

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Bc. Klára Brožová

**Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Optimalizace a validace stanovení proteinu
FGF23 z FFPE řezu.**

Diplomová práce

Bc. Klára Brožová

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

Olomouc 2021

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára BROŽOVÁ**
Osobní číslo: **R18929**
Studijní program: **N1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Název tématu: **Optimalizace a validace stanovení proteinu FGF23 z FFPE řezu**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Studentka zavede, zoptimalizuje a zvaliduje stanovení proteinu FGF23 metodou cílené proteomiky. V rámci toho se naučí pracovat s FFPE tkání a laserovou mikrodisekcí, přípravou vzorků pro proteomiku a hmotnostně spektrometrická stanovení. V rámci validace pak stanoví parametry optimalizovaného měření.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.

Ústav molekulární a translační medicíny



Datum zadání diplomové práce:

12. října 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

31. července 2020

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

L.S.

02 -11- 2018

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA DOPĚDNÍ A MOLEKULÁRNÍ GENETIKY
Stodnětská 27, 785 71, Olomouc - Hořovice
tel: +420 585 631 000

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

-2-

V Olomouci

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Klára Brožová
Název práce	Optimalizace a validace stanovení proteinu FGF23 z FFPE řezu
Typ práce	diplomová
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Oždian Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Klíčová slova	FGF23 protein, hmotnostní spektrometrie, cílená proteomika
Počet stran	83
Počet příloh	0
Jazyk	český

Souhrn

Problematika využití hmotnostní spektrometrie (MS) jako moderní vyšetřovací metody v proteomice je v současnosti velmi aktuální. Ve své práci jsem vypracovala obecný přehled problematiky spojené s využitím hmotnostního spektrometru v identifikaci proteinů a v praktické části jsem se zaměřila konkrétně na detekci proteinu FGF23 pomocí hmotnostního spektrometru. FGF23 protein je nadměrně exprimován v tkáních zhoubných nádorů, což z něj činí předmět odborného zájmu jako potencionálního onkomarkeru. Cílem práce bylo experimentálně optimalizovat a validovat přítomnost FGF23 proteinu z FFPE řezu pomocí MS analýzy. V dostupné literatuře dosud nebyla publikována detekce FGF23 proteinu pomocí MS analýzy. Rovněž správné nastavení hmotnostního spektrometru je jedna ze základních podmínek, která musí být splněna pro jeho využití v proteomice. Po opakované korekci parametrů MS spektrometru byla v rámci provedeného cíleného experimentu prokázána přítomnost 39 % peptidů včetně prekurzorových i dceřinných fragmentů odpovídající FGF23 rekombinantnímu proteinu pomocí cílené MS analýzy.

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Klára Brožová
Title	Optimization and validation of FGF23 protein assay in FFPE samples
Type of thesis Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor	Mgr. Tomáš Oždian Ph.D.
The year of presentation	2021
Keywords	FGF23 protein, mass spectrometry, target proteomic
Number of pages	83
Number of appendices	0
Language	czech

Summary

The issue of using mass spectrometry (MS) as a modern examination method in proteomics is currently very topical. In my work I developed a general overview of the problems associated with the use of mass spectrometry in the identification of proteins and in the practical part I focused specifically on the detection of FGF23 protein using a mass spectrometer. The FGF23 protein is overexpressed in cancer tissues, making it of interest as a potential oncomarker. The aim of the work was to experimentally optimize and validate the presence of FGF23 protein from FFPE section using MS analysis. Detection of FGF23 protein by MS analysis has not been published in the available literature. Also, the correct setting of the mass spectrometer is one of the basic conditions that must be performed for its use in proteomics. After repeated correction of the MS spectrometer parameters, the presence of 39 % of peptides, including precursor and daughter fragments corresponding to FGF23 recombinant protein, was demonstrated in the targeted experiment by targeted MS analysis.

Čestně prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci s názvem „Optimalizace a validace stanovení proteinu FGF23 z FFPE řezu“ zpracovala samostatně pod vedením pana Mgr. Tomáše Oždiana, Ph.D. na Ústavu translační a molekulární medicíny v Olomouci s využitím literatury uvedené v závěru této práce.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Tomášovi Oždianovi, Ph.D. nejen za odborné rady a materiály, které mi poskytl při zpracování teoretické i experimentální části této diplomové práce, ale i za přátelský přístup, ochotu a čas, které mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Evě Kašniarové a Mgr. Dušanu Holubovi, Ph.D. za to, že mi byli ochotni pomoci s řešením problémů při práci v laboratoři.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
3.1	Proteiny a jejich detekce.....	3
3.1.1	Western blotting.....	4
3.1.2	Radioimunoanalýza.....	4
3.1.3	Enzyme-linked immunosorbent assay.....	4
3.2	Hmotnostní spektrometrie.....	5
3.2.1	Proces ionizace elektrosprejem.....	6
3.2.2	Jednoduché hmotnostní analyzátoři.....	7
3.2.3	Hybridní hmotnostní analyzátoři.....	10
3.3	Proteomické metody založené na hmotnostní spektrometrii.....	12
3.3.1	Necílená proteomika.....	13
3.3.1	Cílená proteomika.....	13
3.4	Metody cílené proteomiky.....	14
3.4.1	Monitorování vybraných reakcí.....	14
3.4.2	Monitorování paralelních reakcí.....	17
3.5	Využití cílené proteomiky v klinické praxi.....	20
3.5.1	Výběr vzorků pro klinickou proteomickou analýzu.....	22
3.6	Fibroblastový růstový faktor 23.....	23
3.6.1	Onkologický význam FGF proteinů.....	23
3.6.2	Funkce FGF23 proteinu v organismu.....	24
3.6.3	Vztah proteinu FGF23 a vitamínu D.....	25
3.6.4	Struktura genu a proteinu FGF23.....	25
4	MATERIÁL A METODIKA.....	27
4.1	Biologický materiál.....	27
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	27
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	29
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	29
5	VÝSLEDKY.....	33
5.1	Cílená MS analýza vzorku obsahujícího FGF23 protein.....	33
5.2	Cílená MS analýza vzorku obsahujícího protein FGF23 štěpeného na filtru.....	36
5.3	Cílená analýza FFPE vzorků amyloidu obsahujících FGF23 protein.....	41
5.4	Cílená analýza vzorků obsahujících protein BSA.....	43

5.5	Necílená a následně cílená analýza vzorků obsahujících protein BSA	50
5.6	Cílená analýza vzorků obsahujících různé koncentrace proteinu BSA	55
5.7	Necílená a následně cílená analýza vzorku obsahujícího FGF23 protein.....	63
6	DISKUZE	67
7	ZÁVĚR	71
8	LITERATURA.....	72

Seznam symbolů a zkratek

ACN	Acetonitril
BCA	Bicinchoninic acid assay; metoda stanovení koncentrace proteinů za použití kyseliny bicinchoninové
BSA	Bovine serin albumin; hovězí sérový albumin
CD69+	Cluster of differentiation 69 +
CID	Collision-induced dissociation; disociace vyvolaná kolizí
DTT	Dithiotreitol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Estrogen receptor; estrogenový receptor
ESI	Electrospray ionization; ionizace elektrosprejem
FASP	Filter-aided sample preparation; příprava vzorku za pomoci filtru
FFPE	Formalin fixed paraffin embedded; vzorky fixované formalínem a zalité do parafínu
FGF23	Fibroblast growth factor 23; fibroblastový růstový faktor 23
HCD	Higher-energy collisional dissociation; vysokoenergetická kolizní disociace
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2; receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2
HIF1 α	Hypoxia inducible factor 1 α
HPLC	High-performance liquid chromatography; vysoce účinná kapalinová chromatografie
IAA	Jodacetamid
IHC	Immunohistochemistry; imunohistochemie
LC	Liquid chromatography; kapalinová chromatografie
LC-ESI	Kapalinová chromatografie ve spojení s ionizací elektrosprejem
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
MALDI	Matrix-assisted laser desorption ionization; ionizace laserem za účasti matrice
MRM	Multiple reaction monitoring; sledování vícenásobné reakce
MS	Mass spectrometry; hmotnostní spektrometr
m/z	Mass-to-charge ratio; poměr hmotnosti k náboji

Q	Quadrupole; kvadrupól
QQQ	Triple quadrupole; trojitý kvadrupól
Q-TOF	Quadrupole - Time of flight; kvadrupól v kombinaci s analyzátozem doby letu
PgR	Progesterone receptor; progesteronový receptor
PMT	Phosphaturic mesenchymal tumor; fosfaturický mesenchymální tumor
RIA	Radioimmunoassay; radioimunoanalýza
SRM	Selected reaction monitoring; monitorování vybraných reakcí
TFA	Trifluoroacetic acid; kyselina trifluoroctová
TOF	Time of flight; analyzátor doby letu

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Přístrojové vybavení HPLC zahrnuje čerpadlo, injektor, kolonu, detektor, integrátor a zobrazovací systém.	6
Obrázek č. 2: Schéma ionizace vzorku elektrosprejem zobrazující postupné zmenšování objemu částic vzorku až na molekulární úroveň.	7
Obrázek č. 3: Schéma kvadrupólového hmotnostního analyzátoru znázorňující separaci iontů při průchodu elektrickým polem mezi elektrodami analyzátoru.	8
Obrázek č. 4: Schéma hmotnostního analyzátoru typu iontové pasti, kde je znázorněna selekce iontů v prstencové elektrodě před dopadem na detektor.	8
Obrázek č. 5: Schéma hmotnostního analyzátoru typu TOF v kombinaci s MALDI ionizací zobrazující vliv doby letu letovou trubicí na velikosti molekuly.	9
Obrázek č. 6: Schéma hmotnostního analyzátoru typu Orbitrap zobrazující spirálovitou dráhu letu iontu mezi vnitřní a vnějšími elektrodami.	10
Obrázek č. 7: Schéma tandemového kvadrupólového hmotnostního analyzátoru zobrazující selekci, postupnou fragmentaci molekuly iontu a jeho následnou detekci.	11
Obrázek č. 8: Schéma hybridního kvadrupólového hmotnostního analyzátoru v kombinaci s TOF analyzátorem.	11
Obrázek č. 9: Schematické znázornění hybridního přístroje Orbitrap Fusion Tribrid.	12
Obrázek č. 10: Princip MS/MS proteomické analýzy.	13
Obrázek č. 11: Schematické znázornění metody SRM zobrazující použití dvojitého filtru ke sledování fragmentového iontu (zobrazen fialovou barvou) ze specifického vybraného peptidu (zobrazen červenou barvou).	15
Obrázek č. 12: Schematické znázornění metody MRM, která postupně monitoruje několik fragmentů iontů různých peptidů v každém cyklu.	16
Obrázek č. 13: Schematické znázornění metody PRM analýzy využívající cílených sběr dat na úrovni iontových fragmentů (MS ²).	18
Obrázek č. 14: Schematické znázornění rozdílu mezi metodou SRM a PRM analýzy cílených dat na úrovni iontových fragmentů (MS ²).	19
Obrázek č. 15: Schéma využití MS v klinické praxi.	23
Obrázek č. 16: FGF23 protein.	26
Obrázek č. 17: a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu trypsinem v roztoku analyzované cílenou MS metodou. b) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu štěpeného trypsinem analyzované cílenou metodou MS, zpracováno pomocí programu Skyline.	34

Obrázek č. 17 - pokračování: c) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu chymotrypsinem v roztoku analyzované cílenou MS metodou. d) Spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu štěpeného chymotrypsinem, analyzované cílenou metodou MS, zpracováno pomocí programu Skyline.....	35
Obrázek č. 18: a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu trypsinem na filtru (FASP) analyzované cílenou MS metodou při HCD 20 %. b) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu analyzované cílenou metodou MS při HCD 20 %, zpracováno pomocí programu Skyline.....	37
Obrázek č. 18 - pokračování: c) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu trypsinem na filtru (FASP) analyzované cílenou MS metodou při 25% HCD. d) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu analyzované cílenou metodou MS při HCD 25 %, zpracováno pomocí programu Skyline.	38
Obrázek č. 18 - pokračování: e) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu trypsinem na filtru (FASP) analyzované cílenou MS metodou při 30% HCD. f) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu analyzované cílenou metodou MS při HCD 30 %, zpracováno pomocí programu Skyline.	39
Obrázek č. 18 - pokračování: g) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu trypsinem na filtru (FASP) analyzované cílenou MS metodou při 40% HCD. h) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu analyzované cílenou metodou MS při HCD 40 %, zpracováno pomocí programu Skyline.	40
Obrázek č. 19: a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu z FFPE vzorku trypsinem analyzované cílenou MS metodou. b) Spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.	42
Obrázek č. 20: Metoda A. a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem v roztoku analyzované cílenou MS metodou. b) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované cílenou metodou MS, zpracováno pomocí programu Skyline.....	45
Obrázek č. 20 - pokračování: Metoda B. c) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou. d) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA	

proteinu analyzované cílenou metodou MS, zpracováno pomocí programu Skyline.....	46
Obrázek č. 20 - pokračování: Metoda C. e) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou. f) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.....	47
Obrázek č. 20 - pokračování: Metoda D. g) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou. h) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.....	48
Obrázek č. 20 - pokračování: Metoda E. i) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou. j) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.....	49
Obrázek č. 21: a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované necílenou MS metodou. b) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované necílenou metodou MS zobrazující všechny prekurzorové fragmenty, zpracováno pomocí programu Skyline.....	51
Obrázek č. 22: Metoda HCD. a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou. b) Spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované cílenou MS metodou (metoda HCD), zpracováno pomocí programu Skyline.....	53
Obrázek č. 22 - pokračování: Metoda CID. c) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou. d) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.....	54
Obrázek č. 23: a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou při koncentraci 0,5 µg/µl. b) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu (0,5 µg/µl) analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.....	57

Obrázek č. 23 - pokračování: c) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou při koncentraci 50 ng/μl. d) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu (50 ng/μl) analyzované cílenou metodou MS, zpracováno pomocí programu Skyline.....	58
Obrázek č. 23 - pokračování: e) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou při koncentraci 5 ng/μl. f) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu (5 ng/μl) analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.....	59
Obrázek č. 23 - pokračování: g) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou při koncentraci 500 pg/μl. h) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu (500 pg/μl) analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.	60
Obrázek č. 23 - pokračování: i) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou při koncentraci 50 pg/μl. j) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu (50 pg/μl) analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.....	61
Obrázek č. 24: a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu trypsinem v roztoku analyzované cílenou MS metodou. b) Spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu analyzované cílenou metodou MS, zpracováno pomocí programu Skyline.....	65

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro cílenou analýzu vzorku obsahujícího FGF23 protein.....	33
Tabulka č. 2: Hodnoty m/z peptidů a nábojový stav pro cílenou MS analýzu vzorků FGF23 proteinu.....	34
Tabulka č. 3: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro cílenou analýzu vzorku obsahujícího FGF23 protein připraveného FASP metodou.....	36
Tabulka č. 4: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro cílenou analýzu 6 vzorků obsahujících protein BSA.....	43
Tabulka č. 5: Hodnoty m/z peptidů a nábojový stav pro cílené (A–B) metody MS analýzy.....	44
Tabulka č. 6: Hodnoty m/z peptidů a nábojový stav pro cílené (C–E) metody MS analýzy.....	44
Tabulka č. 7: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro necílenou analýzu vzorku obsahujícího protein BSA.....	50
Tabulka č. 8: Hodnoty m/z peptidů a nábojový stav pro cílenou metodu MS analýzy vzorků obsahujících BSA protein.....	52
Tabulka č. 9: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro cílenou analýzu vzorků obsahujících protein BSA.....	52
Tabulka č. 10: Objemy vyšetřovaných vzorků obsahující 10 µg peptidů BSA proteinu potřebných pro purifikaci na „Stage Tips“.....	56
Tabulka č. 11: Nalezené/nenalezené peptidy včetně jejich prekurzorových i dceřinných fragmentů odpovídající proteinu BSA v programu Skyline u jednotlivých koncentrací (0,5 µg/µl, 50 ng/µl, 5 ng/µl, 500 pg/µl, 50 pg/µl) a u metody CID z předešlého měření.....	62
Tabulka č. 12: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro necílenou analýzu vzorku obsahujícího FGF23 protein.....	64
Tabulka č. 13: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro cílenou analýzu vzorku obsahujícího FGF23 protein.....	64
Tabulka č. 14: Hodnoty m/z peptidů a nábojový stav pro cílenou metodu MS analýzy vzorku obsahujícího FGF23 protein.....	65
Tabulka č. 15: Nalezené peptidy včetně jejich prekurzorových fragmentů i dceřinných fragmentů odpovídající proteinu FGF23 při koncentraci 500 fmol/µl v programu Skyline a jejich m/z a nábojový stav.....	66

1 ÚVOD

Proteomika je věda studující proteom, tedy kompletní soubor všech proteinů v živé buňce. Cílem proteomiky je identifikace proteinů, které mohou být rovněž důležitými markery v diagnostice nádorových onemocnění. V současnosti patří mezi nejdůležitější nástroje k detekci a identifikaci proteinů hmotnostní spektrometrie. Tato moderní metoda umožňuje přímou identifikaci molekul na základě poměru hmotnost/náboj a je v současnosti zcela nezastupitelná v moderní onkologické diagnostice, protože poskytuje stále komplexnější pohled na změny proteomu než dosud využívané imunologické metody.

Mezi širokou škálu onkoproteinů lze zařadit FGF proteiny (fibroblast growth factor, fibroblastový růstový faktor) hrající díky své roli v regulaci buněčné proliferace, migrace, chemotaxe, morfogeneze a angiogeneze důležitou roli v tumorigenezi a vzniku onkologických onemocnění. Konkrétně FGF23 protein je nadměrně exprimován v tkáních zhoubných nádorů a právě pomocí hmotnostní spektrometrie může být detekována přítomnost tohoto proteinu v některých nádorech, jako je např. glioblastom.

Ve své práci se zabývám výše uvedenou problematikou v rámci cílené proteomiky, a to konkrétně využitím hmotnostní spektrometrie k detekci FGF23 proteinu. Pro využití této moderní technologie je mimo jiné zcela zásadní správné nastavení parametrů hmotnostního spektrometru, což je hlavním tématem mé práce.

2 CÍLE PRÁCE

Mezi hlavní cíle této magisterské práce patří:

1. Literární přehled.
2. Laboratorní část - přípravy proteomických vzorků.
3. Laboratorní část - optimalizace parametrů hmotnostního spektrometru.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

Současná moderní onkologie je medicínským oborem, který se velmi dynamicky rozvíjí jak po stránce diagnostické tak i terapeutické. Jedním z hlavních úkolů přírodovědných oborů včetně molekulární biologie, genomiky i proteomiky je hledání biomarkerů využitelných v diagnostice a v cílené onkologické terapii. Je nepopíratelné, že biomarkery u onkologických onemocnění zcela zásadně transformují současné diagnostické a terapeutické postupy. Biomarkery jsou především proteiny, které vznikají expresí genů a to včetně jejich mutací, které jsou příčinou vzniku onkologických onemocnění. Proto stoupá význam moderní proteomiky v onkologii.

3.1 Proteiny a jejich detekce

Proteiny jsou polymery aminokyselin vázaných prostřednictvím α -peptidových vazeb. Mohou být reprezentovány primární, sekundární, terciární a kvartérní strukturou (Watford *et* Wu, 2018). V současnosti je k dispozici spousta různých technik detekce proteinů. Ideální metoda by měla být snadno a rychle proveditelná, finančně nenáročná a ekologická. Výběr vhodné metody detekce proteinů je velmi důležitý, ať už k identifikaci proteinů nebo k měření jejich exprese v biologických vzorcích. Tyto požadavky dosud nespĺňuje žádná technika detekce proteinů. Je proto nutné zvolit metodu, která je optimální k vyšetření konkrétního vzorku v závislosti na jeho typu a dalších metodických požadavcích (Westermeier, 2006).

Dalším podstatným faktorem výběru vhodné vyšetřovací metody je její cena a dostupnost. Analytické stanovení proteinů je v současnosti doménou imunologických metod a to především pro jejich všeobecné rozšíření a nízké náklady. Mezi standardní imunologické metody patří zejména Western blot, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) a RIA (Radioimunoanalýza). Ve většině případů poskytují imunologické testy vysoce přesné, citlivé, relativně levné a jednoduché testy pro mnoho analytů (Hale, 2013). Další důležitou detekční metodou v proteomice je hmotnostní spektrometrie. Vzhledem k tomu, že hmotnostní spektrometrii využívám ve své diplomové práci, rozvedu její principy a využití v následující kapitole.

3.1.1 Western blotting

Western blotting je velice rozšířená metoda, která je používána k detekci proteinů jejich značením protilátkami již od roku 1979 (Renart *et al.*, 1979, Towbin *et al.*, 1979). Principem této metody je separace proteinů nebo peptidů podle velikosti pomocí polyakrylamidové elektroforézy s dodecylsulfátem sodným s následným přenosem na membránu a označením cílového proteinu pomocí vhodné protilátky k vizualizaci (Srinivas, 2012).

3.1.2 Radioimunoanalýza

Radioimunoanalýza (RIA) je metoda poprvé popsána v roce 1959 Yalowem a Bersonem (Yalow *et Berson*, 1959), která detekuje přítomnost proteinu (antigenu) s velmi vysokou senzitivitou. V této metodě neznačený antigen soutěží s radioaktivně značeným antigenem o vazbu na protilátku s příslušnou specificitou. Tato metoda má tři základní kroky: imunitní reakci s vazbou značené protilátky na antigen, kompetitivní reakci značeného a neznačeného antigenu a detekci radioaktivity pomocí detektoru ionizujícího záření (Praither, 1985). Velkou předností této metody je vysoká senzitivita se schopností detekovat látku řádově v nanogramech až pikogramech. Mezi nevýhody patří pořízení drahého zařízení potřebného pro tuto metodu a rizika spojená s manipulací s radioaktivní látkou. Tento test se používá např. ke stanovení hladiny léčiv a hormonů v séru, protilátek proti infekčním onemocněním (Aryal, 2020).

3.1.3 Enzyme-linked immunosorbent assay

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) je považován za zlatý standard imunotestů. Tento imunologický test s vysokou senzitivitou, který byl poprvé popsán v roce 1971 (Engvall *et Perlmann*, 1971) je založený na podobném principu jako metoda RIA (vazba antigen-protilátka). Je používán k detekci a kvantifikaci látek, včetně protilátek, antigenů, proteinů, glykoproteinů a hormonů. Detekce komplexu antigen-protilátka se provádí spektrofotometrickým měřením na základě enzymatické reakce. Mezi hlavní výhody tohoto testu patří vysoká přesnost ve srovnání s RIA a nízká cena a mezi hlavní nevýhody časová náročnost (Sakamoto *et al.*, 2018).

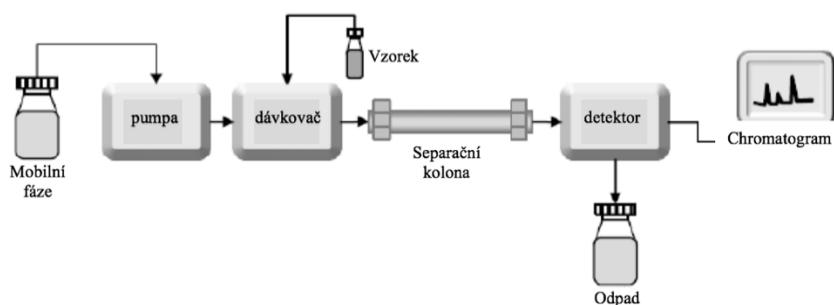
3.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry, MS) je metoda, která přispěla k četným objevům v chemii, fyzice a biochemii. Jedinečnost MS je daná tím, že umožňuje přímou identifikaci molekul na základě poměru hmotnost/náboj u celých a fragmentovaných analytů. Po několik desetiletí se MS používá v kvalitativní chemické analýze (Urban, 2016). MS má své uplatnění rovněž v proteomice, kde umožňuje stále komplexnější pohled na změny proteomu a je využitelná v identifikaci různých proteoforem, včetně jejich posttranslačních modifikací (Macklin *et al.*, 2020).

Hmotnostní spektrometrie je běžně považována za detekční laboratorní techniku určenou k separaci elektricky nabitých iontů v plynné fázi (Urban, 2016). Hmotnostní spektrometry se skládají ze tří hlavních komponentů: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru (Haag, 2016). Nabité ionty jsou produkovány v iontovém zdroji. V některých případech iontový zdroj také napomáhá přenosu analytů z pevné nebo kapalně fáze do fáze plynné. Ionty plynné fáze jsou následně přeneseny do hmotnostního analyzátoru. Hmotnostní analyzátor třídí ionty v prostoru nebo čase podle poměru hmotnost/náboj (m/z). Separované ionty jsou detekovány iontovým detektorem. Elektrické signály produkované iontovým detektorem jsou následně zpracovány za vzniku hmotnostních spekter. Hmotnostní spektra lze vnímat jako histogramy, které poskytují informace o počtu iontů při různých hodnotách m/z (Urban, 2016).

Před samotnou MS analýzou je podstatné peptidy separovat. Účinná separace zvyšuje kapacitu MS identifikovat peptidy a jejich fragmenty. V proteomice jsou nejpoužívanější metody vysokotlaké kapalinové chromatografie (High performance liquid chromatography, HPLC). Principem HPLC metody je průchod kapalného rozpouštědla včetně směsi vzorků kolonou naplněnou pevným adsorpčním materiálem (viz obrázek č. 1). Různá interakce složek vzorku s adsorbentem kolony vede k jejich separaci (Thammana, 2016). Adsorbent je zpravidla granulovaný materiál vyrobený z pevných částic (např. silikagel pokrytý alifatickým oktadecylem) o velikosti 2 μm až 50 μm . Mobilní fáze je obvykle směsí rozpouštědel (např. vody, acetonitrilu a/nebo methanolu), její složení a teplota hraje důležitou roli v postupu dělení tím, že ovlivňuje spojení mezi analyty a adsorbentem (Elshanawane, 2014, Mustafa, 2014). Detektor HPLC, který

se nachází na konci kolony, identifikuje analyty v závislosti na rychlosti eluce v chromatografické koloně. Mezi nejčastěji využívané detektory patří UV-spektrometr a MS (Thammana, 2016). Ve svém experimentu využívám kapalinovou chromatografii napojenou on-line na MS. Nejčastěji se pro spojení s HPLC používají hmotnostní spektrometry s ionizací elektrosprejem.

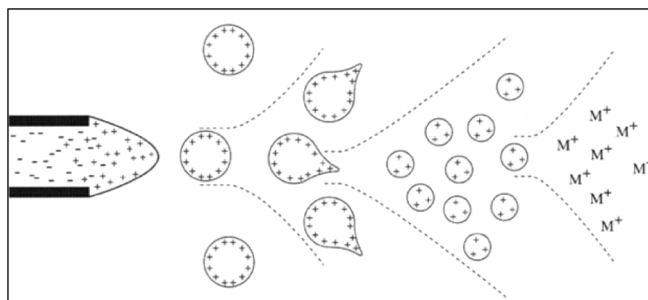


Obrázek č. 1: Přístrojové vybavení HPLC zahrnuje čerpadlo, injektor, kolonu, detektor, integrátor a zobrazovací systém. Převzato a upraveno z Czaplicki, 2013.

3.2.1 Proces ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization, ESI) používá elektrickou energii k přenosu iontů z roztoku do plynné fáze, než jsou podrobeny hmotnostní spektrometrické analýze (Ho *et al.*, 2003).

Proces ionizace elektrosprejem (viz obrázek č. 2) začíná rozprášením vzorku (mobilní fáze obsahující rozdělené peptidy) přes kovovou sprejovací kapiláru v elektrickém poli. Použitím hnacího plynu (např. dusíku), který je hnán pod zvýšeným tlakem kolem eluovaného roztoku vzorku, dojde ke zvýšení rychlosti průtoku vzorku. Nabité kapičky, generované na výstupu z hrotu kapiláry, procházejí směrem k analyzátoru hmotnostního spektrometru. Zvýšením teploty hnacího plynu dojde ke zmenšení částic odpařením rozpouštědla, což vede ke zvýšení povrchového náboje a ke snížení poloměru kapiček. Ve chvíli, kdy je kapička tak malá, že síla, při které se kladné ionty kapičky odpuzují, převáží nad soudržností povrchového napětí, dojde ke Coulombické explozi, tj. rozpadu na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů. Opakováním tohoto procesu dojde k uvolnění iontů, tj. k převedení molekul kapičky do plynné fáze. Tyto emitované ionty jsou poté elektrostatickou silou směřovány do hmotnostního analyzátoru pro následnou analýzu (Ho *et al.*, 2003).



Obrázek č. 2: Schéma ionizace vzorku elektrosprejem zobrazující postupné zmenšování objemu částic vzorku až na molekulární úroveň. Převzato z Ho *et al.*, 2003.

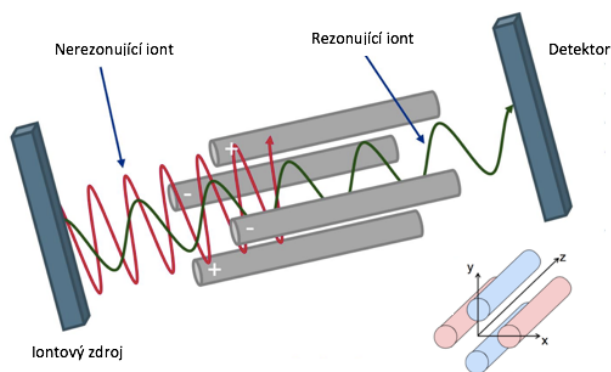
3.2.2 Jednoduché hmotnostní analyzátory

Další fází hmotnostní analýzy je průchod iontů elektromagnetickým polem a jejich separace v závislosti na poměru m/z , což je hlavní princip, na kterém je založena funkce MS (Ho *et al.*, 2003).

V současnosti je k dispozici mnoho různých analyzátorů. Mezi nejběžnější typy patří kvadrupólový analyzátor, analyzátor typu iontová past, analyzátor doby letu a Orbitrap. Volba hmotnostního analyzátoru pro daný experiment závisí na řadě faktorů, např. rozsahu m/z iontu, který má být analyzován a rozlišovací schopnosti analyzátoru (Haag, 2016). Níže jsou popsány nejčastěji používané hmotnostní analyzátory.

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor

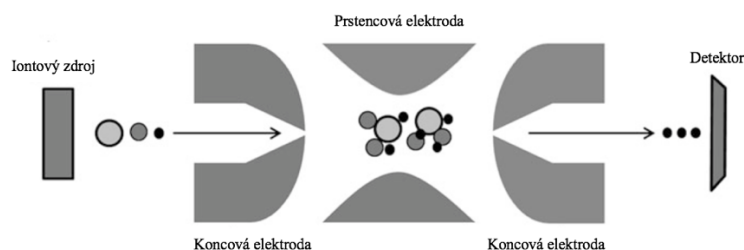
V tomto systému je soustava 4 rovnoběžných kovových tyčí rozmístěna ve stejné vzdálenosti (viz obrázek č. 3). V každé dvojici protilehlých tyčí je udržováno střídavé napětí stejné velikosti, ale opačné polarity. Výsledné elektrické pole způsobí, že ionty se pohybují dopředu ve směru osy z a oscilačním pohybem v rovině $x-y$. Amplituda kmitání nese vztah k poměru m/z a může být řízena frekvenční změnou vysokého napětí. Toto napětí lze nastavit tak, aby amplitudy kmitání pro požadované poměry m/z byly „stabilní“ s ionty pohybujícími se podél osy z , aniž by tyto ionty zasáhly čtyřpólové tyče a nakonec dosáhly detektoru. Na druhé straně jsou u nežádoucích iontů oscilační amplitudy velké a tyto „nestabilní“ ionty zasáhnou kovové tyče, zneutralizují se a nedosáhnou detektoru (Ho *et al.*, 2003).



Obrázek č. 3: Schéma kvadrupólového hmotnostního analyzátoru znázorňující separaci iontů při průchodu elektrickým polem mezi elektrodami analyzátoru. Během letu kvadrupólem v ose z musí mít iont stabilní trajektorii v osách x a y tak, aby nenařazil na kovové tyče. Převzato a upraveno z www.knauer.net.

Hmotnostní analyzátor typu iontové pasti

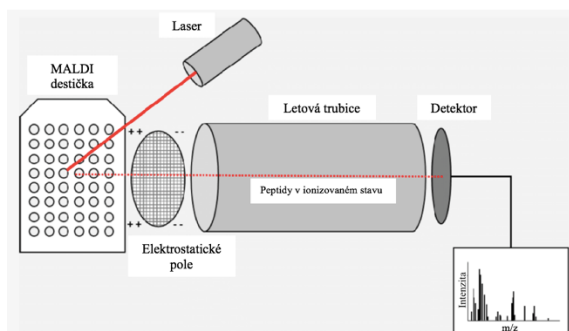
Tento analyzátor je trojrozměrnou obdobou kvadrupólu, skládá ze tří hyperbolických elektrod: prstencové elektrody a dvou propojených koncových elektrod - vstupní a výstupní (viz obrázek č. 4). Tyto elektrody tvoří dutinu, ve které je možné separovat ionty. Obě koncové elektrody obsahují malý otvor, kterým mohou ionty procházet. Prstencová elektroda je umístěna uprostřed mezi dvěma koncovými elektrodami. Ionty produkované ze zdroje jsou změnou napětí přivedeny do pasti vstupním otvorem koncové elektrody a vlivem různých napětí aplikovaných na elektrody dochází k zachycení a vypuzování iontů podle jejich poměru m/z (Ho *et al.*, 2003). Pomocí oscilačního vysokofrekvenčního pole a stejnosměrného elektrického pole, podobnému tomu v kvadrupólech, jsou ionty zadrženy mezi elektrodami uvnitř pasti. Ionty zadržené v iontové pasti je možné fragmentovat částicemi inertního plynu. Tento proces je známý jako disociace vyvolaná kolizí (CID). Ionty nebo jejich fragmenty jsou následně na základě různých m/z selektivně vypuzeny z pasti výstupním otvorem změnou napětí. Poté jsou ionty detekovány na detektoru (Haag, 2016).



Obrázek č. 4: Schéma hmotnostního analyzátoru typu iontové pasti, kde je znázorněna selekce iontů v prstencové elektrodě před dopadem na detektor. Převzato a upraveno z Haag, 2016.

Hmotnostní analyzátor doby letu

Hmotnostní analyzátor doby letu (TOF, Time of flight) je založen na principu různé doby průletu ionizovaných molekul letovou trubicí před dosažením detektoru. Po ionizaci analytu je iontům elektrickým pulzem dodána stejná kinetická energie a jsou vypuzeny do průletové trubice, kde dochází k jejich rozdělení na základě rychlosti pohybu (viz obrázek č. 5) (Mamyrin, 2001). V zásadě platí, že pokud se dva ionty různých m/z urychlí z iontového zdroje se stejnou kinetickou energií a proletí letovou trubicí, pak budou jejich doby příletu k detektoru odlišné. Čím větší je iontová hmotnost, tím pomalejší je průlet letovou trubicí. Když iont narazí na detektor, hmotnostní spektrometr určuje čas, za který iont proletěl letovou trubicí. Doba letu letovou trubicí je úměrná m/z iontu (Haag, 2016). TOF analyzátor bývá často zkombinován s laserem, který se podílí na převedení vzorku krystalizovaného s vhodnou maticí na kovovém terčičku do plynné fáze (Matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI) (Clark *et al.*, 2013).

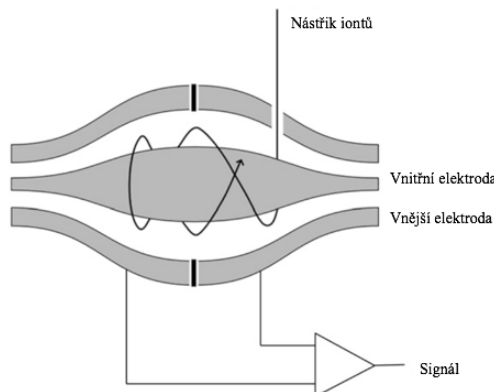


Obrázek č. 5: Schéma hmotnostního analyzátoru typu TOF v kombinaci s MALDI ionizací zobrazující vliv doby letu letovou trubicí na velikosti molekuly. Převzato a upraveno z Ward, 2019.

Hmotnostní analyzátor typu Orbitrap

Hmotnostní analyzátor typu Orbitrap se skládá ze tří hlavních částí, z vnitřní vřetenové elektrody a ze dvou dutých vnějších konkávních elektrod obrácených k sobě (viz obrázek č. 6). Mezi vnitřní a vnější elektrodou je udržován napěťový potenciál, který mezi nimi vytváří lineární elektrické pole. Úzký svazek iontů s určitou hodnotou m/z je zaváděn tangenciálně mezi vnitřní a vnější elektrodu otvorem v jedné z vnějších elektrod. V důsledku elektrického pole mezi vnitřní a vnější elektrodou je dráha iontu zakřivena směrem k vnitřní elektrodě, zatímco tangenciální rychlost iontu vytváří protilehlou odstředivou sílu. Při specifickém potenciálu mezi vnitřní a vnější elektrodou zůstávají ionty ve spirálové dráze kolem vnitřní elektrody. Kvůli kuželovitému tvaru elektrod je

indukována harmonická axiální oscilace iontů, přičemž vnější elektrody také fungují jako přijímací desky, které detekují axiální harmonický pohyb iontů. Axiální harmonické frekvence jsou poté převedeny Fourierovou transformací na běžné hmotnostní spektrum. Jsou detekovány všechny m/z hodnoty (Haag, 2016).



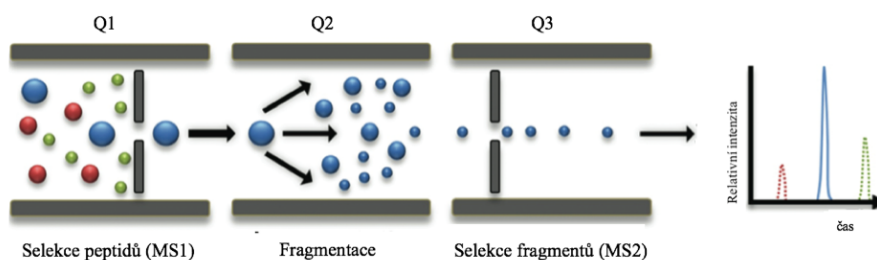
Obrázek č. 6: Schéma hmotnostního analyzátoru typu Orbitrap zobrazující spirálovitou dráhu letu iontu mezi vnitřní a vnějšími elektrodami. Převzato a upraveno z Haag, 2016.

3.2.3 Hybridní hmotnostní analyzátory

Kombinace výše popsaných jednoduchých hmotnostních analyzátorů vytváří tzv. hybridní hmotnostní analyzátory, např. trojitý kvadrupól (QQQ), kvadrupól v kombinaci s analyzátozem doby letu (Q-TOF) a hmotnostní analyzátory v kombinaci s Orbitrapem (Orbitrap Fusion Tribrid). Jde o spojení 2 a více hmotnostních analyzátorů, mezi které je vložena kolizní cela (Haag, 2016).

Trojité kvadrupól (QQQ)

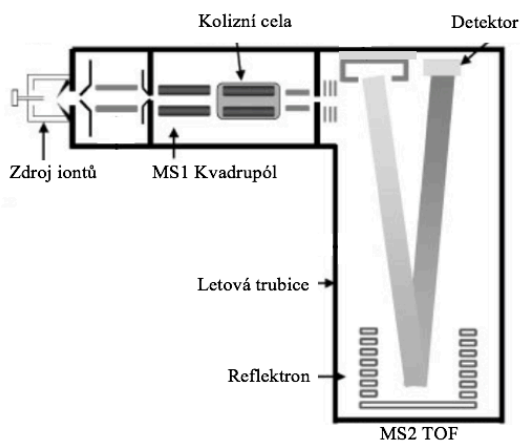
V tomto systému jsou lineárně uspořádány tři kvadrupólové analyzátory (viz obrázek č. 7). Sledovaný analytický iont (obvykle se nazývá prekurzorový iont) je hromadně vybrán prvním kvadrupólem (Q1) a ponechán ke srážce s kolizním plynem (obvykle argonem) ve druhé kvadrupólové kolizní buňce (Q2), kde podléhá další fragmentaci. Dceřinné ionty, které jsou výsledkem CID jsou monitorovány třetím kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem (Q3) poskytujícím strukturální informace o molekulárních iontech. Tento tandemový systém je v literatuře běžně označován jako MS/MS. Nastavení Q1 vyselektuje ionty s jedním specifickým poměrem m/z a odfiltruje ostatní ionty s jinými poměry m/z . Tento „purifikační“ krok uvnitř MS systému usnadňuje interpretaci výsledných spekter (Ho *et al.*, 2003).



Obrázek č. 7: Schéma tandemového kvadrupólového hmotnostního analyzátoru zobrazující selekci, postupnou fragmentaci molekuly iontu a jeho následnou detekci. Převzato a upraveno z Boja *et* Rodriguez, 2011.

Kvadrupól v kombinaci s analyzátozem doby letu (Q-TOF)

Mezi další hybridní analyzátozy patří Q-TOF mezi jehož hlavní součásti patří dva kvadrupóly a jeden analyzátoz doby letu. Toto uspořádání s výhodou sčítá přednosti skenovacích vlastností kvadrupólu v kombinaci s vysokým rozlišením TOF analyzátozu. Q-TOF je možno zkombinovat s ESI i MALDI ionizací (El-Aneed *et al.*, 2009).

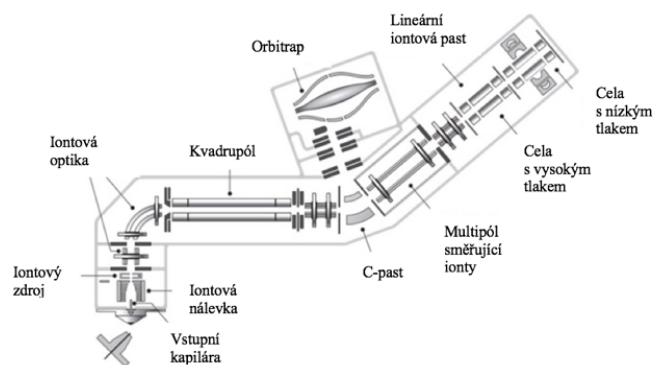


Obrázek č. 8: Schéma hybridního kvadrupólového hmotnostního analyzátozu v kombinaci s TOF analyzátozem. Převzato a upraveno z Lacorte *et* Fernandez-Alba, 2006.

Hybridní hmotnostní analyzátozy v kombinaci s Orbitrapem

Kombinací zapojení několika hmotnostních analyzátozů do jednoho zařízení můžeme zvýšit přesnost detekce hmotnostní analýzy. Konkrétně jedním z hybridních hmotnostních analyzátozů propojených s Orbitrapem je **Orbitrap Fusion Tribrid** od společnosti ThermoFisher Scientific využívaný zejména pro proteomickou analýzu. Kombinuje tři hmotnostní analyzátozy - kvadrupól, lineární iontovou past a Orbitrap (viz obrázek č. 9). Ionty ze zdroje vstupují do analyzátozu vstupní kapilárou a následně jsou

transportovány pomocí iontové nálevky a iontovou optikou jsou unášeny a usměrňovány do kvadrupólu a k analyzátoru podle nastavení analýzy. Analyzátozem může být Orbitrap i lineární iontová past (Senko *et al.*, 2013).



Obrázek č. 9: Schematické znázornění hybridního přístroje Orbitrap Fusion Tribrid. Převzato a upraveno ze Senko *et al.*, 2013.

3.3 Proteomické metody založené na hmotnostní spektrometrii

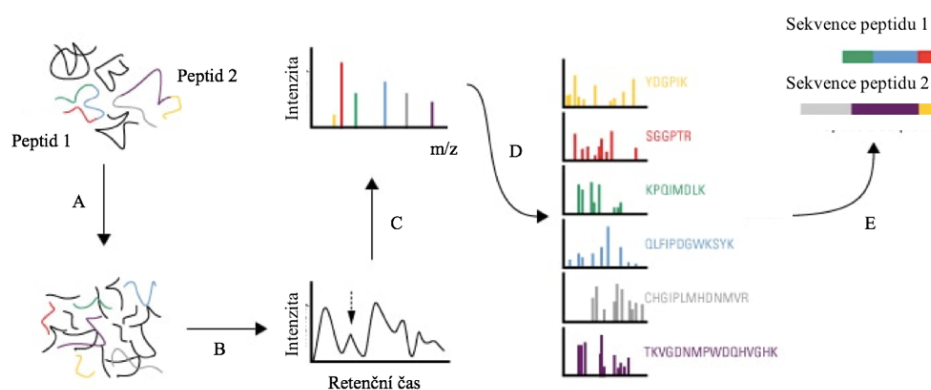
Proteomika je vědní obor zabývající se analýzou veškerého proteinového obsahu (proteomu) buňky, tkáně nebo organismu (Yu *et al.*, 2010). Tento vědní obor se v současnosti velice dynamicky rozvíjí a je oblastí rostoucího zájmu výzkumných laboratoří. Zatímco genomika definuje potenciální genové produkty, proteomika lépe odráží skutečný fenotyp. To zahrnuje například skutečnou expresi (koncentraci) proteinu v důsledku translace nebo regulaci proteinové aktivity prostřednictvím posttranslačních modifikací. Proteomika proto může nabídnout jedinečné informace pro výzkum biomarkerů (Li *et al.*, 2017). A především zde lze využít MS jako metody, která umožňuje stále komplexnější pohled na změny proteomu v moderní personalizované medicíně, a která je využitelná v identifikaci nových tříd nádorově specifických proteoforem, včetně posttranslačních modifikací a variant pocházejících z genomových aberací (Macklin *et al.*, 2020).

Proteomika může být obecně rozdělena na proteomiku necílenou a cílenou.

3.3.1 Necílená proteomika

Předmětem zkoumání necílené proteomiky je téměř úplné pokrytí proteomu, tj. identifikace a kvantifikace co největšího počtu proteinů ve vyšetřovaném vzorku. V necílené analýze vědec odpoví na otázku „Jaké proteiny jsou přítomny ve vzorku?“ (Milman, 2015).

Proteiny vzorku jsou extrahovány a štěpeny na peptidy (viz obrázek č. 10 A). Složky vyšetřovaného vzorku jsou separovány pomocí kapalinové chromatografie (viz obrázek č. 10 B). Frakce se poté analyzují pomocí MS (viz obrázek č. 10 C), během které se peptidy ionizují a měří se jejich poměr hmotnost/náboj (m/z), čímž se získá prekurzorové iontové spektrum. Vybrané ionty jsou poté fragmentovány CID a jednotlivé fragmentové ionty detekovány pomocí MS (viz obrázek č. 10 D). Fragmentům iontových spekter se poté přiřadí peptidové sekvence na základě srovnání v databázi a predikují se proteinové sekvence (viz obrázek č. 10 E) (Ahrens *et al.*, 2010).



Obrázek č. 10: Princip MS/MS proteomické analýzy. A) Extrakce a štěpení peptidů, B) separace peptidů pomocí kapalinové chromatografie, C) MS analýza za vzniku prekurzorového hmotnostního spektra, D) fragmentace vybraných iontů pomocí CID, E) přiřazení peptidové sekvence srovnáním v databázi. Převzato a upraveno z: www.thermofisher.com.

3.3.1 Cílená proteomika

Předmětem zájmu cílené proteomiky je detekovat vybrané proteiny s vysokou citlivostí, reprodukovatelností a kvantitativní přesností. Cílená proteomika zahrnuje získání údajů o konkrétních proteinech a peptidech (Borràs *et Sabidó*, 2017) a s výhodou využívá hmotnostní spektrometrii, která je přínosná v kvantifikaci proteinů (Marx, 2013). V tomto procesu je hmotnostní spektrometr naprogramován tak, aby detekoval specifické

peptidové ionty odvozené od sledovaných proteinů. Tato metoda vyžaduje správné naprogramování hmotnostního spektrometru vložím potřebných údajů k detekci peptidů (Doerr, 2012). Protože používám především metody cílené proteomiky ve svém experimentu, jsou její principy rozvedeny v následující kapitole.

3.4 Metody cílené proteomiky

Vznik celé řady cílených proteomických metod souvisí s použitím různých typů hmotnostních analyzátorů, jako jsou kombinace kvadrupólů, Orbitrapu a TOF, s různými vyhodnocovacími algoritmy a metodami analýzy dat. To vše umožňuje kvantifikovat v rámci detekčních schopností cílené proteomiky tisíce peptidů a proteinů (Selevsek *et al.*, 2015).

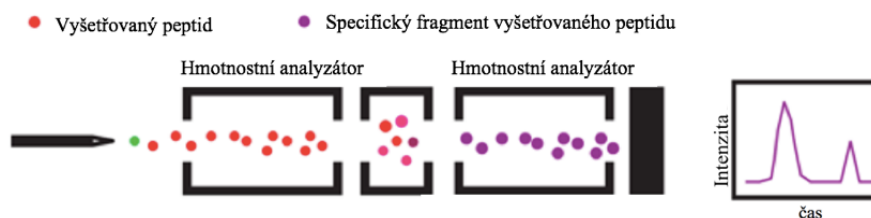
Důležitou součástí analýzy cílených proteomických metod je příprava vzorku. Nejprve jsou v proteinech redukovány disulfidické můstky a vzniklé volné thiolové skupiny jsou alkylovány, poté štěpením proteinů pomocí enzymů vzniknou peptidy. Následně dojde k separaci jednotlivých peptidů pomocí kapalinové chromatografie. Po průchodu vzorku přes sprejovací kapiláru v elektrickém poli dojde k jeho ionizaci a následně k přenosu do hmotnostního spektrometru (Factor *et al.*, 2011). Při cílené proteomice se používá několik specifických módů měření, zejména SRM, MRM a PRM.

3.4.1 Monitorování vybraných reakcí

Monitorování vybraných reakcí (Selected reaction monitoring, SRM) je jednou z hlavních metod používaných v cílených proteomických experimentech (Picotti *et al.*, 2009).

SRM je možno provádět na trojitém kvadrupólu (viz obrázek č. 11), ve kterém je první hmotnostní analyzátor nastaven do filtračního režimu s úzkým izolačním oknem, aby se izoloval specifický požadovaný peptidový prekurzorový iont. Poté je izolovaný peptid fragmentován a jeden z výsledných fragmentovaných iontů je monitorován dalším hmotnostním analyzátozem nastaveným tak, aby opět filtroval konkrétní poměr m/z . Dvojitá selekce iontu prekurzoru peptidu a iontu peptidového fragmentu se nazývá iontový přechod, který je definován jako pár hodnoty m/z prekurzorového iontu vybraného v Q1 a hodnoty m/z jeho produktového iontu vybraného v Q3 (Lange *et al.*,

2008). Pro kvantifikaci jednoho proteinu se využívají nejméně 2 prekurzorové peptidy, každý v jednom či více nábojových stavech. Pro spolehlivou SRM kvantifikaci je následně třeba detekovat alespoň 2 produktové ionty každého peptidu. Z toho vyplývá, že každá kvantifikace proteinu je spojena s minimálně 4 přechody (Faktor *et al.*, 2011).



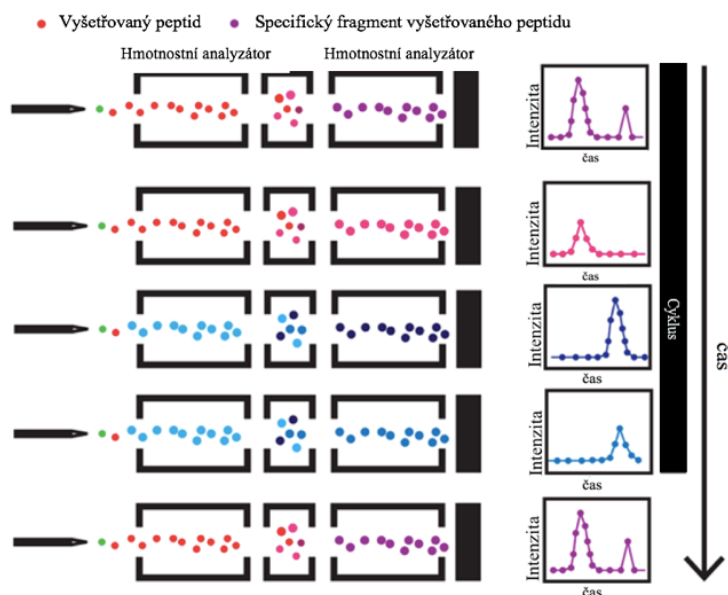
Obrázek č. 11: Schematické znázornění metody SRM zobrazující použití dvojitého filtru ke sledování fragmentového iontu (zobrazen fialovou barvou) ze specifického vybraného peptidu (zobrazen červenou barvou). Převzato a upraveno z Borràs *et Sabidó*, 2017.

Pravděpodobnost, že dva peptidové fragmenty mají stejnou hmotnost nebo vykazují stejný retenční čas je nízká. Proto je metoda cíleného získávání dat pomocí přechodů vysoce specifická, těžší z nízkého chemického šumu, který vede k vysoké citlivosti měření a zároveň dokáže detekovat proteiny ve složitých vzorcích v citlivosti odpovídající několika kopiím v buňce (Picotti *et al.*, 2009).

Monitorování vybraných reakcí může rovněž postupně sledovat několik fragmentů iontů ze stejného peptidu mezi dvěma vzorkovacími událostmi stejného přechodu. Sledováním několika fragmentů stejného peptidového prekurzoru iontu se získávají nejen kvantitativní informace, ale rovněž lze ze získaných údajů také identifikovat peptidy. Typicky se měří tři až pět fragmentovaných iontů na peptid a pro kvantifikaci proteinu jsou použity jeden až tři konkrétní peptidy (Kusebauch *et al.*, 2016, Chiva *et Sabidó*, 2017). Čas mezi dvěma vzorkovacími událostmi stejného přechodu je doba cyklu, a čas, který hmotnostní spektrometr věnuje každému přechodu, je doba měření (Borràs *et Sabidó*, 2017).

Protože tato metoda měří postupně několik fragmentových iontů z různých peptidů, je označována jako sledování vícenásobných reakcí (MRM, Multiple reaction monitoring) (viz obrázek č. 12). SRM i MRM umožňují jak identifikaci tak kvantifikaci peptidu. Navíc vykazují vylepšený dynamický rozsah a citlivost, protože krok dvojitého

filtrování na úrovni prekursoru a fragmentu vede ke zlepšenému poměru signál-šum (Borràs *et Sabidó*, 2017).



Obrázek č. 12: Schematické znázornění metody MRM, která postupně monitoruje několik fragmentů iontů různých peptidů v každém cyklu. Převzato a upraveno z Borràs *et Sabidó*, 2017.

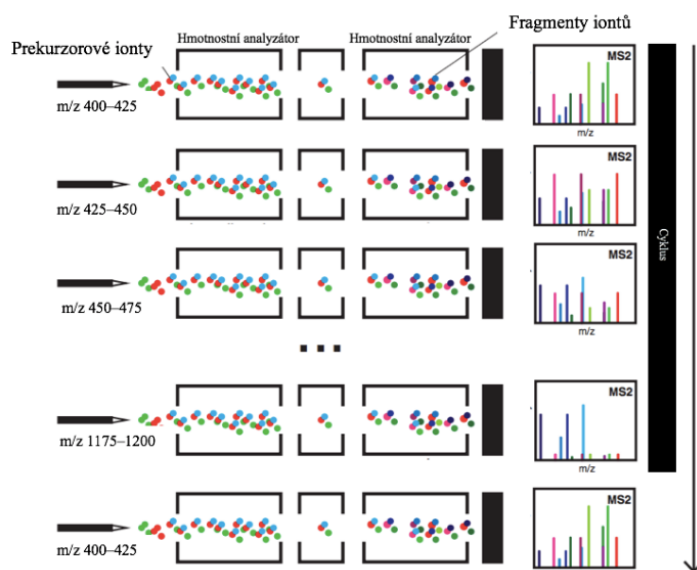
V klinickém využití se SRM ve spojení s protilátkovou imunoafinitou tj. Imuno-SRM jeví jako slibná technologie pro přesnou kvantifikaci cílových proteinů v komplexních maticích (Shi *et al.*, 2012). Tato metoda byla například použita pro kvantifikaci mutovaného Ras proteinu v nádorech pacientů pomocí anti-RAS proteinové protilátky (Ruppen-Cañás *et al.*, 2012) a také ke kvantifikaci proteinu FGF15 (Katafuchi *et al.*, 2015).

Dalším klinickým využitím SRM je použití aptamerů (jednořetězcový oligonukleotid DNA) k obohacení cílových proteinů pro analýzu SRM. Například ve srovnání s přímou SRM kvantifikací ReIA genu a přidružených proteinů z buněčných extraktů obohacení proteinů pomocí aptameru zvýšilo přesnost a reprodukovatelnost kvantifikace (Zhao *et al.*, 2011).

3.4.2 Monitorování paralelních reakcí

Monitorování paralelních reakcí (Parallel reaction monitoring, PRM) je metoda prováděná na hmotnostním spektrometru, který využívá kombinaci hmotnostních analyzátorů kvadrupól-Orbitrap. Oproti metodě SRM prováděné na trojitém kvadrupólu má PRM větší rozlišení, díky vyšší schopnosti zachycení iontů je přesnější (Bourmaud *et al.*, 2016) a zároveň usnadňuje analýzu peptidů s nízkým výskytem (Gallien *et al.*, 2014). Mezi další specifické vlastnosti PRM analýzy využívající hmotnostní analyzátor kvadrupól-Orbitrap patří možnost filtrace peptidů v kvadrupólu, následná fragmentace v kolizní cele, možnost multiplexování fragmentů v C-pasti a konečně vysoká rozlišovací schopnost hmotnostního analyzátoru Orbitrap (Bourmaud *et al.*, 2016). Rovněž však byly také publikovány aplikace PRM na hmotnostních spektrometrech v kombinaci kvadrupól-TOF (Schilling *et al.*, 2015). Ve své práci využívám PRM metodu prováděnou na hmotnostním spektrometru kombinujícího kvadrupól-Orbitrap.

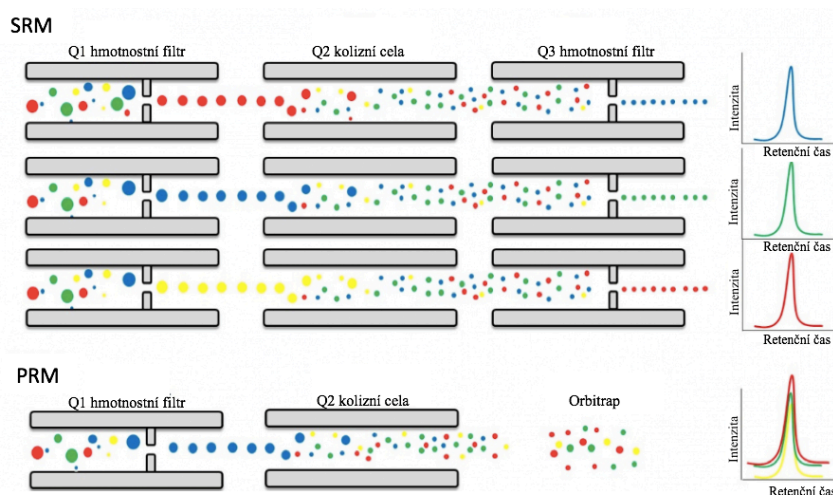
Podobně jako u jakéhokoli cíleného experimentu jsou v analýze PRM nejprve izolovány předdefinované prekurzorové ionty během monitorované chromatografické eluce v kvadrupólovém hmotnostním filtru na základě přednastavené šířky izolačního okna. Poté jsou prekurzorové ionty přeneseny do kolizní cely a fragmentovány při výchozí kolizní energii (pro každý prekurzor existuje definovaná optimální kolizní energie). Výsledné fragmentové ionty jsou přeneseny zpět do C-pasti a vypuzeny do Orbitrapu k analýze (viz obrázek č. 13) (Gallien *et al.*, 2012). Identifikace skupiny fragmentových iontů a peptidových prekurzorů závisí na parametrech, jako je retenční čas a relativní intenzita fragmentovaných iontů. Výsledná peptidová spektra jsou vyhodnocována za pomoci příslušného softwaru. Nejrozšířenějším programem pro tento druh vyhodnocení je Skyline (viz obrázek č. 13) (Röst *et al.*, 2016).



Obrázek č. 13: Schematické znázornění metody PRM analýzy využívající cílených sběr dat na úrovni iontových fragmentů (MS2). První hmotnostní analyzátor filtruje peptidové prekurzory, které jsou následně fragmentovány v kolizní cele a výsledné fragmenty iontů jsou detekovány nejčastěji v Orbitrap hmotnostním analyzátoru. Převzato a upraveno z Borràs et Sabidó, 2017.

Důležitým parametrem při optimalizaci PRM analýzy je doba cyklu (tj. doba, za kterou přístroj jedenkrát kvantifikuje všechny požadované přechody), která je definována na základě chromatografické separace potřebné k tomu, aby se shromáždil dostatečný počet datových bodů přes eluční profil každého sledovaného peptidu. Obvykle se jedná o osm až deset bodů, což vede při době cyklu 2,5 sekundy k celkové době 20–30 sekund udávající šířku chromatografického píku. Lze si přednastavit dvě základní schémata měření, v nichž je dána přednost buď rozsahu experimentu (počet analytů) nebo selektivitě a citlivosti měření s přesným počtem sledovaných peptidů. V závislosti na účelu experimentu je takto zvoleno specifické nastavení přístroje (Bourmaud *et al.*, 2016).

PRM analýza nachází klinické využití především v onkologii při vyšetření vzorků plazmy u pacientů s rakovinou plic (Kim Y. *et al.*, 2015). Kombinace imunoafinitní purifikace a PRM (tj. Imuno-PRM) umožňuje rychlý screening mutací spouštějících onkologické procesy v tkáni a nádorových markerů v lidské plazmě (Lesur *et al.*, 2015).



Obrázek č. 14: Schematické znázornění rozdílu mezi metodou SRM a PRM analýzy cílených dat na úrovni iontových fragmentů (MS2). SRM využívá trojitého kvadrupólu. Q1 funguje jako filtr pro izolaci peptidových prekurzorů. Izolované peptidy jsou poté fragmentovány v Q2, který funguje jako kolizní cela a poskytované peptidové fragmenty jsou izolované v Q3. PRM pracuje na obdobném principu jako SRM, ale v PRM jsou peptidové fragmenty měřeny všechny společně v Orbitrap analyzátoru. Převzato a upraveno z www.biocev.cz.

K analýze dat získaných metodou SRM i PRM z hmotnostního analyzátoru je používán počítačový software Skyline (Schilling *et al.*, 2015). Jedná se o otevřený zdroj dat, který je volně k dispozici pro akademické a komerční využití. Skyline podporuje použití a vytváření MS/MS spektrálních knihoven z celé řady zdrojů, filtruje data získaná pomocí SRM/PRM metod a ověřuje výsledky na základě dříve pozorovaných dat získaných z iontové pasti. Tento software exportuje seznamy přechodů a importuje nativní výstupní soubory z trojitých kvadrupólových analyzátorů Agilent, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific a Waters a spojuje výstup hmotnostního spektrometru zpět s experimentálním návrhovým dokumentem (MacLean *et al.*, 2010). Software Skyline podporuje čtení různých formátů veřejné spektrální knihovny. Vytváří také knihovny BiblioSpec (Frewen *et al.*, 2006) vzniklé z výsledků vyhledávání peptidů. Tyto knihovny poskytují plný přístup k informacím pro interpretaci výsledků peptidového spektra získaných v laboratořích, jakož i informace uložené v úložištích, jako je PeptideAtlas (Desiere, 2006).

3.5 Využití cílené proteomiky v klinické praxi

Cílená proteomika je zcela zásadní metoda především při objevování a analýze biomarkerů, přičemž právě hledání biomarkerů hraje důležitou roli ve většině biomedicínských oblastí a v aplikované medicíně. Cílená proteomika byla jmenována v roce 2012 časopisem *Nature Methods* metodou roku, a to kvůli její vhodnosti pro detekci potencionálních biomarkerů a vhodných klinických aplikací (Gillette *et Carr*, 2013).

Národní institut pro rakovinu (National Cancer Institute) definuje biomarker jako biologickou molekulu nacházející se v krvi, ostatních tělních tekutinách nebo v tkáních, která poskytuje indikaci normálního nebo abnormálního procesu nebo nemoci. Biomarkery se využívají při včasné detekci, diagnostice, prognóze a výběru léčby v onkologické klinické praxi. Rutinní měření biomarkerů a lepší možnosti léčby v onkologii vedou k postupnému snižování úmrtnosti na rakovinu (Siegel *et al.*, 2018).

Identifikace biomarkerů souvisejících s konkrétním onemocněním vyžaduje spolehlivé, kvantitativní způsoby stanovení přítomnosti proteinů. Hmotnostní spektrometry jsou velice vhodné nástroje k řešení výše uvedené problematiky. Přestože je počet a identita genů kódujících proteiny u lidí známa, potencionální počet proteinů je kvůli mnoha možným sestřihovým formám a postranlačních modifikacích velmi vysoký (Marx, 2013).

Biomarkery u onkologických onemocnění zcela zásadně transformují současné diagnostické a terapeutické postupy. Mezi základní diagnostické postupy v onkologii patří především imunohistochemické metody detekující onkologické markery, např. proteinové markery HER2 (receptor pro lidský epidermální růstový faktor), ER (estrogenový receptor) a PgR (progesteronový receptor), které se používají ke klasifikaci podtypů rakoviny prsu. To má významný vliv pro výběr vhodné léčby, přičemž ER a PgR-pozitivní tumory jsou léčeny endokrinní terapií, zatímco HER2-pozitivní status je předpokladem pro cílenou imunoterapii (Vyberg *et al.*, 2015). Imunohistochemie (IHC) je také používána při zkoumání různých druhů malignit, včetně reakcí nádorových buněk na onkologickou léčbu. Důležitým markerem je zjištění rozsahu oxidačního stresu nádorových buněk např. HIF1 α (Kim J. *et al.*, 2015), nebo IHC diagnostika infiltrace

tkáně imunitními buňkami např. CD69+ aktivovanými lymfocyty v melanomu (Hillen *et al.*, 2008). Své výhody má neustále zdokonalovaná ELISA používaná ke kvantifikaci proteinových biomarkerů v různých tělních tekutinách, jako je např. prostatický specifický antigen v krvi pacientů s podezřením na rakovinu prostaty (Łupicka-Słowik *et al.*, 2019). Hlavní výhodou výše uvedených metod je především vysoká specificita, nízká cena a snadná dostupnost. Mezi nevýhody patří především relativně úzké diagnostické spektrum (nutná znalost vyšetřovaného proteinu) a omezená schopnost multiplexování (Macklin *et al.*, 2020).

Komplexní proteomické techniky založené na hmotnostní spektrometrii použitelné pro kvantifikaci proteinů z klinických vzorků jsou zcela nezastupitelné ve výzkumu a vývoji nových diagnostických a terapeutických postupů v moderní onkologii. MS je diagnostická metoda, která umožňuje stále komplexnější pohled na změny proteomu v medicíně díky novým možnostem identifikace nádorově specifických proteoforem, včetně posttranslačních modifikací a variant pocházejících z genomových aberací. Překrytí proteomických dat doplněním genomových a transkriptomických datových sad vytváří novou oblast proteogenomiky s velkým potenciálem v onkologii. Všechny výše uvedené metody urychlují posun směrem k tomu, aby se MS stala pravidelnou součástí rutinní analýzy a klinické praxe (Macklin *et al.*, 2020).

Proteiny biomolekul se účastní většiny biologických procesů, jsou ideálním prediktorem progresu onemocnění (Yaffe, 2019) a také jsou cílem většiny moderních terapeutik, včetně dynamicky se rozvíjející imunoterapie. To dělá z klinické proteomiky nezaměnitelnou oblast v klinickém molekulárním výzkumu (Macklin *et al.*, 2020). Jako příklad lze demonstrovat použití cílené metody PRM-MS k měření úrovní exprese markerů rakoviny prsu HER2, která byla publikována v recentní literatuře (Park *et al.*, 2020). Výsledky publikované v této studii nejen že dobře korelovaly se standartními IHC hodnotami, ale navíc rozlišovaly tzv. „šedou zónu“, což samotná IHC nedokáže.

MS se ukázala rovněž jako velice užitečná ve vývoji nových léčiv ve farmaceutickém průmyslu. Zde lze MS využít pro hledání nových potenciálních lékových cílů v rámci cílené terapie, zkoumání mechanismů působení léků a interakcí protein-protein a identifikaci biomarkerů ze snadno dostupných biologických tekutin (Frantzi *et al.*, 2019). Nedávno bylo zavedeno termální profilování proteomu (Reinhard *et al.*, 2015),

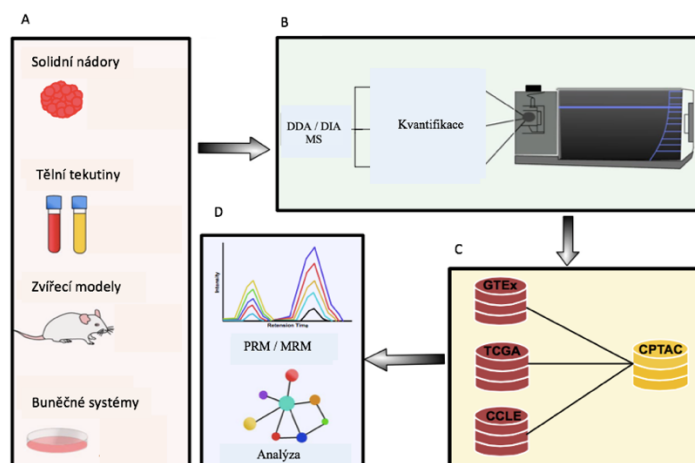
kdy změny tepelné denaturace proteinu za různých tepelných podmínek jsou reprezentativní pro interakce protein-ligand, což lze využít pro vysoce výkonný screening inhibitorů za účelem vývoje nových farmak (Mateus *et al.*, 2016). Technologie MS je využita v buněčných liniích ke sledování inhibitorů kináz (Savitski *et al.*, 2014), transmembránových povrchových proteinů buněk (Reinhard *et al.*, 2015) a dokonce k „on-target“ a „off-target“ účinku chemoterapeutik jako je methotrexát (Huber *et al.*, 2015).

3.5.1 Výběr vzorků pro klinickou proteomickou analýzu

Klinická proteomika (viz obrázek č. 15) zkoumá různé typy vzorků, mezi které patří solidní nádory, tělní tekutiny pacienta, zvířecí modely a buněčné systémy. Nádorové tkáně se získávají buď jako chirurgicky resekované vzorky, nebo prostřednictvím biopsie. Mezi nejčastěji používané tělesné tekutiny patří krev (zpracovaná na plazmu nebo sérum) a moč (Macklin *et al.*, 2020).

Buněčné linie zahrnují nesmrtelné rakovinné buněčné linie nebo sofistikovanější organoidní systémy, které jsou vytvořeny pomocí definovaných kultivačních podmínek a primárního materiálu pacienta. Před proteomickými analýzami jsou vzorky získané z těchto zdrojů homogenizovány a proteolyticky štěpeny (Macklin *et al.*, 2020).

Vlastní proteomická analýza, která zahrnuje „label-free“ metody, izobarické značení nebo specifické obohacení posttranslační modifikací jako je např. fosforylace, ubikvitinace, glykosylace. Následuje srovnání získaných informací s veřejně dostupnými zdroji proteomických dat - CPTAC (Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium), transkripčních profilů - GTEx (The Genotype-Tissue Expression), CCLE (The Cancer Cell Line Encyclopedia), TCGA (The Cancer Genome Atlas) a bioinformatické analýzy pro cílenou validaci proteomických dat získaných pomocí monitorování vícenásobných reakcí a monitorování paralelních reakcí (Macklin *et al.*, 2020).



Obrázek č. 15: Schéma využití MS v klinické praxi. A) Pro klinickou proteomiku se používají různé typy vzorků, mezi které patří solidní nádory, tělní tekutiny pacienta, zvířecí modely a buněčné systémy. B) Vlastní proteomická analýza zahrnující např. „label-free“ metody nebo izobarické značení. C) Srovnání získaných informací s veřejně dostupnými zdroji proteomických dat - CPTAC (Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium) a transkripčních profilů - GTEx (The Genotype-Tissue Expression), CCLE (The Cancer Cell Line Encyclopedia) a TCGA (The Cancer Genome Atlas). D) Bioinformatické analýzy pro cílenou validaci proteomických dat získaných pomocí monitorování vícenásobných reakcí (MRM) a monitorování paralelních reakcí (PRM). Převzato a upraveno z Macklin *et al.*, 2020.

3.6 Fibroblastový růstový faktor 23

3.6.1 Onkologický význam FGF proteinů

FGF (Fibroblast growth factor, fibroblastový růstový faktor) proteiny mají v lidském organismu důležitou roli v regulaci buněčné proliferace, migrace, morfogeneze a angiogeneze. Aberantní signalizace FGF proteinů má zásadní význam ve vývoji rakoviny, reparaci tkání a tumorigenezi malignit rozličných lokalizací, což vysvětluje jejich podíl na vývoji několika lidských nádorů (Eswarakumar *et al.*, 2005, Grose *et Dickson*, 2005), včetně lidských primárních mozkových nádorů, mezi které patří maligní gliom (Todo *et al.*, 1998). V roce 2008 publikoval Allerstorfer (Allerstorfer *et al.*, 2008) výsledek studie na buněčné linii glioblastomu se závěrem, že FGF5 přispívá k maligní progresi lidských astrocytických nádorů mozku autokrinními i parakrinními účinky. Rovněž jsou zkoumány možnosti využití potenciálu blokady receptorů fibroblastového růstového faktoru jako terapeutického cíle v angiogenezi zhoubných nádorů, mimo jiné i glioblastomu (Ronca *et al.*, 2015).

FGF23 protein je nadměrně exprimován v tkáních rakoviny prostaty. Studie na buněčných liniích rakoviny prostaty ukázaly, že působí jako autokrinní, parakrinní a endokrinní růstový faktor (Feng *et al.*, 2015). Protein FGF23 je také nadměrně produkován některými typy benigních nádorů, jako je např. benigní mezenchymální nádor nebo fosfaturický mezenchymální tumor způsobující nádorem indukovanou osteomalácií (Chong *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2014).

3.6.2 Funkce FGF23 proteinu v organismu

FGF23 protein objevený v roce 2000 (White *et al.*, 2000) je nezbytný pro regulaci hladiny fosfátů v těle (fosfátová homeostáza). Mezi mnoha dalšími funkcemi hraje fosfát v dětství rozhodující roli při tvorbě a růstu kostí a pomáhá udržovat pevnost kostí u dospělých. Hladina fosfátů je z velké části kontrolována ledvinami. Ledviny normálně zbavují tělo přebytečného fosfátu vylučováním do moči a reabsorbují tento minerál do krevního řečiště, když je zvýšena jeho potřeba. FGF23 signalizuje ledvinám, aby přestaly reabsorbovat fosfát do krevního řečiště. Dále inhibuje renální tubulární transport fosfátů snížením hladin SLC34A1 (sodium-dependent phosphate transporter 2A). Také působí přímo na příštítná tělíska a snižuje sekreci parathormonu. Reguluje metabolismus vitamínu D. Negativně reguluje diferenciaci osteoblastů a mineralizaci kostní matrix (www.medlineplus.gov).

Funkční protein o plné délce může být deaktivován štěpením na N- a C- konci. Mutace tohoto štěpného místa má za následek autozomálně-dominantní hypofosfatemickou křivici. Mutace v genu způsobuje hyperfosfatemickou familiární nádorovou kalcinózu (www.genecards.org).

Protein FGF23 se podílí na patogenezi různých onemocnění. Jak jsem již výše uvedla je pro FGF23 je charakteristický vztah k různým poruchám homeostázy fosfátů. Mezi klinické jednotky zahrnující výše uvedené patří autozomálně-dominantní hypofosfatemická křivice, X-vázaná hypofosfatemická křivice, nádorem indukovaná osteomalacie a fibrózní dysplazie (Bhattacharyya *et al.*, 2012). Mezi podjednotky fibrozní dysplazie patří sinonazální fosfaturický mezenchymální tumor. Detekce FGF23 výrazně zpřesňuje a usnadňuje stanovení diagnózy u pacientů s tímto raritním onemocněním (Arnaoutakis *et Naseri*, 2015).

Všechna výše uvedená onemocnění s podobnými fenotypy charakterizuje hypofosfatemie způsobená ztrátou fosfátu močí s následnou osteomalácií a křivici (Chong *et al.*, 2011).

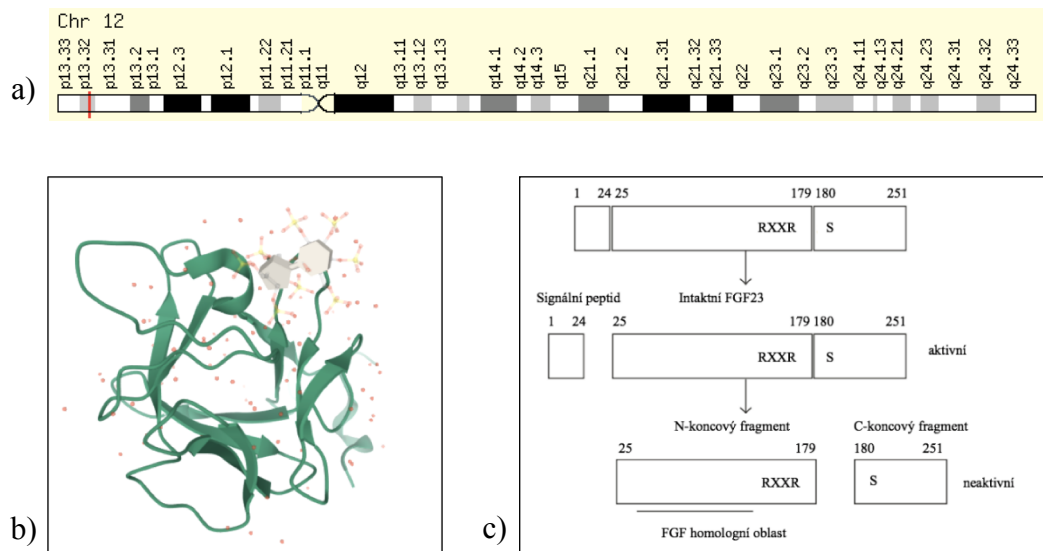
3.6.3 Vztah proteinu FGF23 a vitamínu D

Vztah proteinu FGF23 a vitamínu D je velice komplexní a komplikovaný v závislosti na množství dalších regulujících faktorů. Jsou publikovány četné práce, které vnášejí nové poznatky do tohoto složitého regulačního mechanismu. FGF23 je protein převážně exprimovaný v osteoblastech a osteocytech, který v ledvinách způsobuje inhibici reabsorpce renálního fosfátu (Liu *et al.*, 2003). FGF23 je jedním hlavních regulátorů homeostázy vápníku a fosfátu v organismu. Spolu s kalcitriolem (1,25-dihydroxyvitamin D) a parathormonem je součástí komplexního systému tkáňové zpětné vazby (Blau *et Collins*, 2015). FGF23 se účastní metabolické osy kost-ledvina v rámci regulace hladiny kalcitriolu a regulaci hospodaření s fosfáty ledvinami (Quarles, 2012). Dále způsobuje inhibici metabolismu kalcitriolu a rovněž stimulaci katabolismu kalcitriolu. Výše uvedené skutečnosti mají zásadní vliv na hospodaření organismu s vápníkem a s fosfáty (Shimada *et al.*, 2004).

3.6.4 Struktura genu a proteinu FGF23

Gen FGF23 kóduje protein patřící do rodiny proteinů fibroblastového růstového faktoru, které regulují velké množství vývojových procesů (Beenken *et Mohammadi*, 2009). Gen FGF23 je lokalizován na chromozomu 12 (12p13.32) a jeho molekulová hmotnost je 27954 Da (viz obrázek č. 16 a) (www.genecards.org).

Gen FGF23 je exprimován jako protein složený z 251 aminokyselin. Signální peptid tvořící 24 aminokyselin a sekretovaný protein FGF23 složený z 227 aminokyselin. Sekretovaný protein FGF23 je dále proteolyticky štěpen mezi aminokyselinou argininem na pozici 179 a aminokyselinou serinem na pozici 180 na neaktivní fragmenty pomocí enzymů, které rozpoznávají motiv 176R-177X-178X-179R označující místo štěpení (viz obrázek č. 16 b, c) (Saito *et Fukumoto*, 2009).



Obrázek č. 16: FGF23 protein. a) Schematické znázornění lokalizace genu FGF23 na chromozomu 12. Převzato z www.genecards.org. b) Struktura proteinu FGF23. Převzato z www.rcsb.org. c) Schéma aktivace FGF23 proteinu. Převzato a upraveno z Saito *et* Fukumoto, 2009.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Biologický materiál

Chymotrypsin (Promega, kat. č. V1061)

FGF23 protein (R&D system, kat. č. 2604-FG)

Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, kat. č. A7906)

Lyofilizovaná směs enzymů Trypsin/Lys-C (Promega, kat. č. V5071)

Mikrodisekované tkáňové řezy (FFPE) připravené z amyloidu mozkové tkáně

Trypsin (Promega, kat. č. V507A)

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

Aceton (C_3H_6O) (Sigma-Aldrich, kat. č. 650501)

Acetonitril (CH_3CN , ACN) (Sigma-Aldrich, kat. č. 1.00029)

Chloroacetamid (C_2H_4ClNO , CAA) (Sigma-Aldrich, kat. č. 22790)

Deionizovaná voda určená pro MS analýzu (MS H_2O , Merck Millipore)

Dithiothreitol ($C_4H_{10}O_2S_2$, DTT) (Sigma-Aldrich, kat. č. 1610611)

Dodecylsulfát sodný ($NaC_{12}H_{25}SO_4$, SDS) (Sigma-Aldrich, kat. č. 71729)

Deoxycholát sodný ($C_{24}H_{39}NaO_4$, SDC) (Sigma-Aldrich, kat. č. 30970)

Ethylacetát ($C_4H_8O_2$, EtAc) (Fluka, kat. č. 14264)

Hydrogenuhličitan amonný (NH_4HCO_3 , ABC) (Sigma-Aldrich, kat. č. 09830)

Jodacetamid (C_2H_4INO , IAA) (Sigma-Aldrich, kat. č. I1149)

Kyselina mravenčí (CH_2O_2 , FA) (Sigma-Aldrich, kat. č. 56302)

Kyselina trifluoroctová ($C_2HF_3O_2$, TFA) (Thermo ScientificTM, kat. č. 85183)

Methanol (CH_4O) (Sigma-Aldrich, kat. č. 1.06035)

Močovina (CH_4N_2O , UA) (Sigma-Aldrich, kat. č. U5378)

Mravenečnan amonný (CH_5NO_2) (Sigma-Aldrich, kat. č. 70221)

PierceTM kyselina trifluoroctová ($C_2HF_3O_2$) (Thermo ScientificTM, kat. č. 85183)

Pierce[®] 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo ScientificTM, kat. č. 22660)

PierceTM BCA (kyselina bicinchoninová) Assay Reagent A (Thermo ScientificTM, kat. č. 23223)

Pierce™ BCA (kyselina bicinchoninová) Protein Assay Reagent B (Thermo Scientific™, kat. č. 23224)

Tris-HCl (Sigma-Aldrich, kat. č. T3253)

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (SERVA, kat. č. 37180)

Tris (2-karboxyetyl)fosfin hydroxychlorid (TCEP) (Sigma-Aldrich, kat. č. C4706)

Použité roztoky a jejich příprava

ABC roztok (0,05 mol.l⁻¹ NH₄HCO₃ v MS H₂O)

ACN s TFA (80% ACN s 0,1% TFA v MS H₂O; 2% ACN s 0,1% TFA v MS H₂O)

BCA assay kit (roztok reagensie A - uhličitanový pufr a BCA; reagensie B - roztok síranu měďnatého v poměru 50:1)

BSA protein standardy (koncentrace 125 µg.ml⁻¹; 250 µg.ml⁻¹; 500 µg.ml⁻¹; 750 µg.ml⁻¹; 1000 µg.ml⁻¹; 1500 µg.ml⁻¹ a 2000 µg.ml⁻¹.)

Dithiotreitol (0,3 mol.l⁻¹ DTT v MS H₂O)

Eluční roztok (80% ACN, 1% NH₄OH v H₂O)

FASP lyzační pufr (4% SDS, 0,1 mol.l⁻¹ DTT v 0,1 mol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,6)

Jodacetamid pro digesci v roztoku (0,5 mol.l⁻¹ IAA v MS H₂O)

Jodacetamid pro FASP (0,05 mol.l⁻¹ IAA v UA)

LC-LOAD roztok (1% ACN, 0,05% TFA)

Lyzační pufr (1% SDC, 10 mmol.l⁻¹ TCEP, 40 mmol.l⁻¹ CAA v 100 mmol.l⁻¹ Tris pufru, pH 8,5)

Promývací roztok 1 (1% TFA v etanolu)

Promývací roztok 2 (0,2% TFA v H₂O)

SDB-RPS (100 mmol.l⁻¹ mraveněčan amonný, 40% ACN, 0,5% kyselina mravenčí)

Stop pufr (1% TFA v H₂O, pH 2)

UA roztok (8 mol.l⁻¹ močovina v 0,1 mol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,5)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Analytické váhy SBC21 (Scaltec, Německo)
Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Německo)
Centrifuga ROTINA 420R (SigmaAldrich, Německo)
Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)
Kapalinový chromatograf Thermo UltiMate 3000 spojený s hmotnostním spektrometrem Thermo Orbitrap Fusion (Thermo Scientific, Německo)
Magnetická míchačka s ohřevem MSH 300 (Biosan, Lotyšsko)
MS Vortex Incubator (Major Science, USA)
pH metr UltraBasic UB-10 (Denver Instruments)
Spektrofotometr PerkinElmer Envision (PerkinElmer, USA)
Třepačka Reax control (Heidolph, Německo)
Vakuová odparka Concentrator 5301 (Eppendorf, Německo)
Vyhřívavý termostat Bio TDB-100 (Biosan, Lotyšsko)
Zásobník deionizované vody Milli-Q (Millipore, Francie)

Software

Databáze UniProt, stažena dne 13. 10. 2020
MaxQuant verze 1.6.7.0
Microsoft Excel 2010
Perseus software verze 1.6.5.0
Skyline software verze 4.1
Thermo Xcalibur verze 4.2.47

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Vyšetřované vzorky byly zpracovány dle protokolu č. 1–6, přičemž jednotlivé protokoly byly použity vícekrát a některými parametry se odlišovaly (např. vyšetřovaný protein, použitý enzym). Postupy jednotlivých protokolů jsou podrobně rozepsány níže, viz protokoly č. 1–6, a jejich konkrétní aplikace je rozepsána ve výsledkové části.

Protokol č. 1: Postup štěpení proteinů enzymem v roztoku.

K připraveným vzorkům proteinu přidat 99 μl ABC roztoku pro naředění. Pro redukci disulfidických můstků přidat k připravené směsi 4 μl 65 mmol.l^{-1} roztoku DTT, poté vzorky inkubovat po dobu 15 minut při teplotě 50 °C v termostatu.

Následně přidat 8,3 μl 135 mmol.l^{-1} roztoku IAA k navázání alkylů na vzniklé volné thiolové skupiny, přičemž proces alkylace probíhá při pokojové teplotě a ve tmě. Pro zastavení procesu alkylace přidat 4,5 μl 65 mmol.l^{-1} roztoku DTT a poté 100 μl ABC roztoku pro naředění.

Následně přidat k připravené směsi enzym (trypsin/chymotrypsin) a takto připravené vzorky inkubovat 3 h při určité teplotě (25 °C/37 °C).

Protokol č. 2: Postup štěpení proteinu trypsinem na filtru (FASP).

Připravit vzorky obsahující zkoumaný protein. Digesti provést na filtru Microcon YM-30 ve filtrační mikrozkuhavce (Centrifugační filtrační mikrozkuhavky Microcon YM-30, Millipore, Francie). Na filtr mikrozkuhavky napipetovat 30 μl roztoku proteinů s 200 μl UA a vzorky centrifugovat při 14 000 g po dobu 15 minut. Následně přidat 100 μl 0,05 mol.l^{-1} jodacetamidu v UA. Takto připravené mikrozkuhavky nechat 3 sekundy zvortexovat a inkubovat 20 minut ve tmě. Po inkubaci mikrozkuhavky zcentrifugovat při 14 000 g 10 minut. Na filtr napipetovat 100 μl UA a mikrozkuhavky zcentrifugovat při 14 000 g 15 minut. Tento krok zopakovat dvakrát. Přidat 100 μl 0,05M roztoku ABC a mikrozkuhavky opět zcentrifugovat při 14 000 g po dobu 10 minut. Tento krok opět zopakovat dvakrát. Filtry přenést do nových mikrozkuhovek a následně přidat trypsin. Mikrozkuhavky nechat 3 sekundy zvortexovat a následně inkubovat při 37 °C přes noc (18 hodin).

Protokol č. 3: Postup purifikace naštěpených peptidů a příprava vzorku pro MS analýzu.

K purifikaci proteinů použít „STAGE tips“ (STop And Go Extraction) s C18 membránou, které musí být aktivovány ve třech krocích: přidat 100 μl methanolu s následnou centrifugací při 3000 g po dobu 2 minut, poté přidat 100 μl 80% roztoku ACN s 0,5% AA

s následnou centrifugací při 3000 g po dobu 2 minut, nakonec přidat 100 µl 0,5% roztoku AA s následnou centrifugací při 3000 g po dobu 2 minut.

Poté připravené vzorky zcentrifugovat při 3000 g po dobu 2 minut a promýt 100 µl 0,5% roztoku AA a opět zcentrifugovat při 3000 g po dobu 2 minut. Následně špičky s C18 kolonou přenést do nových mikrozkušavek a jejich obsah eluovat 100 µl 80% roztokem ACN s 0,5 % AA. Mikrozkušavky s eluovanými peptidy umístit do vakuové sušičky po dobu 60 minut. Ke vzorku přidat 100 µl 2% roztoku ACN 0,1% TFA a následně 20 µl vzniklého roztoku přepipetovat do vialek určených pro MS analýzu.

Protokol č. 4: Příprava FFPE vzorku k MS analýze.

K vyřezaným deparafilizovaným vzorkům (FFPE vzorkům), přidat pro lýzu buněk 50 µl lyzačního pufru, vložit na termoblok (95 °C, 1000 rpm, 60 minut) a stočit v centrifuze při 3000 g po dobu 10 sekund.

Pro štěpení přidat 1000 µl H₂O k 20 µg lyofilizované směsi enzymů LysC/Trypsin a promíchat při 500 rpm po dobu 10 minut. Poté přidat 50 µl enzymové směsi ke vzorku a vložit jej na termoblok (37 °C, 500 rpm, 3 h). Následně přidat 75 µl „Stop“ pufru a promíchat, poté přidat 75 µl 1% TFA v EtAc. Stočit pomocí centrifugy při 300 rfc po dobu 10 sekund.

Pro purifikaci veškerý vzorek (250 µl) nanést na „StageTip“ SDB-RPS (3 vrstvy, 1 vrstva = 1 µl SDB-RPS) a centrifugovat při 2000 g po dobu 3 minut. Nanést 100 µl promývacího roztoku na „StageTip“ SDB-RPS a centrifugovat při 2000 g 3 minuty. Poté nanést 100 µl promývacího roztoku 2 na „StageTip“ SDB-RPS a centrifugovat při 2000 g po dobu 3 minut. Přenést „StageTip“ SDB-RPS do eluční zkumavky a nanést na něj 100 µl elučního roztoku a centrifugovat při 2000 g 3 minuty. Eluát odpařit v odparce (45 °C do celkového odpaření). Peptidy rozpustit v „LC-LOAD“ roztoku, aby vznikla koncentrace 1 µg/µl. Vzorky promíchat na třepačce při 500 rpm do dobu 5 minut.

Protokol č. 5: Postup měření koncentrace peptidů metodou BCA.

Na mikrotitrační destičku napipetovat pod sebe vždy 25 μl BCA standardů v koncentracích 125 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 750 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 1500 $\mu\text{g/ml}$, a 2000 $\mu\text{g/ml}$ ve dvou řadách, jako blank do prvních jamek napipetovat MS H_2O . Následně v další řadě samostatně pod sebe napipetovat 25 μl vzorků peptidů. Jako blank napipetovat do první jamky roztok ABC.

Poté do všech jamek připipetovat 200 μl BCA roztoku a mikrotitrační destičku inkubovat 30 minut při 37 °C. Na spektrofotometru změřit absorbanci při vlnové délce $\lambda = 562 \text{ nm}$.

Protokol č. 6: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro všechna měření a následné zpracování pomocí softwarových programů.

Všechna měření byla provedena na hmotnostním spektrometru Orbitrap Fusion (Thermo) spojeným s iontovým zdrojem Proxeon Easy-Spray a chromatogramem Ultimate 3000 RSLC nano. Na odsolovací kolonu PepMap 100 (75 μm x 2 cm, 3 μm , velikost pórů 100 Å; Thermo) zapojenou „in-line“ s analytickou kolonou PepMap RSLC (75 μm x 15 cm, 3 μm , velikost pórů 100 Å; Thermo) vyhřívanou na 35 °C byly nanесeny 2 μl vzorku. Jako mobilní fáze A byla použita 0,1% FA v H_2O , jako mobilní fáze B 0,1% FA v acetonitrilu. Průtok mobilní fáze byl 300 $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplota kolony byla nastavena na 35 °C. Izolační okno 2 m/z. Jako typ detektoru byl použit Orbitrap, jako typ iontového zdroje byla použita ionizace nanosprejem (NSI). Polarita byla pozitivní.

Uvedené parametry byly použity pro všechny experimenty, rozdílné parametry jsou následně uvedeny v jednotlivých experimentech ve výsledkové části.

Všechna data byla zpracována pomocí programu Xcalibur™ Software (Thermo Fisher Scientific) a následně nahrána do programu Skyline (viz výsledky).

5 VÝSLEDKY

5.1 Cílená MS analýza vzorku obsahujícího FGF23 protein

Cílem experimentu bylo cílenou MS analýzou detekovat prekurzory peptidů včetně jejich dceřinných fragmentů odpovídající FGF23 proteinu. Jako vzorek byl použit čistý rekombinantní FGF23 protein. V rámci přípravy vzorků byl použit ke štěpení proteinu trypsin u vzorku 1 a chymotrypsin u vzorku 2.

Byly připraveny 2 vzorky obsahující 1 µg proteinu FGF23 (FGF23-1 a FGF23-2). Vzorky byly zpracovány dle protokolu č. 1. Posledním krokem zpracování vzorků bylo štěpení připravené směsi enzymem. Ke vzorku FGF23-1 byl přidán 1 µl trypsinu o koncentraci 0,5 µg/ml a takto připravený vzorek byl inkubován 3 h při teplotě 37 °C. K vzorku FGF23-2 byl přidán 1 µl chymotrypsinu o koncentraci 0,5 µg/ml a takto připravený vzorek byl inkubován 3 h při teplotě 25 °C.

Následně byla provedena purifikace naštěpených peptidů FGF23 proteinu a příprava vzorku pro MS analýzu dle protokolu č. 3.

Poté byla provedena vlastní cílená MS analýza naštěpených peptidů FGF23 proteinu. Parametry MS analyzátoru byly nastaveny podle protokolu č. 6, ostatní parametry MS analyzátoru jsou uvedeny v tabulce č. 1.

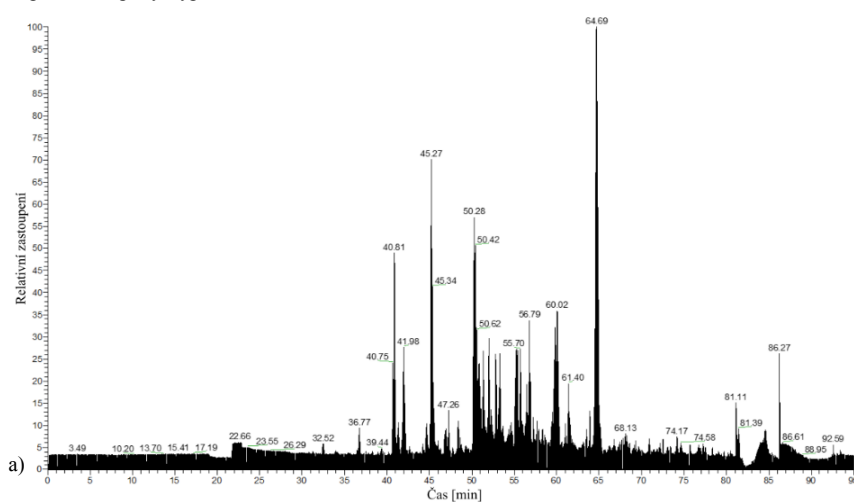
Tabulka č. 1: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro cílenou analýzu vzorku obsahujícího FGF23 protein.

Parametr	Cílená metoda	
	MS1	MS2
Délka analýzy	95 min	
Rozlišení detektoru (orbitrap)	60000	30000
Hmotnostní rozsah	350-1600 m/z	50-2000 m/z
Zadní ostření čočky	60 %	60 %
Automatická regulace citlivosti	4,0e ⁵	5,0e ⁴
Maximální čas nástřiku iontů	50 ms	54 ms
Typ dat	profile	centroid
Typ aktivace	-	HCD
HCD kolizní energie	-	30 %

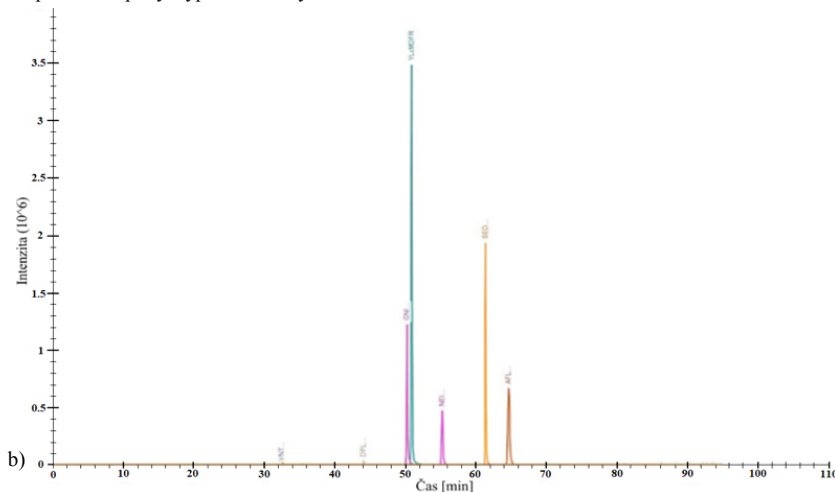
Tabulka č. 2: Hodnoty m/z peptidů a nábojový stav pro cílenou MS analýzu vzorků FGF23 proteinu.

335,482 (3)	570,301 (2)	693,359 (3)	909,012 (2)	1045,840 (3)
351,213 (3)	575,298 (3)	694,017 (3)	928,447 (2)	1058,523 (2)
380,536 (3)	580,770 (2)	706,017 (3)	933,401 (3)	1063,519 (2)
387,516 (3)	604,930 (3)	709,348 (3)	961,485 (2)	1067,543 (3)
408,747 (2)	606,344 (3)	737,373 (3)	970,964 (2)	1105,556 (2)
502,720 (2)	619,300 (3)	784,392 (2)	970,987 (2)	1114,523 (3)
523,264 (3)	641,325 (3)	830,962 (2)	1038,810 (3)	1128,858 (3)
526,316 (2)	647,645 (3)	862,443 (2)	1039,535 (2)	1210,271 (3)
554,310 (3)	647,660 (3)	906,891 (2)	1040,523 (2)	1399,599 (2)

FGF23 protein štěpený trypsinem

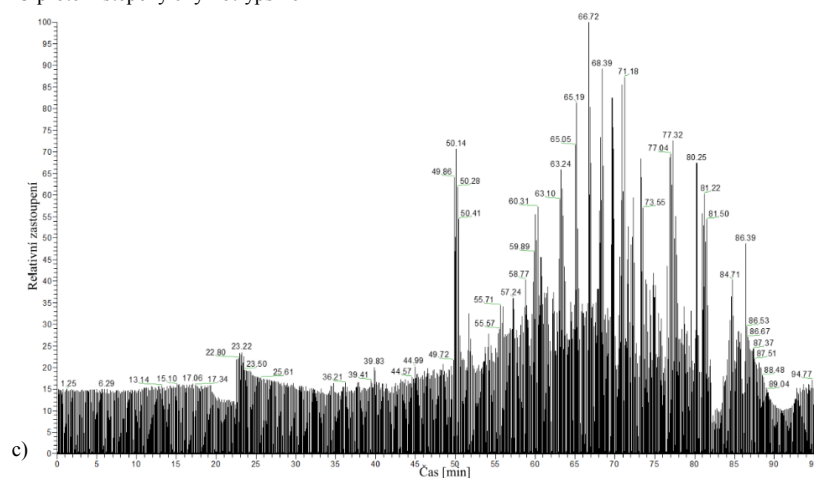


FGF23 protein štěpený trypsinem - Skyline

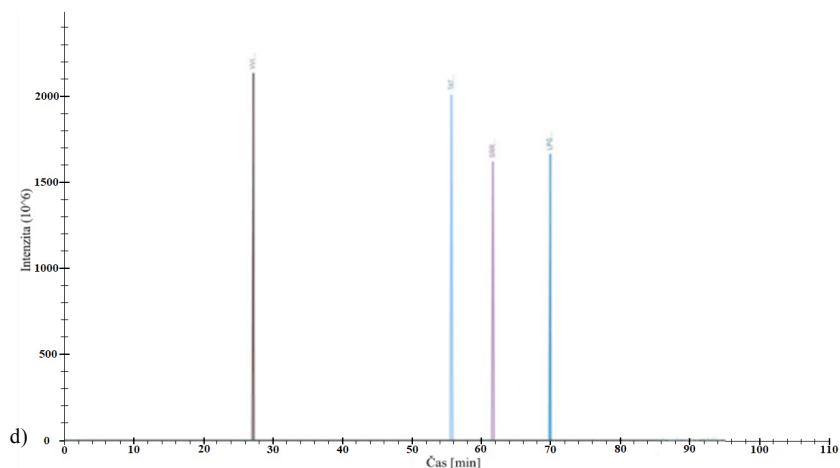


Obrázek č. 17: a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu trypsinem v roztoku analyzované cílenou MS metodou. b) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu štěpeného trypsinem analyzované cílenou metodou MS, zpracováno pomocí programu Skyline.

FGF23 protein štěpený chymotrypsinem



FGF23 protein štěpený chymotrypsinem - Skyline



Obrázek č. 17 - pokračování: c) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu chymotrypsinem v roztoku analyzované cílenou MS metodou. d) Spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu štěpeného chymotrypsinem analyzované cílenou metodou MS, zpracováno pomocí programu Skyline.

Chromatogramy peptidových spekter zpracovány programem Thermo Xcalibur jsou zobrazeny na obrázku č. 17 a) a 17 c). Při analýze peptidového spektra FGF23 proteinu štěpeného trypsinem analyzované pomocí programu Skyline bylo nalezeno pouze 5 peptidových prekurzorů, avšak nebyly nalezeny dceřinné fragmenty těchto prekurzorů odpovídající FGF23 proteinu. Proto byla v následujících experimentech provedena optimalizace parametrů MS analyzátoru.

5.2 Cílená MS analýza vzorku obsahujícího protein FGF23 štěpeného na filtru

Cílem experimentu bylo cílenou MS analýzou detekovat dceřinné fragmenty prekurzorů peptidů odpovídající FGF23 proteinu. Jako vzorek proteinu byl použit čistý rekombinantní FGF23 protein. V rámci přípravy vzorků bylo použito štěpení proteinu trypsinem. U vzorku byla provedena následovně 4 měření, při kterých byly použity různé hodnoty HCD kolizní energie (20 %, 25 %, 30 %, 40 %). Vzorek byl připraven a štěpen trypsinem na filtru (FASP).

K vzorku obsahujícího 1 µg FGF23 proteinu bylo přidáno 99 µl ABC roztoku pro naředění. Poté byl vzorek zpracován dle protokolu č. 2. Posledním krokem zpracování vzorku bylo štěpení připravené směsi přidáním 1 µl trypsinu o koncentraci 0,5 µg/µl a takto připravený vzorek byl inkubován 18 h při teplotě 37 °C.

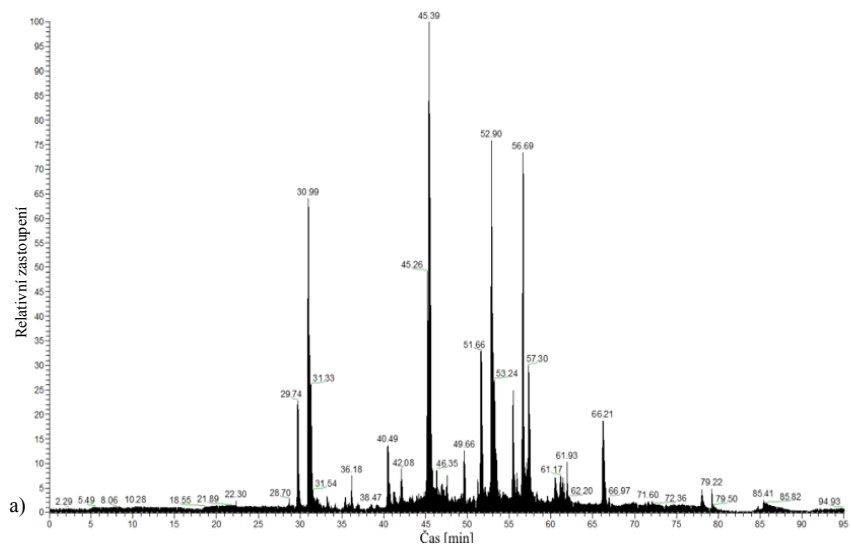
Poté byl vzorek purifikován a připraven pro MS analýzu dle protokolu č. 3.

Parametry MS analyzátoru byly nastaveny dle protokolu č. 6. Následující parametry jsou uvedeny v tabulce č. 3. Hodnoty m/z peptidů a nábojový stav pro cílenou metodu MS analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 2.

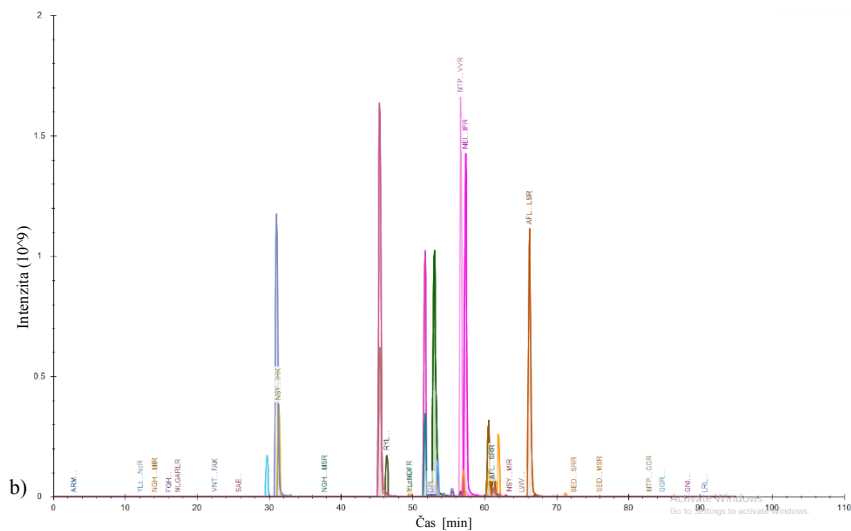
Tabulka č. 3: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro cílenou analýzu vzorku obsahujícího FGF23 protein připraveného FASP metodou.

	Parametry	HCD 20 %	HCD 25 %	HCD 30 %	HCD 40 %
MS1	Rozlišení detektoru (orbitrap)	6000			
	Hmotnostní rozsah	350-1600 m/z			
	Automatická regulace citlivosti	4,0e ⁵			
	Maximální čas nástřiku iontů	50 ms			
MS2	Typ aktivace	HCD			
	HCD kolizní energie	20 %	25 %	30 %	40 %
	Délka analýzy	95 min			
	Rozlišení detektoru (orbitrap)	30000			
	Hmotnostní rozsah	50-2000 m/z			
	Zadní ostření čočky	60 %			
	Automatická regulace citlivosti	5,0e ⁴			
Maximální čas nástřiku iontů	54 ms				
MS1+MS2	Typ dat	centroid			

FGF23 protein - HCD 20 %

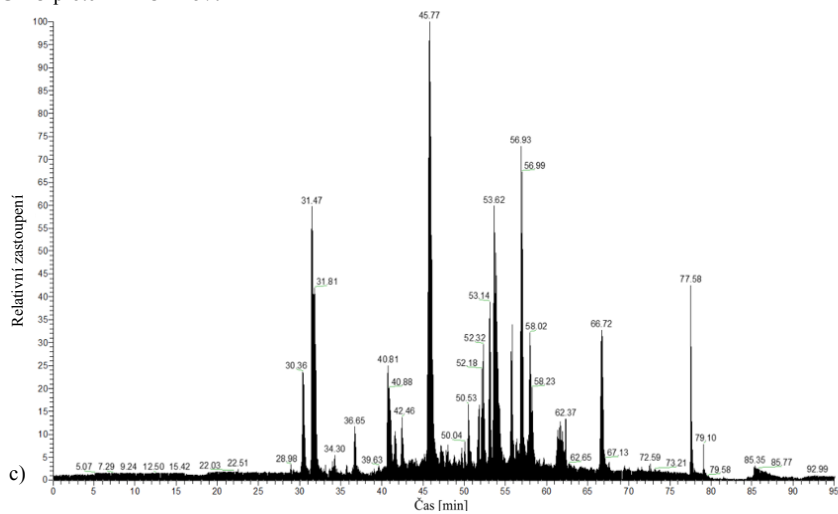


FGF23 protein - HCD 20 % - Skyline

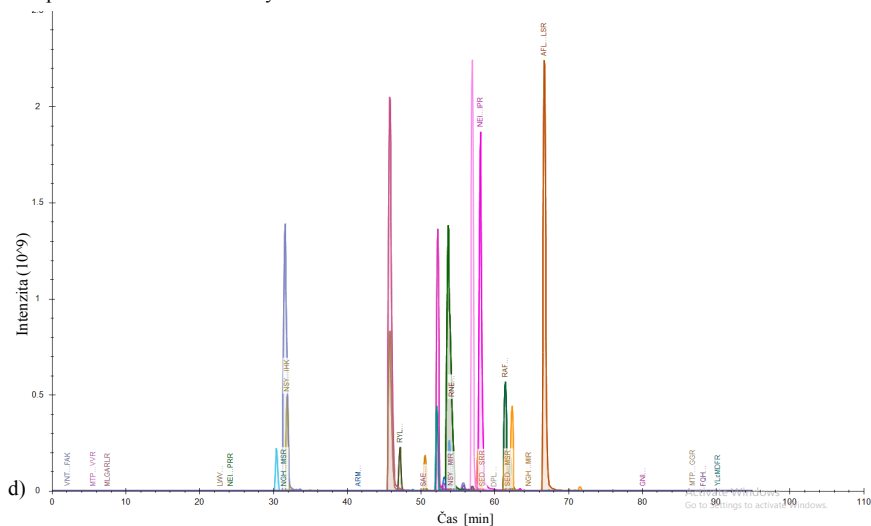


Obrázek č. 18: a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu trypsinem na filtru (FASP) analyzované cílenou MS metodou při HCD 20 %. b) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu analyzované cílenou metodou MS při HCD 20 %, zpracováno pomocí programu Skyline. Byly nalezeny pouze některé prekurzory peptidů.

FGF23 protein - HCD 25%

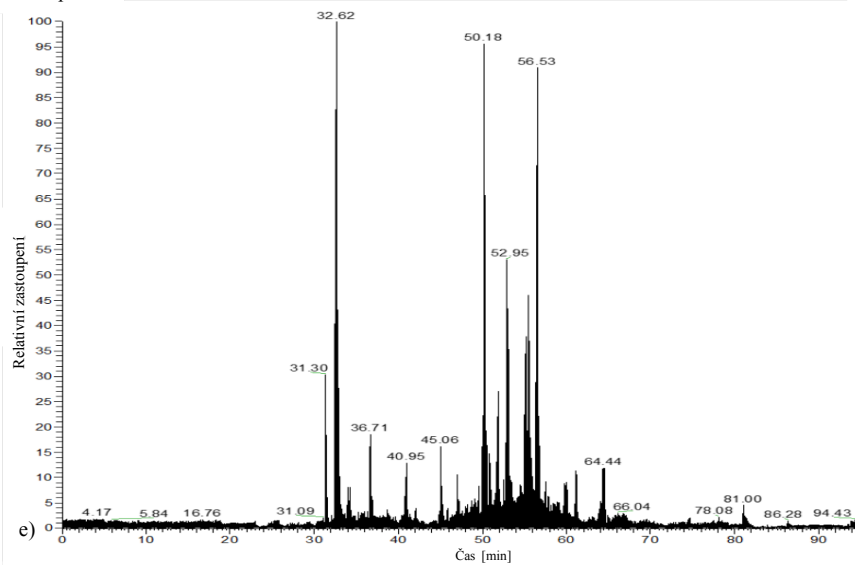


FGF23 protein - HCD 25 % - Skyline

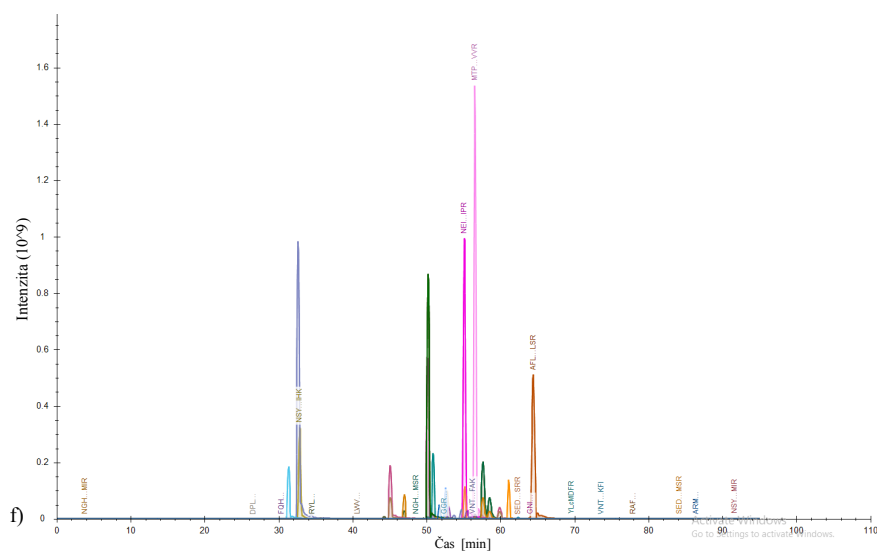


Obrázek č. 18 - pokračování: c) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu trypsinem na filtru (FASP) analyzované cílenou MS metodou při 25% HCD. d) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu analyzované cílenou metodou MS při HCD 25 %, zpracováno pomocí programu Skyline. Byly nalezeny pouze prekurzorové fragmenty.

FGF23 protein - HCD 30 %

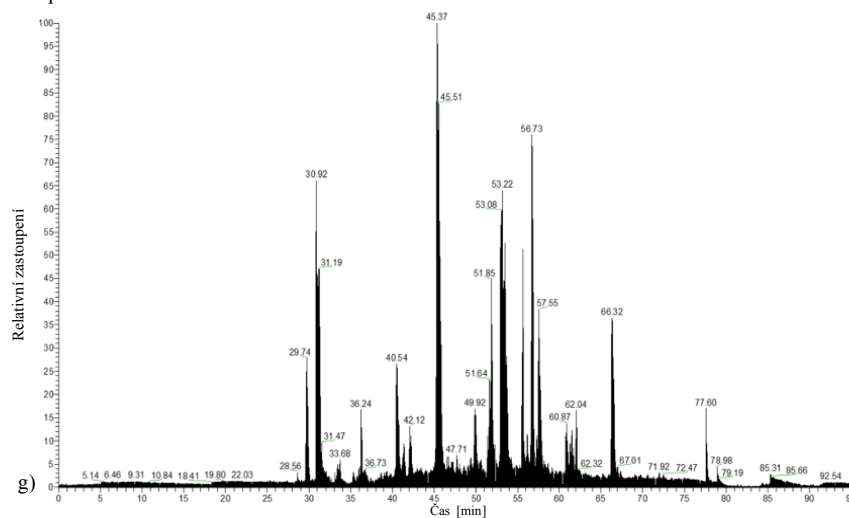


FGF23 protein - HCD 30 % - Skyline

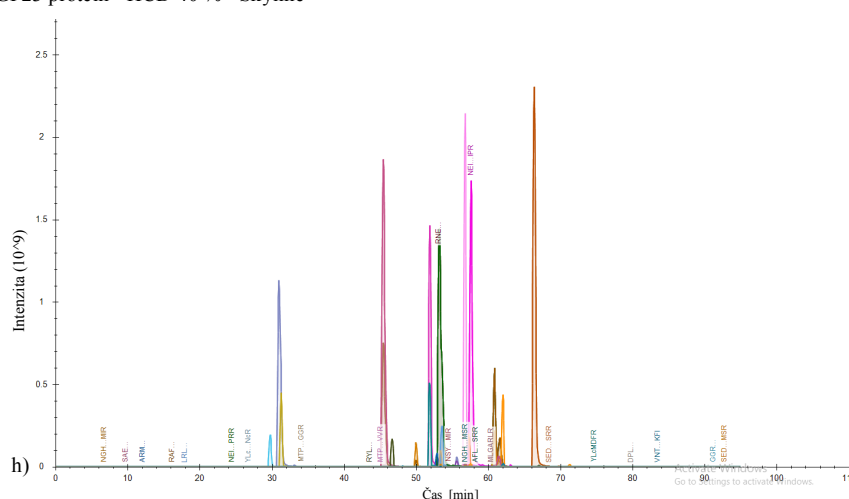


Obrázek č. 18 - pokračování: e) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu trypsinem na filtru (FASP) analyzované cílenou MS metodou při 30% HCD. f) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu analyzované cílenou metodou MS při HCD 30 %, zpracováno pomocí programu Skyline. Byly nalezeny pouze prekurzorové fragmenty.

FGF23 protein - HCD 40 %



FGF23 protein - HCD 40 % - Skyline



Obrázek č. 18 - pokračování: g) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu trypsinem na filtru (FASP) analyzované cílenou MS metodou při 40% HCD. h) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu analyzované cílenou metodou MS při HCD 40 %, zpracováno pomocí programu Skyline. Byly nalezeny pouze prekurzorové fragmenty.

Vzorek byl připraven FASP metodou, kdy se redukce, alkylace, i štěpení provádí přímo na membráně filtru umístěné v mikrozkušavce. V takto připravených vzorcích je možné snadněji identifikovat proteiny zastoupené v malém množství. Rovněž při filtraci jsou odstraněny příměsi jako jsou soli, puify a detergenty, které by mohly ovlivnit následné štěpení nebo výsledek MS analýzy (Manza *et al.*, 2005).

Chromatogramy peptidových spekter zpracovány programem Thermo Xcalibur jsou zobrazeny na obrázku č. 18. V programu Skyline byly při změnách kolizní energie (20 %,

25 %, 30 %, 40 %) nalezeny pouze prekurzorové fragmenty peptidů FGF23 proteinu, avšak nebyly nalezeny fragmenty dceřinné. V tomto případě tedy neměla velikost kolizní energie vliv na fragmentaci iontů v kolizní cele v hmotnostním analyzátoru. Proto byla v následujících experimentech provedena optimalizace jak vzorku tak dalších parametrů MS analyzátoru.

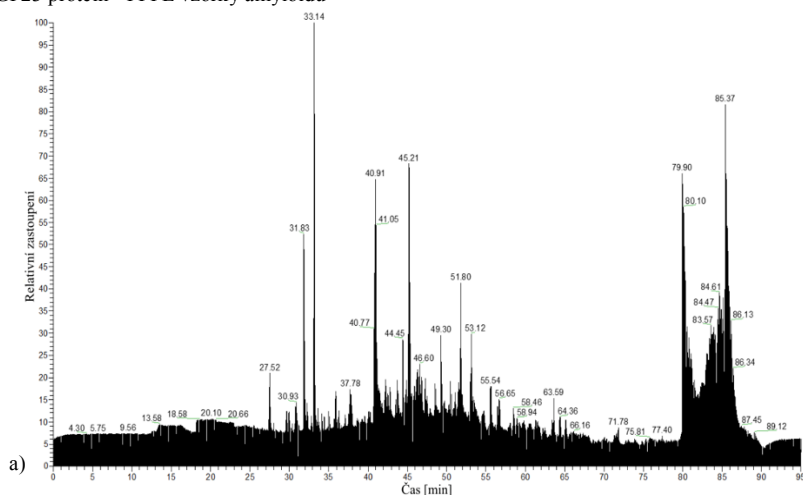
5.3 Cílená analýza FFPE vzorků amyloidu obsahujících FGF23 protein

V předchozím experimentu nebyly v programu Skyline nalezeny dceřinné fragmenty prekurzorů peptidů FGF23 proteinu, proto bylo měření provedeno s jiným vzorkem - mikrodisekované tkáňové řezy (FFPE) připravené z amyloidu mozkové tkáně, při stejném nastavení MS. V rámci přípravy vzorků bylo použito štěpení proteinu směsí enzymů Trypsin/Lys-C.

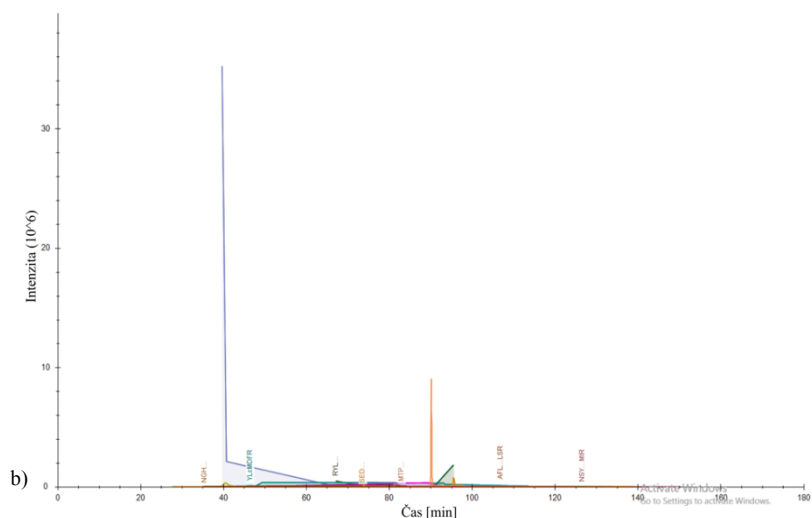
Byly zpracovány mikrodisekované tkáňové řezy - vzorek č. 1 - 335 000 μm^2 , vzorek č. 2 - 328 000 μm^2 , vzorek č. 3 - 325 000 μm^2 .

Vzorky byly připraveny dle protokolu č. 4. Parametry MS analyzátoru byly nastaveny dle protokolu č. 6. Další parametry jsou uvedeny v tabulce č. 3 (HCD kolizní energie 30 %). Hodnoty m/z peptidů a nábojový stav pro cílenou metodu MS analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 2.

FGF23 protein - FFPE vzorky amyloidu



FGF23 protein - FFPE vzorky amyloidu - Skyline



Obrázek č. 19: a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu z FFPE vzorku trypsinem analyzované cílenou MS metodou. b) Spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.

Chromatogram peptidového spektra vzorku č. 1 zpracován programem Thermo Xcalibur je zobrazen na obrázku č. 19. Vzorky č. 2 i 3 vykazovaly stejné výsledky jako vzorek č. 1. V programu Skyline nebyly nalezeny dceřinné fragmenty prekurzorů odpovídající FGF23 proteinu. Změna vzorku obsahujícího FGF23 protein neměla vliv na detekci zkoumaného proteinu.

5.4 Cílená analýza vzorků obsahujících protein BSA

Výsledky dosavadní cílené analýzy neumožňovaly identifikovat prekurzory peptidů včetně jejich dceřinných fragmentů u rekombinantního proteinu i FFPE vzorku. V následujících experimentech byl za účelem hledání správných parametrů MS analyzátoru použit hovězí sérový albumin (BSA), jakožto levný a dostupný protein. Cílem bylo optimalizovat nastavení MS analyzátoru pro spolehlivou detekci BSA proteinu. V rámci přípravy vzorků bylo použito štěpení proteinu trypsinem. U vzorků bylo provedeno následovně 5 měření, při kterých se měnily parametry nastavení MS analyzátoru (viz tabulka č. 4).

Ke vzorkům obsahujícím 1 mg BSA proteinu bylo přidáno 99 μ l ABC roztoku pro naředění. Poté byly vzorky připraveny dle protokolu č. 1. Posledním krokem přípravy vzorků bylo štěpení připravené směsi trypsinem. Ke vzorkům byl přidán 1 μ l trypsinu o koncentraci 0,5 μ g/ μ l a takto připravené vzorky byly inkubovány 3 h při teplotě 37 °C.

Vzorky byly purifikovány a připraveny pro MS analýzu dle protokolu č. 3.

Poté byla provedena vlastní cílená MS analýza naštěpených peptidů BSA proteinu. Parametry MS analyzátoru byly nastaveny dle protokolu č. 6. Metoda byla spuštěna 5x, pokaždé pozměněným nastavením - metoda A–E (viz tabulka č. 4). Hodnoty m/z peptidů a nábojový stav pro cílenou metodu MS analýzy jsou zobrazeny v tabulce č. 5 a 6.

Tabulka č. 4: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro cílenou analýzu 5 vzorků obsahujících protein BSA.

	Parametr	A	B	C	D	E
MS1	Rozlišení detektoru (orbitrap)	60000				
	Hmotnostní rozsah	400–1600 m/z				
	Automatická regulace citlivosti	4,0e ⁵				
	Maximální čas nástřiku iontů	50 ms				
MS2	Typ aktivace	HCD				
	HCD kolizní energie	30 %	25 %	20 %	20 %	20 % *
	Rozlišení detektoru (orbitrap)	30000	15000	15000	15000	15000
	Hmotnostní rozsah	50–2000 m/z				
	Zadní ostření čočky	60 %				
	Automatická regulace citlivosti	5,0e ⁴				
	Maximální čas nástřiku iontů	54 ms	50 ms	50 ms	50 ms	50 ms
	Typ dat	centroid	centroid	centroid	profile	centroid
Počet specifických m/z peptidů	96	96	15	15	15	
MS1 +MS2	Délka analýzy	95 min				

* HCD kolizní energie 20 % + „stepped collision energy“ o 5 %

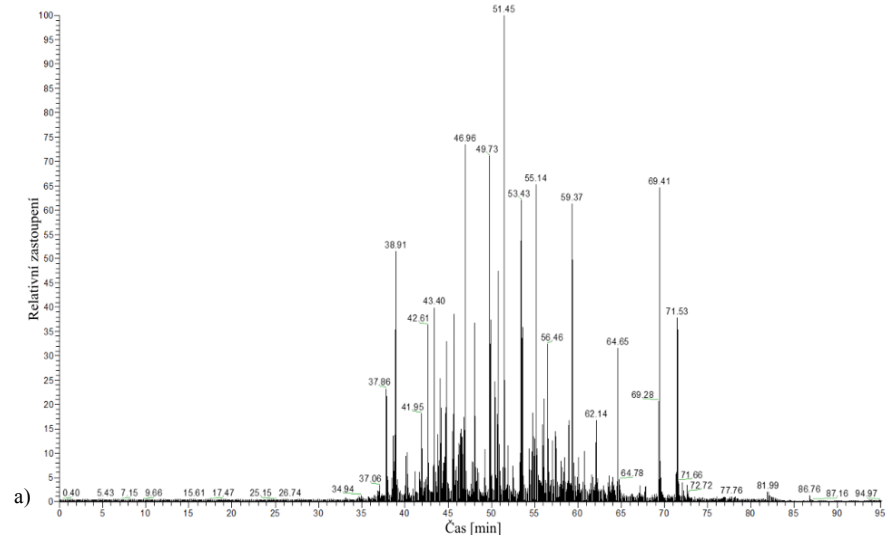
Tabulka č. 5: Hodnoty m/z peptidů a nábojový stav pro cílené (A–B) metody MS analýzy.

409,248 (2)	494,288 (2)	547,317 (3)	649,702 (3)	756,479 (2)	821,458 (3)	1009,030 (2)
409,716 (2)	494,787 (2)	564,985 (3)	652,658 (3)	757,449 (2)	841,147 (3)	1013,088 (2)
410,737 (2)	497,612 (3)	571,860 (2)	668,371 (3)	759,432 (2)	846,974 (2)	1014,554 (2)
415,573 (3)	501,298 (2)	573,324 (2)	673,022 (3)	767,698 (3)	862,425 (2)	1030,578 (2)
419,589 (3)	501,795 (2)	575,286 (3)	675,728 (3)	770,776 (3)	865,480 (2)	1033,082 (2)
424,255 (2)	504,619 (3)	582,318 (2)	676,705 (3)	784,375 (2)	873,491 (3)	1151,044 (2)
432,239 (3)	504,655 (3)	584,329 (3)	687,388 (3)	787,429 (2)	875,990 (2)	1155,660 (2)
461,747 (2)	505,302 (3)	610,696 (3)	689,057 (3)	801,432 (2)	915,541 (2)	1211,168 (2)
464,250 (2)	506,624 (3)	622,857 (2)	723,382 (2)	807,781 (3)	949,041 (2)	1219,708 (2)
480,777 (2)	507,813 (2)	628,880 (2)	729,432 (2)	813,474 (3)	950,507 (2)	1223,194 (2)
482,590 (3)	523,252 (3)	633,029 (3)	740,401 (2)	815,798 (3)	974,049 (2)	1229,095 (2)
486,624 (3)	534,624 (3)	634,007 (3)	745,914 (2)	819,732 (3)	978,483 (2)	1231,683 (2)
493,936 (3)	542,300 (2)	647,855 (2)	756,425 (2)	820,472 (2)	1002,053 (2)	1261,217 (2)
						1309,733 (2)

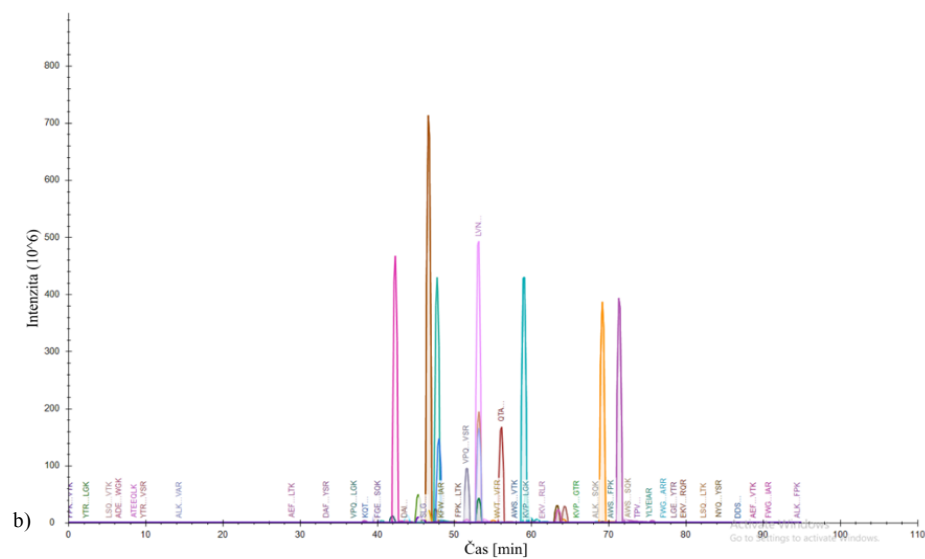
Tabulka č. 6: Hodnoty m/z peptidů a nábojový stav pro cílené (C–E) metody MS analýzy.

409,716 (2)	494,288 (2)	571,860 (2)
424,255 (2)	501,795 (2)	582,319 (2)
443,711 (2)	504,619 (3)	740,401 (2)
461,747 (2)	507,813 (2)	756,425 (2)
464,250 (2)	547,317 (3)	820,472 (2)

BSA protein - metoda A

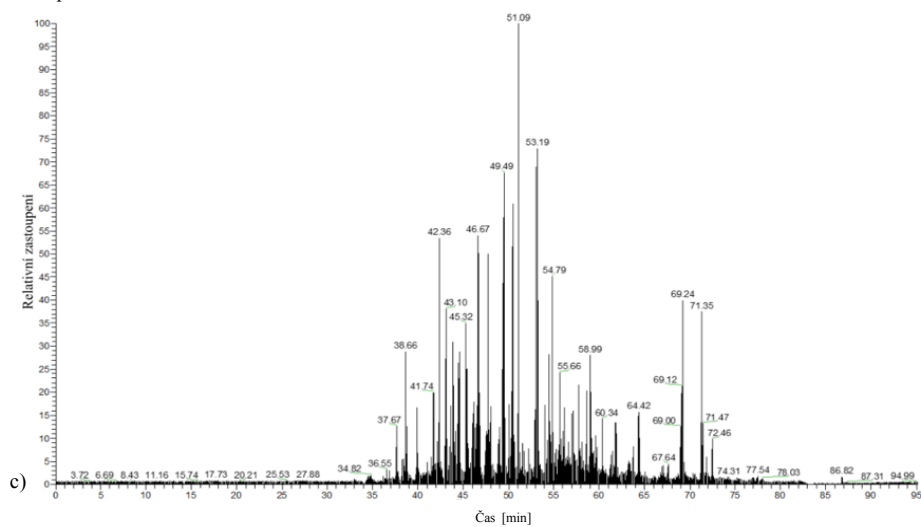


BSA protein - metoda A - Skyline

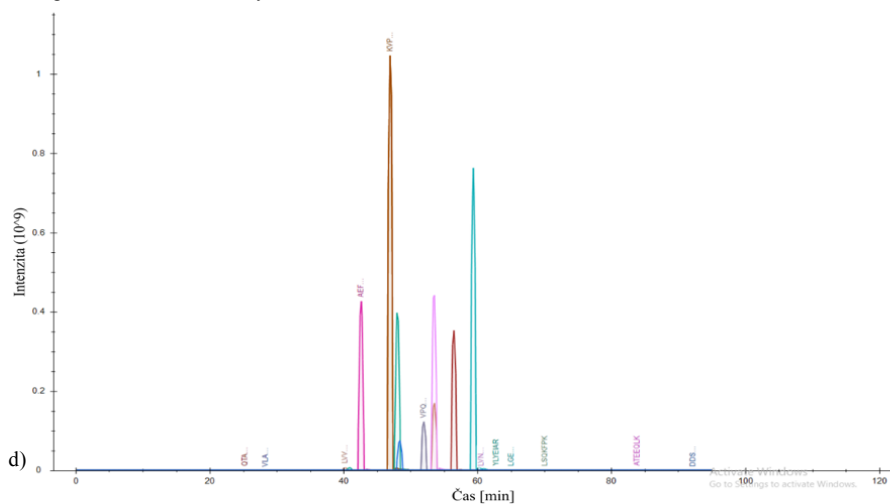


Obrázek č. 20: Metoda A. a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem v roztoku analyzované cílenou MS metodou. b) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline. Parametry: typ fragmentace 30% HCD, typ dat centroid, maximální čas nástřiku iontů 54 ms, rozlišení detektoru 30000, 96 hodnot m/z peptidů. V programu Skyline bylo nalezeno pouze 15 prekurzorových fragmentů peptidů.

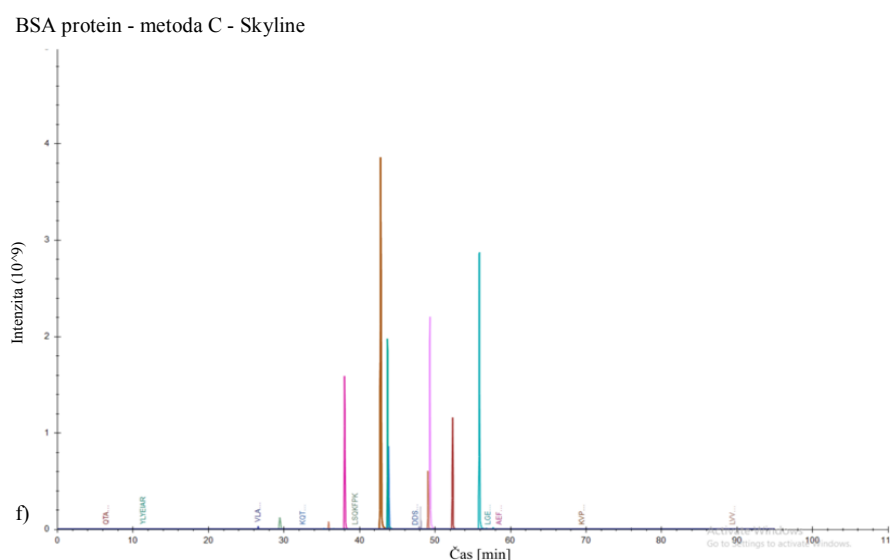
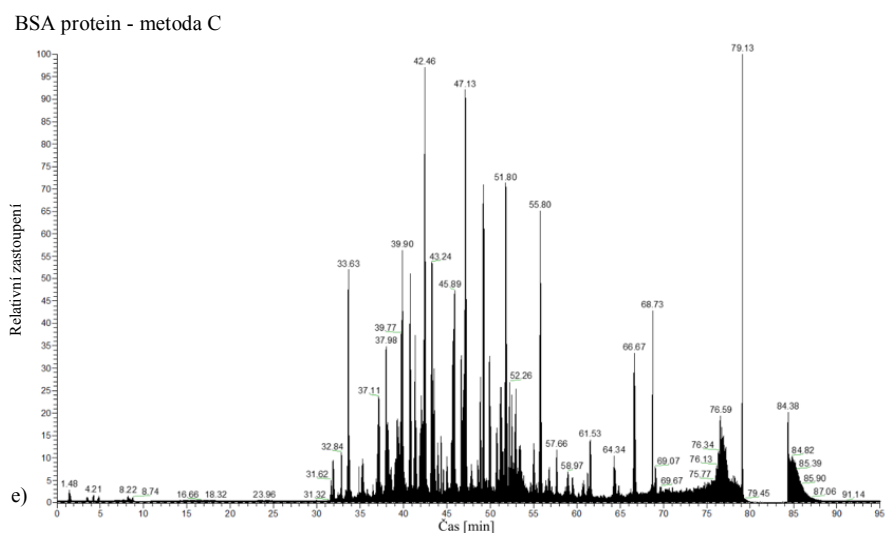
BSA protein - metoda B



BSA protein - metoda B - Skyline

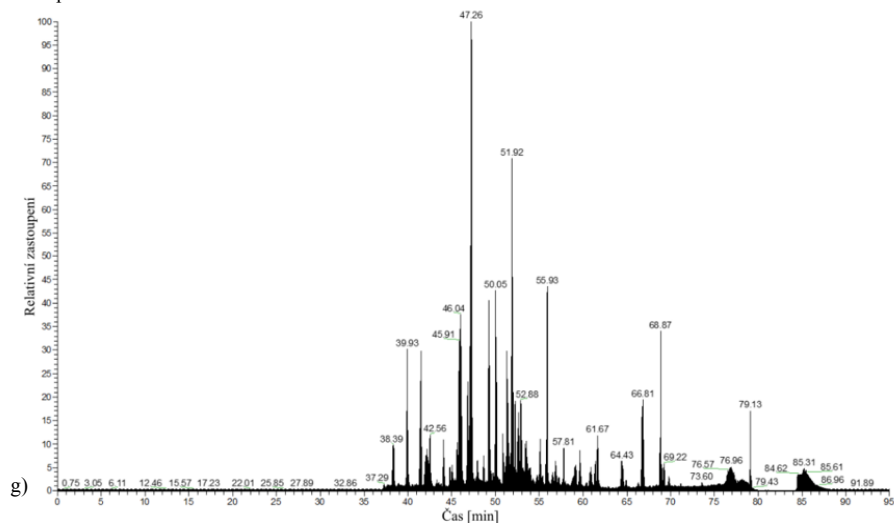


Obrázek č. 20 - pokračování: Metoda B. c) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou. d) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline. Parametry: 25% HCD, typ dat centroid, maximální čas nástřiku iontů 50 ms, rozlišení detektoru 15000 a 96 hodnot m/z peptidů.

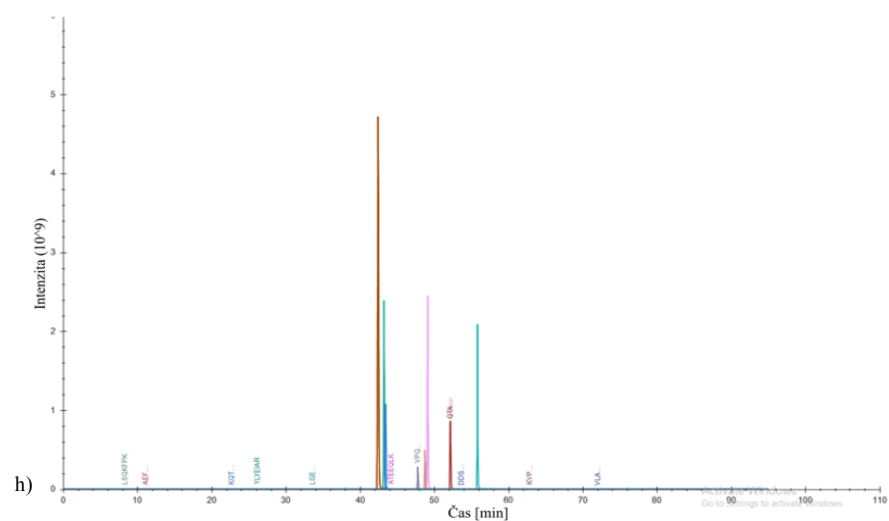


Obrázek č. 20 - pokračování: Metoda C. e) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou. f) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline. Parametry: typ fragmentace 20% HCD, typ dat centroid, maximální čas nástřiku iontů 50 ms, rozlišení detektoru 15000, 15 hodnot m/z peptidů.

BSA protein - metoda D

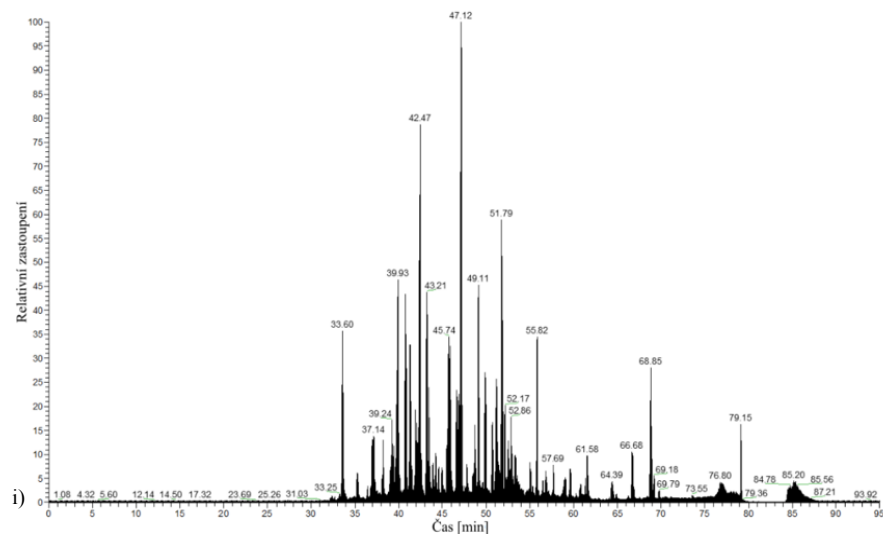


BSA protein - metoda D - Skyline

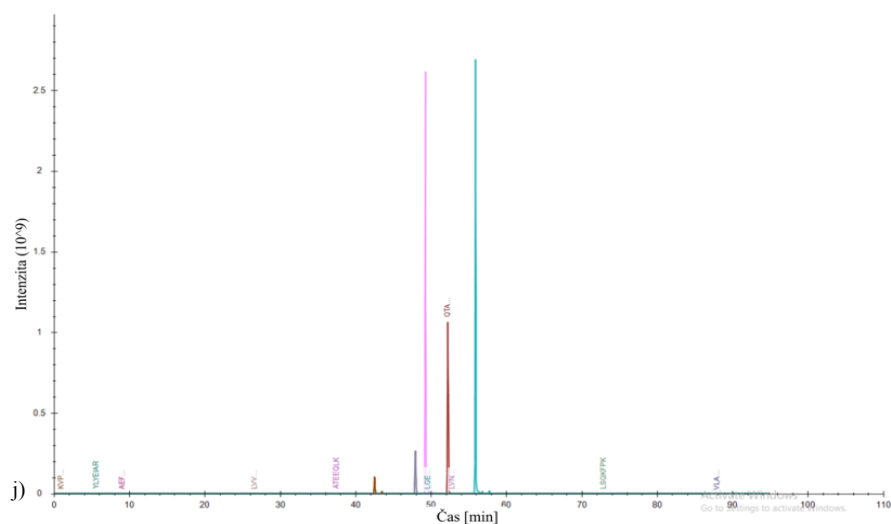


Obrázek č. 20 - pokračování: Metoda D. g) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou. h) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline. Parametry: typ fragmentace 20% HCD, typ dat profil, maximální čas nástřiku iontů 50 ms, rozlišení detektoru 15000 a 15 hodnot m/z peptidů.

BSA protein - metoda E



BSA protein - metoda E - Skyline



Obrázek č. 20 - pokračování: Metoda E. i) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou. j) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline. Parametry: typ fragmentace 20% HCD + „stepped collision energy“ o 5 %, typ dat centroid, maximální čas nástřiku iontů 50 ms, rozlišení detektoru 15000 a 15 specifických m/z peptidů.

Chromatogramy peptidových spekter zpracovány programem Thermo Xcalibur jsou zobrazeny na obrázku č. 20. Písmena A-E značí rozdílné metody lišící se nastavenými parametry MS analyzátoru při analýze vzorků BSA proteinu (viz tabulka č. 4). V programu Skyline bylo u metod A–B nalezeno 15 peptidů (z celkem 96) včetně prekurzorových fragmentů, avšak nebyly identifikovány fragmenty dceřinné. Pouze tyto

m/z hodnoty peptidů byly ponechány u následujících metod C–E. Žádná změna v nastavených parametrech MS analyzátoru nevedla k výsledkům, které by potvrdily přítomnost dceřinných fragmentů prekurzorů odpovídajících BSA proteinu.

5.5 Necílená a následně cílená analýza vzorků obsahujících protein BSA

Cílem experimentu bylo nejprve necílenou MS analýzou detekovat všechny proteiny nacházející se ve vzorku, poté vybrat BSA protein a k tomuto proteinu vyhledat specifické m/z peptidů, které bylo možné následně přidat do cílené metody. Další fází experimentu bylo cílenou MS analýzou detekovat dceřinné fragmenty prekurzorů peptidů odpovídající BSA proteinu. V rámci přípravy vzorků bylo použito štěpení proteinu trypsinem. U vzorků byla provedena následovně 2 měření, při kterých byl v rámci nastavení MS analyzátoru použit různý typ aktivace HCD/CID (viz tabulka č. 9).

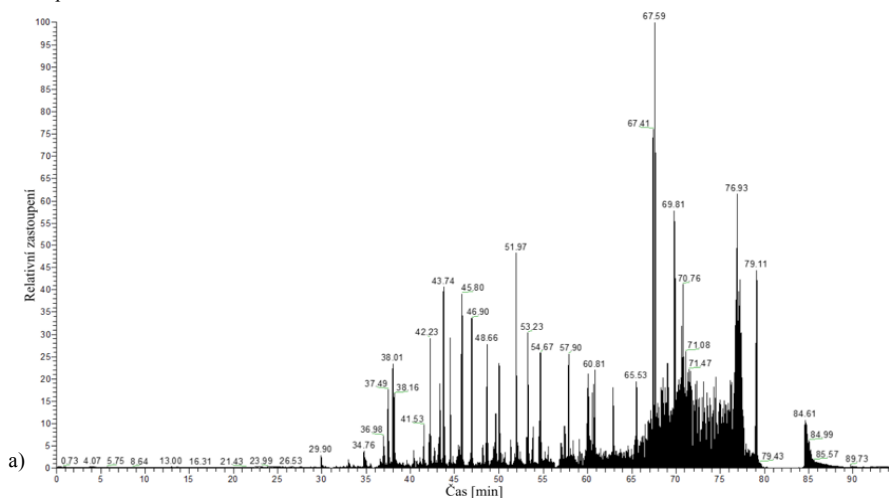
Ke vzorkům obsahujícím 1 mg BSA proteinu bylo přidáno 99 μ l ABC roztoku pro naředění. Poté byly vzorky připraveny dle protokolu č. 1. Posledním krokem přípravy vzorků bylo štěpení připravené směsi trypsinem. Ke vzorkům byl přidán 1 μ l trypsinu o koncentraci 0,5 μ g/ μ l a takto připravené vzorky byly inkubovány 3 h při teplotě 37 °C. Vzorky byly purifikovány a připraveny pro MS analýzu dle protokolu č. 3.

Následně byla spuštěna necílená metoda pro identifikaci všech proteinů ve vzorku. Parametry MS analyzátoru byly nastaveny dle protokolu č. 6, ostatní parametry MS analyzátoru jsou uvedeny v tabulce č. 7.

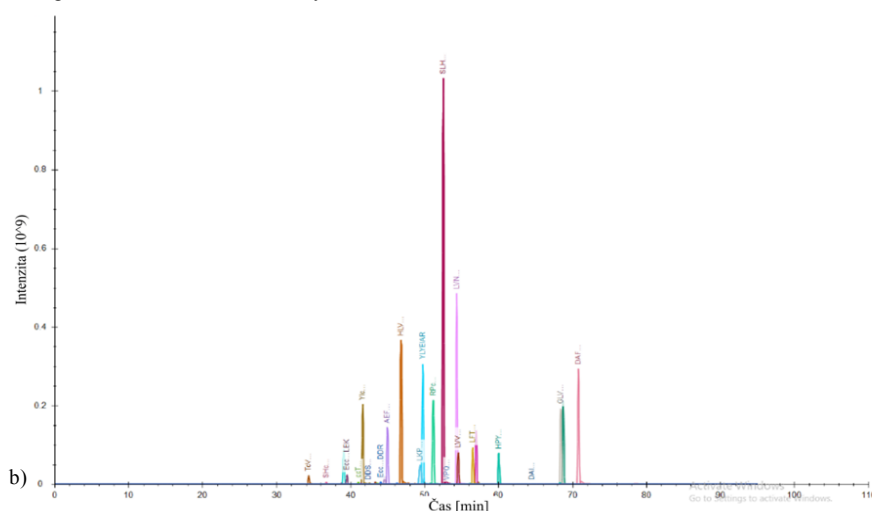
Tabulka č. 7: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro necílenou analýzu vzorku obsahujícího protein BSA.

Parametry	
Délka analýzy	95 min
Rozlišení detektoru (orbitrap)	120000
Hmotnostní rozsah	400-1500 m/z
Zadní ostření čočky	60 %
Automatická regulace citlivosti	4,0e ⁵
Maximální čas nástřiku iontů	50
Typ dat	centroid

BSA protein - necílená metoda



BSA protein - necílená metoda - Skyline



Obrázek č. 21: a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované necílenou MS metodou. b) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované necílenou metodou MS zobrazující všechny prekurzorové fragmenty, zpracováno pomocí programu Skyline.

Z BSA vzorku byly pomocí softwarového programu MaxQuant a programu Perseus identifikovány všechny proteiny nacházející se ve vzorku. Z těchto proteinů byly v proteinové databázi Uniprot vybrány proteiny obsahující albumin - A0A140T897, B0JYQ0 a P02768. K těmto proteinům byly pomocí programu Perseus přiřazeny peptidy se specifickými m/z hodnotami a s nábojovým stavem +2 a +3 (viz tabulka č. 8) (sekvenční pokrytí 62 %). Tyto m/z hodnoty byly přidány do metody, která byla následně spuštěna cíleným měřením.

Tabulka č. 8: Hodnoty m/z peptidů a nábojový stav pro cílenou metodu MS analýzy vzorků obsahujících BSA protein.

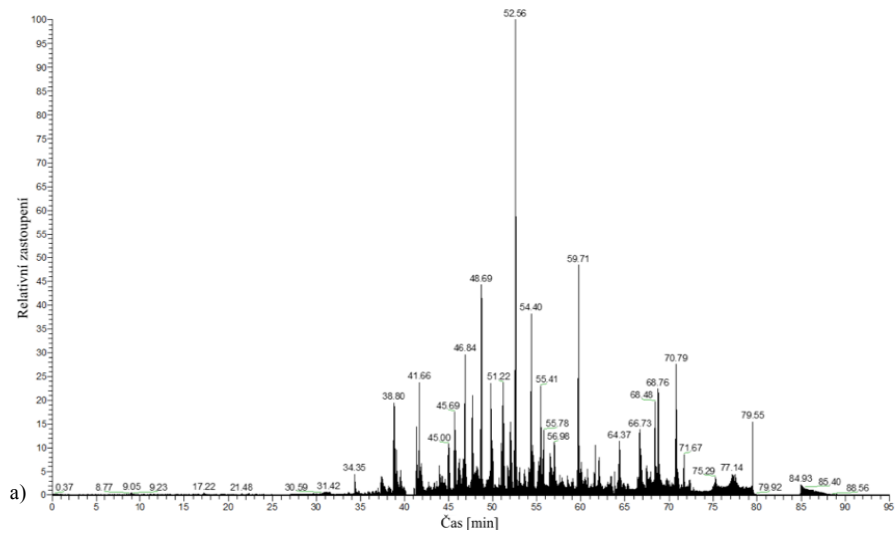
379,715 (2)	435,910 (3)	443,711 (2)	449,744 (2)
461,747 (2)	464,250 (2)	473,903 (3)	487,733 (2)
501,795 (2)	504,619 (3)	507,813 (2)	526,260 (3)
536,758 (2)	569,752 (2)	582,319 (2)	583,892 (3)
627,645 (3)	630,314 (3)	636,645 (3)	646,304 (2)
652,658 (3)	653,361 (2)	710,762 (2)	722,325 (2)
732,298 (2)	751,810 (2)	784,375 (2)	788,887 (2)
831,426 (3)	875,335 (2)	862,914 (2)	944,184 (2)

Následně byla zvolena cílená metoda MS analyzátoru se změněnými parametry (viz tabulka č. 9 - metoda HCD) a s hodnotami m/z peptidů předešlého měření (viz tabulka č. 8). Touto metodou nebyly nalezeny žádné dceřinné fragmenty prekurzorů peptidů odpovídající proteinu BSA, proto byla tato metoda optimalizována změnou typu aktivace z HCD na CID (viz tabulka č. 9 - metoda CID) s hodnotami m/z peptidů shodnými s předchozím měřením (viz tabulka č. 8).

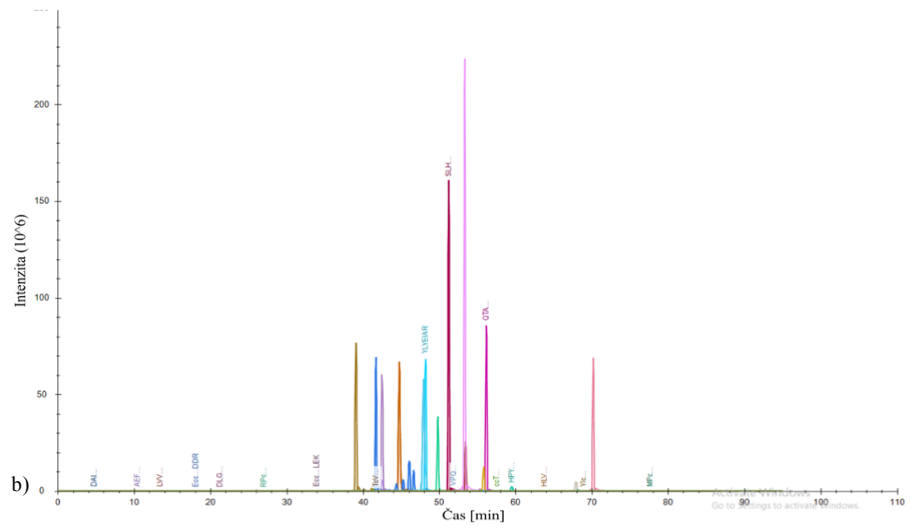
Tabulka č. 9: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro cílenou analýzu vzorků obsahujících protein BSA.

	Parametr	Metoda HCD	Metoda CID
MS1	Rozlišení detektoru (orbitrap)	60000	
	Hmotnostní rozsah	400–1600 m/z	
	Automatická regulace citlivosti	4,0e ⁵	
	Maximální čas nástřiku iontů	50 ms	
MS2	Typ aktivace	HCD	CID
	Kolizní energie	20 %	30 %
	Rozlišení detektoru (orbitrap)	15000	
	Hmotnostní rozsah	50–2000 m/z	
	Zadní ostření čočky	60 %	
	Automatická regulace citlivosti	5,0e ⁴	
	Maximální čas nástřiku iontů	50 ms	
	Typ dat	centroid	
MS1 + MS2	Počet m/z peptidů	32	
	Délka analýzy	95 min	

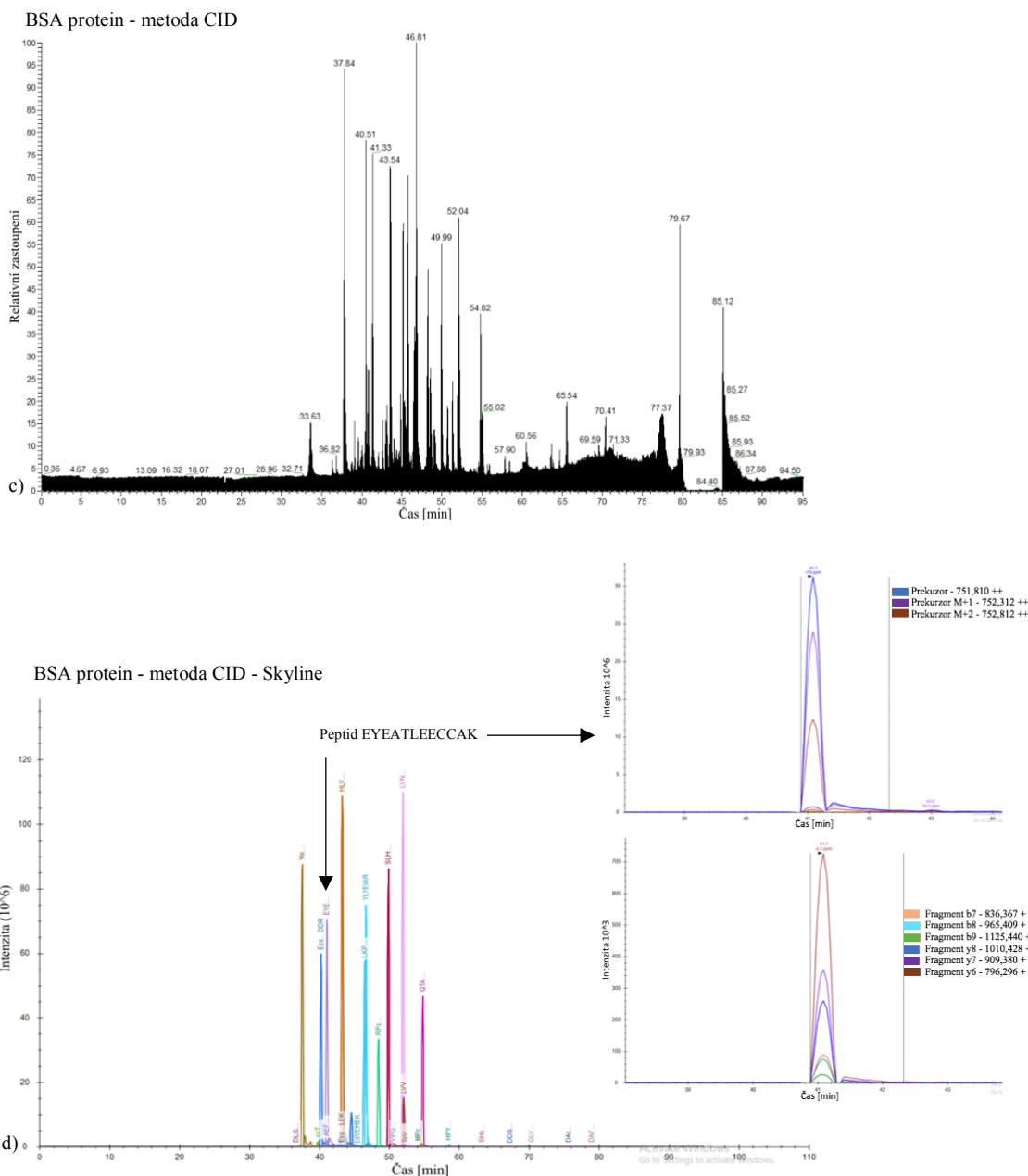
BSA protein - metoda HCD



BSA protein - metoda HCD - Skyline



Obrázek č. 22: Metoda HCD. a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou. b) Spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované cílenou MS metodou (metoda HCD), zpracováno pomocí programu Skyline. Byly nalezeny pouze prekurzorové fragmenty.



Obrázek č. 22 - pokračování: Metoda CID. c) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou. d) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline. Při cíleném měření metodou CID bylo nalezeno 19 z celkem 32 peptidů včetně prekuzorových i dceřinných fragmentů odpovídající BSA proteinu. Jeden z nejintenzivnějších peptidů (K.EYEATLEECCA.K) byl vybrán a zobrazen včetně jeho prekuzorů (nahore) a dceřinných fragmentů (dole).

Při cíleném měření metodou HCD byly v programu Skyline nalezeny pouze některé prekuzorové fragmenty (viz obrázek č. 22 b), ale nebyly nalezeny fragmenty dceřinné odpovídající těmto prekuzorům. Při cíleném měření metodou CID (viz obrázek č. 22 d)

bylo nalezeno 19 z celkem 32 peptidů včetně prekurzorových i dceřinných fragmentů odpovídající BSA proteinu (tabulka č. 11). Například u metody HCD byly nalezeny pouze prekurzory peptidu K.EYEATLEECCA.K.D, avšak u metody CID byly nalezeny jak prekurzorové tak dceřinné fragmenty. Rozdílné výsledky při obou výše uvedených cílených experimentech lze vysvětlit použitím rozdílného typu aktivace z HCD na CID použitý při MS analýze.

5.6 Cílená analýza vzorků obsahujících různé koncentrace proteinu BSA

Cílem experimentu bylo vytvořit koncentrační řadu proteinu BSA (50 pg/μl, 500 pg/μl, 5 ng/μl, 50 ng/μl, 0,5 μg/μl) a nalézt, při jaké koncentraci dojde k identifikaci dceřinných fragmentů peptidů odpovídající BSA proteinu. Jako vzorek proteinu byl použit BSA protein. Vzorek byl připraven přípravou a štěpením proteinů trypsinem na filtru (FASP). V rámci nastavení MS analyzátoru byl použit typ aktivace CID na základě výsledků z předchozího experimentu.

Byly připraveny 3 vzorky obsahující 50 μg proteinu BSA, ke kterým bylo přidáno 99 μl ABC roztoku pro naředění. Následně byl vzorek připraven dle protokolu č. 2. Nakonec byl přidán 1 μg trypsinu o koncentraci 0,5 μg/μl. Mikrozkumavky byly 3 sekundy vortexovány a následně inkubovány při 37 °C přes noc (18 hodin). Poté byla změřena koncentrace peptidů metodou BCA dle protokolu č. 5.

Z takto naměřených hodnot byla vytvořena kalibrační přímka a z rovnice lineární regrese byla vypočtena koncentrace proteinů ve vzorcích. Následně byl vypočítán objem vzorku potřebný pro purifikaci peptidů (tabulka č. 10).

Z kalibrační křivky ($y = 0,0005x + 0,1192$) bylo vypočítáno, jaký objem vzorku je potřebný, aby vzorek pro purifikaci na „Stage Tips“ obsahoval 10 μg proteinu.

Tabulka č. 10: Objemy vyšetřovaných vzorků obsahující 10 µg peptidů BSA proteinu potřebných pro purifikaci na „Stage Tips“.

Vzorek č.	Koncentrace [µg/ml]	Absorbance	Hmotnost [µg]	Vypočtený objem [µl]
1	437,6	0,338	10	22,8
2	463,6	0,351	10	21,57
3	505,6	0,372	10	19,77

Následně proběhla purifikace naštěpených peptidů BSA proteinu a příprava vzorku pro MS analýzu dle protokolu č. 3.

Poté byla připravena koncentrační řada:

Vzorek o koncentraci 0,5 µg/µl - 1 µg peptidů získaných štěpením BSA proteinu

Vzorek o koncentraci 50 ng/µl - 100 ng peptidů získaných štěpením BSA proteinu

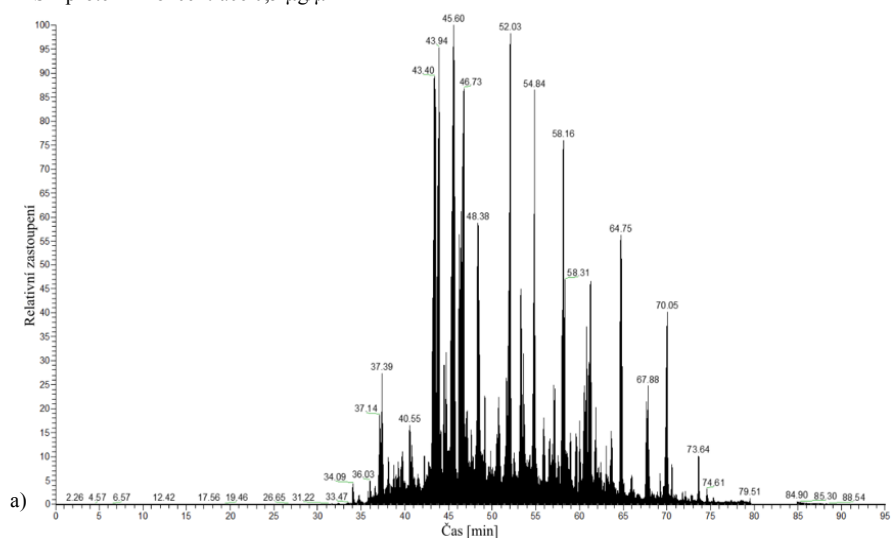
Vzorek o koncentraci 5 ng/µl - 10 ng peptidů získaných štěpením BSA proteinu

Vzorek o koncentraci 500 pg/µl - 1 ng peptidů získaných štěpením BSA proteinu

Vzorek o koncentraci 50 pg/µl - 100 pg peptidů získaných štěpením BSA proteinu

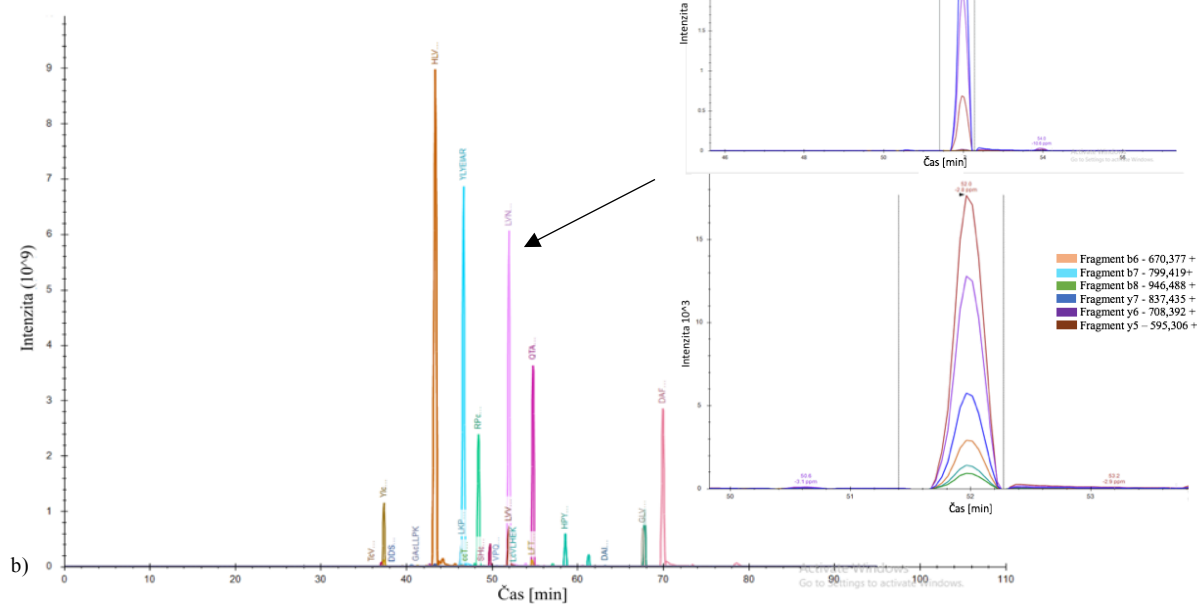
MS analýza BSA vzorků připravených FASP metodou byla na MS analyzátoru provedena cílenou metodou (viz tabulka č. 9 - metoda CID) s hodnotami m/z peptidů zjištěnými v předešlém měření (viz tabulka č. 8).

BSA protein - koncentrace 0,5 µg/µl



a)

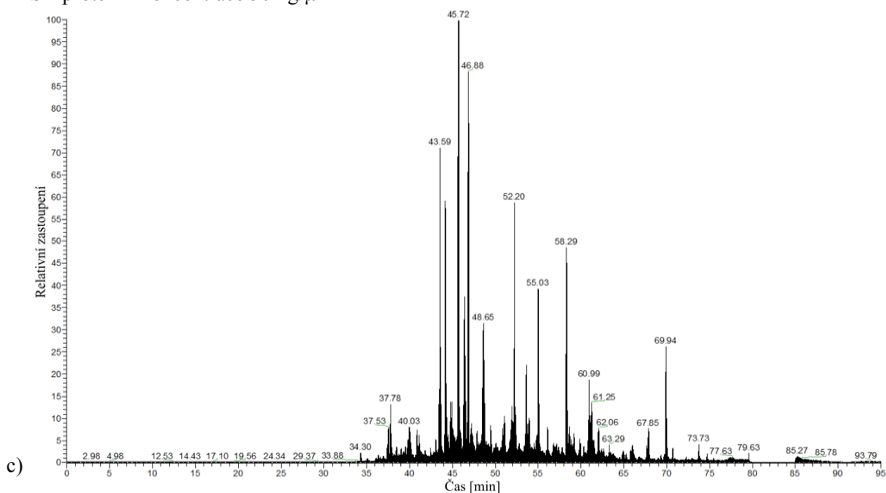
BSA protein - koncentrace 0,5 µg/µl - Skyline



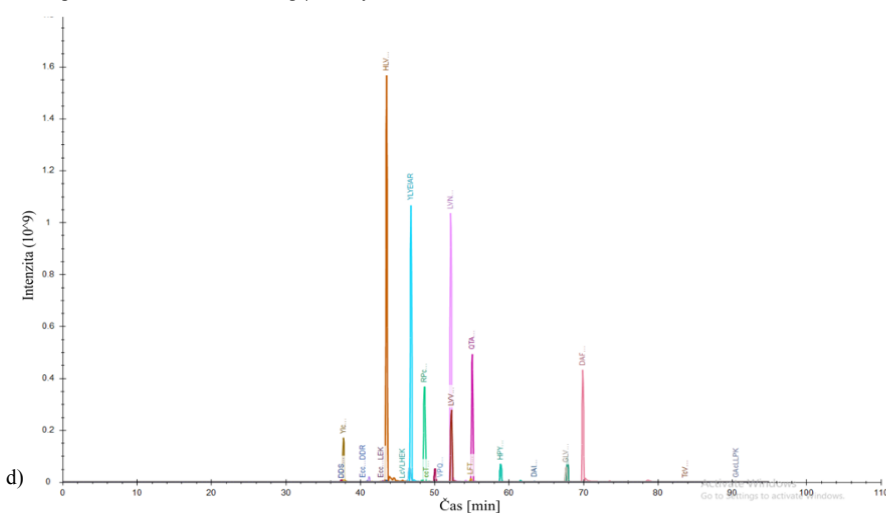
b)

Obrázek č. 23: a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou při koncentraci 0,5 µg/µl. b) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu (0,5 µg/µl) analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline. Jeden z nejintenzivnějších peptidů (K.LVNELTEFAK.T) byl vybrán a zobrazen včetně jeho prekurzorů (nahore) a dceřinných fragmentů (dole).

BSA protein - koncentrace 50 ng/μl

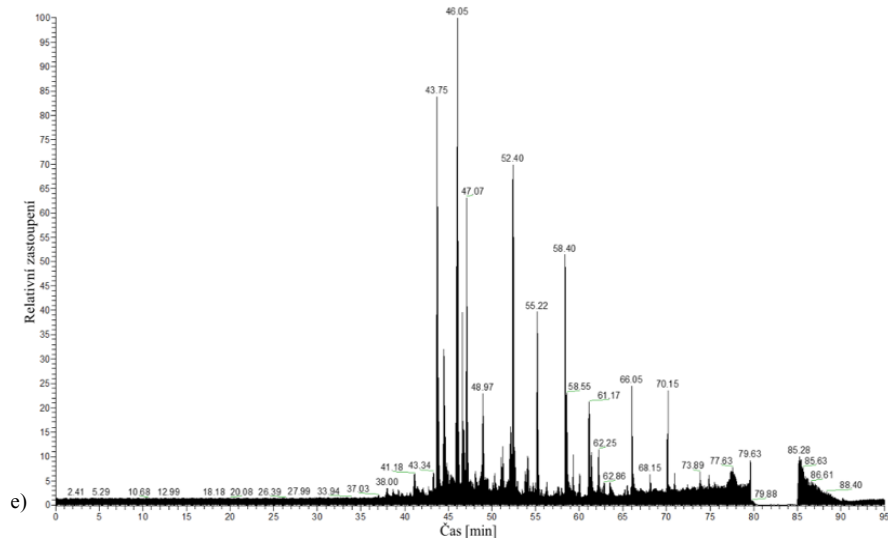


BSA protein - koncentrace 50 ng/μl - Skyline

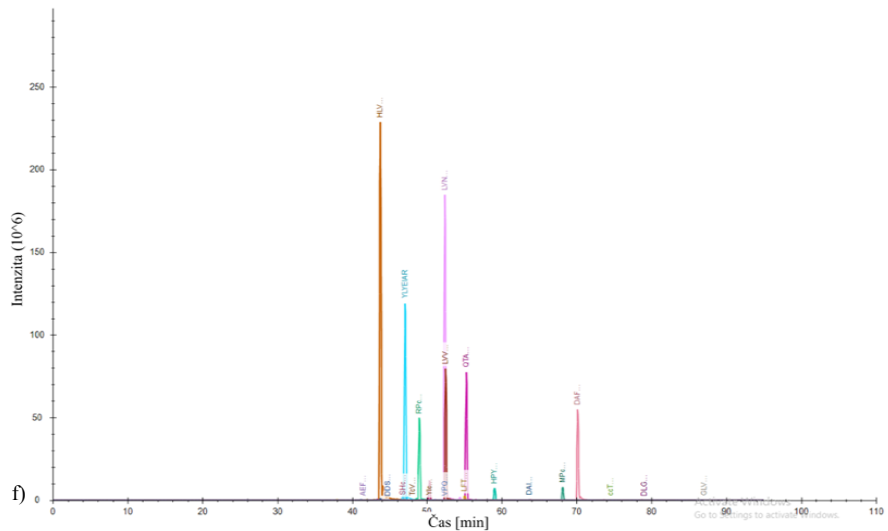


Obrázek č. 23 - pokračování: c) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou při koncentraci 50 ng/μl. d) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu (50 ng/μl) analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.

BSA protein - koncentrace 5 ng/μl

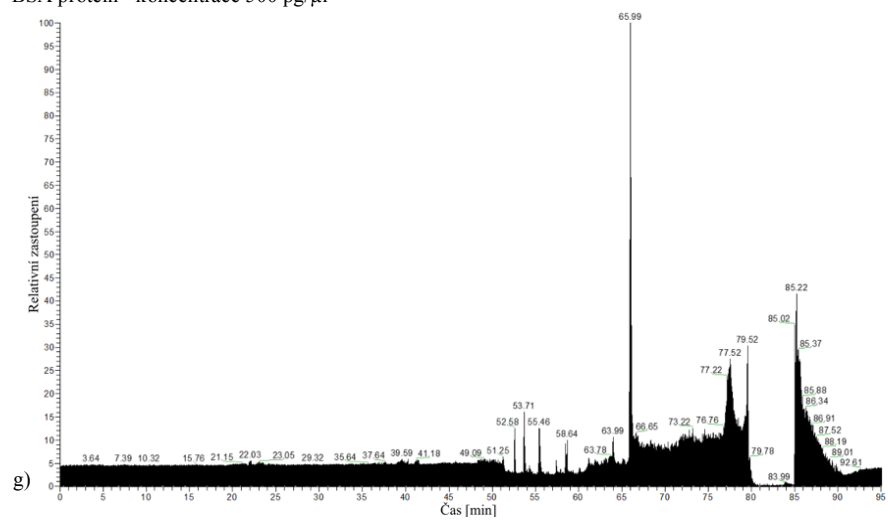


BSA protein - koncentrace 5 ng/μl - Skyline

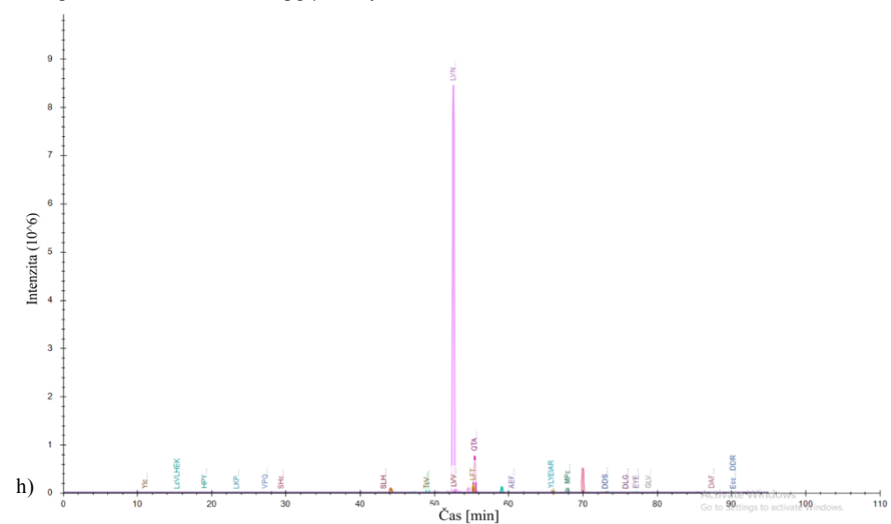


Obrázek č. 23 - pokračování: e) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou při koncentraci 5 ng/μl. f) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu (5 ng/μl) analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.

BSA protein - koncentrace 500 pg/ μ l

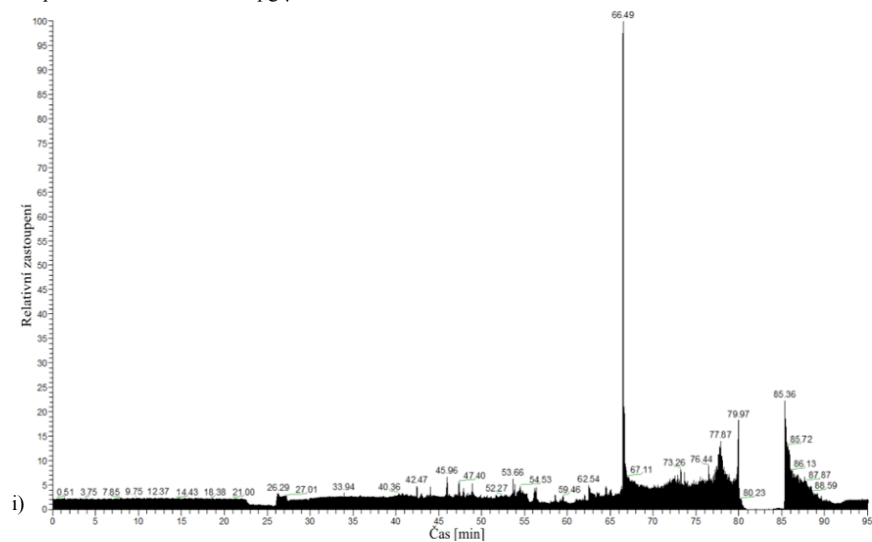


BSA protein - koncentrace 500 pg/ μ l - Skyline

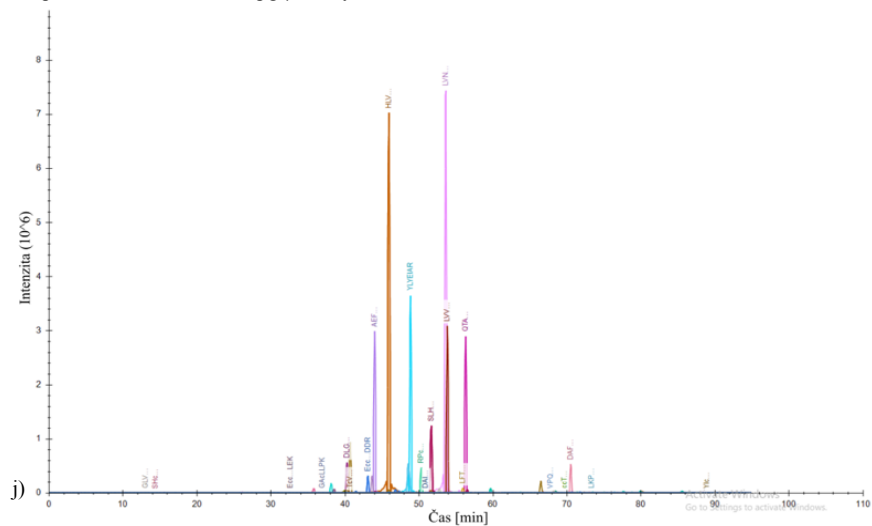


Obrázek č. 23 - pokračování: g) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou při koncentraci 500 pg/ μ l. h) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu (500 pg/ μ l) analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.

BSA protein - koncentrace 50 pg/μl



BSA protein - koncentrace 50 pg/μl - Skyline



Obrázek č. 23 - pokračování: i) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení BSA proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou při koncentraci 50 pg/μl. j) Fragmentační spektrum separované peptidové směsi BSA proteinu (50 pg/μl) analyzované cílenou MS metodou, zpracováno pomocí programu Skyline.

Tabulka č. 11: Nalezené/nenalezené peptidy včetně jejich prekurzorových i dceřinných fragmentů odpovídající proteinu BSA v programu Skyline u jednotlivých koncentrací (0,5 µg/µl, 50 ng/µl, 5 ng/µl, 500 pg/µl, 50 pg/µl) a u metody CID z předešlého měření.

Peptid	m/z peptidu a nábojový stav	0,5 µg/µl	50 ng/µl	5 ng/µl	500 pg/µl	50 pg/µl	metoda CID*
K.LVNELTEFAK.T	582,319 (2)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
R.RPCFSALTPDETYVPK.A	627,645 (3)	✓	✓	✓	✓	×	✓
K.YLYEIAR.R	464,250 (2)	✓	✓	✓	×	✓	✓
K.SLHTLFGDELCK.V	473,902 (3)	✓	✓	✓	×	✓	✓
K.LVVSTQTALA	501,795 (2)	✓	✓	✓	×	✓	✓
K.QTALVELLK.H	507,813 (2)	✓	✓	✓	×	✓	✓
K.HLVDEPQNLIK.Q	653,361 (2)	✓	✓	✓	×	✓	✓
K.SLHTLFGDELCK.V	710,350 (2)	✓	✓	✓	×	✓	×
K.DAFLGSFLYEYSR.R	784,375 (2)	✓	✓	✓	✓	×	×
K.HLVDEPQNLIK.Q	435,910 (3)	✓	✓	✓	×	×	✓
K.LKPDPNTLCDEFK.A	526,260 (3)	✓	✓	✓	×	×	✓
R.HPYFYAPPELLYYANK.Y	630,313 (3)	✓	✓	✓	×	×	✓
K.LFTFHADICTLPDTEK.Q	636,645 (3)	✓	✓	✓	×	×	×
K.LKPDPNTLCDEFK.A	788,887 (2)	✓	✓	✓	×	×	×
K.AEFVEVTK.L	461,747 (2)	✓	✓	×	×	✓	✓
R.MPCTEDYLSLILNR.L	862,920 (2)	✓	✓	✓	×	×	×
K.YICDNQDTISSK.L	722,324 (2)	✓	✓	×	×	×	✓
K.DAIPENLPPLTADFAEDK.D	652,658 (3)	✓	✓	×	×	×	×
K.GLVLIAFSQYLQCPFDEHVKL.L	831,426 (3)	✓	✓	×	×	×	×
R.HPYFYAPPELLYYANK.Y	944,967 (2)	✓	×	×	×	×	×
K.DLGEEHFK.G	487,732 (2)	✓	×	×	×	✓	×
K.CCTESLVNR.R	569,752 (2)	✓	×	×	×	×	✓
K.ECCHGDLLECADDR.A	583,892 (3)	✓	×	×	×	×	✓
K.EYEATLEECCA.K.D	751,810 (2)	✓	×	×	×	×	✓
K.ECCHGDLLECADDR.A	875,334 (2)	✓	✓	×	×	×	✓
K.VPQVSTPTLVEVSR.S	504,619 (3)	✓	×	×	×	×	×
R.LCVLHEK.T	449,744 (2)	✓	×	×	×	×	×
K.ECCDKPLLEK.S	646,304 (2)	×**	×	×	×	×	×
K.TCVADESHAGCEK.S	732,298 (2)	×**	×	×	×	×	×
K.DDSPDLPK.L	443,711 (2)	×**	×	×	×	×	×
K.GACLLPK.I	379,715 (2)	×	×	×	×	×	×
K.SHCIAEVEK.D	536,758 (2)	×	×	×	×	×	×

* Metoda CID z předchozího měření

** Nalezeny pouze prekurzorové fragmenty u vzorku při koncentraci 0,5 µg/µl

V programu Skyline bylo nalezeno při nejvyšší koncentraci (0,5 µg/µl) 27 z 32 (84 %) peptidů (prekurzorové i dceřinné fragmenty) BSA proteinu (viz tabulka č. 11, obrázek č. 23). Při koncentraci 50 ng/µl bylo identifikováno 21 z 32 (65 %) peptidů (prekurzorové i dceřinné fragmenty) BSA proteinu. Při koncentraci 5 ng/µl bylo identifikováno

15 z 32 (47 %) peptidů (prekurzorové i dceřinné fragmenty) BSA proteinu. Při koncentraci 500 pg/μl byly identifikovány pouze 3 z 32 (9 %) peptidy (prekurzorové i dceřinné fragmenty) BSA proteinu. Při koncentraci 50 pg/μl bylo identifikováno pouze 8 z 32 (25 %) peptidů (prekurzorové i dceřinné fragmenty) BSA proteinu. I při nízkých koncentračních řadách se nám podařilo identifikovat fragmenty odpovídající BSA proteinu, což svědčí o vysoké senzitivitě MS.

5.7 Necílená a následně cílená analýza vzorku obsahujícího FGF23 protein

Na základě zjištěnému parametru MS analyzátoru (typ aktivace CID) v předchozích měřeních byl použit k výzkumu opět FGF23 protein. Cílem bylo necílenou MS analýzou detekovat všechny proteiny nacházející se ve vzorku, poté vybrat FGF23 protein a k tomuto proteinu vyhledat specifické hodnoty m/z peptidů, které byly následně přidány do cílené metody. V další fázi experimentu byla cílenou MS analýzou provedena detekce peptidů včetně jejich prekurzorových i dceřinných fragmentů odpovídajících FGF23 proteinu. Jako vzorek proteinu byl použit čistý rekombinantní protein. V rámci přípravy vzorku bylo provedeno štěpení proteinu trypsinem.

K vzorku obsahujícího 1 μg FGF23 proteinu bylo přidáno 99 μl ABC roztoku pro naředění. Poté byl vzorek připraven dle protokolu č. 1. Posledním krokem přípravy vzorku bylo štěpení připravené směsi trypsinem. K vzorku byl přidán 1 μl trypsinu o koncentraci 0,5 μg/μl a takto připravený vzorek byl inkubován 3 h při teplotě 37 °C.

Poté byl vzorek purifikován a připraven pro MS analýzu dle protokolu č. 3.

Koncentrace peptidů FGF23 proteinu ve vzorku byla 17,9 pmol/μl. Vzorek byl naředěn na požadovanou koncentraci 500 fmol/μl.

Parametry MS analyzátoru byly nastaveny podle protokolu č. 6, ostatní parametry MS analyzátoru jsou uvedeny v tabulce č. 12.

Tabulka č. 12: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro necílenou analýzu vzorku obsahujícího FGF23 protein.

Parametr	
Délka analýzy	95 min
Rozlišení detektoru (orbitrap)	60000
Hmotnostní rozsah	400–1600 m/z
Zadní ostření čočky	60 %
Automatická regulace citlivosti	4,0e ⁵
Maximální čas nástřiku iontů	50 ms
Typ dat	centroid

Získaná data z MS analýzy byla zpracována pomocí programu MaxQuant používající databázi UniProt (druh *Homo sapiens*, stažena dne 12. 10. 2020).

Z FGF23 vzorku měřeného necílenou metodou byly pomocí softwarového programu MaxQuant a programu Perseus identifikovány proteiny nacházející se ve vzorku. Z těchto proteinů byl vybrán pomocí proteinové databáze Uniprot FGF23 protein (Q9GZV9). K tomuto proteinu byly pomocí programu Perseus přiřazeny specifické hodnoty m/z s nábojovým stavem +2 a +3 (viz tabulka č. 14), které byly následně přidány do cílené metody.

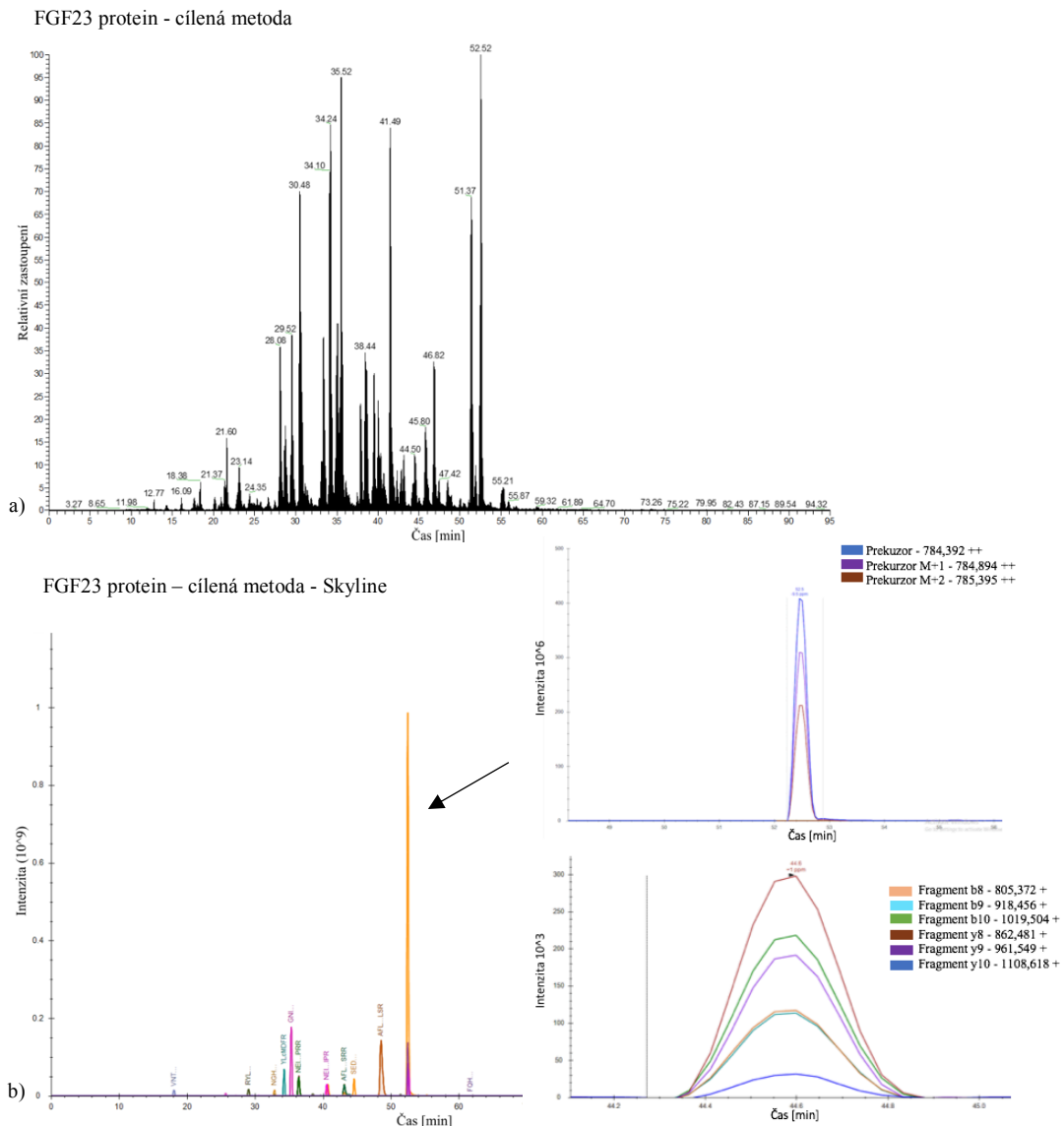
Parametry MS analyzátoru byly nastaveny dle protokolu č. 6, ostatní parametry MS analyzátoru jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Tabulka č. 13: Nastavení parametrů MS analyzátoru pro cílenou analýzu vzorku obsahujícího FGF23 protein.

	Parametr	
MS1	Rozlišení detektoru (orbitrap)	60000
	Hmotnostní rozsah	400–1600 m/z
	Automatická regulace citlivosti	4,0e ⁵
	Maximální čas nástřiku iontů	50 ms
MS2	Typ aktivace	CID
	CID kolizní energie	30 %
	Rozlišení detektoru (orbitrap)	15000
	Hmotnostní rozsah	150–2000 m/z
	Zadní ostření čočky	60 %
	Automatická regulace citlivosti	5,0e ⁴
	Maximální čas nástřiku iontů	50 ms
Typ dat	centroid	
MS1 + MS2	Délka analýzy	95 min

Tabulka č. 14: Hodnoty m/z peptidů a nábojový stav pro cílenou metodu MS analýzy vzorku obsahujícího FGF23 protein.

455,010 (4)	502,720 (2)	510,717 (2)	520,765 (4)
523,264 (3)	524,764 (4)	528,596 (3)	554,311 (3)
575,298 (3)	580,770 (2)	604,930 (3)	606,344 (3)
619,301 (3)	641,326 (3)	646,657 (3)	646,658 (3)
646,727 (4)	693,360 (3)	694,018 (3)	698,691 (3)
784,393 (2)	784,632 (4)	792,390 (2)	906,892 (2)
961,485 (2)	969,482 (2)	969,483 (2)	1045,84 (3)



Obrázek č. 24: a) Chromatogram separované peptidové směsi získané při štěpení FGF23 proteinu trypsinem analyzované cílenou MS metodou. b) Spektrum separované peptidové směsi FGF23 proteinu analyzované cílenou metodou MS, zpracováno pomocí programu Skyline. Nejintenzivnější peptid (R.SEDAGFVVITGVMSR.R) byl vybrán a zobrazen včetně jeho prekurzorů (nahore) i dceřiných fragmentů (dole).

Tabulka č. 15: Nalezené peptidy včetně jejich prekurzorových fragmentů i dceřinných fragmentů odpovídající proteinu FGF23 při koncentraci 500 fmol/μl v programu Skyline a jejich m/z a nábojový stav.

Peptid	m/z a nábojový stav
R.YLCMDFR.G	502,720 (2)
R.SEDAGFVVITGVMSR.R	523,264 (3)
R.NEIPLIHFNTPIPR.R	554,311 (3)
R.RYLCMDFR.G	580,770 (2)
R.GNIFGSHYFDPENCR.F	604,930 (3)
R.VNTHAGGTGPEGCRPFAK.F	619,301 (3)
R.AFLPGMNPPPYSQFLSR.R	641,326 (3)
R.AFLPGMNPPPYSQFLSR.R	693,360 (3)
K.NGHVDGAPHQTIYSALMIR.S.	694,018 (3)
R.SEDAGFVVITGVMSR.R	784,393 (2)
R.GNIFGSHYFDPENCR.F	906,892 (2)

V programu Skyline bylo nalezeno 11 (39 %) z celkem 28 peptidů včetně jejich prekurzorových i dceřinných fragmentů odpovídajících FGF23 proteinu (viz obrázek č. 24 b a tabulka č. 15) v důsledku správného nastavení MS analyzátoru při metodě cílené na FGF23 protein.

6 DISKUZE

MS analýza se k identifikaci proteinů používá od roku 1958, kdy Andersson detekoval fragmenty iontů získaných během ionizace aminokyselin (Andersson, 1958). Teprve v poslední době došlo k rozšíření MS analyzátorů do více pracovišť a tudíž tato metoda se stává dostupnější, čemuž odpovídá i narůstající počet publikací zabývajících se touto problematikou. V dostupné literatuře je popsána detekce FGF23 proteinu pouze pomocí imunohistochemickou analýzou (van Venrooij *et al.*, 2014, Shiba *et al.*, 2016, Dong *et al.*, 2019), dosud však nebyla publikována detekce FGF23 proteinu pomocí MS analýzy.

Shiba (Shiba *et al.*, 2016) u pacientů s PMT (phosphaturic mesenchymal tumor) provádí detekci FGF23 proteinu pomocí imunohistochemie s použitím komerčně dostupné protilátky proti FGF23 proteinu. Kromě toho také detekuje expresi mRNA FGF23 pomocí RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) za použití RNA extrahované z FFPE tkáně. Imunohistochemii pro detekci FGF23 shledává jako užitečný diagnostický doplněk pro diagnostiku PMT, naopak molekulární metodu (RT-PCR) shledává jako nepřesnou.

Van Venrooij (van Venrooij *et al.*, 2014) sleduje význam detekce FGF23 jako jednoho z potenciálních rizikových faktorů u pacientů s vaskulární aterosklerózou opět pomocí imunohistochemie.

Cílem cíleného proteomického experimentu je sledovat vybrané proteiny s vysokou citlivostí, reprodukovatelností a kvantitativní přesností, přičemž v tomto procesu je hmotnostní spektrometr naprogramován tak, aby detekoval specifické peptidové ionty odvozené od sledovaných proteinů. Tato metoda vyžaduje správné naprogramování hmotnostního spektrometru vložení potřebných údajů k detekci peptidů (Doerr, 2012).

Uchida (Uchida *et al.*, 2013) se ve své práci zabývá správným nastavením protokolu studie pro kvantitativní cílenou proteomiku podle LC-MS/MS. Zdůrazňuje, že k dosažení vysoce citlivé analýzy SRM/MRM pro jednotlivé peptidy je kromě dalších kroků (jako např. příprava vzorků) nezbytné zvolit správné m/z hodnoty peptidů a optimalizovat potenciál rozpadu a typ fragmentace v kolizní cele.

Mezi základní fragmentační techniky používané MS spektrometry patří tradiční disociace vyvolaná kolizí (CID, collision induced dissociation) a vysokoenergetická kolizní disociace (HCD, higher energy collisional dissociation) (Jedrychowski *et al.*, 2011).

Kolizní energie je parametr, který je nejčastěji upravován při disociaci fragmentů při MS/MS analýze. Jeho volba podstatně ovlivňuje kvalitu spektra detekovaných peptidů a tím využitelnost této metody. Při nízké kolizní energii jsou prekurzorové fragmenty zobrazeny jako vysoké píky v úzkém spektru, zatímco při vysoké kolizní energii můžou být zcela fragmentované a zobrazeny jako nízké píky v širším spektru. Relativní intenzita různých fragmentovaných iontů se tím pádem významně mění v závislosti na velikosti kolizní energie (Szabó *et al.*, 2021).

Jak prokázal Tu (Tu *et al.*, 2016), typ použité fragmentace hmotnostního spektrometru v kombinaci s různými detektory má vliv na senzitivitu této metody. Ve svém experimentu jsem použila nejprve HCD disociaci jak při detekci FGF23 tak i BSA proteinu, ani v jednom případě nebyla přítomnost zkoumaného proteinu prokázána. Až při nastavení typu fragmentace MS na CID byla v obou případech přítomnost zkoumaného proteinu potvrzena. U BSA proteinu v 84 % a u FGF23 proteinu v 39 %. To svědčí o důležitosti správného nastavení tohoto parametru při použití MS analýzy.

Dalším parametrem MS analyzátoru, který má vliv na citlivost detekce hledaných sloučenin je rozlišení Orbitrapu. Rajskei (Rajskei *et al.*, 2014) udává, že zvýšení rozlišení hmotnostního analyzátoru zabrání ztrátě iontů s velmi malým hmotnostním zastoupením (<1%), které nelze detekovat při nižších hodnotách rozlišení. V experimentu zkoumajícím vliv změny intenzity rozlišení Orbitrapu na citlivost detekce z celkového počtu 170 pesticidů v koncentraci 10 µg/kg ve vyšetřovaném vzorku nebylo identifikováno 15 vybraných pesticidů s rozlišením 17 500. Zvýšením rozlišení na 35 000 se toto číslo snížilo na 6 a při hodnotě rozlišení 70 000 byly pouze 4 nedetekované sloučeniny.

V další studii Kilpatrick (Kilpatrick *et al.*, 2017) zkoumá vliv správného nastavení rozlišení Orbitrapu na citlivost detekce proteinů pomocí MS analyzátoru. Při hodnotách rozlišení Orbitrapu od 15000 do 240000 popisuje rozdílnou citlivost detekce pro proteiny

o různých molekulárních hmotnostech (C-reactive protein, vitamin D-binding protein, transferrin, immunoglobulin G) v závislosti jak na nastavení citlivosti Orbitrapu tak molekulární hmotnosti zkoumaného proteinu.

Ve svém experimentu jsem zkoumala vliv různých nastavení parametrů MS při cílené analýze zkoumaných proteinů. Cílená metoda se však ukázala jako nepřesná bez správného nastavení MS analyzátoru a bez známých m/z hodnot pro daný protein. Proto se ukázalo jako užitečné provedení nejprve necílené metody, zjištění správných m/z hodnot pro daný protein a následně jejich zpracování do již cílené MS analýzy. Stejný postup je popisován také Milmanem ve studii o hlavních principech MS analýz (Milman, 2015).

Při cílené MS analýze vzorku obsahujícího FGF23 protein nebyly identifikované dceřinné fragmenty prekurzorů odpovídající FGF23 proteinu. Proto byla v následujících experimentech provedena optimalizace parametrů MS analyzátoru.

Následně byla provedena cílená analýza FGF23 proteinu při různých hodnotách HCD fragmentace. Nebyly nalezeny dceřinné fragmenty prekurzorů, v tomto případě tedy neměla velikost kolizní energie HCD vliv na detekci fragmentovaných iontů v hmotnostním analyzátoru. Proto byla v následujících experimentech provedena optimalizace jak vzorku tak dalších parametrů MS analyzátoru.

Rovněž přítomnost FGF23 proteinu ve vzorcích mikrodisekovaných tkáňových řezů připravených z amyloidů mozkových nádorů se nám nepodařilo cílenou analýzou detekovat. Změna vzorku obsahujícího FGF23 protein tedy neměla vliv na detekci zkoumaného proteinu.

Výsledky dosavadní cílené analýzy neumožňovaly identifikovat prekurzory peptidů včetně jejich dceřinných fragmentů u rekombinantního proteinu i FFPE vzorku. V následujících experimentech byl za účelem hledání správných parametrů MS analyzátoru použit hovězí sérový albumin (BSA), jakožto levný a dostupný protein. Cílem bylo optimalizovat nastavení MS pro spolehlivou detekci BSA proteinu. Opět ani při použití různých nastavení parametrů MS analyzátoru jako je kolizní energie, rozlišení

detektoru Orbitrapu, maximální čas nástřiku iontů a typu dat se nepodařilo prokázat dceřinné fragmenty prekurzorů odpovídající BSA proteinu.

Proto byl vzorek BSA proteinu analyzován necílenou univerzální metodou. Byly zjištěny specifické m/z hodnoty tohoto proteinu a zapracovány do již cílené metody na výše uvedený protein. Nebyly nalezeny žádné dceřinné fragmenty prekurzorů odpovídající proteinu BSA. Proto jsme následně experimentovali s různým nastavením kolizní energie MS analyzátoru a při změně fragmentace z HCD na CID se nám již podařilo identifikovat 19 z celkem 32 peptidů, včetně jejich prekurzorových i dceřinných fragmentů. Následně byla připravena koncentrační řada BSA proteinu a byla provedena cílená MS analýza pro jednotlivé koncentrace. Při každém desetinásobném ředění došlo k poklesu detekovaných fragmentů. I při nízkých koncentracích v řádech pikogramů se nám podařilo identifikovat fragmenty odpovídající BSA proteinu, což svědčí o vysoké senzitivitě MS.

V závěru experimentu byla provedena již při známém typu fragmentace CID detekce FGF23 proteinu. Nejprve byly necílenou univerzální metodou identifikovány všechny proteiny nacházející se ve vzorku. Z těchto proteinů byl vybrán FGF23 protein, pro který byly zjištěny specifické hodnoty m/z. Tyto m/z hodnoty byly zapracovány do již cílené metody na výše uvedený protein, která byla následně spuštěna na MS analyzátoru po předchozím nastavení parametrů (viz výsledky v kapitole 5.7). Bylo identifikováno 11 (z 28) peptidů včetně prekurzorových i dceřinných fragmentů potvrzující přítomnost FGF23 proteinu.

Z námi zjištěných výsledků lze rovněž vyvodit závěr, že pro správnost identifikace proteinu pomocí MS analyzátoru je důležité nastavení MS analyzátoru nejprve prostřednictvím necílené metody, identifikace m/z peptidů pro zkoumaný protein a pak teprve provedení cíleného měření s již známými m/z peptidů.

Ve své práci jsem chtěla provést ještě řadu dalších experimentů upřesňujících MS analýzu FGF23 proteinu. Mým hlavním cílem bylo úspěšně dokončit optimalizaci metody a pokračovat s analýzou FFPE vzorků, ale vzhledem k probíhající pandemii Covid 19/SARS-CoV-2, kdy byl dle zákona zakázán vstup studentům do laboratoří, nemohl být experiment dokončen.

7 ZÁVĚR

Podářilo se nám prokázat pŕítomnost 39 % peptidů včetně prekurzorových i dceřinných fragmentů odpovídající FGF23 proteinu pomocí MS analýzy z pŕipraveného rekombinantního FGF23 proteinu. Pŕítomnost FGF23 proteinu z FFPE vzorků se nám nepodařilo prokázat, je potřeba ještě dalších studií na MS analyzátoru k upŕesnění této metody. Z námi provedených experimentů vyplývá důležitost správného nastavení jednotlivých parametrů MS analyzátoru pro úspěšnost cílené MS analýzy.

Bylo plánováno provedení ještě dalších experimentů upŕesňujících MS analýzu FGF23 proteinu, včetně pŕípravy a zpracování FFPE vzorků, ale vzhledem k probíhající pandemii Covid 19/SARS-CoV-2, kdy byl dle zákona zakázán vstup studentům do laboratoŕí, nemohl být experiment dokončen.

8 LITERATURA

Andersson, C. O. (1958): Mass spectrometric studies on amino acid and peptide derivatives. *Acta Chemica Scandinavica*, 12(6), 1353–1353.

Ahrens, C. H., Brunner, E., Qeli, E., Basler, K., Aebersold, R. (2010): Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(11), 789–801.

Allerstorfer, S., Sonvilla, G., Fischer, H., Spiegl-Kreinecker, S., Gauglhofer, C., Setinek, U., Czech, T., Marosi, C., Buchroithner, J., Pichler, J., Silye, R., Mohr, T., Holzmann, K., Grasl-Kraupp, B., Marian, B., Grusch, M., Fischer, J., Micksche, M., Berger, W. (2008): FGF5 as an oncogenic factor in human glioblastoma multiforme: Autocrine and paracrine activities. *Oncogene*, 27(30), 4180–4190.

Arnautakis, D., Naseri, I. (2015): Sinonasal Phosphaturic Mesenchymal Tumor: A Rare and Misinterpreted Entity. *Journal of Neurological Surgery Reports*, 76(2), 233–238.

Aryal, S. (2020): Radioimmunoassay- Principle, Uses and Limitations. *Microbe Notes*. [online] [navštíveno 28.10.2020] Dostupné z <https://microbenotes.com/radioimmunoassay-principle-uses-and-limitations/>

Beenken, A., Mohammadi, M. (2009): The FGF family: Biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(3), 235–253.

Bhattacharyya, N., Wiench, M., Dumitrescu, C., Connolly, B. M., Bugge, T. H., Patel, H. V., Gafni, R. I., Cherman, N., Cho, M., Hager, G. L., Collins, M. T. (2012): Mechanism of FGF23 processing in fibrous dysplasia. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 27(5), 1132–1141.

Biocev. [online] [navštíveno 27. 2. 2021] Dostupné z <https://www.biocev.eu/cs/sluzby/omics-proteomika.6/cilena-proteomika.25?t=s>

Blau, J. E., Collins, M. T. (2015): The PTH-Vitamin D-FGF23 axis. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 16(2), 165–174.

Boja, E. S., Rodriguez, H. (2011): The path to clinical proteomics research: Integration of proteomics, genomics, clinical laboratory and regulatory science. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 31(2), 61–71.

Borràs, E., Sabidó, E. (2017): What is targeted proteomics? A concise revision of targeted acquisition and targeted data analysis in mass spectrometry. *Proteomics*, 17, 17–18.

Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. E. (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*, 106(3), 761–771.

Bourmaud, A., Gallien, S., Domon, B. (2016): Parallel reaction monitoring using quadrupole-Orbitrap mass spectrometer: Principle and applications. *Proteomics*, 16(15–16), 2146–2159.

Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., Wolk, D. M. (2013): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 547–603.

Czaplicki, S. (2013): Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. *Column Chromatography*, 99–122.

Desiere, F. (2006): The PeptideAtlas project. *Nucleic Acids Research*, 34(90001), D655–D658.

Doerr, A. (2012): Interactomes by mass spectrometry. *Nature methods*, 9(11), 1043–1043.

Dong, Q., Li, S., Wang, W., Han, L., Xia, Z., Wu, Y., Tang, Y., Li, J., Cheng, X. (2019). FGF23 regulates atrial fibrosis in atrial fibrillation by mediating the STAT3 and SMAD3 pathways. *Journal of cellular physiology*, 234(11), 19502–19510.

El-Aneed, A., Cohen, A., Banoub, J. (2009): Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3), 210–230.

Elshanawane, A. (2014): Development and Validation of HPLC Method for Simultaneous Estimation of Brimonidine Tartrate and Timolol Maleate in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, 05(03).

Engvall, E., Perlmann, P. (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874.

Eswarakumar, V. P., Lax, I., Schlessinger, J. (2005): Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(2), 139–149.

Faktor, J., Struhárová, I., Fu, A., Hubálek, M., Vojt, I. (2011): Kvantifikace proteinových biomarkerů pomocí hmotnostní spektrometrie pracující v režimu monitorování vybraných reakcí. *Chemické Listy*, 5.

Feng, S., Wang, J., Zhang, Y., Creighton, C. J., Ittmann, M. (2015): FGF23 promotes prostate cancer progression. *Oncotarget*, 6(19), 17291.

Frantzi, M., Latosinska, A., Mischak, H. (2019): Proteomics in Drug Development: The Dawn of a New Era? *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 13(2), 1800087.

Frewen, B. E., Merrihew, G. E., Wu, C. C., Noble, W. S., MacCoss, M. J. (2006): Analysis of Peptide MS/MS Spectra from Large-Scale Proteomics Experiments Using Spectrum Libraries. *Analytical Chemistry*, 78(16), 5678–5684.

Gallien, S., Domon, B. (2014): Quantitative proteomics using the high resolution accurate mass capabilities of the quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Bioanalysis*, 6(16), 2159–2170.

Gallien, S., Duriez, E., Crone, C., Kellmann, M., Moehring, T., Domon, B. (2012): Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(12), 1709–1723.

Gene Cards. [online] [navštíveno 7. 12. 2020] Dostupné z <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FGF23>

- Gillette, M. A., Carr, S. A. (2013): Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nature Methods*, 10(1), 28–34.
- Grose, R., Dickson, C. (2005): Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(2), 179–186.
- Haag, A. M. (2016): Mass Analyzers and Mass Spectrometers. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 919, 157–169.
- Hale, J. E. (2013): Advantageous uses of mass spectrometry for the quantification of proteins. *International Journal of Proteomics*, 2013, 219452.
- Hillen, F., Baeten, C. I. M., van de Winkel, A., Creyten, D., van der Schaft, D. W. J., Winnepeninckx, V., Griffioen, A. W. (2008): Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 57(1), 97–106.
- Ho, C. S., Lam, C. W. K., Chan, M. H. M., Cheung, R. C. K., Law, L. K., Lit, L. C. W., Ng, K. F., Suen, M. W. M., Tai, H. L. (2003): Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 24(1), 3–12.
- Eswarakumar, K. V. M., Olek, K. M., Müller, A. C., Tan, C. S. H., Bennett, K. L., Colinge, J., Superti-Furga, G. (2015): Proteome-wide drug and metabolite interaction mapping by thermal-stability profiling. *Nature Methods*, 12(11), 1055–1057.
- Chiva, C., Sabidó, E. (2017): Peptide Selection for Targeted Protein Quantitation. *Journal of Proteome Research*, 16(3), 1376–1380.
- Chong, W. H., Molinolo, A. A., Chen, C. C., Collins, M. T. (2011): Tumor-induced osteomalacia. *Endocrine-Related Cancer*, 18(3), 53–77.
- Jedrychowski, M. P., Huttlin, E. L., Haas, W., Sowa, M. E., Rad, R., Gygi, S. P. (2011): Evaluation of HCD-and CID-type fragmentation within their respective detection platforms for murine phosphoproteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(12), M111–009910.

Katafuchi, T., Esterházy, D., Lemoff, A., Ding, X., Sondhi, V., Kliewer, S. A., Mirzaei, H., Mangelsdorf, D. J. (2015): Detection of FGF15 in plasma by stable isotope standards and capture by anti-peptide antibodies and targeted mass spectrometry. *Cell metabolism*, 21(6), 898–904.

Kilpatrick, L. E., Kilpatrick, E. L. (2017): Optimizing high-resolution mass spectrometry for the identification of low-abundance post-translational modifications of intact proteins. *Journal of proteome research*, 16(9), 3255–3265.

Kim, J. I., Choi, K. U., Lee, I. S., Choi, Y. J., Kim, W. T., Shin, D. H., Kim, K., Lee, J. H., Kim, J. Y., Sol, M. Y. (2015): Expression of hypoxic markers and their prognostic significance in soft tissue sarcoma. *Oncology Letters*, 9(4), 1699–1706.

Kim, Y. J., Gallien, S., El-Khoury, V., Goswami, P., Sertamo, K., Schlessner, M., Berchem, G., Domon, B. (2015): Quantification of SAA1 and SAA2 in lung cancer plasma using the isotype-specific PRM assays. *Proteomics*, 15(18), 3116-3125.

Knauer. [online] [navštíveno 7. 12. 2020] Dostupné z <https://www.knauer.net/en/what-happens-in-a-quadrupole/f24287>

Kusebauch, U., Campbell, D. S., Deutsch, E. W., Chu, C. S., Spicer, D. A., Brusniak, M.-Y., Slagel, J., Sun, Z., Stevens, J., Grimes, B., Shteynberg, D., Hoopmann, M. R., Blattmann, P., Ratushny, A. V., Rinner, O., Picotti, P., Carapito, C., Huang, C.-Y., Kapousouz, M., Lam, H., Tran, T., Demir, E., Aitchison, J. D., Sander, C., Hood, L., Aebersold, R., Moritz, R. L. (2016): Human SRMAtlas: A Resource of Targeted Assays to Quantify the Complete Human Proteome. *Cell*, 166(3), 766–778.

Lacorte, S., Fernandez-Alba, A. R. (2006): Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass spectrometry reviews*, 25(6), 866–880.

Lange, V., Picotti, P., Domon, B., Aebersold, R. (2008): Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: A tutorial. *Molecular Systems Biology*, 4, 222.

Lee, E. K., Martinez, M. C. R., Blakely, K., Santos, K. D., Hoang, V. C., Chow, A., Emmenegger, U. (2014): FGF23: Mediator of poor prognosis in a sizeable subgroup of patients with castration-resistant prostate cancer presenting with severe hypophosphatemia? *Medical Hypotheses*, 83(4), 482–487.

Lesur, A., Ancheva, L., Kim, Y. J., Berchem, G., van Oostrum, J., Domon, B. (2015): Screening protein isoforms predictive for cancer using immunoaffinity capture and fast LC-MS in PRM mode. *PROTEOMICS–Clinical Applications*, 9(7-8), 695–705.

Li, J., Zhao, W., Akbani, R., Liu, W., Ju, Z., Ling, S., Vellano, C. P., Roebuck, P., Yu, Q., Eterovic, A. K., Byers, L. A., Davies, M. A., Deng, W., Gopal, Y. N. V., Chen, G., von Euw, E. M., Slamon, D., Conklin, D., Heymach, J. V., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Jeffrey, N. M., Lu, Y., Gordon, B. M., Liang, H. (2017): Characterization of Human Cancer Cell Lines by Reverse-phase Protein Arrays. *Cancer Cell*, 31(2), 225–239.

Liu, S., Guo, R., Simpson, L. G., Xiao, Z.-S., Burnham, C. E., Quarles, L. D. (2003): Regulation of Fibroblastic Growth Factor 23 Expression but Not Degradation by PHEX. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37419–37426.

Łupicka-Słowik, A., Grzywa, R., Leporowska, E., Procyk, D., Oleksyszyn, J., Sieńczyk, M. (2019): Development and Evaluation of an Immunoglobulin Y-Based ELISA for Measuring Prostate Specific Antigen in Human Serum. *Annals of Laboratory Medicine*, 39(4), 373–380.

Macklin, A., Khan, S., Kislinger, T. (2020): Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: Applications to cancer research. *Clinical Proteomics*, 17(1), 17.

MacLean, B., Tomazela, D. M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G. L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D. L., Liebler, D. C., MacCoss, M. J. (2010): Skyline: An open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*, 26(7), 966–968.

Mamyrin, B. A. (2001): Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). *International Journal of Mass Spectrometry*, 206(3), 251–266.

Manza, L. L., Stamer, S. L., Ham, A. J. L., Codreanu, S. G., Liebler, D. C. (2005): Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. *Proteomics*, 5(7), 1742–1745.

Marx, V. (2013): Targeted proteomics. *Nature Methods*, 10(1), 19–22.

Mateus, A., Määttä, T. A., Savitski, M. M. (2016): Thermal proteome profiling: Unbiased assessment of protein state through heat-induced stability changes. *Proteome Science*, 15(1), 13.

Medline Plus. [online] [navštíveno 7. 12. 2020] Dostupné z <https://medlineplus.gov/genetics/gene/fgf23/>

Milman, B. L. (2015): General principles of identification by mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 69, 24–33.

Mustafa, S. (2014): An Improved High Performance Liquid Chromatographic Method for Tryptophan Analysis in Rat Brain Administrated by Seaweed. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 5(2).

Park, J., Oh, H. J., Han, D., Wang, J. I., Park, I. A., Ryu, H. S., Kim, Y. (2020): Parallel Reaction Monitoring-Mass Spectrometry (PRM-MS)-Based Targeted Proteomic Surrogates for Intrinsic Subtypes in Breast Cancer: Comparative Analysis with Immunohistochemical Phenotypes. *Journal of Proteome Research*, 19(7), 2643–2653.

Picotti, P., Bodenmiller, B., Mueller, L. N., Domon, B., Aebersold, R. (2009): Full Dynamic Range Proteome Analysis of *S. cerevisiae* by Targeted Proteomics. *Cell*, 138(4), 795–806.

Praither, J. D. (1985): Basic Principles of Radioimmunoassay Testing: A Simple Approach. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 13(1), 34–43.

Quarles, L. D. (2012): Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: Implications in chronic kidney disease. *Experimental Cell Research*, 318(9), 1040–1048.

Rajski, Ł., del Mar Gómez-Ramos, M., Fernández-Alba, A. R. (2014): Large pesticide multiresidue screening method by liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry in full scan mode applied to fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1360, 119–127.

RCSB Protein Data Bank. [online] [navštíveno 7. 12. 2020] Dostupné z

<https://www.rcsb.org/3d-view/2P39/1>

Reinhard, F. B. M., Eberhard, D., Werner, T., Franken, H., Childs, D., Doce, C., Savitski, M. F., Huber, W., Bantscheff, M., Savitski, M. M., Drewes, G. (2015): Thermal proteome profiling monitors ligand interactions with cellular membrane proteins. *Nature Methods*, 12(12), 1129–1131.

Renart, J., Reiser, J., Stark, G. R. (1979): Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(7), 3116–3120.

Ronca, R., Giacomini, A., Di Salle, E., Coltrini, D., Pagano, K., Ragona, L., Matarazzo, S., Rezzola, S., Maiolo, D., Torella, R., Moroni, E., Mazzieri, R., Escobar, G., Mor, M., Colombo, G., Presta, M. (2015): Long-Pentraxin 3 Derivative as a Small-Molecule FGF Trap for Cancer Therapy. *Cancer Cell*, 28(2), 225–239.

Ruppen-Cañás, I., López-Casas, P. P., García, F., Ximénez-Embún, P., Muñoz, M., Morelli, M. P., Real, F. X., Serna, A., Hidalgo, M., Ashman, K. (2012): An improved quantitative mass spectrometry analysis of tumor specific mutant proteins at high sensitivity. *Proteomics*, 12(9), 1319–1327.

Saito, T., Fukumoto, S. (2009): Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) and Disorders of Phosphate Metabolism. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, 2009, 1–6.

Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., Morimoto, S. (2018): Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of natural medicines*, 72(1), 32–42.

Savitski, M. M., Reinhard, F. B. M., Franken, H., Werner, T., Savitski, M. F., Eberhard, D., Molina, D. M., Jafari, R., Dovega, R. B., Klaeger, S., Kuster, B., Nordlund, P., Bantscheff, M., Drewes, G. (2014): Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome. *Science*, 346(6205), 1255784.

Schilling, B., MacLean, B., Held, J. M., Sahu, A. K., Rardin, M. J., Sorensen, D. J., Peters, T., Wolfe, A. J., Hunter, C. L., MacCoss, M. J., Gibson, B. W. (2015): Multiplexed, scheduled, high-resolution parallel reaction monitoring on a full scan QqTOF instrument with integrated data-dependent and targeted mass spectrometric workflows. *Analytical chemistry*, 87(20), 10222–10229.

Selevsek, N., Chang, C.-Y., Gillet, L. C., Navarro, P., Bernhardt, O. M., Reiter, L., Cheng, L.-Y., Vitek, O., Aebersold, R. (2015): Reproducible and consistent quantification of the *Saccharomyces cerevisiae* proteome by SWATH-mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(3), 739–749.

Senko, M. W., Remes, P. M., Canterbury, J. D., Mathur, R., Song, Q., Eliuk, S. M., Mullen, C., Earley, L., Hardman, M., Blethrow, J. D., Bui, H., Specht, A., Lange, O., Denisov, E., Makarov, A., Horning, S., Zabrouskov, V. (2013): Novel parallelized quadrupole/linear ion trap/Orbitrap tribrid mass spectrometer improving proteome coverage and peptide identification rates. *Analytical chemistry*, 85(24), 11710–11714.

Shi, T., Su, D., Liu, T., Tang, K., Camp, D. G., Qian, W. J., Smith, R. D. (2012): Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring-based targeted quantitative proteomics. *Proteomics*, 12(8), 1074–1092.

Shiba, E., Matsuyama, A., Shibuya, R., Yabuki, K., Harada, H., Nakamoto, M., Kasai, T., Hisaoka, M. (2016): Immunohistochemical and molecular detection of the expression of FGF23 in phosphaturic mesenchymal tumors including the non-phosphaturic variant. *Diagnostic pathology*, 11(1), 1–7.

Shimada, T., Hasegawa, H., Yamazaki, Y., Muto, T., Hino, R., Takeuchi, Y., Fujita, T., Nakahara, K., Fukumoto, S., Yamashita, T. (2004): FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 19(3), 429–435.

Schilling, B., MacLean, B., Held, J. M., Sahu, A. K., Rardin, M. J., Sorensen, D. J., Peters, T., Wolfe, A. J., Hunter, C. L., MacCoss, M. J., Gibson, B. W. (2015): Multiplexed, Scheduled, High-Resolution Parallel Reaction Monitoring on a Full Scan QqTOF Instrument with Integrated Data-Dependent and Targeted Mass Spectrometric Workflows. *Analytical Chemistry*, 87(20), 10222–10229.

Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. (2018): Cancer statistics, 2018: *Cancer Statistics*, 2018. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68(1), 7–30.

Srinivas, P. R. (2012): Introduction to protein electrophoresis. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 869, 23–28.

Szabó, D., Schlosser, G., Vékey, K., Drahos, L., Révész, Á. (2021): Collision energies on QTOF and Orbitrap instruments: How to make proteomics measurements comparable?. *Journal of Mass Spectrometry*, 56(1), e4693.

Thammana, M. (2016): A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 7.

Thermo Fisher Scientific. [online] [Navštíveno 7.12.2020] Dostupné z <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/quantitative-proteomics.html>

Todo, T., Kondo, T., Kirino, T., Asai, A., Adams, E. F., Nakamura, S., Ikeda, K., Kurokawa, T. (1998): Expression and Growth Stimulatory Effect of Fibroblast Growth Factor 9 in Human Brain Tumors. *Neurosurgery*, 43(2), 337–346.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354.

Tu, C., Li, J., Shen, S., Sheng, Q., Shyr, Y., Qu, J. (2016): Performance investigation of proteomic Identification by HCD/CID fragmentations in combination with high/low-resolution detectors on a Tribrid, high-field Orbitrap instrument. *PloS one*, 11(7), e0160160.

Uchida, Y., Tachikawa, M., Obuchi, W., Hoshi, Y., Tomioka, Y., Ohtsuki, S., Terasaki, T. (2013). A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood–brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids and barriers of the CNS*, 10(1), 1–22.

Urban, P. L. (2016): Quantitative mass spectrometry: An overview. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 374(2079).

van Venrooij, N. A., Pereira, R. C., Tintut, Y., Fishbein, M. C., Tumber, N., Demer, L. L., Salusky I. B., Wesseling-Perry, K. (2014). FGF23 protein expression in coronary arteries is associated with impaired kidney function. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29(8), 1525–1532.

Vyberg, M., Nielsen, S., Røge, R., Sheppard, B., Ranger-Moore, J., Walk, E., Gartemann, J., Rohr, U.-P., Teichgräber, V. (2015): Immunohistochemical expression of HER2 in breast cancer: Socioeconomic impact of inaccurate tests. *BMC Health Services Research*, 15, 352.

Ward, L. (2019): Sex differences in atherosclerosis and exercise effects (Vol. 1676). Linköping University Electronic Press, Linköping, Sweden.

Watford, M., Wu, G. (2018): Protein. *Advances in Nutrition*, 9(5), 651–653.

Westermeier, R. (2006): Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations. John Wiley & Sons, New York.

White, K. E., Evans, W. E., O’Riordan, J. L. H., Speer, M. C., Econs, M. J., Lorenz-Depiereux, B., Grabowski, M., Meitinger, T., Strom, T. M. (2000): Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nature Genetics*, 26(3), 345–348.

Yaffe, M. B. (2019): Why geneticists stole cancer research even though cancer is primarily a signaling disease. *Science Signaling*, 12(565).

Yalow, R. S., Berson, S. A. (1959): Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, 184 (4699), 1648–1649.

Yu, L. R., Stewart, N. A., Veenstra, T. D. (2010): Proteomics. In: Ginsburg, G. S., Willard, H. F. (ed.): *Essentials of Genomic and Personalized Medicine*, pp. 89–96, Elsevier, Academic Press, New York.

Zhao, Y., Widen, S. G., Jamaluddin, M., Tian, B., Wood, T. G., Edeh, C. B., Brasier, A. R. (2011): Quantification of Activated NF- κ B/RelA Complexes Using ssDNA Aptamer Affinity–Stable Isotope Dilution—Selected Reaction Monitoring—Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(6), M111–008771.