase
LTQ-Orbitrap	proteomika odozgor nadolje; karakterizacija PTM sa velikom točnosti izmjerene mase; identifikacija i kvantifikacija petida iz kompleksnih smjesa

**Tablica D4.** Karakteristike akvizicijskih tehnika SRM, PRM i DIA kod tandemne sprektrometrije masa<sup>33</sup>

<b>Karakteristike</b>	<b>SRM</b>	<b>PRM</b>	<b>DIA</b>
Akvizicijski mod	usmjerena	usmjerena	globalna
Primarni instrument	QqQ	Q-Orbitrap	Q-TOF/Q-Orbitrap
Ionska transmisija	Tip zrake	Akumulacijski tip	zraka/akumulacija
MS1 filter	0,7-1,2 <i>m/z</i>	1,4-2,0 <i>m/z</i>	2- cijeli <i>m/z</i> raspon
MS2 filter	0,7 <i>m/z</i>	cijeli <i>m/z</i> raspon	cijeli <i>m/z</i> raspon
Osjetljivost (LOD)	Vrlo visoka ( $\approx 10$ amol)	Srednja ( $\approx 1$ fmol)	Srednja- visoka ( $\approx 0,1$ fmol)
Točnost mase	Umjerena (50-300 ppm)	Vrlo visoka (1-5 ppm)	Visoka (5-10 ppm)
Rezolucijska moć	Niska (3-5000)	Srednja-visoka (17,5-140,000)	Srednja (15-50,000)
Dinamički raspon	4-5 log	3-4 log	4 log
Tip ionskog detektora	Elektronski multiplikator	Mjerenje jakosti struje	Multikanalna ploča/mjerenje jakosti struje
Brzina (engl. <i>rate</i> ) akvizicije podataka	>75 Hz	0,35-18 Hz	0,25-0,31 Hz

**Tablica D5.** Programi i tipovi akvizicije<sup>36</sup>

<b>Ime programa</b>	<b>Tip akvizicije</b>	<b>Ekstrakcija</b>
Skyline	SRM, PRM, uDIA	Usmjerena
OpenSWATH, Spectronaut, SWATH 2.0	uDIA	Usmjerena
DIA-Umpire	uDIA	Neusmjerena
Group-DIA	uDIA	Neusmjerena
MSPLIT—DIA	uDIA	Neusmjerena
PECAN	uDIA	Usmjerena
XDIA	uDIA	-
PAcIFIC	uDIA	-
mapDIA	SRM, PRM, uDIA	-
TRIC	uDIA	-
Msstats	SRM, PRM, uDIA	-
NOFI ranking	SRM, PRM, uDIA	-

**Tablica D6.** Opis programa korištenih za analizu podataka dobivenih DIA-om<sup>36</sup>

Ime programa	Opis
Skyline	Naknadna obrada, razvoj testova (assay), statistički testovi, kvantifikacija proteina iz preddefiniranih spektralnih knjižnica
OpenSWATH, Spectronaut, SWATH 2.0	Kvantifikacija proteina korištenjem preddefiniranih spektralnih knjižnica
DIA-Umpire	Stvaranje pseudo-MS/MS spektara za identifikaciju pretraživanjem baza podataka, kvantifikacija proteina pomoću identifikacijskih brojeva (ID-s) iz pseudo-MS/MS i postojećih knjižnica
Group-DIA	Stvaranje pseudo-MS/MS spektara za identifikaciju pretraživanjem baza podataka, blagodati više akvizicija
MSPLIT-DIA	Identifikacija proteina korištenjem postojećih spektralnih knjižnica, spektralno spajanje
PECAN	Peptidno-centrični program koji procjenjuje značaj prisutnosti određenog peptida
XDIA	Strategija skupljanja podataka i stvaranja pseudo MS/MS spektra za identifikaciju pretragom baza podataka koristeći podatke iz od-sredine-nadolje ETD-a
PAcIFIC	Usmjerena fragmentacija 10 malih m/z prekursorskih raspona koji prekrivaju 15 m/z ponovljena puno puta da se prekrije cijeli maseni raspon prekursora
mapDIA	Post-kvantifikacijsko filtriranje na razini fragmenta, statistički testovi značaja
TRIC	Strategija automatiziranog poravnanja za reproducibilnu kvantifikaciju proteina
MSstats	Post-kvantifikacijski testovi značaja
NoFI ranking	Post-kvantifikacijsko multivarijabilno filtriranje fragmenata bazirano na ionskoj razini i kromatografskim svojstvima

**Tablica D7.** Korišteni instrumenti i vrsta fragmetacije u različitim pristupima DIA-e <sup>10,37,54</sup>

<b>Metoda</b>	<b>Instrument</b>	<b>Vrsta fragmentacije</b>	<b>Radni ciklus na cijelom <math>m/z</math></b>
Originalna DIA	Ionska stupica	CID	~ 35 s
MS <sup>E</sup>	QqTOF	CID (i HCD)	~ 2 s
PAcIFIC	Ionska stupica	CID	~ 3 s · 67
AIF	Orbitrap	CID (i HCD)	~ 2 s
XDIA	ionska stupica-ETD-CAD	ETD i CID	neusporedivo
FT-ARM	LTQ-FT	CID	~5,45 s · 2
SWATH	QqTOF	CID	~3,2 s
MSX	Q-Orbitrap	CID	~3,5 s
pSMART	Q-Orbitrap	HCD	~20 s
wiSIM DIA	Q-Orbitrap-ionska stupica	HCD	~ 3,6 s

Tablica D8. DIA metode- širine prozora i raspon masa <sup>10,37,86</sup>

Metoda	Ciklički mod	MS1 izolacijska strategija	Maseni raspon ( $m/z$ )
Originalna DIA	Postepen; prozori	Prozori od 10 $m/z$	400- 1400
MS <sup>E</sup>	Izmjena LCD (MS1) i HCD (MS2)	Cijeli raspon masa	300- 2000
PAcIFIC	Postepen; prozori	Prozori od 2,5 $m/z$	400-1400
AIF	Izmjena LCD (MS1) i HCD (MS2)	Cijeli raspon masa	200- 1600
XDIA	Postepen; prozori	Prozori 20 $m/z$	400-1000
FT-ARM	Postepen; prozori	Prozori od 100 $m/z$ ili 12 $m/z$	500-1500
SWATH	Postepen; prozori	Prozori duljine 25 $m/z$ ili varijabilnog $m/z$	400-1200
MSX	Nasumičan; prozori	5·prozora duljine 4 $m/z$ po injektiranju	500-900
pSMART	Postepen; prozori	Prozori duljine 5 $m/z$ Prozori duljine 10 $m/z$ Prozori duljine 20 $m/z$	za 400-800 za 800-1000 za 1000-1200
wiSIM DIA	Postepen; prozori	Prozori duljine 200Da Prozori duljine 12 Da na prozore od 200 Da	za 400-1000

Tablica D9. Prednosti i nedostaci odabranih DIA metoda <sup>54</sup>

Metoda	Prednosti	Nedostaci
MS <sup>E</sup>	Jednostavna metoda Nije potrebno predznanje o uzorku Zahtjeva minimalni razvoj metode Velik broj signala mogućih proteina	Metoda ograničena povezivanjem iona prekursora s ionom fragmentom. Potrebna validacija peptida DDA metodama. Spojevi niskog intenziteta se izgube u šumi fragmenata
AIF	Isto kao MS <sup>E</sup> samo navećem dinamičkom rasponu i uz veću točnost mase.	Nema selekcije iona prekursora. Teško praćenje iona nisko zastupljenih spojeva zbog koeulacije drugih iona.
SWTH-MS	Pogodna za kompleksne uzorke; selektivnost poboljšana uskim prozorima.	Peptidi se ne mogu direktno pretraživati iz baze podataka Potrebna validacija. Velika količina podataka za spremanje.
MSX	Pogodna za kompleksne uzorke Smanjena količina „kemijske buke” i interferencije drugih iona	Metoda je kompromis između kvalitete dobivenih podataka i brzine snimanja.

**Tablica D10.** Molekulska funkcija potencijalnih biomarkera prema genskoj ontologiji

<b>molekulska funkcija</b>	<b>broj proteina</b>	<b>p-vrijednost</b>
vezanje heparina	4	$7,3 \cdot 10^{-5}$
vezanje glikozaminoglikana	4	$2,0 \cdot 10^{-4}$
regulacija aktivnosti peptidaza	4	$4,2 \cdot 10^{-4}$
transport lipida	3	$2,7 \cdot 10^{-3}$
vezanje proteinskih kompleksa	2	$1,7 \cdot 10^{-2}$
inhibicija enzima	3	$2,6 \cdot 10^{-2}$
aktivacija enzima	3	$3,4 \cdot 10^{-2}$
vezanje alkohola	2	$4,3 \cdot 10^{-2}$
vezanje steroida	2	$5,3 \cdot 10^{-2}$

**Tablica D11.** Celularna lokalizacija potencijalnih biomarkera prema genskoj ontologiji

<b>stanična lokalizacija</b>	<b>broj proteina</b>	<b>p-vrijednost</b>
ekstracelularna vezikula	12	$1,2 \cdot 10^{-8}$
krvna mikročestica	6	$3,8 \cdot 10^{-9}$
lipoproteinska čestica plazme	4	$7,9 \cdot 10^{-7}$
lipoproteinska čestica bogata trigliceridima	3	$6,4 \cdot 10^{-2}$
HDL	3	$1,1 \cdot 10^{-4}$
LDL	2	$4,4 \cdot 10^{-3}$



## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Marin Popović

Datum rođenja: 21. 12.1990.

Mjesto rođenja: Bjelovar

### Obrazovanje

1997.–2005. Osnovna škola - Prva osnovna škola Bjelovar, Područni odjeli Kokinac  
i Ciglena

2005.–2009. Srednja škola - Prirodoslovno-matematička gimnazija, Gimnazija  
Bjelovar

2009.–2015. Preddiplomski studij - Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-  
matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb