

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Karolína Vévodová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Zvyšování citlivosti v cílených proteomických analýzách

Bakalářská práce

Karolína Vévodová

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

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Oždian Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Karolína VÉVODOVÁ
Osobní číslo: R21763
Studijní program: B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Zvyšování citlivosti v cílených proteomických analýzách
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Studentka se seznámí se základy instrumentace pro cílenou proteomiku založenou na hmotnostní spektrometrii po teoretické a praktické stránce. Studentka provede sérii experimentů s cílem zvýšit citlivost stanovení pomocí úprav přípravků, chromatografické separaci a nastavení hmotnostního spektrometru.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Borràs E, Sabidó E. What is targeted proteomics? A concise revision of targeted acquisition and targeted data analysis in mass spectrometry. *Proteomics*. 2017 Sep;17(17-18). doi: 10.1002/pmic.201700180. PMID: 28719092.
Martin, A., David, V. and Quarles, L.D. (2012) 'REGULATION AND FUNCTION OF THE FGF23/KLOTHO ENDOCRINE PATHWAYS', *Physiological reviews*, 92(1), pp. 131–155. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2011>.
Prié, D. and Friedlander, G. (2010) 'Reciprocal Control of 1,25-Dihydroxyvitamin D and FGF23 Formation Involving the FGF23/Klotho System', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(9), pp. 1717–1722. Available at: <https://doi.org/10.2215/CJN.02680310>.
Simic, P. and Babitt, J.L. (2021) 'Regulation of FGF23: Beyond Bone', *Current Osteoporosis Reports*, 19(6), pp. 563–573. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11914-021-00703-w>.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.**
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání bakalářské práce: 12 února 2023
Termín odevzdání bakalářské práce: 31 května 2024

LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 30. března 2023

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Karolína Vévodová
Název práce	Zvyšování citlivosti v cílených proteomických analýzách
Typ práce	bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Oždian Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024
Klíčová slova:	proteomika, chromatografická separace, hmotnostní spektrometrie, Fibroblastový růstový faktor 23, optimalizace
Počet stran	76
Jazyk:	Čeština

SOUHRN

Cílem mé práce bylo zvýšit citlivost metody pro analýzu proteinů. V teoretické části jsem podrobně diskutovala problematiku chromatografické separace a hmotnostní spektrometrie, přičemž jsem zdůraznila důležitost využití těchto technik v proteomickém výzkumu. Dále je zde představena problematika Fibroblastového růstového faktoru 23 a jeho role v organismu. V praktické části jsem se věnovala optimalizaci přípravy vzorku, chromatografické separace a nastavení hmotnostního spektrometru s cílem vyvinout metodu pro mikroprůtokovou LC-MS. Postupnou optimalizací přečištění vzorku se podařilo posunout z výtěžku průměrných 20 % na skoro 80 %. Dále se také optimalizací přístrojového nastavení podařilo zvýšit citlivost z hodnot 10^3 v 10 μ l roztoku na hodnoty 10^7 v 1 μ l roztoku. Veškeré experimenty jsem provedla na dostupnějším Bovinním sérovém albuminu s úmyslem vyvinout metodu pro diagnostiku Fibroblastového růstového faktoru 23. Bohužel práce nebyla dokončena z kapacitních a časových důvodů, a proto se dalším krokům plánuji věnovat v rámci své diplomové práce.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Karolína Vévodová
Title:	Increasing the sensitivity in targeted proteomics
Type of thesis:	bachelor
Department:	Department of cell biology and genetics
Supervisor:	Mgr. Tomáš Oždian, PhD.
The year of presentation:	2024
Keywords	proteomics, chromatographic separation, mass spectrometry, Fibroblast Growth Factor 23, optimization
Number of pages	76
Language:	Czech

SUMMARY

The aim of my work was to increase the sensitivity of the method for protein analysis. In the theoretical part, I discussed in detail the issues of chromatographic separation and mass spectrometry, emphasizing the importance of application these techniques in proteomic research. Furthermore, the issue of Fibroblast Growth Factor 23 and its role in the organism is introduced. In the practical part, I focused on optimizing sample preparation, chromatographic separation, and mass spectrometer settings to develop a method for microflow LC-MS. Through gradual sample purification optimization, the yield was increased from an average of 20 % to nearly 80 %. Additionally, instrument setting optimization resulted in increasing sensitivity from values of 10^3 in a 10 μ l solution to values of 10^7 in a 1 μ l solution. All experiments were conducted using more readily available Bovine Serum Albumin with the intention of developing a method for diagnosing Fibroblast Growth Factor 23. Unfortunately, the work was not completed due to capacity and time constraints, and therefore, I plan to dedicate further steps to it as part of my thesis.

Čestně prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Zvyšování citlivosti v cílených proteomických analýzách“ vypracovala samostatně a všechny použité zdroje jsem řádně citovala a uvedla v seznamu literatury. Všechny informace, data a názory převzaté z literatury, internetu či jiných zdrojů jsou jasně označeny a citovány v souladu s platnými akademickými standardy a etickými principy vědecké práce.

V Olomouci dne.....

.....

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu, Mgr. Tomáši Oždianovi PhD., za jeho cenné rady, vedení, trpělivost a podporu během celého procesu tvorby mé práce. Jeho odborné znalosti a konstruktivní připomínky byly velkým přínosem. Dále bych chtěla vyjádřit svou vděčnost všem členům kolektivu Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého, kteří mi poskytli nezbytné zázemí k realizaci mého výzkumu. A nakonec, děkuji všem, kteří mi v průběhu studia a psaní práce pomohli, inspirovali mě nebo mi byli morální podporou. Tato práce byla podpořena z infrastrukturního projektu EATRIS-CZ (LM2023053), z projektu Národní Ústav pro Výzkum Rakoviny (Program EXCELES, LX22NPO5102) a vnitřního grantu Lékařské fakulty Univerzity Palackého IGA_LF_2024_038.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	CHROMATOGRAFIE	3
3.1.1	KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	3
3.1.2	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	4
3.2	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	9
3.2.1	IONIZACE	9
3.2.2	ANALÝZA	11
3.3	VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V PROTEOMICE	15
3.3.1	NECÍLENÁ PROTEOMIKA	15
3.3.2	CÍLENÁ PROTEOMIKA	15
3.4	GENY FIBROBLASTOVÝCH RŮSTOVÝCH FAKTORŮ	18
3.5	FIBROBLASTOVÝ RŮSTOVÝ FAKTOR 23	18
3.5.1	FUNKCE FGF23	19
3.5.2	FGF23 A JEHO ROLE VE VYBRANÝCH LIDSKÝCH ONEMOCNĚNÍCH	20
3.5.3	SYSTÉMOVÁ REGULACE PROTEINU FGF23	21
4	MATERIÁL A METODY	23
4.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL	23
4.2	CHEMIKÁLIE, ROZTOKY	23
4.3	PŘÍPRAVA POUŽITÝCH ROZTOKŮ	23
4.4	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ	24
4.5	POUŽITÝ SOFTWARE	24
4.6	METODY	25
4.6.1	Postup digesce proteinů	25
4.6.2	Příprava a přečištění vzorku pro MS analýzu	25
4.6.3	Postup měření koncentrace peptidů metodou BCA	26
4.6.4	Metoda hmotnostní spektrometrie	26
5	VÝSLEDKY	29
5.1	Měření koncentrace peptidů v roztoku digestu BSA a následná MS analýza	29
5.2	Optimalizace hmotnostního spektrometru TripleTof	31
5.3	Optimalizace přečištění roztoku peptidů	33
5.3.1	Zvýšení množství vrstev C18 membrány v systému STAGE tips	33

5.3.2	Zvýšení množství štěpeného proteinu na 200 µg.....	35
5.3.3	Rozdělení digesce na polovinu	36
5.3.4	Přečištění roztoku peptidů použitím SEP-PAK CARTRIDGE	39
5.4	Použití nové chromatografické kolony Kinetex.....	43
5.5	Cílená MS analýza.....	44
5.6	Cílená MS analýza vybraných peptidů v roztocích o různých koncentracích.....	46
6	DISKUSE	50
7	ZÁVĚR.....	53
8	LITERATURA	54

Seznam symbolů a zkratk

AA	Acetic acid, kyselina octová
ABC	Ammonium hydrogen carbonate, hydrogenuhličitan amonný
ACN	Acetonitril
BCA	Bicinchoninic acid assay; metoda stanovení koncentrace proteinů za použití kyseliny bicinchoninové
BSA	Bovine serin albumin; hovězí sérový albumin
CE	Collision energy, kolizní energie
DBP	Vitamin D-binding protein, protein vázající vitamin D
DDA	Data dependent acquisition
DIA	Data-independent acquisition
DTT	Dithiotreitol
ESI	Electrospray ionization; ionizace elektrosprejem
ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrometry, elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie
FA	Formic acid, kyselina mravenčí
FGF23	Fibroblast growth factor 23; fibroblastový růstový faktor 23
GC-MS	Gas chromatography mass spectrometry, plynová chromatografie spojená s hmotnostní analýzou
HPLC	High-performance liquid chromatography; vysoce účinná kapalinová Chromatografie
HPLC/ESI-MS	Vysoce účinná kapalinová chromatografie ve spojení s elektrosprejovou ionizační hmotnostní spektrometrií
IAA	Jodacetamid
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
mikro-LC	Microflow liquid chromatography, mikroprůtoková kapalinová chromatografie
MRM	Multiple reaction monitoring; sledování vícenásobné reakce
MS	Mass spectrometry; hmotnostní spektrometr
m/z	Mass-to-charge ratio; poměr hmotnosti k náboji
nano-LC	Nanoflow liquid chromatography, nanoprůtoková kapalinová chromatografie
PRM	Parallel reaction monitoring, monitorování paralelních reakcí
PTH	Parathormon
QQQ	Trojité kvadrupóly
Q-TOF	Quadrupol-time of flight, kvadrupól spojený s analyzátozem doby letu
RP-LC	Reverse-phase liquid chromatography, Kapalinová chromatografie na reverzní fázi
SRM	Selected reaction monitoring; monitorování vybraných reakcí
STAGE	Stop and go extraction
TFA	Trifluoroacetic acid; kyselina trifluoroctová
TIO	Tumorem indukovaná osteomalcie
TOF	Time of flight; analyzátozem doby letu
UHPLC	Ultra-High-Performance Liquid Chromatography, ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie
VDR	Vitamin D receptor

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: HPLC chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla (pumpa), dávkovacího zařízení (dávkovač), separační kolony s termostatem, detektoru a zobrazovacího zařízení - počítače (analýza dat).....	4
Obrázek č. 2: A: Schéma recipročního čerpadla s pístem, který se pohybuje se ve směru šipek. B: Recipročně zapojené písty poháněné jedním motorem s převodovkou.....	6
Obrázek č. 3: Schéma šesticestného dávkovacího ventilu	7
Obrázek č. 4: Schéma stacionárních fází C18 (A), C8 (B) a C4 (C) používaných v RP-LC.....	8
Obrázek č. 5: Vznik nabitých kapek na konci kapiláry a jejich postupné zmenšování vlivem odpařováním rozpouštědla. Nakonec dojde k explozi a uvolnění iontů (převedení do plynné fáze)	11
Obrázek č. 6: Hmotnostní analyzátor doby letu ve spojení s ionizátorem MALDI (MALDI-TOF MS).....	12
Obrázek č. 7: Ion (M^+) putuje ve směru Z ze zdroje přes uspořádání 4 kovových tyčí. Protilehlé tyče střídají kladný a záporný náboj, což vede k oscilaci M^+ v rovině X-Y. Ion tak dosáhne detektoru	13
Obrázek č. 8: Schéma hmotnostního analyzátoru typu iontové pasti.	14
Obrázek č. 9: Schéma analyzátoru typu Orbitrap	14
Obrázek č. 10: Schéma měření SRM.	16
Obrázek č. 11: Schéma měření PRM.	17
Obrázek č. 12: Schéma rozdělení jednotlivých zástupců FGF rodiny do podrodin.....	18
Obrázek č. 13: Schématická struktura FGF23..	19
Obrázek č. 14: Kalibrační křivka s rovnicí pro výpočet koncentrací peptidů vzorku 1 a 2.	29
Obrázek č. 15: Spektrum peptidů vzorku, který obsahoval 6 μg peptidů proteinu BSA štěpeným směsí enzymů trypsin-lys-C. Zpracováno v programu Skyline.	30
Obrázek č. 16: Klesající intenzita peptidu YLYEIAR s klesajícím množstvím peptidů ve vzorku.	31
Obrázek č. 17: Spektrum peptidů vzorku digestu BSA z testu č. 8. Zpracováno v programu Skyline.....	33
Obrázek č. 18: Kalibrační křivka pro výpočet koncentrací vzorků peptidů získaných z 100 μg BSA proteinů přečištěných přes 3, 6, 9, 12 a 15 vrstev membrány C18.....	34
Obrázek č. 19: Kalibrační křivka pro výpočet koncentrací vzorků peptidů získaných z 200 μg BSA proteinů přečištěných přes 3, 6, 9, 12 a 15 vrstev membrány C18.....	36

Obrázek č. 20: Kalibrační křivka pro výpočet koncentrací vzorků peptidů získaných z 200 µg BSA proteinů přečištěných přes 6, 9 a 12 vrstev membrány C18.....	37
Obrázek č. 21: Záznam vzrůstající koncentrace získané v jednotlivých optimalizačních krocích přečišťování roztoku peptidů.....	38
Obrázek č. 22: Kalibrační křivka pro výpočet koncentrací vzorků peptidů získaných z 200 µg BSA proteinů přečištěných přes kolonu SEP-PAK. Vyšší koncentrace vyřazeny z důvodu saturace.	39
Obrázek č. 23: Intenzita peptidu LVNELTEFAK při analýze 5 odlišných množství vzorku. 5 µgA značí vzorek č. 1. Ostatní hodnoty se týkají vzorku č. 2.....	41
Obrázek č. 24: Retenční čas a intenzita peptidu LVNELTEFAK při analýze 5 µg vzorku č. 1. Zpracováno v programu Skyline.	41
Obrázek č. 25: Intenzita peptidu LGEYGFQNALIVR při analýze 5 odlišných množství vzorku. 5 µgA značí vzorek č. 1. Ostatní hodnoty se týkají vzorku č. 2.....	42
Obrázek č. 26: Intenzita peptidu AEFVEVTK při analýze 5 odlišných množství vzorku. 5 µgA značí vzorek č. 1. Ostatní hodnoty se týkají vzorku č. 2.	42
Obrázek č. 27: Intenzita peptidu DLGEEHFK při analýze 5 odlišných množství vzorku. 5 µgA značí vzorek č. 1. Ostatní hodnoty se týkají vzorku č. 2.	43
Obrázek č. 28: Intenzity peptidů LVNELTEFAK, LGEYGFQNALIVR, AEFVEVTK a DLGEEHFK při nástřiku 5 µg vzorku, průtoku 30 µl/ min ⁻¹ při použití nové kolony Kinetex.	44
Obrázek č. 29: Intenzita vybraných peptidů ve 3 různých nastaveních kolizní energie	46
Obrázek č. 30: Kalibrační křivka pro výpočet koncentrací vzorku peptidů získaných z 200 µg BSA proteinů přečištěných přes kolonu SEP-PAK.....	47
Obrázek č. 31: Intenzita vybraných peptidů v 5 různých koncentracích od 0,01 µg/µl po 1 µg/µl	48
Obrázek č. 32: Porovnání retenčních časů peptidů v jednotlivých měření. Odlišné barvy zastupují jednotlivé peptidy.....	49

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Gradient mobilní fáze v průběhu analýz	27
Tabulka č. 2: Nastavení parametrů pro cílené měření vybraných peptidů.....	28
Tabulka č. 3: Absorbance a koncentrace vzorku 1 a 2. Blank = rozpouštěcí pufr (blank 1% ACN s 0,05% TFA ve vodě). Odlehlá hodnota je zvýrazněná červeně.	29
Tabulka č. 4: Optimalizace jednotlivých parametrů hmotnostního spektrometru TripleTof s výslednou intenzitou a retenčním časem peptidu DLGEEHFK. Nejúčinnější nastavení je zvýrazněno tučně.	32
Tabulka č. 5: Gradient mobilní fáze v průběhu optimalizace v testu č. 6.....	32
Tabulka č. 6: Upravená množství chemikálií a doba centrifugace jednotlivých kroků protokolu č. 2.....	34
Tabulka č. 7: Absorbance a koncentrace peptidů vzorků ze 100 µg proteinu BSA přečištěných přes 3, 6, 9, 12 a 15 vrstev membrány C18.	35
Tabulka č. 8: Absorbance a koncentrace peptidů dvou sad vzorků z 200 µg proteinu BSA přečištěných přes 3, 6, 9, 12 a 15 vrstev membrány C18.....	36
Tabulka č. 9: Absorbance a koncentrace vzorků peptidů, u kterých nedošlo k rozdělení na poloviny. Digest 200 µg BSA proteinu přečištěný přes 6, 9 a 12 vrstev membrány C18.	37
Tabulka č. 10: Absorbance a koncentrace peptidů v rozpůlených vzorcích digestu 200 µg BSA proteinu přečištěných přes 6, 9 a 12 vrstev membrány C18.....	38
Tabulka č. 11: Absorbance a koncentrace vzorků peptidů získaných z 200 µg BSA proteinů přečištěných přes kolonu SEP-PAK.....	40
Tabulka č. 12: Vybrané peptidy a jejich intenzita pro cílené měření.....	44
Tabulka č. 13: Průtok a gradient mobilní fáze zvolený pro cílenou analýzu	45
Tabulka č. 14: Absorbance a koncentrace vzorků peptidů získaných z 200 µg BSA proteinů přečištěných přes kolonu SEP-PAK.....	47

1 ÚVOD

Proteomika se zabývá systematickým studiem proteinů v biologických vzorcích s cílem pochopení jejich struktury, funkce a vzájemných interakcí. V současném proteomickém výzkumu představuje zvyšování citlivosti analytických metod klíčový krok k objevování nových znalostí a diagnostických markerů. V proteomických analýzách se stále více využívá hmotnostní spektrometrie, která vybrané proteiny analyzuje na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji.

V této bakalářské práci se zaměřím na problematiku zvyšování citlivosti v cílených proteomických analýzách s využitím hmotnostní spektrometrie. Tato práce vychází z předchozího výzkumu provedeného Mgr. Klárou Brožovou, která vyvinula postup zpracování vzorku a nastavení parametrů přístroje pro cílenou analýzu. Nicméně svoji práci nedokončila kvůli tehdy probíhající pandemii Covid 19/SARS-CoV-2. Navazuji na její předchozí práci a snažím se optimalizovat metody a postupy s cílem dosáhnout efektivnější detekce. V průběhu práce budou zkoumány různé techniky, které mohou přispět k zvyšování citlivosti cílených proteomických analýz. Zaměřím se na vylepšení předzpracování vzorků s cílem vyšší výtěžnosti zkoumaných analytů, dále se také zaměřím na vylepšení separace a nakonec také vyzkouším různá nastavení vstupních parametrů pro zajištění co nejvyšší citlivosti detekce.

Cílem této práce je vyvinout cílenou metodu pro citlivou analýzu diagnosticky významného proteinu - Fibroblastového růstového faktoru 23, který se řadí mezi významné onkoproteiny. Veškeré optimalizace budou prováděny na komerčně dostupném hovězím sérovém albuminu.

2 CÍLE PRÁCE

Zvýšení citlivosti metody cílené proteomické analýzy, kterou vyvinula Mgr. Klára Brožová.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

V teoretické části mé bakalářské práce se budu věnovat tématu chromatografické separace a její detekci pomocí hmotnostní spektrometrie. Dále také uvedu problematiku týkající se Fibroblastového růstového faktoru 23.

3.1 CHROMATOGRAFIE

Roku 1906 Michail Semenovič Cvět, ruský botanik, vynalezl chromatografii (Abraham, 2004). Ta, ačkoliv byla až do roku 1941 zcela zapomenuta, patří dodnes mezi velice rozšířené separační metody. Chromatografické metody jsou založeny na rozdělení látek mezi dvě fáze – mobilní a stacionární. Záleží na interakci mezi vzorkem a oběma fázemi. Složky se pohybují rychleji nebo pomaleji v mobilní fázi okolo fáze stacionární (Czaplicki, 2013). Vzorek je nanesen na pevnou či kapalnou stacionární fázi a mobilní fáze ho unáší. Jednotlivé složky vzorku jsou pak rozděleny vytvořením vazby na stacionární fázi. Některé složky jsou, díky odlišným vlastnostem, zadržovány déle a jiné prochází rychle do mobilní fáze. Chromatografické metody můžeme dělit dle několika možných hledisek. Kupříkladu dle skupenství mobilní fáze lze chromatografii dělit na plynovou a kapalinovou (Coskun, 2016). V mé práci se budu věnovat právě kapalinové chromatografii.

3.1.1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Jak jsem již zmínila, při kapalinové chromatografii se mobilní fáze nachází v kapalném skupenství. Naopak stacionární fáze se vždy skládá z pevné fáze nebo pevného nosiče, který na svůj povrch adsorbuje vrstvu kapaliny (Coskun, 2016). Můžeme se setkat s kapalinovou chromatografií, která je prováděna v planárním uspořádání, a také s tzv. kolonovou kapalinovou chromatografií. Na počátku byly ke kapalinové chromatografii používány skleněné kolony o průměru od 10 do 50 mm naplněné částicemi o velikosti několik stovek μm . Mobilní fáze kolonou protékala pouze díky gravitační síle, a separace tak trvala i několik hodin. Později se začaly používat daleko menší kolony, které byly naplněny částicemi o velikosti od 3 do 10 μm , což mělo za následek zvýšení účinnosti. K tomu už ale nestačila pouze gravitační síla, ale mobilní fáze musela být protlačena přes stacionární fázi použitím vysokých tlaků. Tento typ chromatografie se nazývá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Skoog *et al.*, 2021).

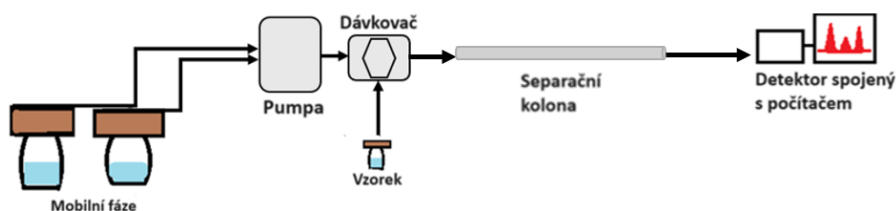
Pro analýzu proteinů se dále využívají kolony s daleko menším průměrem a o to nižší průtokovou rychlostí. Příkladem může být mikroprůtoková a nanoprůtoková kapalinová chromatografie (micro-LC a nano-LC). Výhodou těchto technik je vyšší citlivost za použití

menšího množství vzorku. Užší kolony mohou také pracovat za vyšších tlaků díky efektivnějšímu odvodu tepla. Jako detektor je pro obě metody preferován hmotnostní spektrometr (Shaaban a Górecki, 2015). Průtokové rychlosti se pohybují do 47 $\mu\text{l}/\text{min}$ pro micro- a okolo 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ pro nano-LC. To si také vyžaduje specializovaný HPLC systém. V dnešní době existuje řada zařízení uzpůsobených odlišným objemům systému (Maier-Rosenkranz, 2004; Mandel, 2004).

3.1.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) má dominantní postavení, protože se dnes za použití vysokého tlaku provádí většina chromatografických experimentů (Skoog *et al.*, 2021). V HPLC se používá stacionárních fází s homogenní náplní o malé velikosti částic. Aby kolonou se stacionární fází protékala mobilní fáze dostatečnou rychlostí, aplikuje se zde přetlak desítek MPa (Čáslavský *et al.*, 2022). Vysokou účinnost separace zajišťují malé částice stacionární fáze a vysoký tlak je pouze důsledek této účinnosti.

HPLC chromatograf se obecně skládá ze zásobníku mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony a jejího termostatu. Na konci se nachází detektor, který je připojen k počítači pro konečné vyhodnocení (Nováková *et al.*, 2021). Obecné schéma HPLC chromatografu je znázorněno na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: HPLC chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla (pumpa), dávkovacího zařízení (dávkovač), separační kolony s termostatem, detektoru a zobrazovacího zařízení - počítače (analýza dat).

Velmi důležitým krokem v HPLC je volba složení mobilní fáze. Tím je ovlivněna její polarita. Vztah mezi polaritou mobilní a stacionární fáze a polaritou složek vzorku udává schopnost chromatografie separovat jednotlivé analyty. Podle užití mobilní fáze můžeme eluci rozdělit na izokratickou a gradientovou. Při izokratické eluci je v průběhu separace složení mobilní fáze konstantní. Naopak při gradientové eluci jsou použity dvě mobilní fáze, které jsou v průběhu analýzy míseny dle nastavení (Nováková *et al.*, 2021).

ČERPADLA UŽÍVANÁ V HPLC

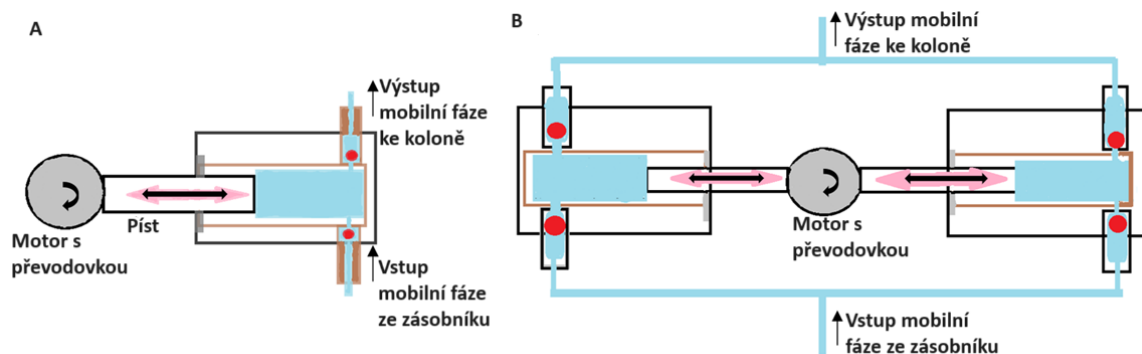
V HPLC se pro přesný a stabilní pohyb mobilní fáze dříve používala pneumatická čerpadla, která pracovala při konstantním tlaku. Dnes se používají vysokotlaká pístová čerpadla, která mají konstantní objemový průtok (Čáslavský *et al.*, 2022).

Prvním typem čerpadla, který se v HPLC používá, je jednopístové reciproční čerpadlo. Zde píst v pracovním válci nasává a vytlačuje mobilní fázi cyklicky. Průtok je regulován pomocí kuličkovitých ventilů. Pokud se kuličky zvedají, tak otevírají vstupní nebo výstupní otvory a umožňují pohyb kapaliny směrem k separaci. Pokud naopak kuličky klesnou, otvory se uzavřou (Nováková *et al.*, 2021).

Největší výhodou je pak možnost změny složení mobilní fáze během analýzy. Naopak nevýhodou je pulzující tok. Tyto pulzy lze odstranit zařazením druhého pracovního válce s pístem pracujícím v opačné periodě než píst první. Jeden píst se pohybuje ve směru nasávání tekutiny a druhý svůj obsah vytlačuje pryč (Opekar *et al.*, 2003).

Druhý píst může být zařazen buď recipročně, nebo sériově. Při recipročním zařazení má každý píst vlastní vstup i výstup mobilní fáze. V okamžiku, kdy jeden píst mobilní fázi nasává, druhý ji vytlačuje na analytickou kolonu.

V sériovém zapojení mají píсты jeden společný vstup i výstup. První píst svůj obsah přečerpává na druhý a z druhého mobilní fáze putuje směrem k analýze. Tímto způsobem se tlak v systému udrží a pulzy jsou eliminovány (Nováková *et al.*, 2021). Porovnání recipročního čerpadla a recipročního zapojení dvou pístů je uvedeno na obrázku č. 2.

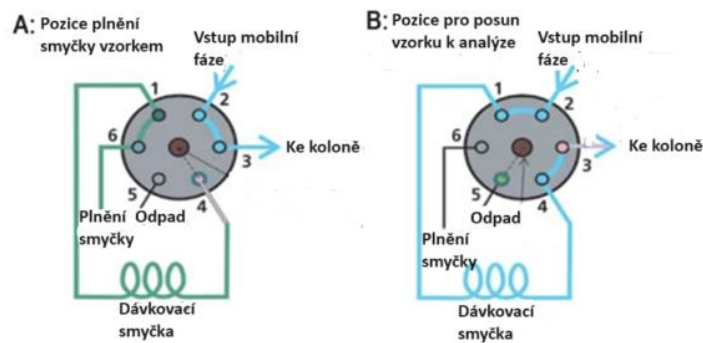


Obrázek č. 2: A: Schéma recipročního čerpadla s pístem, který se pohybuje se ve směru šipek. Píst je poháněn motorkem přes převodovku. Při pohybu pístu vlevo dochází ke vstupu mobilní fáze a pohybem vpravo je mobilní fáze posunuta směrem k analytické koloně. B: Recipročně zapojené písty poháněné jedním motorem s převodovkou. Jedna část se plní a druhá svůj obsah vytlačuje dál do přístroje.

Před čerpadla bývá ještě zařazen vakuový degaser s polopropustnou membránou, který pomocí vakuové pumpičky vytváří v systému vakuum. To zajistí, že se v mobilní fázi nebudou vyskytovat rozpuštěné plyny, které by způsobily zavzdušnění čerpadla. Kdyby se bubliny vzduchu uvolnily do čerpadla, průtok by nebyl bezpulzní. Také by docházelo ke kolísání tlaku v přístroji. Při výsledné analýze by se zavzdušnění systému mohlo projevit sníženou citlivostí detekce, nestabilním signálem detektoru nebo neopakovatelnými retenčními časy složek. (Nováková *et al.*, 2021)

DÁVKOVACÍ ZAŘÍZENÍ

Dávkovací zařízení v HPLC slouží k nanesení kapalného vzorku za atmosférického tlaku do vysokotlakého systému mobilní fáze. Při vstříknutí nesmí dojít k narušení rychlosti průtoku mobilní fáze kolonou (Opekar *et al.*, 2003). Jako dávkovací zařízení se nejčastěji používá šesticestný dvoupolohový ventil s dávkovací smyčkou definovaného objemu (od 1 do 100 μ l) (Nováková *et al.*, 2021). Ventil má tedy šest vstupů, přičemž dva jsou propojeny kanálkem. K dávkování vzorku dochází pootáčením jádra ventilu tak, že v jednom bodě proudí mobilní fáze do kolony a do smyčky proudí vzorek o přesně definovaném objemu. Po pootáčení smyčky o 60 stupňů je obsah dávkovací smyčky proudem mobilní fáze vytlačen do separační kolony (Opekar *et al.*, 2003). Dávkovací smyčka v obou polohách je znázorněna na obrázku č. 3.



Obrázek č. 3: Schéma šesticestného dávkovacího ventilu. Na schématu A dochází k plnění smyčky vzorkem cestou č. 6 a mobilní fáze proudí ke koloně. Pootočením ventilu o 60° se vzorek posouvá směrem k analýze průtokem mobilní fáze smyčkou (B). Převzato a upraveno z (Steiner *et al.*, 2019).

HPLC KOLONY

Kolony jsou většinou ocelové trubice. Existují kolony s širokou škálou velikostí vnitřního průměru a liší se tak i jejich využití.

V micro-LC se používají kolony s vnitřním průměrem 1,0 mm a průtoková rychlost se zde pohybuje okolo 47 $\mu\text{l}/\text{min}$. Nano-LC (tlak do 1500 bar) se používá při ultrasenzitivní analýze. Tato technika využívá kolon s průměrem do 0,1 mm a velmi nízkých průtokových rychlostí okolo 500 nl/min (Shaaban a Górecki, 2015; Stejskal *et al.*, 2021).

U konvenční chromatografie se využívají kolony o vnitřním průměru 2–5 mm a délce 10–300 mm. Materiál, který se nachází na vnitřní straně, musí být dokonale hladký, musí odolat vysokým tlakům a chemickému složení mobilní fáze (Nováková *et al.*, 2021).

V koloně je umístěna stacionární fáze, kterou bývá silikagel různého typu a na něj jsou nejčastěji kovalentně navázány funkční skupiny určující výslednou polaritu stacionární fáze. Velikost částic sorbentu stacionární fáze se dnes pohybuje od 1 do 5 μm , výjimečně se používají sorbenty o průměru 10 μm (Opekar *et al.*, 2003; Nováková *et al.*, 2021).

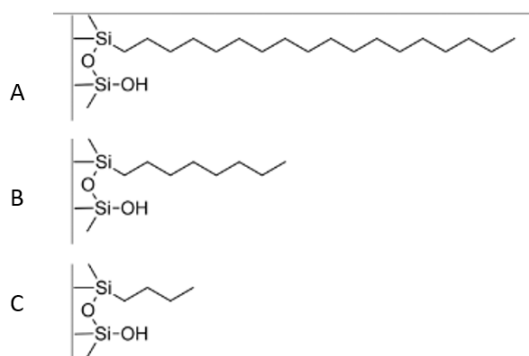
Při separaci dochází vlivem průtoku mobilní fáze kolonou k jejímu zahřívání. Výkyvy teplot se korigují pomocí termostatů (Nováková *et al.*, 2021).

KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE NA REVERZNÍ FÁZI

U reverzní kapalinové chromatografie (*Reverse-phase liquid chromatography*, RP-LC) je stacionární fáze nepolární kvůli uhlovodíkovým řetězcům, které má navázané na svém povrchu.

Vzorek je umístěn v polární mobilní fázi a retence se zvyšuje s polaritou mobilní fáze nebo hydrofobicitou analytů. Nejčastěji se používají kolony s C18 stacionární fází a poté náplně s alkylovým řetězcem C8 nebo C4. Jejich schéma je uvedeno na obrázku č. 4. Čím delší je uhlovodíkový řetězec, tím vyšší je hydrofobnost fáze (Žuvela *et al.*, 2019).

Mobilní fáze, užívané při RP-LC proteinů, jsou vodné roztoky s organickými rozpouštědly (nejčastěji methanol nebo acetonitril). Dále se přidává kyselina (např. mravenčí nebo trifluoroctová) pro pozitivní náboj proteinů a peptidů, a také kvůli eliminaci nežádoucích interakcí se stacionární fází. Eluce je prováděna pomocí snižující se polaroty. Různé poměry vody a organického rozpouštědla vytváří gradient a k eluci jednotlivých složek vzorku pak dochází postupně. (Josic a Kovac, 2010).



Obrázek č. 4: Schéma stacionárních fází C18 (A), C8 (B) a C4 (C) používaných v RP-LC. Převzato a upraveno z (Žuvela *et al.*, 2019).

DETEKTORY

Detektory v HPLC zaznamenávají rozdíly mezi čistou mobilní fází a fází s analytem. Používají se různé koncentrační nebo hmotnostní metody. Nejdůležitější je, aby byla detekční cela přizpůsobena použití v HPLC a nedocházelo v ní k rozmývání zón látek separovaných v koloně. HPLC detektor by měl být především vysoce citlivý, univerzální pro všechny analyty, nedestruktivní a jeho signál by neměl být ovlivnitelný změnami teplot, průtoku nebo složením mobilní fáze (Opekar *et al.*, 2003; Nováková *et al.*, 2021).

Mezi velice oblíbené patří spektrofotometrické detektory, a to zejména ve spojení s detekcí s diodovým polem, které sledují absorbanci separovaných látek při velkém počtu vlnových délek. Dále také existují fluorimetrické, elektrochemické nebo vodivostní detektory. V poslední době však narůstá využití hmotnostní spektrometrie (Čáslavský *et al.*, 2022).

3.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie je účinná instrumentální metoda, která identifikuje, a také kvantifikuje analyty v komplexních směsích. Funguje na principu ionizace a štěpení neutrálních molekul, které jsou následně hodnoceny na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z). Data jsou vyhodnocována pomocí softwaru a analyzované látky jsou rozeznány dle druhu a zastoupení fragmentů (Opekar *et al.*, 2003; Nováková *et al.*, 2021).

KONSTRUKCE MS

Existuje několik rozdílných instrumentací hmotnostních spektrometrů, ale všechny obsahují důležité základní části: zdroj iontů, analyzátor a detektor částic (Friedecký a Lemr, 2012).

Ve zdroji iontů je látka převedena do plynného skupenství a různými způsoby ionizována. Pokud se jedná o látky méně stabilní, může docházet k jejich fragmentaci. Ionizace je základ úspěšného experimentu.

Ionizované fragmenty dále interagují s elektrickým polem a dojde k jejich urychlení (získaná rychlost je závislá na jejich hmotnosti – čím větší hmotnost, tím nižší rychlost). V analyzátoru poté dochází vlivem elektrického nebo magnetického pole k filtraci iontů se stejným poměrem hmotnosti ku náboji (m/z).

Detektor nakonec zaznamenává dopadající ionty a vytváří elektrický signál. Detektorem prochází elektrický proud a při dopadu vybraného iontu tento elektrický proud vzroste vlivem elektronásobiče. Na hmotnostním spektru se to projeví tzv. píkem, který je tím vyšší, čím více iontů dopadne na detektor (Opekar *et al.*, 2003).

Ve všech částech hmotnostního spektrometru je vysoké vakuum (do 10^{-4} Pa), aby nedocházelo k vzájemným reakcím ionizovaných fragmentů nebo k reakcím fragmentů s molekulami vzduchu. To by vedlo ke ztrátám energie a rozptylu částic (Friedecký a Lemr, 2012; Čáslavský *et al.*, 2022).

3.2.1 IONIZACE

Prvním krokem v hmotnostním spektrometru je ionizace analyzované látky. Tím dochází ke vzniku molekulového iontu. Existuje mnoho způsobů ionizace. Dělíme je na techniky tvrdé a měkké. Tvrdé techniky aplikují velké množství energie a jejich působením se často molekulové ionty rozpadají na nabitě fragmenty a neutrální radikály (Čáslavský *et al.*, 2022). Řadí se sem například elektronová ionizace, která se používá ve spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). V tomto spojení se také využívá

chemická ionizace, kde dochází k ionizaci analytu přes reakční plyn. Měkké ionizační techniky naopak minimalizují fragmentaci. Patří mezi ně například ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace za pomoci matrice (MALDI) (Friedecký a Lemr, 2012). Tyto dvě metody se zároveň nejčastěji užívají k ionizaci proteinů (Aebersold a Mann, 2003).

MALDI se užívá k ionizaci jednodušších směsí peptidů. Analyt je z krystalického vzorku sublimován a následně ionizován pomocí laserových pulzů. ESI ionizuje analyty z roztoku komplexních vzorků, a proto se často používá ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-MS). (Aebersold a Mann, 2003).

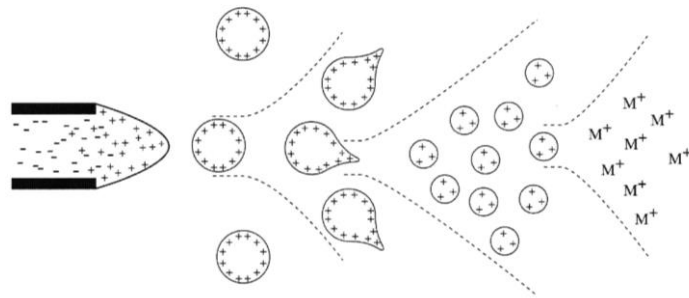
ELEKTROSPREJ

Elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie (ESI-MS) je velice spolehlivá technika. ESI se dnes využívá nejen k analýze proteinů a dalších biopolymerů, ale také k analýze malých polárních látek. Ve spojení s vysoce výkonným kapalinovým chromatografem (HPLC/ESI-MS) se stala velmi výkonnou technikou, která je schopna analyzovat i složité biologické vzorky a produkovat několikanásobné ionty (Ho *et al.*, 2003; Hoffmann a Stroobant, 2007).

ESI převádí vzorek před analýzou z roztoku do plynného skupenství, aniž by docházelo k jeho degradaci (Fenn *et al.*, 1989).

Funguje na tom principu, že je na vzorek v tenké kapiláře aplikováno elektrické pole za atmosférického tlaku (Hoffmann a Stroobant, 2007). To zajistí, že se vzorek akumuluje na jejím konci (Fenn *et al.*, 1989). Nejprve je aplikováno počáteční napětí (stejně jako povrchové napětí tekutiny), které se postupně zvyšuje. To vyvolá vznik kapky a akumulaci náboje na jejím povrchu. Nakonec je tlak na konci kapky v důsledku odpuzování souhlasných nábojů, vyšší, než povrchové napětí a dojde k jejímu rozbití na malé nabitě kapičky (Hoffmann a Stroobant, 2007). Opakováním tohoto kroku dojde k převedení vzorku do plynné fáze a k uvolnění iontů. (viz obrázek č. 5).

Do systému se také zavádí inertní plyn (např. dusík), který se zahřívá a urychluje průtok vzorku a odpařování rozpouštědla. Emitované ionty jsou následně urychleně směřovány do hmotnostního analyzátoru pro následnou analýzu (Ho *et al.*, 2003).



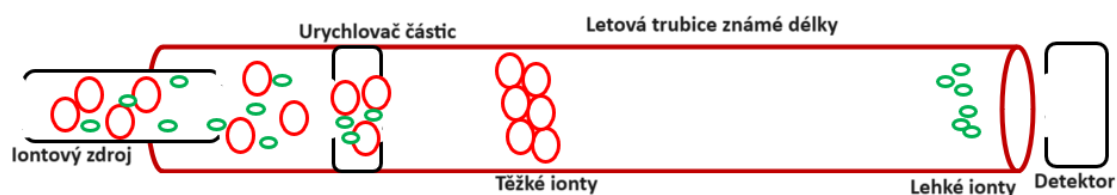
Obrázek č. 5: Vznik nabitých kapek na konci kapiláry a jejich postupné zmenšování vlivem odpařování rozpouštědla. Nakonec dojde k explozi a uvolnění iontů (převedení do plynné fáze). Převzato z (Ho *et al.*, 2003).

3.2.2 ANALÝZA

Hmotnostní analyzátory využívají magnetické či elektrické pole k separaci iontů dle jejich poměru m/z . Pole mohou být kombinována. Bylo vyvinuto několik typů hmotnostních analyzátorů, které separují ionty na základě různých principů (Hoffmann a Stroobant, 2007). Analyzátory mohou být v systému samostatně nebo kombinovaně. V tom případě bývají spojovány výhody všech propojených analyzátorů. Všechny mají společné důležité parametry jako je citlivost, rozlišení nebo preciznost (Aebersold a Mann, 2003).

HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTOR DOBY LETU

Analyzátor doby letu (Time of flight, TOF) využívá velmi jednoduchého způsobu, jak od sebe oddělit jednotlivé ionty s různými poměry m/z . Ionty jsou na počátku letové trubice o známé délce urychleny elektrickým polem. Všechny ionty mají tedy stejnou kinetickou energii a liší se svojí hmotností. Ionty poté vstoupí do letové trubice, ve které již elektrické pole nepůsobí, a dojde k jejich rozdělení dle rychlosti, kterou trubicí proletí (Hoffmann a Stroobant, 2007). Lehčí ionty dorazí na detektor rychleji než těžší ionty (viz obrázek č. 6). Po nárazu na detektor vyvolají odezvu a z času, po jakou dobu daný iont letěl trubicí, je odvozen retenční čas (Volný, 2020).

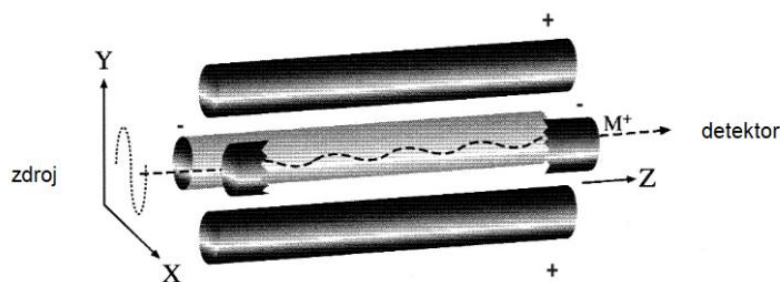


Obrázek č. 6: Hmotnostní analyzátor doby letu ve spojení s ionizátorem MALDI (MALDI-TOF MS). Ionty jsou urychleny elektrickým polem a po vstupu do letové trubice jsou rozděleny podle jejich hmotnosti. Nejlehčí ionty putují nejrychleji k detektoru a nejtěžší ionty nejpomaleji. V trubici již nepůsobí elektrické pole.

KVADRUPÓLOVÝ ANALYZÁTOR

Za vývojem kvadrupólového analyzátoru stojí držitel Nobelovy ceny za fyziku Wolfgang Paul (Paul, 1990). V analyzátoru dochází k separaci iontů na základě stability trajektorie jejich pohybu. Analyzátor se skládá ze 4 rovnoběžných kovových tyčí, které jsou od sebe ve stejné vzdálenosti a jsou dokonale paralelní. Na dvojici úhlopříčně protilehlých tyčí působí střídavé napětí stejné velikosti a na druhou dvojici působí napětí stejné velikosti, ale opačného pólu. Ion, který vstoupí do prostoru mezi tyčemi, letí opačně dle svého náboje buď směrem ke kladně, nebo záporně nabitým tyčím. Protilehlé tyče pravidelně střídají kladný a záporný náboj. To má za následek pohyb iontů ve směru Z a jejich oscilaci ve směru X a Y (dle obrázku č. 7) (Ho *et al.*, 2003; Hoffmann a Stroobant, 2007).

Pohyb iontů kvadrupólem je řízen jejich poměrem m/z . Nastavením napětí, které propojuje tyče kvadrupólu, pak můžeme řídit, které ionty (s jakým poměrem m/z) projdou k detektoru. Amplituda kmitání ostatních iontů bude nestabilní. Srazí se s tyčemi a nedosáhnou tak detekce (Ho *et al.*, 2003).



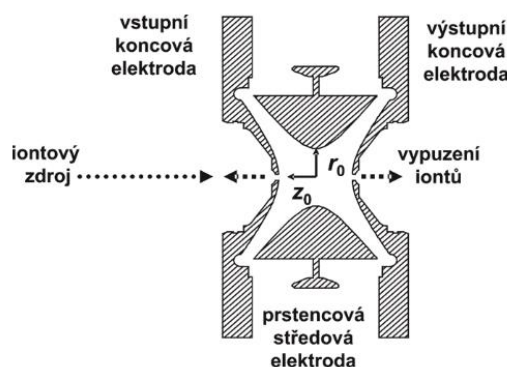
Obrázek č. 7: Ion (M^+) putuje ve směru Z ze zdroje přes uspořádání 4 kovových tyčí. Protilehlé tyče střídají kladný a záporný náboj, což vede k oscilaci M^+ v rovině X-Y. Ion tak dosáhne detektoru. Převzato a upraveno z (Ho et al., 2003).

Kvadrupólový analyzátor lze kombinovat a lze vytvářet tzv. tandemové hmotnostní analyzátoři. Kvadrupól se vyskytuje například v trojitém kvadrupólu (QQQ) nebo v kombinaci s analyzátořem doby letu (Q-TOF). V prvním analyzátoři nejprve dochází k izolaci analyzovaného iontu, který se dále fragmentuje a v posledním analyzátoři je vyhodnocen. Cílem hybridního nástroje je spojit silné stránky jednotlivých analyzátořů a zároveň eliminovat jejich slabiny (Hoffmann a Stroobant, 2007).

IONTOVÁ PAST

Iontová past je stejně jako kvadrupól velmi rozšířený analyzátor. Podobně jako kvadrupól využívá oscilující elektrické pole k rozdělení jednotlivých iontů. Jedná se vlastně o trojrozměrný kvadrupól (Havlíček a Tureček, 2020). Skládá se z prstencové elektrody, která je umístěna uprostřed, a ze vstupní a výstupní koncové elektrody na okrajích (Paul, 1990) (viz obrázek č. 8). V dutině, kterou tyto tři hyperbolické elektrody vytvoří, jsou za přítomnosti helia ionty zachycovány (Ho et al., 2003; Havlíček a Tureček, 2020).

Ionty vstupují ze zdroje otvorem vstupní koncové elektrody. Na prstencovou elektrodu je vloženo napětí. Napětí se postupně zvyšuje a tím se zvyšuje také náboj na jednotlivých iontech. Ionty poté postupně přesáhnou tzv. body vypuzení a jsou z pasti vypuzeny koncovými elektrodami. K detekci se nakonec dostane necelá čtvrtina analyzovaných iontů z pasti, protože ionty jsou vypuzovány oběma velmi malými otvory na obou koncových elektrodách a pouze jeden konec vede k detektoru (Havlíček a Tureček, 2020).

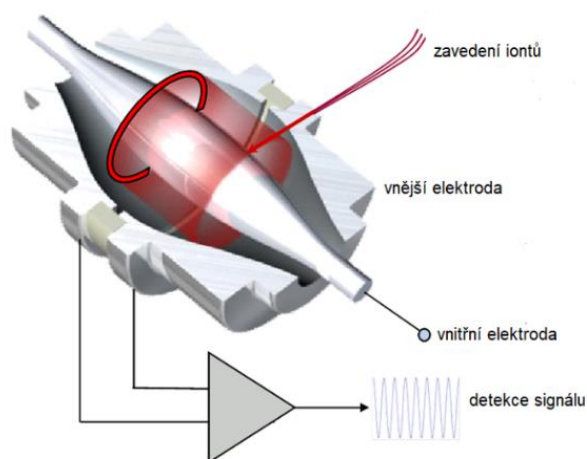


Obrázek č. 8: Schéma hmotnostního analyzátoru typu iontové pasti. Veličiny r_0 , z_0 popisují rozměry iontové pasti. Převzato z (Havlíček a Tureček, 2020).

HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTOR TYPU ORBITRAP

Analyzátorů typu orbitrap se skládají ze tří elektrod. Centrální elektroda je ve tvaru vřetene a dvě vnější elektrody mají tvar kalichu. Vnější elektrody jsou otočeny směrem k sobě a jsou izolovány úzkou mezerou (viz obrázek č. 9).

Mezi vnější a centrální elektrody je přiváděno napětí a vzniká tak lineární elektrické pole. Ionty jsou silně přitahovány k centrální elektrodě působením radiální složky elektrického pole (Zubarev a Makarov, 2013).



Obrázek č. 9: Schéma analyzátoru typu Orbitrap. Ionty vstupují otvorem ve vnější elektrodě a zůstávají uvnitř rotující okolo centrální elektrody. Dochází k detekci frekvence jejich oscilace. Převzato a upraveno z (Zubarev a Makarov, 2013).

Skrz otvor ve vnější elektrodě jsou mezi vnitřní a vnější elektrody vstříkovány ionty. Pokud jsou parametry nastaveny správně, dojde k zachycení iontů ve spirálovité „pasti“ okolo centrální elektrody. Ionty jsou tlačeny do nejšířší části pasti vlivem kuželovitého tvaru vnějších

elektrod (Zubarev a Makarov, 2013). Ionty oscilují podél osy z a rotují okolo centrální elektrody. Poměr hmotnosti a náboje je přímo úměrný frekvenci jejich oscilace (Hu *et al.*, 2005).

Vnější elektrody přijímají a detegují oscilace iontů. Elektrody zachytí časový signál, který je pomocí Fourierově transformaci převeden na frekvenční signál. Výstupem je tedy spektrum s různými frekvenčními píky, které odpovídají jednotlivým hmotnostem iontů (Zubarev a Makarov, 2013).

3.3 VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V PROTEOMICE

Proteomika je disciplína spojována s komplexní analýzou velkého množství proteinů přítomných ve vzorku. Tento soubor se obecně nazývá proteom. Proteiny proteomu jsou vzájemně funkčně propojeny (Aebersold a Mann, 2016). Proteomika studuje nejen proteiny jako takové, ale také změny v jejich expresi vlivem biologických poruch (Anderson a Anderson, 1998). Mezi tyto poruchy patří různá onemocnění, a tak lze podrobné studium proteinů využít například v diagnostice. Proteiny zde fungují jako biomarkery, které mohou onemocnění předpovídat a prokazovat pozitivní nebo negativní reakci pacientů na léčbu (Macklin *et al.*, 2020). Proteomické přístupy lze rozdělit na necílené a cílené (Sobsey *et al.*, 2020).

3.3.1 NECÍLENÁ PROTEOMIKA

Necílená proteomika zkoumá veškeré složky proteomu. Cílem je identifikace a kvantifikace co největšího počtu proteinů (Sobsey *et al.*, 2020). Pro tuto analýzu jsou zejména využívány dvě metody – *data dependent acquisition* (DDA) a *data-independent acquisition* (DIA). DDA nejprve vyhledá nejintenzivnější prekurzorové ionty a ty jsou poté fragmentovány. U DIA není fragmentace závislá na intenzitě a to vede k lepšímu pokrytí proteomu (Mendes a Dittmar, 2022).

3.3.2 CÍLENÁ PROTEOMIKA

Cílená proteomika je navržena pro identifikaci a kvantifikaci specifických peptidů, které se nacházejí v proteinovém vzorku. Tyto sady peptidů detekuje velmi citlivě, reprodukovatelně a přesně (Mendes a Dittmar, 2022). Pro tuto funkci musí být spektrometr správně naprogramován vložení potřebných údajů pro detekci. V cílené proteomice je užíváno velké množství metod, které si vyžadují kombinace různých typů analyzátorů. Kombinují se kvadrupóly, orbitrapy i hmotnostní analyzátory doby letu. (Borràs a Sabidó, 2017). V cílené proteomice jsou prováděny dvě hlavní metody: monitorování vybraných reakcí

(*Selected reaction monitoring*, SRM) a monitorování paralelních reakcí (*Parallel reaction monitoring*, PRM) (Mendes a Dittmar, 2022).

MONITOROVÁNÍ VYBRANÝCH REAKCÍ

Metoda SRM se zaměřuje na jeden vybraný soubor peptidů. Provádí se v trojitém kvadrupólu (QQQ). V prvním kvadrupólu (Q1) je nejprve vybrán prekurzorový iont požadovaného peptidu. Toho se docílí nastavením velmi úzkého izolačního okna. V druhém kvadrupólu (Q2) dochází k jeho fragmentaci. Ve třetím (Q3) je monitorován jeden z fragmentů tohoto peptidu. Jde o dvojitou selekci, kterou nazýváme tranzice (Borràs a Sabidó, 2017).

Dvojice m/z vybraná v Q1 a Q3 musí být jedinečná pro analyzovaný protein. Specifické peptidy pro určitý protein se označují jako proteotypické. Specifická filtrování v Q1 a Q3 zajistí vysokou selektivitu, citlivost a přesnost (Mendes a Dittmar, 2022). Schéma průběhu SRM je vyobrazeno na obrázku č. 10.



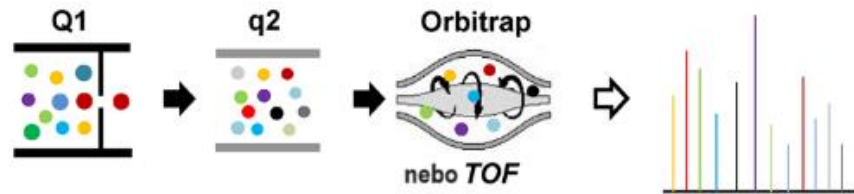
Obrázek č. 10: Schéma měření SRM. Ionizovaný peptid je vybrán v prvním kvadrupólu Q1 a poté dochází k jeho fragmentaci v kolizní cele. Jeden fragmentový iont je vybrán ve třetím kvadrupólu a poté je detekován na hmotnostním detektoru. Na obrázku je znázorněn výběr dvou fragmentů z jednoho prekurzorového iontu. Převzato a upraveno z (Mendes a Dittmar, 2022).

V SRM lze identifikovat i více fragmentů jednoho peptidu. Tím pak získáváme jak kvantitativní informaci, tak můžeme dané peptidy identifikovat. Pokud dochází ke sledování více různých peptidů, metodu můžeme nazvat jako sledování vícenásobných reakcí (MRM, *Multiple reaction monitoring*). Pokud dojde k identifikaci alespoň třech proteotypických peptidů, lze poté kvantifikovat analyzovaný protein (Borràs a Sabidó, 2017).

MONITOROVÁNÍ PARALELNÍCH REAKCÍ

V PRM jsou analyzovány veškeré fragmenty, které vznikají z vybraného prekurzorového iontu paralelně. Toto monitorování probíhá v hmotnostních spektrometrech, které mají kombinace různých hmotnostních analyzátorů. Nejčastěji jsou to kombinace kvadrupól-orbitrap nebo kvadrupól-TOF. První analyzátor izoluje vybraný peptid, který je následně fragmentován v kolizní cele. Fragmentové ionty jsou pak analyzovány v druhém analyzátoru. Cílem PRM je získat píky těch fragmentových iontů, které jsou pro identifikaci

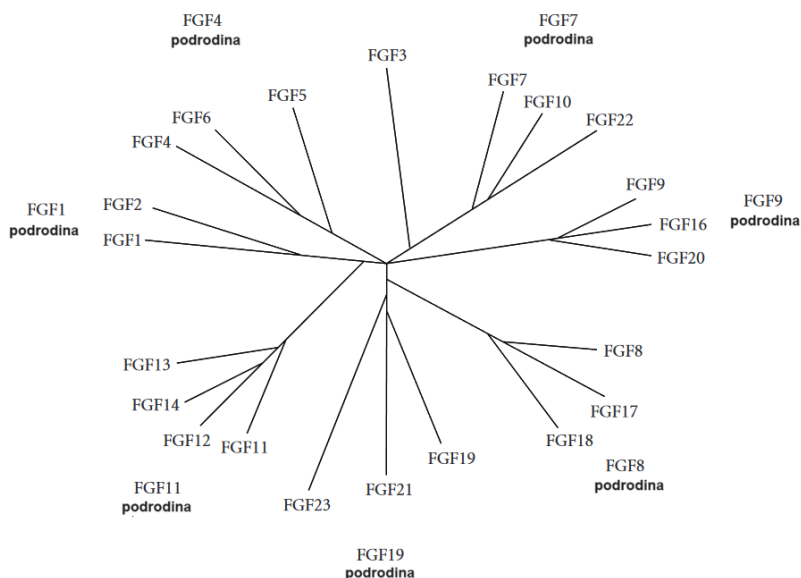
a kvantifikaci peptidu nejvhodnější. To jsou zejména ty fragmenty, které neinterferují a nemají vysoký šum (Borràs a Sabidó, 2017; Mendes a Dittmar, 2022). Schéma průběhu PRM je vyobrazeno na obrázku č. 11.



Obrázek č. 11: Schéma měření PRM. V Q1 vybrán prekurzorový iont a je fragmentován v q2. Následně dochází k proměření veškerých fragmentů ve třetí části hmotnostního spektrometru, což může být orbitrap nebo TOF analyzátor. Na spektru jsou poté znázorněny píky fragmentů prekurzorového iontu. Převzato a upraveno z (Shi et al., 2016).

3.4 GENY FIBROBLASTOVÝCH RŮSTOVÝCH FAKTORŮ

Geny FGF rodiny mají různé funkce – vývojovou, opravnou nebo metabolickou. U člověka je tato rodina tvořena 22 geny od FGF1 až po FGF23 (FGF15 deficientní). Dle fylogenetických analýz je lze dělit do sedmi podrodin (obrázek. Č. 12).



Obrázek č. 12: Schéma rozdělení jednotlivých zástupců FGF rodiny do podrodin. Převzato a upraveno z: (Yun et al. 2010).

Alternativně lze gen FGF dělit dle mechanismu působení do skupin dle (Martin et al. 2012).

Intracelulární skupina: Sem jsou zařazeny podrodiny, které fungují jako signální molekuly nezávisle na FGF receptoru (FGFR).

Kanonická skupina: Produkty této skupiny působí jako extracelulární proteiny, které se vážou na povrchové tyrosinkinázy a aktivují tak povrch buňky. Jako kofaktor zde funguje heparin. Mají lokální signální funkci v parakrinním a endokrinním systému.

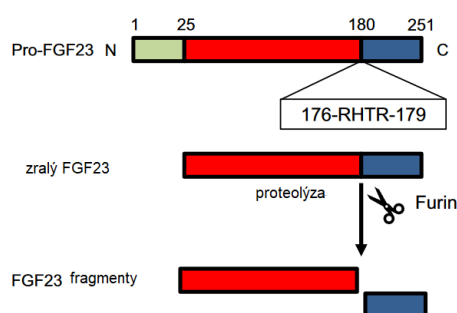
Hormonům podobné FGFgeny (endokrinní skupina): Svou odpověď zprostředkovávají pomocí FGFR, ale působí jako endokrinní faktory. Pro svou vazbu na FGFR nepotřebují heparin, ale alternativní kofaktor.

3.5 FIBROBLASTOVÝ RŮSTOVÝ FAKTOR 23

Gen FGF23 se nachází na 12. chromozomu. Je tvořen 3 exony, které jsou odděleny 2 introny. K jeho přepisu dochází zejména v osteoblastech a osteocytech. V menší míře je exprimován také žaludkem nebo slinnými žlázami. Vzniká tak glykoprotein složený z 251 aminokyselin. Prvních 24 aminokyselin z N-koncové oblasti je odštěpeno jako signální sekvence a poté dojde

k O-glykosylacy proteinu. FGF23 je dále vyloučen do krevního oběhu ve dvou formách: ve formě plné délky (25-FGF23-251) a ve kratší formě (25-FGF23-179). Na druhém konci proteinu se nachází unikátní C-koncová oblast. Pouze plná délka proteinu je aktivní. Kratší forma vzniká proteolytickým štěpením C-koncové oblasti proteinu, v čemž spočívá jeho regulace (Martin *et al.*, 2012) (viz obrázek č. 13).

Na C-koncovou doménu se váže α Klotho kofaktor, který je nutný pro vazbu proteinu na jeho receptor. (Athonvarangkul a Insogna, 2021). V místech, kde se FGF23 uplatňuje, dochází k expresi jeho receptoru a také membránové formy α Klotho.



Obrázek č. 13: Schématická struktura FGF23. Zelenou barvou je označena signální sekvence 24 aminokyselin na N-konci a modrou unikátní C-konec. RHTR je zkratka pro aminokyselinovou sekvenci od aminokyseliny 176 do 179 (arginin-histadin-threonin- arginin). Tato sekvence je štěpena, čímž dojde k deaktivaci proteinu. Převzato a upraveno z: (Athonvarangkul a Insogna, 2021).

Fibroblastový růstový faktor 23 účinkuje primárně v ledvinách, kde má vliv na funkci proximálního tubulu. Ovlivňuje zejména metabolismus vitamínu D skrze kontrolu jeho extracelulární koncentrace, a také skrze koncentrace fosfátů v séru (Prié a Friedlander, 2010).

3.5.1 FUNKCE FGF23

Jak jsem již zmínila, FGF23 je nezbytnou součástí metabolismu vitamínu D. Syntéza tohoto vitamínu začíná v kůži, kde je jeho tvorba stimulovaná působením UV-záření. Poté pokračuje do jater, kde je přeměněn na 25(OH)D a následně je uvolněn do krevního oběhu a po těle cirkuluje ve vazbě s DBP (*vitamin D-binding protein*). Tento meziprodukt je vyloučen buňkami proximálního tubulu a dochází k jeho přeměně hydroxylací na aktivní vitamín D₃ (1,25(OH)₂D₃) (Prié a Friedlander 2010).

Vysoká koncentrace extracelulárního vitamínu D₃ stimuluje produkci FGF23 v kostních buňkách. FGF23 stimuluje expresi 24 a 25-hydroxyláz, které vitamín D₃ inaktivují, a potlačuje

tvorbu 25(OH)D-1 α hydroxylas, které zajišťují přeměnu neaktivního 25(OH)D na aktivní 1,25(OH)₂D₃. Kromě vysokých hladin vitamínu D₃, stimuluje produkci FGF23 také vysoké hladiny extracelulárního fosfátu. To je důvod propojení koncentrace fosfátů s metabolismem vitamínu D (Athonvarangkul a Insogna, 2021).

Fosfát tvoří okolo 1 % tělesné hmoty a 85 % z něj je uloženo v kostech a zubech. Uplatňuje se při vývoji a mineralizaci kostry (Qadeer a Bashir, 2023). Jeho nedostatek i přebytek může mít za následek mnohé zdravotní komplikace. Nedostatek vede k srdečnímu a respiračnímu selhání, poruchám růstu a mineralizaci skeletu. Naopak nadbytek zvyšuje rizika srdeční hypertrofie, vede k onemocněním kostí, kardiovaskulárním onemocněním nebo ektopické kalcifikaci. Dále také zvyšuje rizika infekce a smrti (Simic a Babitt, 2021).

Fosfát vstupuje do tubulárních buněk ledvin za pomoci kotransportérů závislých na aktivitě sodno-draselné pumpy (Martin *et al.*, 2012). FGF23 potlačuje expresi některých z těchto kotransportérů a jako důsledek toho zvýší vylučování fosfátu ledvinami (Shimada *et al.*, 2004). Účinky různých hladin FGF23 byly prokázány *in vivo*. Transgenní myši, které nadměrně exprimují FGF23, měly sníženou reabsorpci fosfátů renálními tubulami. Při nízké koncentraci vitamínu D₃ v séru, myši vykazovaly abnormality na kostře, jako je křivice nebo osteomalcie (Bai *et al.*, 2004). Naopak mutované myši, které neprodukují FGF23, trpěly těžkou hyperfosfatemíí a vykazovaly zvýšenou reabsorpci fosfátu renálním tubulem. Koncentrace vitamínu D₃ v séru byla také zvýšená (Shimada *et al.*, 2004).

3.5.2 FGF23 A JEHO ROLE VE VYBRANÝCH LIDSKÝCH ONEMOCNĚNÍCH

Fibroblastový růstový faktor 23 je nadměrně exprimován v nádorech způsobujících onkogenní osteomalcii. (Jonsson *et al.*, 2003) Tumorem indukovaná osteomalcie (TIO) je onemocnění způsobené hypofosfatemíí. Ta vzniká jako důsledek zvýšených hladin FGF23. Nádory je velmi těžké vyhledat a odstranit, protože jsou velmi malé a nachází se na různých místech po těle. TIO samotná nemá typické příznaky, ale veškeré problémy vychází z vysokých hladin FGF23 (bolest kostí, svalová slabost, atd.) (Brandi *et al.*, 2021).

Dále se zvýšená hladina FGF23 vyskytuje u X-vázané hypofosfatemické křivice. Jedná se o vrozené onemocnění způsobené mutací genu PHEX, který leží na krátkém raménku chromozomu X. Tato mutace způsobuje zvýšenou expresi genu FGF23. To má opět za následek zvýšení ztrát fosfátu v ledvinách a dochází k poškození mineralizace kostí. Křivice se pak projevuje nejčastěji deformací dolních končetin, špatnou mineralizací zubů nebo nízkou

postavou. Onemocnění se nejčastěji projevuje v prvních dvou letech života a jeho vzácnost a variabilita klinického obrazu může vést k pozdnímu rozpoznání diagnózy (Čamborová, 2020).

3.5.3 SYSTÉMOVÁ REGULACE PROTEINU FGF23

Regulace proteinu FGF23 je velmi složitá. Protein je regulován jak systémově, tak lokálně a pomocí intracelulárních mediátorů. Jelikož se jedná o důležitý regulátor metabolismu kosterních minerálů, FGF23 je regulován různými hladinami fosfátu, vápníku, vitamínu D a parathormonu v krevním séru (Simic a Babitt, 2021). Dále mají vliv na produkci například hladiny železa, přítomnost zánětu a další. Vliv všech faktorů je komplexně provázán (Bär *et al.*, 2019). V následujícím textu se věnuji několika systémovým regulátorům.

AKTIVACE POMOCÍ VITAMINU D₃

Vitamin D₃ patří mezi nejdůležitější systémové regulátory produkce FGF23. Vitamin má vliv především na zpětnou absorpci vápníku a fosfátu v gastrointestinálním traktu. Vyšší hladiny vápníku společně s vitamínem působí na příštítná tělíska a potlačují syntézu parathormonu (PTH). Potlačěním syntézy tohoto hormonu dochází ke snížení hladin vápníku v krvi. Druhým důsledkem této inhibice je snížení vylučování fosfátu. Jeho vysoké hladiny pak spustí syntézu FGF23 a ten potlačí Vitamin D₃. Tím se smyčka regulace uzavře. Pokud tedy dojde k navázání Vitaminu D₃ na jeho receptor (VDR) na příštítných tělískách, dojde ke zvýšení hladiny FGF23 (Martin *et al.*, 2012).

Vliv samotného PTH na syntézu FGF23 je nejasný. Existují experimentální studie, které potvrzují, že PTH zvyšuje expresi genu pro FGF23 (Rhee *et al.*, 2011). U jiných prací jsou výsledky opačné a PTH expresi FGF23 snižuje nebo nemá vliv (Samadfam *et al.*, 2009).

VLIV ŽELEZA A DALŠÍCH KOVOVÝCH IONTŮ

Železo je biogenním prvkem, který je součástí nejen hemoglobinu, ale také je důležitým kofaktorem pro funkci enzymů a dalších molekul (Wallace, 2016). Nedostatek železa v organismu ovlivňuje množství FGF23. Má za následek jeho zvýšenou transkripci, ale také jeho štěpení. Nedostatek železa souvisí také s hypoxií, která opět vede ke zvýšení produkce FGF23. Diskutuje se také o vlivu dalších iontů, jako například Mg²⁺, Cd²⁺ nebo Li⁺ (Bär *et al.*, 2019).

ZMĚNY HLADINY FGF23 PŘI ZÁNĚTLIVÝCH REAKCÍCH

Zvýšené hladiny fibroblastového růstového faktoru 23 je spojeny také se zánětlivými reakcemi. Ty se vyskytují zejména při infekcích, autoimunitních onemocněních nebo obezitě

(Simic a Babitt, 2021). Cytokiny jsou signální molekuly, které se podílejí na tvorbě a udržování zánětlivých reakcí v těle. Tyto prozánětlivé molekuly přímo zvyšují exprese genu FGF23. Exprese mRNA a přítomnost aktivního FGF23 je zvýšená. V případě neaktivního FGF23 nedochází k žádným změnám (David *et al.*, 2016).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

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

Proteinové standardy BSA- koncentrace 125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; 250 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; 750 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; 1500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a 2000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Thermo ScientificTM, kat.č. 23208)

Lyofilizovaná směs enzymů Trypsin/Lys-C (Promega, kat.č. V5073)

4.2 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY

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

Bicinchoninic Acid (BCA) Reagens A (Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Pierce BCA detekční reagens (kyselina bicinchoninová), $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$ v 0,1M NaOH), Thermo ScientificTM, kat.č. 23223

BCA Reagens B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v H_2O), Thermo ScientificTM, kat.č. 23224

Dithiothreitol ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SH}$, DTT), Roche, kat.č. 11583786001

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

Jodacetamid ($\text{ICH}_2\text{CONH}_2$, IAA), Sigma-Aldrich, kat.č. I1149

Kyselina mravenčí (HCOOH , FA), LC-MS Grade, Thermo ScientificTM, kat.č. 85178

Kyselina octová (CH_3COOH , AA), Sigma-Aldrich, kat.č. 49199

Kyselina trifluoroctová (CF_3COOH , TFA), Honeywell FlukaTM, kat.č. 14264

Methanol (CH_3OH , MeOH), Sigma-Aldrich, kat.č. 1.06035

Pufr na rozpuštění enzymu – Promega, kat.č. V181A

Voda pro hmotnostní spektrometrii (MS H_2O)

4.3 PŘÍPRAVA POUŽITÝCH ROZTOKŮ

AA roztok (0,1% AA v MS H_2O)

ABC roztok (0,05 mol.l^{-1} ABC v MS H_2O)

ACN s AA roztok (80% ACN s 0,1% AA v MS H_2O)

DTT roztok (0,065 mol.l^{-1} DTT v MS H_2O)

IAA roztok (0,135 mol.l^{-1} IAA v MS H_2O)

Mobilní fáze A (0,1% FA v MS H_2O)

Mobilní fáze B (0,1% FA v ACN)

Rozpouštěcí pufr: ACN s TFA roztok (1% ACN s 0,05% TFA v MS H₂O)

4.4 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ

Analytická váha SBC21 (Scaltec)

Centrifuga – Rotina 420R (Hettich)

Hmotnostní spektrometr - Orbitrap exploris 480 (Thermo Scientific™)

Hmotnostní spektrometr - TripleTOF 5600+ (AB Sciex)

Inkubátor – MS incubator (Major science)

Kapalinový chromatograf - ExionLC (AB Sciex)

Kapalinový chromatograf UltiMate 3000 (Thermo Scientific™)

Spektrofotometr Envision (PerkinElmer)

Termostat - Thermomixer comfort (Eppendorf)

Vakuová odparka – Concentrator 5301 (Eppendorf)

Výrobník MS vody – Milli-Q (Milipore)

4.5 POUŽITÝ SOFTWARE

Skyline software verze 4.1

Thermo Xcalibur verze 4.2.47

4.6 METODY

V praktické části bakalářské práce jsem využila níže zmíněné metody. Protokoly metod jsem podrobně rozepsala, přestože jsem některé části v různých experimentech upravovala (doba centrifugace, množství použitých chemikálií, atd.). Konkrétní úpravy jsem vypsala ve výsledkové části k jednotlivým experimentům.

4.6.1 Postup digesce proteinů

Pro digesci proteinů v roztoku enzymem Trp-LysC je nejdříve potřeba přerušit disulfidické můstky a zbylé thiolové skupiny alkylovat. (Glatter et al. 2012)

K roztoku proteinu ve vodě jsem přidala 99 μl ABC roztoku. K připravené směsi jsem dále přidala 4 μl 65mM DTT pro přerušování disulfidických můstků. Vzorek jsem vložila na 15 min do termostatu při 50°C.

Po inkubaci jsem ke směsi přidala 8,3 μl IAA, aby proběhl proces alkylace. Poté jsem vzorek nechala inkubovat 30 min ve tmě při pokojové teplotě.

Přidala jsem 4,5 μl DTT a následně 100 μl ABC.

Provedla jsem digesci směsí enzymů Trp-Lys (1 μg enzymu na 100 μg proteinu). Takto připravené vzorky jsem nechala inkubovat ve 37 °C přes noc.

4.6.2 Příprava a přečištění vzorku pro MS analýzu

Pro přečištění proteinů se používá C18 membrána STAGE (Stop and go extraction) tips (Rappsilber et al. 2007).

C18 membránu jsem umístila do žluté pipetovací špičky. Udělala jsem otvor do víčka 2ml mikrozkušavky a skrz otvor jsem do mikrozkušavky vložila špičku tak, aby vložená membrána byla uvnitř mikrozkušavky a aby v ní špička držela pevně.

Špičku s C18 membránou jsem aktivovala pomocí 100 μl methanolu a centrifugovala při 3000 g po dobu 3 min. Dále jsem přidala 100 μl 80% ACN a 0,1% AA ve vodě a opět centrifugovala při 3000 g po dobu 3 min. Přidala jsem 100 μl 0,1% AA ve vodě a centrifugovala při 3000 g po dobu 3 min.

Následně jsem na membránu nanasla připravený vzorek a centrifugovala při 3000 g po dobu 3 min. Dále jsem membránu propláchla 100 μl 0,1% AA ve vodě a centrifugovala při 3000 g po dobu 3 min.

Přenesla jsem špičku do nové ependorfky a provedla eluci pomocí 100 μl 80% ACN a 0,1% AA ve vodě, centrifugovala jsem při 3000 g po dobu 3 min

Eluovaný vzorek jsem umístila do vakuové sušičky na 60 min. Nakonec jsem vysušený vzorek rozpustila ve 100 μl 1% ACN s 0,05% TFA ve vodě.

4.6.3 Postup měření koncentrace peptidů metodou BCA

BCA (bicinchoninic acid assay) je kolorimetrická metoda pro měření koncentrace proteinů v roztoku. Využívá barevné změny roztoku vlivem kyseliny bicinchoninové, které jsou úměrné jeho koncentraci. (Smith et al. 1985).

Na mikrotitrační destičku jsem napipetovala vždy v duplikátech pod sebe 25 μl BSA protein standardů v koncentracích 125 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$, 750 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$, 1500 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ a 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$. Jako blank jsem použila 25 μl MS vody.

Dále jsem napipetovala 25 μl vzorku a jako blank použila Rozpouštěcí pufr (25 μl 1% ACN s 0,05% TFA ve vodě).

Připravila jsem si zabarvovací roztok kyseliny bicinchoninové z BCA reagens A a B v poměru 50:1. Do všech jamek, které obsahovaly vzorek, blank nebo BSA standardy jsem napipetovala 200 μl připraveného roztoku. Poté jsem nechala destičku inkubovat při 37 °C po dobu 30 min. Na spektrofotometru jsem změřila absorbanci při vlnové délce $\lambda = 562 \text{ nm}$.

4.6.4 Metoda hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr Orbitrap Exploris

První vzorky jsem změřila na hmotnostním spektrometru Orbitrap Exploris, který je spojen s iontovým zdrojem Proxeon Easy-Spray a s chromatografem Ultimate 3000 RSLC nano. Nanesený vzorek prošel nejdříve přes odsolovací kolonu PepMap 100 (75 μm x 2 cm, 3 μm , 100 Å; Thermo) a dále byl rozdělen na analytické koloně PepMap RSLC (75 μm x 15 cm, 3 μm , 100 Å; Thermo), která je vyhřívána na 35 °C.

Na vymytí vzorku jsem použila dvě mobilní fáze. Jako mobilní fázi A jsem použila 0,1% FA v H₂O a jako mobilní fázi B 0,1% FA v ACN.

Průtok mobilní fáze jsem nastavila na 300 $\text{nl}\cdot\text{min}^{-1}$ a izolační okno na 2 m/z. vzorek byl ionizován nanosprejem (NSI) a nakonec vzorek dorazil na detektor Orbitrap.

Hmotnostní spektrometr TripleTOF:

Hmotnostní spektrometr TripleTOF byl spojen s kapalinovým chromatografem ExionLC od výrobce Sciex. K rozdělení vzorku byla použita UHPLC kolona (Arion Plus C18, 2,2 μm , 50 mm x 2,1 mm, kat. č. ARI-5720-EG21) a poté druhá chromatografická kolona (Kinetex IC column 2,6 μm , 150 mm x 1,0 mm, 100 Å, kat. č. 00F-4496-A0). Chlazení přístroje bylo nastaveno na 8 °C a průtok ve stroji byl 5 $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$. Měřila jsem v hmotnostním rozsahu 100-2000 m/z. Izolační okno bylo 2 m/z. Jako typ detektoru byl použit trojitý kvadrupól ve spojení s analyzátozem doby letu. Jako zdroj iontů byl použit nanosprej. Gradient mobilní fáze (%A a %B) uvádím v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Gradient mobilní fáze v průběhu analýz

Čas analýzy [min]	%A	%B
0	97	3
5	97	3
45	65	35
46	5	95
51	5	95
52	97	3
60	97	3

Některé z popsaných parametrů se mohou lišit u jednotlivých experimentů. Upravené parametry uvádím ve výsledkové části u jednotlivých experimentů.

Data jsem zpracovala v programu XcaliburTM Software a nahrála do programu Skyline.

Cílená analýza:

Z měřených peptidů jsem vybrala pouze ty, které měli vysokou intenzitu a na základě toho jsem upravila izolační okna. Hmotnostní spektrometr tak propustil k analýze jen mnou zvolené ionty, což vedlo ke zvýšení intenzity vybraných peptidů. Sekvence vybraných peptidů a parametry nastavení jsou uvedeny v tabulce č. 2.

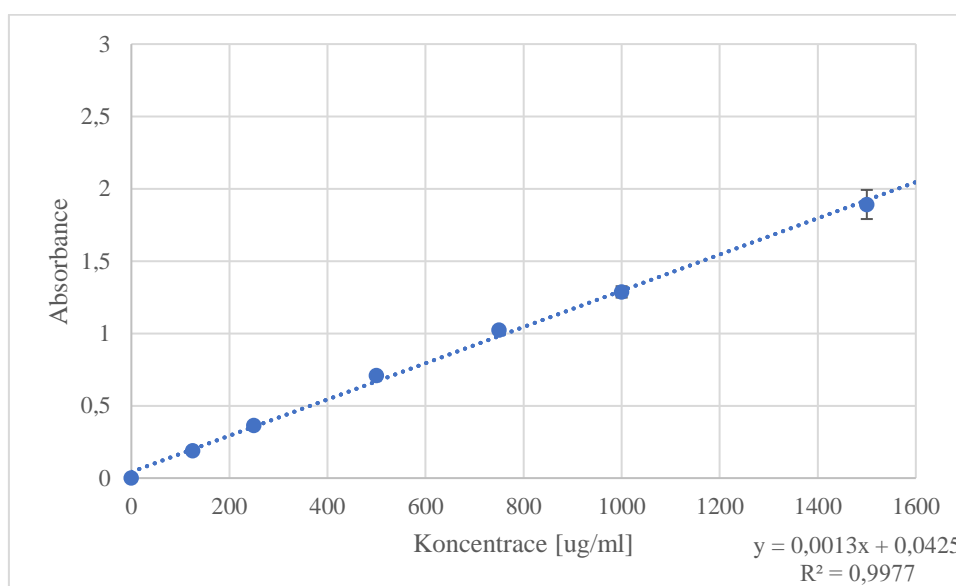
Tabulka č. 2: Nastavení parametrů pro cílené měření vybraných peptidů

Sekvence peptidu	m/z peptidu	Deklastrovací potenciál (DP)	Kolizní energie (CE)	Ion Release Delay (IRD)	Ion Release Width (IRW)
LVNELTEFAK	582,3	80	32,5	67	25
LVNELTEFAK	388,5	80	21,7	67	25
SLHTLFGDELCK	710,4	80	38,8	67	25
SLHTLFGDELCK	473,9	80	25,7	67	25
AEFVEVTK	461,7	80	26,6	67	25
AEFVEVTK	308,2	80	17,8	67	25
YICDNQDTISSK	722,3	80	39,4	67	25
YICDNQDTISSK	481,9	80	26,1	67	25
DAFLGSFLYEYSR	784,4	80	42,4	67	25
DAFLGSFLYEYSR	523,3	80	28,1	67	25
HLVDEPQNLIK	653,4	80	36,0	67	25
HLVDEPQNLIK	435,9	80	23,9	67	25
QNCDQFEK	534,7	80	30,2	67	25
QNCDQFEK	356,8	80	20,1	67	25
LGEYGFQNALIVR	740,4	80	40,3	67	25
LGEYGFQNALIVR	493,9	80	26,7	67	25
MPCTEDYLSLILNR	862,9	80	46,3	67	25
MPCTEDYLSLILNR	575,6	80	30,6	67	25
TVMENFVAFVDK	700,3	80	38,3	67	25
TVMENFVAFVDK	467,2	80	25,4	67	25

5 VÝSLEDKY

5.1 Měření koncentrace peptidů v roztoku digestu BSA a následná MS analýza

Ze zásobního roztoku 2000 µg/ml BSA jsem si připravila 2 vzorky digestu, které jsem následně přečistila, vysušila, rozpustila a změřila koncentraci peptidů metodou BCA. Vytvořila jsem si kalibrační křivku z absorbancí a koncentrací BSA protein standardů (viz obrázek č. 14). Z rovnice kalibrační křivky jsem vypočítala koncentraci těchto zpracovaných vzorků.



Obrázek č. 14: Kalibrační křivka s rovnicí pro výpočet koncentrací peptidů vzorku 1 a 2.

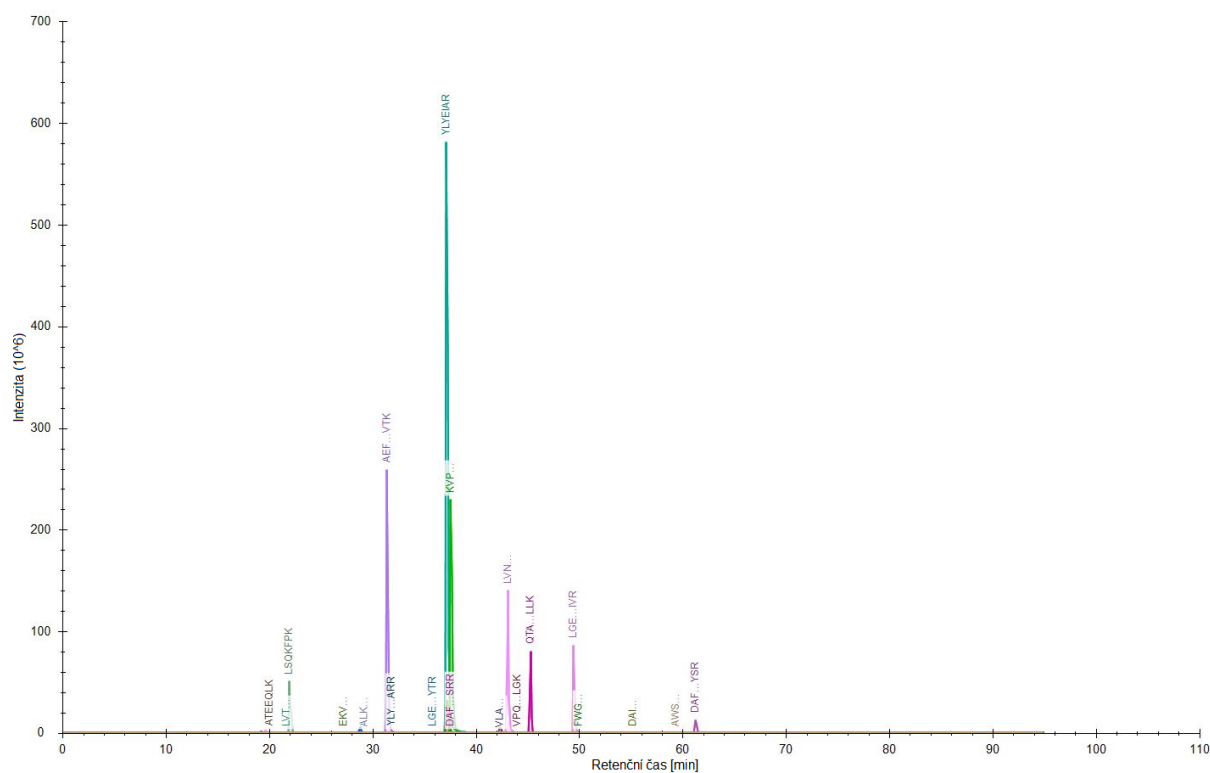
Vypočítané koncentrace v 1 ml a v celém objemu jsem společně s absorbancemi shrnula do tabulky č. 1. Jednu hodnotu absorbance blanku (v tabulce č. 3 znázorněna červeně) jsem vyřadila z důvodu kontaminace.

Tabulka č. 3: Absorbance a koncentrace vzorku 1 a 2. Blank = rozpouštěcí pufr (blank 1% ACN s 0,05% TFA ve vodě). Odlehlá hodnota je zvýrazněná červeně.

Vzorky	Absorbance	Průměr absorbancí	Průměr absorbance bez blanku	Koncentrace [µg /ml]	Koncentrace v celém objemu - 150 µl [µg]
Blank	0,243	0,090	0,090	0	
Vzorek 1	0,217	0,231	0,224	70	10,6
Vzorek 2	0,273	0,278	0,276	110	16,5

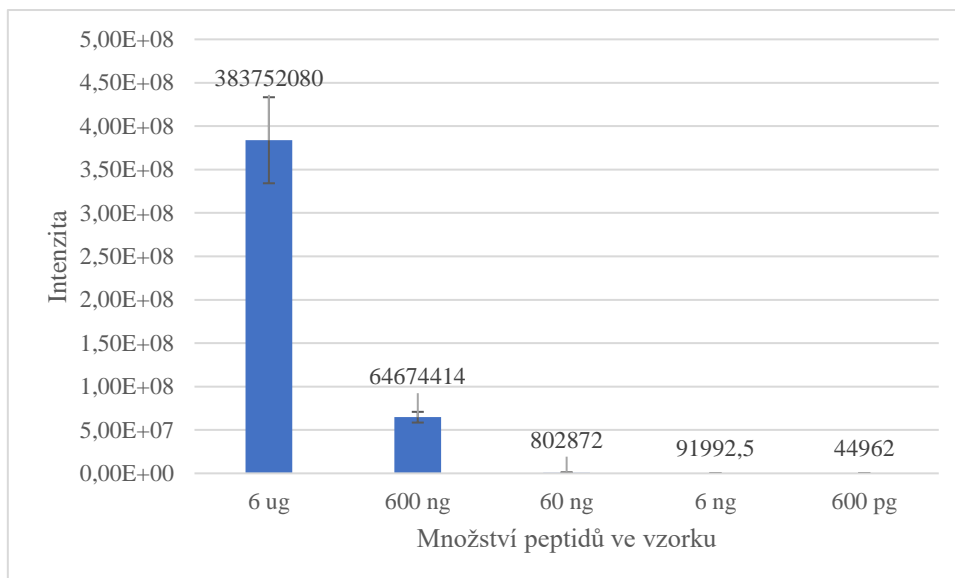
Nadále jsem pracovala se vzorkem č. 2 z důvodu vyšší koncentrace. Tento vzorek jsem si naředila do vialek tak, abych měla řadu 6 µg, 600 ng, 60 ng, 6 ng a 600 pg v 60 µl.

Provedla jsem necílenou a následně cílenou MS analýzu na hmotnostním spektrometru Orbitrap Exploris. Hmotnostní spektrum cílené analýzy je znázorněno na obrázku č. 15. Do přístroje byl nanášen 1 μl vzorku. Nejintenzivnější byl peptid YLYEAR ($600 \cdot 10^6$) s retenčním časem 37,22 min v nejvíce koncentrovaném vzorku.



Obrázek č. 15: Spektrum peptidů vzorku, který obsahoval 6 μg peptidů proteinu BSA štěpeným směsí enzymů trypsin/lys-C. Zpracováno v programu Skyline.

S klesající koncentrací vzorku klesala také jeho intenzita. Vzorek obsahující 600 pg peptidů dosahoval intenzity pouhých 44962 (viz obrázek č. 16).



Obrázek č. 16: Klesající intenzita peptidu YLYEIAR s klesajícím množstvím peptidů ve vzorku.

Analýza byla z důvodu technických komplikací ukončena. Následně jsem tento experiment z kapacitních důvodů začala znova, od úplného začátku, na novém hmotnostním spektrometru TripleTof.

5.2 Optimalizace hmotnostního spektrometru TripleTof

Z kapacitních a časových důvodů jsem experimenty pro mou bakalářskou práci začala provádět na jiném hmotnostním spektrometru – TripleTof, který kombinuje trojitý kvadrupól a analyzátor doby letu.

Připravila jsem si novou digesci, kterou jsem dle původního protokolu přečistila a celý vzorek využila k optimalizaci nastavení přístroje.

Vzorek obsahoval 1 µg peptidů v 10 µl roztoku a měřila jsem v nastavení programu IDA experiment, který měří ms⁻¹ vzorku, tedy celé peptidy. Provedla jsem 9 měření, přičemž v každém měření jsem se změnila jeden z důležitých parametrů hmotnostní analýzy. Používala jsem UHPLC kolonu Arion Plus C18.

Na hodnotách intenzity a retenčních časech peptidu sekvence DLGEEHFK jsem porovnávala výsledky jednotlivých testů, které jsem vyzkoušela a vybrala jsem nejúčinnější nastavení, které budu nadále používat. Jako nejúčinnější se jevil test č. 8. Parametry, které jsem během optimalizace měnila jsou shrnuty v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Optimalizace jednotlivých parametrů hmotnostního spektrometru TripleTof s výslednou intenzitou a retenčním časem peptidu DLGEEHFK. Nejúčinnější nastavení je zvýrazněno tučně.

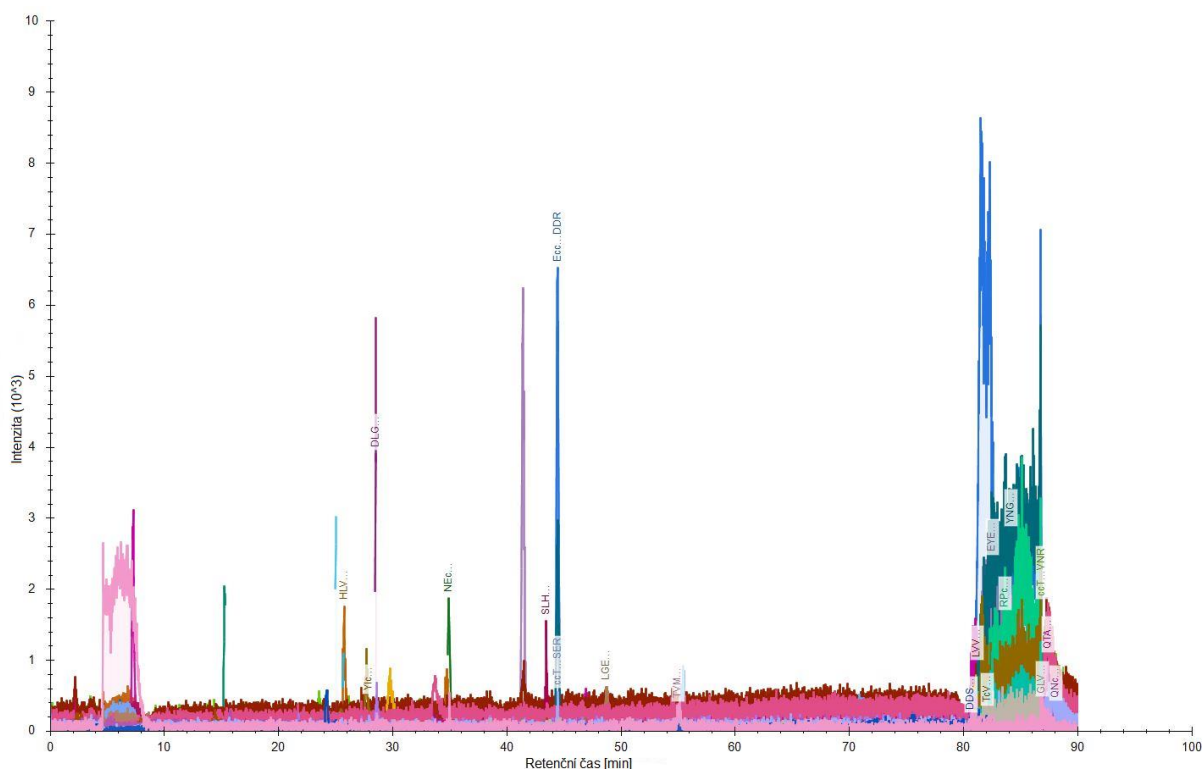
IDA experiment	Doba měření [min]	Průtok [μl/min]	Nástřik [μl]	Napětí na spreji [V]	Retenční čas [min]	Intenzita
Test 1	60	100	10	5500	17,94	5870
Test 2	60	100	10	5500	18,20	5769
Test 3	60	100	20	5500	5,28	5222
Test 4	60	200	10	5500	14,36	1980
Test 5	60	100	10	5300	16,35	3052
Test 6	60	100	10	5300	16,35	3052
Test 7	60	50	10	5500	23,66	2751
Test 8	90	50	10	5500	28,64	4968
Test 9	90	40	10	5500	32,95	5103

V testu č. 6 jsem upravila gradient mobilní fáze. Jednotlivá zastoupení mobilních fází (%A a %B) v průběhu analýzy jsou shrnuty v tabulce č. 5

Tabulka č. 5: Gradient mobilní fáze v průběhu optimalizace v testu č. 6

Čas analýzy [min]	%A	%B
0	97	3
5	97	3
45	55	45
46	5	95
51	5	95
52	97	3
60	97	3

Výsledek MS analýzy při nastavení z testu č. 8 je znázorněn na obrázku č. 17.



Obrázek č. 17: Spektrum peptidů vzorku digestu BSA z testu č. 8. Zpracováno v programu Skyline.

5.3 Optimalizace přečištění roztoku peptidů

Protože žádné z aplikovaných nastavení v průběhu optimalizace nevedlo k požadovanému výsledku, jako další krok jsem se rozhodla zvýšit množství nanášeného vzorku. Protokol pro přečištění roztoku peptidů vždy vedl zhruba ke 20% výtěžnosti, rozhodla jsem se optimalizovat právě tento protokol.

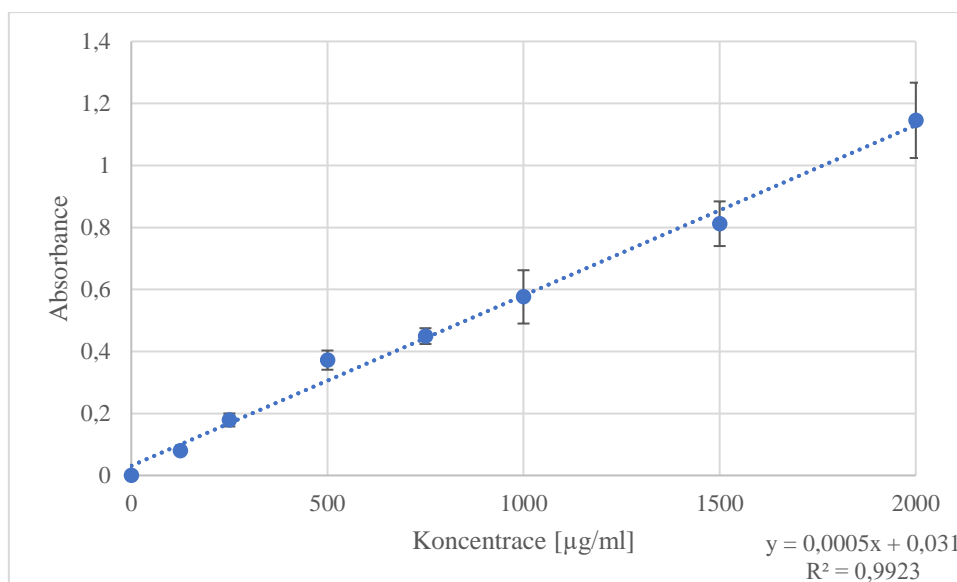
5.3.1 Zvýšení množství vrstev C18 membrány v systému STAGE tips

Jako první krok jsem zvýšila množství vrstev C18 membrány ve STAGE tips. Připravila jsem si 10 vzorků digestu 100 µg proteinu BSA ze zásobního roztoku 2000 µg/ml. Tyto vzorky jsem rozdělila na 2 sady, tedy 5 + 5 vzorků. Vzorky obou sad jsem pak přečistila přes 3, 6, 9, 12 a 15 vrstev membrány C18. Upravila jsem původní protokol přečištění. Na každou membránu jsem použila 200 µl chemikálií a aplikovala jsem celý vzorek. Protože přes větší počet membrán neprocházely chemikálie stejnou rychlostí, jako v původním protokolu, musela jsem upravit také časy centrifugace (viz tabulka č. 6).

Tabulka č. 6: Upravená množství chemikálií a doba centrifugace jednotlivých kroků protokolu č. 2

Chemikálie	Aplikované množství [μl]	Doba centrifugace [min]
Methanol	200	5 + 5
80% ACN s 0,1% AA	200	10
0,1% AA	200	10
Vzorek	Celý	10 + 5
0,1% AA	200	10 + 3
80% ACN S 0,1% AA	100	10 + 3

Po přečištění jsem změřila koncentraci peptidů metodou BCA. Sestavila jsem kalibrační křivku (viz obrázek č. 18), ze které jsem si vypočítala koncentrace peptidů získané z jednotlivých vrstev.



Obrázek č. 18: Kalibrační křivka pro výpočet koncentrací vzorků peptidů získaných ze 100 μg BSA proteinů přečištěných přes 3, 6, 9, 12 a 15 vrstev membrány C18.

Navýšení počtu membrány C18 na 15 vrstev vedlo ke zvýšení výtěžnosti na zhruba čtyřnásobek. Výsledek však není jednoznačný, protože byl mezi sadami 1 a 2 značný rozdíl ve výsledných koncentracích (viz tabulka č. 7)

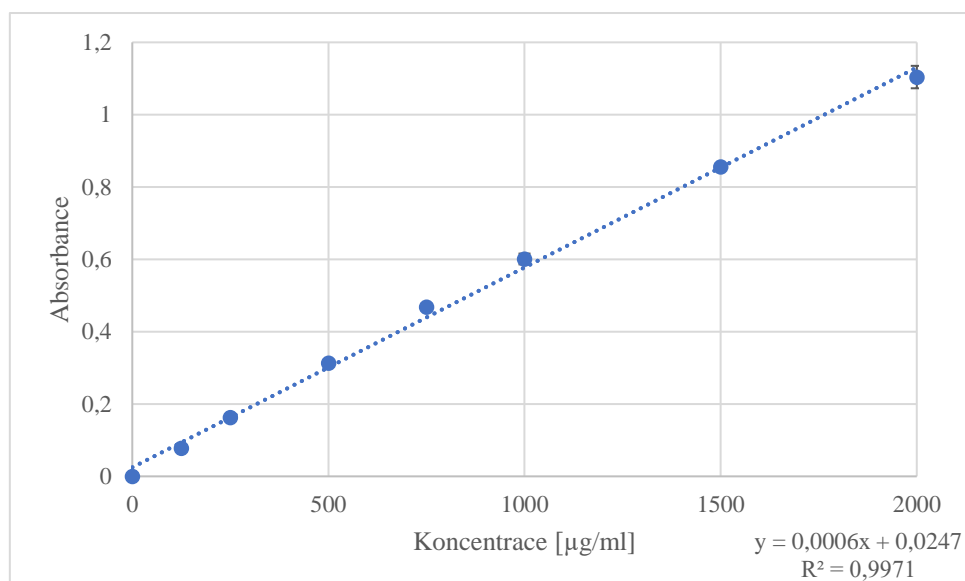
Tabulka č. 7: Absorbance a koncentrace peptidů vzorků ze 100 µg proteinu BSA přečištěných přes 3, 6, 9, 12 a 15 vrstev membrány C18.

Vzorky	Počet vrstev	Absorbance		Průměr absorbancí	Průměr absorbancí bez blanku	Koncentrace v 1 ml	Koncentrace v 10 µl
První sada	blank	0,082	0,082	0,082	0		
	3	0,153	0,148	0,151	0,069	75	0,75
	6	0,216	0,245	0,231	0,149	235	2,35
	9	0,251	0,253	0,252	0,170	278	2,78
	12	0,244	0,212	0,228	0,146	230	2,30
	15	0,239	0,279	0,259	0,177	292	2,92
Druhá sada	3	0,155	0,166	0,161	0,079	95	0,95
	6	0,208	0,205	0,207	0,125	187	1,87
	9	0,244	0,239	0,242	0,160	257	2,57
	12	0,256	0,242	0,249	0,167	272	2,72
	15	0,326	0,351	0,339	0,257	451	4,51

5.3.2 Zvýšení množství štěpeného proteinu na 200 µg

Jelikož se mi pouhým zvýšením počtu vrstev membrány C18 nepovedlo získat požadovanou koncentraci, v další pokusu jsem zvýšila množství proteinu k digesci ze 100 µg proteinu BSA na 200 µg. Množství ostatních chemikálií z protokolu č. 1 zůstalo stejné a pro přečištění jsem opět použila 3, 6, 9, 12 a 15 vrstev membrány C18.

Výsledné koncentrace peptidů z jednotlivých vrstev jsem zjistila metodou BCA. Po sestavení kalibrační křivky s její rovnicí (viz obrázek č. 19) jsem vypočítala koncentrace v 1 ml a poté přepočítala na koncentraci v nanášeném objemu 10 µl.



Obrázek č. 19: Kalibrační křivka pro výpočet koncentrací vzorků peptidů získaných z 200 µg BSA proteinů přečištěných přes 3, 6, 9, 12 a 15 vrstev membrány C18.

Lze pozorovat nárůst koncentrace ve všech vrstvách. V obou sadách došlo k výraznému zvýšení výtěžnosti a sady mají mezi sebou výrazně nižší odchylky oproti předchozímu pokusu. Veškeré získané hodnoty jsem shrnula do tabulky č. 8.

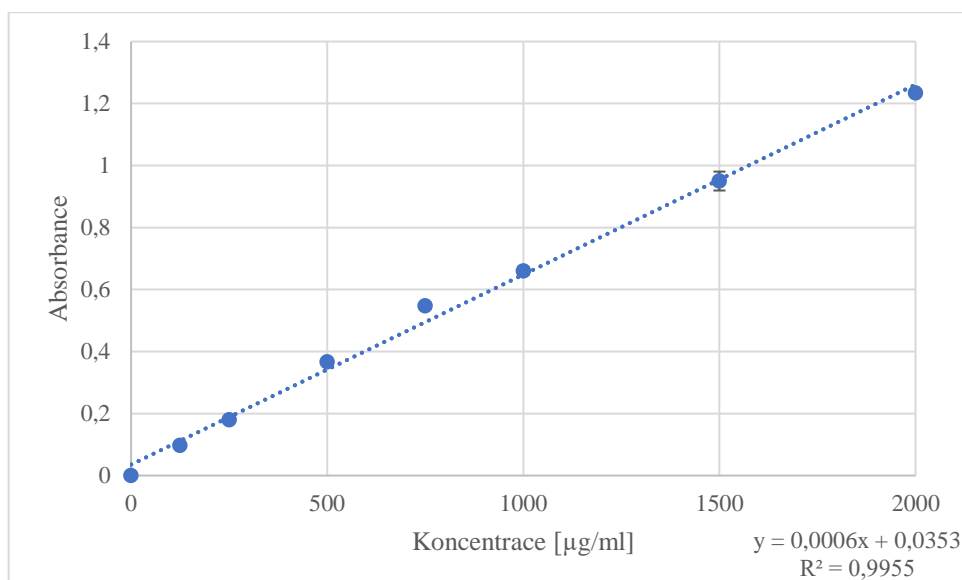
Tabulka č. 8: Absorbance a koncentrace peptidů dvou sad vzorků z 200 µg proteinu BSA přečištěných přes 3, 6, 9, 12 a 15 vrstev membrány C18

Vzorky	Počet vrstev	Absorbance		Průměr absorbancí	Průměr absorbancí bez blanku	Koncentrace [µg/ml]	Koncentrace v 10 µl [µg]
První sada	Blank	0,086	0,086	0,086	0		
	3	0,200	0,204	0,202	0,116	152	1,52
	6	0,276	0,283	0,280	0,194	281	2,81
	9	0,340	0,340	0,340	0,254	382	3,82
	12	0,357	0,367	0,362	0,276	419	4,19
	15	0,371	0,378	0,375	0,289	440	4,40
Druhá sada	3	0,178	0,189	0,184	0,098	121	1,21
	6	0,282	0,294	0,288	0,202	296	2,96
	9	0,318	0,321	0,320	0,234	348	3,48
	12	0,368	0,374	0,371	0,285	434	4,34
	15	0,380	0,388	0,384	0,298	456	4,56

5.3.3 Rozdělení digesce na polovinu

V dalším kroku optimalizace přečištění jsem digest 200 µg proteinu BSA před přečištěním rozdělila na polovinu. Pokus jsem tentokrát prováděla pouze na 6, 9 a 12 vrstvách membrány

C18, protože 3 vrstvy nevedly k dostatečně vysokému výtěžku a mezi 12 a 15 vrstvami již nebyl zásadní rozdíl získané koncentrace peptidů. K tomuto pokusu jsem ještě provedla jedno opakování s plným objemem pro detekci případných chyb. Kalibrační křivka je uvedena na obrázku č. 20.



Obrázek č. 20: Kalibrační křivka pro výpočet koncentrací vzorků peptidů získaných z 200 µg BSA proteinů přečištěných přes 6, 9 a 12 vrstev membrány C18.

V tabulce č. 9 jsem shrnula hodnoty koncentrací a absorbancí získaných ze vzorků, u kterých nedošlo k rozdělení digestu na polovinu.

Tabulka č. 9: Absorbance a koncentrace vzorků peptidů, u kterých nedošlo k rozdělení na polovinu. Digest 200 µg BSA proteinu přečištěný přes 6, 9 a 12 vrstev membrány C18.

Vzorky	Počet vrstev	Absorbance		Průměr absorbancí	Průměr absorbancí bez blanku	Koncentrace [µg/ml]	Koncentrace v 10 µl [µg]
		0,091	0,095				
První sada	Blank	0,091	0,095	0,093	0		
	6	0,324	0,334	0,329	0,236	335	3,35
	9	0,364	0,365	0,365	0,272	394	3,94
Druhá sada	12	0,400	0,398	0,399	0,306	451	4,51
	6	0,299	0,303	0,301	0,208	288	2,88
	9	0,369	0,365	0,367	0,274	398	3,98
	12	0,451	0,475	0,463	0,370	558	5,58

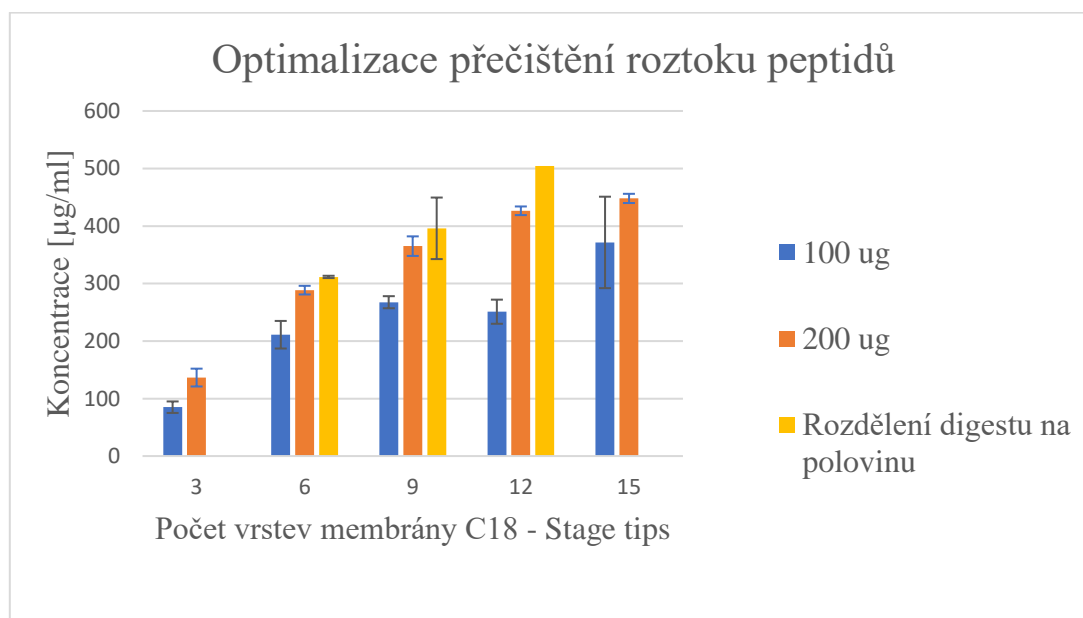
V tabulce č. 10 uvádím hodnoty absorbancí a koncentrací z jednotlivých vrstev membrán C18 ze vzorků, u kterých došlo k rozdělení na poloviny.

Tabulka č. 10: Absorbance a koncentrace peptidů v rozpůlených vzorcích digestu 200 μg BSA proteinu přečištěných přes 6, 9 a 12 vrstev membrány C18

Vzorky	Počet vrstev	Absorbance		Průměr absorbancí	Průměr absorbancí bez blanku	Koncentrace v 1 ml	Koncentrace v 10 μl
	Blank	0,101	0,091	0,096	0		
První sada	6	0,391			0,295	433	4,33
	9	0,443			0,347	520	5,20
	12	0,454			0,358	538	5,38
Druhá sada	6	0,383			0,287	420	4,20
	9	0,450			0,354	531	5,31
	12	0,452			0,356	535	5,35

Při porovnání těchto hodnot s hodnotami koncentrací z tabulky č. 9 lze pozorovat další zvýšení získané koncentrace.

Na obrázku č. 21 je znázorněn postupný růst koncentrace na jednotlivých vrstvách membrány C18 v každém provedeném experimentu.



Obrázek č. 21: Záznam vzrůstající koncentrace získané v jednotlivých optimalizačních krocích přečišťování roztoku peptidů.

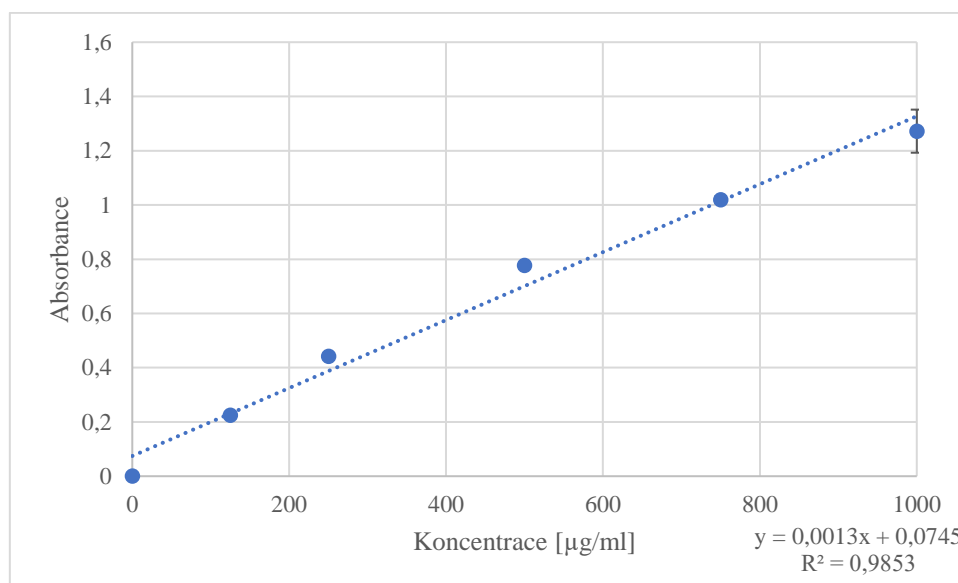
5.3.4 Přečištění roztoku peptidů použitím SEP-PAK CARTRIDGE

Jelikož dosavadní způsob purifikace peptidů přes STAGE TIPS membrány nevedl k výraznému zvýšení výtěžnosti, přistoupila jsem k jinému způsobu za použití SEP-PAK CARTRIDGE.

Jedná se o kolonky s C18 fází na bázi oxidu křemičitého, které se využívají k odsolování peptidů. Pro tuto variantu jsem se rozhodla na základě rešerše (Bian et al. 2020).

Kolonou jsem jednotlivé chemikálie protlačila pomocí stříkačky. Všechny chemikálie (viz protokol č. 2) jsem nanášela v požadovaném množství 5 ml a eluci peptidů jsem provedla 2 ml 80% ACN a 0,1% AA ve vodě.

Eluát jsem rozdělila na poloviny (dále označeno jako vzorek č. 1 a vzorek č. 2) a dala sušit do vakuové sušičky. Vzorek č. 1 jsem rozpustila ve 100 μ l 1% ACN s 0,05% TFA ve vodě, na mikrotitrační destičku jsem nanasla 25 μ l a metodou BCA změřila koncentraci peptidů. Kalibrační křivka a její rovnice je uveden na obrázku č. 22.



Obrázek č. 22: Kalibrační křivka pro výpočet koncentrací vzorků peptidů získaných z 200 μ g BSA proteinů přečištěných přes kolonu SEP-PAK. Vyšší koncentrace vyřazeny z důvodu saturace.

Hodnoty koncentrace v 1 ml jsem přepočítala na objem nanášený na destičku, tady 25 μ l. Obě hodnoty jsem společně s absorbancemi zapsala do tabulky č. 11.

Tabulka č. 11: Absorbance a koncentrace vzorků peptidů získaných z 200 µg BSA proteinů přečištěných přes kolonu SEP-PAK.

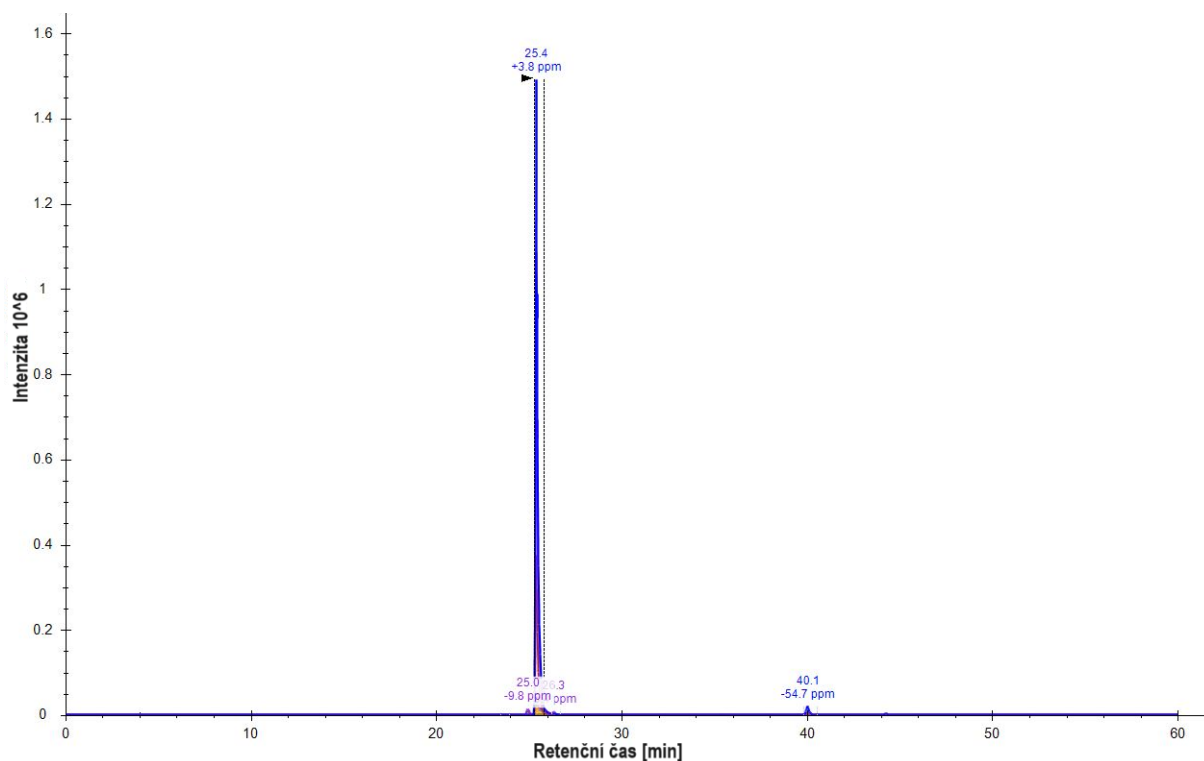
	Absorbance			Průměr absorbancí	Průměr absorbancí bez blanku	Koncentrace [µg/ml]	Koncentrace ve 25 µl [µg]
Blank	0,082	0,083		0,0825	0		
Vzorek	0,879	0,91	0,902	0,897	0,8145	569,23	14,23

Vzorek č. 2 jsem rozpustila v 56 µl 1% ACN s 0,05% TFA ve vodě, aby byla koncentrace vzorku 1 µg na 1 µl. U obou vzorků jsem pak provedla MS analýzu. Parametry měření jsem použila z předchozí optimalizace (viz tabulka č. 4, test č. 8). Provedla jsem 5 měření. V prvním měření bylo nanášeno 5 µg vzorku č. 1 (tabulka č. 12). Ostatní měření byla provedena ze vzorku č. 2. Nastříkovan byl 1 µg, 5 µg, 10 µg a 20 µg vzorku.

Do výsledkové části uvádím 3 peptidy, které vykazovaly nejvyšší intenzitu a peptid DLGEEHFK pro porovnání zvýšení intenzity oproti intenzitě z optimalizačního testu č. 8 z tabulky č. 2.

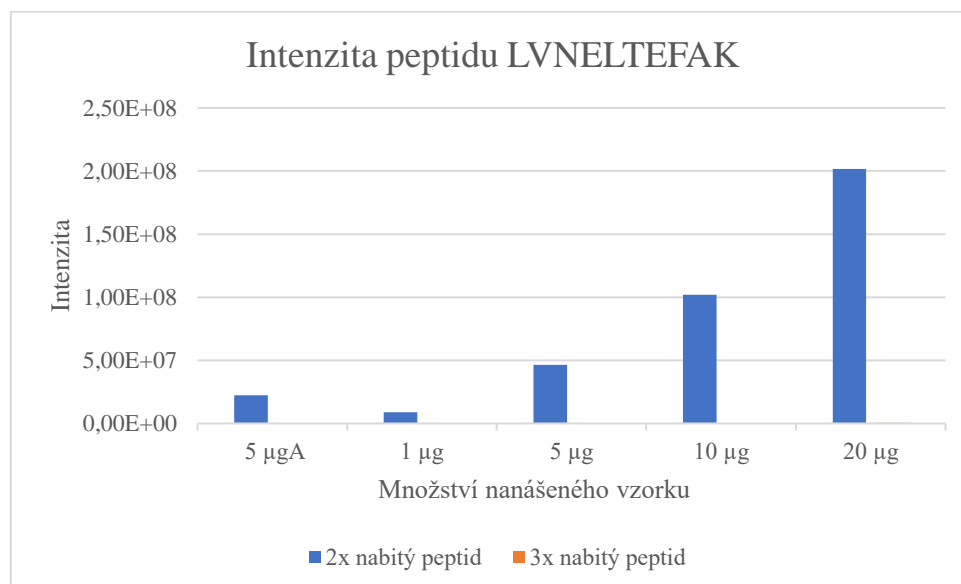
Nejintenzivnější peptid LVNELTEFAK dosahoval intenzity až 201,5 milionu ve své 2x nabitě formě při analýze 20 µg vzorku. Výsledek měření všech nanášených množství je znázorněn na obrázku č. 23.

Výsledná intenzita se lišila pro 5 µg ze vzorku č. 1 a vzorku č. 2. To nasvědčuje tomu, že došlo k chybě při rozdělování původního 2ml roztoku na poloviny.



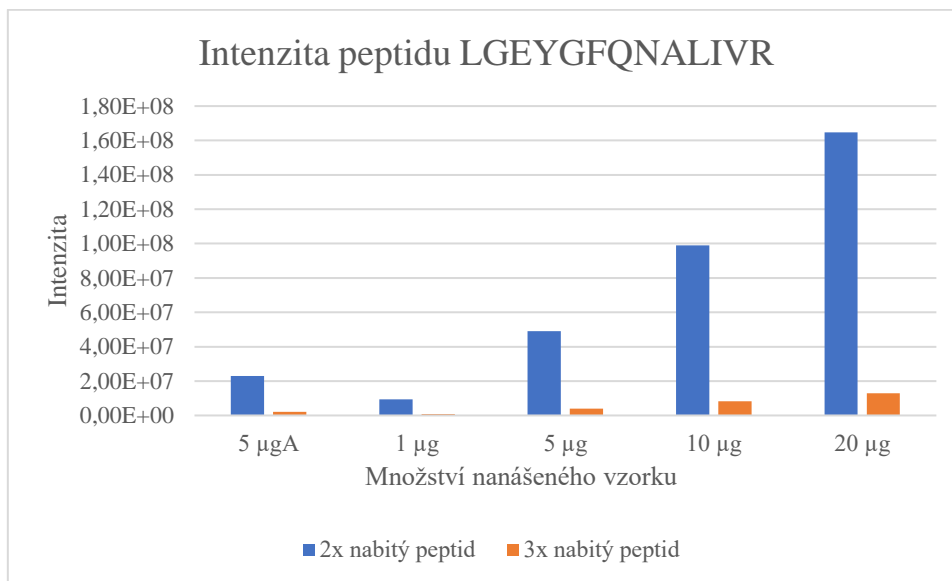
Obrázek č. 23: Intenzita peptidu LVNELTEFAK při analýze 5 odlišných množství vzorku. 5 μ gA značí vzorek č. 1. Ostatní hodnoty se týkají vzorku č. 2.

Dále přikládám snímek tohoto peptidu po zpracování v programu Skyline (viz obrázek č. 24).



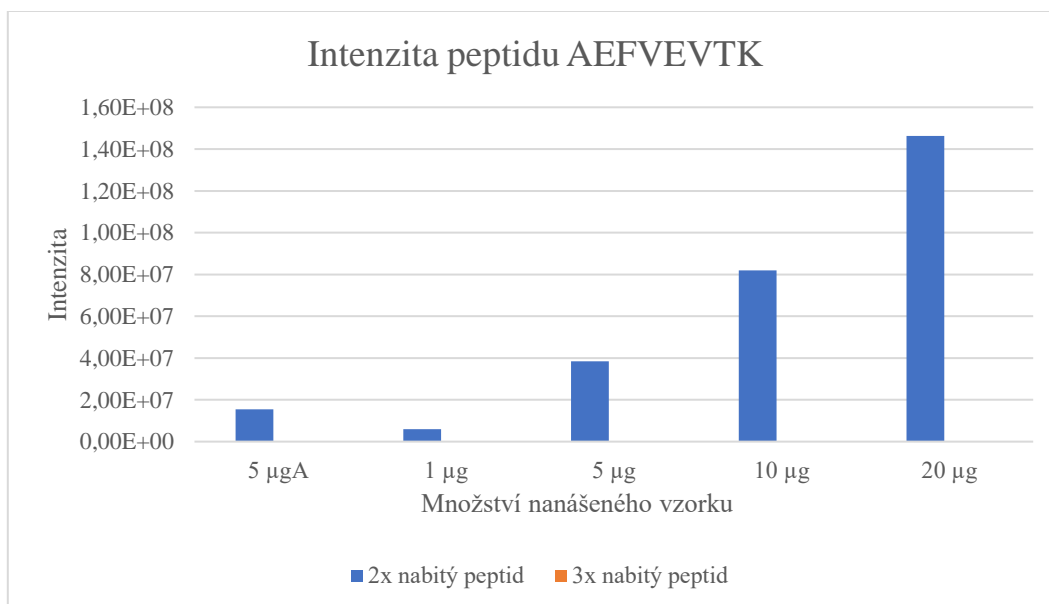
Obrázek č. 24: Retenční čas a intenzita peptidu LVNELTEFAK při analýze 5 μ g vzorku č. 1. Zpracováno v programu Skyline.

Peptid LGEYGFQNALIVR dosahoval maximální intenzity okolo $1,6 \cdot 10^8$ ve své 2x nabitě formě a necelých $2 \cdot 10^7$ v 3x nabitě formě (viz obrázek č. 25)



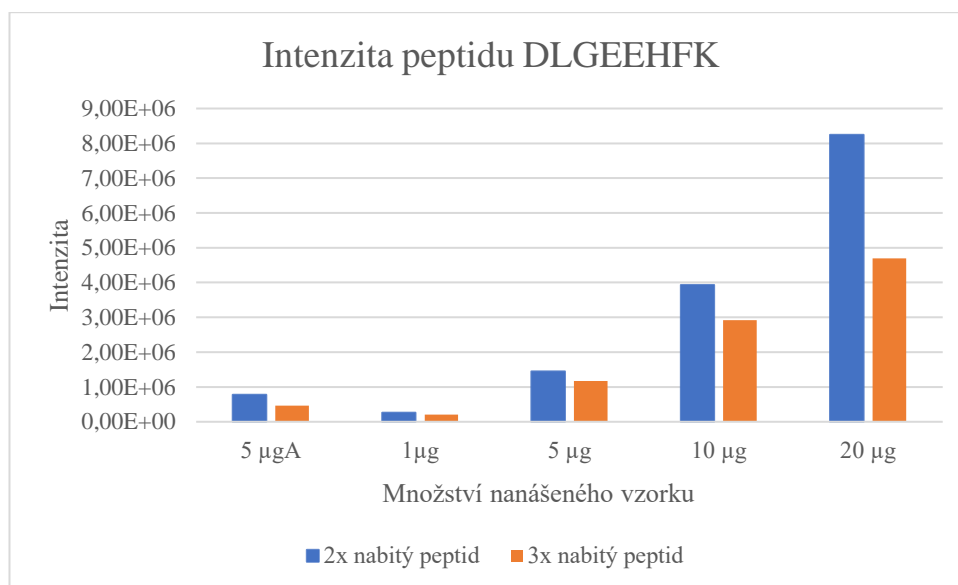
Obrázek č. 25: Intenzita peptidu LGEYGFQNALIVR při analýze 5 odlišných množství vzorku. 5 µgA značí vzorek č. 1. Ostatní hodnoty se týkají vzorku č. 2.

Intenzita Peptid AEFVEVTK dosahovala v jeho 2x nabitě formě maximálně přes $1,4 \cdot 10^8$. Trojnásobně nabitý peptid dosahoval pouze 68904. Výsledek měření ve všech nastříkovaných množstvích je znázorněn na obrázku č. 26.



Obrázek č. 26: Intenzita peptidu AEFVEVTK při analýze 5 odlišných množství vzorku. 5 µgA značí vzorek č. 1. Ostatní hodnoty se týkají vzorku č. 2.

Pro porovnání s výsledky před optimalizací přečištění jsem vložila výsledek měření peptidu DLGEEHFK. Před optimalizací se jeho intenzita pohybovala v řádech tisíců (viz tabulka č. 4). Jeho intenzita se oproti těmto měřením zvýšila až o 3 řády s maximální intenzitou přes $8 \cdot 10^6$ (viz obrázek č. 27).



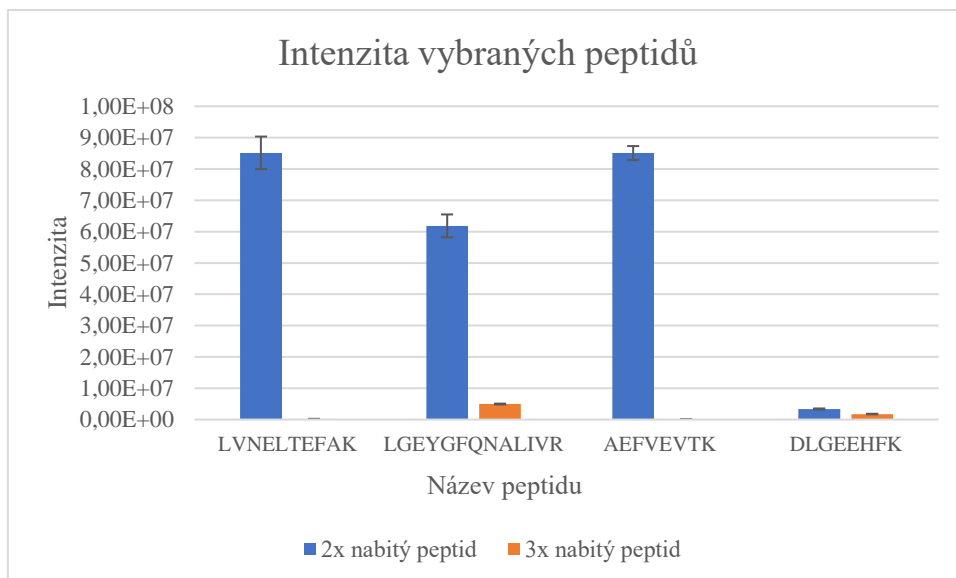
Obrázek č. 27: Intenzita peptidu DLGEEHFK při analýze 5 odlišných množství vzorku 5 µgA značí vzorek č. 1. Ostatní hodnoty se týkají vzorku č. 2.

5.4 Použití nové chromatografické kolony Kinetex

Jako další krok k docílení vyšší intenzity jsem se rozhodla vyzkoušet novou chromatografickou kolonu (Kinetex LC column 2,6 µm, 150 x 1,0 mm, 100 Å, kat. č. 00F-4496-A0), která má menší průměr než kolona Arion, a tudíž by měla být citlivější.

Vzorek digestu 200 µg proteinu BSA jsem přečistila přes SEP-PAK CARTRIDGE, vysušila a rozpustila v 56 µl 1% ACN s 0,05% TFA ve vodě. BCA jsem tentokrát neprováděla a pracovala jsem s hodnotou z minulého měření (viz tabulka č. 8), protože vzorek byl připraven ze stejného zásobního roztoku. Vzorek měl tedy výslednou koncentraci přibližně 1 µg/µl.

Následně jsem provedla měření při různých nastavení průtoku přes kolonu. Vždy bylo nanášeno 5 µg vzorku a průtok byl nastaven nejdříve na $40 \mu\text{l}/\text{min}^{-1}$, $30 \mu\text{l}/\text{min}^{-1}$ a $20 \mu\text{l}/\text{min}^{-1}$. Jako nejefektivnější se jevílo nastavení průtoku na $30 \mu\text{l}$. Intenzita vybraných peptidů byla zvýšena zhruba na dvojnásobek (viz obrázek č. 28).



Obrázek č. 28: Intenzity peptidů LVNELTEFAK, LGEYGFQNALIVR, AEFVEVTK a DLGEEHFK při nástřiku 5 μg vzorku, průtoku 30 $\mu\text{l}/\text{min}^{-1}$ při použití nové kolony Kinetex.

Tímto experimentem jsem ukončila necílené měření a přesunula jsem se k měření cílenému.

5.5 Cílená MS analýza

Vybrala jsem 10 nejintenzivnějších peptidů z posledního měření s novou kolonou Kinetex. (viz tabulka č. 12)

Tabulka č. 12: Vybrané peptidy a jejich intenzita pro cílené měření

Peptid	Intenzita
LVNELTEFAK	90344408
AEFVEVTK	87300304
LGEYGFQNALIVR	65479716
YICDNQDTISSK	53705660
HLVDEPQNLIK	47050840
DAFLGSFLYEYSR	34135340
TVMENFVAFVDK	25985086
MPCTEDYLSLILNR	23777932
QNCDQFEK	23069752
SLHTLFGDELCK	22629914

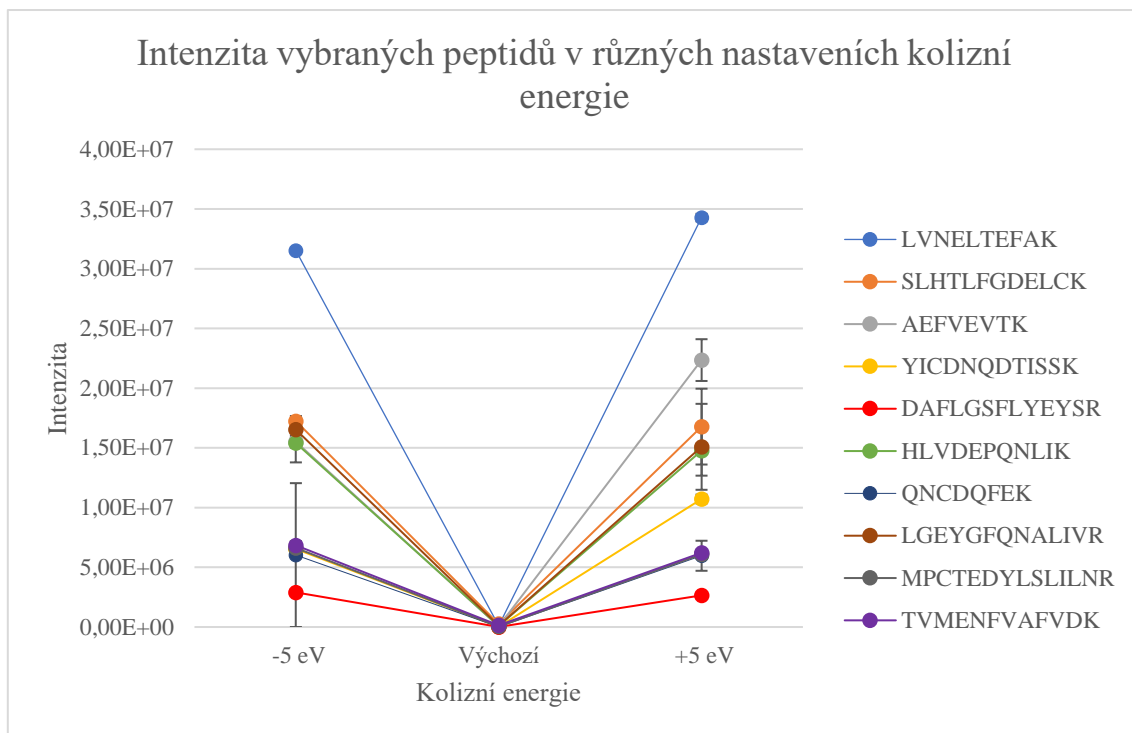
Na analýzu jsem nastavila nástřik 1 μl s předpokladem, že koncentrace nastříkovaného vzorku je 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Zvolené nastavení hmotnostního spektrometru viz tabulka č. 4, test č. 8. Zvolený gradient mobilní fáze viz tabulka č. 13.

Tabulka č. 13: Průtok a gradient mobilní fáze zvolený pro cílenou analýzu

Čas měření	Průtok	%A	%B
0	20	97	3
5	20	97	3
75	20	65	35
76	20	5	95
81	20	5	95
82	20	97	3
90	20	97	3

Výsledné intenzity a retenční časy byly nestabilní. Následně jsem dle vygenerovaného doporučení programu Skyline změřila vybrané peptidy s kolizní energií -5 eV a + 5 eV. Výsledky měření při nastavení všech třech variant kolizní energie (standardní, -5 eV a + 5 eV) jsou znázorněny na obrázku č. 29.

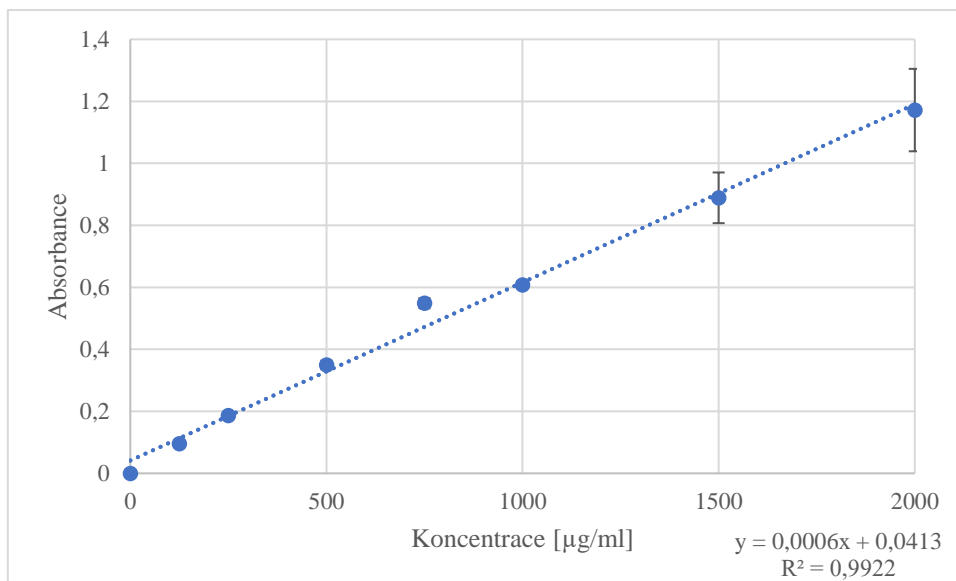
Zvýšení kolizní energie o 5 eV vedlo k výraznému zvýšení intenzity oproti standardní kolizní energii.



Obrázek č. 29: Intenzita vybraných peptidů ve 3 různých nastaveních kolizní energie. Peptid LVNELTEFAK (modrá), peptid SLHTLFGDELCK (oranžová), peptidy AEFVEVTK (šedá), peptid YICDNQDTISSK (žlutá), peptid DAFLGSFLYEYSR (červená), peptid HLVDEPQNLIK (zelená), peptid QNCDQFEK (tmavě modrá), peptid LGEYGFQNALIVR (hnědá), peptid MPCTEDYLSLILNR (černá), peptid TVMENFVAFVDK (fialová).

5.6 Cílená MS analýza vybraných peptidů v roztocích o různých koncentracích

Jako další krok jsem si připravila koncentrační řadu 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Připravila jsem si ze zásobního roztoku 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nové vzorky. 200 μg proteinu jsem naštípala a roztok peptidů přečistila přes kolonu Sep-pak. Vzorek jsem vysušila a rozpustila v rozpouštěcím pufru. U jednoho ze vzorků jsem změřila koncentraci peptidů metodou BSA (viz obr. č. 30). Výpočítala jsem si koncentraci peptidů ve vzorku (viz tabulka č. 14), aby následné naředění vzorku pro koncentrační řadu bylo co nejpřesnější.

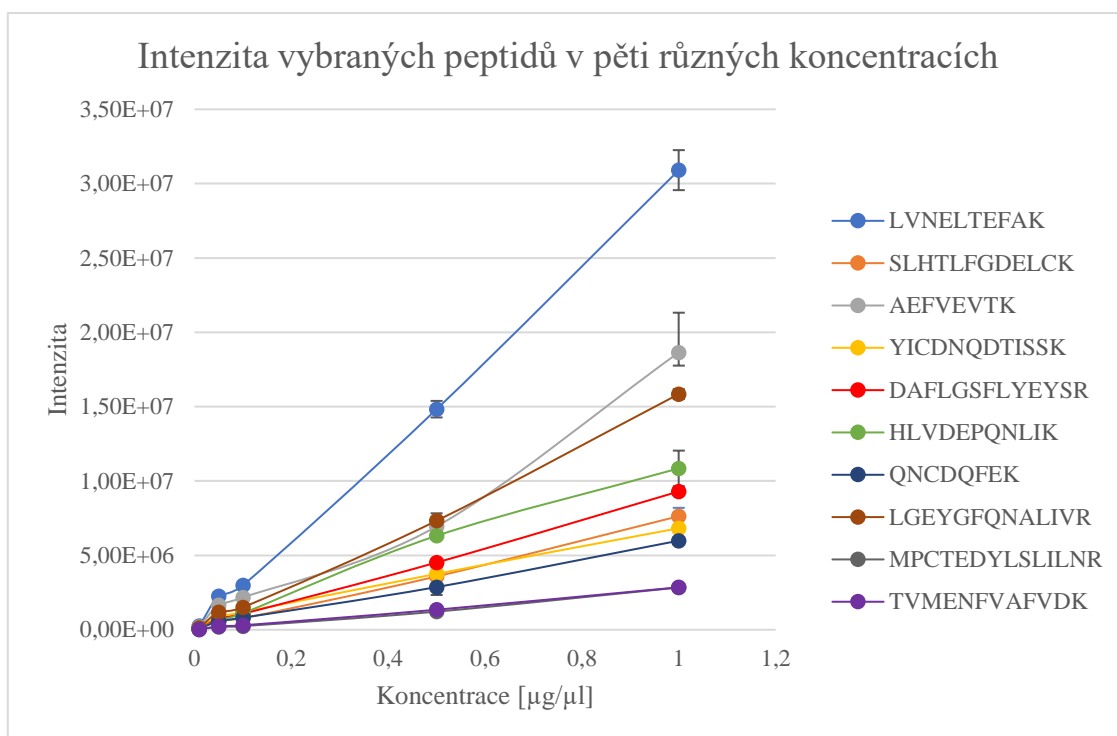


Obrázek č. 30: Kalibrační křivka pro výpočet koncentrací vzorku peptidů získaných z 200 µg BSA proteinů přečištěných přes kolonu SEP-PAK.

Tabulka č. 14: Absorbance a koncentrace vzorků peptidů získaných z 200 µg BSA proteinů přečištěných přes kolonu SEP-PAK.

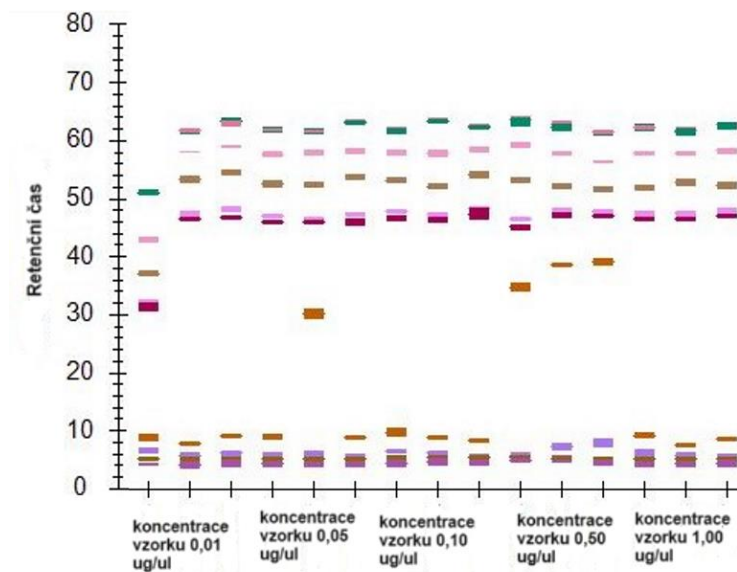
	Absorbance		Průměr Absorbancí	Průměr absorbancí bez blanku	Koncentrace [µg/ml]
Blank	0,085	0,083	0,084	0	
Vzorek	0,996	1,021	1,008	0,924	1471,83

Naředěný vzorek do koncentrační řady jsem proměřila na hmotnostním spektrometru s předchozím nastavením, tedy +5 eV kolizní energie. Peptidy byly zaznamenány i v nejnižší koncentraci (0,01 µg/µl), a to v intenzitách až v řádech milionů. Každou z koncentrací jsem proměřila 3x a průměrné výsledky jsem uvedla na obrázku č. 31.



Obrázek č. 31: Intenzita vybraných peptidů v 5 různých koncentracích od 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ po 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Peptid TVMENFVAFVDK (fialová), peptid MPCTEDYLSLILNR (šedá), peptid LGEYGFQNALIVR (hnědá), peptid QNCDQFEK (tmavě modrá), peptid HLVDEPQNLIK (zelená), peptid DAFLGSFLYEYSR (červená), peptid YICDNQDTISSK (žlutá), peptid AEFVEVTK (šedá), peptid SLHTLFGDELCK (oranžová) a peptid LVNELTEFAK (modrá).

Ačkoli je intenzita relativně vysoká, u některých peptidů je neustálený retenční čas a liší se u každého měření (viz obrázek č. 32). Dále jsou některé z peptidů zaznamenány příliš brzo (retenční čas okolo 6. minuty) a píky se překrývají.



Obrázek č. 32: Porovnání retenčních časů peptidů v jednotlivých měření. Odlišné barvy zastupují jednotlivé peptidy. U prvních třech měření se jedná o vzorky s koncentrací 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, u dalších třech měření o vzorek s koncentrací 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, další tři jsou vzorky o koncentraci 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a další jsou vzorky o koncentraci 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Poslední trojice jsou vzorky o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

6 DISKUSE

V mé práci jsem se věnovala optimalizaci přípravy vzorku, optimalizaci parametrů chromatografické separace a optimalizaci nastavení hmotnostního spektrometru s cílem zvýšení citlivosti metody pro stanovení Fibroblastového růstového faktoru 23, kterou vyvinula Mgr. Klára Brožová. Optimalizační kroky jsem prováděla s dostupnějším a finančně méně nákladným Bovinním sérovým albuminem.

První experimenty provedené na hmotnostním spektrometru Orbitrap Exploris vedly k uspokojivým výsledkům a po jednom necíleném přeměření připraveného vzorku jsem mohla přikročit k cílené analýze. Naneštěstí se vyskytly technické problémy, které přístroj vyřadily z provozu na skoro půl roku. Poté jsem práci z kapacitního a časového důvodu přesunula na hmotnostní spektrometr TripleTOF.

TripleTOF pracuje na základě jiných principů než předchozí hmotnostní spektrometr a má odlišné vlastnosti. Především jeho odlišné přístrojové nastavení neumožňuje nanoLC-MS analýzu, což je nejběžnější přístup v proteomických analýzách. Z tohoto důvodu bylo potřeba vyvinout metodu využívající mikroLC-MS, která se čím dál víc stává vhodnou alternativou k nanoLC-MS (Bian et al. 2022).

Využití mikroLC-MS v proteomickém výzkumu se věnuje například Lenčo (Lenčo *et al.*, 2018). Práce zmiňuje možnost využití mikroLC-MS pro určité proteomické analýzy. Dále se touto metodou zabývá několik studií.

Bian zmiňuje, že pomocí mikroLC-MS lze dosáhnout výsledků podobné úrovně, jako při standardní nanoLC-MS, pokud je analyzováno vyšší množství vzorku. Lze tak dosáhnout velice spolehlivých a robustních výsledků (Bian et al. 2020). V této práci se podařilo identifikovat asi 250 plazmatických proteinů (2 300 peptidů), 600 proteinů CSF (4 500 peptidů) a 1 100 proteinů moči (5 000 peptidů) z 5 µg proteinového digestu. Navíc by díky spolehlivým hodnotám většina kvantifikovaných proteinů splňovala směrnice pro klinické testy.

Jako první bylo nutné optimalizovat metodu přípravy vzorku s cílem zajistit vyšší výtěžek štěpených peptidů. Nanášení většího množství peptidů do LC-MS systému by mělo vést k citlivější analýze s intenzivnějším výsledkem. Dle Maia (Maia *et al.*, 2020) si LC-MS/MS experimenty typicky vyžadují množství peptidů v rozmezí mezi 100 ng a 5 µg peptidů obsažených v objemu několika málo mikrolitrů. Dle jejich výsledků se optimální množství nanášeného peptidu pohybuje zhruba v rozmezí 1,49–5,20 µg.

V protokolu zpracování vzorku, se kterým jsem pracovala, se vyskytují dva klíčové kroky, jejichž úprava by mohla vést k vyššímu výtěžku. Prvním z nich je enzymatická digesce. Wiśniewski a Mann porovnávají různé způsoby digesce proteinů s cílem získat co největší množství různých peptidů a zároveň identifikovat co nejvíce proteinů ze směsi (Wiśniewski a Mann 2012). Porovnávají štěpení pouze trypsinem (*one step digestion*) a štěpení směsí enzymů a to směsí trypsinu/lysC, trypsin-GluC, trypsin-AspN a trypsin-ArgC. Různé směsi enzymů vedly k různým počtům identifikovaných peptidů a tím pádem i k identifikaci různých množství proteinů přítomných ve směsi. Kombinace LysC a trypsinu vedla k nejlepším výsledkům (identifikovali 3350 ± 67 proteinů ze vzorku). Tento výsledek je následně podpořen výzkumem (Glatter et al. 2012), ve kterém je porovnána efektivita štěpení pouze trypsinem a štěpení směsí trypsin-LysC. Směs vede opět k vyšší efektivitě.

Na základě těchto výsledků tedy nebylo potřeba upravovat krok digesce proteinu, ale zaměřila jsem se na optimalizaci přečištění směsi peptidů.

Přečištění roztoku peptidů patří mezi jeden z limitních faktorů, protože přítomnost nízkomolekulárních netěkavých látek (zejména solí) způsobuje vyšší pozadí a špatnou detekci analytu. Například Vera (Vera *et al.*, 2011) zmiňuje, že při zařazení extrakce na pevné fázi (solid phase extraction – SPE) před LC-MS systém vede k preciznějším výsledkům a vyšší výtěžnosti.

Přečištění je nutnou součástí každého proteomického protokolu. Odstraněním kontaminantů o nízké molekulové hmotnosti dochází k vylepšení intenzity a lepšímu pokrytí hledané proteinové sekvence.

Dnes se využívá řada způsobů přečištění vzorku a existují také zakázkově vyrobené mikrokolony, které slouží pro rychlé čištění před analýzou (např. ZipTips). Tyto kolony mají materiál pro purifikaci polymerizovaný do špiček pipet (Larsen *et al.*, 2002).

V původním protokolu, dle kterého jsem postupovala, se využívalo přečištění pomocí StageTips s C18 membránou, která nabízí řešení problémů, které se část vyskytují u komerčně vyráběných systémů (Rappsilber *et al.*, 2003). Příkladem takových problémů může být nutnost velkého objemu roztoku pro eluci, čímž dojde k naředění vzorku (Larsen *et al.*, 2002).

Dle Rappsilbera (Rappsilber *et al.*, 2003) by kapacita C18 membrány využívané v systému StageTips měla být 2–4 μg vzorku. Po optimalizaci počtu vrstev C18 membrány (od 3 do 15)

a po optimalizaci štěpeného množství proteinu se mi podařilo získat maximálně okolo 55,8 μg peptidů ve 100 μl roztoku.

Pro vyšší výtěžnost jsem se rozhodla využít Sep-Pak cartridge dle práce (Guo a Kristal, 2012), která porovnává různé komerčně přístupné SPE sorbenty. Výrobci často doporučují kapacity, které neodpovídají realitě. Práce porovnává několik různých SPE sorbentů. Výstupem práce je, že dostupné Sep-Pak C18 sorbenty zadržují lépe hydrofobnější peptidy, které bývají delší a často poskytují lepší informaci o proteinové sekvenci. Rozhodli jsme se tedy využít tuto Cartridge, čímž se nám postupnou optimalizací povedlo zvýšit výtěžek na trojnásobek. Zvýšením množství nanášeného vzorku se povedlo zvýšit také intenzitu peptidů v hmotnostním spektru. Z původních intenzit pohybujících se v hodnotách 10^3 se intenzita zvedla až na 10^8 .

Dalším krokem bylo zařazení nové kolony Kinetex o vnitřním průměru 1 mm, na kterou jsem aplikovala průtoky typické pro mikroLC-MS. Tímto krokem se podařilo zvýšit citlivost analýzy na dvojnásobek a mohla jsem přistoupit k cílené analýze.

Práce (MacLean et al. 2010) ukazuje, že optimální kolizní energie (CE) má vliv na kvalitu výsledku experimentu. Z tohoto důvodu jsem pro vylepšení intenzity při cílené MS analýze provedla její optimalizaci. Po přeměření vzorku s nastavením standardní CE jsem, dle programu Skyline, provedla měření s hodnotou -5 eV a $+5$ eV. Lepšího výsledku bylo dosaženo s hodnotou $+5$ eV a proto s ní bylo pokračováno i v dalších experimentech.

Postupnými kroky se mi podařilo dosáhnout uspokojivé intenzity i ve velmi nízkých koncentracích (až necelé $3 \cdot 10^5$ v koncentraci $0,01$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Problémem však bylo, že retenční časy jednotlivých peptidů se vzájemně lišily napříč každým měřením. Dále také některé peptidy eluovaly příliš v mrtvém čase. Další kroky by tudíž měly vést k další optimalizaci chromatografické separace. Například změna složení mobilní fáze, úprava jejího gradientu nebo použití jiné chromatografické kolony, by mohlo vést ke spolehlivějším výsledkům. Dalším experimentům s cílem vylepšení dosavadní metody se budu věnovat v diplomové práci.

7 ZÁVĚR

Původním cílem práce byla optimalizace proteomického protokolu vytvořeného Mgr. Klárou Brožovou. Optimalizaci jsem prováděla na Orbitrapu Exploris. Z technických a kapacitních důvodů jsem tento experiment přerušila a začala nově na hmotnostním spektrometru TripleTOF. Z důvodu odlišného přístrojového nastavení jsem následně začala vyvíjet metodu pro mikroprůtokovou LC-MS, která není pro proteomické analýzy zcela typická. Při analýze vyššího množství vzorku však poskytuje robustní a spolehlivé výsledky vyšší úrovně, než nabízí nanoprůtoková LC-MS.

Po změně přístroje klesla hodnota intenzity peptidů ve vzorku digestu proteinu BSA 1000x. Po optimalizaci přečištění, chromatografické separace a aplikováním různých nastavení hmotnostního spektrometru, se mi podařilo vrátit na původní hodnoty intenzity. Po proměření koncentrační řady cílenou analýzou s množstvím nanášeného vzorku 1 μg se mi podařilo získat intenzitu 3×10^7 v koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a až necelé $3 \cdot 10^5$ v koncentraci 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Další kroky mé práce by směřovaly k optimalizaci retenčních časů, které se nepodařilo ustálit, a to například změnou složení mobilní fáze. To však bude, z kapacitních a časových důvodů, cílem budoucího výzkumu.

8 LITERATURA

ABRAHAM, Michael H., 2004. 100 years of chromatography—or is it 171? *Journal of Chromatography A* [online]. **1061**(1), 113–114. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2004.10.060

AEBERSOLD, Ruedi a Matthias MANN, 2003. Mass spectrometry-based proteomics [online]. **422**, 198–207. Dostupné z: doi:10.1038/nature01511

AEBERSOLD, Ruedi a Matthias MANN, 2016. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* [online]. **537**(7620), 347–355. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature19949

ANDERSON, N. Leigh a Norman G. ANDERSON, 1998. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* [online]. **19**(11), 1853–1861. ISSN 0173-0835, 1522-2683. Dostupné z: doi:10.1002/elps.1150191103

ATHONVARANGKUL, Diana a Karl INSOGNA, 2021. New Therapies for Hypophosphatemia-Related to FGF23 Excess. *Calcified Tissue International* [online]. **108**. Dostupné z: doi:10.1007/s00223-020-00705-3

BAI, Xiuying, Dengshun MIAO, Jiarong LI, David GOLTZMAN a Andrew C. KARAPLIS, 2004. Transgenic Mice Overexpressing Human Fibroblast Growth Factor 23 (R176Q) Delineate a Putative Role for Parathyroid Hormone in Renal Phosphate Wasting Disorders. *Endocrinology* [online]. **145**(11), 5269–5279. ISSN 0013-7227, 1945-7170. Dostupné z: doi:10.1210/en.2004-0233

BÄR, Ludmilla, Christos STOURNARAS, Florian LANG a Michael FÖLLER, 2019. Regulation of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in health and disease. *FEBS Letters* [online]. **593**(15), 1879–1900. ISSN 1873-3468. Dostupné z: doi:10.1002/1873-3468.13494

BIAN, Yangyang, Chunli GAO a Bernhard KUSTER, 2022. On the potential of micro-flow LC-MS/MS in proteomics [online]. **19**(3), 153–164. ISSN 1478-9450. Dostupné z: doi:0.1080/14789450.2022.2134780

BIAN, Yangyang, Runsheng ZHENG, Florian P. BAYER, Cassandra WONG, Yun-Chien CHANG, Chen MENG, Daniel P. ZOLG, Maria REINECKE, Jana ZECHA, Svenja WIECHMANN, Stephanie HEINZLMEIR, Johannes SCHERR, Bernhard HEMMER, Mike

BAYNHAM, Anne-Claude GINGRAS, Oleksandr BOYCHENKO a Bernhard KUSTER, 2020. Robust, reproducible and quantitative analysis of thousands of proteomes by micro-flow LC–MS/MS. *Nature Communications* [online]. **11**(1), 157. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-13973-x

BORRÀS, Eva a Eduard SABIDÓ, 2017. What is targeted proteomics? A concise revision of targeted acquisition and targeted data analysis in mass spectrometry. *PROTEOMICS* [online]. **17**(17–18), 1700180. ISSN 1615-9861. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.201700180

BRANDI, Maria Luisa, Gavin P. R. CLUNIE, Pascal HOUILLIER, Suzanne M. JAN DE BEUR, Salvatore MINISOLA, Ralf OHEIM a Lothar SEEFRIED, 2021. Challenges in the management of tumor-induced osteomalacia (TIO). *Bone* [online]. **152**, 116064. ISSN 8756-3282. Dostupné z: doi:10.1016/j.bone.2021.116064

COSKUN, Ozlem, 2016. Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *Northern Clinics of Istanbul* [online]. 156–160. ISSN 21484902. Dostupné z: doi:10.14744/nci.2016.32757

CZAPLICKI, Sylwester, 2013. Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. In: [online]. s. 99–122. ISBN 978-953-51-1074-3. Dostupné z: doi:10.5772/55620

ČAMBOROVÁ, Petra, 2020. Hypofosfatemická křivice vázaná na X-chromozom. Příběh Tomáše. In: *SBORNÍK KAZUISTIK PACIENTŮ S X-VÁZANOU HYPOFOSFATEMICKOU KŘIVICÍ*. B.m.: SOLEN MEDICAL EDUCATION, s. 7–10. ISBN 978-80-7471-322-4.

ČÁSLAVSKÝ, Josek, Jiří G. K. ŠEVČÍK a KOLEKTIV, 2022. Kapalinová chromatografie. In: *Organická analýza*. 1. Český Těšín: Ing. Václav Helán. ISBN 978-80-88279-17-4.

DAVID, Valentin, Aline MARTIN, Tamara ISAKOVA, Christina SPAULDING, Lixin QI, Veronica RAMIREZ, Kimberly B. ZUMBRENNEN-BULLOUGH, Chia Chi SUN, Herbert Y. LIN, Jodie L. BABITT a Myles WOLF, 2016. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney International* [online]. **89**(1), 135–146. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1038/ki.2015.290

FENN, John B., Matthias MANN, Chin Kai MENG, Shek Fu WONG a Craig M. WHITEHOUSE, 1989. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* [online]. **246**(4926), 64–71. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.2675315

FERREIRO-VERA, C., J.M. MATA-GRANADOS, F. PRIEGO-CAPOTE a M.D. LUQUE DE CASTRO, 2011. Automated method for targeting analysis of prostanoids in human serum by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry in selected reaction monitoring. *Journal of Chromatography A* [online]. **1218**(20), 2848–2855. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.03.049

FRIEDECKÝ, David a Karel LEMR, 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. **20**(41), 152–157. ISSN 1210-7921.

GLATTER, Timo, Christina LUDWIG, Erik AHRNÉ, Ruedi AEBERSOLD, Albert J. R. HECK a Alexander SCHMIDT, 2012. Large-Scale Quantitative Assessment of Different In-Solution Protein Digestion Protocols Reveals Superior Cleavage Efficiency of Tandem Lys-C/Trypsin Proteolysis over Trypsin Digestion. *Journal of Proteome Research* [online]. **11**(11), 5145–5156. ISSN 1535-3893, 1535-3907. Dostupné z: doi:10.1021/pr300273g

GUO, Xiaofeng a Bruce S. KRISTAL, 2012. The use of underloaded C18 solid-phase extraction plates increases reproducibility of analysis of tryptic peptides from unfractionated human plasma. *Analytical Biochemistry* [online]. **426**(1), 86–90. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2012.04.003

HAVLÍČEK, Vladimír a František TUREČEK, 2020. Kvadrupólový analyzátor a iontové pasti. **114**(2), 106–112. ISSN 0009 - 2770.

HO, CS, CWK LAM, MHM CHAN, RCK CHEUNG, LK LAW, LCW LIT, KF NG, MWM SUEN a HL TAI, 2003. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **24**, 3–12.

HOFFMANN, Edmond de a Vincent STROOBANT, 2007. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: J. Wiley. ISBN 978-0-470-03310-4.

HU, Qizhi, Robert J. NOLL, Hongyan LI, Alexander MAKAROV, Mark HARDMAN a R. GRAHAM COOKS, 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. **40**(4), 430–443. ISSN 1096-9888. Dostupné z: doi:10.1002/jms.856

JONSSON, Kenneth B, Kenneth E WHITE, Takehisa YAMAMOTO, Östen LJUNGGREN, Akimitsu MIYAUCHI a Harald JÜPPNER, 2003. Fibroblast Growth Factor 23 in Oncogenic Osteomalacia and X-Linked Hypophosphatemia. *The New England Journal of Medicine*. 8.

JOSIC, Djuro a Spomenka KOVAC, 2010. Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography of Proteins. *Current Protocols in Protein Science* [online]. **61**(1) [vid. 2024-02-08]. ISSN 1934-3655, 1934-3663. Dostupné z: doi:10.1002/0471140864.ps0807s61

LARSEN, Martin R., Stuart J. CORDWELL a Peter ROEPSTORFF, 2002. Graphite powder as an alternative or supplement to reversed-phase material for desalting and concentration of peptide mixtures prior to matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. *PROTEOMICS* [online]. **2**(9), 1277–1287. ISSN 1615-9861. Dostupné z: doi:10.1002/1615-9861(200209)2:9<1277::AID-PROT1277>3.0.CO;2-P

LENČO, Juraj, Marie VAJRYCHOVÁ, Kristýna PIMKOVÁ, Magdaléna PROKŠOVÁ, Markéta BENKOVÁ, Jana KLIMENTOVÁ, Vojtěch TAMBOR a Ondřej SOUKUP, 2018. Conventional-Flow Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Exploratory Bottom-Up Proteomic Analyses. *Analytical Chemistry* [online]. **90**(8), 5381–5389. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.8b00525

MACKLIN, Andrew, Shahbaz KHAN a Thomas KISLINGER, 2020. Recent advances in mass spectrometry based clinical proteomics: applications to cancer research. *Clinical Proteomics* [online]. **17**(1), 17. ISSN 1542-6416, 1559-0275. Dostupné z: doi:10.1186/s12014-020-09283-w

MACLEAN, Brendan, Daniela M. TOMAZELA, Susan E. ABBATIELLO, Shucha ZHANG, Jeffrey R. WHITEAKER, Amanda G. PAULOVICH, Steven A. CARR a Michael J. MACCOSS, 2010. Effect of Collision Energy Optimization on the Measurement of Peptides by Selected Reaction Monitoring (SRM) Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. **82**(24), 10116–10124. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac102179j

MAIA, Teresa Mendes, An STAES, Kim PLASMAN, Jarne PAUWELS, Katie BOUCHER, Andrea ARGENTINI, Lennart MARTENS, Tony MONTOYE, Kris GEVAERT a Francis IMPENS, 2020. Simple Peptide Quantification Approach for MS-Based Proteomics Quality Control. *ACS Omega* [online]. **5**(12), 6754–6762. ISSN 2470-1343, 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.0c00080

MAIER-ROSENKRANZ, Jürgen, 2004. Micro- and Nano-LC. In: *More Practical Problem Solving in HPLC* [online]. s. 213–228. ISBN 978-3-527-61230-7. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9783527612307.ch2a>

MANDEL, Friedrich, 2004. LC-MS Coupling LC-MS – The one and only universal tool? In: *More Practical Problem Solving in HPLC* [online]. s. 187–212. ISBN 978-3-527-31113-2. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9783527612307.ch2a>

MARTIN, Aline, Valentin DAVID a L. Darryl QUARLES, 2012. REGULATION AND FUNCTION OF THE FGF23/KLOTHO ENDOCRINE PATHWAYS. *Physiological reviews* [online]. **92**(1), 131–155. ISSN 0031-9333. Dostupné z: [doi:10.1152/physrev.00002.2011](https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2011)

MENDES, Marta a Gunnar DITTMAR, 2022. Targeted proteomics on its way to discovery [online]. **22**. ISSN 1615-9853. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pmic.202100330>

NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA, Petr ČESLA a KOLEKTIV, 2021. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. 2*. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek. ISBN 978-80-270-8559-0.

OPEKAR, František, Ivan JELÍNEK, Petr RYCHLOVSKÝ a Zbyněk PLZÁK, 2003. Kvalitativní analytická chemie. In: *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. Praha: Nakladatelství Karolinum, Praha, 1, Ovocný trh 3, s. 29–42. ISBN 80-246-0553-8.

PAUL, Wolfgang, 1990. Electromagnetic traps for charged and neutral particles. *Reviews of Modern Physics* [online]. **62**(3), 531–540. ISSN 0034-6861, 1539-0756. Dostupné z: [doi:10.1103/RevModPhys.62.531](https://doi.org/10.1103/RevModPhys.62.531)

PRIÉ, Dominique a Gérard FRIEDLANDER, 2010. Reciprocal Control of 1,25-Dihydroxyvitamin D and FGF23 Formation Involving the FGF23/Klotho System. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* [online]. **5**(9), 1717–1722. ISSN 1555-9041, 1555-905X. Dostupné z: [doi:10.2215/CJN.02680310](https://doi.org/10.2215/CJN.02680310)

QADEER, Hafiza A. a Khalid BASHIR, 2023. Physiology, Phosphate. In: *StatPearls [Internet]* [online]. B.m.: StatPearls Publishing [vid. 2023-11-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560925/>

RAPPSILBER, Juri, Yasushi ISHIHAMA a Matthias MANN, 2003. Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. *Analytical Chemistry* [online]. **75**(3), 663–670. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac026117i

RAPPSILBER, Juri, Matthias MANN a Yasushi ISHIHAMA, 2007. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols* [online]. **2**(8), 1896–1906. ISSN 1754-2189, 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2007.261

RHEE, Yumie, Nicoletta BIVI, Emily FARROW, Virginia LEZCANO, Lilian I. PLOTKIN, Kenneth E. WHITE a Teresita BELLIDO, 2011. Parathyroid hormone receptor signaling in osteocytes increases the expression of fibroblast growth factor-23 in vitro and in vivo. *Bone* [online]. **49**(4), 636–643. ISSN 87563282. Dostupné z: doi:10.1016/j.bone.2011.06.025

SAMADFAM, Rana, Christian RICHARD, Loan NGUYEN-YAMAMOTO, Isabel BOLIVAR a David GOLTZMAN, 2009. Bone Formation Regulates Circulating Concentrations of Fibroblast Growth Factor 23. *Endocrinology* [online]. **150**(11), 4835–4845. ISSN 0013-7227, 1945-7170. Dostupné z: doi:10.1210/en.2009-0472

SHAABAN, Heba a Tadeusz GÓRECKI, 2015. Current trends in green liquid chromatography for the analysis of pharmaceutically active compounds in the environmental water compartments. *Talanta* [online]. **132**, 739–752. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2014.09.050

SHI, Tujin, Ehwang SONG, Song NIE, Karin D. RODLAND, Tao LIU, Wei-Jun QIAN a Richard D. SMITH, 2016. Advances in targeted proteomics and applications to biomedical research. *PROTEOMICS* [online]. **16**(15–16), 2160–2182. ISSN 1615-9861. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.201500449

SHIMADA, Takashi, Makoto KAKITANI, Yuji YAMAZAKI, Hisashi HASEGAWA, Yasuhiro TAKEUCHI, Toshiro FUJITA, Seiji FUKUMOTO, Kazuma TOMIZUKA a Takeyoshi YAMASHITA, 2004. *Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism* [online]. B.m.: American Society for Clinical Investigation [vid. 2023-11-25]. Dostupné z: doi:10.1172/JCI19081

SIMIC, Petra a Jodie L BABITT, 2021. Regulation of FGF23: Beyond Bone. *Current Osteoporosis Reports* [online]. **19**(6), 563–573. ISSN 1544-1873, 1544-2241. Dostupné z: doi:10.1007/s11914-021-00703-w

SKOOG, Douglas A., F. James HOLLER, Stanley R. CROUCH a Donald M. WEST, 2021. High-Performance Liquid Chromatography. In: *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 10. Boston, USA: Cengage, s. 886–907. ISBN 978-0-357-45039-0.

SMITH, P.K., R.I. KROHN, G.T. HERMANSON, A.K. MALLIA, F.H. GARTNER, M.D. PROVENZANO, E.K. FUJIMOTO, N.M. GOEKE, B.J. OLSON a D.C. KLENK, 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* [online]. **150**(1), 76–85. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7

SOBSEY, Constance A., Sahar IBRAHIM, Vincent R. RICHARD, Vanessa GASPAR, Georgia MITSA, Vincent LACASSE, René P. ZAHEDI, Gerald BATIST a Christoph H. BORCHERS, 2020. Targeted and Untargeted Proteomics Approaches in Biomarker Development. *PROTEOMICS* [online]. **20**(9), 1900029. ISSN 1615-9861. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.201900029

STEINER, Frank, Carsten PAUL a Michael DONG, 2019. HPLC Autosamplers: Perspectives, Principles, and Practices. **37**(8), 514–529.

STEJSKAL, Karel, Jeff OP DE BEECK, Gerhard DÜRNBERGER, Paul JACOBS a Karl MECHTLER, 2021. Ultrasensitive NanoLC-MS of Subnanogram Protein Samples Using Second Generation Micropillar Array LC Technology with Orbitrap Exploris 480 and FAIMS PRO. *Analytical Chemistry* [online]. **93**(25), 8704–8710. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.1c00990

VOLNÝ, Michael, 2020. HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTOR DOBY LETU. **114**(2), 113–118. ISSN 0009 - 2770.

WALLACE, Daniel F, 2016. The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. **37**(2), 57–62.

WIŚNIEWSKI, Jacek R. a Matthias MANN, 2012. Consecutive Proteolytic Digestion in an Enzyme Reactor Increases Depth of Proteomic and Phosphoproteomic Analysis. *Analytical Chemistry* [online]. **84**(6), 2631–2637. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac300006b

YUN, Ye-Rang, Jong Eun WON, Eunyi JEON, Sujin LEE, Wonmo KANG, Hyejin JO, Jun-Hyeog JANG, Ueon Sang SHIN a Hae-Won KIM, 2010. Fibroblast Growth Factors: Biology, Function, and Application for Tissue Regeneration. *Journal of Tissue Engineering* [online]. **1**(1), 218142. ISSN 2041-7314, 2041-7314. Dostupné z: doi:10.4061/2010/218142

ZUBAREV, Roman A. a Alexander MAKAROV, 2013. Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. **85**(11), 5288–5296. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac4001223

ŽUVELA, Petar, Magdalena SKOCZYLAS, J. JAY LIU, Tomasz BĄCZEK, Roman KALISZAN, Ming Wah WONG a Bogusław BUSZEWSKI, 2019. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Reviews* [online]. **119**(6), 3674–3729. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.8b00246