

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Intracelulární nukleotidy v analýze metabolomu

Diplomová práce

Jitka Prachařová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím literatury citované v závěru.

V Olomouci dne 10. 5. 2010

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce doc. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. za umožnění práce na zajímavém tématu, odborné vedení a vstřícný přístup, Mgr. Haně Krätschmerové, Mgr. Lence Žídkové a Mgr. Emě Ruzové za cenné rady a připomínky a v neposlední řadě také RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. za pomoc při plnění zadaného úkolu. Dále také děkuji všem pracovníkům a studentům Laboratoře dědičných metabolických poruch Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice v Olomouci za jejich obětavost a trpělivost.

Souhrn

Metabolomika je moderní vědní disciplína zabývající se identifikací a kvantifikací metabolitů. Metabolomické analýze musí předcházet vhodné sklizení buněčné populace a okamžité zastavení metabolické aktivity. V rámci praktické části této diplomové práce byly analyzovány nukleotidy dvěma metodami – kapilární elektroforézou (CE) a ultraúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC/MS/MS). Pomocí CE byl testován vliv sklizení buněk (lidské kožní fibroblasty) trypsinizací a methanolovým quenchingem na obsah intracelulárních nukleotidů. Bylo zjištěno, že rozptyl hodnot u quenchovaných vzorků je mnohem menší než v případě trypsinizace.

Dále byla vyvíjena metoda pro analýzu nukleotidů pomocí UHPLC/MS/MS. Optimalizovaná metoda byla poté aplikována na reálné vzorky – extrakty fibroblastů a erytrocytů.

Klíčová slova: metabolomika, quenching, lidské kožní fibroblasty, nukleotidy

Summary

Metabolomics is a modern science interested in identification and quantification of metabolites. Metabolome analysis is preceded by cell population harvesting and immediate quenching of metabolic activity. The practical part of this diploma thesis deals with two methods of nucleotide analysis – capillary electrophoresis (CE) and ultra high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UHPLC/MS/MS). The influence of cell (human skin fibroblasts) harvesting by trypsinisation and methanol quenching on the content of intracellular nucleotides was tested by means of CE. Quenching was found to result in a smaller variability of values than trypsinisation.

Moreover, this thesis discusses an UHPLC/MS/MS method optimisation for nucleotide analysis. The optimised method was consequently applied to real samples – extracts of human fibroblasts and erythrocytes.

Key words: metabolomics, quenching, human skin fibroblasts, nucleotides

OBSAH:

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	10
2.1	METABOLOMIKA	10
2.1.1	Historie metabolomiky	10
2.1.2	Metabolom	11
2.1.3	Metabolomické přístupy.....	12
2.1.4	Biologický materiál pro metabolomickou analýzu.....	13
2.1.5	Příprava vzorků pro metabolomiku	15
2.1.6	Analytické techniky v metabolomice	17
2.1.7	Zpracování dat pro metabolomiku.....	25
2.1.8	Praktické aplikace metabolomiky.....	26
2.2	LIDSKÉ KOŽNÍ FIBROBLASTY	28
2.2.1	Charakteristika	28
2.2.2	Funkce	29
2.2.3	Využití.....	30
3	CÍLE PRÁCE.....	31
4	MATERIÁL A METODIKA.....	32
4.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	32
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	32
4.3	POUŽITÉ ROZTOKY.....	33
4.4	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A DALŠÍ POMŮCKY	35
4.5	PŘÍPRAVA KOŽNÍCH FIBROBLASTŮ	35
4.5.1	Kultivace	35
4.5.2	Sklizení.....	36
4.5.3	Extrakce.....	37
4.6	PŘÍPRAVA ERYTROCYTŮ.....	37
4.7	ANALÝZA NUKLEOTIDŮ POMOCÍ CE	38
4.7.1	Analýza směsi standardů	38
4.7.2	Analýza quenchovaných a trypsinizovaných vzorků	38
4.8	ANALÝZA NUKLEOTIDŮ POMOCÍ UHPLC/MS/MS	38
4.8.1	Příprava nukleotidových standardů	38
4.8.2	Optimalizace podmínek MS/MS	39
4.8.3	Optimalizace podmínek UHPLC.....	39
4.8.4	Analýza směsi standardů	39
4.8.5	Analýza reálných vzorků fibroblastů a erytrocytů.....	40

5	VÝSLEDKY	41
5.1	ANALÝZA NUKLEOTIDŮ POMOCÍ CE	41
5.2	ANALÝZA NUKLEOTIDŮ POMOCÍ UHPLC/MS/MS	46
5.2.1	Optimalizace podmínek MS/MS	46
5.2.2	Optimalizace podmínek UHPLC.....	50
5.2.3	Analýza směsi standardů	51
5.2.4	Analýza reálných vzorků.....	57
6	DISKUZE	61
6.1	SROVNÁNÍ METOD QUENCHINGU A TRYPSINIZACE	61
6.2	ANALÝZA NUKLEOTIDŮ POMOCÍ UHPLC/MS/MS	62
7	ZÁVĚR	63
8	LITERATURA	64
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	70

1 ÚVOD

Metabolomika je definována jako všeobecná, přesná a vysoce účinná analýza směsi metabolitů určitého organismu (Fiehn, 2002; Hall *et al.*, 2002; Oldiges *et al.*, 2007; Villas-Bôas *et al.*, 2005). Na rozdíl od ostatních „omických“ disciplín se metabolomický výzkum zabývá mnohem širším spektrem látek, které jsou produkty regulačních procesů (Fiehn, 2002). Materiálem pro metabolomickou analýzu mohou být vzorky mikroorganismů, rostlin a hub nebo živočichů (Dettmer *et Hammock*, 2004).

Informace o metabolitech určitého organismu jsou nezbytné nejen pro popis a monitoring biochemických drah a výzkum biologických účinků, ale i ke studiu změn fenotypu a porozumění jeho interakcím s genotypem (Dettmer *et al.*, 2007, Oldiges *et al.*, 2007). Metabolomická analýza je také hodnotným nástrojem lékařské vědy. Umožňuje diagnostiku onemocnění, pozorování jeho průběhu a odezvy na terapii. Poznatky získané sledováním metabolických procesů u zdravých a nemocných jedinců pomáhají k identifikaci markerů onemocnění v raném stádiu, což může mít velký vliv na úspěšnost léčby (Issaq *et al.*, 2009). Kromě lékařství se metabolomické studie uplatňují v mnoha dalších odvětvích, jako je funkční genomika, biotechnologie, toxikologie a ekologie.

Stálé zdokonalování metabolomiky je umožněno zejména vývojem v oblasti analytických technik. K analýzám složitých směsí metabolitů velmi často slouží chromatografické a elektromigrační techniky, jako je plynová chromatografie (gas chromatography, GC), kapalinová chromatografie (liquid chromatography, LC), kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis, CE), a spektrální techniky, mezi které řadíme např. hmotnostní spektrometrii (mass spectrometry, MS) a nukleární magnetickou rezonanci (nuclear magnetic resonance, NMR). Přesnou metabolomickou analýzu pak umožňují jejich různé kombinace.

Hlavním předpokladem pro úspěšné studium metabolických reakcí a jejich regulačních vlivů je získání přesných koncentračních hladin metabolitů. Kvalita a množství těchto látek bývají ovlivňovány již při přípravě vzorků. Složení buněčného metabolomu a koncentrace jeho složek jsou velmi dynamické a mohou se měnit v časech kratších než jedna sekunda. Pro získání spolehlivých dat je tedy nutné velmi rychle zastavit metabolickou aktivitu. K tomuto účelu bylo vyvinuto mnoho postupů s použitím různých

chemikálií, ale žádná metodologie není bohužel zcela stoprocentní (Canelas *et al.*, 2008).

V experimentální části předkládané diplomové práce byly analyzovány nukleotidy dvěma metodami – kapilární elektroforézou a ultraúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (ultra high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, UHPLC/MS/MS). Pomocí CE byl porovnáván vliv sklizení buněk trypsinizací a methanolovým quenchingem na obsah intracelulárních nukleotidů. Jako biologický materiál byly použity lidské kožní fibroblasty (human skin fibroblasts, HSF).

Dále byla vyvíjena metoda pro analýzu nukleotidů rozpustných ve vodě pomocí UHPLC/MS/MS. Optimalizovaná metoda byla poté aplikována na reálné vzorky fibroblastů a erytrocytů.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Metabolomika

Metabolismus je buněčný regulační proces primárně vycházející z genových produktů, proteinů (Roberts, 2000). Jeho podstatu tvoří přeměna malých sloučenin na soubor jiných chemických sloučenin s nižším obsahem volné energie, což zahrnuje velký počet chemických reakcí s mnoha meziprodukty. Látky, které činností metabolismu vznikají, metabolity, lze považovat za odpovědi biologických systémů na genetické nebo environmentální změny. Odezvy na jeden stav pak mohou být zprostředkovány několika biochemickými drahami a metabolity domněle nesouvisejících sítí mohou být regulovány pleiotrofním efektem (Fiehn, 2002).

Metabolomika je poměrně novým a velmi dynamicky se rozvíjejícím oborem, který se zabývá identifikací a kvantifikací složek metabolomu určitého biologického systému (Fiehn, 2002; Hall *et al.*, 2002; Oldiges *et al.*, 2007; Villas-Bôas *et al.*, 2005). Jde o velmi komplexní a různorodou disciplínu s plně integrovanými strategiemi pro optimální získávání vzorků, separaci, detekci a identifikaci metabolitů a také pro shromažďování, úpravu a analýzu dat. Její nedílnou součástí tvoří též analytické a matematicko-statistické nástroje (Hall *et al.*, 2002). Správný metabolomický výzkum musí zahrnovat strategii k identifikaci neznámých metabolitů a prostředky ke srovnání získaných výsledků s teoretickými modely (Fiehn, 2002).

2.1.1 Historie metabolomiky

Nástupu metabolomiky jako vědního oboru předcházelo zdokonalení chromatografických metod spojením s vysoce citlivými detektory. Na konci šedesátých let dvacátého století došlo k výraznému rozvoji hmotnostní spektrometrie a v kombinaci s plynovou chromatografií se stala důležitým nástrojem pro identifikaci a kvantifikaci organických kyselin, cukrů, aminokyselin a mnoha dalších látek (Fiehn, 2002).

Fiehn (2002) formuloval první přesnější definici, podle které je metabolomika všeobecným a přesným vědním oborem, využívajícím analytické nástroje ke studiu metabolitů určitého biologického systému.

V dubnu roku 2002 se v Nizozemí konal The First International Congress on Plant Metabolomics. Jeho hlavním cílem bylo shromáždit odborníky, kteří se angažují v oblasti metabolomiky, a prodiskutovat nové strategie a další vývoj v této oblasti vědy (Hall *et al.*, 2002).

V roce 2004 byla založena nezávislá a nezisková organizace Metabolomics Society, která usiluje o rozvoj metabolomiky a shromažďování a propojení jejích poznatků s genomickými a proteomickými daty. V současné době má přes pět set členů z více než dvaceti zemí světa a vydává vlastní časopis s názvem Metabolomics, který vychází každé tři až čtyři měsíce (převzato z: <http://www.metabolomicssociety.org>, citováno dne 15. 2. 2010).

2.1.2 Metabolom

Metabolom je definován jako kvalitativní a kvantitativní soubor všech nízkomolekulárních látek (metabolitů), které se nacházejí v buňce, účastní se hlavních metabolických reakcí a jsou nezbytné pro udržování aktivity, růst a normální fungování buňky (Dunn *et al.*, 2005). Metabolom hraje důležitou roli při kontrole buněčných funkcí a regulaci metabolických sítí (Oldiges *et al.*, 2007). Je reprezentován mnoha skupinami látek, které se liší chemickými a fyzikálními vlastnostmi (Tab. I). Všeobecný výzkum je komplikován jeho enormní složitostí a dynamičností (Dettmer *et al.*, 2007; Issaq *et al.*, 2009).

Charakterizovat lze mikrobiální, rostlinný a živočišný metabolom, přičemž rozlišujeme endometabolom (úplný soubor intracelulárních metabolitů) a exometabolom (soubor metabolitů vylučovaných do růstového média nebo extracelulární tekutiny). Charakteristika těchto dvou pojmů je důležitá, protože exometabolom má často velmi odlišnou fyziologickou úlohu než endometabolom (Pilátová, 2008).

Velikost metabolomu je u různých biologických systémů velmi rozmanitá a závisí na konkrétních vlastnostech organismu (Dettmer *et al.*, 2007; Issaq *et al.*, 2009). Bylo

zjištěno, že celá rostlinná říše je schopna produkovat dvě sta až čtyři sta tisíc metabolitů, a podle odhadů vědců je lidský metabolom ještě mnohem větší. Počet metabolitů v buňce je řádově menší než počet genů nebo proteinů (bakterie *Escherichia coli* K12 obsahuje 4 392 genů, 4 464 proteinů a produkuje pouze 796 metabolitů; Harrigan *et Goodacre*, 2003).

Tab. I: Klasifikace metabolitů podle chemické struktury (převzato z: Pilátová, 2008)

Chemická třída	Typické příklady
Aminokyseliny, aminy	L-glutamát, L-aspartát
Karboxylové kyseliny	kyselina pyrohroznová, kyselina 2-oxoglutarová
Alkoholy	glycerol
Aldehydy	acetaldehyd, formaldehyd
Fosfátové estery, nukleotidy	D-glukosa-1-fosfát, adenosintrifosfát
Sacharidy	D-glukosa, D-fruktosa
Lipidy, steroidy a mastné kyseliny	estron, cholesterol
Vitaminy a koenzymy	β -nikotinamidadeninukleotid
Anorganické ionty	fosforečnany, dusitany

2.1.3 Metabolomické přístupy

Protože identifikace a kvantifikace všech složek metabolomu jsou po časové i finanční stránce velmi náročné, provádějí se běžně především cílené analýzy, zabývající se pouze látkami určitých metabolických reakcí. Metabolomický výzkum používá několik hlavních přístupů – přímou analýzu, metabolické profilování, metabolický fingerprinting a footprinting a metabonomiku (Dettmer *et Hammock*, 2004).

Studiem přímého vlivu hlavních efektů na genetické změny se zabývá přímá analýza. Tento postup může být omezen na substrát nebo na přímý produkt odpovídajícího kódujícího proteinu (Oldiges *et al.*, 2007). Přímá analýza se používá převážně pro screeningové účely a pro analýzy vyžadující extrémní citlivost (Fiehn, 2002).

Metabolické profilování je zaměřeno na identifikaci a kvantitativní analýzu předem definovaných skupin metabolitů určitých biochemických drah nebo tříd specifických komponent, jako je analýza aminokyselin nebo cílená specifikace vybraných látek např. biomarkerů onemocnění, toxických agens nebo substrátů a produktů enzymových reakcí

(Fiehn, 2002; Dettmer *et al.*, 2007; Oldiges *et al.*, 2007). Velký význam má ve farmacii, kde se používá k pozorování katabolismu léků a drog (Hall *et al.*, 2002).

Dalším přístupem je metabolický fingerprinting. Ten se nesnaží identifikovat každý nalezený metabolit, ale srovnává vzory – „fingerprinty“ látek, které se mění při výskytu nemocí či jako odezva na expozici toxinům nebo vlivem dalších environmentálních nebo genetických změn. Využívá především technik hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetické rezonance. Tento přístup se uplatňuje při screeningu vzorků v genomických programech, v biologickém výzkumu a v hojně míře také v diagnostice, kde díky němu lze srovnávat fingerprinty zdravých a nemocných pacientů (Fiehn, 2002).

Metabolický footprinting se zabývá analýzou pouze extracelulárních metabolitů (Dettmer *et al.*, 2007). Metabonomika využívá analýzy tkání a tekutin ke stanovení hladin endogenních metabolitů a uplatňuje se při studiu vlivu léčiv na organismus (Dunn *et al.*, 2005).

2.1.4 Biologický materiál pro metabolomickou analýzu

Materiálem pro metabolomickou analýzu mohou být vzorky mikroorganismů, rostlin a hub nebo živočichů (Roe *et al.*, 1999). Studium metabolomu lze provádět na úrovni jednotlivých buněk, tkání nebo dokonce celého organismu (Griffin *et al.*, 2007).

Mikroorganismy

Mikroorganismy jsou poměrně hojně využívány nejen v metabolomice, ale i v mnoha dalších oborech. Jejich metabolomická analýza je díky jednodušší struktuře a funkcím v porovnání s rostlinným a živočišným materiálem poměrně snadná. Bylo zjištěno, že množství metabolitů u již osekvenovaných mikroorganismů se pohybuje okolo několika set (580 – *Bacillus subtilis* a 800 – *Escherichia coli*; Hall *et al.*, 2002; Oldiges *et al.*, 2007). Výhodou těchto kultur je také jednoduchá manipulace a možnost kultivace v bioreaktorech, kde lze přesně nastavit a libovolně měnit optimální životní podmínky, jako je teplota, pH, složení média nebo obsah plynů (kyslík, oxid uhličitý). Kultivací mikroorganismů v bioreaktoru získáme velké množství biologického materiálu pro metabolomickou analýzu (Mashego *et al.*, 2007).

Poznatky získané charakterizací mikrobiálního metabolomu lze využít při zlepšování účinnosti biotechnologických procesů, v systematické biologii nebo v lékařství (Jewett *et al.*, 2006). Mezi běžně používané modelové organismy patří především bakterie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* a *Corynebacterium glutamicum* nebo kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Garcia *et al.*, 2008).

Rostliny

Rostliny jsou v metabolomice mnohem méně využívány než mikroorganismy nebo živočišný materiál, což je způsobeno především obsahem velkého množství sekundárních metabolitů, které komplikují studium rostlinného metabolomu (Kamleh *et al.*, 2009). Oproti mikroorganismům produkují rostliny desítky až stovky tisíc metabolitů. Tato diverzita pramení nejen z počtu genů (obvykle 20 000 až 50 000), ale také z různorodé substrátové specifity mnoha enzymů a buněčné kompartmentace. Funkce určité látky je často závislá na její lokalizaci v dané organelle (Oldiges *et al.*, 2007).

Analýza metabolitů produkovaných rostlinami poskytuje velké množství informací, které umožňují hlubší porozumění rostlinným biochemickým drahám a jejich vlivům na genetické změny a životní prostředí. Přiřazení specifických metabolomických dat k různým fenotypům poskytuje nové informace o fyziologii, rezistenci a biodiverzitě rostlin (Hall *et al.*, 2002).

Živočichové

Při práci s živočišným biologickým materiálem mohou být výsledky ovlivněny mnoha faktory, k nimž patří věk, pohlaví, dieta, stres, konzumace léků, genetický profil a v neposlední řadě také podmínky při odběru a zpracování vzorků (Dettmer *et al.*, 2007). Pro metabolomické studie se nejvíce používají vzorky krve a moči (Issaq *et al.*, 2009).

Pro úspěšnou analýzu živočišného materiálu je nutné dodržovat určitá pravidla. Moč by se měla při delším skladování uchovávat zamrazená při -80 °C po alikvotech ve sterilizovaných zkumavkách. Pokud bude následovat nukleární magnetická rezonance, je důležité se vyvarovat protektiv na bázi citrátu a kyseliny askorbové, protože mají výrazné

signály a mohou potlačovat látky s menší intenzitou.

Z krevních vzorků je v metabolomice nejčastěji analyzována plazma nebo sérum. Sérum je průzračná kapalina, která se separuje při srážení krve. Plazma se získává po přidavku antikoagulantů k odebrané krvi a po centrifugaci k odstranění buněčných komponent. Při nukleární magnetické rezonanci plazmy se jako antikoagulant používá Li-heparin, protože ostatní běžně zavedené látky (ethylendiamintetraoctová kyselina – EDTA, citronan sodný) mohou rušit NMR spektra (Issaq *et al.*, 2009).

Pro studium metabolomu bývají využívány také buněčné linie, které se kultivují za předem stanovených podmínek a v přesně definovaném prostředí za účelem minimálního ovlivnění extracelulárními vlivy (Roe *et al.*, 1999). Získání spolehlivých dat pro metabolomickou analýzu intracelulárního obsahu však vyžaduje vhodnou kultivační techniku (Munger *et al.*, 2006).

Kromě buněk je v metabolomice možné pracovat také přímo se zvířecími modely, čehož se využívá zejména při výzkumu nádorových onemocnění prsu, mozku, jater a prostaty. Metabolické profily nádorových buněk a tkání získaných biopsií mohou poskytnout informace o růstovém charakteru nádorů a procesech výměny látek mezi tumorovou tkání a okolním prostředím. Tyto poznatky jsou hodnotným nástrojem pro vytváření nových hypotéz o tumorogenezi a umožňují zlepšení diagnostiky u postižených jedinců. Pro tento účel byly vyvinuty zejména linie geneticky modifikovaných myší s různými metabolickými odchylkami. Při výzkumu zvířecích modelů nejen v metabolomice, ale i v obecném měřítku je nutné brát v úvahu etické hledisko a především se snažit o redukci počtu zvířat potřebných ke studiu (Griffin *et al.*, 2007).

2.1.5 Příprava vzorků pro metabolomiku

Metabolomika má přesné nároky na přípravu a následnou analýzu vzorků (Dettmer *et al.*, 2007; Issaq *et al.*, 2009). Výběr vhodných technik závisí především na druhu biologického materiálu a samozřejmě také na tom, které metabolity chceme studovat. Metabolický profil může být ovlivněn podmínkami při odběru vzorků (např. stres při odběru krve zvýší hladinu katecholaminů), jejich transportem, skladováním a úpravou před vlastní analýzou (Issaq *et al.*, 2009). Různé změny nebo degradace metabolitů bývají způsobeny vlivem enzymové aktivity nebo oxidačních procesů (Dettmer *et al.*, 2007).

Prvním krokem metabolomické analýzy bývá okamžité zastavení (zhášení, quenching) metabolismu (Oldiges *et al.*, 2007). Pro zachování dobré kvality a reálného množství metabolitů je velmi důležitá rychlost quenchingu, protože metabolické procesy se mění řádově v časech kratších než jedna sekunda (Dunn *et Ellis*, 2005). Zastavení biochemických procesů se obvykle provádí prudkou změnou teploty (působení horkých nebo ledových roztoků, dusík) nebo pH (Dettmer *et al.*, 2007; Fiehn, 2002). Velmi častou metodou je také vystavení biologického materiálu prostředí polárních (roztok methanol/voda) nebo málo polárních (chloroform) solventů (Dunn *et Ellis*, 2005). Každý z těchto postupů přináší určitá negativa. Prudká změna teploty může u buněk vyvolat vylučování metabolitů do extracelulárního prostředí. Při použití kapalného dusíku je nutné dbát na to, aby nedocházelo k částečnému tání materiálu před extrakcí metabolitů. Kyselé působení může způsobit degradaci nestabilních metabolitů nebo ovlivnit výsledky následných analýz (Fiehn, 2002).

Velmi často používaná quenchovací metoda je založena na aplikaci ledového vodného roztoku methanolu různých koncentrací. Bylo zjištěno, že quenching tímto činidlem může vést k vylučování metabolitů do média. Tento fenomén byl potvrzen u *Corynebacterium glutamicum*, kde během aplikace methanolového quenchingu docházelo k exkreci více než 90 % glutamátu a glutaminu. Při použití nižších koncentrací methanolu v quenchovacím činidle se ztráty metabolitů zmenšily, ale stále dosahovaly více než 30 %. Z této studie lze usuzovat, že quenching ledovým methanolem není vhodnou metodou pro sklizení buněk u *Corynebacterium glutamicum* (Wittmann *et al.*, 2004).

V další práci byl methanolový quenching aplikován na *Saccharomyces cerevisiae* a byl zjištěn negativní vliv chladového šoku (Hans *et al.*, 2001; Wittmann *et al.*, 2004). Během quenchingu docházelo ke změnám buněčné integrity a tím i ke ztrátám intracelulárních metabolitů. Dále bylo zjištěno, že tuto metodu zhášení není obecně vhodné použít u gramnegativních (*Escherichia coli*) nebo grampozitivních (*Bacillus subtilis*) bakterií, protože tyto organismy jsou citlivé na chladový šok (Leder, 1972; Wittmann *et al.*, 2004). Tento fenomén je méně častý u kvasinek a hub (Canelas *et al.*, 2008). Výzkumy v oblasti vlivu ledového methanolového quenchingu na koncentrace intracelulárních metabolitů nejsou stále ještě zcela jednoznačné (Wittmann *et al.*, 2004).

Po zastavení biochemických reakcí následuje extrakce metabolitů. Při analýze endometabolomu je nejprve nutné vhodným způsobem rozrušit povrch buňky. Postup závisí na množství analyzovaných vzorků a na typu tkáně nebo rostlinného pletiva. Běžně se k tomuto účelu používají vhodné enzymy, homogenizace v tekutém dusíku, rozemletí zmrazených vzorků, ultrazvuk nebo mikrovlny. Vlastní extrakce je pak provedena působením vhodného organického rozpouštědla, které volíme podle vlastností stanovovaných látek. Mezi nejčastější extrakční činidla patří polární organická rozpouštědla jako ethanol, methanol nebo málo polární činidla jako chloroform (Fiehn, 2002).

Někdy je potřeba vzorek před vlastní metabolomickou analýzou zakonzentrovat, což se provádí lyofilizací nebo extrakcí na pevné fázi. Získaný extrakt lze ihned použít pro analýzu nebo jej uchovat při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tání však může ovlivnit stabilitu a složení vzorku, proto je lepší materiál před uchováním lyofilizovat (Dettmer *et al.*, 2007).

Posledním krokem je vlastní metabolomická analýza získaných vzorků, která se provádí pomocí širokého spektra separačních a detekčních technik a jejich kombinací. Identifikace celého metabolomu během jediné analýzy je však díky rozmanitosti jeho složek prakticky nemožná.

2.1.6 Analytické techniky v metabolomice

Studium metabolomu je jedním z úkolů analytické chemie a zahrnuje identifikaci, kvalitativní a kvantitativní analýzu metabolitů studovaného biologického vzorku (Dettmer *et al.*, 2007). Metoda metabolomické analýzy musí být dostatečně citlivá, selektivní, a pokud je to možné, i univerzálně aplikovatelná (Fiehn, 2002). Její volba závisí na druhu biologického materiálu, typu jeho zpracování a samozřejmě také na dostupnosti zvolené analýzy (Issaq *et al.*, 2009). Trendem současné doby jsou vysoce selektivní a citlivé postupy, které umožňují spolehlivou detekci širokého spektra komponent z minimálního množství vzorku (Oldiges *et al.*, 2007).

V principu lze každou analytickou techniku použít v jiné oblasti metabolomického výzkumu. Neexistuje však jedna určitá metodika, která by umožňovala spolehlivou identifikaci a kvantifikaci všech metabolitů daného organismu během jediné analýzy. Z tohoto důvodu se stále hledají nové a lepší postupy a stávající se zdokonalují (Dettmer *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2002). Úspěšnost jednotlivých měření bývá komplikována velkou

diverzitou a dynamickými změnami hladin metabolitů v biologických vzorcích (Issaq *et al.*, 2009). Nejvíce analýz je založeno na kombinaci separačních technik s hmotnostní spektrometrií (Hall *et al.*, 2002) a na nukleární magnetické rezonanci (Issaq *et al.*, 2009; Oldiges *et al.*, 2007).

Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance je nedestruktivní metoda, která umožňuje analýzu mnoha tříd metabolitů v komplexních směsích *in vivo*. Používá se k přímému pozorování metabolitů a tím následně k nepřímému sledování enzymové aktivity (Roberts, 2000). Principem je zjišťování chemického posunu u jader atomů s lichým atomovým nebo nukleovým číslem a tedy s nenulovým spinem po jejich vložení do silného uniformního magnetického pole a za působení radiofrekvenčních impulzů. Vliv těchto impulzů vyvolá přechod jádra ze stavu o nižší energii do stavu o vyšší energii a následná emise záření během relaxace je pak detekována (Pilátová, 2008). Materiálem pro tuto analýzu bývají nejen tělní tekutiny (cerebrospinální tekutina, plazma, moč) a buněčné extrakty, ale i celé tkáně a rostliny. Hlavní nevýhodou NMR je ve srovnání s hmotnostní spektrometrií vyšší mez detekce (Issaq *et al.*, 2009).

Při NMR analýze lze determinovat jednotlivé metabolické dráhy použitím izotopově značených látek. NMR spektra umožňují pozorovat průchod značeného metabolitu určitou dráhou nebo sledovat, jakou cestou byl syntetizován. NMR aktivní jádra jsou používána zejména při charakterizaci biologických vzorků (obsahují tyto izotopy: ^1H , ^{13}C , ^{15}N a ^{31}P). ^1H NMR je jedním z nejrozšířenějších experimentů metabolického profilování, protože tento izotop je přítomen téměř ve všech metabolitech a je velmi senzitivní. ^{31}P se hojně uplatňuje při studiu fosfolipidů a látek účastnících se energetického metabolismu. Obecně se značené izotopy snadněji používají u buněčných extraktů než *in vivo* (Roberts, 2000).

Prakticky se NMR uplatnila při studiu rostlinných extraktů a poskytla přímé informace o struktuře všech metabolitů obsahujících vodík (Hall *et al.*, 2002). NMR byla též použita k analýze moči ke stanovení biomarkerů, které pomohly rozlišit rozdílné variety fenotypově stejných myší. Tato technika umožnila i získání informací o intermediátech a produktech methylalaninové dráhy při výzkumu karcinomu prostaty (Fiehn, 2002).

Hmotnostní spektrometrie

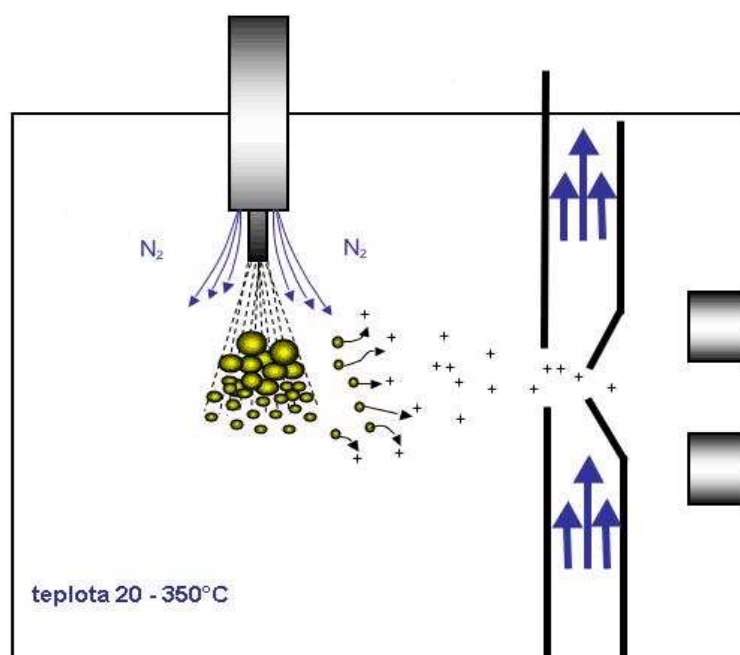
Hmotnostní spektrometrie je jednou z nejpoužívanějších fyzikálně-chemických technik v metabolickém výzkumu. Slouží k určování hmotností atomů, molekul a jejich částí po převedení na kladné nebo záporné ionty (Ho *et al.*, 2003). Umožňuje vysoce selektivní kvantitativní analýzu a velmi spolehlivou identifikaci metabolitů na základě jejich rozdílného hmotnostního spektra, poskytuje tedy informace o struktuře látek (Issaq *et al.*, 2009; Oldiges *et al.*, 2007). Její nevýhoda spočívá v tom, že některé metabolity bývají ovlivněny (diskriminovány) použitou ionizační technikou (Dettmer *et al.*, 2007, Monton *et Soga*, 2007).

Vývoj přístrojů pro MS se stále zdokonaluje, ale i přes značnou rozmanitost se všechny skládají ze tří základních částí (iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor). Iontový zdroj slouží k ionizaci analyzované látky. Důležitým kritériem je výběr vhodné ionizační techniky, kterou volíme podle vlastností vzorku a celkového účelu analýzy (Ho *et al.*, 2003).

V praktické části mé diplomové práce byla použita ionizace elektrosprejem (electrospray ionisation, ESI; Obr. 1). U tohoto typu prochází vzorek kapilárou, na které je vloženo vysoké napětí (obvykle 2,5–6 kV). Na výstupu z kapiláry vznikají malé kapičky nesoucí vlivem vysokého gradientu elektrického pole kladný nebo záporný náboj (podle polarity napětí). Zároveň dochází k odpařování mobilní fáze působením proudu horkého inertního plynu (běžně dusík), tím ke zmenšování povrchové velikosti kapiček a zároveň tedy i ke zvýšení hustoty povrchového náboje. Větší kapky se postupně rozpadají na malé kapičky (Coulombická exploze) a nakonec se uvolní protonovaný molekulární ion $[M+H]^+$ nebo adukt molekuly např. se sodným iontem $[M+Na]^+$ při snímání kladných iontů nebo deprotonovaný molekulární ion $[M-H]^-$ při snímání záporných iontů (Holčapek *et Jandera*, 1998).

Poměrně rozšířenou ionizační technikou je chemická ionizace za atmosférického tlaku, kdy je vzorek v kapalně fázi rozprášen rychlým ohřevem a proudem inertního plynu. Vzniklý aerosol je odpařen a k jeho ionizaci dochází v okolí výbojové jehly. Tento způsob ionizace je vhodný pro málo polární analyty a naopak nevhodný pro velké termolabilní molekuly (Štulík *et al.*, 2004). Používá se také fotoionizace za atmosférického tlaku, kde dojde pomocí UV výbojky k ionizaci molekul vzorku. Uplatňuje se při analýzách nepolárních analytů a nevhodná je též pro velké termolabilní molekuly. Další variantou ionizační techniky

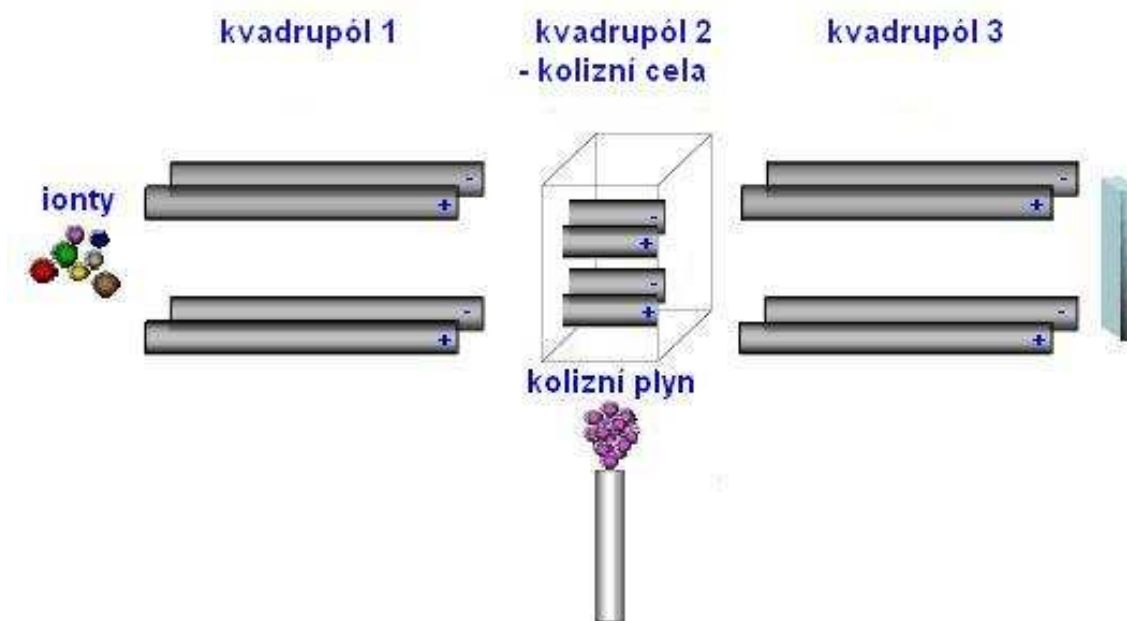
je termosprejová ionizace, k níž dochází ve vyhřívaném iontovém zdroji. Je vhodná pro termostabilní, netěkavé a silně polární látky (Volka *et al.*, 1995). Dále lze zmínit ionizaci svazkem rychlých atomů, která je vyvolána působením urychlených atomů nebo iontů. Probíhá ve viskózním kapalném prostředí (glycerol, thioglycerol), které se účastní procesu ionizace a stabilizuje vzniklé ionty. Používá se pro analýzu fosfolipidů, nukleotidů a peptidů (Linscheid *et Westmoreland*, 1994).



Obr. 1: Schéma ionizace elektrosprejem (upraveno dle: http://www.ich.ucl.ac.uk/services_and_facilities/lab_services/mass_spectrometry/images/HPLC_ESI_MS_1.gif, citováno dne: 27. 3. 2010).

Nezbytnou součástí MS je hmotnostní analyzátor, který umožňuje rozdělit směs iontů o různých poměrech hmotnost/náboj (m/z). Používá se např. kvadrupólový hmotnostní analyzátor. Jedná se o čtyři kovové tyče kruhového nebo hyperbolického průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům napětí obsahujícího stejnosměrnou a střídavou složku. Při zvolených hodnotách elektrického pole projdou kvadrupólem pouze ionty, které mají určité m/z . Po změnách napětí je možno kvadrupólem nechat postupně selektovat ionty ve zvoleném intervalu hodnot m/z (Ho *et al.*, 2003). V experimentální části této práce bylo použito

MS zařízení s trojitým kvadrupólem (triple quadrupole, QqQ; Obr. 2). V QqQ jsou umístěny tři soustavy tyčí za sebou, přičemž prostřední slouží jako kolizní cela, kde probíhají srážky iontů analytu s molekulami kolizního plynu. K dalším běžně používaným hmotnostním analyzátorům patří iontová past, orbitrap nebo průletový analyzátor (Štulík *et al.*, 2004).



Obr. 2: Schéma trojitého kvadrupólu (upraveno dle: http://www.ich.ucl.ac.uk/services_and_facilities/lab_services/mass_spectrometry/images/HPLC_ESI_MS_3.gif, citováno dne: 27. 3. 2010).

Po průchodu hmotnostním analyzátozem je proud iontů veden do detektoru, který poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů. Ten je po digitalizaci převeden do počítače a zpracován vhodným programem (Volka *et al.*, 1995).

Pro získání optimálních výsledků metabolické analýzy se MS často spojuje s chromatografickými (LC, GC) a elektromigračními (CE) technikami, což výrazně zvyšuje selektivitu a redukuje složitost hmotnostních spekter (Dettmer *et al.*, 2007). Pro použití této instrumentace je nutné optimální propojení dané separační techniky s hmotnostním spektrometrem (Issaq *et al.*, 2009).

Plynová chromatografie

Principem plynové chromatografie je rozložení složek vzorku mezi mobilní (nosný plyn) a stacionární fázi na základě adsorpce a rozpouštění (Štulík *et al.*, 2004).

Při GC vchází nosný plyn do kolony ohřáté na určitou teplotu. Do proudu nosného plynu je přes nástřikový port dávkován vzorek analyzované směsi. Nosný plyn unáší směs analyzovaných látek kolonou, kde dojde k rozdělení složek analytu na základě jejich těkavosti (Skoog *et al.*, 2000). Během chromatografické separace se neustále opakuje proces adsorpce a rozpouštění složek směsi, takže na výstupu se objeví prakticky všechny analyty, který byl do kolony nastříknut. Jednotlivé složky pak vchází do příslušného detektoru, jehož signál je zaznamenáván počítačem. Jako nosné plyny, které mají za úkol obstarávat transport složek vzorku kolonou, slouží nejčastěji helium, dusík, vodík a argon (Štulík *et al.*, 2004).

Protože GC využívá převedení všech složek vzorku do plynné fáze, je vhodná pro analýzu organických látek s teplotou varu do 400 °C, těkavých anorganických sloučenin a některých netěkavých vzorků, které lze pomocí derivatizace (esterifikace, silylace) převést na těkavější deriváty a naopak nevhodná pro termolabilní vzorky (Fiehn, 2002; Monton *et Soga*, 2007; Volka *et al.*, 1995).

V kombinaci s GC se používá několik typů detekčních zařízení, jejichž volba závisí na aplikaci a cíli analýzy. Jednotlivé detektory se liší jak principem funkce a konstrukcí, tak i selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem. Běžné je spojení plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS). Nezbytnou součástí GC/MS musí být vhodný spojovací článek mezi oběma přístroji – chromatografický výstup (Volka *et al.*, 1995). Pro detekci u GC se dále používá plamenový ionizační detektor, detektor elektronového záchytu nebo tepelně vodivostní detektor (Issaq *et al.*, 2009).

GC/MS je rozšířena v medicíně a soudním lékařství, kde se používá pro monitoring léků, drog a jejich metabolitů v tělních tekutinách. Své uplatnění našla tato technika také v ochraně životního prostředí při stanovení ropného znečištění ve vodě a k určení chlorovaných pesticidů ve tkáních zvířat (Volka *et al.*, 1995). GC/MS je velmi efektivní technikou pro analýzu složitých směsí organických látek (Issaq *et al.*, 2009).

Kapalinová chromatografie

Principem kapalinové chromatografie je distribuce složek vzorku mezi kapalnou mobilní fází a fází stacionární. Při průtoku kolonou přejde každá molekula vzorku několikrát z proudu mobilní fáze na povrch fáze stacionární a zpět a podle toho, jak látka interaguje se stacionární fází, je různě dlouho zadržována na koloně. Mobilní fáze má v separačním procesu aktivní roli, protože při adsorpci z roztoků je povrch sorbentu obsazen monovrstvou molekul mobilní fáze a molekuly analytu s nimi soutěží o aktivní místa.

Jako stacionární fáze nejčastěji slouží různě upravený silikagel. Součástí silikonového polymeru je vždy určitá koncová funkční skupina, která ovlivňuje jeho vlastnosti. Běžně se používají hydrofóbní uhlovodíkové skupiny (oktadecyl, fenyl) a polární skupiny (aminopropyl, dioly). Mezi další stacionární fáze patří alumina (krystalická forma oxidu hlinitého) a florisil (křemičitan hořečnatý). Vysokých účinností se v LC dosahuje využitím stacionárních fází obsahujících malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu (Štulík *et al.*, 2004).

Výběr vhodné mobilní fáze závisí na vlastnostech analytů a na typu LC. Běžně se používá methanol, acetonitril, dioxan, diethylether a směsi těchto látek s vodou (Volka *et al.*, 1995).

Variantou LC je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography, HPLC). Je vhodná pro analýzu širokého spektra biologického materiálu. V porovnání s GC není HPLC omezena pouze separací termostabilních a derivatizovatelných látek. Další výhodou je možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze (Issaq *et al.*, 2009). Běžně rozlišujeme normální HPLC, při které je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. U reverzního HPLC systému je tomu naopak (Štulík *et al.*, 2004). Rutinní HPLC je limitována tlakem přibližně šest tisíc psi. Tento problém překonává systém ultraúčinné LC (ultra high performance liquid chromatography, UHPLC), která může pracovat při tlaku až patnáct tisíc psi. Nejlepších výsledků UHPLC dosahuje při použití kolon naplněných stacionární fází o velikosti částic pod 2 μm . UHPLC instrumentace tedy nabízí oproti HPLC větší citlivost, vyšší rozlišení a také značně urychluje analýzu (Issaq *et al.*, 2009).

V LC se používají převážně optické (fotometrický, fluorimetrický, diferenciální refraktometr) a elektrochemické (voltametrický, vodivostní) detektory. V běžné analytické praxi je velmi rozšířeno spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, které je však poměrně komplikované (Issaq *et al.*, 2009).

Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je významná analytická technika vhodná zejména pro separaci nabitých látek. Jejími hlavními výhodami jsou rychlost, dobré rozlišení a také poměrně malá spotřeba solventů, tedy nízká produkce odpadu (Monton *et Soga*, 2007). CE separace látek je založena na různé elektroforetické pohyblivosti nabitých částic, které jsou hnány gradientem elektrického pole k opačně nabitě elektrodě (Jenkins, 2009; Skoog *et al.*, 2000).

Migrační vlastnosti látek při CE se mění působením elektroosmotického toku (electroosmotic flow, EOF). EOF vzniká na rozhraní elektrolytu a negativně nabitě vnitřní stěny kapiláry, kde dochází k deprotonaci silanolových skupin. Díky tomu se generují negativní náboje, které působí proti elektroforetické pohyblivosti. V důsledku EOF tedy putují anionty i kationty směrem od anody ke katodě. EOF je silný přibližně při pH 2 a vyšším a lze ho eliminovat potažením vnitřní stěny kapiláry trimethylchlorosilanem (Jenkins, 2009).

Zařízení pro CE se obvykle skládá z 10–100 μm silné a 40–100 cm dlouhé křemenné kapiláry potažené ochrannou polyimidovou vrstvou a naplněné vhodným pufrům. Kapilára je umístěna mezi dvěma rezervoáry pufru, v nichž jsou ponořeny elektrody (Skoog *et al.*, 2000). Důležitý je také stejnosměrný zdroj napětí, jehož rozdíl potenciálů se obvykle pohybuje v rozmezí 5–30 kV (Volka *et al.*, 1995). Po vložení napětí jsou ionty hnány gradientem elektrického pole k opačně nabitě elektrodě a jejich rychlost je snímána vhodným detektorem (Štulík *et al.*, 2004).

V kombinaci s CE se používají elektrochemické (konduktometr, potenciometr, ampérmetr) a spektrometrické (UV/VIS, Ramanův) detektory (Skoog *et al.*, 2000). V metabolomice je velmi oblíbené spojení CE s hmotnostním spektrometrem, které je nejčastěji realizováno pomocí elektrosprejového rozhraní. Problémem je, že běžný průtok elektrolytu se pohybuje v řádech nl/min, což je pro vytvoření stabilního spreje v běžném

zdroji ESI nedostatečné. Chybějící objem je možné dodat z externího zdroje, kterým bývá nejčastěji tzv. stínící kapalina – vodný roztok soli a vhodného organického rozpouštědla (nanoelektrosprej; Štulík *et al.*, 2004).

CE se používá zejména při analýze peptidů, proteinů a nukleových kyselin v tělních tekutinách a buněčných extraktech (García-Pérez *et al.*, 2008). Vedle toho je tato technika vhodná také pro separaci anorganických kationtů a aniontů (Volka *et al.*, 1995).

2.1.7 Zpracování dat pro metabolomiku

Aby výsledky metabolomických experimentů pomohly objasnit a efektivně popsat studovanou problematiku, je nutné pracovat s nástroji, které dokáží zpracovávat, uchovávat, standardizovat a vyhodnocovat metabolomická data (Fiehn, 2002). V případech, kdy je důležité učinit objektivní závěr o celku složeném z velkého množství jednotek, se používají matematicko-statistické metody. K efektivnímu zpracování dat a jejich správné interpretaci přispívají také různé softwarové programy a internetové databáze (Goodacre *et al.*, 2004).

Výstupní data metabolomických analýz mají velmi často podobu chromatografických záznamů nebo MS či NMR spekter a před vlastním statistickým zpracováním je nutná jejich úprava (Hall *et al.*, 2002; Issaq *et al.*, 2009). Pro tento účel bylo vytvořeno mnoho softwarových programů, které dokáží redukovat „šum“, uspořádat retenční časy a identifikovat píky jednotlivých složek vzorku. Při MS analýze se používají MZmine (<http://mzmine.sourceforge.net>) nebo XCMS (Scripps Research Institute, USA). Software MZmine využívá porovnání výstupních dat s interními standardy a je volně dostupný na internetu (Issaq *et al.*, 2009; Ramautar *et al.*, 2009).

Po tomto zpracování obvykle následuje vlastní statistická analýza, při které dochází k porovnávání a vyhledávání vztahů mezi daty a vyhodnocování jejich podobností. K tomu může sloužit analýza hlavních komponent (principal component analysis, PCA), což je matematický postup umožňující vyhledávání lineárních kombinací dat (např. koncentrace metabolitů), která mají mezi sebou maximální rozptyl. Právě tyto velmi rozdílné hodnoty jsou nejvíce signifikantní (pokud není velký rozptyl způsoben chybou měření; Steinfath *et al.*, 2008). V praxi je pro statistickou analýzu dostupné velké množství různých programů.

Jako příklad lze uvést MarkerviewTM (Applied Biosystems, USA). Tento statistický software používá PCA analýzu ke zjednodušení rozsáhlých souborů dat v nový systém komponent (Issaq *et al.*, 2009). Důležitými parametry při statistické analýze vycházející z plynové nebo kapalinové chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem jsou retenční časy jednotlivých píků, intenzita a poměr hmotnost/náboj. Pro statistickou analýzu následovanou po NMR to může být jakýkoliv chemický posun nebo změna koncentrace metabolitů (Issaq *et al.*, 2009).

Vzhledem k velmi dynamickému rozvoji metabolomiky je získáváno stále větší množství dat, která se shromažďují v různých databázích. Podle charakteru dat se dělí na databáze obsahující: přesné metabolické profily včetně prvotních (raw) dat a metadat, metabolické profily jednoho živočišného druhu, komplexní metabolické profily mnoha druhů různých fyziologických stavů, veškeré informace o metabolitech jednoho biologického druhu, biochemickou specifikaci metabolitů, genomická i metabolická data integrovaná s různými metabolickými drahami (Goodacre *et al.*, 2004).

2.1.8 Praktické aplikace metabolomiky

Jedním z primárních cílů metabolomiky je kompletní zmapování metabolických drah od mikrobů až po člověka. Středem tohoto zájmu jsou modelové organismy. Metabolická studie se tedy používají k predikci nových a popisu stávajících metabolických sítí, k identifikaci jejich produktů a k monitoringu průchodu látek biochemickými drahami – metabolické fluxy (Hall *et al.*, 2002).

Poznatky získané z metabolických dat mohou být velmi efektivně využity v lékařství a biomedicinském výzkumu, který je v této oblasti zaměřen především na diagnostiku onemocnění. K tomuto účelu je nejprve nutné velmi detailně a přesně popsat metabolické dráhy u zdravých jedinců a poté asociovat odchylky v množství metabolitů s abnormálními stavy organismu (Fiehn, 2002). V praxi to znamená určit pro každé onemocnění sadu biomarkerů, tedy specifických a přesně stanovitelných látek, jejichž změny umožní přesnou identifikaci dané choroby. Tyto markery jsou hojně využívány při diagnostice dědičných metabolických poruch, které vznikají v důsledku špatné enzymové aktivity a mohou mít vážné klinické projevy (Ho *et al.*, 2003). Po vlastním určení diagnózy

obvykle následuje výběr optimální léčby. Zde se opět uplatňují metabolomické analýzy, díky nimž je možné sledovat vstřebávání a vylučování léků a stanovit vhodné koncentrace medikamentů pro konkrétní jedince (Issaq *et al.*, 2009).

Znalost metabolických drah, jejich vzájemného propojení a různých meziproductů může být prospěšná i v oblasti biotechnologií. Zejména mikroorganismy bývají cíleně modifikovány k produkci aminokyselin, vitaminů, enzymů, antibiotik, insulinu a mnoha dalších významných látek. Zlepšení výtěžků těchto „biochemikálií“ na základě studia metabolismu organismů, které je produkují, je jedním z úkolů metabolického inženýrství (Mashego *et al.*, 2007).

Metabolomika je také hodnotným nástrojem systematické biologie, kde napomáhá ke správnému taxonomickému zařazení a celkové charakterizaci organismů prostřednictvím určování funkce jednotlivých buněk na základě jejich metabolitů (Hall *et al.*, 2002; Issaq *et al.*, 2009).

V neposlední řadě slouží analýza metabolomu také ke studiu interakcí mezi genotypem a fenotypem. Ukázalo se totiž, že fenotypový projev organismu lze dobře zkoumat z hlediska metabolomiky, protože hladiny metabolitů velmi rychle odrážejí i minimální změny v buněčných pochodech. Metabolický profil se uplatňuje také při výzkumu efektů biochemických a environmentálních stresů na rostliny a mikroby nebo při hodnocení ekvivalence mezi geneticky modifikovanými organismy (Dettmer *et al.*, 2007; Dunn *et al.*, 2005).

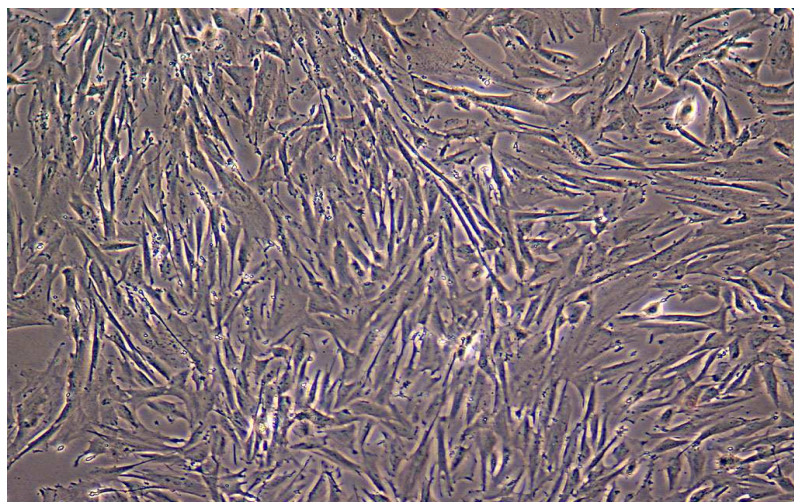
Obrovský rozvoj technologií v období posledních let umožňuje identifikaci velkého množství látek během jedné metabolomické analýzy (Dettmer *et al.*, 2007). Získané soubory dat jsou velmi rozsáhlé a mohou být využity při sestavování databází integrovaných s mapami metabolických drah. Ve spojení s poznatky transkriptomiky, genomiky a proteomiky pak umožňují celkové pochopení struktury a funkcí zkoumaných organismů (Stephanopoulos *et al.*, 2004).

2.2 Lidské kožní fibroblasty

Jak již bylo řečeno, pro účely metabolické analýzy se velmi často používají modelové buněčné populace. Jednu z nich reprezentují lidské kožní fibroblasty, které jsou pro snadný odběr a kultivaci *in vitro* velmi oblíbeným biologickým materiálem. Uvádí se, že nevykazují známky senescentního fenotypu nejméně po šestnáct pasáží (Cooper *et al.*, 1991).

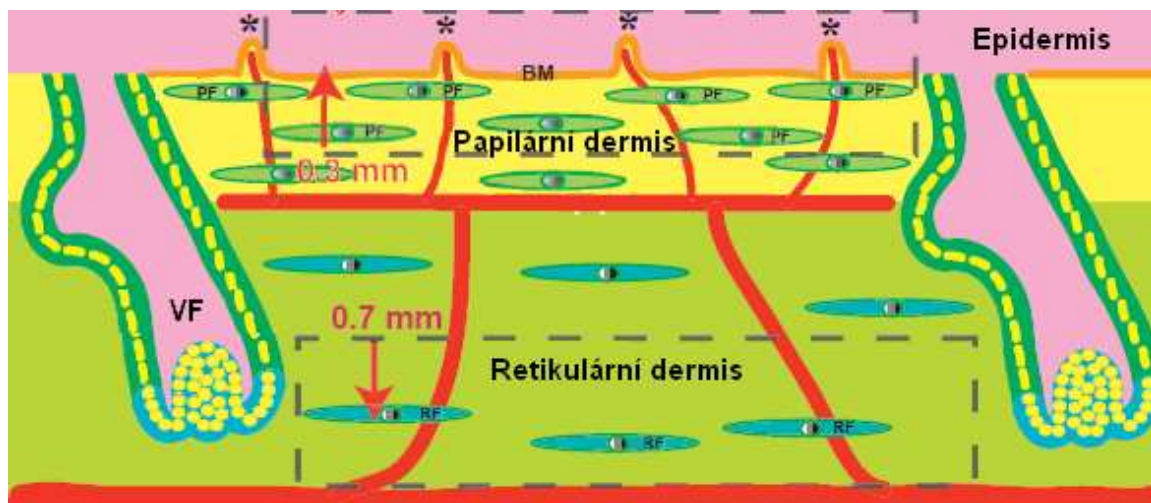
2.2.1 Charakteristika

HSF jsou základními články pojivové tkáně a představují velmi rozmanitou skupinu buněk. Během embryonálního vývoje vznikají jako primárně nesespecializované hvězdicovité buňky odvozené od mezenchymu (Enenstein *et Furcht*, 1984). HSF jsou obvykle ploché buňky podlouhlého nepravidelného tvaru s oválným jádrem obsahujícím jedno až dvě jadérka (Obr. 3). V kultuře rostou jako adherentní buňky, ale jsou schopné i pohybu.



Obr. 3: *In vitro* kultura lidských kožních fibroblastů.

Podle lokalizace v kůži se dělí na tři základní typy (Obr. 4). Papilární fibroblasty se vyskytují v dermis v hloubce 0,3 mm a retikulární fibroblasty jsou přítomny od 0,7 mm hlouběji. Poslední skupinu tvoří fibroblasty přidružené k vlasovým folikulům.



Obr. 4: Schéma řezu lidskou kůží (upraveno dle: Sorrell *et* Caplan, 2004). BM – bazální membrána, VF – vlasový folikul, PF – papilární fibroblasty, RF – retikulární fibroblasty.

2.2.2 Funkce

HSF mají velký význam pro tvorbu pojivové tkáně a při regulaci dermálních procesů. Jejich funkce spočívá především v syntéze mnoha látek (viz níže; Enenstein *et* Furcht, 1984; Chang *et al.*, 2002; Sorrel *et* Caplan, 2009).

Velmi důležitým produktem HSF je extracelulární matrix (ECM), tedy homogenní hmota obklopující buňky pojivové tkáně. ECM má za úkol udržování tvaru tkání a propojení jejich buněk. Slouží také jako médium pro výměnu látek mezi buňkou a prostředím a vytváří fyzickou bariéru proti pronikání mikroorganismů. Skládá se z těchto hlavních typů makromolekul: glykosaminoglykany (GAG) a proteoglykany, fibrózní proteiny (kolageny, elastiny) a multiadhezní molekuly (Masopust *et* Průša, 2003).

HSF se účastní také tvorby GAG a glykoproteinů. GAG mají formu hydratovaného gelu tvořícího základní substanci ECM a umožňují jí působit proti silám stlačujícím tkáň. Mezi GAG patří kyselina hyaluronová, která obklopuje migrující a proliferující buňky, zvláště v embryonálních tkáních (Volpi *et al.*, 2008).

Další funkcí HSF je syntéza a organizace molekul fibrózních proteinů. Jedním z nich je nerozpustný protein kolagen, jehož vlákna značně odolávají tahu. Za elastické vlastnosti tkáně zodpovídá další fibrózní protein, elastin. Skládá se z vláken pokrytých mikrofibrilami

s navázanými glykoproteiny. Pravděpodobně nejdůležitějším mikrofibrilovým glykoproteinem je fibrilin, jehož mutace vede k Marfanovu syndromu.

HSF sekretují rozpustné cytokiny a růstové faktory, které zajišťují autokrinní a parakrinní stimulaci dalších buněk. Autokrinní aktivita zahrnuje především indukci syntézy fibroblastových růstových faktorů a transformujícího růstového faktoru β (Ornitz *et al.*, 2001). Tento faktor následně ovlivňuje sekreci růstového faktoru pojivové tkáně, který podporuje tvorbu kolagenu, proliferaci HSF a formování ECM (Moussad *et al.*, 2000). Parakrinní aktivita řídí růst, diferenciaci a migraci keratinocytů produkcí keratinocytového růstového faktoru a interleukinu 6 (Chang *et al.*, 2002; Sorrell *et al.*, 2004). Bylo zjištěno, že keratinocyty v kultuře bez této stimulace zhruba do dvou týdnů umírají (El-Ghalbzouri *et al.*, 2002). Kooperace HSF s keratinocyty je důležitá zejména při vývoji organismu a hojení ran.

Mezi další funkce HSF patří ovlivňování vzniku vlasových folikulů ve fetální pokožce a regulace jejich růstu a odumírání u dospělých jedinců. HSF přispívají také k formování bazální membrány produkcí lamininu a nidogenu (Sorrell *et al.*, 2004).

2.2.3 Využití

Kultury HSF se dělí na dva základní typy. Prvním je klasické jednovrstevné *in vitro* uskupení, kdy adherentní buňky pokrývají dno kultivační nádoby (Zijlstra *et al.*, 1999). Tyto modely slouží především k fenotypové charakterizaci a výzkumu metabolismu HSF a v neposlední řadě také k diagnostickým účelům (Fleischmajer *et al.*, 1995). Druhý typ představují vícevrstevné organotypové kultury, které mohou kromě HSF obsahovat i další buňky. Uplatňují se zejména jako *in vitro* kožní model a lze na nich studovat biologii kůže, tkáňovou morfolonii nebo testovat vliv farmakologických a kosmetických produktů. Byly využity např. při výzkumu vlivu UV záření nebo při sledování průniku chemických látek pokožkou. Organotypové kultury jsou také materiálem k vývoji kožních náhrad, které slouží k rekonstrukci kůže po prodělání onemocnění nebo popálení (Wong *et al.*, 2007).

3 CÍLE PRÁCE

- 3.1** Vypracovat literární rešerši na téma metabolomika. Popsat běžně používané analytické techniky a uvést stručný přehled o lidských kožních fibroblastech.
- 3.2** Kultivovat lidské kožní fibroblasty, sklídit je metodou trypsinizace a quenchingu a provést analýzu intracelulárních nukleotidů kapilární elektroforézou. Porovnat vliv působení těchto metod sklízení na koncentrace intracelulárních nukleotidů.
- 3.3** Optimalizovat metodu pro analýzu látek nukleotidového charakteru pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Ověřit aplikovatelnost této metody na reálných vzorcích.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Biologický materiál

K analýzám byly použity lidské kožní fibroblasty a vzorek krve získané od dobrovolných dárců z řad laboratorního personálu.

4.2 Použité chemikálie

Acetonitril (AcCN) (99,9%), hydroxid amonný (25%), hydroxid sodný (98%), kyselina mravenčí (98%) a kyselina octová (100%) byly zakoupeny u firmy Fluka (Německo), fetální hovězí sérum (FBS) u firmy PANBiotech (Německo), fyziologický roztok u firmy Braun (Německo), diethylether (p. a.) a kyselina trichloroctová (TCA; 99%) u firmy Lach-Ner (ČR). Cetyltrimethylamonium bromid (CTAB; 99%), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), kyselina citrónová (100%), kyselina γ -aminomáselná (GABA; 99%), methanol ($\geq 99,9\%$), směs antibiotik streptomycin (10 mg/ml)/penicilin (10 000 U/ml), trypsin/EDTA (10x) a standardy nukleotidů a nukleotidových derivátů (dále jen nukleotidy): 2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát (dATP) disodná sůl (100%), 2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát (dGTP) sodná sůl (96%), 2'-deoxycytidin-5'-trifosfát (dCTP) disodná sůl (98%), 2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát (dGMP) sodná sůl hydrát (98%), 2'-deoxythymidin-5'-difosfát (dTDP) trisodná sůl ($> 90\%$), 2'-deoxythymidin-5'-monofosfát (dTMP) disodná sůl hydrát ($> 99\%$), 2'-deoxythymidin-5'-trifosfát (dTTP) sodná sůl ($> 96\%$), adenosin-5'-trifosfát (ATP) disodná sůl (99%), adenosin-5'-monofosfát (AMP) sodná sůl (99%), uridin-5'-monofosfát (UMP) disodná sůl (98%), β -nikotinamidadenindinukleotid (NADH) redukována disodná sůl hydrát (98%), cytidin-5'-trifosfát (CTP) disodná sůl (98%), guanosin-5'-difosfát (GDP) sodná sůl (98%), guanosin-5'-monofosfát (GMP) disodná sůl (100%), guanosin-5'-trifosfát (GTP) sodná sůl (95%), inosin-5'-difosfát (IDP) sodná sůl (96%), inosin-5'-monofosfát (IMP) disodná sůl (99%), inosin-5'-trifosfát (ITP) trisodná sůl (97%), β -nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+ ; 99%), β -nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP^+) sodná sůl (99%), uridin-5'-difosfát (UDP) sodná sůl (96%), uridin-5'-difosfoglukosa (UDP-glukosa) disodná sůl (98%), uridin-5'-trifosfát (UTP) sodná sůl (98%), 2'-deoxyadenosin-5'-difosfát (dADP) sodná sůl (98%),

2'-deoxyadenosin-5'-monofosfát (dAMP; 98%), 2'-deoxyguanosin-5'-difosfát (dGDP) sodná sůl (98%), 2'-deoxyuridin-5'-monofosfát (dUMP) disodná sůl (100%), 2'-deoxyuridin-5'-trifosfát (dUTP) sodná sůl (95%), adenosin-5'-difosfát (ADP) sodná sůl (96%), cytidin-5'-difosfát (CDP) sodná sůl (98%), cytidin-5'-monofosfát (CMP) disodná sůl (99%), uridin-5'-difosfoglukuronát (UDP-glukuronát) triamonná sůl (99,6%), β -nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaná tetrasodná sůl (NADPH; 96%), guanosin-5'-difosfo-D-mannosa (GDP-mannosa) sodná sůl (97%), flavinadeninukleotid (FAD) disodná sůl hydrát (95%), 2'-deoxycytidin-5'-monofosfát (dCMP) sodná sůl (100%), uridin-5'-difosfogalaktosa (UDP-galaktosa) disodná sůl (95%), guanosin-5'-difosfo- β -L-fukosa (GDP-fukosa) sodná sůl (>85%), 2'-deoxycytidin-5'-difosfát (dCDP) sodná sůl (\geq 96%), 2'-deoxyinosin-5'-trifosfát (dITP) trisodná sůl (98,2%), uridin-5'-difosfát-N-acetylglukosamin (UDP-N-acetylglukosamin) sodná sůl (100%), cytidin-5'-monofosfoneuraminát (CMP-N-acetylneuraminát) sodná sůl (94%) byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (USA).

Pro přípravu všech roztoků byla použita deionizovaná voda (18,3 M Ω .cm).

4.3 Použité roztoky

Médium DMEM pro kultivaci kožních fibroblastů:

5 ml směsi antibiotik streptomycin (100 μ g/ml)/penicilin (100 U/ml)

50 ml FBS (před použitím přefiltrovat přes sterilní filtr – typ 2 μ m)

doplnit médiem DMEM na 500 ml

CTAB pufr:

0,42 g kyseliny citrónové

14,58 mg CTAB

doplnit deionizovanou vodou na 50 ml

upravit pH na 4 pomocí GABA

Trypsin/EDTA:

10 ml trypsin/EDTA roztok

10 ml fyziologického roztoku

Kyselý pufr pro optimalizaci na tandemovém hmotnostním spektrometru:

192,5 μ l kyseliny mravenčí

doplnit deionizovanou vodou na 250 ml

přidat 250 ml methanolu

Alkalický pufr pro optimalizaci na tandemovém hmotnostním spektrometru:

385 mg octanu amonného

779 μ l hydroxidu amonného

doplnit deionizovanou vodou na 250 ml

přidat 250 ml AcCN

Mobilní fáze A (acetát amonný – 20 mmol/l roztok):

286 μ l kyseliny octové

doplnit deionizovanou vodou na 250 ml

upravit pH na 9,45 pomocí hydroxidu amonného

Mobilní fáze B:

30 ml mobilní fáze A (20 mmol/l acetát amonný pH 9,45)

doplnit AcCN na 200 ml

4.4 Přístrojové vybavení a další pomůcky

Veškeré manipulace s buňkami probíhaly v laminárním boxu (Heraeus Instruments, Německo). Fibroblasty byly kultivovány v kultivačních lahvičkách (plocha dna 25 cm², TPP, Švýcarsko) v inkubátoru (Shel Lab, USA) s 5 % atmosférou CO₂ při teplotě 37 °C.

Analýza nukleotidových standardů a reálných vzorků trypsinizovaných a quenčováných buněk byla provedena na kapilární elektroforéze „homemade“ skládající se z UV detektoru CE-975 (Jasco Corporation, Japonsko) a zdroje napětí CZE 3000 HV (Spellman, USA). Ke zpracování dat byl použit software Clarity station (Data Apex, ČR) a k vyhodnocení výsledků Statistica 7.0 (Statsoft, ČR).

K analýze nukleotidových standardů a reálných vzorků fibroblastů a erytrocytů byla použita UHPLC UltiMate 3000 (Dionex, USA) s detekcí tandemovým hmotnostním spektrometrem (tandem mass spectrometer, MS/MS) API 4000 (Applied Biosystems, USA) – trojitý kvadrupól s ionizací elektrosprejem. Všechny experimenty byly provedeny na koloně Luna (3 μm, NH₂, 100 Å, 150 x 1,00 mm, Phenomenex, USA). Podmínky systému UHPLC/MS/MS pro analýzu nukleotidů byly předmětem optimalizace. Ke zpracování dat byl použit software Analyst 1.5 (Applied Biosystems, USA).

Dále byly použity následující přístroje: centrifuga (Heraeus Instruments, Německo), centrifuga (Hettich, Německo), lyofilizátor (Labconco, USA), příprava deionizované vody (Werner Reinstwassersystem, Německo), syringe pumpa (Kdscientific, USA), ultrazvuková lázeň (Kraintek 12, Slovensko), vortex (IKA Works, USA).

4.5 Příprava kožních fibroblastů

4.5.1 Kultivace

K experimentům bylo připraveno 14 kultivačních lahviček HSF. Buňky byly kultivovány dle standardního protokolu v médiu DMEM s 10 % FBS a přísádkem streptomycinu (100 μg/ml) a penicilinu (100 U/ml) při 37 °C v 5% atmosféře CO₂. Po nárůstu do 100% konfluence bylo 7 kultivačních lahví sklizeno metodou trypsinizace a druhá polovina lahví metodou quenchingu ledovým (-50 °C) 60% methanolem.

4.5.2 Sklizení

Trypsinizace

Buňky v kultivačních lahvičkách byly přeneseny z inkubátoru do laminárního boxu a bylo z nich slito médium. HSF byly opláchnuty dvakrát 5 ml fyziologického roztoku a bylo k nim přidáno 500 μ l roztoku trypsin/EDTA. Poté byly buňky inkubovány po dobu 3 min při 37 °C v 5% atmosféře CO₂. Po uvolnění buněk bylo přidáno 5 ml média k zastavení účinku trypsinu. Obsah kultivační lahvičky byl důkladně promíchán a rychle přelit do 15 ml centrifugační zkumavky. Zbytek buněk v kultivační lahvičce byl dvakrát promyt 5 ml fyziologického roztoku a výplach byl přidán do zkumavky ke vzorku. Vzorek byl centrifugován (5 min, 1200 rpm) a poté byl slit supernatant. Peleta buněk byla intenzivně rozklepána a poté resuspendována v 1 ml média.

Quenching

Kultivační lahvička s buňkami byla vyndána z inkubátoru a rychle (během 10 s) vypláchnuta pomocí quenchovací stříkačky se zahnutou jehlou 20 ml ledového (-50 °C) 60% methanolu (Obr. 5). Vypláchnutá lahvička byla důkladně oklepána o gázu a ihned umístěna na led.



Obr. 5: Použitá technika quenchingu.

4.5.3 Extrakce

Extrakce po trypsinizaci

Vzorek byl po trypsinizaci centrifugován (5 min, 3400 rpm) a poté byl odpipetován supernatant. K peletě bylo přidáno 100 µl ledového (-50 °C) 80% methanolu. Vzorek byl sonifikován (1 min) a následně centrifugován (1 min, 10 000 rpm). Supernatant (extrakt) byl převeden do čisté 1,5 ml eppendorfky. K peletě bylo přidáno 100 µl ledového 80% methanolu. Vzorek byl sonifikován (1 min) a poté centrifugován (1 min, 10 000 rpm). Supernatant byl přidán k původnímu extraktu. Extrakt byl lyofilizován, rozpuštěn ve 100 µl deionizované vody a až do vlastní analýzy zamrazen na -20 °C.

Extrakce po quenchingu

Do kultivační lahvičky byl přidán 1 ml ledového 80% methanolu. Buňky byly ze dna kultivační lahvičky důkladně seškrabány škrabkou opláchnutou v methanolu. Extrakt byl přepipetován do 15 ml centrifugační zkumavky, která byla předem vypláchnuta methanolem. Zbylé buňky byly z kultivační lahvičky vypláchnuty 1 ml ledového 80% methanolu a přidány k extraktu. Vzorek byl sonifikován (1 min) a centrifugován (5 min, 3000 rpm). Supernatant byl lyofilizován, rozpuštěn ve 100 µl deionizované vody a až do vlastní analýzy zamrazen na -20 °C.

4.6 Příprava erytrocytů

40 µl krve bylo extrahováno 80 µl roztoku TCA (koncentrace 1 mol/l). Vzorek byl sonifikován (1 min), vortexován (1 min) a centrifugován (1 min, 10 000 rpm). Po centrifugaci byl odebrán supernatant a přemístěn do čisté 1,5 ml eppendorfky, která byla v digestoři doplněna 1 ml diethyetheru. Vzorek byl vortexován (1 min), byl odstraněn ether – vrchní vrstva. Přídavek etheru byl třikrát opakován. Zbytek etheru byl odpařen v digestoři (15 min) při laboratorní teplotě.

4.7 Analýza nukleotidů pomocí CE

4.7.1 Analýza směsi standardů

K analýze byla použita směs osmnácti vybraných nukleotidových standardů připravená rozpuštěním pevných látek v deionizované vodě (výsledná koncentrace 0,1 mol/l). Analýza této směsi byla provedena metodou CE již dříve publikovanou (Friedecký *et al.*, 2007).

Všechny experimenty byly provedeny na nepokryté křemenné kapiláře (vnitřní průměr 75 μm , délka 90/97 cm) při pokojové teplotě. Hydrostatické dávkování vzorku bylo prováděno manuálně po dobu 15 s. Separace probíhala za použití CTAB pufru při napětí 24,4 kV a proudu 40 μA . Analyty byly detekovány fotometricky při 255 nm. Kapilára byla před každou analýzou proplachována pufrům CTAB.

4.7.2 Analýza quenchovaných a trypsinizovaných vzorků

Byla provedena analýza intracelulárních nukleotidů quenchovaných a trypsinizovaných vzorků HSF. Všechny experimenty byly realizovány za stejných podmínek jako analýza směsi nukleotidových standardů.

4.8 Analýza nukleotidů pomocí UHPLC/MS/MS

4.8.1 Příprava nukleotidových standardů

K analýzám bylo vybráno čtyřicet dva standardů látek nukleotidového charakteru na základě databáze Olmeda (Olomoucká metabolická databáze), která byla vytvořena v Laboratoři dědičných metabolických poruch v rámci metabolického projektu a která integruje data z databáze KEGG (<http://www.kegg.com/>), HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) a jiných zdrojů. Zásobní roztoky standardů byly připraveny rozpuštěním pevných látek v deionizované vodě (výsledná koncentrace 0,1 mmol/l) a dále ředěny dle potřeby.

4.8.2 Optimalizace podmínek MS/MS

Pro optimalizaci podmínek na tandemovém hmotnostním spektrometru byly zásobní roztoky naředěny kyselým a alkalickým pufrem (výsledná koncentrace 0,1 $\mu\text{mol/l}$).

Nukleotidy v kyselém a alkalickém pufru byly dávkovány pomocí syringe pumpy (průtok 1 ml/hod) přímo do iontového zdroje MS/MS. Na základě monoizotopových hmotností se hledalo šest multiple-reaction monitoring (MRM) přechodů pro každou studovanou látku a to v pozitivním i negativním módu. Přístroj provedl také automatickou optimalizaci podmínek, při nichž tyto přechody vznikaly. Pro každou látku byl vybrán jeden nejintenzivnější MRM přechod.

4.8.3 Optimalizace podmínek UHPLC

Pro UHPLC analýzu bylo nutné vybrat vhodnou kolonu, mobilní fáze a stanovit konečné podmínky separace směsi standardů. Byly optimalizovány následující parametry: teplota a průtok kolony, složení mobilní fáze, podmínky gradientové eluce a množství nastříkovaného vzorku.

4.8.4 Analýza směsi standardů

Ze zásobních roztoků standardů (0,1 mmol/l) byly připraveny čtyři směsi. Každá směs obsahovala jinou část analyzovaných látek. Složení bylo zvoleno tak, aby se v jedné směsi nevyskytovaly látky s podobnou monoizotopovou hmotností (rozdíl 1 Da a méně). Směsi byly ředěny mobilní fází B v poměru směs : mobilní fáze B, 1 : 1. Každá směs byla analyzována pomocí UHPLC/MS/MS za optimalizovaných podmínek.

Směsný vzorek obsahující všechny studované nukleotidy byl připraven ze zásobních roztoků standardů (0,1 mmol/l). Tato směs byla opět ředěna mobilní fází B v poměru směs : mobilní fáze B, 1 : 1 a analyzována pomocí UHPLC/MS/MS za optimalizovaných podmínek.

4.8.5 Analýza reálných vzorků fibroblastů a erytrocytů

Extrakty quenčovaných buněk a erytrocytů byly zředěny mobilní fází B (v poměru vzorek : mobilní fáze, 1 : 1) a analyzovány pomocí UHPLC/MS/MS. Podmínky analýzy vycházely z předchozí optimalizace.

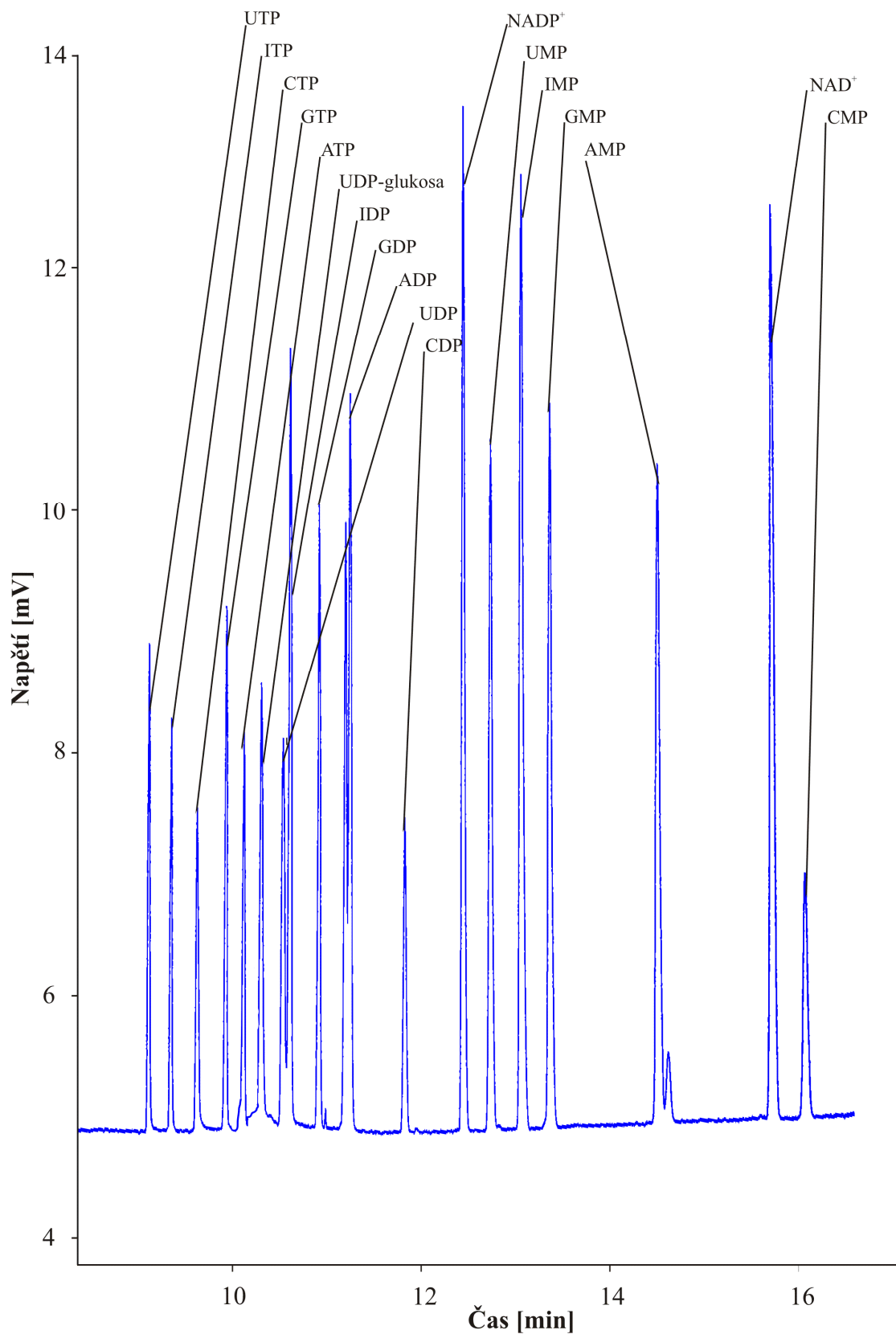
5 VÝSLEDKY

5.1 Analýza nukleotidů pomocí CE

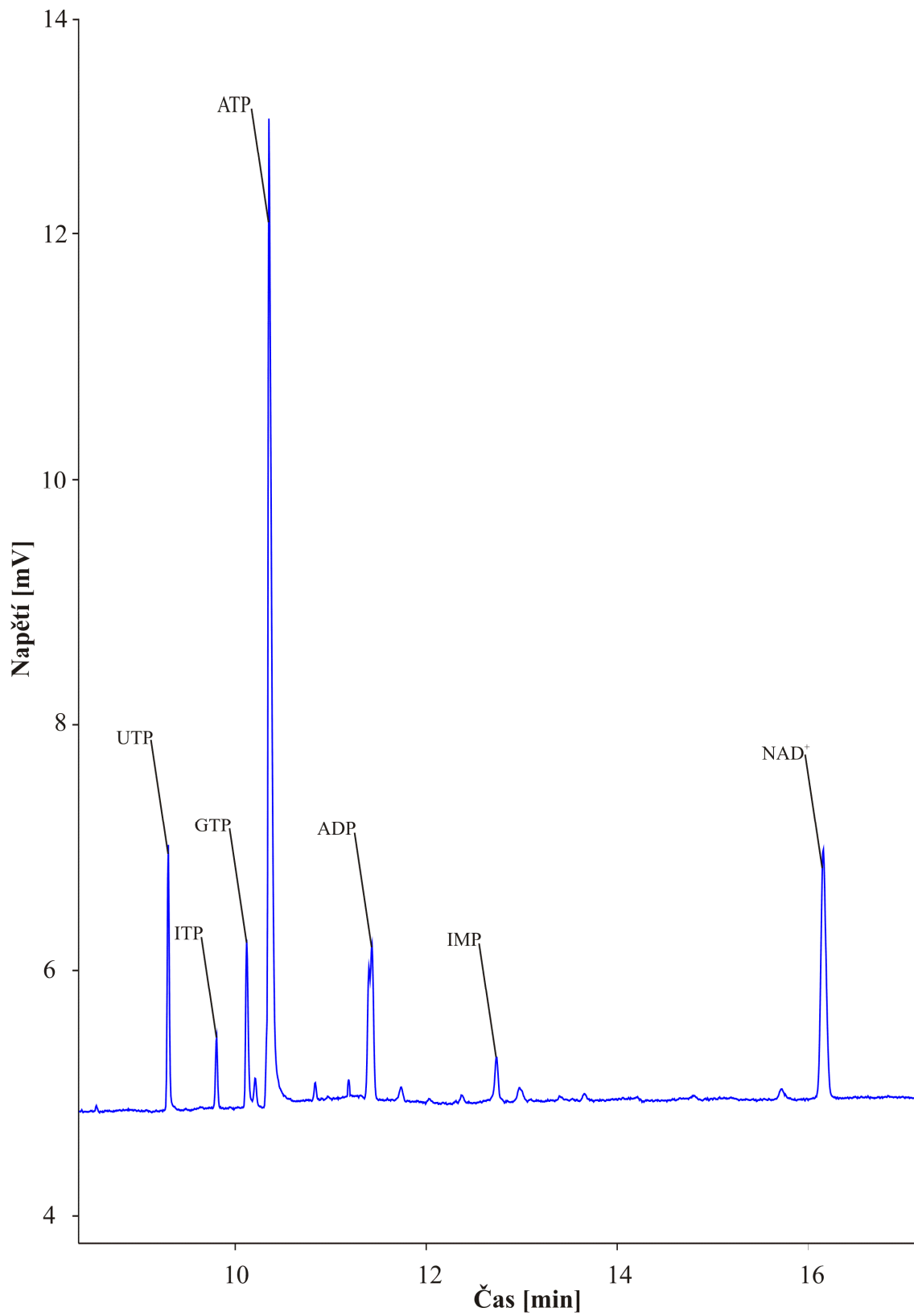
Jak již bylo řečeno v teoretické části této práce, důležitým krokem analýzy metabolomu většiny buněk je vhodné sklizení jejich populace a okamžité zastavení biochemické aktivity. Tento quenching metabolismu umožňuje zachovat kvalitní buněčný obsah pro další metabolickou analýzu. Ve většině laboratoří se však provádí pouhé sklizení buněčné populace pomocí roztoku trypsinu a poté extrakce metabolitů. Tento postup může mít za následek ztráty intracelulárních metabolitů a to v důsledku jejich vylučování do kultivačního média.

Prvním cílem experimentální části předkládané diplomové práce bylo studovat vliv trypsinizace a quenchingu na koncentrace intracelulárních nukleotidů v buňkách lidských kožních fibroblastů a zjistit, zda je metabolický quenching opravdu zásadním krokem metabolické analýzy. Ke studiu byly získány HSF od zdravých jedinců sklizené metodou trypsinizace a quenchingu, jak je uvedeno v kapitole Materiál a metodika. K analýze intracelulárních nukleotidů byla použita CE s UV detekcí. Nukleotidy byly identifikovány na základě srovnání migračních časů se známou směsí standardů, taktéž analyzovanou pomocí CE (Obr. 6).

U trypsinizovaných i quenčovanych buněk byly identifikovány stejné látky. Jednalo se o UTP, ITP, GTP, ATP, ADP, IMP a NAD^+ (Obr. 7).



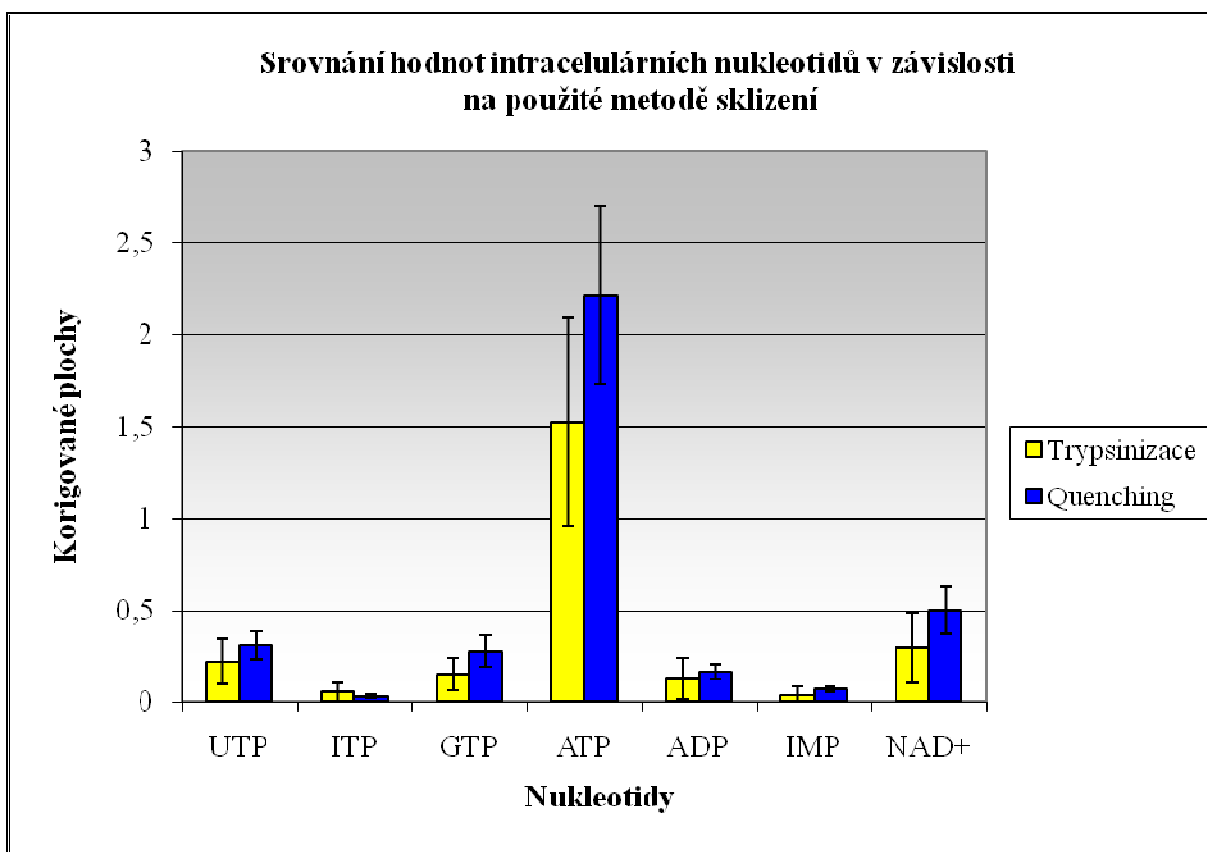
Obr. 6: Analýza směsi nukleotidových standardů pomocí CE.



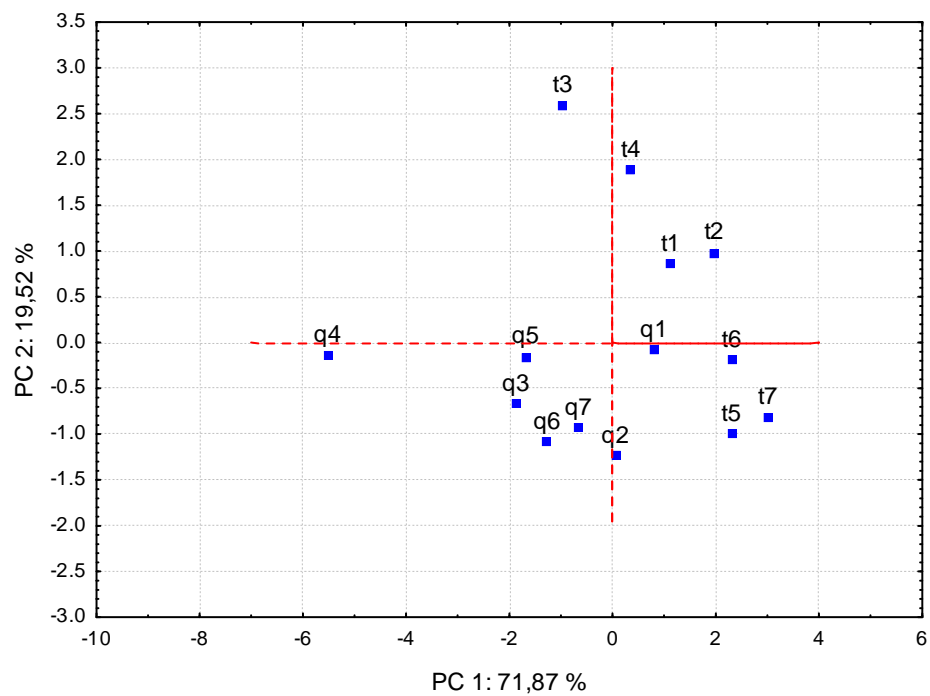
Obr. 7: Analýza extraktu fibroblastů pomocí CE.

Z elektroforegramů byly odečteny plochy jednotlivých píků a korigovány na migrační čas. Následně byl sestaven graf z průměrů korigovaných ploch nukleotidů u trypsinizovaných a quenčováných buněk (Obr. 8). Vyhodnocení výsledků bylo dále provedeno pomocí PCA analýzy (Obr. 9, 10).

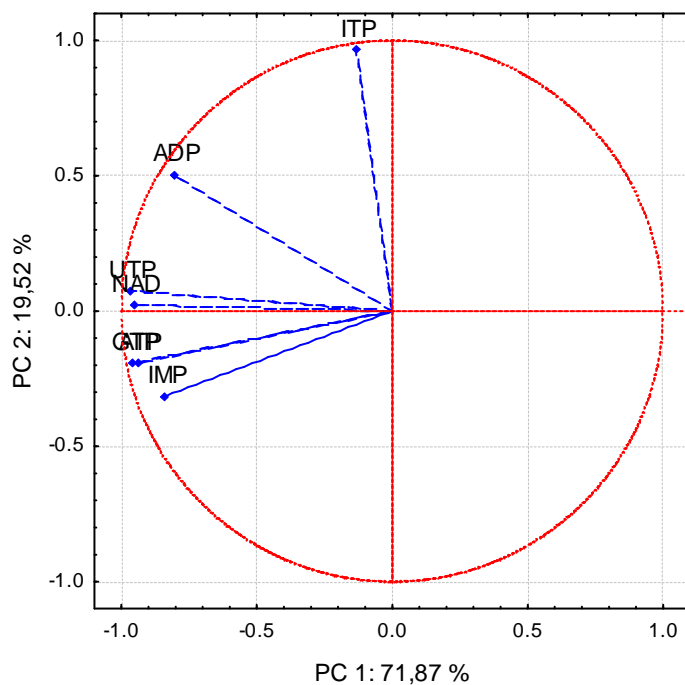
Bylo zjištěno, že oba způsoby sklizení buněk lze od sebe odlišit. Mezi quenčovánými vzorky byla pozorována menší variabilita ve srovnání s trypsinizovanými (nižší směrodatné odchylky odpovídající kratším chybovým úsečkám; Obr. 8). Tato skutečnost byla potvrzena PCA analýzou. Na obrázcích je možné pozorovat projekci případů (Obr. 9) a proměnných (Obr. 10) do komponentní roviny pro obě metody sklizení buněk. Celkové procento vysvětlené variability je 91,39 %. Dále bylo zjištěno, že quenching 4 je odlehlá hodnota, což mohlo být způsobeno chybou provedení quenchingu či měření. Naměřené hodnoty pro ATP a GTP spolu korelují.



Obr. 8: Srovnání hladin intracelulárních nukleotidů v buňkách sklizených trypsinizací a quenchingem.



Obr. 9: Projekce případů do komponentní roviny – porovnání metod sklizení (q – quenching, t – trypsinizace).



Obr. 10: Projekce proměnných do komponentní roviny – porovnání metod sklizení.

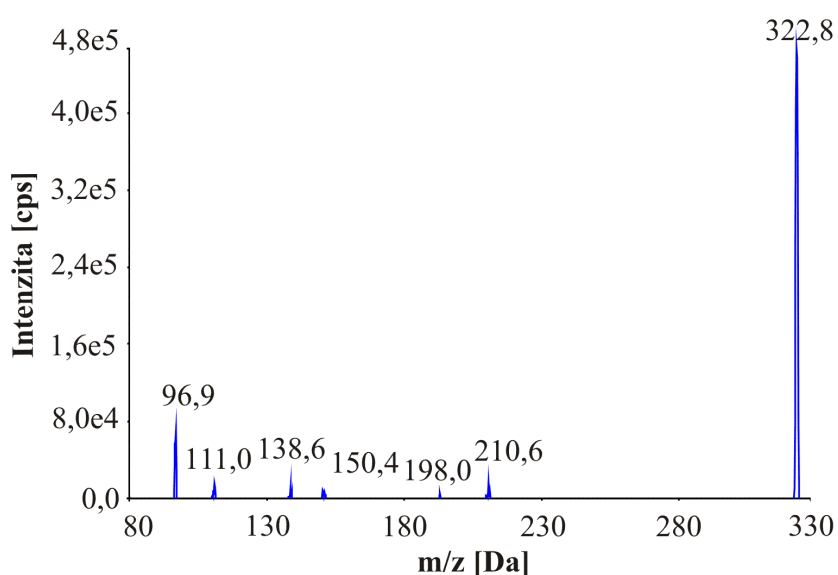
5.2 Analýza nukleotidů pomocí UHPLC/MS/MS

K moderním analytickým technikám patří UHPLC/MS/MS, která je velmi často využívána pro diagnostiku dědičných metabolických poruch a pro studium metabolomu biologických systémů. Dalším cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodu pro analýzu látek nukleotidového charakteru. Optimalizovaná metoda byla poté aplikována na reálné vzorky – extrakty buněk fibroblastů a erytrocytů.

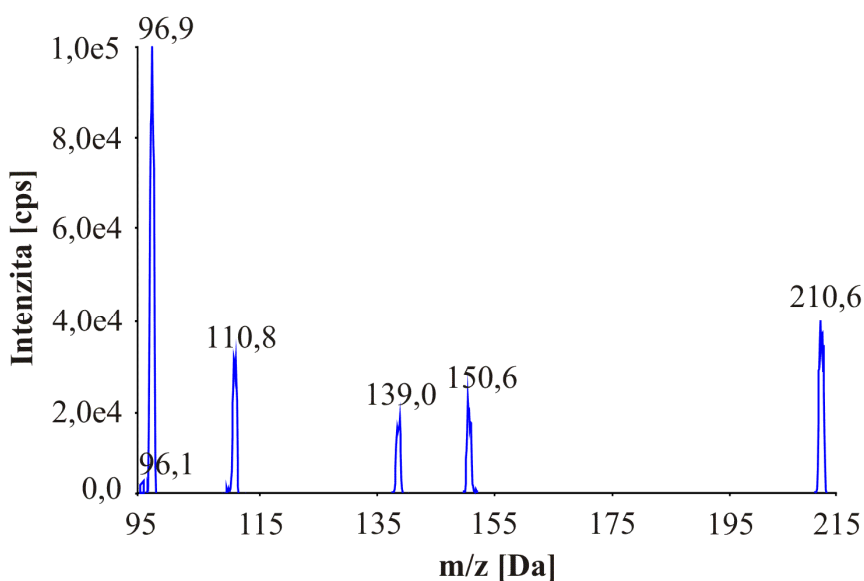
5.2.1 Optimalizace podmínek MS/MS

Nejdříve bylo nutné optimalizovat parametry MS/MS pro analýzu nukleotidů. Nukleotidové standardy v kyselém a alkalickém pufru byly dávkovány přímo do iontového zdroje MS/MS a měřeny v pozitivním a negativním módu, jak je uvedeno v kapitole Materiál a metodika. Za účelem nalezení optimálních MRM přechodů byla změřena hmotnostní spektra všech studovaných látek a fragmentační spektra molekulových iontů.

Jako příklad uvádím hmotnostní (Obr. 11) a fragmentační (Obr. 12) spektrum UMP. Hmotnostní spektrum UMP představuje deprotonovaný molekulární ion ($m/z = 322,8$ Da) a produktové ionty získané po jeho fragmentaci. Pro další analýzu byl na základě intenzity vybrán produktový ion s poměrem $m/z = 96,9$ Da. Tento fragment odpovídá fosfátu, který se odštěpil z UMP.

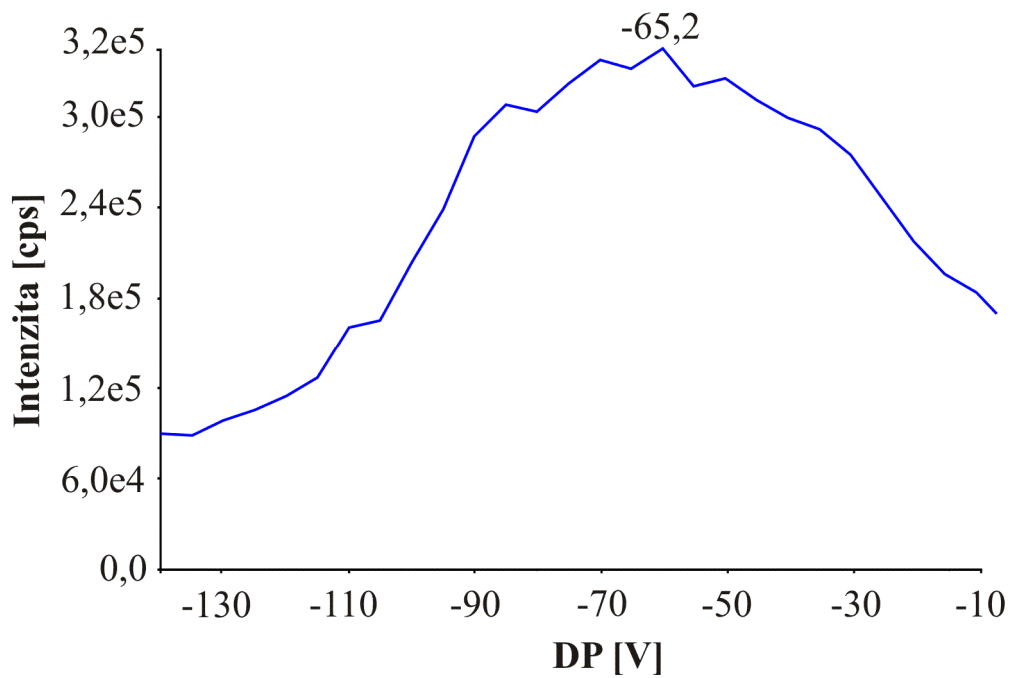


Obr. 11: Hmotnostní spektrum UMP (negativní mód).

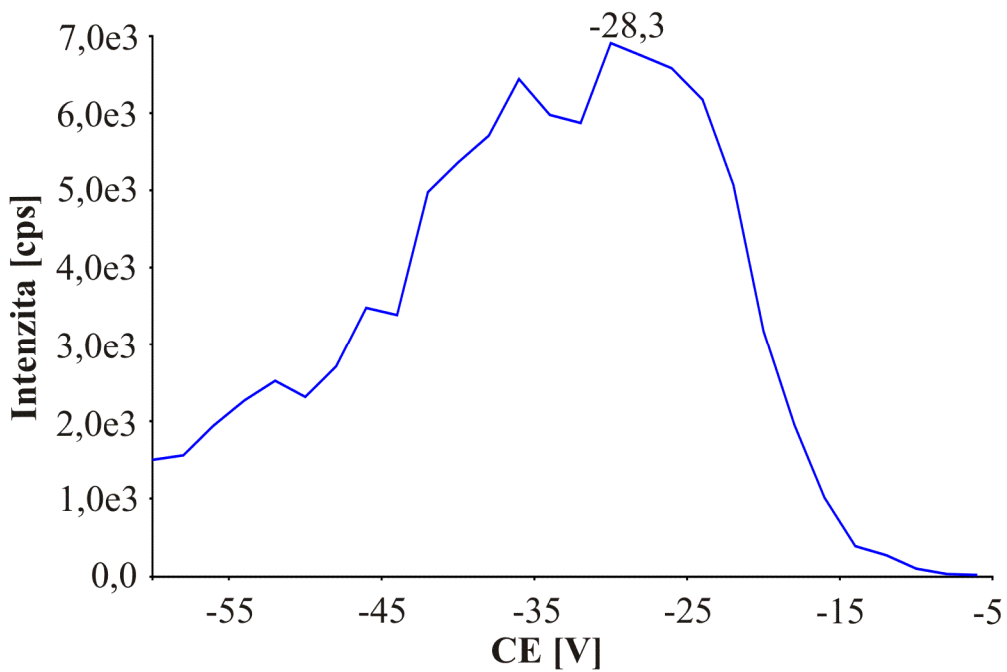


Obr. 12: Fragmentační spektrum molekulového iontu UMP (negativní mód).

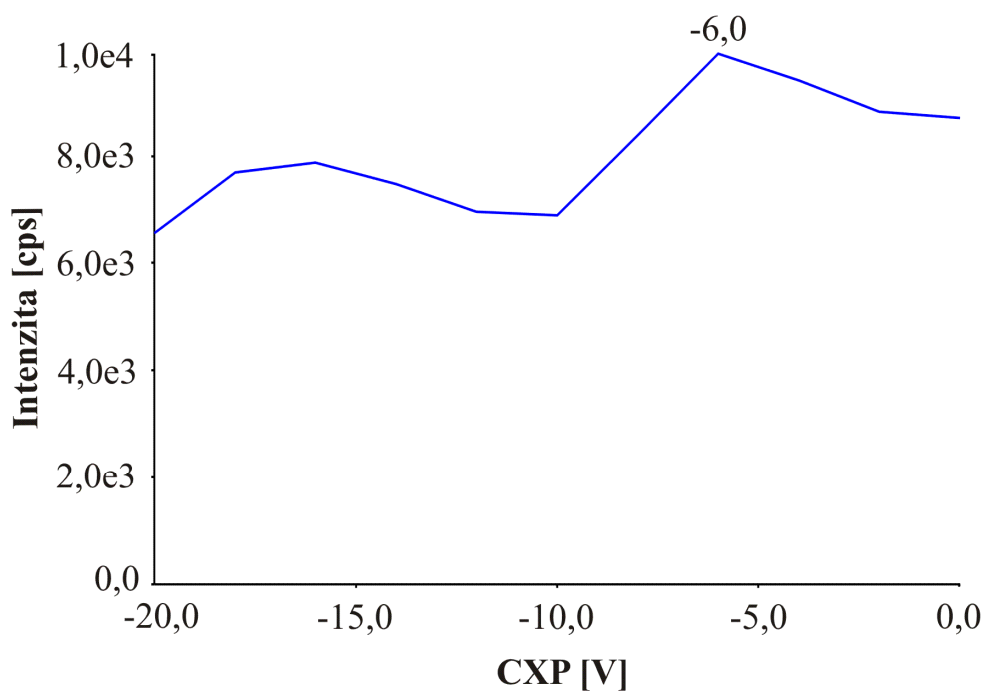
Na základě intenzity signálu jednotlivých fragmentů bylo zjištěno, že nukleotidy se nejlépe štěpí, pokud jsou naředěny alkalickým pufrem a jsou měřeny v negativním módu. Z optimalizace v tomto módu byl pro každou látku vybrán jeden nejintenzivnější MRM přechod. Současně s výběrem vhodných MRM přechodů byl přístrojem automaticky optimalizován deklasterační potenciál (declustering potential, DP), vstupní potenciál (entrance potential, EP), kolizní energie (collision energy, CE) a výstupní potenciál kolizní cely (collision cell exit potential, CXP) pro každý přechod. Jako příklad uvádím optimalizaci DP (Obr. 13), CE (Obr. 14) a CXP (Obr.15) pro UMP. Přehled vybraných MRM přechodů analyzovaných nukleotidů a optimalizované hodnoty DP, EP, CE a CXP jsou shrnuty v tabulce (Tab. II). Dále byly optimalizovány hodnoty tlaku kolizního plynu (collision gas pressure, CAD), zmlžujícího (nebulizing gas, GS1) a sušícího plynu (heater gas, GS2), „curtain gas“ (CUR), teploty zmlžujícího plynu (source temperature, TEM) a napětí na kapiláře v iontovém zdroji (ion spray voltage, IS; Tab. III).



Obr. 13: Optimalizace DP pro UMP v rozmezí -140 až -10 V. Byla zvolena hodnota -65 V.



Obr. 14: Optimalizace CE pro UMP v rozmezí -50 až -5 V. Byla zvolena hodnota -28 V.



Obr. 15: Optimalizace CXP pro UMP v rozmezí -20 až 0 V. Byla zvolena hodnota -6 V.

Tab. II: Optimalizované parametry MS/MS pro jednotlivé nukleotidy.

Metabolit	MRM [Da]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
ADP	425,8→158,8	-75	-10	-36	-6
AMP	345,9→96,9	-75	-10	-28	-4
ATP	505,8→158,7	-65	-10	-36	-6
CDP	401,9→158,7	-35	-10	-36	-6
CMP	321,8→96,8	-70	-10	-28	-6
CMP-N-acetylneuraminát	612,9→321,8	-60	-10	-30	-18
CTP	481,8→158,8	-80	-10	-36	-4
dADP	409,8→158,7	-60	-10	-36	-8
dAMP	329,9→194,6	-55	-10	-22	-10
dATP	489,8→158,7	-85	-10	-38	-8
dCDP	385,8→158,7	-80	-10	-36	-4
dCMP	305,8→96,8	-65	-10	-30	-6
dCTP	465,8→158,9	-85	-10	-38	-6
dGDP	425,9→158,8	-80	-10	-36	-6
dGMP	345,9→96,9	-55	-10	-36	-2
dGTP	505,8→158,7	-75	-10	-38	-6
dITP	490,9→158,6	-75	-10	-38	-6
dTDP	400,9→158,6	-30	-10	-36	-6
dTMP	320,8→96,9	-55	-10	-36	-16
dTTP	480,8→158,5	-70	-10	-42	-6
dUMP	306,8→96,8	-60	-10	-38	-16

Metabolit	MRM [Da]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
dUTP	466,8→158,5	-60	-10	-36	0
FAD	783,9→345,8	-75	-10	-46	-20
GDP	441,9→149,9	-60	-10	-36	-6
GDP-L-fucosa	587,9→158,7	-95	-10	-60	-6
GDP-mannosa	604,0→424,0	-100	-10	-42	-18
GMP	361,9→96,7	-45	-10	-38	-16
GTP	521,9→158,7	-85	-10	-40	-6
IDP	426,9→158,9	-80	-10	-36	-6
IMP	346,9→96,9	-75	-10	-28	-6
ITP	506,9→159,0	-80	-10	-38	-4
NAD+	662,9→540,2	-55	-10	-20	-10
NADH	663,9→407,7	-110	-10	-42	-20
NADP+	742,9→620,8	-70	-10	-26	-10
NADPH	743,8→407,9	-110	-10	-50	-18
UDP	403,0→158,6	-45	-10	-36	-6
UDP-D-galactosa	564,9→96,8	-80	-10	-56	-2
UDP-glucosa	564,9→322,8	-85	-10	-34	-18
UDP-glucuronát	578,9→402,9	-70	-10	-34	-18
UDP-N-acetyl-D-glucosamin	605,9→384,8	-100	-10	-40	-18
UMP	322,8→96,9	-65	-10	-28	-6
UTP	482,8→158,8	-70	-10	-36	-8

Tab. III: Optimalizované parametry MS/MS.

CAD [psi]	GS1 [psi]	GS2 [psi]	CUR [psi]	TEM [°C]	IS [V]
6	40	30	15	500	-4500

5.2.2 Optimalizace podmínek UHPLC

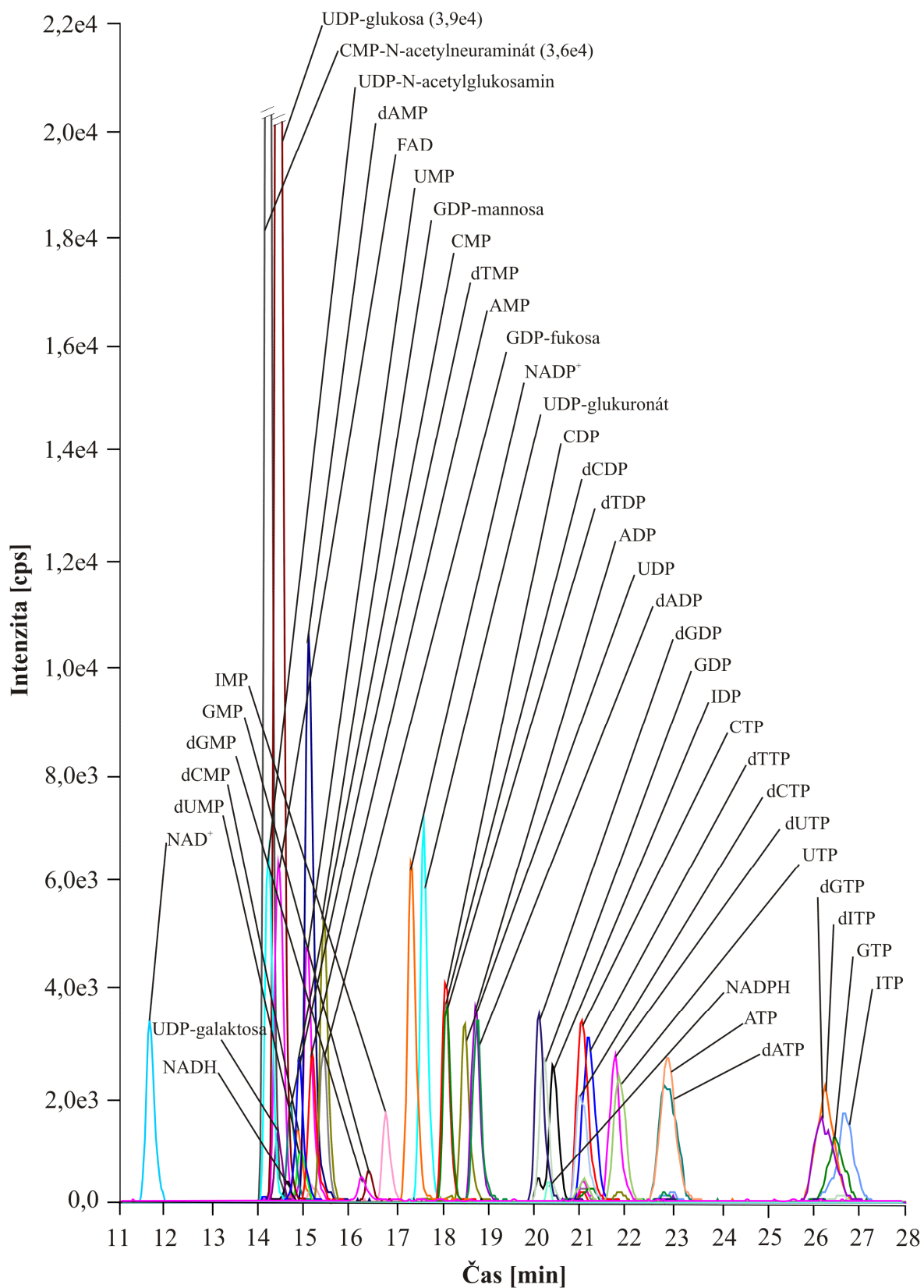
Dalším krokem optimalizace byl výběr vhodných podmínek pro UHPLC separaci nukleotidů. Byl modifikován již dříve publikovaný postup (Bajad *et al.*, 2006). Pro experimenty byla zvolena kolona Luna s aminopropylovou (NH₂) stacionární fází a velikostí částic 3 μm. Teplota kolony byla nastavena na 30 °C a tlak se při separaci pohyboval okolo 190 Pa.

Jako vodná mobilní fáze A byl použit 20 mmol/l acetát amonný pH 9,45. Mobilní fáze B se skládala z 85 % AcCN a 15 % mobilní fáze A, jak je uvedeno v kapitole Materiál a metodika. Byla použita lineární gradientová eluce, která začala v čase 0 min se 100 % B a klesala po dobu 15 min k 5 % B. Tento stav byl udržován v čase 15–29,3 min. V době

29,3–30,3 min byl systém navrácen k iniciálním podmínkám (100 % B). Kolona byla ekvilibrována 4 min před další injekcí. Celková délka analýzy byla 34,3 min. Průtok byl nastaven na 0,1 ml/min a množství nastříkovaného vzorku činilo 3 μ l.

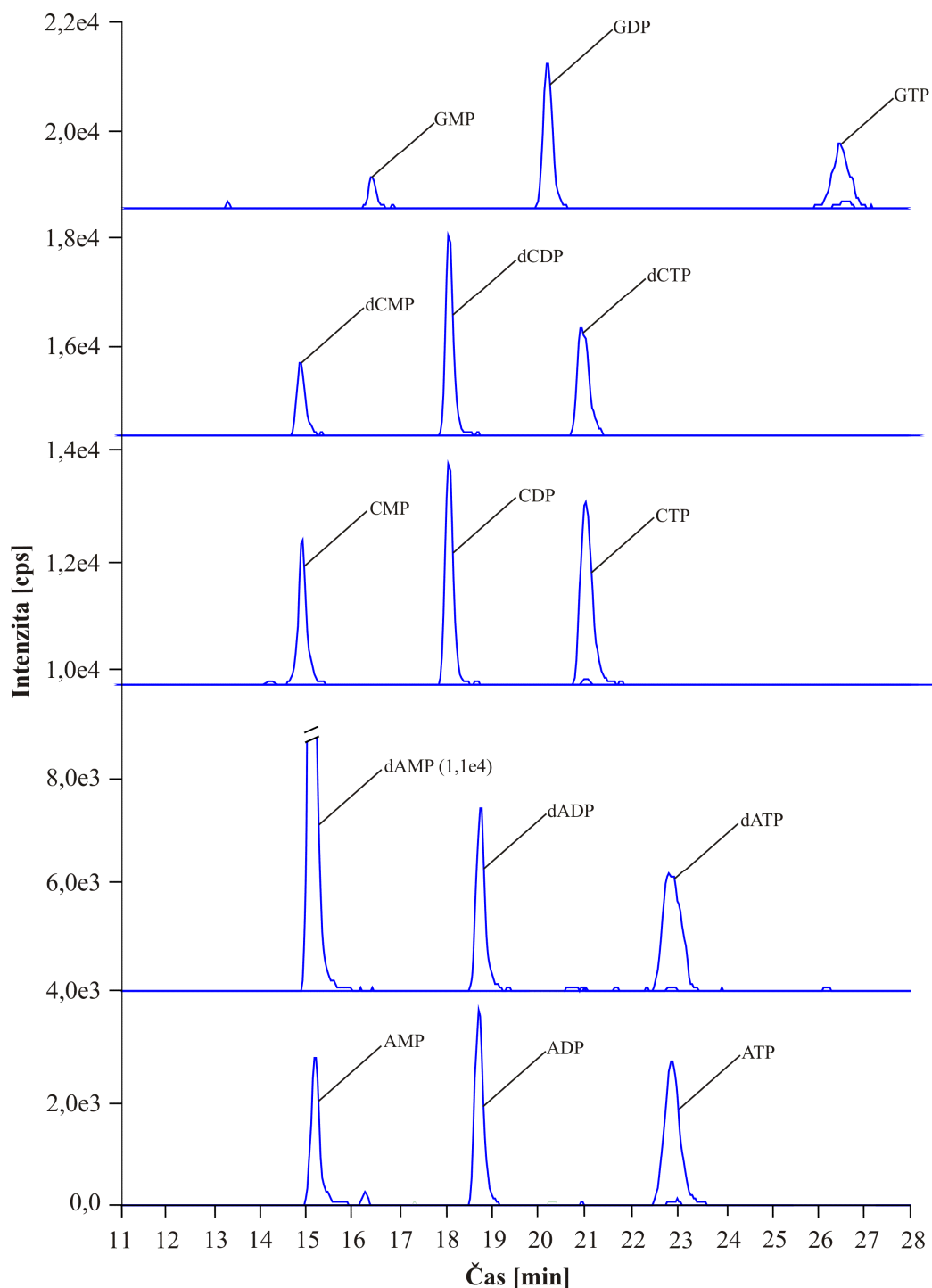
5.2.3 Analýza směsi standardů

Směs nukleotidových standardů byla analyzována pomocí UHPLC/MS/MS za optimalizovaných podmínek. Touto metodou se podařilo identifikovat na základě MRM přechodů a retenčních časů všechny studované nukleotidy (Obr. 16).

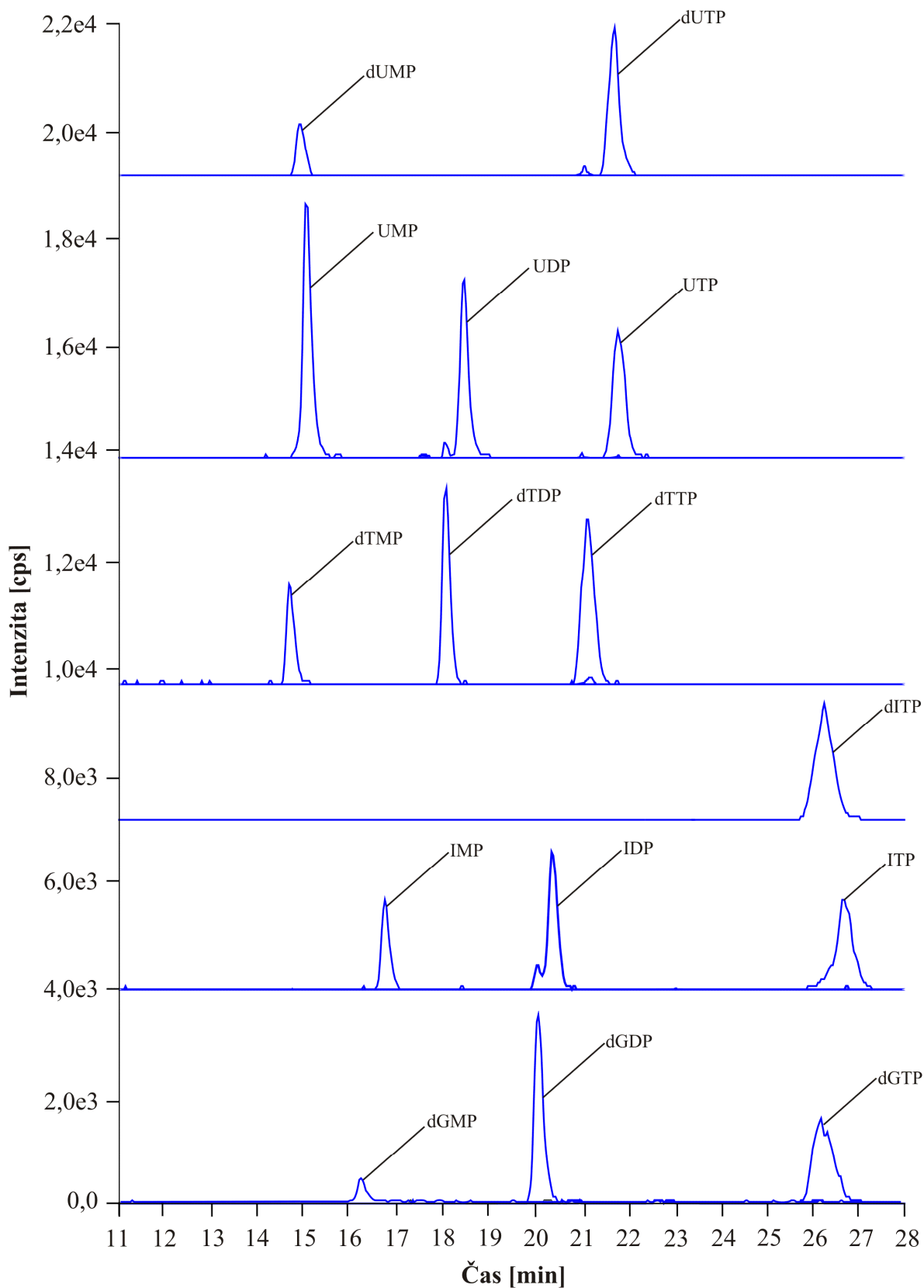


Obr. 16: Analýza směsi nukleotidových standardů pomocí UHPLC/MS/MS za optimalizovaných podmínek.

Za optimalizovaných podmínek bylo možné separovat nukleotidy odvozené od stejné báze (Obr. 17, 18).

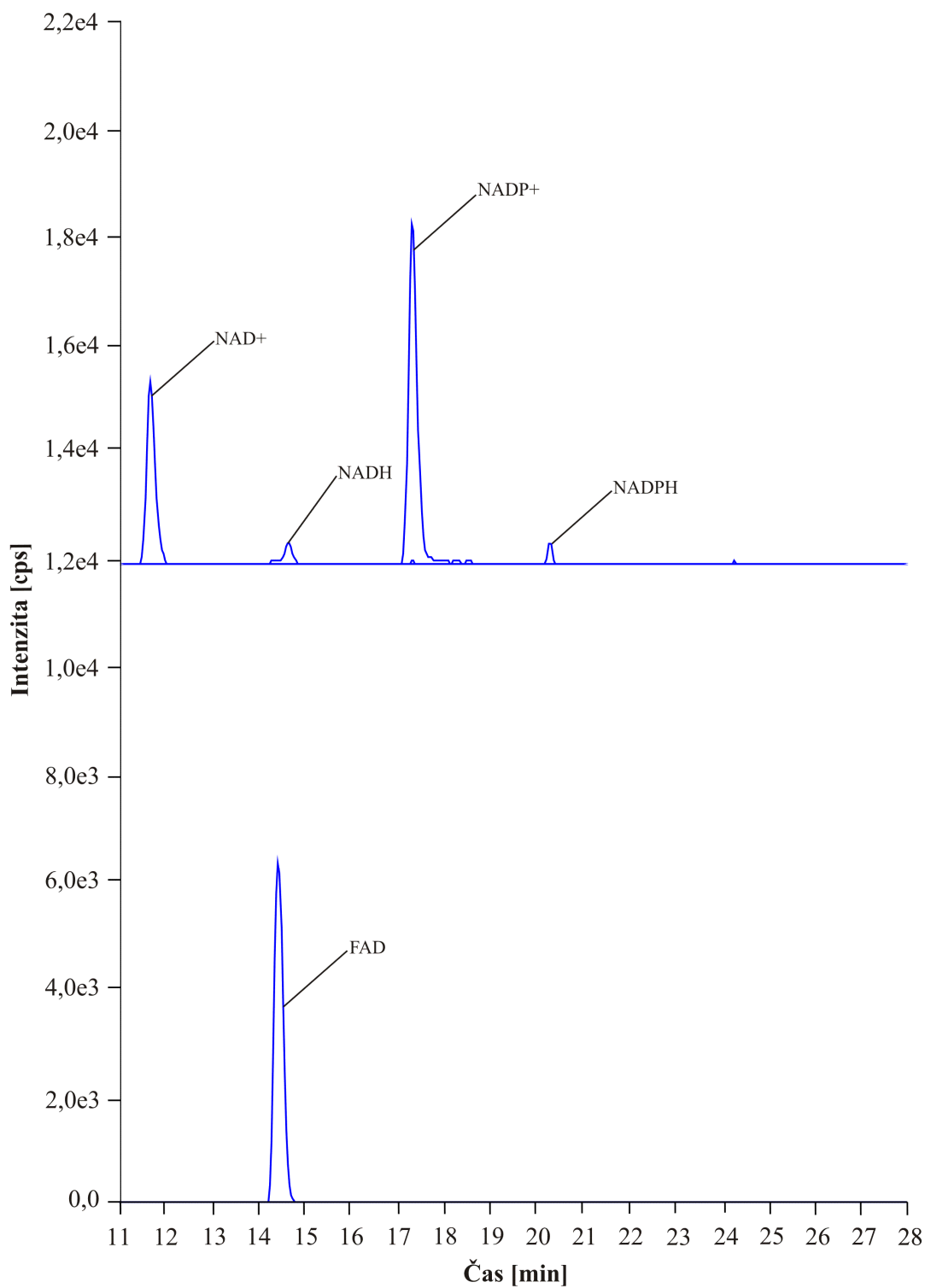


Obr. 17: Analýza nukleotidů odvozených od adeninu, cytosinu a guaninu pomocí UHPLC/MS/MS za optimalizovaných podmínek.

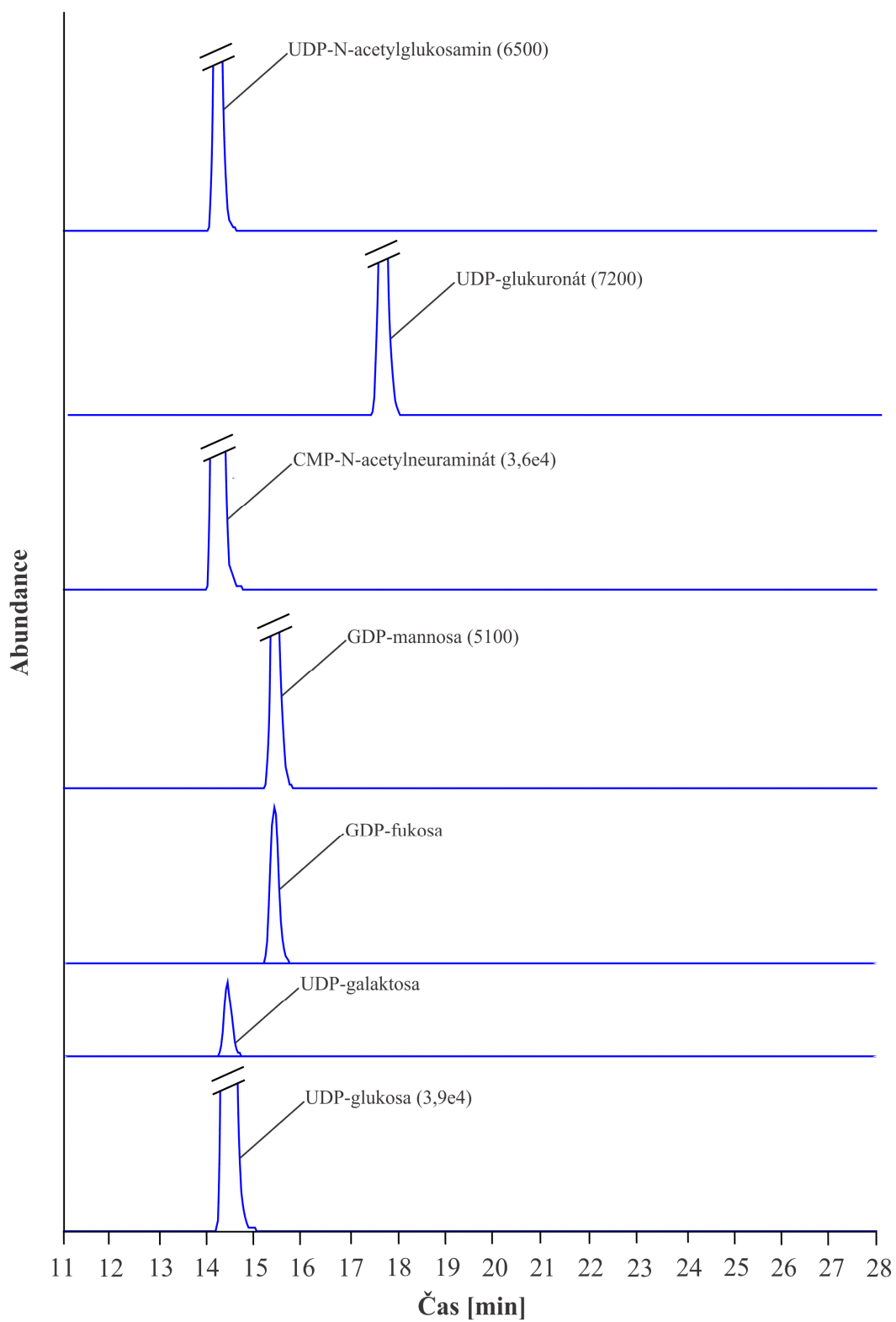


Obr. 18: Analýza nukleotidů odvozených od guaninu, inosinu, thyminu a uracilu pomocí UHPLC/MS/MS za optimalizovaných podmínek.

Dále se podařilo od sebe oddělit vybrané koenzymy (Obr. 19) a nukleotidové deriváty (Obr. 20).



Obr. 19: Analýza koenzymů pomocí UHPLC/MS/MS za optimalizovaných podmínek.



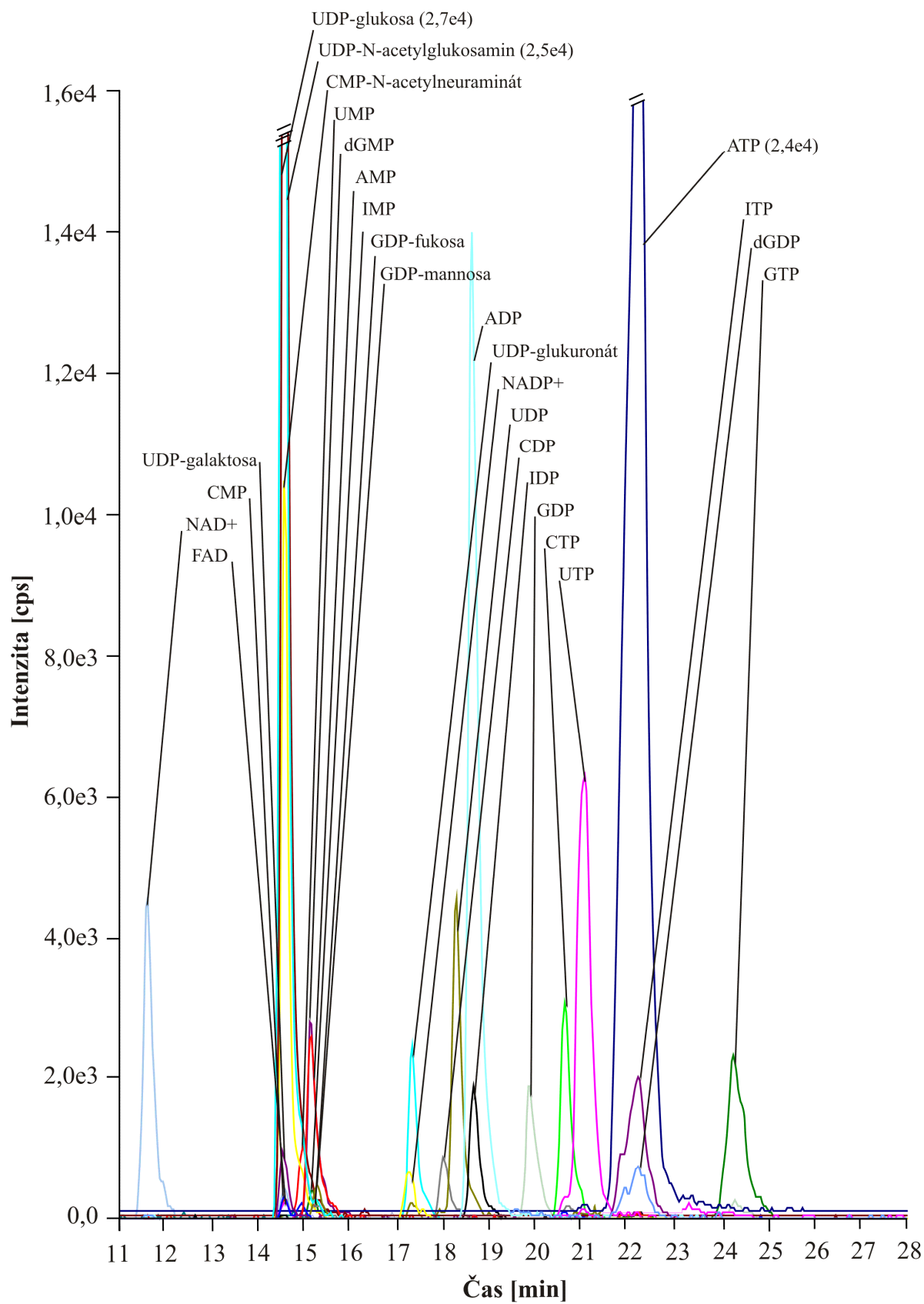
Obr. 20: Analýza nukleotidových derivátů pomocí UHPLC/MS/MS za optimalizovaných podmínek.

Pro některé nukleotidy se shodnou molekulovou hmotností byl vybrán stejný MRM přechod. Tyto látky však bylo možné od sebe rozlišit pomocí retenčního času (retention time, RT), který byl zjištěn analýzou čtyř dílčích směsí, v nichž se tyto látky nevyskytovaly současně. Jednalo se o nukleotidy s MRM přechodem 345,9→96,9 Da (AMP – RT 15 min, dGMP – RT 16 min), 425,8→158,8 Da (ADP – RT 18 min, dGDP – RT 20 min) a 505,8→158,7 Da (ATP – RT 23 min, dGTP – RT 26 min).

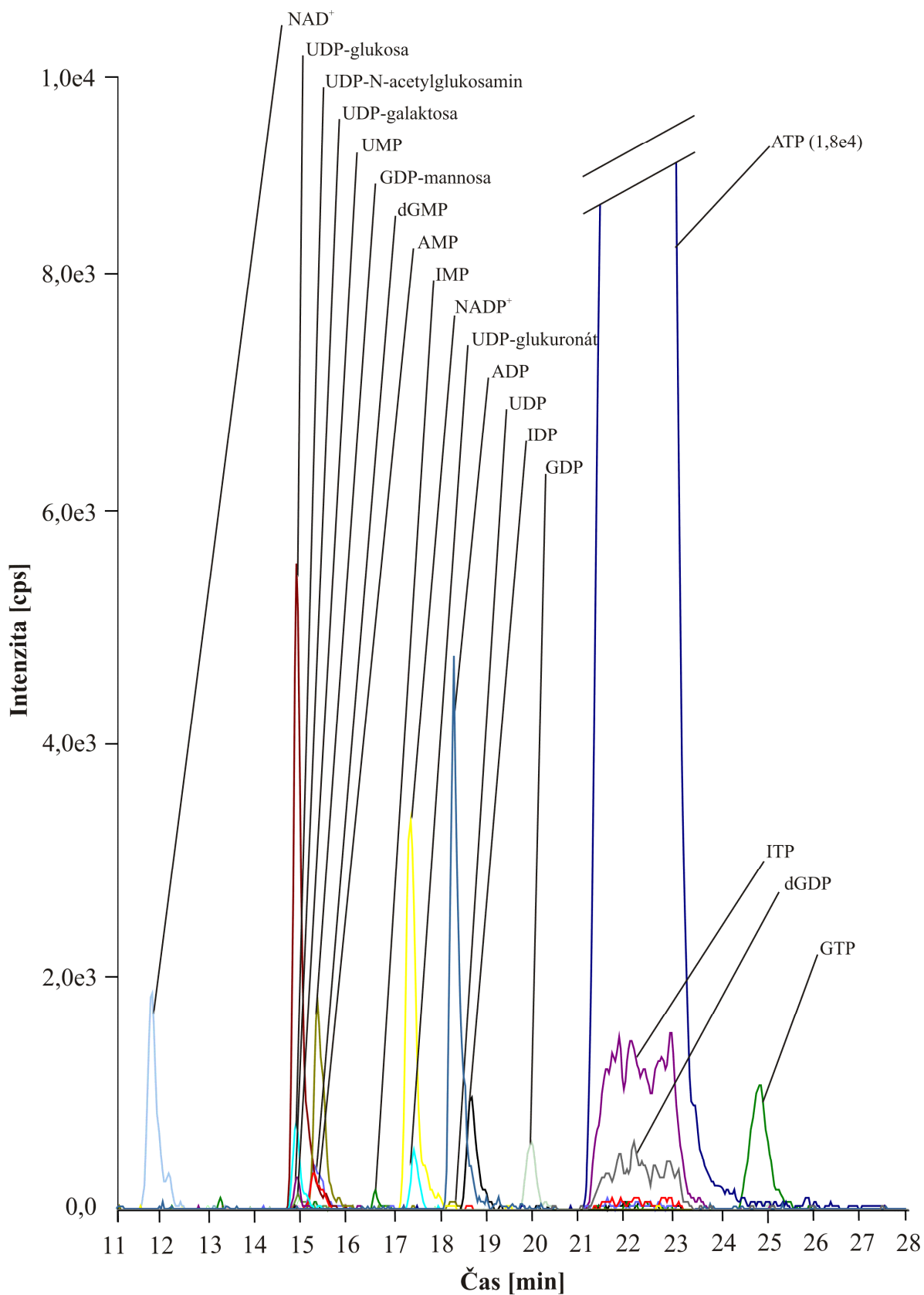
Před zavedením optimalizované UHPLC/MS/MS pro analýzu nukleotidů do běžné laboratorní praxe bude nutné tuto metodu validovat. Při validaci bude posouzeno, zda je tato analytická metoda dostatečně přesná a správná.

5.2.4 Analýza reálných vzorků

Optimalizované podmínky systému UHPLC/MS/MS bylo nutné prakticky ověřit. Vytvořená metoda byla použita k analýze intracelulárních nukleotidů v extraktech buněk fibroblastů sklizených quenchingem (Obr. 21) a erytrocytů (Obr. 22).



Obr. 21: Analýza reálného vzorku fibroblastů pomocí UHPLC/MS/MS.



Obr. 22: Analýza reálného vzorku erytrocytů pomocí UHPLC/MS/MS.

Při analýze extraktu fibroblastů byly identifikovány následující látky: AMP, ADP, ATP, CMP, CDP, CTP, dGMP, dGDP, GDP, GTP, IMP, IDP, ITP, UMP, UDP, UTP, FAD, NAD⁺, NADP⁺, CMP-N-acetylneuraminát, GDP-fukosa, GDP-mannosa, UDP-galaktosa, UDP-glukosa, UDP-glukuronát, UDP-N-acetylglukosamin. Největší intenzitu měla UDP-glukosa. V extraktu erytrocytů byly obsaženy tyto nukleotidy: AMP, ADP, ATP, dGMP, dGDP, GDP, GTP, IMP, IDP, ITP, UMP, UDP, NAD⁺, NADP⁺, GDP-mannosa, UDP-galaktosa, UDP-glukosa, UDP-glukuronát, UDP-N-acetylglukosamin. Největší intenzitu měl ATP.

6 DISKUZE

6.1 Srovnání metod quenchingu a trypsinizace

Materiálem pro studium metabolomu velmi často bývají různé buněčné populace, které lze pěstovat v přesně definovaném prostředí za jednoznačně stanovených podmínek. Jednu z nich reprezentují lidské kožní fibroblasty. HSF patří mezi adherentní buňky, které je před samotnou analýzou nutné určitým způsobem „sklidit“, tedy oddělit od kultivační nádoby, a poté extrahovat jejich intracelulární metabolity (Cooper *et al.*, 1991). Prvním cílem experimentální části předkládané diplomové práce bylo testovat vliv metod sklizení a zastavení buněčného metabolismu na koncentrace intracelulárních nukleotidů. Fibroblasty byly sklizeny trypsinizací a quenchingem ledovým 60% methanolem. Trypsinizace je standardně zavedena v běžné laboratorní praxi. Provádí se pomocí roztoku trypsinu, který efektivně přeruší vazby buněk se stěnou kultivační nádoby. Následuje extrakce vhodným solventem, při které je získán intracelulární obsah. Tato metoda je však poměrně časově náročná. Navíc působení trypsinu může vyvolat u buněk šok, což má za následek změny hladin metabolitů (metabolity jsou vylučovány do média).

Další variantou sklizení buněk je metabolický quenching. Velmi často používaná quenčovací metoda je založena na aplikaci ledového vodného roztoku methanolu různých koncentrací. Výhoda tohoto quenchingu spočívá ve velmi rychlém zastavení metabolických reakcí. U buněk však může nastat chladový šok způsobený nízkou teplotou solventu (Hans *et al.*, 2001; Wittmann *et al.*, 2004). Následkem toho dochází ke změnám buněčné integrity a tím i ke ztrátám intracelulárních metabolitů. Tento fenomén byl potvrzen u gramnegativních (*Escherichia coli*) nebo grampozitivních (*Bacillus subtilis*) bakterií (Leder, 1972; Wittmann *et al.*, 2004). U lidských buněk však nebyl dosud prokázán negativní vliv tohoto quenchingu, což potvrzuje i další studie, kde byla tato metoda sklizení aplikována na populaci kožních fibroblastů infikovaných lidským cytomegalovirem (Munger *et al.*, 2006).

Pomocí PCA analýzy bylo zjištěno, že oba způsoby sklizení buněk lze od sebe odlišit. Mezi quenčovanými vzorky byla pozorována menší variabilita ve srovnání s trypsinizovanými.

6.2 Analýza nukleotidů pomocí UHPLC/MS/MS

V současné době je na trhu k dispozici mnoho přístrojů, které se v metabolomice využívají pro diagnostické i výzkumné účely. Hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem a trojitým kvadrupólem je poměrně levný a podává dostačující výsledky. K jeho hlavním výhodám patří možnost analýzy širokého spektra látek, jednoduchá příprava vzorků a vysoká specifita ve spojení se separační technikou (Ho *et al.*, 2003). Nevýhodou je nesnadná identifikace neznámých látek.

V této práci byla dále optimalizována metoda pro analýzu látek nukleotidového charakteru pomocí UHPLC/MS/MS. Jak bylo řečeno dříve, vycházelo se z již publikovaného postupu (Bajad *et al.*, 2006). MRM přechody získané pomocí optimalizace na tandemovém hmotnostním spektrometru se shodovaly s publikací. Metoda však byla příliš časově náročná (50 min), proto bylo nutné analýzu zkrátit. Toho bylo docíleno změnami podmínek gradientové eluce, teploty a délky kolony. Celková délka analýzy po úpravě separačních podmínek činila 34,3 min.

7 ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byly shrnuty poznatky o moderní vědní disciplíně – metabolomice. Pozornost byla věnována nejběžnějším metabolomickým technikám analýzy vzorků a postupům zpracování dat. Byl zmíněn také stručný přehled o lidských kožních fibroblastech.

V experimentální části práce byly analyzovány nukleotidy dvěma metodami – kapilární elektroforézou a ultraúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Pomocí kapilární elektroforézy byl zkoumán vliv metod sklizení buněk na intracelulární nukleotidový obsah. K analýzám byly použity extrakty lidských kožních fibroblastů od zdravých jedinců. Buňky byly sklizeny dvěma metodami, trypsinizací a quenchingem ledovým 60% methanolem. Pomocí PCA analýzy bylo zjištěno, že oba způsoby sklizení buněk lze od sebe odlišit. Mezi quenčoványými vzorky byla pozorována menší variabilita ve srovnání s trypsinizovanými.

Dále byla vyvíjena metoda pro analýzu látek nukleotidového charakteru pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Nejprve byly optimalizovány podmínky pro modelovou směs standardů. Optimalizovaná metoda byla následně aplikována na reálné vzorky – extrakty fibroblastů a erytrocytů.

8 LITERATURA

- Bajad SU, Lu W, Kimball EH, Yuan J, Peterson C, Rabinowitz JD (2006): Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1125: 76–88.
- Canelas AB, Ras C, ten Pierick A, van Dam JC, Heijnen JJ, van Gulik WM (2008): Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics. *Metabolomics* 4: 226–239.
- Cooper ML, Hansbrough JF, Spielvogel RL, Cohen R, Bartel RL, Naughton G (1991): In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. *Biomaterials* 12: 243–248.
- Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD (2007): Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews* 26: 51–78.
- Dettmer K, Hammock BD (2004): Metabolomics – a new exciting field within the "omics" sciences. *Environmental Health Perspectives* 112: 396–397.
- Dunn, WB, Ellis DI (2005): Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry* 24: 285–294.
- El-Ghalbzouri A, Gibbs S, Lamme E, Van Blitterswijk CA, Ponc M (2002): Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. *British Journal of Dermatology* 147: 230–243.
- Enestein J, Furcht LT (1984): Isolation and characterization of epinectin, a novel adhesion protein for epithelial cells. *The Journal of Cell Biology* 99: 464–470.
- Fiehn O (2002): Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48:155–171.
- Fleischmajer R, Schechter A, Bruns M, Perlish JS, Macdonald ED, Pan TC, Timpl R, Chu ML (1995): Skin fibroblasts are the only source of nidogen during early basal lamina formation in vitro. *Journal of Investigative Dermatology* 105: 597–601.

- Friedecký D, Tomková J, Maier V, Janošťáková A, Procházka M, Adam T (2007): Capillary electrophoretic method for nucleotide analysis in cells: application on inherited metabolic disorders. *Electrophoresis* 3: 373–380.
- Garcia DE, Baidoo EE, Benke PI, Pingitore F, Tang YJ, Villa S, Keasling JD (2008): Separation and mass spectrometry in microbial metabolomics. *Current Opinion in Microbiology* 11: 233–239.
- García-Pérez I, Vallejo M, García A, Legido-Quigley C, Barbas C (2008): Metabolic fingerprinting with capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1204: 130–139.
- Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB (2004): Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology* 22: 245–252.
- Griffin JL, Kauppinen RA (2007): Tumour metabolomics in animal models of human cancer. *Journal of Proteome Research* 6: 498–505.
- Griffiths B (1992): Alternative strategies to the scaleup of animal cells. *The New York Academy of Sciences* 665: 364–370.
- Hall R, Beale M, Fiehn O, Hardy N, Sumner L, Bino R (2002): Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies. *The Plant Cell* 14: 1437–1440.
- Hans MA, Heinzle E, Wittmann C (2001): Quantification of intracellular amino acids in batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 776–779.
- Harrigan, G., G., Goodacre, R. (2003): *Metabolic profiling: its role in biomarker. Discovery and gene function analysis*. Kluwer Academic Publisher. ISBN: 978-1-4020-7370-0.
- Ho C, Lam C, Chan M, Cheung R, Law L, Lit L, Ng K, Suen M, Tai H (2003): Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews* 24: 3–12.
- Holčápek M, Jandera P (1998): Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy* 92: 278–286.

- Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO (2002): Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 12877–12882.
- Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR (1993): Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Molecular Biology of the Cell* 6: 637–645.
- Issaq HJ, Van QN, Waybright TJ, Muschik GM, Veenstra TD (2009): Analytical and statistical approaches to metabolomics research. *Journal of Separation Science* 32: 2183–2199.
- Jenkins MA (2009): Serum and urine electrophoresis for detection and identification of monoclonal proteins. *The Clinical Biochemist Reviews* 30: 119–122.
- Jewett MC, Hofmann G, Nielsen J (2006): Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 191–197.
- Kamleh MA, Dow JA, Watson DG (2009): Applications of mass spectrometry in metabolomic studies of animal model and invertebrate systems. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 8: 28–48.
- Kler RS, Jackson S, Bartlett K, Bindoff LA, Eaton S, Pourfarzam M, Frerman FE, Goodman SI, Watmough NJ, Turnbull DM (1991): Quantitation of acyl-CoA and acylcarnitine esters accumulated during abnormal mitochondrial fatty acid oxidation. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 22932–22938.
- Kretzmer G (2002) Industrial processes with animal cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 135–142.
- Leder IG (1972): Interrelated effects of cold shock and osmotic pressure on the permeability of the *Escherichia coli* membrane to permease accumulated substrates. *The Journal of Bacteriology* 111: 211–219.
- Linscheid M, Westmoreland DG (1994): Application of liquid chromatography-mass spectrometry. *Pure and Applied Chemistry* 66: 1913–1930.

- Mashego MR, Rumbold K, De Mey M, Vandamme E, Soetaert W, Heijnen JJ (2007): Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnology Letters* 29: 1–16.
- Masopust J, Průša R (2003): *Patobiochemie buňky*. Vydala 2. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha. ISBN 80-239-1011-0.
- Monton MR, Soga T (2007): Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1168: 237–246.
- Moussad EE, Brigstock DR (2000): Connective tissue growth factor: what's in a name? *Molecular Genetics and Metabolism* 71: 276–292.
- Munger J, Bajad SU, Coller HA, Shenk T, Rabinowitz JD (2006): Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection. *PLoS Pathogens* 2: e132.
- Oldiges M, Lütz S, Pflug S, Schroer K, Stein N, Wiendahl C (2007): Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 495–511.
- Ornitz DM, Itoh N (2001): Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2: Reviews 3005.
- Pilátová K (2008): *Metabolomika*. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně.
- Rabinowitz JD (2007): Cellular metabolomics of *Escherichia coli*. *Expert Review of Proteomics* 4: 187–198.
- Rabinowitz JD, Kimball E (2007): Acidic acetonitrile for cellular metabolome extraction from *Escherichia coli*. *Analytical Chemistry* 79: 6167–6173.
- Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ (2009): CE-MS in metabolomics. *Electrophoresis* 30: 276–291.
- Roberts JK (2000): NMR adventures in the metabolic labyrinth within plants. *Trends in Plant Science* 5: 30–34.
- Roe CR, Roe DS (1999): Recent developments in the investigation of inherited metabolic disorders using cultured human cells. *Molecular Genetics and Metabolism* 68: 243–257.

- Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR (2000): Analytical chemistry: an introduction. Saunders College Publishing, USA. ISBN 0-03-020293-0.
- Sorrell JM, Caplan AI (2004): Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *Journal of Cell Science* 117: 667–675.
- Sorrell JM, Caplan AI (2009): Fibroblasts – a diverse population at the center of it all. *Molecular Biology of the Cell* 276: 161–214.
- Steinfath M, Groth D, Lisec J, Selbig J. (2008): Metabolite profile analysis: from raw data to regression and classification. *Plant Physiology* 132: 150–161.
- Stephanopoulos G, Alper H, Moxley J (2004): Exploiting biological complexity for strain improvement through systems biology. *Nature Biotechnology* 22: 1261–1267.
- Štulík K, Bosáková Z, Coufal P, Jelínek I, Pacáková V, Ševčík J (2004): Analytické separační metody. Karolinum, Praha. ISBN 80-246-0852-9.
- Villas-Bôas SG, Højer-Pedersen J, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J (2005): Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeasts* 22: 1155–1169.
- Volka K, Fogl J, Popl M, Suchánek M (1995): Analytická chemie II. Karolinum, Praha. ISBN 80-7080-227-8.
- Volpi N, Maccari F, Linhardt RJ (2008): Capillary electrophoresis of complex natural polysaccharides. *Electrophoresis* 29: 3095–3106.
- Wang QZ, Wu CY, Chen T, Chen X, Zhao XM (2006): Integrating metabolomics into a systems biology framework to exploit metabolic complexity: strategies and applications in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 151–161.
- Wittmann C, Krömer JO, Kiefer P, Binz T, Heinzle E (2004): Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Analytical Biochemistry* 327: 135–139.
- Wong T, McGrath JA, Navsaria H (2007): The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *British Journal of Dermatology* 156: 1149–1155.

Zijlstra A, Schelling ME (1999): Detection of multiple fibronectin isoforms in fetal fibroblast monolayer culture: a novel method for the qualitative and quantitative detection of multiple antigens. *Histochemistry and Cell Biology* 111: 163–169.

Internetové zdroje:

<http://www.metabolomicsociety.org>. Citováno dne 15.2.2010.

http://www.ich.ucl.ac.uk/services_and_facilities/lab_services/mass_spectrometry/images/HPLC_ESI_MS_1.gif. Citováno dne 27.3.2010.

http://www.ich.ucl.ac.uk/services_and_facilities/lab_services/mass_spectrometry/images/HPLC_ESI_MS_3.gif. Citováno dne 27.3.2010.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AcCN	acetonitril
ADP	adenosin-5'-difosfát
AMP	adenosin-5'-monofosfát
ATP	adenosin-5'-trifosfát
CAD	tlak kolizního plynu (collision gas pressure)
CDP	cytidin-5'-difosfát
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis) kolizní energie (collision energy)
CMP	cytidin-5'-monofosfát
CMP-N-acetylneuraminát	cytidin-5'-monofosfoneuraminát
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
CTP	cytidin-5'-trifosfát
CUR	curtain gas
CXP	výstupní potenciál kolizní cely (collision cell exit potential)
dADP	2'-deoxyadenosin-5'-difosfát
dAMP	2'-deoxyadenosin-5'-monofosfát
dATP	2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát
dCDP	2'-deoxycytidin-5'-difosfát
dCMP	2'-deoxycytidin-5'-monofosfát
dCTP	2'-deoxycytidin-5'-trifosfát
dGDP	2'-deoxyguanosin-5'-difosfát
dGMP	2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát
dGTP	2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát

dITP	2'-deoxyinosin-5'-trifosfát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DP	deklasterační potenciál (declustering potential)
dTDP	2'-deoxythymidin-5'-difosfát
dTMP	2'-deoxythymidin-5'-monofosfát
dTTP	2'-deoxythymidin-5'-trifosfát
dUMP	2'-deoxyuridin-5'-monofosfát
dUTP	2'-deoxyuridin-5'-trifosfát
ECM	extracelulární matrix
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
EP	vstupní potenciál (entrance potential)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionisation)
FAD	flavinadenindinukleotid
FBS	fetální hovězí sérum
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GAG	glykosaminoglykany
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
GC/MS	plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie (gas chromatography/mass spectrometry)
GDP	guanosin-5'-difosfát
GDP-fukosa	guanosin-5'-difosfo- β -L-fukosa
GDP-mannosa	guanosin-5'-difosfo-D-mannosa
GMP	guanosin-5'-monofosfát
GS1	zmlžující plyn (nebulizing gas)
GS2	sušící plyn (heater gas)

GTP	guanosin-5'-trifosfát
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
HSF	lidské kožní fibroblasty (human skin fibroblasts)
IDP	inosin-5'-difosfát
IMP	inosin-5'-monofosfát
IS	napětí na kapiláře v iontovém zdroji (ion spray voltage)
ITP	inosin-5'-trifosfát
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
MRM	multiple-reaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spectrometry)
NAD ⁺	β-nikotinamidadeninukleotid, oxidovaná forma
NADH	β-nikotinamidadeninukleotid, redukována forma
NADP ⁺	β-nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP ⁺), oxidovaná forma
NADPH	β-nikotinamidadeninukleotidfosfát, redukována forma
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
PCA	analýza hlavních komponent (principal component analysis)
QqQ	trojitý kvadrupól (triple quadrupole)
RT	retenční čas (retention time)
TCA	trichloroctová kyselina
TEM	teplota zmlžujícího plynu (source temperature)
UDP	uridin-5'-difosfát
UDP-galaktosa	uridin-5'-difosfogalaktosa

UDP-glukosa	uridin-5'-difosfoglukosa
UDP-glukuronát	uridin-5'-difosfoglukuronát
UDP-N-acetylglukosamin	uridin-5'-difosfát-N-acetylglukosamin
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (ultra high performance liquid chromatography)
UHPLC/MS/MS	ultraúčinná kapalinová chromatografie/tandemová hmotnostní spektrometrie (ultra high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry)
UMP	uridin-5'-monofosfát
UTP	uridin-5'-trifosfát