

Univerzita Palackého v Olomouci

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Olomouc 2014

Lucie Broskevičová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Využití hmotnostní spektrometrie pro identifikaci
a kvantifikaci proteinových biomarkerů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Lucie Broskevičová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: Mgr. Dušan Holub

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Dušana Holuba za použití citované literatury.

V Olomouci

Podpis

Chtěla bych poděkovat Mgr. Dušanu Holubovi za odborné vedení bakalářské práce. Především děkuji za jeho čas, trpělivost, ochotu, a také pomoc v laboratoři a při vypracování této práce. Dále děkuji rodině a všem blízkým za podporu během celého studia.

Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lucie Broskevičová
Název práce	Využití hmotnostní spektrometrie pro identifikaci a kvantifikaci proteinových biomarkerů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	Mgr. Dušan Holub
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	<p>V teoretické části této bakalářské práce jsou uvedeny základní informace o proteomice, hmotnostní spektrometrii a přehled přístupů pro kvantifikaci proteinů. Dále je popsán proteinový hormon hepcidin-25 a jeho využití jako diagnostický biomarker onemocnění související s poruchou homeostázy železa. Experimentální část práce je zaměřena na vývoj a optimalizaci metody pro stanovení hladiny hepcidinu-25 v séru a moči pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.</p>
Klíčová slova	biomarker, hepcidin, hmotnostní spektrometrie, kvantitativní proteomika, proteomika
Počet stran	54
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Lucie Broskevičová
Title	Application of mass spectrometry for identification and quantification of protein biomarkers
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of molecular and translational medicine
Supervisor	M.Sc. Dušan Holub
The year of presentation	2014
Abstract	In the theoretical part of this bachelor thesis are provided basic information about proteomics, mass spectrometry, and an overview of approaches for the quantification of proteins. It also describes a protein hormone hepcidin-25 and its use as a diagnostic biomarker for diseases associated with impairment iron homeostasis. The experimental part of this thesis is focused on the development and optimization of method for determining the levels of hepcidin-25 in human serum and urine by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.
Keywords	biomarker, hepcidin, mass spectrometry, quantitative proteomics, proteomics
Number of pages	54
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	9
2	CÍLE PRÁCE	10
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	PROTEOMIKA	11
3.1.1	Proteom.....	11
3.1.2	Přístupy v proteomických analýzách	12
3.1.3	Postupy při identifikaci proteinu.....	13
3.2	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	14
3.2.1	Historie.....	14
3.2.2	Instrumentální vybava hmotnostního spektrometru	15
3.2.3	Iontové zdroje a ionizační techniky	15
3.2.3.1	Ionizace/desorpce laserem za přítomnosti matrice	16
3.2.3.2	Ionizace elektrosprejem	18
3.2.4	Hmotnostní analyzátory	19
3.2.5	Detektor	23
3.2.6	Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	23
3.2.6.1	Trojité kvadrupól	24
3.3	KVANTITATIVNÍ PROTEOMICKÉ PŘÍSTUPY	26
3.3.1	Chemické značení	27
3.3.2	Enzymatické značení	29
3.3.3	Metabolické značení	29
3.3.4	Metody kvantifikace bez značení	31
3.4	HEPCIDIN	32
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4.1	MATERIÁL	34
4.1.1	Chemikálie	34
4.1.2	Přístrojové vybavení	34
4.1.3	Software	34
4.2	OPTIMALIZACE MS (SRM) PODMÍNEK	35
4.2.1	Příprava roztoků.....	35

4.2.2	Postup optimalizace MS metody	35
4.3	OPTIMALIZACE PODMÍNEK NA LC.....	36
4.3.1	Příprava roztoků.....	36
4.3.2	Postup optimalizace na LC	38
5	VÝSLEDKY	40
5.1	VÝSLEDKY OPTIMALIZACE MS (SRM) PODMÍNEK.....	40
5.2	VÝSLEDKY OPTIMALIZACE PODMÍNEK NA LC	42
6	DISKUZE	45
7	ZÁVĚR	46
8	LITERATURA.....	47
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	53

1 ÚVOD

Cílem této práce bylo naučit se nastavit a optimalizovat LC-MS metodu pro kvantifikaci cíleného biomarkeru - hepcidinu-25. Tento proteinový hormon je hlavní regulátor homeostázy železa v lidském těle. Je považován za vhodný biomarker onemocnění související s poruchami homeostázy železa. Nadměrná produkce hepcidinu je pozorována například u anémie chronických chorob. Naopak snížená produkce hepcidinu je zodpovědná za většinu případů dědičné hemochromatózy. Přesné stanovení hladiny hepcidinu v séru nebo moči se proto jeví jako slibný nástroj v hematologii při diagnostice poruch homeostázy železa.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracování rešerše na téma proteomika, hmotností spektrometrie, přehled přístupů ke kvantitativní proteomické analýze a využití hepcidinu-25 jako diagnostického biomarkeru.

Cílem experimentální části práce bylo vyvinout a optimalizovat LC-MS metodu pro stanovení hladiny hepcidinu-25 v séru.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Proteomika

Proteomika je vědní obor, který se zabývá studiem proteinů s cílem poskytnout podrobný popis jejich struktury, funkce a účinku v biologických systémech (Bradshaw *et* Burlingame, 2005).

V současné době jsou známy dvě definice proteomiky. První je více klasická a zahrnuje analýzu samotných proteinů. Druhá je pojata ve větším měřítku a spojuje studium proteinů s analýzou mRNA a s analýzou genomu. Tato definice zahrnuje různé oblasti studia proteinů jako například protein-proteinové interakce, posttranslační modifikace proteinů, funkce proteinů a také jejich lokalizace. Cílem proteomiky je nejen identifikovat všechny proteiny v buňce, ale také vytvořit kompletní trojrozměrnou (3D) mapu buňky (Graves *et* Haystead, 2002).

3.1.1 Proteom

Termín "proteom" zavedl Marc Wilkins roku 1994 na konferenci v Sienně, vznikl spojením slov „protein“ a „genom“ a označoval proteinový komplement genomu (Patterson *et* Aebersold, 2003).

Proteom lze definovat jako soubor všech proteinů nacházejících se v daném okamžiku a za daných podmínek v konkrétní buňce, tkáni, orgánu nebo organismu.

Při popisu proteomu dané buňky nebo organismu, je třeba počítat s tím, že se proteom chová dynamicky. V reakci na vnitřní nebo vnější podněty mohou být proteiny posttranslačně modifikovány a přemístovány uvnitř buňky. Zároveň může v buňce docházet k syntéze či degradaci proteinů (Graves *et* Haystead, 2002).

3.1.2 Přístupy v proteomických analýzách

Současná proteomika zahrnuje několik přístupů, které se rozdělují na základě použitých metod, cílů a účelů analýzy.

1. Analytická proteomika

Zahrnuje především identifikaci proteinů, které byly separovány z biologické směsi. Stanovuje jejich sekvenci, molekulovou hmotnost a případné posttranslační modifikace s využitím hmotností spektrometrie a bioinformatiky (Chmelík, 2005).

2. Expresní proteomika

Expresní proteomika je známa jako kvantitativní studie exprese různých proteinů a jejich srovnání. Tímto způsobem mohou být identifikovány například proteiny pro konkrétní onemocnění (Graves *et* Haystead, 2002).

3. Strukturní proteomika

Cílem je zmapovat strukturu proteinových komplexů a proteinů přítomných v určité buněčné organelle, identifikovat všechny proteiny a následně určit jejich umístění. Izolace specifických subcelulárních organel nebo proteinových komplexů pomocí afinitní purifikace může značně zjednodušit proteomické analýzy. Tyto informace pomáhají sestavit celkovou architekturu buňky a vysvětlují, jak exprese určitých proteinů uděluje buňce jedinečné vlastnosti (Graves *et* Haystead, 2002).

4. Funkční proteomika

Jedná se o široký pojem zahrnující mnoho specificky zaměřených přístupů pro izolaci proteinových komplexů nebo použití specifických ligandů k izolaci určitého typu proteinu. Funkční proteomika slouží ke studiu vybraných proteinů ve sledované signální dráze, při vzniku určitého onemocnění nebo reakce proteinů s léčivem (Graves *et* Haystead, 2002).

5. Klinická proteomika

Klinická proteomika zahrnuje uplatnění proteomických metod v klinické diagnostice a to především měřením novým biomarkerů metodou SRM, které mohou být využity pro včasnou diagnózu konkrétního onemocnění. Své uplatnění našla také metoda MALDI zobrazování (MALDI imaging), která zaznamenává hmotnostní profily napříč řezem tkáni (Palmlblad, 2009).

3.1.3 Postupy při identifikaci proteinu

Základní metody v proteomických analýzách umožňují separaci a izolaci proteinů z buněčné linie, tkáně nebo organismu, poskytují informace o proteinové struktuře za účelem identifikace a následného vyhodnocení pomocí proteinových databází. Podle způsobu identifikace proteinu lze proteomiku dále dělit:

1. Bottom-up proteomika

Přístup zahrnující identifikaci proteinů pomocí klasické analýzy peptidů. Protein je nejprve izolován ze směsi, poté je enzymově štěpen na směs peptidů a nakonec je tato směs analyzována pomocí LC-MS (Zhang *et al.*, 2013).

2. Shotgun proteomika

Shotgun proteomika poskytuje nepřímé měření proteinů prostřednictvím peptidů, které vznikly proteolytickým štěpením intaktních proteinů. V typickém experimentu je peptidová směs podrobena frakcionaci a LC-MS analýze. Identifikace je dosaženo porovnáním naměřených a teoretických hmotnostních spekter peptidů (Zhang *et al.*, 2013).

3. Top-down proteomika

Jedná se o analýzu, kdy je intaktní protein analyzován hmotnostní spektrometrií. Tento přístup poskytuje informace o sekvenci aminokyselin, posttranslačních modifikacích nebo izoformách daného proteinů (Zhang *et al.*, 2013).

3.2 Hmotnostní spektrometrie

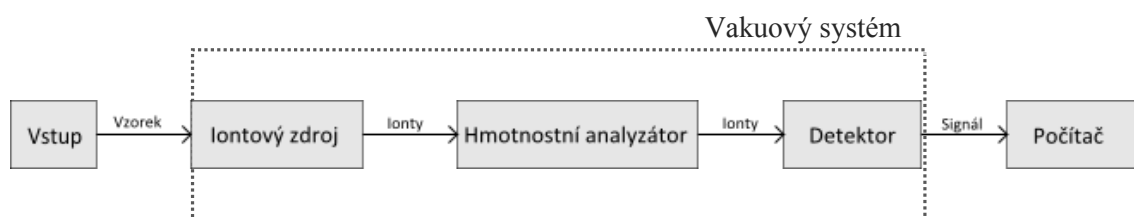
3.2.1 Historie

Počátky hmotností spektrometrie sahají do roku 1897 a jsou spojeny se jménem J. J. Thomson, známého pro objev elektronu při experimentech s vychylováním katodových paprsků v elektrickém poli (Thomson, 1897). Tento objev byl zásadní pro rozvoj hmotnostní spektrometrie a Thomson byl oceněn Nobelovou cenou za fyziku. První hmotnostní spektrometr pro měření nabitých atomů sestrojil jeho student Francis Aston. Tento přístroj za pomoci plynové výbojky generoval ionty, které následně procházely elektrickým a magnetickým polem až k fotografické desce, kde byly detekovány (Griffiths, 2008). Thomson ze studií iontů v katodové trubici vyvodil, že charakteristická parabolická dráha každého iontu odpovídá poměru náboje a hmotnosti. Na základě toho bylo možno identifikovat atomovou a molekulovou hmotnost všech složek v trubici (Thomson, 1913). Využití tohoto přístroje vedlo k prokázání existence těžkých izotopů a objevu izotopu ^{22}Ne (Downard, 2012).

Až do 40. let byla hmotnostní spektrometrie využívána především na poli fyziky. Změna nastala až s projektem „Manhattan“ a potřebou prokázat existenci elementárních izotopů. Vliv na rozvoj měl také Alfred Nier a jeho snaha ukázat světu praktičnost této metody. Zanedlouho poté se hmotnostní spektrometry staly běžně dostupné a komerčně využívané například v průmyslu. Následující roky byly možností dalšího využití předmětem zkoumání mnohých laboratoří. Již koncem padesátých let proběhl první úspěšný pokus v určení struktury neznámých organických molekul a stanovení pravidel pro fragmentaci peptidů. Brzy poté byla navržena první metoda sekvenování peptidů pomocí MS, která položila základy pro moderní proteomiku. Analýza proteinů, především těch velkých, však představovala stále problém. Bylo nutné minimalizovat fragmentaci a rozklad analytu při ionizaci. Až příchod tzv. „měkkých“ ionizačních technik ESI a MALDI toto vyřešil a zároveň došlo k rozvoji hmotnostní spektrometrie v analýzách biomolekul. Tento objev byl v roce 2002 oceněn Nobelova cenou za chemii (Griffiths, 2008). Zdokonalením prošla během let také instrumentace hmotnostních spektrometrů a to zavedením zcela nových analyzátorů fungujících na odlišných principech. Mezi vůbec nejnovější se řadí vynález Alexandra Makarova nesoucí název Orbitrap (Makarov, 2000). V dnešní době nalezneme různé „hybridní“ přístroje, které tyto hmotnostní analyzátory kombinují (Thorngate, 2006).

3.2.2 Instrumentální výbava hmotnostního spektrometru

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí: **iontový zdroj**, **hmotnostní analyzátor** a **hmotnostní detektor** (Obr. 1). Iontový zdroj převádí molekuly analytu na nabitě ionty do plynné fáze. Vzniklé ionty jsou pomocí analyzátoru rozděleny na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z). Detektor následně poskytuje záznam o množství zastoupených iontů (Yates, 2004).



Obr. 1: Schéma základních částí hmotnostního spektrometru (převzato a upraveno dle Lane, 2005).

3.2.3 Iontové zdroje a ionizační techniky

Jak již bylo zmíněno, analyt je nutné před samotnou analýzou v hmotnostním spektrometru ionizovat. Hmotnostní spektrometrie využívá různých ionizačních technik, které se volí na základě fyzikálně-chemických vlastností analytu. Techniky se rozdělují na základě ionizační šetrnosti na měkké a tvrdé.

Ionizační techniky způsobující rozsáhlou fragmentaci molekul se označují jako tvrdé. Řadí se zde **elektronová ionizace** (EI) využívaná především v analýze organických molekul. Její výhodou je poskytnutí strukturálních informací pro identifikaci analytu. Přílišná fragmentace však může zabránit molekulární ion vůbec detekovat (de Hoffman *et* Stroobant, 2007).

Měkké ionizační techniky pracují naopak šetrnějším způsobem a při ionizaci nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci molekul. Jedná se například o **chemickou ionizaci** (CI) při které je prvně ionizován reakční plyn (metan, isobutan) a až poté molekuly analytu. (Munson *et* Field, 1966). O něco jemnější technikou je považována **ionizace polem** (FI) využívající velmi silné elektrické pole pro produkci iontů. Vnitřní energie iontů je velmi nízká a nedochází k téměř žádné fragmentaci. Nevýhoda spočívá v možném

tepelném rozkladu analytu. Použití dosud zmíněných technik je omezeno pro ionizaci analytu v plynné fázi. Analyt musí být dostatečně těkává a tepelně stabilní sloučenina (de Hoffman *et* Stroobant, 2007).

Pro termolabilní sloučeniny se volí jiné techniky jako například **desorpce polem** (FD), **desorpce plasmou** (PD), **desorpce laserem** (LD), **ionizace urychlenými atomy** (FAB) a **ionizace/desorpce laserem za přítomnosti matrice** (MALDI). Tyto techniky kombinují ionizaci a desorpci, čímž je míněno uvolňování iontů z povrch analytu. Poslední zmíněná technika se využívá při analýze biomolekul (Busch, 1995). Mezi ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku patří **chemická ionizace za atmosférického tlaku** (APCI), **fotoionizace za atmosférického tlaku** (APPI) a **ionizace elektrosprejem** (ESI). Využívají se především v analýzách metabolitů (de Hoffman *et* Stroobant, 2007).

Povrchem podpořená ionizace/desorpce laserem (SELDI) patří mezi méně běžnou ionizační techniku využívanou v proteomice. Využívá se u tzv. proteinových čipů, které mají chemicky aktivovaný povrch uzpůsobený k selektivnímu zachycení proteinů nebo jiných biomolekul. Zachycení je uskutečněno např. pomocí specifických interakcí (hydrofobní interakce, protilátka-antigen nebo enzym-substrát). K desorpci iontů do plynné fáze dochází pomocí laseru. Tato technika se stala přínosná především v analýzách biologických materiálů jako je krev, sérum nebo buněčný lyzát. Své uplatnění našla také při hledání nových biomarkerů (Tang *et al.*, 2004).

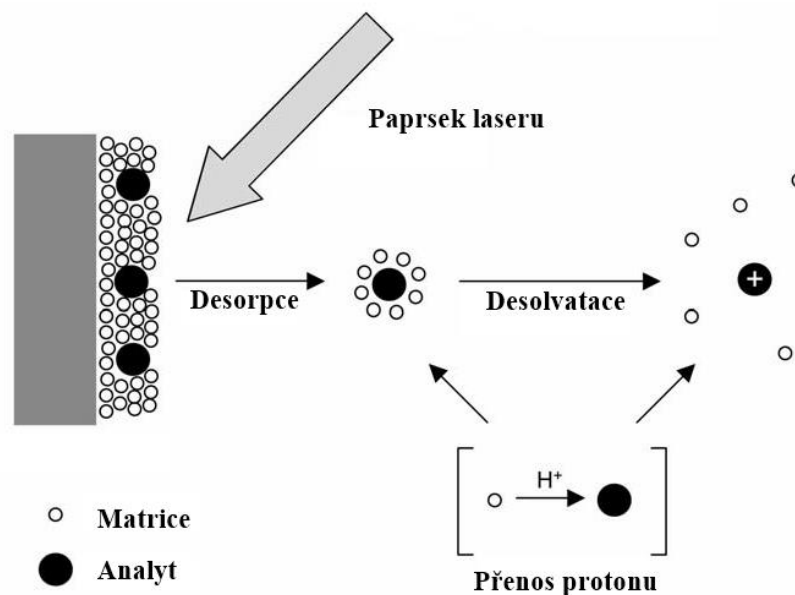
V proteomice mají největší význam ionizační techniky ESI a MALDI. Vzhledem k jejich relativní jemnosti dovolují ionizaci proteinů, a v podstatě všech biomolekul, bez nadměrné fragmentace. Jejich objev byl klíčový pro rozvoj hmotnostní spektrometrie (Patterson *et* Aebersold, 2003).

3.2.3.1 Ionizace/desorpce laserem za přítomnosti matrice

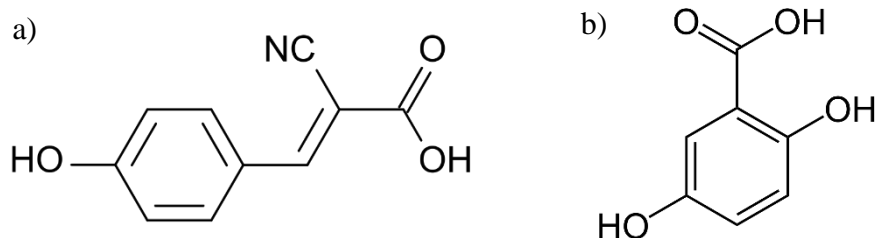
Princip této ionizační technika byl poprvé popsán v roce 1985 vědci Michaelem Karasem a Franzem Hillenkampem (Karas *et al.*, 1985). Samotnou ionizaci proteinů uskutečnil vědec Koichi Tanaka použitím laseru a kombinace tzv. „ultra jemné kovové a kapalné matrice“ při přípravě vzorku (Tanaka *et al.*, 1988). Za objev byl v roce 2002 oceněn Nobelovou cenou za chemii (Tanaka, 2003). Tato technika se kromě peptidů a proteinů používá v analýzách např. nukleotidů, sacharidů či syntetických polymerů.

Princip spočívá ve dvou krocích, které jsou znázorněny na obrázku (Obr. 2). Nejprve je analyt rozpuštěn v roztoku malých organických molekul (matrici). Při odpaření této směsi před samotnou analýzou dochází k zabudování molekul analytu do krystalové struktury matrice. K ionizaci dochází za podmínek vakua, kde je výsledná pevná látka ozářena pomocí krátkých laserových impulsů (de Hoffman *et* Stroobant, 2007). Zásah laseru způsobí rychlé zahřátí krystalů matrice a nakonec desorpci iontů do plynné fáze. Přenosem protonu z matrice jsou molekuly analytu ionizovány (Guerrera *et* Kleiner, 2005).

Matricí jsou obvykle malé organické molekuly absorbující při vlnové délce použitého laseru. Při práci s biomolekulami se používají především α -kyano-4-hydroxybenzoická kyselina a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (Obr. 3). Odlišují se na základě množství energie, které předají do biomolekul a následně způsobené míry fragmentace. Iontový zdroj MALDI je obvykle spojován s hmotnostním analyzátozem typu TOF (Mann *et al.*, 2001).



Obr. 2: Schéma ionizační techniky MALDI (převzato a upraveno dle Lane, 2005).

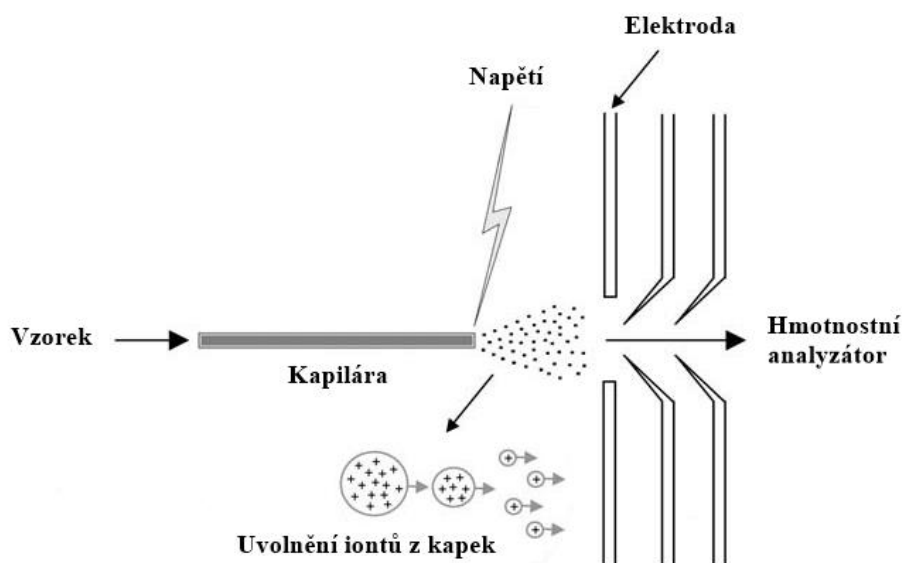


Obr. 3: Chemické vzorce nejčastěji využívaných matric u MALDI.

- a) α -kyano-4-hydroxybenzoická kyselina
 b) 2,5-dihydroxybenzoová kyselina

3.2.3.2 Ionizace elektrosprejem

První zásluhy na objevu měl vědec Malcolm Dole, který již v 60. letech zkoumal možnosti využití elektrospreje při ionizaci molekul (Dole, 1968). Na jeho práci navázal John Fenn, který o 20 let později experimentálně potvrdil využití ESI v analýze proteinů (Fenn, 1989). Za tento objev mu byla stejně jako v případě Tanaka v roce 2002 udělena Nobelova cena (Fenn, 2003). Tato technika může být použita pro analýzu široké škály polárních molekul, což zahrnuje proteiny, oligonukleotidy, sacharidy a polární lipidy (Mann *et al.*, 2001). Základní uspořádání elektrospreje je zobrazeno na obrázku (Obr. 4). Roztok analytu prochází kapilárou, která je udržována pod vlivem vysokého elektrického napětí (např. 2,5 až 6,0 kV) vzhledem k vstupní stěně hmotnostního spektrometru. Je generován sprej obsahující nabitě kapičky o stejné polaritě, jako je náboj ve sprejovací kapiláře. Pro podporu sprejování je aplikován rozprašovací plyn (např. dusík), který obtéká sprejovací kapiláru. Nabitě kapičky jsou kumulovány na hrotu kapiláry a působením rozprašovacího plynu a tlakového spádu jsou směřovány k analyzátoru. Působením zvýšené teploty a dalšího pomocného proudu plynu dochází k odpařování rozpouštědla. Nabitě kapičky zmenšují svou velikost, což vede ke zvýšení hustoty povrchového náboje (Ho *et al.*, 2003). Poté, co náboj uvnitř kapičky dosáhne krajního bodu, tzv. Rayleighova limitu, dochází k rozdělení kapičky na několik menších. Opakováním tohoto procesu dojde k uvolnění iontů z povrchu kapky, které následně vstupují do analyzátoru (Gaskell, 1997).



Obr. 4: Schéma ionizační techniky ESI (převzato a upraveno dle Lane, 2005).

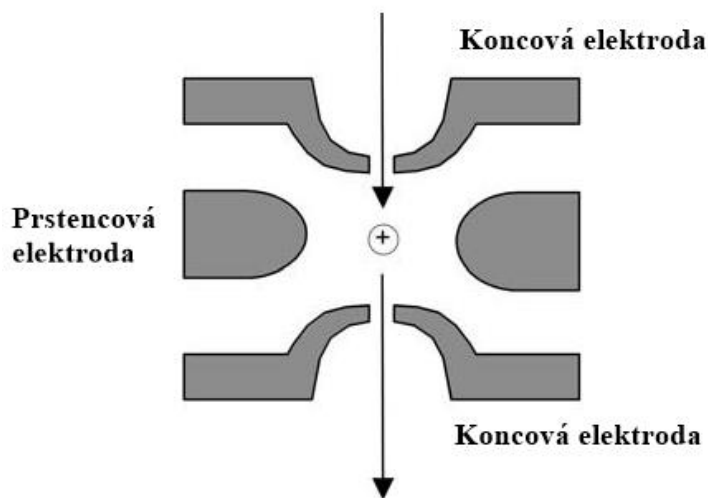
3.2.4 Hmotnostní analyzátoary

Analyzátoar je ústřední část hmotnostního spektrometru, kde dochází využitím elektrického nebo magnetického pole k separaci iontů na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Podle principu této separace se jednotlivé analyzátoary odlišují. U každého analyzátoaru lze nalézt určité výhody či nevýhody. V souvislosti s proteomikou se klade důraz především na citlivost, rozlišení, přesnost a schopnost generovat fragmentační spektra z peptidů.

V současné době existuje pět základních typů hmotnostních analyzátoarů využívaných v proteomice. Jedná se o kvadrupólovou iontovou past, analyzátoar doby letu (TOF), kvadrupólový hmotnostní analyzátoar, iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) a Orbitrap. Tyto analyzátoary mohou pracovat samostatně nebo v tzv. tandemu (Makarov, 2000; Aebersold *et* Mann 2003).

Kvadrupólová iontová past je typ analyzátoaru, který pracuje na principu zachycení iontů v trojrozměrném elektrickém poli a následném selektivním vypouštění iontů (Graves *et* Haystead, 2002). Iontovou past (Obr. 5) tvoří prstencová elektroda a dvě koncové elektrody (Lane, 2005). Obvykle je iontová past vyplněna inertním plynem (helium), který po srážce s ionty způsobí utlumení jejich kinetické energie a zároveň uchovává ionty ve středu iontové pasti. Ionty jsou zadržovány uvnitř vlivem oscilujícího elektrického pole, které je generováno radiofrekvenčním (RF) napětím aplikovaným na prstencovou elektrodu (Yates, 1998). Stupňováním amplitudy RF napětí ionty

o určitém poměru m/z ztrácí stabilitu. Dojde k jejich vypuzení z analyzátoru a následné detekci (March, 1997). Iontové pasti se vyznačují stabilitou, citlivostí a nízkou cenou (Lane, 2005).

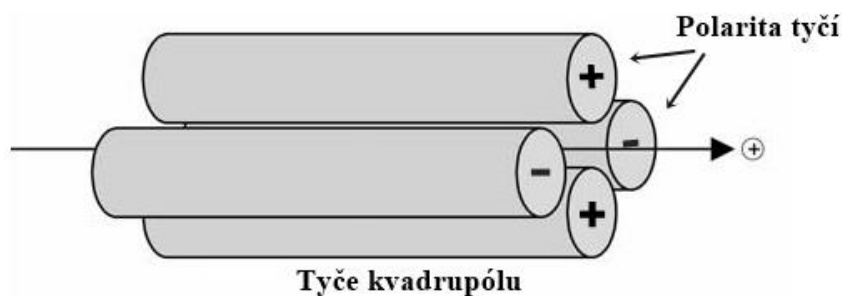


Obr. 5: Kvadrupólová iontová past (převzato a upraveno dle Lane, 2005).

Obecně však nemají příliš dobré zachycovací vlastnosti vzhledem k jejich malému objemu, což má za následek omezení jejich dynamického rozsahu. Vzhledem k této limitující nevýhodě byl vynalezen nový typ, který nese název **lineární iontová past** (Hager, 2002). Uvádí se také pojmenování dvojrozměrná iontová past, jelikož jsou zde ionty uzavřeny prostřednictvím kvadrupólu v radiálním rozměru a působením elektrického pole ve směru axiálním (de Hoffman *et* Stroobant, 2007). Tímto způsobem došlo k zvýšení objemu zachycených iontů v lineární iontové pasti. Zvýšila se citlivost, rozlišení a přesnost (Aebersold *et* Mann 2003).

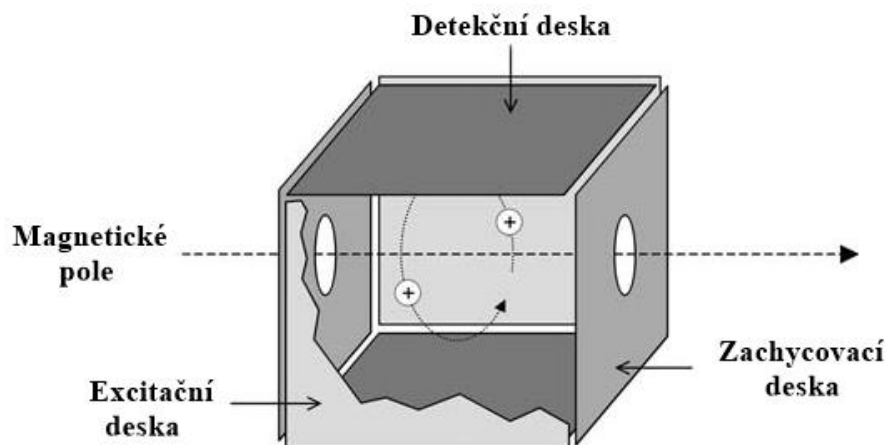
Analyzátor doby letu (TOF) je považován za poměrně jednoduchý typ analyzátoru, kdy se poměr m/z stanovuje na základě doby letu iontů trubicí o specifické délce (Domon *et* Aebersold, 2006). Na počátku je iontům dodána stejná kinetická energie. V průběhu letu se ionty začínají od sebe dělit na základě jejich rozdílné rychlosti (Aebersold *et* Mann 2003). Ionty o menší hmotnosti letí trubicí rychleji a dosáhnou detektoru dříve než ionty o hmotnosti větší (Figeys *et al.*, 2001). Dráha letu může být prodloužena začleněním iontového zrcadla tzv. reflektoru na konec trubice. Odražené ionty se vrací zpátky trubicí v mírně odlišném úhlu, který zamezí srážce s dopadajícími ionty. Především však dochází ke srovnání rozdílů v kinetické energii, jelikož ionty s větší rychlostí dorazí k reflektoru dříve, pronikají hlouběji a dochází k jejich zpomalení. Tímto se minimalizují odchylky v době letu (Yates, 1998).

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor se skládá ze čtyř rovnoběžných tyčí, které jsou rovnoměrně rozmístěné kolem středové osy (Obr. 6). Na tyče je zavedeno stejnosměrné (DC) a vysokofrekvenční střídavé (RF) napětí (protilehlé tyče mají stejnou polaritu). Ve své podstatě se jedná o iontový filtr, který využívá pro separaci iontů oscilujícího elektrického pole vytvořeného mezi jednotlivými tyčemi kvadrupólů. Průchod je umožněn pouze iontům o určitém poměru m/z , které mají v tomto poli stabilní trajektorii. Ostatní ionty s nestabilní trajektorií jsou vychýleny směrem k tyčím a na detektor nedopadnou. Hodnota m/z procházejících iontů je přímo úměrná napětí aplikovaného na tyče (Lane, 2005). Skenováním amplitudy elektrického pole a zaznamenáváním iontů na detektoru se získá hmotností spektrum (Mann *et al.*, 2001).



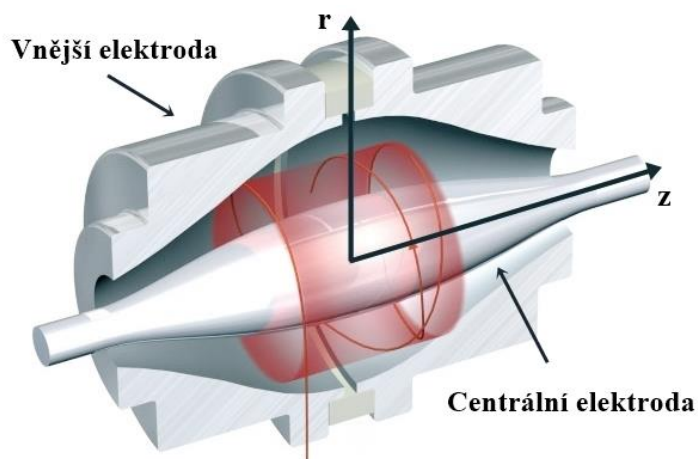
Obr. 6: Kvadrupólový hmotnostní analyzátor (převzato a upraveno dle Lane, 2005).

Na základě **iontové cyklotronové rezonance s využitím Fourierovy transformace** (FT-ICR) pracuje další typ analyzátoru, který může být konstruován do několika tvarů. Jako první zaujímal tvar krychlové cely umístěné v silném magnetické poli (Obr. 7). Tato cela je složená ze tří typů desek: zachycovací, excitační a detekční (Amster, 1996). Ionty vznikající ve zdroji jsou vedeny do této cely, kde na ně působí magnetické pole a zapříčiní jejich cyklotronový pohyb. Na zachycovací desku působí elektrický potenciál, který ionty stabilizuje v rovině kolmé k tomuto poli. Hodnota poměru m/z se poté stanoví měřením cyklotronové frekvence (Lane, 2005). Tento nový typ analyzátoru se vyznačuje vysokým rozlišením, vysokou přesností a velkým dynamickým rozsahem (Aebersold *et Mann* 2003).



Obr. 7: FT-ICR tvaru krychlové cely (převzato a upraveno dle Lane, 2005).

Nejnovějším typem hmotnostního analyzátoru je **Orbitrap**, který byl poprvé popsán v roce 2002 Alexanderem Makarovem (Makarov, 2000). Z historického hlediska vychází princip z původního přístroje pro zachycení iontů tzv. Kingdonovy pasti. Současně lze Orbitrap považovat za modifikovanou verzi kvadrupolové iontové pasti. Rozdíl spočívá ve způsobu zachycení iontů, kdy Orbitrap využívá elektrostatické pole. Samotná past, jak je znázorněno na obrázku (Obr. 8), se skládá ze dvou elektrod, vnější a centrální (Hu, 2005). V principu dochází k radiálnímu pohybu iontů kolem centrální elektrody (směr r), která má tvar vřetena. Zároveň ionty harmonicky oscilují podél své osy (směr z) s frekvencí charakteristickou pro poměr jejich m/z hodnot. Proudový obraz těchto oscilací se Fourierovou transformací převádí na frekvenci, ze které je stanoveno hmotnostní spektrum (Yates *et al.*, 2006). Tento nový typ analyzátoru se vyznačuje především vlastnostmi jako vysoké rozlišení, vysoká hmotnostní přesnost a velký dynamický rozsah (Hu, 2005).



Obr. 8: Orbitrap (převzato a upraveno dle Scigelova *et* Makarov, 2006).

3.2.5 Detektor

Poslední částí hmotnostního spektrometru je detektor. Zde dopadající ionty vytváří elektrický proud úměrný jejich množství. Detektor následně poskytuje signál, který je zaznamenán v počítači (Yates, 2004).

V současné době existuje několik typů detektorů, které se liší především na základě samotného hmotnostního spektrometru. Charakteristické vlastnosti ideálního detektoru jsou různé, všechny se však musí vyznačovat vysokou citlivostí. Mezi nejběžnější detektory řadí Faradayův detektor a elektronový násobič (Koppelaar *et al.*, 2005).

3.2.6 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Samotná hmotnostní spektrometrie neposkytuje informace o struktuře iontů. Při analýze peptidů a proteinů jsou informace o sekvenci aminokyselin velmi žádoucí. Byly tedy vyvinuty přístroje schopné tuto informaci poskytnout. Obecně se tato oblast MS nazývá tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Při MS/MS analýze jsou konkrétní prekurzorové ionty izolovány, podrobeny fragmentaci a následně vzniklé fragmenty jsou analyzovány dle jejich m/z hodnot (Yates, 2004).

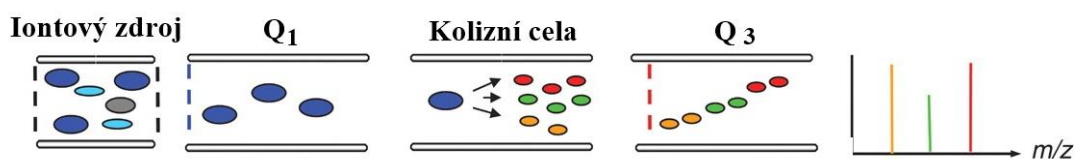
Tandemová hmotnostní spektrometrie existuje ve dvou formách uspořádání, v prostoru a čase. V prvním případě probíhá izolace a fragmentace na stejném místě. Příkladem je LIT a FT-ICR. Naopak zařazením kombinace dvou a více analyzátorů probíhá tzv. tandem v čase. V prvním analyzátoru je ion o požadované hodnotě m/z izolován. Tento tzv. prekurzorový ion pokračuje do kolizní cely, kde dochází k jeho fragmentaci a výsledný produktový ion je analyzován v druhém analyzátoru. Jedná se o tzv. hybridní hmotnostní spektrometry, které kombinují např. dva kvadrupóly (QqQ), dva analyzátory doby letu (TOFqTOF), kvadrupól s analyzátozem doby letu (QqTOF) či kvadrupól s Orbitrapem.

Fragmentace iontů je nejčastěji uskutečněna nízko-energetickou metodou tzv. kolizně indukovanou disociací (CID). Samotná reakce probíhá v kolizní cele (případně v iontové pasti), do které je obvykle přiváděn plyn (např. argon). Dochází ke srážkám prekurzorových iontů s molekulami kolizního plynu, což způsobí energetickou excitaci a následně dochází k fragmentaci. V případě peptidů a proteinů dochází k štěpení peptidové vazby a jsou produkovány ionty typu y - a b - (Griffiths *et al.*, 2001).

3.2.6.1 Trojitý kvadrupól

Jedná se o velmi využívaný hybridní hmotnostní spektrometr v souvislosti s kvantitativní analýzou a to především pro jedinečnou schopnost pracovat v skenovacím režimu „monitorování vybraných reakcí“ (SRM). Jak napovídá název, QqQ je tvořen třemi za sebou spojenými kvadrupóly. První (Q_1) a třetí (Q_3) pracují jako analyzátoři, zatímco prostřední jako kolizní cela (q). V kolizní cele jsou ionty fragmentovány pomocí CID fragmentace. Trojitý kvadrupól může dle potřeby pracovat ve čtyřech skenovacích režimech:

1. **Sken produktových iontů** (Obr. 9) pracuje tak, že Q_1 vybere prekurzorový ion o specifické hodnotě m/z , který je následně fragmentován v kolizní cele. Vzniklé produktové ionty jsou analyzovány v Q_3 a zaznamenány na detektoru. Výsledkem je získání fragmentačního spektra vybraného iontu. Využívá se především k identifikaci látek nebo konkrétně k zjištění aminokyselinové sekvence peptidů.



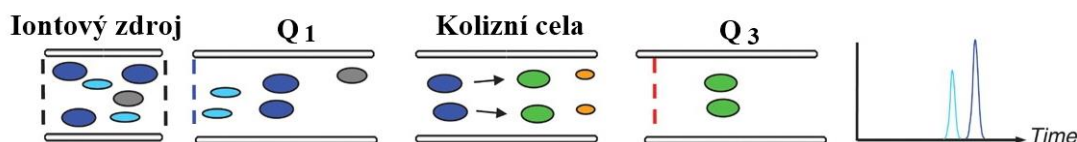
Obr. 9: Sken produktových iontů
(převzato a upraveno dle Domon *et* Aebersold, 2006).

2. **Sken prekurzorových iontů** (Obr. 10) je založen na principu opačném, kdy Q_1 propouští všechny prekurzorové ionty, které jsou následně fragmentovány. Q_3 pak vybere pouze jeden ion o specifické hodnotě m/z , který je detekován. Obvykle se tato metoda používá např. k detekci funkčních skupin peptidů ve vzorku.



Obr. 10: Sken prekurzorových iontů
(převzato a upraveno dle Domon *et* Aebersold, 2006).

3. **Sken neutrální ztráty** (Obr. 11) pracuje na principu synchronizovaného skenování Q_1 a Q_3 tak, že hmotnostní rozdíl procházejících iontů zůstává konstantní. Tento rozdíl odpovídá fragmentu, který se ztratil z peptidového iontu v kolizní cele. Metoda se opět uplatňuje např. při detekci peptidů ve vzorku obsahující konkrétní funkční skupinu.



Obr. 11: Sken neutrální ztráty
(převzato a upraveno dle Domon *et* Aebersold, 2006).

4. **Monitorování vybraných reakcí** (Obr. 12) (SRM) je vysoce selektivní a citlivá metoda hmotnostní spektrometrie pro přesnou kvantifikaci nízkých hladin proteinů v komplexních směsích a zároveň pro charakterizaci modifikací peptidů. V principu probíhá tak, že Q_1 vybere prekurzorový ion, který je v kolizní cele fragmentován. V Q_3 je poté vybrán jeho produktový ion. Několik takových iontových párů (prekurzor-fragment) se označuje jako tzv. SRM přechody (Domon *et* Aebersold, 2006).



Obr. 12: Monitorování vybraných reakcí
(převzato a upraveno dle Domon *et* Aebersold, 2006).

3.3 Kvantitativní proteomické přístupy

Studium kvantitativních rozdílů mezi dvěma a více fyziologickými stavy v buňce, tkáni či organismu patří mezi nejdůležitější cíle v proteomické analýze (Bantscheff *et al.*, 2007). Kvantitativní proteomika umožňuje měření těchto změn a stala se tak účinným nástrojem pro porozumění základním procesům a mechanismům v biologickém systému. Hraje důležitou roli v nalezení nových diagnostických a prognostických biomarkerů (Tao *et al.*, 2003). Biomarkery jsou proteiny nebo jiné molekuly, které se odlišně exprimují či podléhají modifikacím při určitém metabolickém stavu. Identifikace a kvantifikace těchto biomarkerů poskytuje důležité informace při prognóze a diagnóze onemocnění (Iliuk *et al.*, 2009).

Analýza pomocí hmotnostní spektrometrie sama o sobě poskytuje pouze kvalitativní výsledky. Vznikly tedy nové efektivní metody, které umožňují sledovat také kvantitativní zastoupení jednotlivých složek ve směsi (Ong *et al.*, 2002). Většina z těchto metod využívá značení stabilními izotopy, které vytvoří specifickou hmotnostní značku. Tato značka je rozpoznána hmotnostním spektrometrem a současně slouží ke kvantifikaci. V principu se spoléhá na to, že stabilní izotopicky značený peptid je po chemické stránce stejný jako neznačený a tak se oba peptidy chovají během LC analýzy identicky. Hmotnostní rozdíly mezi oběma peptidy jsou následně pomocí hmotnostní spektrometrie rozpoznány a kvantifikace se provádí porovnáním příslušných intenzit signálů (Bantscheff *et al.*, 2007). Bylo vyvinuto několik strategií, které se odlišují na základě způsobu zavádění izotopu do peptidu či proteinu. Stabilní izotopickou značku lze zavést chemickou reakcí, enzymaticky nebo metabolicky (Ong *et al.*, 2005).

V kontrastu k výše zmíněným metodám existuje odlišný přístup ke kvantitativní analýze a to zcela bez značení (label-free). Tento přístup je například založen na porovnání naměřeného signálu dané látky ve vzorcích, který odpovídá jejich koncentraci (Wang *et al.*, 2003).

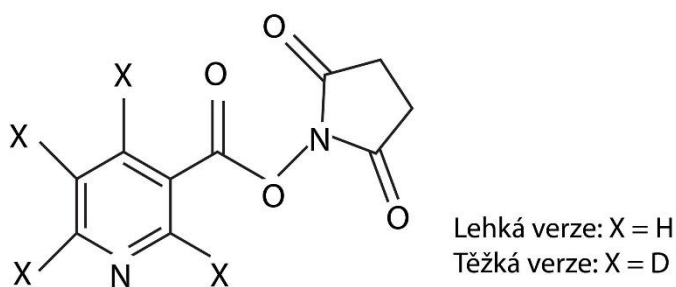
3.3.1 Chemické značení

Kvantifikace využívající chemického značení se řadí k nejvíce rozšířené metodě v rámci současné proteomiky. Existuje mnoho možností, jak selektivně zavést pomocí chemické reakce izotopickou značku na požadované místo v peptidu či proteinu (Iliuk *et al.*, 2009).

Jako jedna z prvních byla představena metoda nesoucí název „isotope-coded affinity tag“ (ICAT). Činidlo ICAT se skládá ze tří funkčních částí: reaktivní skupiny se specificitou vůči cysteinu, izotopicky značeného linkeru a afinitní značky pro izolaci značených proteinů. ICAT existuje ve dvou formách, těžké a lehké. V principu se jedná o zavedení izotopicky lehké formy činidla do jednoho vzorku a těžké formy do druhého. Následně se oba vzorky smíchají a enzymaticky štěpí na peptidy. Značené peptidy (pouze peptidy obsahující cystein s navázaným činidlem) se izolují pomocí afinitní chromatografie s následnou analýzou pomocí LC-MS. Kvantifikace je provedena na základě poměru intenzity naměřeného signálu obou forem peptidů (Gygi *et al.*, 1999).

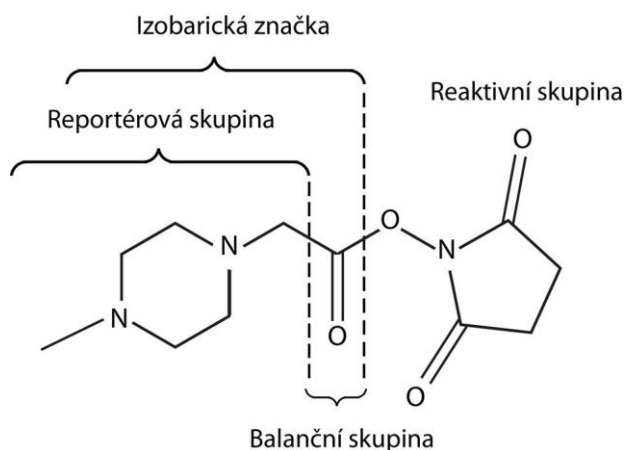
Další metody založené na cíleném značení N-konce peptidů a ϵ -amino skupinou lysinových zbytků jsou „isotope-coded protein label“ (ICPL) a „isotope tags for relative and absolute quantification“ (iTRAQ) (Bantscheff *et al.*, 2007).

Metoda ICPL je založená na značení všech volných aminoskupin ve vzorku proteinu izotopicky odlišným činidlem, N-nikotinoyloxysukcimidem (Nic-NHS). Jeden vzorek se izotopicky označí jeho těžkou (d4) formou a druhý jeho lehkou (d0) formou (Obr. 13). Po smíchání se vzorky enzymaticky štěpí a následně analyzují pomocí LC-MS. Z poměru intenzit těchto sesterských peptidových párů se stanoví množství proteinů v původním vzorku. Touto metodou je možné analyzovat dva nebo i tři vzorky zároveň. Další výhodou spočívá v kompatibilitě se všemi separačními metodami (Schmidt *et al.*, 2005).

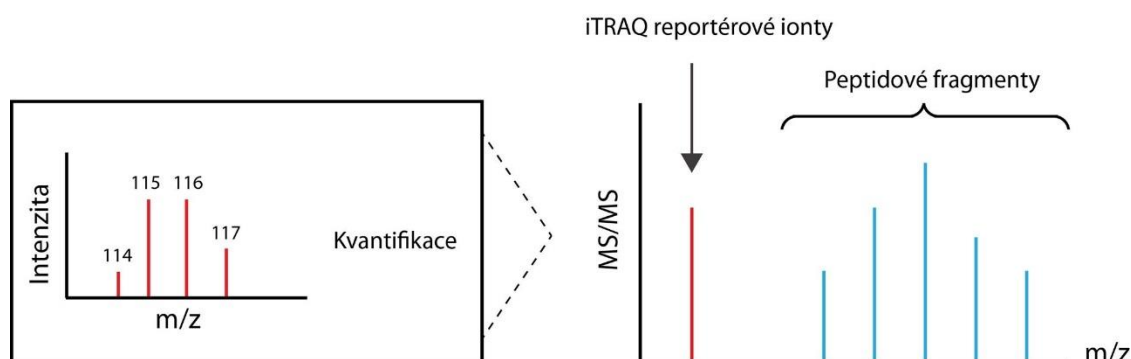


Obr. 13: Struktura molekuly N-nikotinoyloxysukcimidinu (vytvořeno dle Schmidt *et al.*, 2005).

Za vůbec nejrozšířenější se považuje metoda iTRAQ, která pracuje na principu izobarického značení. Činidlo iTRAQ je složeno z reaktivní skupiny (ester NHS), balanční skupiny a reportérové skupiny (Obr. 14). Po zavedení do vzorku se činidlo přes reaktivní skupinu váže na všechny volné aminoskupiny peptidu a naznačí je. Vytvořená značka je izobarická díky odlišnému rozdělení izotopů mezi balanční a reportérovou skupinou při zachování konstantní hmotnosti. Vzorky označené izobaricky odlišnou značkou jsou smíchány a podrobeny LC-MS analýze. Výsledkem fragmentace peptidů je odštěpení značek, kdy dojde k přirozené ztrátě balanční skupiny. Naopak reportérová skupina nesoucí náboj je analyzována. Kvantifikace je provedena porovnáním naměřených intenzit těchto tzv. reportérových iontů (Obr. 15) (Unwin *et al.*, 2005). Velká výhoda této metody v dnešní době spočívá v možnosti analyzovat až osm vzorků současně (Pottiez *et al.*, 2012).



Obr. 14: Chemické složení činidla iTRAQ (vytvořeno dle Ross *et al.*, 2005).

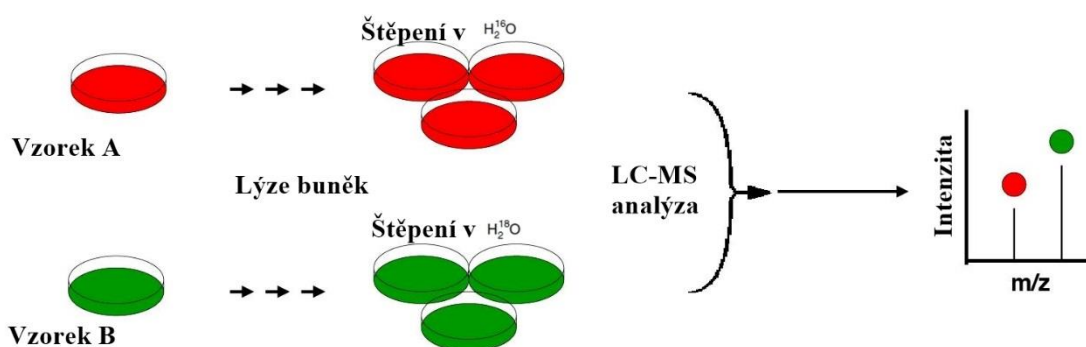


Obr. 15: Kvantifikace metody iTRAQ (vytvořeno dle Gingras *et al.*, 2007).

3.3.2 Enzymatické značení

Jinou z možností jak zavést stabilní izotopickou značku do proteinu nebo peptidu, je za účasti enzymu. Využívají se nejčastěji trávicí enzymy jako například trypsin, chymotrypsin či Glu-C. Nejlepší volbu zastává trypsin, které má schopnost tvořit peptidy o stejné hmotnosti, což usnadňuje MS analýzu.

Jedna z metod enzymatického značení je založená na navázání dvou atomů kyslíku z rozpouštědla na C-konec každého z peptidů během proteolytického štěpení trypsinem. Tato metoda (Obr. 16) umožňuje kvantitativně porovnávat dva vzorky, kde jeden je štěpen ve vodě obsahující ^{18}O a druhý ve vodě obsahující ^{16}O . Po smíchání jsou vzorky analyzovány pomocí LC-MS. Začlenění dvou atomů ^{18}O způsobí hmotnostní posun o 4 Da (Iliuk *et al.*, 2009). Hlavní nevýhodou této metody je možnost začlenění pouze jednoho atomu kyslíku, kdy posun o 2 Da není dostatečný pro kvantifikaci. Řešením je prodloužení doby inkubace při proteolytickém štěpení (Ong *et Mann*, 2005).



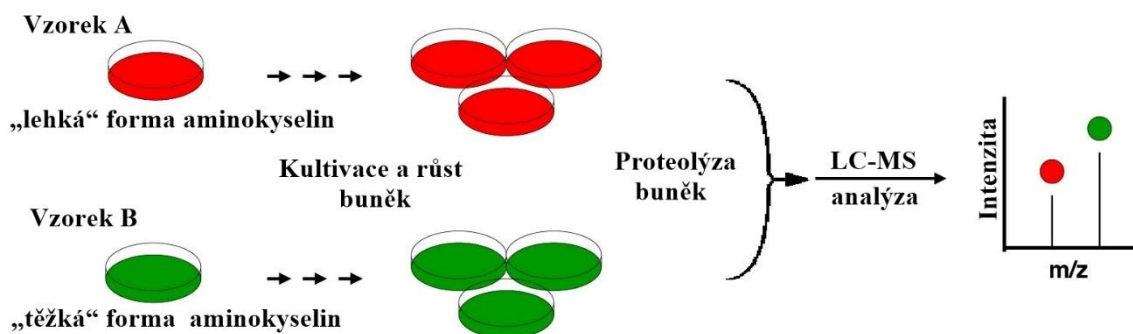
Obr. 16: Schéma kvantitativní analýzy metodou proteolytického značení (převzato a upraveno dle Iliuk *et al.*, 2009).

3.3.3 Metabolické značení

Kromě výše zmíněných, existuje ještě možnost metabolického značení, kdy je izotopická značka zavedena do každého proteinu během růstu a dělení buňky. Toho je dosaženo kultivováním živých buněk na médiu, které tuto izotopickou značku obsahuje. Metoda je známá pod názvem „stable isotope labeling by amino acids in cell culture“ (SILAC) a umožňuje začlenění izotopicky značených aminokyselin do všech proteinů *in vivo* (Ong *et al.*, 2002).

Princip metody SILAC (Obr. 17) spočívá v kultivování jedné populace buněk na médiu, obsahující normální („lehkou“) formu esenciálních aminokyselin. A zároveň je kultivována druhá populace buněk na médiu obsahující izotopicky značenou („těžkou“) formu aminokyselin (Guerrera *et* Kleiner, 2005). Značení je dosaženo nejčastěji použitím těžkých izotopů ^2H , ^{13}C nebo ^{15}N (Iliuk *et al.*, 2009). Nejpoužívanější aminokyseliny jsou lysin a arginin, které po štěpení trypsinem vytváří komplexní směsi obsahující všechny (s výjimkou C-konce) peptidy značené. Po začlenění izotopu do buněk se oba vzorky smíchají, zpracují a následně analyzují pomocí LC-MS. Kvantifikace je dosaženo porovnáním naměřených intenzit značeného a neznačeného peptidu ve hmotnostním spektru (Geiger *et al.*, 2011).

Hlavní výhodou metody SILAC je minimalizace manipulačních kroků, a tedy snížení možných chyb během přípravy pokusu. Navíc rozsah začlenění je prakticky 100 % a tak nejsou rozdíly v účinnosti značení mezi vzorky. Jako další výhodu lze uvést, že při vhodně navržené kombinaci značení aminokyselin lze kvantitativně rozlišit tři a více vzorků najednou. Obecně se tedy jedná o jednoduchou, cenově přijatelnou metodu, která zároveň poskytuje přesná data a může být využita pro kvantitativní analýzu jakéhokoli buněčného systému (Ong *et al.*, 2002).



Obr. 17: Schéma kvantitativní analýzy metodou SILAC (převzato a upraveno dle Iliuk *et al.*, 2009).

3.3.4 Metody kvantifikace bez značení

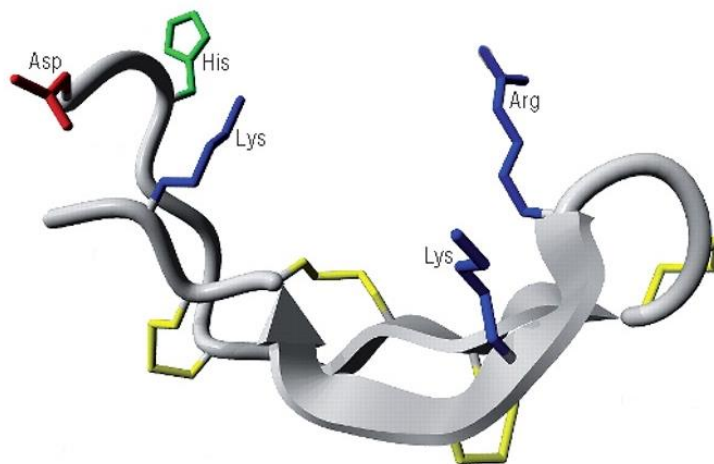
Metody s izotopickým značením se obecně považují za přesnější, ale potýkají se i s jistými nevýhodami. Jedná se především o vysokou cenu izotopických značek, potřebu specifického softwaru a odborné znalosti pro následnou analýzu dat (Neilson, 2011). Zkoumání jiných možností vedlo k nalezení metod kvantifikace bez použití izotopického značení. Jedná se o metody založené na porovnání změn naměřeného signálu, odpovídající koncentraci, v jednom vzorku vzhledem ke druhému (Wang *et al.*, 2003). Tyto metody se dělí do dvou skupin, kdy se porovnává buď **plocha píku pod křivkou** (AUC) nebo **počet získaných spekter** (spectral counting) (Neilson, 2011).

U první skupiny bylo prokázáno, že plocha peptidových píků získaná pomocí LC-MS analýzy je v korelaci s koncentrací daného proteinu (Chelius *et Bondarenko*, 2002). Spektrální počítání je naopak založeno na zjištění, že čím více konkrétního proteinu je obsaženo ve vzorku, tím získáme větší počet peptidových spekter z tohoto proteinu. Relativní kvantifikace je dosaženo porovnáním počtů spekter mezi sadou experimentů (Bantscheff *et al.*, 2007). Přímá kvantifikace bez izotopového značení nabízí výhody především v nízkých nákladech a jednodušším zpracování vzorků (Wang *et al.*, 2003).

3.4 Hepcidin

Hepcidin je v hepatocytech syntetizovaný peptidový hormon, který hraje ústřední roli při regulaci homeostázy železa (Fe) v lidském organismu. Poprvé byl identifikován v roce 2000 z ultrafiltrátu lidské plazmy a byl pojmenován jako „liver-expressed antimicrobial peptide“ (LEAP-1). Přibližně ve stejnou dobu se podařilo hepcidin identifikovat také v lidské moči. Pro jeho jaterní původ a baktericidní účinky byl označen jako hepcidin. Probíhající studie na ovlivnění hladiny hepcidinu u lidí poskytují informace o příčinách vzniku poruch homeostázy železa. Cílem těchto studií je vytvořit nové terapeutické strategie a zlepšit diagnostické protokoly (Kemna *et al.*, 2008).

Hepcidin je tvořený 25 aminokyselinami. V prostoru zaujímá tvar vlásenky s deformovaným β skládaným listem. Celá molekula je stabilizována čtyřmi disulfidickými můstky (Obr. 18). Lidský gen pro hepcidin se nachází na chromozomu 19q13.1 a kóduje prekursorový proteinu s názvem preprohepcidin, který je složený z 84 aminokyselin (Kemna *et al.*, 2008). Po dvou-stupňovém enzymatickém štěpení na C-konci prekursoru v cytosolu hepatocytu vzniká biologicky aktivní formu hepcidinu (hepcidin-25). Aktivní forma je poté sekretována dle potřeby do krevního oběhu, kde se váže na přenašeč β 2-makrogloblin. Hepcidin je filtrován v glomerulu a následně vylučován močí (Maule, 2013). Kromě hepcidinu-25 byly v lidské moči identifikovány jeho dvě izoformy, hepcidin-20 a hepcidin-22 (Park *et al.*, 2001).



Obr. 18: 3D struktura biologicky aktivního hepcidinu-25 (převzato a upraveno dle Kemna *et al.*, 2008).

Regulační funkce hepcidinu byla potvrzena na myší studii. Myši (USF-2 knock-out) byly zbaveny genu kódující hepcidin a došlo u nich k závažným stavům z přetížení železem. V jiné studii byly zkoumány geneticky upravené myši za účelem nadměrné syntézy hepcidinu. Většina transgenních zvířat zemřela brzy po narození, pravděpodobně v důsledku závažné formy anemie (Nicolas *et al.*, 2002). Ve výsledku tyto dvě studie prokázaly, že nedostatek hepcidinu je spojen s nadbytkem železa v organismu, a zároveň jeho nadměrná exprese souvisí s fatálním nedostatkem železa. Byla potvrzena hypotéza, že hepcidin funguje jako negativní regulátor hladiny železa v organismu (Maule, 2013). Jakékoliv patofyziologické situace vedoucí ke změně hladiny hepcidinu předpovídají vznik stavu z přetížení nebo naopak s nedostatek hladiny železa v organismu. Od doby jeho objevu a objasnění jeho funkce byl hepcidin navržen jako slibný diagnostický marker onemocnění souvisejících s poruchou homeostázy železa (Galesloot *et al.*, 2011).

Účast hepcidinu na regulaci homeostázy železa je zprostředkována jeho vazbou na ferroportin. Ferroportin je membránový protein, který je jediný známý exportér železa z buněk skládající zásoby železa (enterocyty, makrofágy, hepatocyty). Po navázání hepcidinu na ferroportin dojde k internalizaci a degradaci vzniklého komplexu, což vede k neschopnosti buněk exportovat železo z buněk do extracelulárního prostoru (Nemeth *et al.*, 2004).

Syntéza hepcidinu je regulována několika protichůdnými signály. Zvýšená hladina železa a zánětlivý stav syntézu hepcidinu podněcují. V opačném případě nedostatek hladiny železa, erythropoéza a hypoxie syntézu snižují. Tato regulace probíhá na úrovni transkripce (Hentze *et al.*, 2010). Hpcidin není jen regulačním hormonem, ale také zastává důležitou roli v obraně organismu v průběhu infekce a zánětu. Nezávisle na stavu hladiny železa a erythropoézy, dochází v průběhu akutního zánětu k jeho zvýšené syntéze. Syntézu hepcidinu v tomto případě indukuje cytokinin interleukin-6 (IL-6).

Nadměrná produkce hepcidinu se jeví jako patogenní znak provázející například anémií chronických chorob (ACD). Naopak snížená produkce hepcidinu je zodpovědná za většinu případů dědičné hemochromatózy (HH). Přesné stanovení koncentrace hepcidinu v séru nebo moči se jeví jako slibný nástroj v diagnostice onemocnění související s poruchou homeostázy železa (Ganz, 2006).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

- Syntetizovaný standard Hecpidinu-25 se čtyřmi disulfidickými vazbami, sekvence: DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCCKT (Thermo Scientific, USA)
- Syntetizovaný izotopicky značený standard Hecpidinu-25 se čtyřmi disulfidickými vazbami, [¹³C₉, ¹⁵N₁]-Phe₄-Hecpidin-25 (Thermo Scientific, USA)
- Metanol pro LC-MS (MeOH, Merck, Německo)
- Kyselina mravenčí pro LC-MS (FA, Sigma-Aldrich, Německo)
- Acetonitril pro LC-MS (ACN, Sigma-Aldrich, Německo)
- Milli-Q voda (Merck, Německo)

4.1.2 Přístrojové vybavení

- Kapalinový chromatograf: UltiMate 3000 RSLCnano System (Thermo Scientific, USA)
- Separační kolona: Kinetex 2.6 μm, C18, 100 Å, 100 x 2.1 mm (Phenomenex, USA)
- Separační kolona: Polaris C18 - A, 180 Å, 75 x 2.1 mm (Agilent Technologies, USA)
- Hmotnostní spektrometr: QTRAP 5500 (AB Sciex, USA)
- Výrobník Milli-Q vody: Direct-Q 3 UV Water Purification System (Merck, Německo)
- Třepačka Vortex (Eppendorf, Německo)

4.1.3 Software

- Program pro ovládání LC: Chromeleon Express 7.2 (Thermo Scientific, USA)
- Program pro ovládání LC-MS: Analyst 1.5.1 (AB Sciex, USA)

4.2 Optimalizace MS (SRM) podmínek

4.2.1 Příprava roztoků

Příprava ředící směsi

Pro ředění zásobního roztoku standardu byla připravena ředící směs o složení 50 % (v/v) ACN s 0,1 % (v/v) FA (1 ml ACN + 998 μ l H₂O + 2 μ l FA). Ředící směs byla před použitím promíchána na vortexu.

Příprava roztoků hepcidinu-25 a [¹³C₉, ¹⁵N₁]-Phe₄-hepcidin-25 pro optimalizaci SRM metody

K dispozici byl zásobní roztok syntetizovaného standardu hepcidinu-25 o koncentraci 100 μ g/ml. Z tohoto roztoku byl vytvořen pracovní roztok o koncentraci 10 ng/ml (1ml). Stejným způsobem byl připraven izotopicky značený [¹³C₉, ¹⁵N₁] - Phe₄ - hepcidin-25. Oba roztoky byly před použitím promíchány na vortexu.

4.2.2 Postup optimalizace MS metody

Hmotnostní spektrometr byl nastaven v konfiguračním módu využívající hmotnostní spektrometr QTRAP 5500 a syringe pumpu. Před použitím byla hamiltonka (1 ml) a použitá kapilára (PEEK (red) Tubing) promyta několikrát pomocí 50 % (v/v) ACN. Pracovní roztok standardu byl nabrán do hamiltonky, která byla poté pomocí spojky a kapiláry připojena k iontovému zdroji (Turbo VTM Source). Na syringe pumpu byla přichycena hamiltonka a byl nastaven průtok 10 μ l/min. Na iontovém zdroji byly nastaveny tyto podmínky: CUR 20, IS 5500 V, TEM 0, GS1 14, GS2 0.

Pro získání MS spektra studované látky byl hmotnostní spektrometr nastaven na skenovací režim Q1 MS (Q1), v pozitivním módu, se skenovací rychlostí 200 Da/s a v rozsahu hmot od 300 do 1250 Da. Hodnota deklasterizačního potenciálu (DP) byla 180 V a EP 10 V. Po ustálení signálu bylo změřeno a uloženo MS spektrum hepcidinu-25. Stejným způsobem bylo získáno i MS spektrum izotopicky značeného [¹³C₉, ¹⁵N₁] - Phe₄ - hepcidin-25.

Pro získání MS/MS spektra studované látky pracoval hmotnostní spektrometr ve skenovacím režimu Product Ion (MS2), v pozitivním módu, se skenovací rychlostí

1000 Da/s a v rozsahu hmot od 300 do 1250 Da. Hodnota DP byla 180 V a EP 10 V. Bylo změřeno a uloženo MS/MS spektrum hepcidinu-25. Stejným způsobem bylo získáno i MS/MS spektrum izotopicky značeného [$^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_1$] - Phe₄ - hepcidin-25.

Pro získání SRM metody studované látky bylo použito automatické optimalizace v programu Analyst 1.5.1. Program vybral čtyřnásobně nabitý prekurzorový ion hepcidinu, který byl poté fragmentován na produktové ionty. Při optimalizaci byl naladěn deklasterizační potenciál (DP), kolizní energie (CE) a výstupní potenciál na kolizní cele (CXP). Potenciály těchto parametrů iontové optiky byly postupně zvyšovány a snižovány za účelem získání maximální intenzity signálů pro prekurzor a jeho produktových iontů.

4.3 Optimalizace podmínek na LC

4.3.1 Příprava roztoků

Mobilní fáze

Pro chromatografii byly připraveny dvě mobilní fáze: Mobilní fáze A byla složena z 0,1 % (v/v) FA ve H₂O; Mobilní fáze B byla složena z 99,9 % (v/v) ACN s 0,1 % (v/v) FA.

Ředící směs

Pro ředění zásobního roztoku standardu byla připravena ředící směs o složení 5 % (v/v) ACN s 0,1 % (v/v) FA (100 μl ACN + 1898 μl H₂O + 2 μl FA). Ředící směs byla před použitím promíchána na vortexu.

Roztoky standardu hepcidinu-25 pro optimalizaci nástřikového objemu

Byla připravena řada standardů o koncentracích 0,5; 1,0; 2,0; 10,0 ng/ml smícháním příslušného množství standardu hepcidinu-25 a ředící směsi podle tabulky (Tab. 1). Koncentrace každého roztoku byla přizpůsobena tomu, aby po nástřiku různého objemu analytu bylo v systému stejné množství hepcidinu-25 (10 ng). Roztoky byly před použitím promíchány na vortexu a byly přeneseny na 96 jamkovou destičku pro následnou LC-MS analýzu.

Tab. 1: Příprava řady roztoků standardu hepcidinu-25 pro optimalizaci nástřikového objemu.

Koncentrace roztoku standardu [ng/ml]	Objem standardu hepcidinu-25 [μ l]	Objem ředící směsi [μ l]	Výsledný objem [μ l]
10	20	180	200
2	5	245	250
1	3,5	346,5	350
0,5	2,5	497,5	500

Příprava roztoku standardu hepcidinu-25 pro nalezení optimálního nastavení LC gradientu

Pro nalezení optimálního LC gradientu (získání maximální intenzity LC-MS signálu) byl připraven roztok standardu hepcidinu-25 o koncentraci 0,5 ng/ml (1,8 ml). Roztok byl před použitím promíchán na vortexu a nakonec byl alikvotován po 300 μ l do 6 pozic na 96 jamkovou destičku pro následnou LC-MS analýzu.

Příprava roztoků standardu hepcidinu-25, u kterých bylo různé procentuální zastoupení ACN a FA, pro nalezení optimálního složení ředící směsi pro LC-MS analýzu

Ředící směs o objemu 1 ml byla připravena smícháním ACN, vody a FA podle rozpisu v tabulce (Tab. 2). Bylo připraveno 9 roztoků pro analýzu o objemu 200 μ l a výsledné koncentraci 0,5 ng/ml hepcidinu-25. Roztoky byly před použitím promíchány na vortexu a přeneseny na 96 jamkovou destičku pro následnou LC-MS analýzu.

Tab. 2: Rozpis přípravy ředící směsi pro objem 1 ml.

Pokus	ACN [%]	Objem ACN [μ l]	Objem vody [μ l]	FA [%]	Objem FA [μ l]
1	3	30	970	0,05	0,5
2	15	150	850	0,05	0,5
3	3	30	970	0,5	5
4	15	150	850	0,5	5
5	3	30	970	0,275	2,75
6	15	150	850	0,275	2,75
7	9	90	910	0,05	0,5
8	9	90	910	0,5	5
9	9	90	910	0,275	2,75

4.3.2 Postup optimalizace na LC

Při optimalizaci LC podmínek byly porovnávány dvě analytické kolony, byl optimalizován nástřikový objem vzorku, byl optimalizován LC gradient a nakonec bylo optimalizováno složení nástřikové směsi.

V první části LC optimalizace bylo provedeno srovnání dvou analytických kolon a zároveň byl optimalizován nástřikový objem vzorku. Pro srovnání byly vybrány kolony: Kinetex (2.6 μm , C18, 100 \AA , 100 x 2.1 mm) a Polaris (C18 - A, 180 \AA , 75 x 2.1 mm). Pro separaci byly použity: mobilní fáze A (0.1 % FA v H_2O) a mobilní fáze B (0,1 % FA v ACN). Byl nastaven průtok mobilní fáze na 0,2 ml/min. Na začátku gradientu bylo použito 10 % B po dobu 1,5 minuty, poté bylo složení mobilní fáze postupně zvyšováno až na 100 % B po dobu 3,5 minut, kolona byla vymyta 100 % B po dobu 0,5 minut a nakonec byla kolona ekvilibrována 10 % B po dobu 2 minut. Na každou kolonu byly ve třech opakováních postupně nastříknuty čtyři různé objemy 1, 5, 10 a 20 μl , přičemž množství nastříknutého analytu bylo vždy stejné (10 ng hepcidinu-25).

V druhé části optimalizace byl optimalizován gradient pouze na koloně Polaris. Bylo navrženo celkem deset různých gradientů, které se od sebe lišily počátečním (0. minuta), středním (2. minuta) a koncovým (4. minuta) složením mobilní fáze B (Tab. 3). Po gradientu byla kolona vymyta a ekvilibrována pro další analýzu. Pro každý gradient byly provedeny tři nástřiky 20 μl odpovídající 10 ng hepcidinu-25 na analytickou kolonu.

V poslední části optimalizace byl zkoumán vliv složení nástřikové směsi na intenzitu píku. Byly navrženy nástřikové směsi o různém procentuálním složení ACN a FA. Celkově bylo připraveno devět nástřikových směsí. Pro každou směs byly provedeny tři nástřiky 20 μl odpovídající 10 ng hepcidinu-25 na analytickou kolonu Polaris. V této části byl použit optimalizovaný gradient z předchozí optimalizace.

Změřená data byla prohlížena v programu Analyst 1.5.1., poté byly extrahovány a zpracovány v programu Microsoft Excel.

Tab. 3: Návrh rozložení gradientu pro optimalizaci. X1, X2 a X3 odpovídá procentu ACN (mobilní fáze B) na začátku, ve středu a na konci gradientu.

Pokus	X₁	X₂	X₃
1	10	30	60
2	20	30	60
3	10	50	60
4	20	50	60
5	10	30	80
6	20	30	80
7	10	50	80
8	20	50	80
9	10	40	70
10	20	40	70

5 VÝSLEDKY

5.1 Výsledky optimalizace MS (SRM) podmínek

Při optimalizaci MS podmínek bylo změřeno MS spektrum hepcidinu-25 (Obr. 19) a MS spektrum izotopicky značeného [$^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_1$]-Phe₄-hepcidin-25. Bylo také změřeno MS/MS spektrum hepcidinu-25 (Obr. 20) a MS/MS spektrum izotopicky značeného [$^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_1$]-Phe₄-hepcidin-25.

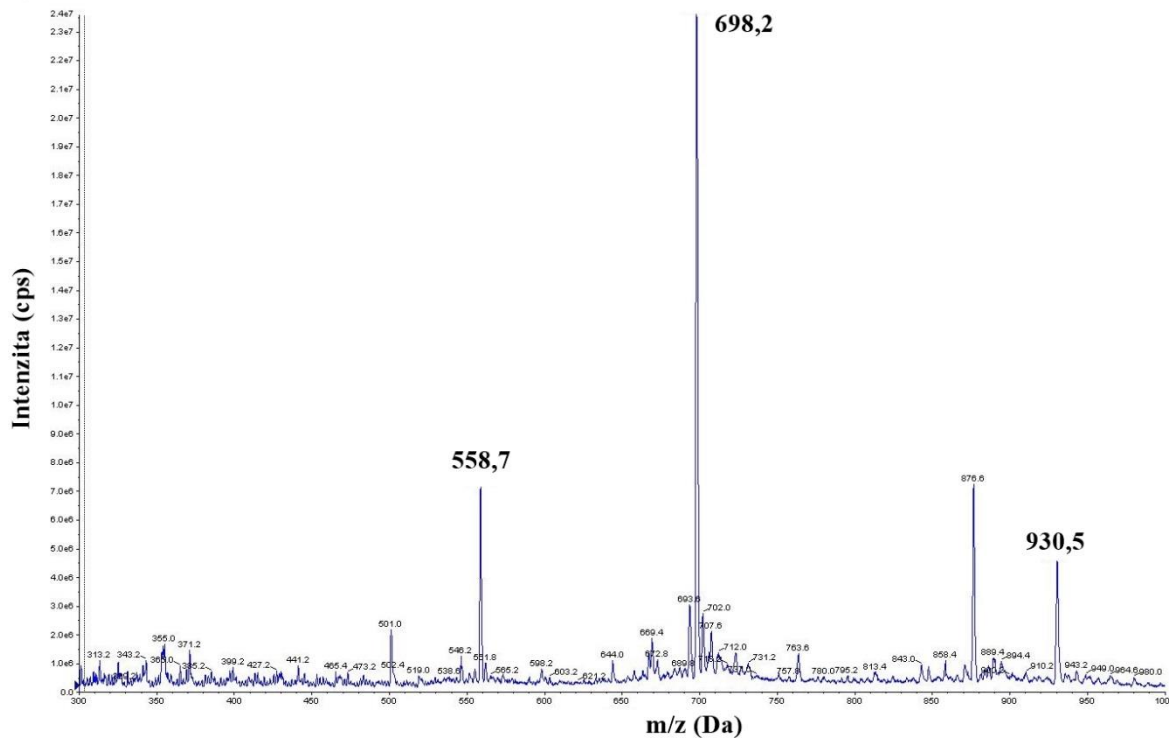
V MS spektru hepcidinu-25 byly pozorovány trojnásobně, čtyřnásobně a pětinásobně nabitě ionty o hodnotách m/z a DP uvedených v tabulce (Tab. 4). Při automatické optimalizaci v programu Analyst 1.5.1. byl pro fragmentaci vybrán nejintenzivnější čtyřnásobně nabitý prekurzorový ion hepcidinu-25 o hodnotě m/z 698,105 Da, který poskytl nejintenzivnější produktový ion o hodnotě m/z 354,1 Da (Tab. 5). Kolizní energie byla optimalizovaná na hodnotu 40 V. Izotopicky značený [$^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_1$]-Phe₄-hepcidin-25 poskytoval podobné výsledky.

Tab. 4: Prekurzorové ionty v MS spektru hepcidinu-25 a příslušný deklasterizační potenciál.

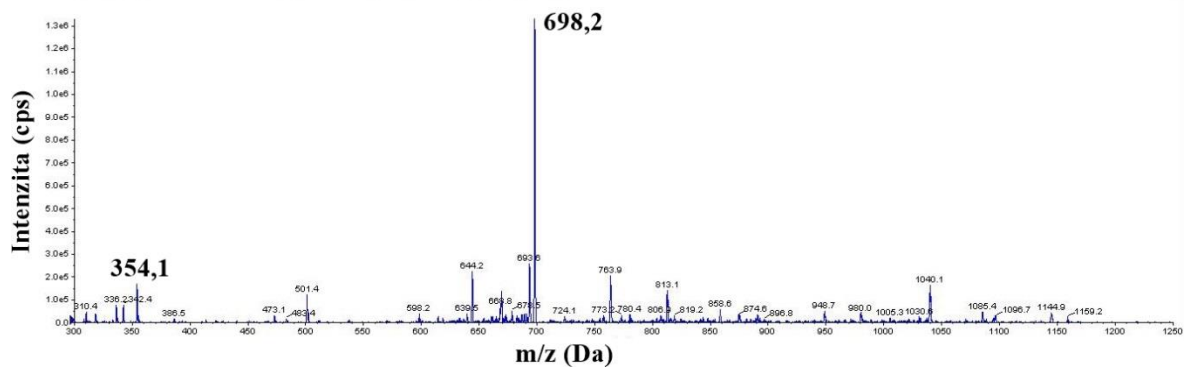
Ion	Q ₁ [Da]	DP [V]
[M+3H] ³⁺	930,5	236
[M+4H] ⁴⁺	698,2	131
[M+5H] ⁵⁺	558,7	96

Tab. 5: Nejintenzivnější produktový ion hepcidinu-25 v MS/MS spektru a příslušná kolizní energie.

Ion	Q ₁ [Da]	Q ₃ [Da]	CE [V]
[M+4H] ⁴⁺	698,2	354,1	40



Obr. 19: MS spektrum hepcidinu-25.



Obr. 20: MS/MS spektrum hepcidinu-25.

5.2 Výsledky optimalizace podmínek na LC

V první části LC optimalizace bylo provedeno srovnání dvou analytických kolon a zároveň byl optimalizován nástřikový objem vzorku. V tabulkách je uvedena změřená intenzita píků u třech replikátů a průměrná intenzita píku u čtyř různých nástřikových objemů při separaci na koloně Kinetex (Tab. 6) a při separaci na koloně Polaris (Tab. 7). Maximální intenzity píku ($3,47e4$) bylo dosaženo při nástřikovém objemu 1 μ l vzorku při separaci na koloně Polaris.

Tab. 6: Vliv nástřikového objemu vzorku na intenzitu píku při separaci na koloně Kinetex

Nástřikový objem vzorku [μ l]	Koncentrace roztoku [ng/ml]	Intenzita	Průměrná intenzita
1	10	1,8e4	1,8e4
1	10	1,8e4	
1	10	1,8e4	
5	2	2,1e4	2,03e4
5	2	2,0e4	
5	2	2,0e4	
10	1	2,0e4	2,07e4
10	1	2,1e4	
10	1	2,1e4	
20	0,5	1,4e4	1,47e4
20	0,5	1,5e4	
20	0,5	1,5e4	

Tab. 7: Vliv nástřikového objemu vzorku na intenzitu píku při separaci na koloně Polaris.

Nástřikový objem vzorku [μ l]	Koncentrace roztoku [ng/ml]	Intenzita	Průměrná intenzita
1	10	3,0e4	3,47e4
1	10	3,7e4	
1	10	3,7e4	
5	2	3,3e4	3,37e4
5	2	3,3e4	
5	2	3,5e4	
10	1	3,4e4	3,40e4
10	1	3,5e4	
10	1	3,3e4	
20	0,5	2,6e4	2,53e4
20	0,5	2,5e4	
20	0,5	2,5e4	

V druhé části optimalizace byl optimalizován gradient pouze na koloně Polaris. V tabulce (Tab. 8) je uvedena změřená intenzita píků a průměrná intenzita píku u 10 testovaných gradientů. Nejvyšší intenzity píku ($3,1e4$) bylo dosaženo při složení mobilní fáze B na počátku gradientu 10 %, ve středu 40 % a na konci 70 %. Při pokusech 2, 4, 6 a 8 nebyly zaznamenány ostré píky hepcidinu-25, což si vysvětlujeme malou strmostí testovaného gradientu.

Tab. 8: Vliv průběhu gradientu na intenzitě píku při separaci na koloně Polaris. X_1 , X_2 a X_3 odpovídá procentuálnímu složení mobilní fáze B na počátku (0. minuta), středu (2. minuta) a konci gradientu (4. minuta).

Pokus	X_1	X_2	X_3	Intenzita	Průměrná intenzita
1	10	30	60	1,4e4	1,63e4
				1,7e4	
				1,8e4	
2	20	30	60	-	-
3	10	50	60	2,4e4	2,47e4
				2,3e4	
				2,7e4	
4	20	50	60	-	-
5	10	30	80	2,0e4	1,97e4
				1,9e4	
				2,0e4	
6	20	30	80	-	-
7	10	50	80	2,8e4	2,97e4
				3,1e4	
				3,0e4	
8	20	50	80	-	-
9	10	40	70	3,1e4	3,1e4
				2,9e4	
				3,3e4	
10	20	40	70	1,09,e4	5,57e3
				0,57e4	
				0,58e4	

V poslední části optimalizace byl zkoumán vliv složení nástřikové směsi na intenzitu píku. V tabulce (Tab. 9) je uvedena naměřená intenzita píků a průměrná intenzita při různém složení nástřikové směsi. Největší intenzita píku ($3,57e4$) byla dosažena v případě nástřikové směsi obsahující 15 % ACN a 0,05 % FA.

Tab. 9: Vliv složení nástřikové směsi na intenzitě píku.

Pokus	ACN [%]	FA [%]	Intenzita	Průměrná intenzita
1	3	0,05	2,3e4	2,63e4
			2,7e4	
			2,9e4	
2	15	0,05	3,4e4	3,57e4
			3,7e4	
			3,6e4	
3	3	0,5	0,9e4	1,07e4
			1,18e4	
			1,14e4	
4	15	0,5	2,3e4	2,57e4
			2,7e4	
			2,7e4	
5	3	0,275	1,25e4	1,38e4
			1,4e4	
			1,5e4	
6	15	0,275	2,7e4	2,73e4
			2,5e4	
			3,0e4	
7	9	0,05	3,4e4	3,50e4
			3,6e4	
			3,5e4	
8	9	0,5	1,4e4	1,63e4
			1,6e4	
			1,9e4	
9	9	0,275	0,9e4	9,67e3
			1,0e4	
			1,0e4	

6 DISKUZE

Nadměrná nebo naopak snížená produkce hepcidinu v těle je zodpovědná za většinu onemocnění související s poruchou homeostázy železa. Přesné stanovení hladiny hepcidinu v séru nebo moči je proto důležité pro diagnostiku těchto poruch.

Jednou z možných metod pro stanovení hladiny hepcidinu v séru a v moči je metoda ELISA. Tato metoda je relativně dostupná, avšak nedokáže rozlišit různé izoformy hepcidinu. Metody založené na MS poskytují tedy přesnější výsledky. Detekce všech tří izoform v séru a moči byla již dříve provedena pomocí techniky SELDI-TOF MS. (Kemna *et al.*, 2008).

Cílem experimentální části práce bylo vyvinout metodu pro stanovení hladiny hepcidinu v séru pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Metoda byla optimalizovaná na základě publikace (Mansion *et al.*, 2011). Jako první byly optimalizovány MS (SRM) podmínky. Při automatické optimalizaci byl pro fragmentaci vybrán nejintenzivnější čtyřnásobně nabitý prekurzorový ion hepcidinu-25 o hodnotě m/z 698,105 Da, který poskytl nejintenzivnější produktový ion o hodnotě m/z 354,1 Da. Kolizní energie byla optimalizována na hodnotu 40 V. Izotopicky značený [$^{13}\text{C}_9$, $^{15}\text{N}_1$]-Phe₄-hepcidin-25 poskytoval podobné výsledky (Q1 700,6 Da; Q3 354,1 Da; CE 40 V).

Při optimalizaci LC podmínek byly nejdříve porovnávány dvě analytické kolony (Kinetex a Polaris) a zároveň byl optimalizován nástřikový objem vzorku. Maximální intenzity píku ($3,47 \times 10^4$) bylo dosaženo při nástřikovém objemu 1 μl vzorku při separaci na koloně Polaris. Dále byl optimalizován LC gradient. Při složení mobilní fáze B na počátku gradientu (0. minuta) 10 %, ve středu (2. minuta) 40 % na konci (4. minuta) 70 % bylo dosaženo nejvyšší intenzity píku ($3,1 \times 10^4$). V posledním kroku bylo optimalizováno složení nástřikové směsi, kdy byla dosažena největší intenzita píku ($3,57 \times 10^4$) v případě nástřikové směsi obsahující 15 % ACN a 0,05 % FA.

Optimalizovaná metoda je připravena pro validaci metody a k následnému měření reálných sérových vzorků pacientů s poruchou homeostázy železa.

7 ZÁVĚR

Práce byla zaměřena na vývoj a optimalizaci metody pro stanovení hladiny hepcidinu v séru a moči u pacientů trpící poruchou homeostázy železa pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

V teoretické části byla vypracována rešerše na téma proteomika, hmotností spektrometrie, přehled přístupů ke kvantitativní proteomické analýze a využití hepcidinu-25 jako diagnostického biomarkeru.

V experimentální části byla vyvinuta a optimalizována LC-MS metoda pro stanovení hladiny hepcidinu-25 v séru. Tato optimalizovaná metoda je připravena pro následnou validaci.

8 LITERATURA

Aebersold, R., Mann, M. (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422(6928): 198-207.

Amster, I. J. (1996): Fourier transform mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry* 31(12): 1325-1337.

Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., Kuster, B. (2007): Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry* 389(4): 101-1031.

Bradshaw, R. A., Burlingame, A. L. (2005): From proteins to proteomics. *Iubmb Life* 57(4-5): 267-272.

Busch, K. L. (1995): Desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 30(2): 233-240.

de Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007): *Mass spectrometry: Principles and Applications*. Third Edition. John Wiley and Sons Ltd, England.

Di Girolamo, F., Lante, I., Muraca, M., Putignani, L. (2013): The Role of Mass Spectrometry in the “Omics” Era. *Current organic chemistry* 17(23): 2891.

Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., Alice, M. D. (2003): Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics* 49(5): 2240-2249.

Domon, B., Aebersold, R. (2006): Mass spectrometry and protein analysis. *science* 312(5771): 212-217.

Downard, K. (2012): 1912: a Titanic year for mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry* 47: 1034–1039

Fenn, J. B. (2003): Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 42(33): 3871-3894.

- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246(4926): 64-71.
- Figeys, D., McBroom, L. D., Moran, M. F. (2001): Mass spectrometry for the study of protein-protein interactions. *Methods* 24(3): 230-239.
- Galesloot, T. E., Vermeulen, S. H., Geurts-Moespot, A. J., Klaver, S. M., Kroot, J. J., van Tienoven, D., Swinkels, D. W. (2011). Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood*, 117(25): e218-e225.
- Ganz, T. (2006): Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *ASH Education Program Book*, 2006(1): 29-35.
- Gaskell, S. J. (1997): Electrospray: principles and practice. *Journal of mass spectrometry* 32: 677-688.
- Geiger, T., Wisniewski, J. R., Cox, J., Zanivan, S., Kruger, M., Ishihama, Y., Mann, M. (2011): Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture as a spike-in standard in quantitative proteomics. *Nature protocols*, 6(2): 147-157.
- Gingras, A. C., Gstaiger, M., Raught, B., Aebersold, R. (2007). Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(8), 645-654.
- Graves, P. R., Haystead, T. A. (2002): Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(1): 39-63.
- Griffiths, J. (2008): A brief history of mass spectrometry. *Analytical chemistry* 80: 5678-683.
- Guerrera, I., Kleiner, O. (2005): Application of mass spectrometry in proteomics. *Bioscience reports* 25: 71-93.
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., Aebersold, R. (1999): Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature biotechnology* 17(10): 994-999.

- Hager, J. W. (2002): A new linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16(6): 512-526.
- Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B., Camaschella, C. (2010): Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142(1): 24-38.
- Ho, C. S., Lam, C. W. K., Chan, M. H. M., Cheung, R. C. K., Law, L. K., Lit, L. C. W., Tai, H. L. (2003): Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews* 24(1): 3.
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Graham Cooks, R. (2005): The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of mass spectrometry* 40(4): 430-443.
- Chelius, D., Bondarenko, P. V. (2002): Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of proteome research* 1(4): 317-323.
- Chmelík, J. (2005): Proteomický průvodce. *Chemické Listy* 99: 883-885.
- Iliuk, A., Galan, J., Tao, W. A. (2009): Playing tag with quantitative proteomics. *Analytical and bioanalytical chemistry* 393(2): 503-513.
- Karas, M., Bachmann, D., Hillenkamp, F. (1985): Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry*, 57(14): 2935-2939.
- Kemna, E. H., Tjalsma, H., Willems, H. L., Swinkels, D. W. (2008): Heparin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica*, 93(1): 90-97.
- Koppelaar, D. W., Barinaga, C. J., Denton, M. B., Sperline, R. P., Hieftje, G. M., Schilling, G. D., Iv, I. V. (2005): MS detectors. *Analytical chemistry* 77(21):418-A.
- Kroot, J. J., Tjalsma, H., Fleming, R. E., Swinkels, D. W. (2011): Heparin in human iron disorders: diagnostic implications. *Clinical chemistry* 57(12): 1650-1669.
- Lane, C. S. (2005): Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 62(7-8): 848-869.

- Makarov, A. (2000): Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical chemistry* 72: 1156–1162.
- Mann, M., Hendrickson, R. C., Pandey, A. (2001): Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual review of biochemistry* 70(1): 437-473.
- Mansion, F., Chiap, P., Houbart, V., Crommen, J., Servais, A. C., Fillet, M. (2011): Optimization of micro-HPLC peak focusing for the detection and quantification of low hepcidin concentrations. *Journal of separation science* 34(15): 1820-1827.
- March, R. E. (1997): An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 32(4): 351-369.
- Maule, W. (2013): Hepcidin. A Brief review. *Medical Technology SA* 27(1): 9-16.
- Munson, M. S. B., Field, F. H. (1966): Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction. *Journal of the American Chemical Society* 88(12): 2621-2630.
- Neilson, K. A., Ali, N. A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Haynes, P. A. (2011): Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 11(4): 535-553.
- Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Kaplan, J. (2004): Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306(5704): 2090-2093.
- Nguyen, S., Fenn, J. B. (2007): Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4): 1111-1117.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Vaulont, S. (2002). Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(7): 4596-4601.
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. (2002): Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics* 1(5): 376-386.

- Ong, S. E., Mann, M. (2005): Mass spectrometry–based proteomics turns quantitative. *Nature chemical biology* 1(5): 252-262.
- Palmblad, M., Tiss, A., Cramer, R. (2009): Mass spectrometry in clinical proteomics -from the present to the future. *PROTEOMICS-Clinical Applications* 3(1): 6-17.
- Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., Ganz, T. (2001): Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *Journal of biological chemistry* 276(11): 7806-7810.
- Patterson, S. D., Aebersold, R. H. (2003): Proteomics: the first decade and beyond. *Nature genetics* 33: 311-323.
- Pottiez, G., Wiederin, J., Fox, H. S., Ciborowski, P. (2012): Comparison of 4-plex to 8-plex iTRAQ quantitative measurements of proteins in human plasma samples. *Journal of proteome research* 11(7): 3774-3781.
- Scigelova, M., Makarov, A. (2006): Orbitrap mass analyzer–overview and applications in proteomics. *Proteomics*, 6(S2): 16-21.
- Schmidt, A., Kellermann, J., Lottspeich, F. (2005): A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* 5(1): 4-15.
- Tanaka, K. (2003): The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 42: 3860-3870.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T. (1988): Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2(8): 151-153.
- Tang, N., Tornatore, P., Weinberger, S. R. (2004): Current developments in SELDI affinity technology. *Mass spectrometry reviews* 23(1): 34-44.
- Tao, W. A., Aebersold, R. (2003): Advances in quantitative proteomics via stable isotope tagging and mass spectrometry. *Current opinion in biotechnology* 14(1): 110-118.
- Thomson. J. J. (1897): Cathode rays. *Philosophical Magazine* 44: 293.

Thomson, J. J. (1913): Bakerian Lecture: Rays of Positive Electricity. Proceedings of the Royal Society of London 89: 1-20.

Thorngate, J. H. (2006): Methods for analyzing phenolics in research. American journal of enology and viticulture 57: 269–279

Unwin, R. D., Pierce, A., Watson, R. B., Sternberg, D. W., Whetton, A. D. (2005): Quantitative proteomic analysis using isobaric protein tags enables rapid comparison of changes in transcript and protein levels in transformed cells. Molecular & cellular proteomics 4(7): 924-935.

Yamashita, M., Fenn, J. B. (1984): Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. The Journal of Physical Chemistry 88(20): 4451-4459.

Yates, J. R. (1998): Mass spectrometry and the age of the proteome. Journal of Mass Spectrometry 33(1): 1-19.

Yates, J. R. (2004): Mass spectral analysis in proteomics. Annual review of biophysics and biomolecular structure 33: 297–316.

Yates, J. R., Cociorva, D., Liao, L., Zabrouskov, V. (2006): Performance of a linear ion trap-Orbitrap hybrid for peptide analysis. Analytical chemistry 78(2): 493-500.

Wang, W., Zhou, H., Lin, H. U. A., Roy, S., Shaler, T. A., Hill, L. R., Becker, C. H. (2003): Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards. Analytical Chemistry 75(18): 4818-4826.

Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M. C., Yates, J. R. (2013). Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. Chemical reviews 113(4): 2343-2394.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3D	trojrozměrný
ACD	anemia of chronic disease (anémie chronických chorob)
APCI	atmospheric pressure chemical ionization (chemická ionizace za atmosférického tlaku)
APPI	atmospheric pressure photoionization ionization (fotoionizace za atmosférického tlaku)
AUC	area under the curve (plocha pod křivkou)
CI	chemical ionization (chemická ionizace)
CE	collision energy (kolizní energie)
CID	collision-induced dissociation (kolizně indukovaná disociace)
CXP	collision cell exit (výstupní potenciál kolizní cely)
DC	direct current (stejnoseměrný elektrický proud)
DP	declustering potential (deklasterizační potenciál)
EI	electron ionization (elektronová ionizace)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	electrospray ionization (ionizace elektrosprejem)
FA	formic acid (kyselina mravenčí)
Fe	železo
FAB	fast atom bombardment (ionizace urychlenými atomy)
FD	field desorption (desorpce polem)
FI	field ionization (ionizace polem)
FT-ICR	fourier transform ion cyclotron resonance (iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací)
H ₂ O	voda
HH	hereditary hemochromatosis (dědičná hemochromatóza)
HPLC	high-performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
ICAT	isotope-coded affinity tag
ICPL	isotope-coded protein label
IL-6	interleukin-6

iTRAQ	isotope tags for relative and absolute quantification
LC	liquid chromatography (kapalinová chromatografie)
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry (kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií)
LD	laser desorption (desorpce laserem)
LEAP-1	liver-expressed antimicrobial peptide
LIT	linear ion trap (lineární iontová past)
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization (ionizace/desorpce laserem za přítomnosti matrice)
MeOH	metanol
MS	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
MS/MS	tandem mass spectrometry (tandemová hmotnostní spektrometrie)
m/z	mass-to-charge (poměr hmotnosti a náboje)
Ne	neon
NHS	N-hydroxysukcinimidin
Nic-NHS	N-nikotinoyloxysukcimidin
O	kyslík
PD	plasma desorption (desorpce plasmou)
RF	radio frequency (radiofrekvenční/ vysokofrekvenční střídavé napětí)
SELDI	surface enhanced laser desorption/ionization (povrchem podpořená ionizace/desorpce laserem)
SILAC	stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SRM	selected reaction monitoring (monitorování vybraných reakcí)
Q	quadrupole mass filter (kvadrupólový hmotnostní analyzátor)
QqTOF	quadrupole-time of flight (kvadrupól s analyzátozem doby letu)
QqQ	triple quadrupole (trojitý kvadrupól)
TOF	time of flight (analyzátor doby letu)
TOFqTOF	time of flight-time of flight (dva analyzátory doby letu)