

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Doktorský studijní program: Fyzikální chemie

Autoreferát dizertační práce



Studium kinetiky trypsinového štěpení peptidů a chirálních separací biologicky aktivních
látek metodou HPLC

Mgr. Tereza Šlechtová

Školitel: Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Školitel-konzultant: RNDr. Květa Kalíková, PhD.

Praha, 2016

Předkládaná dizertační práce shrnuje výsledky získané během doktorského studia ve Skupině chromatografických a elektroforetických separačních metod (ECHMET) na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Práce byla financována v rámci řešení následujících projektů: GAUK 254214 a 364215, GAČR 14-19278P a 16-05942S, CEEPUS CIII-RO-0010-08-1314-M-69317, KONTAKT LH11018 a National Institute of Health Grants 5U24DK097153 a 1R01DK101473-01A1.

Abstrakt

Dizertační práce se skládá ze dvou tematických částí; první část se zabývá charakterizací trypsinu, enzymu využívaného v proteomickém výzkumu k identifikaci proteinových sekvencí, a rychlostí trypsinového štěpení peptidů. Druhá část je zaměřena na chirální separace biologicky aktivních látek.

V první části projektu byla studována kinetika štěpení syntetických peptidů trypsinem a vyvinuta metoda vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro detekci těchto peptidů a jejich fragmentů. Za použití enzymové reakce v roztoku a HPLC byly stanoveny relativní rychlostní konstanty štěpné reakce problematických sekvenčních motivů. Bylo objasněno, které aminokyseliny v okolí štěpného místa zpomalují enzymovou reakci a v jaké poloze vůči štěpnému místu je jejich vliv největší. Dále bylo zjištěno, že trypsin je schopen nízké exopeptidázové aktivity, především při štěpení na konci peptidového řetězce. Dále byly zjištěny a porovnány účinnosti tří chromatografických kolon s imobilizovaným trypsinem. Imobilizace na pevný nosič se využívá pro zvýšení množství enzymu účastnícího se katalytické reakce a pro zajištění lepší opakovatelnosti a reprodukovatelnosti výsledků. Účinnost kolony syntetizované na University of North Carolina byla porovnána s účinností dvou komerčně dostupných kolon. Jako substrát byl použit N_α -benzoyl-L-arginin 4-nitroanilid hydrochlorid a testovací podmínky zahrnovaly použití separačních pufrů o různém pH, různých průtoků mobilních fází a teplot. Za vybraných podmínek, především při pH 9,0, vykazovala nově syntetizovaná kolona vyšší účinnost než kolony komerční.

Ve druhé části práce byly vypracovány a optimalizovány metody HPLC a kapilární elektroforézy (CE) pro separaci enantiomerů tryptofanu a jeho derivátů používaných pro různé účely např. ve farmaceutickém průmyslu. V případě CE byl jako chirální selektor použit cyklodextrin a jeho deriváty. Vývoj HPLC metody vyžadoval použití více různých typů chirálních stacionárních fází a separačních módů. Byly testovány stacionární fáze na bázi cyklodextrinu, cyklofruktanu, teikoplaninu i polysacharidů. Bylo dosaženo separace všech analytů na základní linii. Na základě získaných výsledků byl diskutován separační mechanismus použitých kolon. Dizertační práce zahrnuje také rozsáhlé rešerše týkající se enantioseparací léčiv, aminokyselin a dalších chirálních látek metodami HPLC, superkritické fluidní chromatografie (SFC), plynové chromatografie (GC) a elektrokinetické chromatografie.

Obsah

1. Úvod	6
2. Cíle práce	7
3. Teoretický úvod do analýzy bioaktivních látek	8
3.1. Trypsinové štěpení aminokyselinové sekvence proteinů	8
3.2. Chirální separace	9
4. Výsledky a diskuze	10
4.1. Publikace I – Objasnění trypsinového štěpení: Určení a srovnání rychlostních konstant enzymatické hydrolýzy problematických sekvencí	10
4.2. Publikace II – Porovnání katalytické účinnosti tří trypsinových kolon používaných v kapalinové chromatografii	12
4.3. Publikace III – Přímé CE a HPLC metody pro separaci tryptofanu a jeho neproteinogenních derivátů	14
4.4. Publikace IV – Chirální stacionární fáze na bázi cyklických oligosacharidů používaných pro kontrolu čistoty léčiv	15
4.5. Publikace V – Využití poměru enantiomerů aminokyselin chromatografickými metodami pro určení stáří a v diagnostice některých chorob	16
4.6. Publikace VI – Enantioselektivní separace v superkritické fluidní chromatografii	17
5. Závěr	18
Seznam použité literatury	19
Přílohy	22
A Životopis	22
B Seznam publikací	23
C Seznam konferenčních příspěvků	24

1. Úvod

Biologicky aktivní látky lze definovat jako sloučeniny, které jsou i v nízkých koncentracích schopny ovlivňovat životní pochody, přičemž toto ovlivnění může být pozitivní nebo negativní. Tyto látky mohou být přírodního i syntetického původu. Mezi biologicky aktivní látky řadíme např. proteiny, léčiva, vitamíny a aminokyseliny. Velké množství těchto látek je chirální - vyskytují se v odlišných prostorových uspořádáních, která navzdory stejnému sumárnímu vzorci mohou vykazovat různou biologickou aktivitu [1].

Základní složkou proteinů jsou L-enantiomery aminokyselin; některé se vlivem vysokých teplot, stárnutím nebo činností mikroorganismů mohou postupně přeměňovat na D-enantiomery. Ty však mohou zasahovat do metabolismu L-formy a způsobit toxickou reakci, v případě zabudování do proteinu i ztrátu biologické funkce [2]. D-aminokyseliny lze přirozeně nalézt např. v buněčných stěnách bakterií [3,4]. U vyspělejších biologických systémů, např. u člověka, může výskyt D-aminokyselin doprovázet rozvoj některých onemocnění, např. *Diabetes mellitus* [5] nebo Alzheimerovu chorobu [6]. Přirozeně se v tělech organismů vytváří kyselina D-asparagová, především metabolickými pochody souvisejícími se stárnutím [2]. Z důvodu diagnostiky, prevence a boje proti různým chorobám je potřeba vývoje spolehlivých a efektivních metod pro detekci a identifikaci proteinů a jejich stavebních jednotek.

Identifikace proteinů a jejich aminokyselinového složení probíhá nejčastěji za využití specifických proteolytických enzymů [7]. Nejpoužívanějším enzymem ke štěpení proteinů za účelem jejich analýzy je z důvodu vysoké specifity trypsin [7,8]. Využívá se především k přípravě vzorků pro tvorbu peptidových map, stanovení primární struktury proteinů a post-translačních modifikací [9]. Ačkoli jsou optimální podmínky pro trypsinovou hydrolýzu detailně popsány [10], stanovení rychlosti štěpení tzv. problematických sekvencí bylo dosud opomíjeno. Trypsin štěpí aminokyselinové řetězce pouze na karboxylovém konci argininu a lysinu [11], ale aminokyseliny obklopující štěpné místo mohou tuto reakci významně zpomalovat. Nejčastěji jsou nekompletně naštěpené sekvence pozorovány v blízkosti kyselých aminokyselin (kyseliny asparagové a glutamové) nebo v případech, kdy je v aminokyselinové sekvenci přítomno více štěpných míst jdoucích za sebou [12]. Znalost rychlostních konstant hydrolýzy těchto sekvencí by po zabudování do programů pro identifikaci peptidů mohla vést ke snížení množství falešně pozitivních výsledků a k podstatnému urychlení vyhodnocování získaných dat.

Enzymové štěpení lze provést v chromatografii dvěma způsoby. Konvenčně se používá reakce v roztoku, ale ta je zatížena mnoha nevýhodami, především autolýzou. Výrazné vylepšení představuje imobilizace enzymu na pevný nosič, která umožňuje použití podstatně vyššího množství enzymu a eliminuje nevýhody reakce v roztoku [13,14]. Použití chromatografických kolon s imobilizovaným trypsinem by mělo vést k větší opakovatelnosti a spolehlivosti výsledků.

Chirální separace biologicky aktivních látek mají stále obrovský význam, protože mnoho léčiv a látek používaných v chemickém, potravinářském průmyslu a zemědělství vykazuje chiralitu. Stále větší důraz je kladen na vypracování toxikologických a environmentálních analýz vlivu jednotlivých enantiomerů, se kterými je úzce spjata potřeba rychlých, spolehlivých a citlivých metod. Uplatnění v této problematice našla především kapalinová chromatografie, kterou lze použít pro různě polární analyty pocházející z různých typů matric [15]. Velké množství dostupných chirálních stacionárních fází (CSP) ještě více upřednostňuje použití této techniky [16]. Příkladem biologicky aktivních látek mohou být neproteinogenní deriváty tryptofanu, používané např. ve farmacii k vývoji nových léčiv, jako biologické sondy nebo katalyzátory [17,18,19]. Dále lze zmínit nepřírodní deriváty prolinu, používané v peptidomimetice ke zlepšení biologické dostupnosti léčiv a odolnosti vůči enzymům [20], nebo β -aryl-substituované β -aminokyseliny, které působí jako inhibitory enzymů, mají neurologickou aktivitu a používají se při vývoji nových léčiv [21].

2. Cíle práce

Cílem dizertační práce bylo studium peptidů a aminokyselin vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Dílčí cíle lze rozdělit do následujících bodů:

- Studium rychlostních konstant štěpení problematických peptidových sekvencí trypsinem.
- Zjištění a porovnání účinnosti komerčně dostupných kolon s imobilizovaným trypsinem vůči a syntetizované kolony v laboratoři.
- Vývoj vhodných metod pro chirální separace tryptofanu a jeho neproteinogenních derivátů pro screeningové a purifikační účely.

3. Teoretický úvod do analýzy biologicky aktivních látek

3.1. Trypsinové štěpení aminokyselinové sekvence proteinů

Proteiny společně se sacharidy a lipidy patří mezi makromolekuly nezbytné k existenci života na Zemi. Základem proteinového řetězce jsou aminokyseliny, jejichž pořadí určuje nejen vyšší strukturu proteinů, ale také jejich funkci. V proteomickém výzkumu je protein izolován, denaturován a následně rozložen na krátké peptidové fragmenty, které jsou identifikovány nejčastěji hmotnostní detekcí. Štěpení je obvykle prováděno enzymatickou katalýzou. Štěpné místo a okolní sekvence aminokyselin musí být kompatibilní s aktivním centrem enzymu, aby mohlo dojít k hydrolytické reakci. Některé aminokyseliny v bezprostředním okolí štěpného místa mohou zabránit navázání proteinu na enzym. Ve výsledné směsi pak pozorujeme peptidové fragmenty s vynechanými štěpnými místy (z angl. miscleavage), i když je reakční doba dostatečně dlouhá. Trypsin je pro vysokou specifitu nejpoužívanějším enzymem pro štěpení proteinů [7,8]. Specifita štěpení trypsinem spočívá ve schopnosti štěpit proteiny pouze na karboxylovém konci lysinu a argininu, pokud po nich nenásleduje prolin [9]. Optimální podmínky pro trypsinové štěpení jsou udávány následovně: pH v rozmezí 7-9 jednotek [23,24] a teplota 37°C. Mezi faktory, které negativně ovlivňují rychlost enzymové reakce, se řadí pH, teplota, přítomnost organických rozpouštědel, autolýza, vyšší struktury štěpeného proteinu a samotná sekvence aminokyselin. Negativně nabitě kyseliny asparagová a glutamová, nacházející se v bezprostřední blízkosti štěpného místa, snižují rychlost enzymové reakce. Jejich vzdálenost od štěpného místa je zásadní a má různý dopad na rychlost reakce [11,12]. Tyto dvě aminokyseliny vytváří solné můstky s bazickým argininem a lysinem, a zabraňují tak jejich navázání na kyselinu asparagovou v aktivním centru trypsinu, čímž dochází k bránění interakce s enzymem [12]. „Miscleavage“ sekvence se objevují také v případech, kdy je v aminokyselinovém řetězci umístěno několik štěpných míst za sebou. Bylo popsáno, že trypsin není schopen pracovat jako exopeptidáza - nedokáže štěpit na úplném začátku nebo konci peptidového řetězce [26]. V sekvenci je obvykle hydrolyzováno pouze jedno štěpné místo, ostatní už enzymové reakci nepodléhají.

S výzkumem struktury a funkce proteinů je úzce spjata potřeba rychlých, nenáročných a efektivních separačních metod. V proteomickém výzkumu je nejčastěji využívána metoda HPLC v reverzním módu [7], dále se uplatňují také metody CE a gelová chromatografie. V případě HPLC a CE metod může štěpná reakce probíhat jak odděleně tak i přímo

v separačním systému. Obrovskou výhodou imobilizace představuje posílení stability enzymu vůči autolýze, zvýšení odolnosti vůči teplotě, pH nebo přítomnosti organických rozpouštědel [13,14]. Pro použití v kapalinové chromatografii se enzym imobilizuje na membrány [14,27], polymerní nebo silikagelové nosiče [8], nanočástice [28] i magnetické částice [29]. Nevýhodou imobilizace enzymů je určitá ztráta účinnosti vlivem strukturních změn doprovázejících vazbu na pevný povrch [27], která je však kompenzována stechiometricky větším množstvím enzymu účastnícího se reakce. Použitím imobilizovaného enzymu tak lze výrazně zkrátit dobu štěpné reakce. Reakce v roztoku obvykle probíhá 12-24 hodin, oproti tomu reakce na imobilizovaných enzymových reaktorech může být ukončena po několika minutách, jak udávají výrobci komerčně dostupných trypsinových kolon [30,31].

3.2. Chirální separace

Chiralita je přirozenou vlastností přírodních látek. Chirální molekuly mají stejné složení, ale liší se prostorovým uspořádáním a v chirálním prostředí vykazují různé vlastnosti. Chirální látky se vyskytují ve formě izomerů, které si jsou navzájem zrcadlovými obrazy a nazýváme je enantiomery [1,32]. Většina léčiv a látek používaných v hemickém, potravinářském průmyslu a zemědělství vykazuje chiralitu, a proto je nutné prozkoumat chování všech jejich izomerů nejen v lidském těle, ale také v tělech ostatních organismů a v životním prostředí. Důvodem takto rozsáhlých toxikologických studií jsou právě rozdílné vlastnosti jednotlivých enantiomerů v chirálním prostředí. Zatímco je jeden izomer aktivní, druhý může vykazovat nižší nebo žádnou účinnost, případně jiné až nežádoucí účinky [32,33]. Problematika chirálních léčiv vstoupila do širokého povědomí v šedesátých letech 20. století, kdy došlo k tragickému incidentu s thalidomidem a teratogenní účinek jednoho z enantiomerů byl zjištěn příliš pozdě [34]. Tato tragédie se stala mezníkem v regulaci léčiv. Dalším příkladem rozdílných účinků enantiomerů a problematiky správného výběru testovacích zvířat ve farmakologických studiích může být omeprazol, léčivo používané jako inhibitor protonových pump při poruchách trávení. Testy na potkanech ukázaly, že *R*-enantiomer má vyšší účinnost, zatímco při testech na psech nebyl zjištěn rozdíl v účinnosti enantiomerů a farmakologický výzkum u člověka ukázal o 90% vyšší účinnost *R*-enantiomeru [35].

Účinnou metodou pro separaci chirálních látek je především kapalinová chromatografie (LC). Mezi další významné metody patří SFC, CE a GC. [32]. HPLC je v současnosti nejpoužívanější technikou pro separaci chirálních látek vzhledem k velké

robustnosti, opakovatelnosti a reprodukovatelnosti analýz. Další výhodou této metody je možnost použití několika různých módů v závislosti na povaze separovaných látek. Podle polarity stacionární a mobilní fáze (MP) rozlišujeme tyto chromatografické módy: (i) normální mód – polárnější SP a méně polární MP; (ii) RP – méně polární SP a polárnější MP; (iii) polárně-organický mód – jako MP se používá směs acetonitrilu (ACN) s methanolem (MeOH), nebo samotný MeOH s malým přídavkem kyseliny octové a triethylaminu; (iv) hydrofilní-interakční kapalinová chromatografie (HILIC) - polární SP a MP složená z ACN a vodné fáze (pufru) do max. 30% objemu. [16]

Chirální separace lze v HPLC provést dvěma způsoby – přímým a nepřímým. Při přímých separacích jsou nejvíce používány systémy s CSP, která může být vhodná pro jeden nebo více módů. Dále lze použít chirální selektor jako aditivum v MP, ale tento postup není příliš využíván z důvodu nižší selektivity a účinnosti chromatografického systému. Při nepřímých separacích se využívá reakce enantiomerů s opticky čistým derivatizačním činidlem před vlastní analýzou. Vytvořené stabilní diastereoizomery jsou separovány v achirálním prostředí. Nevýhodou nepřímé metody představuje především nutnost vysoké optické čistoty derivatizačního činidla, možnost racemizace analytu během derivatizace a časová náročnost přípravy derivátu. Tato metoda není vhodná pro semipreparativní a preparativní účely. Hlavní nevýhodou přímých metod je vysoká cena CSP [16,32]. V současnosti jsou nejvíce využívány polysacharidové CSP na bázi derivatizované celulózy a amylózy. Dále je vhodné zmínit CSP na bázi makrocyclických antibiotik (teikoplanin, vankomycin), derivatizovaných i nativních cyklodextrinů (CD) a cyklofruktanů (CF), syntetických polymerů nebo molekulárně vtištěných polymerů [16,36].

4. Výsledky a diskuze

Publikace I – Objasnění trypsinového štěpení: Určení a srovnání rychlostních konstant enzymatické hydrolýzy problematických sekvencí

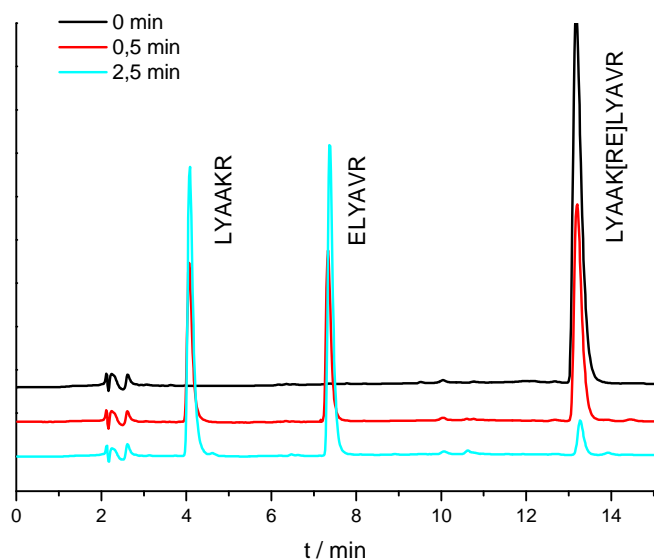
Jak bylo zmíněno výše, jedním z negativních jevů provázejících trypsinové štěpení proteinů je produkce tzv. „miscleavage“ sekvencí. Objasnění afinity trypsinu k těmto sekvencím a určení rychlostních konstant štěpných reakcí je důležité nejen pro usnadnění a zpřesnění vyhledávání v databázích hmotnostních spekter, ale i pro vývoj nových enzymových modifikací. Zavedení rezistentních sekvencí do identifikačních programů by

významně urychlilo a zpřesnilo vyhodnocování výsledků a zmenšilo by množství falešně pozitivních identifikací.

Publikace I se zabývá (i) vlivem kyselin glutamové a asparagové a (ii) několika po sobě jdoucích štěpných míst na rychlost trypsinového štěpení. Reakční podmínky byly zvoleny tak, aby bylo za pomalého průběhu reakce umožněno podrobné sledování změn v reakční směsi. Jako substráty byly použity syntetické peptidy s danou sekvencí aminokyselin bez sekundární struktury. Produkty enzymové reakce byly separovány vyvinutou metodou RP-HPLC (Obr. 1). Navržená metoda byla použita ke stanovení a porovnání relativních rychlostních konstant štěpných reakcí různých sekvenčních motivů.

Trypsin je vysoce specifický enzym, který štěpí pouze na karboxylovém konci aminokyselin argininu a lysinu. Výsledky ukázaly, že trypsin preferuje štěpné místo obsahující arginin, pravděpodobně kvůli slabší vazbě lysinu do aktivního centra trypsinu. Postranní řetězec argininu je delší, a proto může tvořit vodíkové vazby přímo s kyselinou asparagovou na dně kapsy aktivního centra trypsinu. Postranní řetězec lysinu vytváří vodíkové můstky se serinem a s kyselinou asparagovou je spojen nepřímo přes molekulu vody [37]. Z tohoto důvodu byly naměřené rychlostní konstanty peptidů obsahujících arginin vyšší. Dále byl sledován vliv pozice kyselých aminokyselin vůči štěpnému místu na rychlost enzymové reakce. Bylo zjištěno, že umístění kyseliny glutamové nebo asparagové před štěpným místem zpomaluje rychlost reakce výrazněji. Jako silnější inhibitor reakce se projevila kyselina asparagová ve všech případech měření.

Sekvence obsahující několik po sobě jdoucích štěpných míst jsou označovány za nejčastěji se objevující „miscleavage“ motivy. V **Publikaci I** byly studovány sekvence se dvěma štěpnými místy, a to dvěma argininy, lysiny, nebo párem arginin-lysin a lysin-arginin. Hydrolyzováno je pouze jedno ze dvou štěpných míst, což vede k produkci „miscleavage“ peptidů. B. Keil popsal, že trypsin není schopen pracovat jako exopeptidáza – neumí štěpit na úplném začátku nebo konci peptidového řetězce [26]. Toto tvrzení bylo částečně vyvráceno. Po 2 minutách byl veškerý původní peptid v reakční směsi naštěpen, ale stále docházelo ke změnám ploch píků vzniklých fragmentů. Bylo zjištěno, že trypsin je pravděpodobně schopen exopeptidázové aktivity, a to především pokud je štěpné místo na konci peptidového řetězce. Rychlost reakcí je však podstatně nižší než u původního peptidu.



Obr. 1 Ilustrativní chromatogramy separace štěpeného peptidu a jeho fragmentů v závislosti na době enzymové reakce. Peptid s aminokyselinovou sekvencí LYAA[RE]LYAVR, která obsahovala jako štěpné místo arginin (R) následované kyselinou glutamovou (E), byl trypsinem hydrolyzován na dva fragmenty. Separační podmínky: kolona Atlantis dC18; MP ACN/10 mM octan amonný, pH 3,0; lineární gradient MP 10-18% ACN (*v/v*) v čase 0-6 min, 6-20 min 18% ACN; 280 nm; teplota kolony 30°C; teplota autosampleru 20°C; dávkovaný objem 6 μ l.

Publikace II – Porovnání katalytické účinnosti tří trypsinových kolon používaných v kapalinové chromatografii

Imobilizace enzymů na pevný nosič je vhodným prostředkem jak zabránit nechtěným jevům, které doprovází enzymové štěpení v roztoku. V případě trypsinu je těchto nevýhod několik. Molekuly trypsinu jsou schopny se navzájem hydrolyzovat, a tak dochází ke kontaminaci analyzovaného vzorku nechtěnými peptidovými fragmenty. Z tohoto důvodu se trypsin do reakční směsi přidává v malém množství, obvykle v poměru 1:50. Další nevýhody představuje malá odolnost vůči organickým rozpouštědlům a vysokým teplotám, jejichž použití by mohlo podstatně zvýšit efektivitu štěpné reakce [13,14]. Všem těmto nevýhodám se lze vyhnout imobilizací enzymu. Velkou výhodou představuje také přímé zapojení do HPLC aparatury, čímž lze omezit manipulaci se vzorkem a vnášení chyb do analýz.

Produkcí „miscleavage“ sekvencí, která byla diskutována v předešlé publikaci, se tímto způsobem nelze vyhnout, ale vzhledem k velkému zrychlení enzymové reakce by se jejich množství mělo významně snížit.

Publikace II se zabývá určením a srovnáním účinnosti tří trypsinových kolon, z nichž dvě, Perfinity a Poroszyme, jsou komerčně dostupné. Kolony Poroszyme a Perfinity jsou již nějakou dobu používané, jejich výrobci slibují vysokou účinnost, rychlé reakční časy v rámci několika minut, odolnost vůči vysokým tlakům, teplotám a opakovatelné výsledky pro nástřik více než 250 vzorků. Třetí kolona, UNC prototyp, byla vytvořena ve skupině prof. J. Jorgensona na University of North Carolina (UNC) at Chapel Hill, USA a stále podléhá vývoji. Jako jediná by měla být kompatibilní s UPLC přístroji. U zmíněných trypsinových kolon byla určena a porovnána katalytická účinnost vyjádřená jako úbytek plochy píku substrátu štěpné reakce po aplikaci různých separačních podmínek. Byl studován vliv pH separačního pufru, průtoku mobilní fáze a teploty. Zvolené testovací podmínky v této práci jsou: pH 7,0; 8,0; 9,0; teploty 20, 25, 30 a 37°C; průtoky mobilní fáze 0,1, 0,2 a 0,3 ml/min. Změna rychlosti průtoku mobilní fáze souvisí s dobou setrvání analytu v koloně. Práce se zaměřuje také na opakovatelnost měření a celého procesu. Jako substrát pro enzymovou reakci byl zvolen N_α -benzoyl-L-arginin 4-nitroanilid hydrochlorid, který je obvykle využíván k ověření účinnosti trypsinu [38,39].

Vybrané kolony se liší nosičem, na kterém je imobilizován trypsin, velikostí pórů a původem použitého enzymu (vepřový/hovězí). Rozdíly mezi kolonami shrnuje Tabulka 1. V případě UNC kolony byl trypsin imobilizován na hybridní silikagelové částice (BEH, 300 Å) modifikovaným postupem popsáním v literatuře [40]. Množství imobilizovaného trypsinu bylo stanoveno spektrofotometricky, na 1 mg BEH sorbentu bylo imobilizováno 84 mg trypsinu. Byla porovnána směrnice závislosti absorbance na době reakce v roztoku vůči reakci stejného množství trypsinu imobilizovaného na BEH částicích rozptýlených v reakčním pufru. Množství trypsinu imobilizovaného v koloně bylo 5,7 mg a enzym si zachoval 35-40 % účinnosti vůči čerstvě připravenému roztoku trypsinu. I s takovou ztrátou účinnosti se reakce účastní o tři řády více trypsinu než při reakci v roztoku, kde se obvykle používá množství kolem 1 µg. Při porovnání účinnosti výše zmíněných trypsinových kolon bylo zaznamenáno několik trendů. (i) Reakční rychlost roste s rostoucím pH pufru. Nejlépe pozorovatelný byl tento trend u UNC prototypu, který vykazovat podstatně vyšší účinnost při pH 9,0 než při pH 7,0 a 8,0. (ii) Rychlost štěpení roste s rostoucí teplotou. (iii) Se snižujícím se průtokem mobilní fáze se zvyšuje množství naštěpeného substrátu. Výjimka v tomto

chování byla zaznamenána u kolony Poroszyme při měření v pufrech o pH 7,0 a 8,0. Optimální rozsah pH pro trypsinové štěpení udávají výrobci Sigma Aldrich a Worthington Biochemical Corporation jako pH 7-9 [23,24]. Experimentálně byl však zjištěn významný pokles účinnosti studovaných kolon při pH 7,0 a nejvyšší účinnost byla zaznamenána při použití reakčního pufru o pH 9,0.

Tab. 1 Obecné parametry testovaných kolon s imobilizovaným trypsinem.

	Poroszyme	Perfinity	UNC prototyp
Rozměry	2,1 × 30 mm, 20 μm	2,1 × 33 mm, 20 μm	2,1 × 30 mm, 5 μm
Velikost pórů	500-10000 Å	>>1000 Å	300 Å
Maximální tlak	2500 psi	2500 psi	15000 psi
Pracovní teplota	25-67 °C	25-67 °C	20-60 °C
Sorbent	PDVB	PDVB	BEH
Původ trypsinu	Hovězí	Vepřový	Hovězí

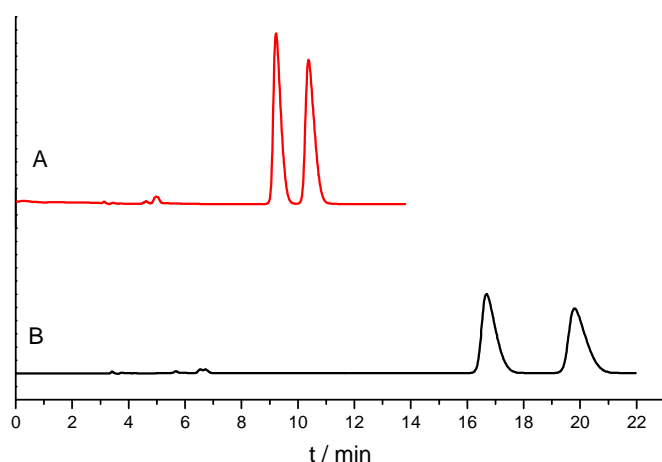
PDVB – polystyrendivinybenzen, BEH – “ethylene bridged hybrid silica”

Publikace III – Přímé CE a HPLC metody pro separaci tryptofanu a jeho neproteinogenních derivátů

Tryptofan a jeho neproteinogenní deriváty jsou často používány k vývoji a syntéze léčiv nebo jako chirální katalyzátory [19]. Dále se tyto aminokyseliny zavádí do řetězců bioaktivních peptidů, např. pro zvýšení jejich odolnosti vůči enzymům [41]. **Publikace III** se zabývá vývojem a optimalizací separace enantiomerů tryptofanu a jeho derivátů metodami HPLC a CE. Analyty bylo možné rozdělit do tří skupin: (i) bazické – tryptofan methyl ester, tryptofan butyl ester, tryptofan oktyl ester, tryptofan benzyl ester, tryptofanol; (ii) kyselé – *N*_α-BOC-tryptofan; (iii) amfoterní – tryptofan, 5-fluoro tryptofan, 5-hydroxy tryptofan.

Metody CE byly vyvinuty za použití CD a jeho derivátů jako chirálních selektorů a jsou vhodné především pro kontrolu čistoty enantiomerů. Metodou CE byly separovány enantiomery všech analytů na základní linii a čas separace nepřekročil 8 min. Při vývoji vhodných HPLC metod bylo nutné použít různé typy CSP a separačních módů vzhledem k velkým strukturálním rozdílům mezi analyty. Byly testovány chirální stacionární fáze na bázi teikoplaninu, CD, CF a polysacharidů. Vyvinuté HPLC metody jsou vhodné pro kontrolu čistoty enantiomerů i pro semipreparativní účely. Jako příklad vlivu složení MP na separaci

enantiomerů lze uvést separaci tryptofan butyl esteru v reverzním módu (Obr. 2). Na kolonách obsahujících teicoplanin (Chirobiotic T a Chirobiotic T2) byl testován vliv množství MeOH na retenci a separaci enantiomerů tryptofanu a jeho amfoterních derivátů. Bylo potvrzeno, že kolony na bázi teicoplaninu vykazují tzv. „mixed mode“ chování – v závislosti na množství organické fáze vykazují chování charakteristické pro více chromatografických módů. Při nízkém obsahu MeOH v MP se systém chová jako reverzní, zatímco při vysokém obsahu MeOH přechází do HILIC módu. U obou chromatografických systémů se sice používají obdobné složky MP, ale systém retence je opačný. V RP módu se na retenci analytů nejvíce podílí hydrofobní interakce, takže látky s vyšší polaritou eluují nejdříve a s rostoucím množstvím organické složky MP retence klesá. V HILIC systému, podobně jako při separacích na normální fázi, se retence zvyšuje s polaritou analytu a snižuje se zvýšením polarity MP, tedy s rostoucím množstvím organické složky v MP roste retence. Proto je HILIC systém vhodnější pro separace polárních látek, např. pro peptidy nebo polární léčiva, které jsou v reverzním systému eluovány v blízkosti mrtvého času kolony.



Obr. 2 Vliv složení MP na enantioseparaci bazického tryptofan butyl esteru v RP módu na koloně s derivatizovaným β -CD (Astec CyclobondTM I 2000 HP-RSP). (A) MeOH/10 mM octan amonný, pH 4,0 40/60; (B) MeOH/10 mM octan amonný, pH 4,0 30/70 (v/v).

Publikace IV – Chirální stacionární fáze na bázi cyklických oligosacharidů používaných pro kontrolu čistoty léčiv

Na enantiomerní čistotu léčiv jsou v dnešní době kladeny vysoké nároky. Se zajištěním enantiomerní čistoty léčiv je spojen vývoj efektivních a citlivých separačních metod, které budou schopny detekovat i stopová množství nežádoucích příměsí [32,33]. Nejčastěji se používá metoda HPLC s CSP, dále v této oblasti nalezly uplatnění GC, SFC, CE, micelární elektrokinetická chromatografie a kapilární elektrochromatografie. **Publikace IV** shrnuje chromatografické metody vhodné pro separaci léčiv za použití chirálních stacionárních fází na bázi cyklických oligosacharidů, CD, CF a jejich derivátů. Základním rozdílem mezi těmito chirálními selektory jsou sacharidové jednotky, ze kterých se skládají, a velikost jejich kavity. Vzhledem k těmto rozdílům vykazují rozdílné separační vlastnosti. CD jsou tvořeny 6 - 8 glukopyranosovými jednotkami, které vytváří hydrofobní kavitu [42]. CF jsou tvořeny obdobným počtem fruktofuranosových jednotek vytvářejících kavitu hydrofilní, která je menší než u CD [43]. Oba chirální selektory mají v nativním stavu nižší enantioselektivní účinnost než jejich deriváty. Vzhledem k rozdílným fyzikálně-chemickým vlastnostem nalezly v HPLC CD CSP uplatnění zejména v RP módu a CF CSP v normálním a polárně-organickém módu. CSP na bázi CF byly použity také v HILIC pro achirální separace léčiv a jejich nečistot.

Publikace V – Využití poměru enantiomerů aminokyselin chromatografickými metodami pro určení stáří a v diagnostice některých chorob

Stanovení D-enantiomerů aminokyselin v organických materiálech se využívá k indikaci změn nebo poruch v různých vědních oborech, ať už z lékařského nebo technologického hlediska. Některé D-aminokyseliny vznikají v buňkách a tkáních při jejich morfologickém vývoji a stárnutí, jsou důležitými ukazateli při vývoji některých chorob a jejich diagnostice, při biologickém a geologickém datování a podílely se na vývoji života na Zemi. **Publikace V** shrnuje chromatografické metody vyvinuté za účelem stanovení poměru enantiomerů aminokyselin v různých biologických materiálech, jídle i v meteoritech. Příprava vzorků je poměrně náročná, je nutné vyvarovat se podmínek, za kterých by mohlo dojít k dodatečné izomerizaci studovaných aminokyselin. Přímé separační metody vyžadují použití chirální stacionární fáze, při nepřímých metodách se aplikuje vhodné chirální derivatizační činidlo. Nechirální derivatizace se používá především při stopových analýzách biologických vzorků ke zvýšení citlivosti separačních metod. Matrice analyzovaných vzorků jsou různorodé. Mohou to být biologické materiály, jako jsou biologické tekutiny a tkáně,

oční čočky, dentin (zubovina) a rostlinné buňky, dále také jídlo nebo farmaceutika [2,44]. Detekce izomerizace aminokyselin v proteinech je instrumentálně náročná, obvykle se používá HPLC nebo GC s hmotnostní detekcí. Obdržená spektra se pak porovnávají se spektry syntetických peptidů pro lokalizaci specifických míst, na kterých dochází k izomerizaci aminokyselin [45]. „Screening“ biomarkerů provázejících neléčitelná onemocnění, jako je např. *Diabetes mellitus*, schizofrenie, roztroušená skleróza nebo Alzheimerova choroba, nabývá v dnešní době velkého významu s přibývajícím počtem pacientů a vývojem vhodných separačních metod [46,47,48]. Vznik a vývoj těchto onemocnění lze sledovat z izomerizace aminokyselin v proteinech, především z poměru D- a L-enantiomerů serinu a kyseliny asparagové v mozku, mozkomíšním moku, moči, séru nebo plazmě. Ke změnám v poměru enantiomerů kyseliny asparagové dochází také procesem stárnutí, jak u lidí, tak i u ostatních živočichů [49]. Jako vhodný materiál k této analýze se používají oční čočky nebo dentin ze zubů. Determinace stáří fosilních materiálů dle racemizace aminokyselin se používá především pro paleontologické, archeologické a biogeochemické účely [50,51]. Studovanými materiály jsou nejčastěji mořské i suchozemské sedimenty, speleotémy a fosilní schránky měkkýšů. Méně často se takto analyzují kosterní pozůstatky, u kterých se spíše využívá radiouhlíkové analýzy [52,53].

Publikace VI – Enantioselektivní separace v superkritické fluidní chromatografii

Rostoucí využití SFC v chirálních separacích je dáno především lepší konstrukcí SFC přístrojů a zvýšenou robustností této metody. **Publikace VI** diskutuje mechanismus SFC separací, zabývá se dostupnými chirálními stacionárními fázemi a shrnuje publikované chirální analýzy v letech 2000-2013.

Metoda SFC je založena na použití superkritické kapaliny jako hlavní složky mobilní fáze. Superkritické kapaliny mají unikátní vlastnosti, jejich hustota a rozpouštěcí schopnost je obdobná jako u kapalin, nízkou viskozitou a difuzními vlastnostmi se podobá plynům [54]. Výsledkem těchto vlastností je nižší tlak v chromatografickém systému, a tedy možnost používat několikanásobně vyšší průtoky mobilní fáze v porovnání s běžnou HPLC bez ztráty separační účinnosti [55]. Nejčastěji se používá oxid uhličitý, který je snadno dostupný, netoxický, nehořlavý a jeho kritických hodnot se dosahuje snadno ($T_K = 31\text{ °C}$, $p_K = 74\text{ bar}$). Jako organické modifikátory se obvykle používají MeOH, ACN, ethanol nebo izopropanol, dále se používají kyselá a/nebo zásaditá aditiva, např. kyselina trifluoroctová a triethylamin.

Pro přípravu CSP lze použít širokou škálu chirálních selektorů. V dnešní době se uplatňují především polysacharidové CSP na bázi derivatizované celulózy a amylozy. Dále se používají CSP na bázi derivatizovaných cyklodextrinů a cyklofruktanů, teikoplaninu, syntetických polymerů, Pirklovy nebo iontově výměnné chininové a chinidinové CSP.

5. Závěr

Předkládaná dizertační práce, tvořená komentovaným souborem šesti publikací, se zabývá problematikou kinetiky trypsinového štěpení peptidů a chirálními separacemi biologicky aktivních látek.

Trypsin je v proteomickém výzkumu používán k popisu aminokyselinových sekvencí proteinů, ale jeho využití je zatíženo několika nevýhodami, jako je autolýza a produkce „miscleavage“ sekvencí. Hlubší pochopení trypsinového štěpení problematických sekvenčních motivů a stanovení odpovídajících relativních rychlostních konstant je přínosem pro identifikační techniky proteinů i pro vývoj nových enzymových modifikací. Zavedení rezistentních sekvencí do Peptide Mass Fingerprinting programů by významně urychlilo a zpřesnilo vyhodnocování výsledků a snížilo by množství falešně pozitivních identifikací.

Provedení enzymové hydrolyzy na trypsinové koloně zapojené přímo v chromatografickém systému představuje další zjednodušení a zpřesnění celého identifikačního procesu. Omezí se tak manipulace se vzorkem, která do procesu analýzy vnáší další nepřesnosti a vyšší množství enzymu zvýší rychlost a opakovatelnost reakce. Byla syntetizována trypsinová kolona o rozměrech 2,1 × 30 mm a jako nosič byly zvoleny BEH částice. Tato nově připravená kolona vykazovala účinnost srovnatelnou, za některých podmínek i vyšší než kolony komerční.

Chirální separace biologicky aktivních látek jsou důležité nejen pro kontrolu čistoty léčiv, ale také při sledování průběhu některých chorob, stárnutí i pro studie zaměřené na výzkum vzniku života na Zemi. Byly vyvinuty metody HPLC a CE vhodné pro purifikační i screeningové analýzy enantiomerů tryptofanu a jeho neproteinogenních derivátů. Dále byly vypracovány tři rozsáhlé rešerše věnované chirálním separacím metodou SFC a enantioseparacím aminokyselin a léčiv chromatografickými metodami.

Seznam citované literatury

- [1] Subramanian, G. Chiral separation techniques: a practical approach, Wiley-VCH 2007, Weinheim, Německo.
- [2] Zahradníčková, H.; Hartvich, P.; Holoubek, I.: Chem. Listy 99 (2005) 703.
- [3] Cava, F.; Lam, H.; de Pedro, M.A.; Waldor, M.K.: Cell. Mol. Life Sci. 68 (2011) 817.
- [4] Brückner, H.; Becker, D.; Lüpke, M.: Chirality 5 (1993) 385.
- [5] Min, J.Z.; Hatanaka, S.; Yu, H.; Higashi, T.; Inagaki, S.; Toyo'oka, T.: J. Chromatogr. B 879 (2011) 3220.
- [6] Hashimoto, K.; Fukushima, T.; Shimizu, E.; Okada, S.; Komatsu, N.; Okamura, N.; Koike, K.; Koizumi, H.; Kumakiri, C.; Imai, K.; Iyo, M.: Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psych. 28 (2004) 385.
- [7] He, Y.; Zhong, W.; Yeung, E. S.: J. Chromatogr. B 782 (2002) 331.
- [8] Yuan, H.M.; Zhang, L.H.; Hou, C.Y.; Zhu, G.J.; Tao, D.Y.; Liang, Z.; Zhang, Y.K.: Anal. Chem. 81 (2009) 8708.
- [9] Ren, D.; Pipes, G.D.; Liu, D.; Shih, L.; Nichols, A.C.; Treuheit, M.J.; Brems, D.N.; Bondarenko, P.V.: Anal. Biochem. 392 (2009) 12.
- [10] Rawlings, N.D.; Waller, M.; Barrett, A.J.; Bateman, A.: Nucleic Acids Res. 42 (2014) D503.
- [11] Monigatti, F.; Berndt, P.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 16 (2005) 13.
- [12] Siepen, J.A.; Keevil, E.J.; Knight, D.; Hubbard, S.J.: J. Proteome Res. 6 (2007) 399.
- [13] Calleri, E.; Temporini, C.; Perani, E.; Stella, S.; Rudaz, C.; Lubda, D.; Mellerio, G.; Veuthey, J.-L.; Caccialanza, G.; Massolini, G.: J. Chromatogr. A 1045 (2004) 99.
- [14] Kranz, B.; Burck, J.; Franzreb, M.J.; Ulrich, A.S.: J. Colloid Interface Sci. 316 (2007) 413.
- [15] Nováková, L.; Douša, M. a kol. Moderní HPLC separace v teorii a praxi II., Lucie Nováková, Michal Douša 2013, Praha, Česká republika.
- [16] Nováková, L.; Douša, M. a kol. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., Lucie Nováková, Michal Douša 2013, Praha, Česká republika.
- [17] Daugan, A.; Grondin, P.; Ruault, C.; de Gouville, A.C.L.; Coste, H.; Linget, J.M.; Kirilovsky, J.; Hyafil, F.; Labaudiniere, R.: J. Med. Chem. 46 (2003) 4533.
- [18] Royer, C.A.: Chem. Rev. 106 (2006) 1769.
- [19] Kieffer, M.E.; Repka, L.M.; Reisman, S.E.: J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 5131.
- [20] Ilisz, I.; Tourwe, D.; Armstrong, D.W.; Péter, A.: Chirality 18 (2006) 539.

- [21] Berkecz, R.; Sztojkov-Ivanov, A.; Ilisz, I.; Forró, E.; Fülöp, F.; Hyun, M.H.; Péter, A.: *J. Chromatog A*, 1125 (2006) 138.
- [22] Perona, J.J.; Craik, C.S.: *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 29987.
- [23] Trypsin, general informations, dostupné 30.6.2016 z <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/trypsin.html>.
- [24] Introduction to enzymes, Worthington Biochemical Corporation, 2015, dostupné 30.6.2016 z <http://www.worthington-biochem.com/introbiochem/Enzymes.pdf>.
- [25] Schechter, I.; Berger, A.: *Biochem. Biophys. Res. Co.* 27 (1967) 157.
- [26] Keil, B. *Specificity of Proteolysis*, Springer-Verlag 1992, New York.
- [27] Guedidi, S.; Portugal, C.A.M.; Innocent, C.; Janot, J.-M.; Deratani, A.; Crespo, J.G.: *Enzyme Microb. Technol.* 51 (2012) 325.
- [28] Hinterwirth, H.; Lindner, W.; Lämmerhofer, M.: *Anal. Chim. Acta* 733 (2012) 90.
- [29] Sun, L.; Li, Y.; Yang, P.; Zhu, G.; Dovichi, N. J.: *J. Chromatogr. A* 1220 (2012) 68.
- [30] General product information on Poroszyme Immobilized trypsin Cartridge, dostupné 30.6.2016 z <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/2312800>.
- [31] General product information on Perfinity Integrated Digestion Platform, dostupné 30.6.2016 z <http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=perfinity-2>.
- [32] Ahuja, S. *Chiral separation methods for pharmaceutical and biotechnological research*, John Wiley and Sons, Inc. 2011, Hoboken, New Jersey.
- [33] Anzenbacher, P.; Jezdinsky, J.: *Klin. Farmakol. Farm.* 17 (2003) 148.
- [34] Agranat, I.; Caner, H.; Caldwell, J.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 753.
- [35] Rouhi A.M.: *Chem. Engn. News* 5 (2003) 56.
- [36] Ward, T.J.; Ward, K.D.: *LC GC Europe* 32 (2014) 20.
- [37] Craik, C.S.; Largman, C.; Fletcher, T.; Roczniak, S.; Barr, P.J.; Fletterick, R.J.; Rutter, W.J.: *Science* 228 (1985) 291.
- [38] Bayramoglu, G.; Celikbicak, O.; Arica, M.Y.; Salih, B.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 4554.
- [39] Nidhin, M.; Ghosh, D.; Yadav, H.; Yadav, N.; Majumder, S.: *Mat. Sci. Eng. B* 202 (2015) 46.
- [40] Ahn, J.; Jung, M.C.; Wyndham, K.; Yu, Y.Q.; Engen, J.R.: *Anal. Chem.* 84 (2012) 7256.
- [41] Gentilucci, L.; Cerisoli, L.; De Marco, R.; Tolomelli, A.: *Tetrahedron Lett.* 51 (2010) 2576.
- [42] Xiao, Y.; Ng, S.-C.; Tan, T.T.Y.; Wang, W.Y.: *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 52.

- [43] Sun, P.; Wang C.; Breitbach, Z.S.; Zhang, Y.; Armstrong, D.W.: *Anal. Chem.* 81 (2009) 10215.
- [44] Iadarola, P.; Ferrari, F.; Fumagalli, M.; Viglio, S.: *Electrophoresis* 29 (2008) 224.
- [45] Tao, Y.; Julian, R.R.: *Anal. Chem.* 86 (2014) 9733.
- [46] Fukushima, T.; Lee, J.A.; Korenaga, T.; Ichihara, H.; Kato, M.; Imai, K.: *Biomed. Chromatogr.* 15 (2001) 189.
- [47] Deakova, Z.; Durackova, Z.; Armstrong, D.W.; Lehotay, J.: *J. Chromatogr. A* 1408 (2015) 118.
- [48] Lorenzo, M.P.; Dudzik, D.; Varas, E.; Gibellini, M.; Skotnicki, M.; Zorawski, M.; Zarzycki, W.; Pellati, F.; Garcia, A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 107 (2015) 480.
- [49] McCudden, C.R.; Kraus, V.B.: *Clin. Biochem.* 39 (2006) 1112.
- [50] Engel, M.H.; Goodfriend, G.A.; Qian, Y.; Macko, S.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 10475.
- [51] Amelung, W.; Zhang, X.; Flach, K.W.: *Geoderma* 130 (2006) 207.
- [52] Csapo, J.; Csapo-Kiss, Z.; Csapo Jr., J.: *Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 140.
- [53] Iuliani, P.; Di Federico, L.; Fonteccio, G.; Carlucci, G.: *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 2411.
- [54] Guiochon, G.; Tarafder, A.: *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1037.
- [55] De Klerck, K.; Mangelings, D.; Heyden, Y.V.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 69 (2012) 77.

Přílohy:

A. Životopis

Jméno: Tereza Šlechtová

Narozena: 19.1.1988

Adresa: K výzkumným ústavům 1783, Praha 4 – Krč, 142 00

Vzdělání:

- 2007 – 2010 Bakalářské studium: Chemie životního prostředí
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Bakalářská práce: Enantiomery pesticidů ve vodě
- 2010 – 2012 Magisterské studium: Chemie životního prostředí
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Diplomová práce: Porovnání metod detekce a stanovení enantiomerů
theaninu metodou HPLC
- 2012 – 2016 Doktorské studium: Fyzikální chemie
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Dizertační práce: Studium kinetiky trypsinového štěpení peptidů a
chirálních separací biologicky aktivních látek metodou HPLC

Zahraniční stáže:

- 2013 CEEPUS program (Central European Exchange for University Studies)
Faculty of Science, University of Zagreb, Záhřeb, Chorvatsko
Purifikace syntetických peptidů vhodných k trypsinovému štěpení metodou
HPLC
3 týdny
- 2014 CEEPUS program (Central European Exchange for University Studies)
Faculty of Science, University of Vienna, Vídeň, Rakousko
Vývoj metody ELISA vhodné k detekci fungicidu fenpropimorf
1 měsíc

Projekty:

- Hlavní řešitel projektu č. 254214 Grantové agentury Univerzity Karlovy

- Spoluřešitel projektu č. 364215 Grantové agentury Univerzity Karlovy
- Člen řešitelského týmu projektu č. 16-05942S Grantové agentury České republiky

Výuka na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze:

- Praktikum z fyzikální chemie MC260C45N

Certifikáty:

- CAE (Cambridge ESOL Examination)

B. Seznam publikací

Publikace I: Šlechtová, T.; Gilar, M.; Kalíková, K.; Tesařová, E. Insight into Trypsin Miscleavage: Comparison of Kinetic Constants of Problematic Peptide Sequences, *Analytical Chemistry* 87 (2015) 7636-7643 (IF 5,886).

Publikace II: Šlechtová, T.; Gilar, M.; Kalíková, K.; Moore, S.S.; Jorgenson, J.W.; Tesařová, E. Comparison of catalytic activity of three trypsin columns used in liquid chromatography, zasláno do periodika *Analytical Chemistry* (IF 5,886).

Publikace III: Riesová, M.; Geryk, R.; Kalíková, K.; Šlechtová, T.; Voborná, M.; Martínková, M.; Bydžovská, A.; Tesařová, E. Direct CE and HPLC methods for enantioseparation of tryptophan and its unnatural derivatives, *Separation and Purification Technology* 158 (2016) 24-30 (IF 3,091).

Publikace IV: Kalíková, K.; Šlechtová, T.; Tesařová, E. Cyclic Oligosaccharide-Based Chiral Stationary Phases Applicable to Drug Purity Control; A Review, přijato k publikaci v periodiku *Current Medicinal Chemistry* (IF 3,455).

Publikace V: Kalíková, K.; Šlechtová, T.; Tesařová, E. Enantiomeric ratio of amino acids as a tool for determination of aging and disease diagnostics by chromatographic measurements, zasláno do periodika *Separations* (nový odborný časopis, zatím nemá IF).

Publikace VI: Kalíková, K.; Šlechtová, T.; Vozka, J.; Tesařová, E. Supercritical Fluid Chromatography as a Tool for Enantioselective Separation; A Review, *Analytica Chimica Acta* 821 (2014) 1-33 (IF 4,712).

Publikace VII: Šlechtová, T.; Kalíková, K.; Tesařová, E. Stanovení enantiomerů theaninu pomocí HPLC, porovnání metod detekce, *Chemické Listy* 107 (2013) 228-232 (IF 0,279).

C. Seznam konferenčních příspěvků

Přednášky:

The comparison of kinetic constants of different sequence motifs digested by trypsin

T. Šlechtová, K. Kalíková, E. Tesařová

9th International Student Conference “Modern Analytical Chemistry“ Praha, Česká republika, 2013

The study of peptide digestion by trypsin under RP HPLC conditions

T. Šlechtová, K. Kalíková, M. Gilar, E. Tesařová

13th Symposium and Summer School on Bioanalysis, Debrecen, Maďarsko, 2013

The Influence of Protein Structure to Trypsin Digestion Kinetics

T. Šlechtová, K. Kalíková, M. Gilar, E. Tesařová

15th Symposium and Summer School on Bioanalysis, Targu Mures, Rumunsko, 2015

Comparison of three immobilized trypsin reactors used in HPLC

T. Šlechtová, M. Gilar, K. Kalíková, E. Tesařová

16th Symposium and Summer School on Bioanalysis, Varšava, Polsko, 2016

Plakátová sdělení:

Comparison of methods for detection and determination of enantiomers of theanine by HPLC

T. Šlechtová, K. Kalíková, E. Tesařová

29th International Symposium on Chromatography, Toruň, Polsko, 2012

The analysis of tryptic digests of peptides with different sequence motifs

T. Šlechtová, K. Kalíková, M. Gilar, E. Tesařová

4. ročník konference Česká chromatografická škola - HPLC 2013, Seč, Česká republika, 2013

The kinetic study of peptide digestion by trypsin

T. Šlechtová, K. Kalíková, M. Gilar, E. Tesařová

39th International Symposium on HPLC Separations & Related Techniques, Amsterdam, Nizozemsko, 2013

Structure related trypsin cleavage of peptides

E. Tesařová, **T. Šlechtová**, K. Kalíková, M. Gilar, J. Ševčík

63th American Crystallographic Association, Honolulu, Hawaii, 2013

An insight into trypsin miscleavage: Comparison of kinetic constants of problematic sequences

T. Šlechtová, K. Kalíková, M. Gilar, E. Tesařová

21st International Symposium on Electro and Liquid Phase Separation Techniques, Natal, Brazílie, 2014

Tryptic digestion kinetics of miscleavage sequence motifs

T. Šlechtová, M. Gilar, K. Kalíková, E. Tesařová

5. ročník konference Česká chromatografická škola - HPLC 2015, Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika, 2015

Determination of kinetic constants of tryptic miscleavage patterns

T. Šlechtová, M. Gilar, K. Kalíková, E. Tesařová

42nd International Symposium on HPLC Separations & Related Techniques, Ženeva, Švýcarsko, 2015

Comparison of catalytic activity of three trypsin columns used in HPLC

T. Šlechtová, M. Gilar, K. Kalíková, E. Tesařová

44th International Symposium on HPLC Separations & Related Techniques, San Francisco, USA, 2016

Comparison of performance of three trypsin columns compatible with HPLC apparatus

T. Šlechtová, M. Gilar, K. Kalíková, E. Tesařová

31st International Symposium on Chromatography, Cork, Irsko, 2016