

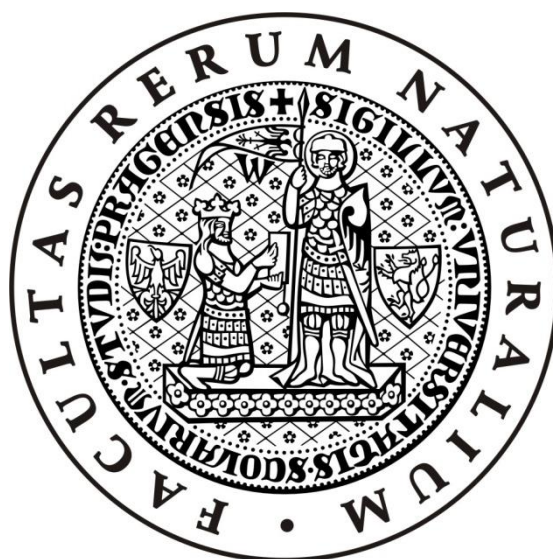
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Biologie



Tomáš Siegel

Využití metod hmotnostní spektrometrie v identifikaci a lokalizaci významných molekul parazitických helmintů
Application of Mass Spectrometry Methods for Identification and Localization of Important Molecules from Parasitic Helminths

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Martin Kašný, PhD.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 22. 8. 2014

.....

Poděkování

V první řadě patří velké poděkování mému školiteli RNDr. Martinu Kašnému, PhD. za vytrvalou podporu, obrovskou trpělivost, velmi cenné rady a připomínky a odborné vedení při vypracování této bakalářské práce. Rád bych také poděkoval RNDr. Janě Bulantové, PhD. za odborné konzultace, své přítelkyni Kristině Blažkové za morální oporu a v neposlední řadě své rodině za neocenitelnou podporu během celého studia.

Abstrakt

Tato práce shrnuje základní technologická řešení, postupy a principy hmotnostní spektrometrie a zaměřuje se na její využití v oblasti parazitologie. V první části jsou postupně definovány jednotlivé fáze zpracování biologického vzorku s využitím hmotnostní spektrometrie - od ionizace až po způsoby vyhodnocování výsledků. Různé postupy jsou prezentovány především na příkladech publikací zabývajících se využitím hmotnostní spektrometrie při identifikaci molekul parazitických helmintů, se zaměřením na proteiny a fasciolidní motolice (např. *Fasciola hepatica*). Druhá část práce se věnuje identifikaci a lokalizaci molekul pomocí zobrazovací hmotnostní spektrometrie a využití této techniky v experimentální biologii, parazitologii. V závěru práce je navržen aplikovatelný postup pro identifikaci a lokalizaci významných proteinů motolice *Fascioloides magna* s využitím kombinace techniky mikrodisekce a hmotnostní spektrometrie.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, paraziti, helminti, MALDI MSI, zobrazovací hmotnostní spektrometrie, laserová mikrodisekce

Abstract

The thesis summarises the fundamental technological solutions, processes and principles of mass spectrometry with special focus on their use in parasitology. In the first part, the particular phases of processing of the biological sample by using mass spectrometry are defined - from ionisation to the evaluation of results. In the text, the various methodological approaches are presented mainly on the published examples concerning the identification of molecules from parasitic helminths, especially proteins of fasciolid flukes (e.g. *Fasciola hepatica*). The second part of the thesis comprises the methods of identification and localization of molecules by using mass spectrometry imaging and the use of this combined technique in experimental biology, parasitology, is discussed. There is also proposed the procedure including the combination of laser microdissection and mass spectrometry techniques which could be applied for identification and localisation of important proteins of the fluke *Fascioloides magna*.

Key words: Mass spectrometry, parasites, helminths, MALDI imaging, MSI, laser dissection

OBSAH

1. Úvod	1
2. Cíl práce.....	1
3. Hmotnostní spektrometrie	2
3.1. Princip.....	3
3.2. Jednotlivé části hmotnostního spektrometru	3
3.2.1. Vstupní prostor pro analyzovaný vzorek.....	4
3.2.2. Iontový zdroj.....	5
3.2.3. Hmotnostní analyzátor.....	10
3.2.4. Tandemová hmotnostní spektrometrie	20
3.2.5. Detektor iontů	21
3.2.6. Hmotnostní spektrum	23
3.2.7. Metody vyhodnocování výsledků.....	24
3.3. Další metody identifikace proteinů.....	27
4. Zobrazovací hmotnostní spektrometrie	28
4.1. MALDI MSI.....	28
4.1.2. Princip metody.....	29
4.1.2. Možnosti a omezení využití MALDI MSI	30
4.1.3. Využití v experimentální biologii.....	30
4.1.4. Srovnání s jinými přístupy pro identifikaci a lokalizaci molekul.....	31
5. Postup identifikace a lokalizace vybraného proteinu na příkladu <i>Fascioloides magna</i> ..	31
6. Závěr.....	32
Publikované texty vzniklé v průběhu studia.....	33
Seznam použité literatury	33

1. Úvod

Díky obecnému technologickému pokroku a současnému rozvoji moderních biologických vědních disciplín se identifikace nejrůznějších molekul (například lipidy, sacharidy, proteiny) přítomných v komplexních biologických vzorcích stává běžně dostupnou rutinní aplikací. Mezi dominující postupy směřující k identifikaci molekul spadá i hmotnostní spektrometrie, která je využívána v mnoha odvětvích výzkumu, například také v protetických přístupech k parazitologii. Přestože byla doposud publikována celá řada metodik, jejichž použitím lze identifikovat jednotlivé typy molekul ve vzorcích nejrůznějších parazitárních organismů, tak prozatím zcela chybí informace o hmotnostně spektrometrické lokalizaci konkrétních molekul přímo ve tkáni daného parazita (helmita). MALDI MSI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging) je jednou z technik hmotnostní spektrometrie, která umožňuje jak elegantní identifikaci vybrané molekuly, tak její prostorovou lokalizaci přímo ve tkáňovém řezu. Získaných informací z jednotlivých hmotnostně spektrometrických analýz lze navíc využít i k vytipování funkčně významných molekul, jejichž následná experimentální charakterizace by mohla přispět k pochopení některých zásadních biologických dějů nebo by mohla být využita v diagnostice či v boji s parazity.

2. Cíl práce

Hlavní cíl:

V navržené práci by měly být definovány základní hmotnostně spektrometrické přístupy ve vztahu k identifikaci molekul parazitických červů. Zároveň bude diskutováno možné využití těchto technik k přímé lokalizaci jednotlivých molekul ve tkáňových řezech. Dílčí cíle této práce jsou:

- 1) Zpracovat literární přehled jednotlivých hmotnostně spektrometrických technik a jejich aplikovatelnost pro identifikaci a lokalizaci různých typů molekul u modelových mnohobuněčných organismů se zaměřením zejména na parazitární modelové organismy - helminty.
- 2) Na základě zjištěných informací definovat aplikovatelný hmotnostně spektrometrický postup od zpracování vzorku - modelového parazitického červa (např. *Fascioloides magna*) po identifikaci/lokalizaci vybrané funkční molekuly (např. peptidáza).

3. Hmotnostní spektrometrie

Objev hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS) je považován za jeden z důležitých milníků vědy, který znamenal průlom v analytických metodách umožňujících odhalování složení látek. Jedná se o analytickou fyzikálně-chemickou metodu, jejímž prostřednictvím lze stanovit hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů. Díky mimořádným detekčním limitám v řádech fentomolů (Morris et al., 1997) a attomolů (Valaskovic et al., 1996), rychlosti měření a interpretace výsledků (v řádu hodin) a také širokému spektru možného využití, nachází hmotnostní spektrometrie široké uplatnění v mnoha biologicko-chemických odvětvích (například farmakologie, biochemie či molekulární biologie) zaměřených na určování primární struktury látek měřením hmotnosti biomolekul v jednoduchých či velmi komplexních vzorcích. Informace získané hmotnostní spektrometrií jsou dnes zásadní ve výzkumu rakoviny v lékařství, při charakterizaci biotransformace terapeutik a sledování jejich metabolitů ve farmaceutickém průmyslu, ke kontrole kvality a bezpečnosti potravin nebo při analýze ropných produktů v petrochemickém průmyslu.

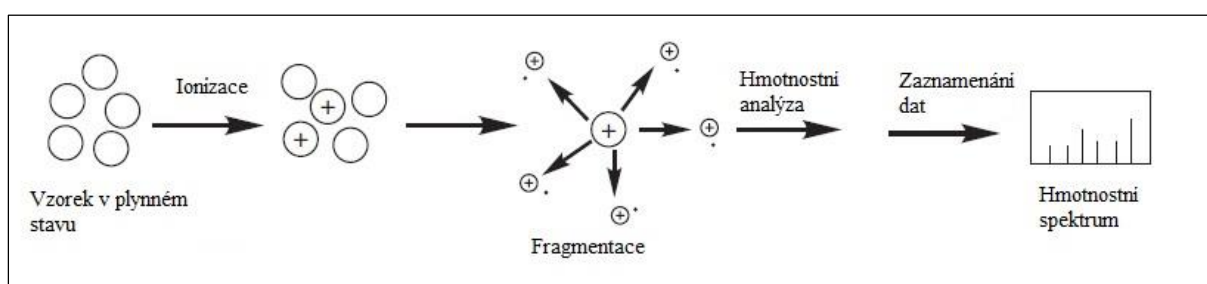
Za zakladatele hmotnostní spektrometrie je považován Sir Joseph J. Thompson (1856-1940), který předpověděl mnohé možnosti budoucího využití této techniky. První hmotnostní spektrometr sestavil J.J. Thomson již v roce 1913 (Thomson, 1913). Dalším milníkem v rozvoji metody byl rok 1956, kdy Fred W. McLafferty a Ronald S. Gohlke spojili hmotnostní spektrometrii s plynovou chromatografií (Gohlke, 1959). Ke spojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií umožňující přímou chemickou ionizaci vzorku došlo v 70. letech (Baldwin a McLafferty, 1973). Zavedení ionizační techniky elektrospreje (Electrospray ionization, ESI) (Fenn et al., 1989) a laserové desorpce a ionizace za účasti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI) (Karas a Hillenkamp, 1988) v 80. letech 20. století vyústilo zejména k rozvoji analýz biologických molekul s velkou hmotností, jako jsou syntetické polymery, proteiny a polynukleotidy. V posledních dvaceti letech bylo v odvětvích hmotnostní spektrometrie dosaženo obrovského pokroku, k čemuž přispěly nejen nové inovativní technické vlastnosti částí hmotnostního spektrometru, ale také vývoj zcela nových instrumentů jakým byl například Orbitrap (Makarov, 2000). Díky tomuto technologickému rozvoji se hmotnostní spektrometrie stala hlavní metodou používanou v proteomice (Mann a Kelleher, 2008) a nahradila tím tradiční metody identifikace proteinů jako například Edmanovo odbourávání (Graves a Haystead, 2002).

Současné aplikace hmotnostní spektrometrie znamenají důležitý přínos i pro oblast parazitologie. V minulosti byly tyto techniky využity k vybudování efektivní strategie v boji proti parazitárním onemocněním, směřujícím například k nalezení a vytipování potenciálních molekul vhodných pro vývoj nových vakcín (Castro-Borges et al., 2011). Zkoumání jednotlivých funkčních molekul parazita a snaha o pochopení jejich funkce hraje důležitou roli při zkoumání biologie parazita a jeho interakce s hostitelem (González-Miguel et al., 2014). Charakterizace funkčních molekul parazita, sledování míry jejich exprese v různých vývojových stádiích a jejich lokalizace v dané tkáni jsou přesně ty oblasti, ve kterých mohou být techniky hmotnostní spektrometrie přínosné.

3.1. Princip

Předpokladem úspěšné analýzy prostřednictvím hmotnostního spektrometru je, že přenosem vložené energie na vzorek dojde k uvolnění nabitých fragmentů ze zkoumaného vzorku, které jsou následně ve vakuu separovány dle poměru hmotnosti (m) a náboje (z). Prostřednictvím detektoru je zaznamenáno množství nabitých částic a jejich m/z hodnoty (Gross, 2004). Tímto procesem vzniká pro danou sestavu fragmentů unikátní hmotností spektrum, které lze počítačově vyhodnotit a pomocí různých dostupných algoritmů definovat složení dané látky (Obr. 1).

Obr. 1: Základní schéma principu hmotnostní spektrometrie (upraveno podle Dass, 2007).



3.2. Jednotlivé části hmotnostního spektrometru

Hmotností spektrometr se vždy skládá z následujících základních částí (Obr. 2):

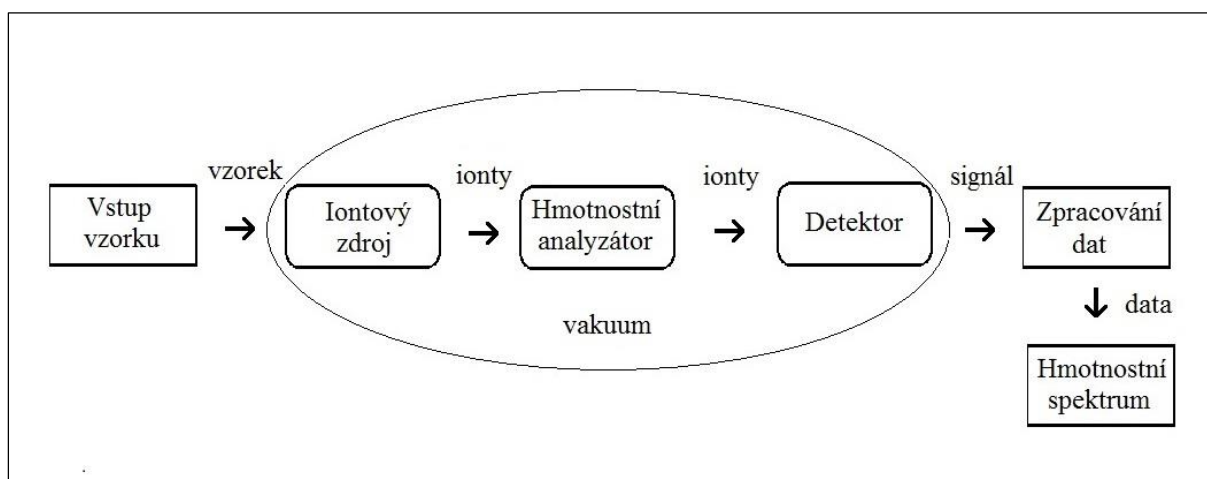
- vstupního prostoru pro vzorek
- zdroje ionizace (například elektronová ionizace (elektrosprej), laser (MALDI))

- analyzátoru, který umožňuje separování iontů (například magnetický sektor, průletový analyzátor, iontová past)
- detektoru zaznamenávajícího hmotnost a náboj iontů (například elektronový násobič či Faradayova klec) (Gross, 2004).

Data naměřená hmotnostním spektrometrem jsou dále zpracována s využitím vhodného softwaru (např. Mascot, ProFound) umožňujícím jejich interpretaci s využitím veřejných databází (Řehulka et al., 2007). Společným rysem hmotnostních spektrometrů je také jejich funkčnost za přítomnosti zvýšeného vakua. Díky vakuu nedochází v analyzátoru ke srážkám iontů a je tímto omezena další nezamýšlená fragmentace nabitých částic a změny v jejich trajektoriích.

V současné době jsou na trhu nabízeny různé typy výše uvedených částí hmotnostního spektrometru a jsou spolu kombinovatelné do mnoha technických řešení. Každá sestava má svá pozitiva i negativa a jejich správný výběr je klíčový pro úspěch budoucích experimentů. Některá technická řešení hmotnostních spektrometrů jsou charakterizována v následujících kapitolách.

Obr. 2: Základní schéma hmotnostního spektrometru (T. Siegel).



3.2.1. Vstupní prostor pro analyzovaný vzorek

Tato část hmotnostního spektrometru slouží k zavedení zkoumaného analytu do prostředí hmotnostního spektrometru. Obecně existují dvě základní možnosti zavedení vzorku – přímé vložení a přímý nástřik (Hoffmann a Stroobant, 2007). V prvním případě se vzorek vkládá z vnějšího prostředí hmotnostního spektrometru pomocí sondy nebo „spotovací“ destičky,

na které je nanesen společně s matricí schopnou absorbovat energii zdroje. Vzorek je v tomto případě zaváděn přes vakuový zámek, aby nedocházelo ke změnám tlaku uvnitř spektrometru. Tímto způsobem jsou do spektrometru zaváděny především vzorky pevného skupenství, které jsou následně podrobeny desorpčním ionizačním technikám jako je např. MALDI. Ve druhém případě je vzorek v plynném nebo kapalném stavu vstříkovan pomocí kapiláry, tímto způsobem je možné analyzovat i velmi malé množství vzorku. Přímé vstříkování vzorku je často spojeno s předcházející separační technikou plynové (Gohlke, 1959) nebo kapalinové (Holčápek, 1998) chromatografie, pomocí které je vzorek přiváděn a lze jej bezprostředně ionizovat například pomocí ionizační techniky elektrospreje.

3.2.2. Iontový zdroj

Iontový zdroj je část hmotnostního spektrometru, ve které dochází k ionizaci vzorku - převedení neutrálních molekul na nabitě částice (Gross, 2004). Vzorek je do iontového zdroje přiváděn ze vstupního prostoru hmotnostního spektrometru a pomocí některé z ionizačních metod (Tab. 1) jsou ze vzorku produkovány nabitě ionty v plynné fázi. Konkrétně jsou ionty vzorku tvořeny přidáním nebo odebráním jednoho nebo více protonů, kationtu, aniontu nebo elektronů (Hoffmann a Stroobant, 2007). Takto vyprodukované nabitě částice následně putují do hmotnostního analyzátoru.

Ionizačních metod lze v současné době napočítat desítky. Obecně se však dají rozdělit do dvou skupin v závislosti na množství dodané energie na tzv. „tvrdé“ a „měkké“. Při použití tvrdých ionizačních metod je dodávaná energie větší, což způsobuje rozsáhlejší fragmentaci vzorku. Naopak u měkkých ionizačních technik je množství dodávané energie menší, a proto jsou tvořeny převážně ionty molekul (Friedecký a Lemr, 2012).

Tab. 1: Ionizační metody organických látek (upraveno podle Cole, 2010).

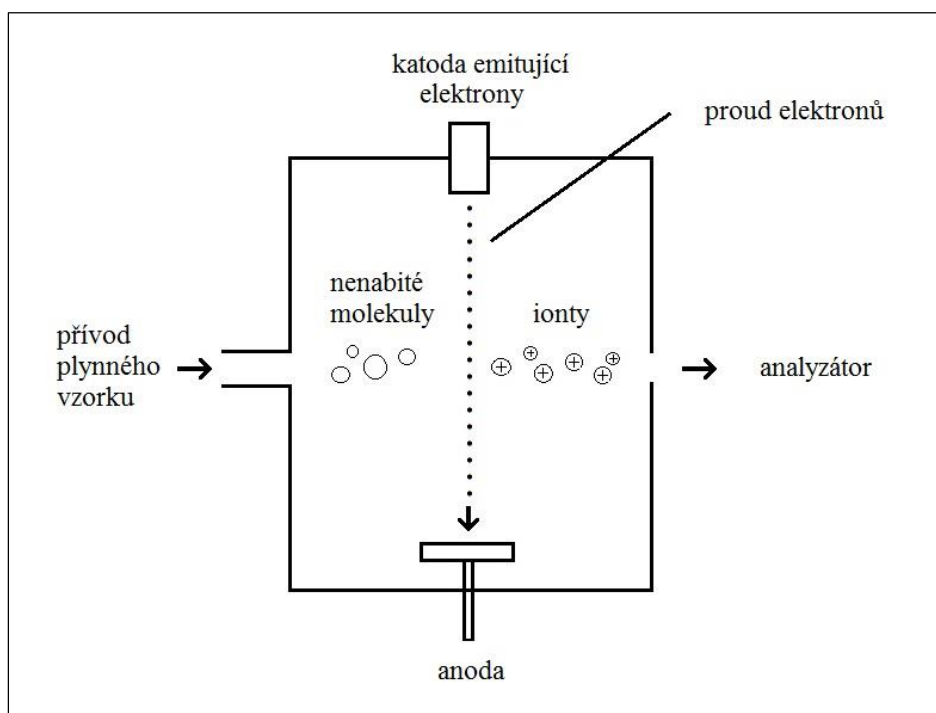
Metoda	Zkratka	Stav vstupujícího vzorku	Charakteristika
Elektronová ionizace	EI	plynný stav	Vysoce kvalitní spektrum
Chemická ionizace	CI	plynný stav	Kontrola vnitřní energie a fragmentace
Desorpční ionizace	DI	pevný stav	Matrice a vzorek; jednoduše nabitě ionty
Sprejová ionizace	SI	roztok	Vícenásobně nabitě ionty; mírná fragmentace

3.2.2.1. Tvrdé ionizační metody

Nadbytek vnitřní energie předaný molekulám vzorku v iontovém zdroji způsobuje jejich rozpad na menší části, čímž vznikají iontové fragmenty. Fragmentace pomocí tvrdých ionizačních metod umožňuje snadné a přesné vyhodnocení výsledků hmotnostní spektrometrie.

a) *Elektronová ionizace (Electron Ionization, EI)*: Metoda je založena na principu předávání energie letících elektronů molekulám analytu (Obr. 3). Při tomto typu ionizace je vzorek v plynném skupenství přiváděn a rozprašován úzkou kapilárou do prostoru s vakuem, kde dochází ke střetávání molekul analytu s proudem elektronů o energii 10-70^{eV} za vzniku iontů (Gross, 2004). Touto metodou je nejčastěji získán kladně nabitý radikál molekuly a velké množství fragmentů. Díky elektronové ionizaci analytu v plynném stavu došlo již v roce 1957 (Holmes a Morrel, 1957) k vytvoření techniky spojující hmotnostní spektrometrii a plynovou chromatografii (Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS). Elektronovou ionizaci lze využít především pro analýzu malých organických molekul do velikosti přibližně 1 kDa. Nevýhodou této metody je nutnost převedení vzorku v pevném nebo kapalném stavu do stavu plynného před samotnou ionizací.

Obr. 3: Schéma elektronové ionizace (T. Siegel)



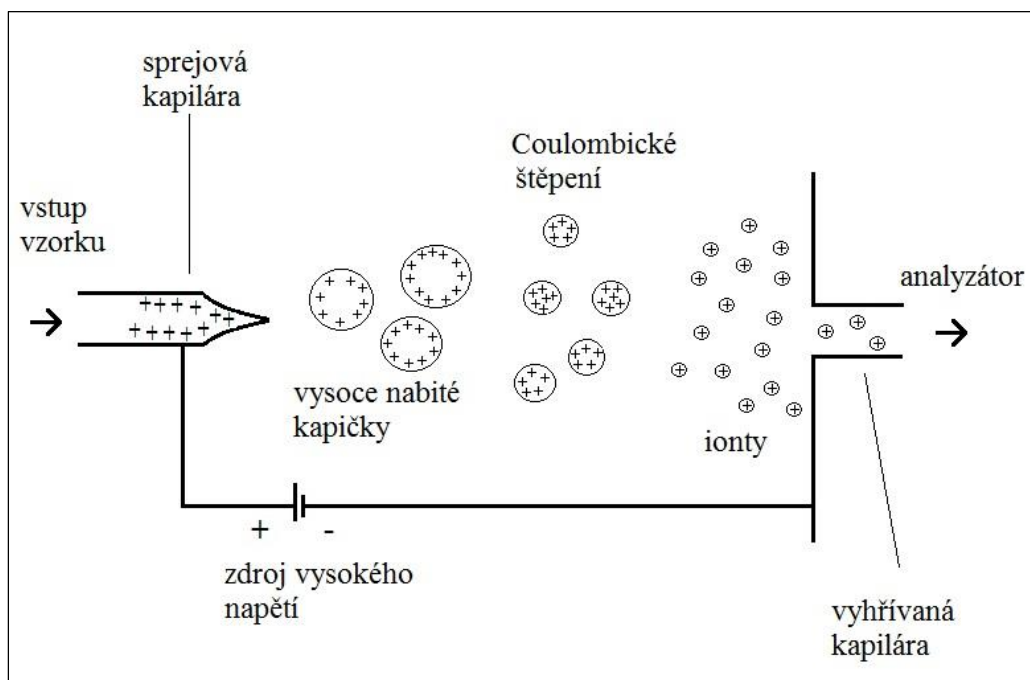
3.2.2.2. Měkké ionizační metody

Množství energie předávané analytu je na rozdíl od tvrdých ionizačních metod menší. Díky tomu jsou ze vzorku tvořeny především ionty molekul a malé množství fragmentů. Pomocí těchto metod lze proto získat informace o hmotnosti molekul v jejich původním stavu. Průlomem v možnostech měkkých ionizačních technik bylo zavedení ionizace pomocí elektrospreje (Fenn et al., 1989) a MALDI (Karas a Hillenkamp, 1988) v 80. letech, které umožnily měření biomolekul a velmi polárních látek.

a) *Chemická ionizace (Chemical Ionization, CI)*: Při chemické ionizaci jsou molekuly analytu ionizovány zprostředkovaně přes reakční plyn, kterým může být metan, isobutan nebo amoniak. Reakční plyn však musí být nejprve ionizován proudem dopadajících elektronů. Následně se za vysokého tlaku uvnitř iontového zdroje stětavají molekuly analytu s ionizovanými molekulami reakčního plynu za vzniku iontů molekul analytu (Munson a Field, 1966). Konstrukčně je chemická ionizace podobná ionizaci elektronové, ionizace však probíhá za vyššího tlaku a vznikají především ionty molekul a malé množství fragmentů. Stejně jako při elektronové ionizaci musí být analyzovaná látka tepelně stabilní. V praxi se využívá u molekul do hmotnosti 1 kDa.

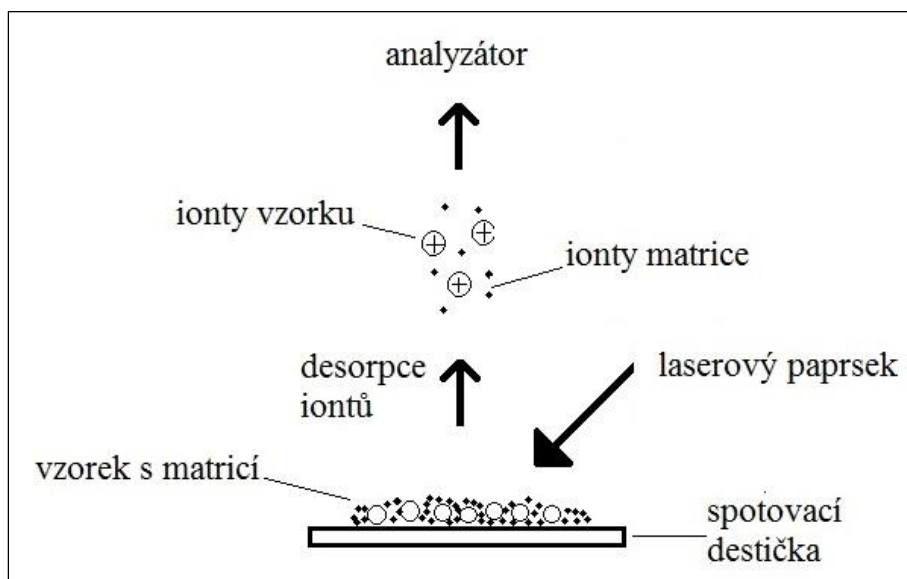
b) *Elektrosprejová ionizace (Electrospray Ionization, ESI)*: Elektrosprejová ionizace je metoda, jejímž prostřednictvím se tvoří nabitě částice z analytu rozpuštěného v roztoku. Tento roztok je rozstříkovan kapilárou do prostoru s atmosférickým tlakem ve formě vysoce nabitých kapiček (Obr. 4). Odpařováním rozpouštědla roste hustota náboje na povrchu kapiček, až dojde k jejich popraskání (Coulombické štěpení). Uvolněné ionty jsou poté elektrickým polem urychleny k analyzátoru (Banerjee a Mazumdar, 2012). Jedná se o nejpoužívanější techniku pracující s kapalným vzorkem. Touto metodou je možné aplikovat i na molekuly o velkých hmotnostech (teoreticky až 1000 kDa), jako jsou různé polymery, nukleové kyseliny, peptidy nebo i proteiny (Fenn et al., 1989). Nevýhodami této metody je menší přehlednost spekter složitějších směsí a s tím spojená jejich komplikovanější interpretace, vznik mnohonásobně nabitých iontů a vysoká náročnost na čistotu vzorku. K rozšíření využití elektrosprejové ionizace přispívá zejména možnost jejího spojení s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

Obr. 4: Schéma elektrosprejové ionizace (T. Siegel).



c) *MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)*: Laserem asistovaná desorpce a ionizace za účasti matrice umožňuje odpaření a ionizaci netěkavých biologických vzorků připravených v pevném skupenství. Před ionizací je nutné nejprve vzorek nanést na spotovací destičku, specificky naštěpit (například proteázou - trypsinem) a poté vzorek převrstvit matricí; obvykle se jedná o organickou kyselinu (například α -kyano-4-hydroxy skořicová kyselina, CHC), která je schopná absorbovat energii laseru. Takto připravený vzorek je excitován krátkým intenzivním pulsem laseru (nejčastěji UV laser; například dusíkový s vlnovou délkou 337 nm), který vyvolává krystalizaci, desorpci a ionizaci vzorku (Obr. 5). Metoda MALDI byla vynalezena v roce 1985 (Karas et al., 1985) a v současnosti se jedná o jeden z nejvíce využívaných zdrojů ionizace. Tato ionizační metoda je využívána především k ionizaci molekul s vysokou molekulovou hmotností, jako jsou polysacharidy, peptidy a proteiny. Ionizace molekul s molekulovou hmotností menší než 1,5 kDa je díky přítomnosti matrice realizovatelná, ale je komplikovaná (Dass, 2007). Vytvořené ionty jsou následně nejčastěji měřeny pomocí průletového analyzátoru (Time-Of-Flight, TOF).

Obr. 5: Schéma MALDI ionizace (T. Siegel).



Výběr správné matrice (Tab. 2) je rozhodující pro následnou analýzu a interpretaci naměřených spekter, neboť při tomto typu ionizace je náboj analytu předáván právě prostřednictvím matrice (Gross, 2004). Smícháním vzorku s matricí o výrazně větší koncentraci dochází ke kokrytalizaci vzorku a matrice. Pulsem laseru pak dochází k desorpci směsi a vzniku iontů analytu předáním jednoho nebo více fotonů matrice molekule vzorku. Tímto procesem vytvořené, nabitě a emitované ionty prolétávají k hmotnostnímu analyzátoru.

Tab. 2: Běžně používané UV-MALDI matrice (upraveno podle Hoffmann a Stroobant, 2007).

Vzorek	Matrice	Zkratka
Peptidy/proteiny	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina	CHCA
	2,5-dihydroxybenzoová kyselina	DHB
	3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina	SA
Oligonukleotidy	trihydroxyacetofenon	THAP
	3-hydroxypicolinová kyselina	HPA
Sacharidy	2,5- dihydroxybenzoová kyselina	DHB
	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina	CHCA
	trihydroxyacetofenon	THAP
Syntetické polymery	trans-3-indolakrylová kyselina	IAA
	dithranol	DIT
	2,5- dihydroxybenzoová kyselina	DHB
Organické molekuly	2,5- dihydroxybenzoová kyselina	DHB
Anorganické molekuly	trans-2-(3-(4-tert-butylfenyl)-2-methyl-2-propenyliden)malononitril	DCTB
Lipidy	dithranol	DIT

3.2.3. Hmotnostní analyzátor

Klíčovou částí hmotnostního spektrometru je analyzátor, ve kterém dochází k separování iontů v plynné fázi na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z). K separaci iontů dochází díky působení statického nebo dynamického elektrického a magnetického pole, případně jejich kombinací. Základní typy analyzátorů a principy separace jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 3).

Tab. 3: Typy analyzátorů používané v hmotnostní spektrometrii (upraveno podle Hoffmann a Stroobant, 2007).

Typ analyzátoru	Symbol	Princip separace
Magnetický sektor	B	Hybnost
Kvadrupól	Q	m/z (stabilita trajektorie)
Iontová past	IT	m/z (rezonanční frekvence)
Analyzátor doby letu	TOF	rychlost (čas letu)
Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací	FTICR	m/z (rezonanční frekvence)
Orbitrap	OT	m/z (rezonanční frekvence)

Z obecného pohledu jsou ionty v analyzátoru urychleny a následně vedeny na detektor, kde je zaznamenán jejich počet a poměr jejich hmotnosti k náboji. Výkonnost hmotnostních analyzátorů je dána především charakteristikami uvedenými v tabulce (Tab. 4).

Tab. 4: Charakteristiky ovlivňující výkonnost analyzátorů (upraveno podle Dass, 2007).

Název	Popis
Hmotnostní rozsah	nejnižší a nejvyšší měřitelné hodnoty m/z
Rozlišovací schopnost	schopnost analyzátoru rozlišit dvě blízké hodnoty m/z
Přesnost určení hmotnosti	míra shody mezi naměřenou a teoretickou hodnotou m/z - vyjádřena v procentech nebo pomocí počtu částic z milionu (parts per milion, ppm)
Rychlost měření	počet skenů analyzátoru za sekundu

Intenzivní vývoj hmotnostních analyzátorů je datován na přelom 40. a 50. let, kdy byly popsány principy průletového analyzátoru (Stephens et al., 1946), iontové cyklotronové rezonance a kvadrupólového analyzátoru (Paul a Steinwedel, 1953). Po vynalezení ionizačních zdrojů schopných vaporizace a ionizace biomolekul, bylo zapotřebí zdokonalit rychlost, přesnost a rozlišení hmotnostních analyzátorů. Následkem toho bylo v posledních dvaceti

letech vynalezeno a zdokonaleno množství analyzátorů, přičemž mezi v současnosti nejrozšířenější se řadí například Orbitrap, průletový nebo kvadrupólový analyzátor. Požadavkem na tyto analyzátoary je především možnost jejich zavedení v kombinaci s iontovými zdroji MALDI a ESI. Správný výběr analyzátoru je rozhodující pro úspěch experimentu prováděného hmotnostní spektrometrií (Gross, 2004). Základní parametry hmotnostních analyzátorů jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 5).

Tab. 5: Základní parametry hmotnostních analyzátorů (T. Siegel)

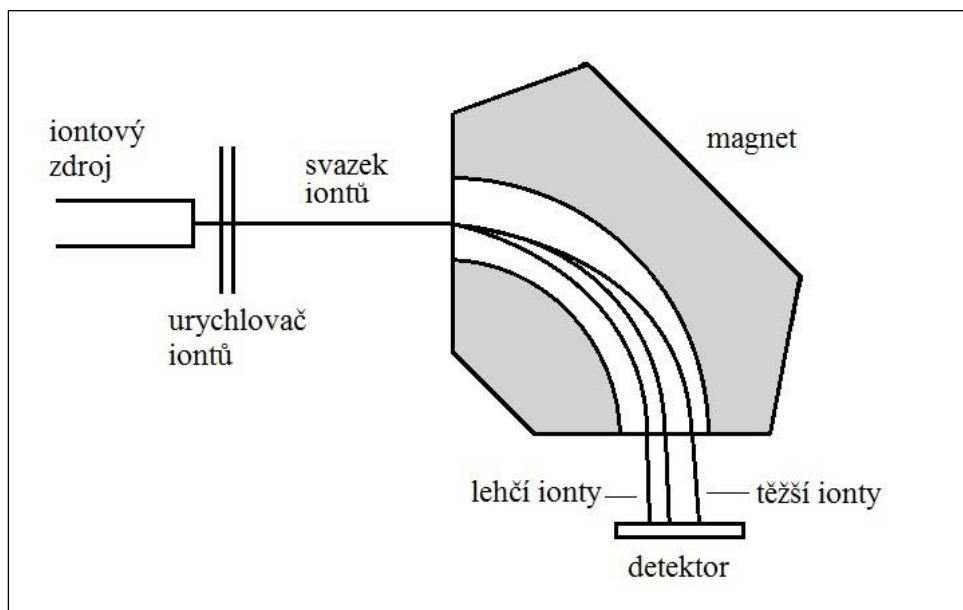
Typ analyzátoru	Hmotnostní rozsah -horní limit (*10 ³)	Rozlišovací schopnost (*10 ³)	Přesnost určení hmotnosti (ppm)	Rychlost měření (sken/s)	Cena přístroje (mil. Kč)
Magnetický sektor	20	<100	<5	0,1-20	10-15
TOF	>1 000	10-60	<5	10-500	5-7
Kvadrupól	2-4	3-5	>5	1-20	2-4
Iontová past	4-6	4-20	>5	1-200	3-5
FTICR	4-10	>1 000	<2	0,5-2	17-30
Orbitrap	6	100-240	1-3	1-5	11-13

Spojením dvou analyzátorů, například průletového analyzátoru a kvadrupólu (Q-TOF micro Mass Spectrometer, Waters Micromass), v jednom hmotnostním spektrometru vzniká přístroj s hybridním tandemovým uspořádáním (Hunt et al., 1986). Metoda tandemové hmotnostní spektrometrie bude podrobněji popsána v kapitole 3.2.4. Tandemová hmotnostní spektrometrie. Hybridní tandemové uspořádání je převládající technikou pro identifikaci nejrůznějších molekul v oboru parazitologie (Chemale et al., 2006; Morphew et al., 2011; Moxon et al., 2010).

a) *Magnetický sektor*: Magnetický sektor je nejstarším typem hmotnostního analyzátoru. K separování iontů je využíváno magnetické pole, které ovlivňuje rychlost a dráhu pohybu iontů v prostoru. Nabitá částice je před vstupem do magnetického pole urychlena pomocí pole elektrického. Ionty v magnetickém poli putují po zakřivené dráze o různých poloměrech, přičemž velikost zakřivení záleží na rychlosti iontů, síle magnetického pole a poměru m/z iontu. Více nabitě a lehčí ionty se pohybují po delší trajektorii než ionty těžší a s menším nábojem (Obr. 6). Díky tomuto principu je možné od sebe jednotlivé ionty oddělit (Gross, 2004). Hmotnostní spektrum je zaznamenáno po dopadu iontu na detektor. Vedle magnetických sektorů s jednoduchou fokusací využívajících k separaci iontů pouze magnetické pole, existují

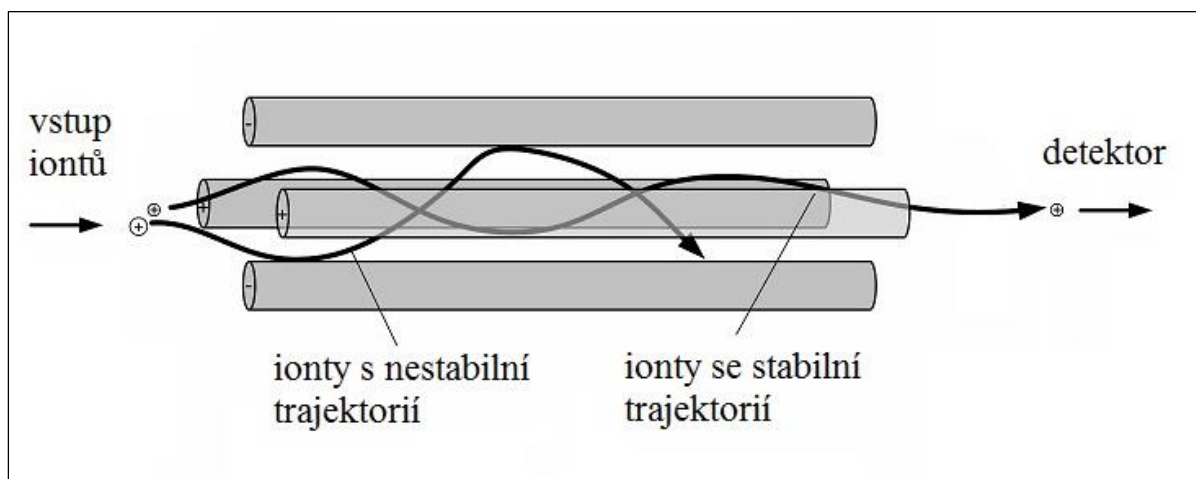
magnetické sektory s dvojitou fokusací využívající magnetické a elektrostatické pole. Přidáním elektrického pole za magnetické doputují k detektoru pouze ionty se stejnou kinetickou energií, díky čemuž dochází ke snížení rozsahu kinetických energií iontů s následkem zvýšení rozlišení hmotnostního analyzátoru (Hoffmann a Stroobant, 2007). Prozatím nebyla publikována žádná práce využívající magnetický sektor k analýze molekul parazitických helmintů.

Obr. 6: Schéma magnetického sektoru (T. Siegel).



b) *Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole, Q)*: Kvadrupólový hmotnostní analyzátor se skládá ze čtyř paralelních elektrod kruhového průřezu, přičemž na dvě protilehlé elektrody je přivedeno kladné stejnosměrné napětí a na zbylé dvě záporné stejnosměrné napětí. Na všechny čtyři elektrody je současně vloženo vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionty jsou přivedeny do středu kvadrupólu, kde dochází k jejich oscilaci. Na základě velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí v daném okamžiku je umožněn průchod analyzátozem pouze iontům o určité hodnotě m/z . Ionty s nestabilní trajektorií jsou z analyzátoru vychýleny a neúčastní se další analýzy (Ekman et al., 2009). Plynulou změnou (skenováním) hodnot stejnosměrného napětí a amplitudy mohou být postupně k detektoru propuštěny ionty o všech hodnotách m/z (Obr. 7). Kvadrupólový analyzátor je vhodný pro analýzu proteinů a biomolekul ionizovaných elektrospřejem.

Obr. 7: Schéma kvadrupólu (upraveno podle Wittmann, 2007).



V oboru parazitologické proteomiky se kvadrupólový analyzátor obvykle využívá v tandemovém uspořádání s analyzátozem TOF (v sestavě Q-TOF nebo QqTOF). Nejstarší a nejnovější využití kvadrupólu v analýze molekul parazitů a několik recentních publikací jsou uvedeny v tabulce (Tab. 6). Fasciolidní motolice jsou v tabulce zvýrazněny. První publikace využívající kvadrupólového analyzátoru ke zkoumání molekul parazitického helminta se datuje do roku 1974 (Hariri, 1974). Autor měřil produkci neurotransmiterů acetylcholinu a cholinu tasemnice *Mesocostoides corti* (Platyhelminthes, Cestoda) v závislosti na vystavení parazita podmínkám různých prostředí (NCTC 135 a BME medium, fyziologický roztok, dutina břišní hostitele). Nejrecentnější publikace je od Haçarize a kol. z roku 2014 (Haçariz et al., 2014). Účelem práce bylo vytvoření proteinového profilu proteinů tegumentu a homogenizované motolice *Fasciola hepatica* (Platyhelminthes, Trematoda) v průběhu nákazy dobytka. Celkem bylo identifikováno 776 proteinů, z toho 206 specifických pro tegument a 332 specifických homogenátu.

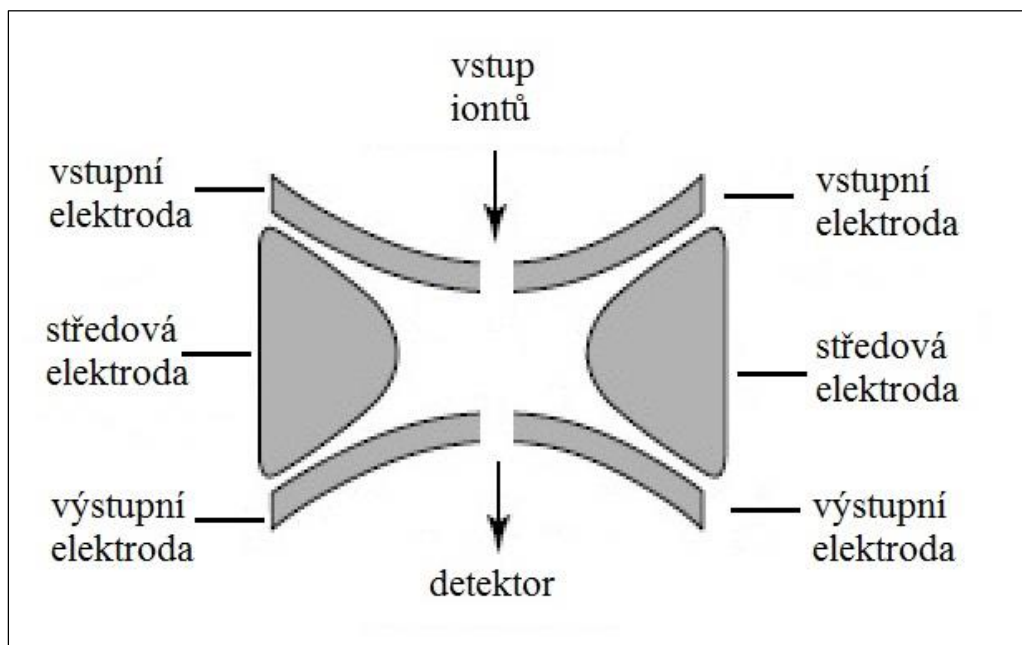
Tab. 6: Využití kvadrupólového analyzátoru v parazitologii.

Typ vzorku	Parazit	Typ zk. molekul (počet)	Rok	Sestava	Přístroj	Citace
Homogenizovaný parazit	<i>M. corti</i>	Neurotransmitter (2)	1974	Q-MS	Quad 300 quadrupole MS (EAI Scientific)	Hariri, 1974
ESP (exkrementně-sekreceční produkty)	<i>F. hepatica</i>	Protein (23)	2008	MS/MS QqToF	QSTAR Elite hybrid QqTOF MS (Applied Biosystems)	Robinson et al., 2008

Tekutina obsažená v cystě	<i>Echinococcus granulosus</i> (Platyhelminthes, Cestoda)	Protein (130)	2011	MS/MS Q-TOF	QSTAR Elite Hybrid MS/MS System (Applied Biosystems)	Aziz et al., 2011
ESP	<i>F. hepatica</i>	Protein (25)	2014	MS/MS Q-TOF	Q-TOF MS (Waters)	Morphew et al., 2014
Homogenizovaný parazit; tegument	<i>F. hepatica</i>	Protein (776)	2014	MS/MS Q-TOF	SYNAPT high-definition MS (Waters)	Haçariz et al., 2014

c) *Sférická iontová past (Three Dimensional Quadrupole Ion Trap, QIT)*: Iontová past se skládá ze dvou koncových hyperbolických elektrod a jedné středové prstencové elektrody (Obr. 8). Koncové elektrody jsou uzemněny a je na ně přivedeno stejnosměrné napětí. Na středovou elektrodu je vloženo vysokofrekvenční napětí. Ionty jsou pulzně přivedeny do pasti a poté jsou pomocí elektrických polí zachyceny, uvedeny do stabilních trajektorií. Se zvyšující se frekvencí na středové elektrodě se excitované ionty dostávají do nestabilních trajektorií a v závislosti na hodnotě m/z vyletují otvorem výstupní elektrody k detektoru (Gross, 2004). Sférická iontová past zatím nebyla využita ke zkoumání molekul parazitických helmintů.

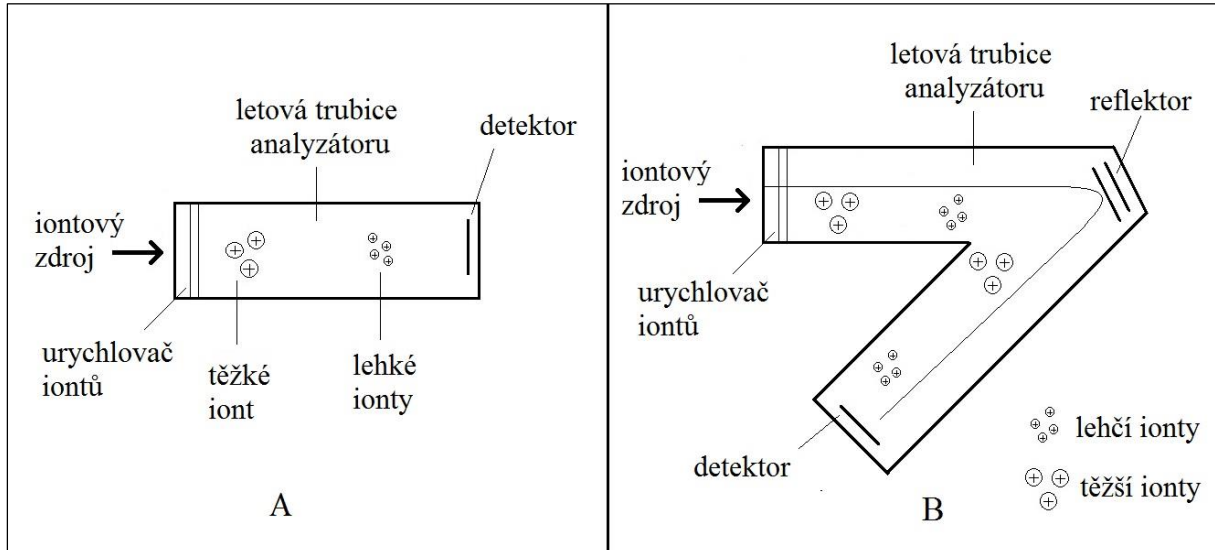
Obr. 8: Schéma iontové pasti (upraveno podle Hoffmann a Stroobant, 2007).



d) *Průletový analyzátor (Time-Of-Flight, TOF)*: Průletový analyzátor je tvořen vakuovanou letovou trubicí o délce 25-150 cm, do které jsou ionty ze zdroje urychleny elektrickým polem (10^3 - 10^4 V). K rozdělení iontů o stejné kinetické energii a s odlišnými hodnotami m/z dochází na základě rozdílné doby letu z iontového zdroje k detektoru. Ionty s nižší hodnotou m/z letí rychleji a dříve dosáhnou detektoru než ionty s větší hodnotou m/z . Hmotnost molekuly je tedy určena na základě rychlosti průletu molekuly analyzátozem (Dass, 2007). Průletový analyzátor je využíván zejména ve spojení s MALDI ionizací. Kombinace těchto technik umožňuje získání kompletního hmotnostního spektra všech iontů z každého pulsu laseru. Pomocí průletového analyzátoru lze měřit i velké molekuly jako jsou proteiny.

Průletový analyzátor může fungovat v lineárním nebo reflektorovém módu (Obr. 9). Zatímco v lineárním módu jsou ionty detekovány po průletu letovou trubicí, v reflektorovém módu je dráha letu iontů prodloužena pomocí iontového zrcadla umístěného na konci letové trubice. Reflektorovým módem je dosaženo většího rozlišení, ale menšího rozsahu, a proto je vhodný pro měření malých molekul (Gross, 2004).

Obr. 9: Schéma lineárního (A) a reflektorového (B) TOF analyzátoru (T. Siegel).



S ohledem na helminty byl analyzátor poprvé využit v roce 1992 (Chamekh et al., 1992) ke stanovení hmotnosti syntetického peptidu odvozeného z rekombinačního proteinu tasemnice *E. granulosus*.

V roce 2004 Bernal a kol. použili průletový analyzátor (Bernal et al., 2004) při identifikaci jednoho z abundančních proteinů - enolázy přítomného v ESP proteinu motolice *F. hepatica*. Tento protein o velikosti 47 kDa byl nejprve separován pomocí dvojrozměrné gelové elektroforézy (2D) a následně štěpen trypsinem. Analýza byla provedena metodou MALDI TOF na přístroji Reflex IV (Bruker Daltonics) s využitím reflektorového módu. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí softwaru MASCOT (Matrix Science) a databáze Biotoools (Bruker Daltonics).

Van Balkom a kol. (2005) využili MALDI a tandemový systém TOF/TOF k identifikaci proteinů tegumentu motolice *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes, Trematoda) (Van Balkom et al., 2005). Vzorek užitý v analýze byl připraven homogenizací separovaného tegumentu motolice. Následně byl vzorek pomocí 2D elektroforézy rozdělen na jednotlivé proteiny, které byly izolovány z gelu a enzymaticky (trypsinem) naštěpeny na peptidy. Měření proběhlo na tandemovém hmotnostním spektrometru MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems 4700 Proteomics analyzer) v pozitivním reflektorovém módu s intenzitou laseru 3800.

Analyzátor TOF byl nejrecentněji využit týmem González-Miguela et al. (2014) (González-Miguel et al., 2014). V experimentu bylo identifikováno 24 imunogenních proteinů parazita *Ascaris suum* (Platyhelminthes, Nematoda) hrajících významnou roli v interakci mezi parazitem a hostitelem. Z těchto proteinů bylo 23 zapojeno do mechanismu přežití parazita uvnitř hostitele. V následující tabulce (Tab. 7) jsou spolu s nejstarší a nejnovější publikací zaměřenou na identifikaci molekul zástupce helmintů, zařazeny také významné práce z posledních deseti let.

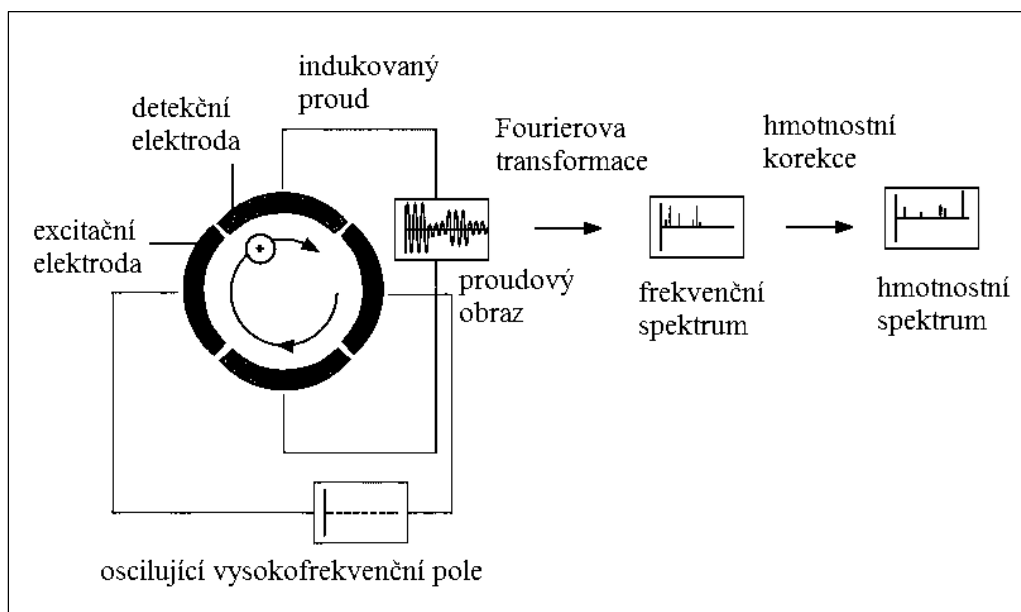
Tab. 7: Využití průletového analyzátoru v parazitologii.

Typ vzorku	Parazit	Typ zk. molekul (počet)	Rok	Sestava	Přístroj	Citace
Homogenizovaný protoskolex, obsah cyst	<i>E. granulosus</i>	Peptid (1)	1992	TOF-MS	TOF mass spectrometer (Bio-Ion)	Chamekh et al., 1992
ESP	<i>F. hepatica</i>	Protein (1)	2004	MALDI-TOF	Reflex IV (Bruker Daltonics)	Bernal et al., 2004
Homogenizovaný parazit, tegument	<i>S. mansoni</i>	Protein (740)	2005	MALDI-TOF/TOF	4700 Proteomics Analyzer TOF/TOF (Applied Biosystems)	Van Balkom et al., 2005

Homogenizovaný parazit	<i>F. hepatica</i> <i>S. mansoni</i>	Protein (45)	2011	MALDI-TOF/TOF	4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems)	Boukli et al., 2011
Tegument	<i>S. mansoni</i>	Protein (229)	2011	MALDI-TOF/TOF	4700 Proteomics Analyzer TOF/TOF (Applied Biosystems)	Castro-Borges et al., 2011
Homogenizovaný parazit	<i>Angiostrongylus vasorum</i> (Platyhelminthes, Nematoda)	Protein (14)	2011	MALDI-TOF/TOF	4700 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems)	Jefferies et al., 2011
Homogenizovaný parazit	<i>A. suum</i>	Protein (24)	2014	MALDI-TOF/TOF	Ultraflex MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics)	González-Miguel et al., 2014

e) *Iontová cyklotronová resonance s Fourierovou transformací (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FTICR)*: Tato metoda představená Comisarowem a Marshalllem v roce 1974 (Comisarow a Marshall, 1974) vznikla spojením iontové cyklotronové resonance (Ion Cyclotron Resonance, ICR) s Fourierovou transformací (Fourier Transform, FT). Ionty přicházející ze zdroje jsou pomocí elektromagnetických polí zachyceny v cyklotronové cele fungující jako iontová past (Obr. 10). Působením elektromagnetických polí zde ionty vykonávají kruhový pohyb s frekvencí závislou na hodnotách m/z . Excitací iontů vysokofrekvenčním polem dochází ke zvětšení poloměru jejich kruhového pohybu a přiblížení iontů k detekční elektrodě. Průchodem iontů kolem detekční elektrody je vždy indukován a registrován malý elektrický proud, který je zaznamenáván v závislosti na čase. Vzniklý proudový obraz iontů je pomocí Fourierovy transformace převeden na spektrum zaznamenávající frekvenci jednotlivých iontů, ze kterého je korekcí vytvořeno hmotnostní spektrum (Ekman et al., 2009).

Obr. 10: Schéma analyzátoru FTICR (upraveno podle <http://people.whitman.edu>).



Ačkoli byl hmotnostní analyzátor FTICR vynalezen již před čtyřiceti lety, teprve v posledních letech se tato technika začala používat v experimentech s parazitickými helminty, proto jsou v níže uvedené tabulce (Tab. 8) zařazeny recentní publikace. V roce 2010 využili Denery a kol. (Denery et al., 2010) techniky hmotnostní spektrometrie s analyzátozem FTICR k nalezení 14 potenciálních biomarkerů parazitické hlístice *Onchocerca volvulus* (Platyhelminthes, Nematoda).

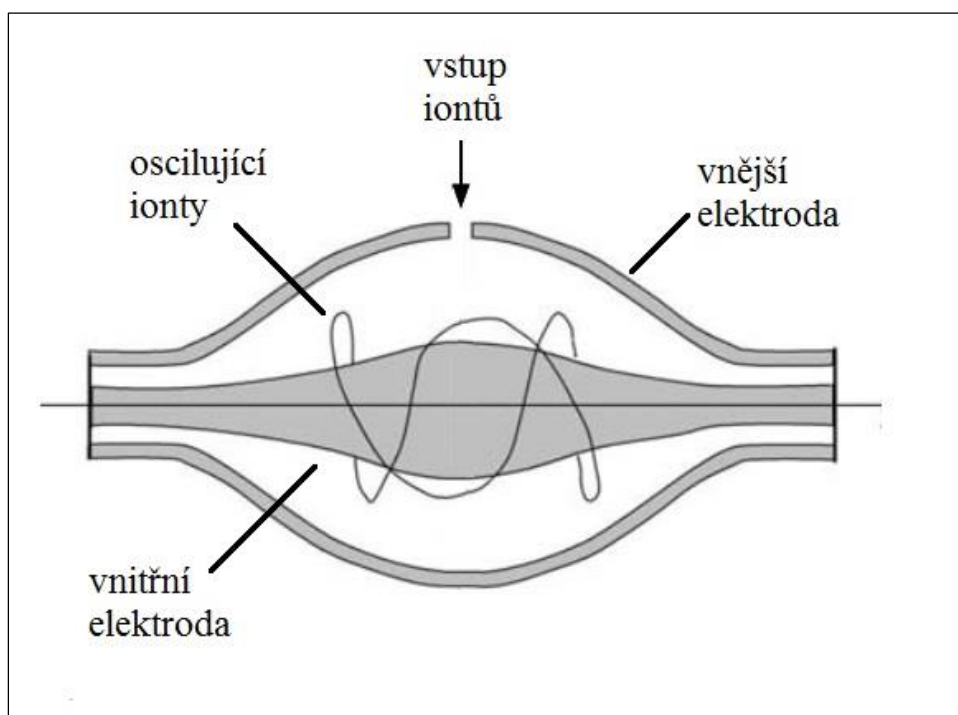
Analýzou obalů vajíček motolice *S. mansoni* identifikovali DeWalick a kol. v roce 2011 45 proteinů (DeWalick et al., 2011). Autoři oproti svým předpokladům zjistili, že většina identifikovaných proteinů nebyla pro vajíčka specifická, nacházely se také ve velkém množství v dospělých červech a miracidiích.

Tab. 8: Využití analyzátoru FTICR v parazitologii.

Typ vzorku	Parazit	Typ zk. molekul (počet)	Rok	Sestava	Přístroj	Citace
Krevní sérum, plazma	<i>O. volvulus</i>	Lipid (10)	2010	FT-ICR MS	Apex II 7,0 Tesla FT-ICR MS (Bruker Daltonics)	Denery et al., 2010
Vaječné obaly	<i>S. mansoni</i>	Protein (45)	2011	FT-ICR MS	7-tesla LTQ-FT MS (Thermo Electron)	DeWalick et al., 2011

f) *Orbitrap*: Je sestaven z vnější elektrody tvaru barelu a vnitřní centrální elektrody vřetenovitého tvaru, na obě elektrody je přivedeno stejnosměrné napětí (Obr. 11). Ionty jsou pulzně přivedeny do Orbitrapu, kde současně krouží kolem centrální elektrody a zároveň se pohybují podél její osy. Následně dochází k oddělení iontů o stejných hodnotách m/z a jejich společné oscilaci po prstencovitých trajektoriích. Oscilující ionty vytvářejí proudový signál, který je pomocí Fourierovy transformace převeden na hmotnostní spektrum (Dass, 2007). Hmotnostní spektrometrie využívající technologii Orbitrap je vhodná pro analýzu proteinů.

Obr. 11: Schéma Orbitrapu (upraveno podle Hoffmann a Stroobant, 2007).



Přestože je Orbitrap nejmladším hmotnostním analyzátozem, počet publikací vzniklých v posledních několika letech naznačuje jeho značný potenciál. Nejrecentnější publikace jsou uvedeny v tabulce (Tab. 9). Za pomoci Orbitrapu Zheng a kol. (Zheng et al., 2013) provedli systematickou proteomickou analýzu ESP motolice *Clonorchis sinensis* (Platyhelminthes, Trematoda). Autoři experimentu pracovali se vzorky sebraných z dospělých červů v průběhu šesti časových úseků a zjistili, že proteinový profil se mění. Bylo identifikováno 24 proteinů a velké množství proteinů s neznámou funkcí.

Hmotnostní spektrometrie s analyzátozem Orbitrap byla jednou z technik využitých při protetické analýze protoskolex tasemnice *E. granulosus* provedené autory Cui a kol. v roce 2013 (Cui et al., 2013). S využitím tohoto analyzátoru bylo identifikováno 1323 proteinů.

Zatím poslední publikace využívající Orbitrap k identifikaci proteinů je od autora Faeste a kol. (Faeste et al., 2014). Autor touto metodou identifikoval celkem 103 proteinů (z toho 94 nepopsaných) ze vzorku ESP hlístice *Anisakis simplex* (Platyhelminthes, Nematoda).

Tab. 9: Využití analyzátoru Orbitrap v parazitologii.

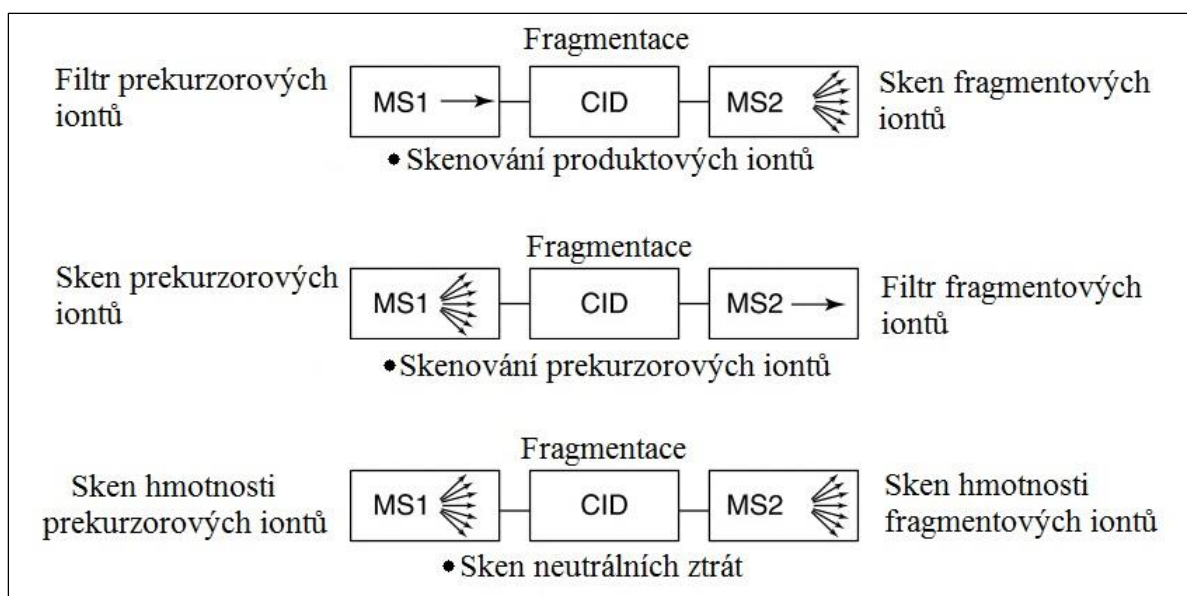
Typ vzorku	Parazit	Typ zk. molekul (počet)	Rok	Sestava	Přístroj	Citace
ESP	<i>C. sinensis</i>	Protein (24)	2013	LC-MS/MS	LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Electron)	Zheng et al., 2013
Homogenizovaný protoskolex	<i>E. granulosus</i>	Protein (1323)	2013	LC-MS/MS	LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher)	Cui et al., 2013
ESP	<i>A. simplex</i>	Protein (103)	2014	LC-MS/MS	LTQ- Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific)	Faeste et al., 2014

3.2.4. Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS) je metoda založená na generování a detekci fragmentů molekul spojením několika základních fází hmotnostní analýzy uvedených v předchozích částech této práce. Tandemovou hmotnostní analýzu lze provádět v prostoru nebo v čase. Analýza v prostoru využívá spojení dvou (TOF/TOF, Quadrupol/TOF) a více (trojitý kvadrupól, TOF/TOF/TOF) hmotnostních analyzátorů seřazených za sebou. Analýza v čase probíhá v témže prostoru za postupných změn parametrů (Iontová past, FTICR). Typickým zástupcem tandemové spektrometrie v prostoru je trojitý kvadrupól (triple quadrupole, QqQ), který byl sestaven v roce 1978 (Yost a Enke, 1978). V této sestavě slouží první a třetí kvadrupól jako hmotnostní analyzátor a druhý kvadrupól jako kolizní cela. V kolizní cele dochází technikou kolizně indukované disociace (Collision Induced

Dissociation, CID) ke srážkám iontů s molekulami inertního plynu (například argonu) za vzniku fragmentů iontů (druhé generace). Analýzu trojitým kvadrupólem lze provést pomocí několika operačních módů (Obr. 12).

Obr. 12: Základní operační módy trojitého kvadrupólu (upraveno podle Hoffmann a Stroobant, 2007).

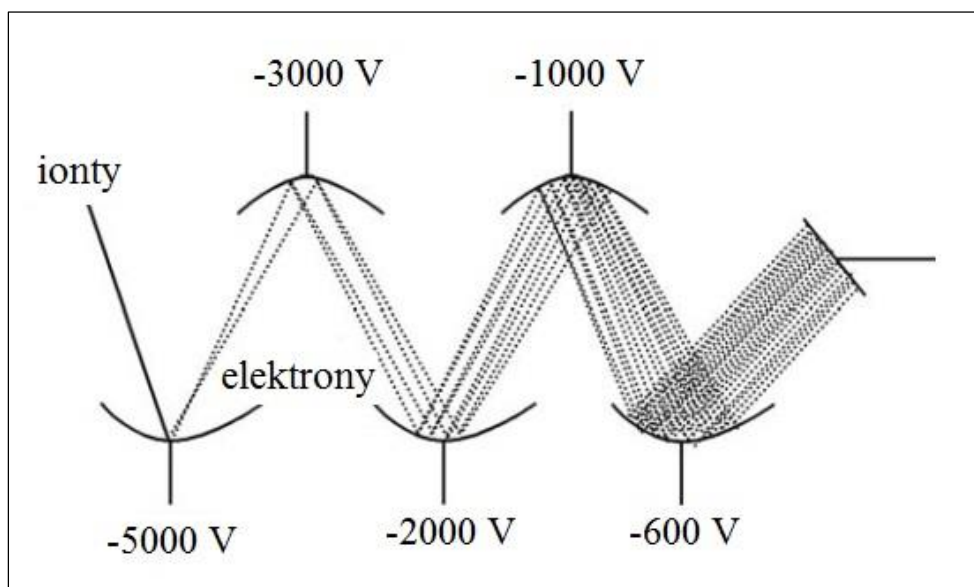


3.2.5. Detektor iontů

Ionty po průchodu hmotnostním analyzátozem putují k detektoru, jehož prostřednictvím je možné zaznamenat ionty po jejich rozdělení dle poměru m/z a určit také jejich relativní četnost. Detektory lze podle možností záznamu iontů rozdělit do dvou kategorií. První skupinu tvoří tzv. elektronové násobiče, které využívají postupného násobení elektronů vytvořeného po dopadu iontu na detektor, čímž vytvářejí silnější měřitelný signál pro jednotlivé ionty (např. elektronový násobič, fotonásobič). Druhou skupinu tvoří detektory umožňující přímá měření, které detekují elektrický proud vznikající přímým dopadem iontů (například Faradayova klec) (Dass, 2007). Detektory tvoří nedílnou součást každého hmotnostního spektrometru. Jedinou výjimku tvoří hmotnostní spektrometry s analyzátozem Orbitrap a FTICR, ve kterých již není klasických detektorů třeba, neboť tyto analyzátozem zároveň separují i detekují ionty.

a) *Elektronový násobič*: Elektronový násobič je nejčastěji používaným typem detektoru. Převádí kinetickou energii dopadajících iontů z povrchu detektoru a produkuje odpovídající násobky sekundárních elektronů. Je tvořen sérií 12 až 24 elektrod (dynod), přičemž po nárazu do každé z nich dochází k emisi sekundárních elektronů, čímž je zesilován elektrický proud, který je následně měřen (Obr. 13). Elektrony jsou urychlovány snižujícím se napětím na dynodách (Hoffmann a Stroobant, 2007).

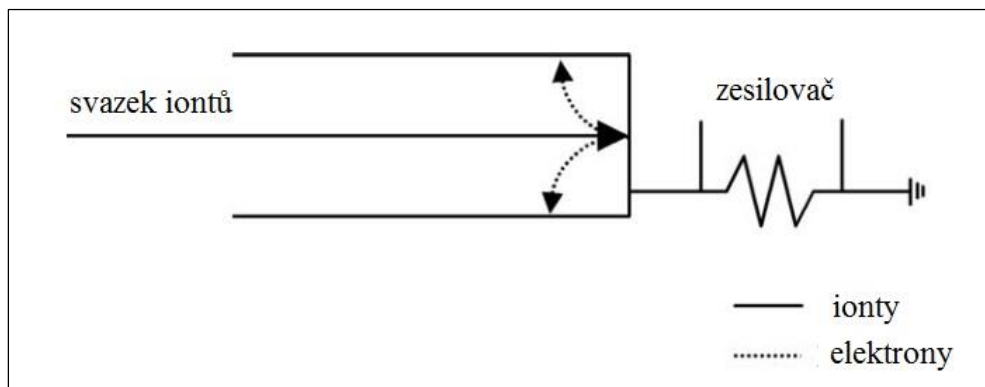
Obr. 13: Schéma elektronového násobiče (upraveno podle Hoffmann a Stroobant, 2007).



b) *Fotonásobič*: Pracuje na podobném principu jako elektronový násobič. Ionty dopadají na konverzní dynodu a způsobují uvolňování elektronů. Takto vyprodukované elektrony dopadají na fosforovou destičku a uvolňují fotony, které jsou zesíleny pomocí fotonásobiče (Gross, 2004). Výhodou fotonásobiče je jeho uložení ve vakuu, které zabraňuje případné kontaminaci a zároveň se tím zvyšuje i jeho životnost.

c) *Faradayova klec*: Dopadající ionty vytvářejí slabý elektrický proud, který je zesilován a zaznamenáván (Obr. 14). Umožňuje přesné určení počtu iontů a využívá se pro přesná izotopická měření.

Obr. 14: Schéma Faradayovy klece (upraveno podle Hoffmann a Stroobant, 2007).



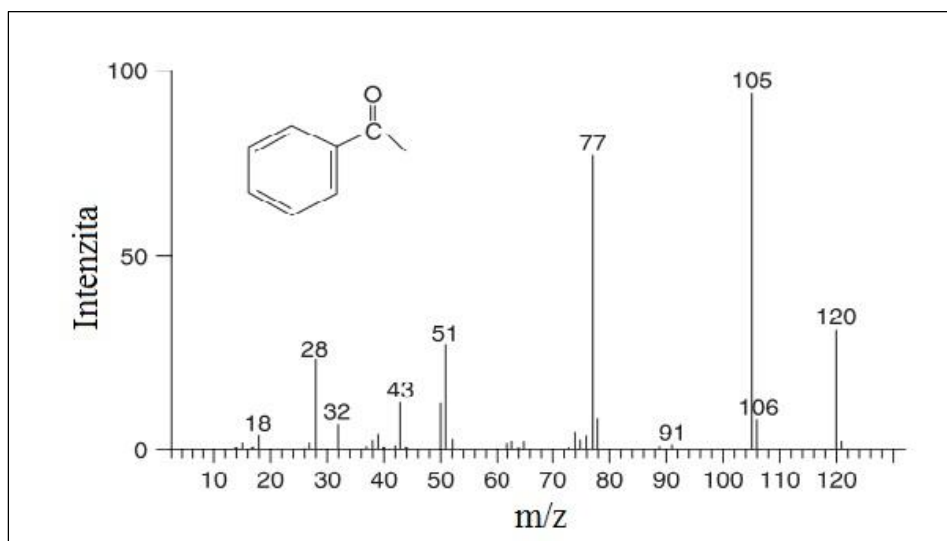
3.2.6. Hmotnostní spektrum

Výsledkem měření hmotnostním spektrometrem je hmotnostní spektrum (Obr. 15). Jedná se o grafické znázornění četnosti jednotlivých iontů v závislosti na poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Jednotlivé ionty jsou v grafu znázorněny pomocí křivek s vrcholy, jejichž poloha na ose x určuje hodnotu m/z . Intenzita (množství) iontů je v grafu zaznamenána na ose y . Intenzita nejvyššího naměřeného vrcholu je normalizována tak, aby odpovídala hodnotě 100 %. Z naměřeného hmotnostního spektra může být zjištěno několik druhů hmotností (Tab. 10).

Tab. 10: Druhy hmotností (Dass, 2007).

Název	Popis
Nominální hmotnost	součet celočíselných hmotností prvků (např. $1\text{H} = 1$ a $12\text{C} = 12$)
Monoizotopická hmotnost	součet přesných hmotností prvků nejvíce zastoupených izotopů (např. $1\text{H} = 1,007825$ a $12\text{C} = 12,000000$)
Průměrná hmotnost	součet hmotností vážených průměrů jednotlivých izotopů podle jejich zastoupení (např. $\text{H} = 1,00797$ a $\text{C} = 12,01115$)

Obr. 15: Hmotnostní spektrum acetofenonu (m/z 120) (upraveno podle, Dass, 2007).



3.2.7. Metody vyhodnocování výsledků

Data získaná v oblasti hmotnostní spektrometrie jsou nejčastěji vyhodnocována s využitím proteinových databází, které je možné prohledávat s využitím různých algoritmů a softwarových nástrojů za účelem identifikace konkrétního proteinu. Tímto způsobem je možné identifikovat obrovské počty proteinů (Quadroni a James, 1999). Úspěch identifikace proteinu záleží na kvalitě dat (kvalitě spekter), použité databázi (Tab. 11) a nástroji, kterým je databáze prohledávána (Tab. 12).

Tab. 11: Přehled vybraných databází.

Název databáze	Typ databáze	Internetový odkaz
NCBI (National Center for Biotechnology Information)	nukleotidová	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
CBFGL (Computational Biology and Functional Genomics Laboratory)	nukleotidová	http://compbio.dfci.harvard.edu/
EMBL (European Molecular Biology Laboratory)	nukleotidová	http://www.embl.de/
BRENDA (Braunschweig Enzyme Database)	proteinová	http://www.brenda-enzymes.org
MEROPS	proteinová	http://merops.sanger.ac.uk
UniProt	proteinová	http://www.uniprot.org/
NIST (National Institute of Standards and Technology)	organické sloučeniny	http://nist.gov/

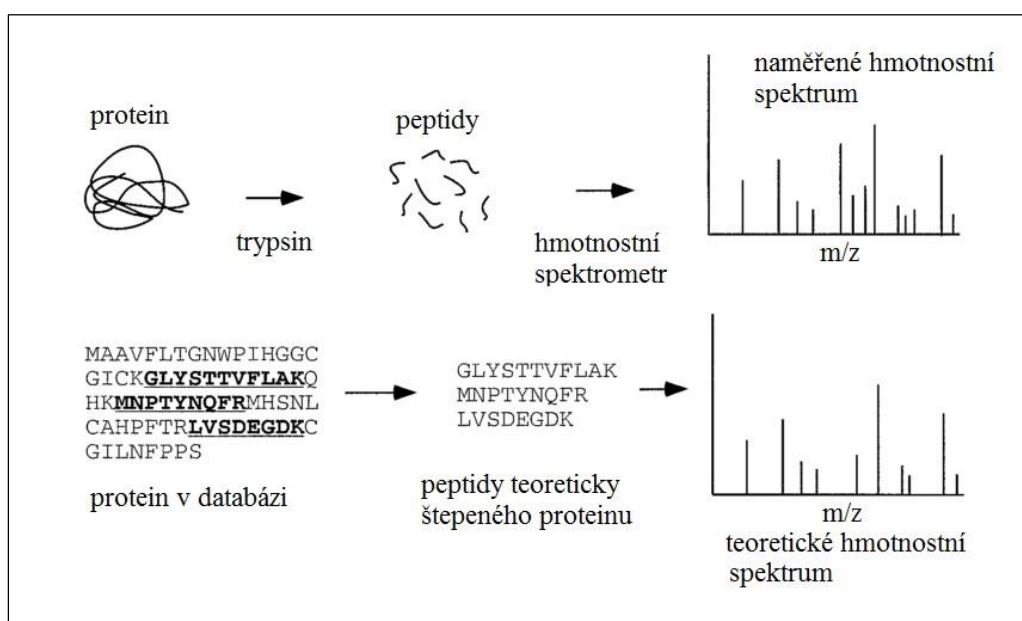
Tab. 12: Vybrané nástroje k prohledávání databází.

Název	Výrobce	Původ dat	Internetový odkaz
MASCOT	Matrix Science	PMF, MS/MS	http://www.matrixscience.com/search_form_select.html
ProFound	Rockefeller University, New York	PMF	http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe
Protein Prospector	University of California, San Francisco	PMF, MS/MS	http://prospector.ucsf.edu

Vysvětlivky: PMF – Peptide Mass Fingerprint, peptidové mapování
MS/MS – Tandem Mass spectrometry, tandemová hmotnostní spektrometrie

a) *Peptidové mapování (Peptide Mass fingerprint, PMF)*: Peptidové mapování je metoda identifikace proteinu, na základě znalosti aminokyselinového složení peptidových štěpů vzniklých prostřednictvím degradace pomocí enzymu (např. trypsinu) (Jensen et al., 1997). Analyzovaný proteinový vzorek je nejprve štěpen specifickou proteázou; obvykle trypsinem, který aminokyselinový řetězec štěpí vždy za argininem a lysinem. Vzniklé peptidy jsou následně analyzovány hmotnostním spektrometrem (obvykle MALDI-TOF). Příslušnost naměřených hmotnostních spekter peptidů je určována na základě prohledávání proteinových databází s využitím softwarových nástrojů (Tab. 12). V rámci procesu identifikace jsou proteiny v databázi *in silico* štěpeny totožnou proteázou jako měřené vzorky; teoretická spektra virtuálních peptidů jsou statisticky porovnána s naměřenými a stupeň homologie je matematicky vyjádřen (Obr. 16).

Obr. 16: Princip peptidového mapování (upraveno podle Graves a Haystead, 2002).

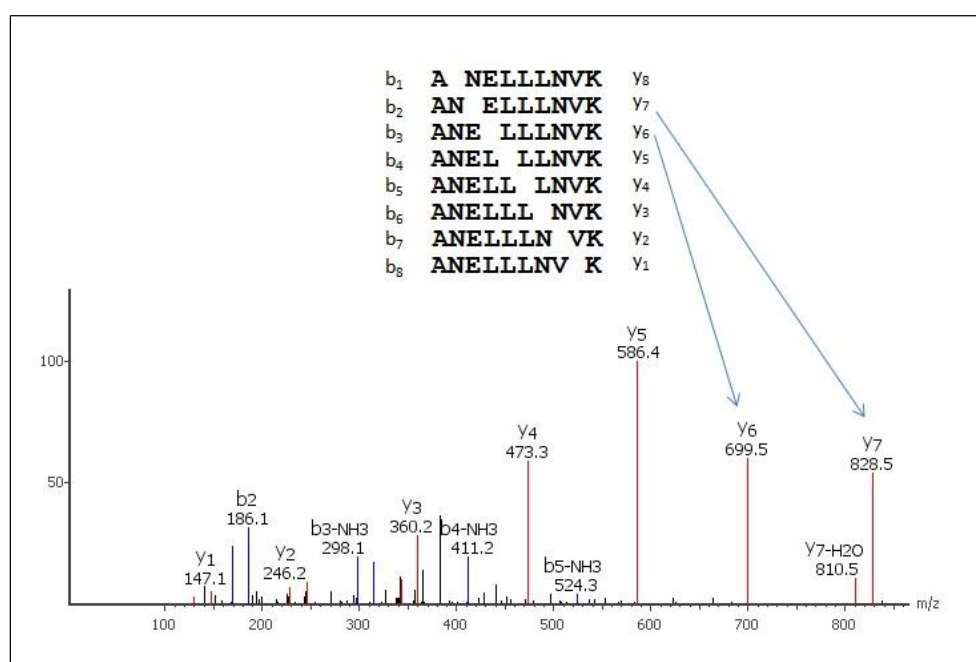


b) *Metoda fragmentového mapování (Peptide Fragment Fingerprint, PFF)*: Fragmentové mapování je metoda využívaná k identifikaci proteinů analyzovaných tandemovou hmotnostní spektrometrií. Princip fragmentového mapování je podobný jako u peptidového mapování, porovnávají se experimentální spektra peptidů s teoretickými spektry v databázi, avšak u této metody nepracujeme s jedním spektrem peptidu, ale s řadou fragmentových spekter (Yates et al., 1995).

c) *De novo peptidové sekvenování (De Novo Peptide Sequencing)*: Metoda spočívá v přímé interpretaci fragmentačního spektra a v použití získané informace o sekvenci aminokyselin k prohledávání databáze proteinů (Řehulka et al., 2007). Srovnáním hmotností dvou sousedních vrcholů na naměřeném hmotnostním spektru je získán rozdíl, který odpovídá hmotnosti konkrétní aminokyseliny (Obr. 17). Sekvence aminokyselin je identifikována porovnáním všech vrcholů ve spektru. Identifikace výchozího proteinu je realizována srovnáním zjištěné sekvence aminokyselin s daty v proteinové databázi (Hughes et al., 2010).

Výhodou metody je možnost identifikace neznámého peptidu, který dosud není uveden v databázi, s využitím sekvence podobného proteinu obsaženého v databázi (Řehulka et al., 2007). Nevýhodou metody je časté chybné přiřazení peptidu naměřenému spektru. Touto metodou lze vyhodnocovat data získaná tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Obr. 17: Získání sekvence aminokyselin metodou de novo sekvenování (www.bioinform.com).



d) *Identifikace s využitím tagů (Sequence Tag)*: Metoda interpretace s využitím tagů kombinuje peptidové mapování a metodu de novo sekvenování. Tato metoda využívá skutečnosti, že většina fragmentačních spekter obsahuje krátkou a snadno identifikovatelnou sekvenci fragmentových iontů, ze které lze snadno zjistit krátkou sekvenci primární struktury analyzovaného peptidu (Řehulka et al., 2007). Tato sekvence (tag) se identifikuje pomocí de novo metody. Následně se zjistí molekulové hmotnosti zbývajících fragmentových iontů před a za tagem. Tím vzniká konstrukce m1TAGm3, která se nazývá peptidový sekvenční úsek. Na základě informace o získaném peptidovém úseku a hmotnosti rodičovského iontu lze prohledávat proteinovou databázi. Pomocí této metody lze dojít k přesnějším výsledkům než pomocí metody peptidového mapování (Mann a Wilm, 1994).

3.3. Další metody identifikace proteinů

Edmanovo odbourávání: jedná se o metodu identifikace proteinu na základě stanovení posloupnosti aminokyselin vyvinutou v roce 1949 Petherem Edmanem (Edman, 1949). Princip metody spočívá v postupném odštěpování aminokyselin z N-konce proteinové molekuly pomocí fenylisothiokyanátu a jejich následné identifikaci pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (Hoffmann a Stroobant, 2007). Mezi hlavní nevýhody metody patří neschopnost odštěpování modifikovaných aminokyselin (např. glykosilovaných) a její časová náročnost (v řádu hodin až dní) oproti hmotnostní spektrometrii (v řádu minut až hodin). Edmanova degradace je metodou stanovující primární strukturu pomocí přímého sekvenování proteinu (Hmotnostní spektrometrie je oproti tomu metodou nepřímého sekvenování, neboť primární struktura proteinu je určena analýzou naměřených spekter). Identifikace proteinů Edmanovým odbouráváním byla nahrazena jinými metodami, jako je hmotnostní spektrometrie. Přesto tato metoda stále nachází své uplatnění a v roce 2009 byla Abdel-Hafeezem a kol. využita k identifikaci třech kandidátních vakcínových proteinů ze vzorku séra prasete nakaženého motolicí *Schistosoma japonicum* (Platyhelminthes, Trematoda) (Abdel-Hafeez et al., 2009).

4. Zobrazovací hmotnostní spektrometrie

Zobrazovací hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry Imaging, MSI) je technologie umožňující současně provést identifikaci a prostorovou lokalizaci látek (Shimma et al., 2008). Využití nachází především k zobrazení peptidů, proteinů, lipidů, metabolitů a léčiv z tkáňového vzorku (Cornett et al., 2007). Technika MSI se používá k mapování molekul v závislosti na jejich množství a prostorovém uspořádání (Yao et al., 2008). K ionizaci vzorku se nejčastěji využívá některá z těchto desorpčně ionizačních metod: laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI), hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS) nebo desorpční elektrosprejová ionizace (Desorption Electrospray Ionization, DESI) (Kimura et al., 2009). Z naměřených hmotnostních spekter lze generovat obrazy o vybrané hodnotě m/z a tím získat informaci o prostorové distribuci látek ve vzorku. Na rozdíl od klasické hmotnostní spektrometrie nevyžaduje metoda MSI homogenizaci vzorku před analýzou, díky čemuž zůstává zachována informace o distribuci jednotlivých molekul ve vzorku.

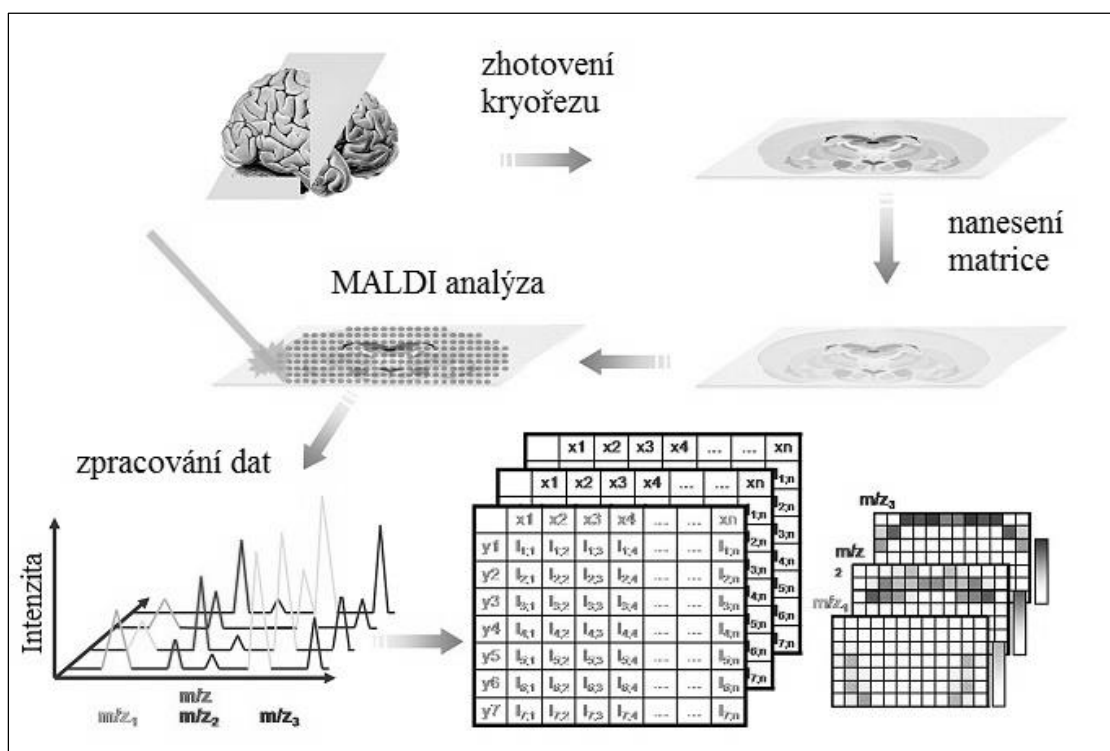
4.1. MALDI MSI

Zobrazovací hmotnostní spektrometrie spojená s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging) byla představena Capriolim a kol. v roce 1997 (Caprioli et al., 1997). Autor pomocí této metody identifikoval insulin obsažený v řezu slinivkou břišní krysy, hormonální peptid v krysí hypofýze a malé proteiny navázané na povrchu lidských endoteliálních buněk. Nejčastěji se MALDI MSI využívá v kombinaci s TOF analyzátozem, který umožňuje analyzování makromolekul, jako jsou polysacharidy, peptidy a proteiny (Chaurand et al., 2005). MALDI MSI nachází uplatnění především v histologii například při identifikaci markerů (molekul) spojených s nádorovým bujením (Balluff et al., 2011; Cazares et al., 2009), lékařské diagnostice a klinické proteomice (Franck et al., 2009). Oproti jiným metodám identifikace a lokalizace molekul je MALDI MSI časově méně náročná a nevyžaduje složitou přípravu vzorku před analýzou, jako je například značení pomocí protilátek v imunochemickém barvení. V helmintologii byla tato metoda prozatím aplikována jen velmi ojediněle – prostorová distribuce lipidů u *S. mansoni* (Ferreira et al., 2014).

4.1.2. Princip metody

Metoda spočívá v postupném snímkování a zaznamenávání hmotnostních spekter z povrchu komplexního vzorku – tkáně. Příprava vzorku před analýzou zahrnuje pouze zamražení odebrané tkáně (biopsie) či zamražení a zpracování pomocí kryotomu (kryořezu). Vzorek je následně umístěn na MALDI destičku a celý jeho povrch je nejčastěji roboticky překryt rovnoměrnou vrstvou matrice pomocí zmlžovače, elektrospreje nebo piezopipetoru. Po zavedení do hmotnostního spektrometru je vzorek na MALDI destičce posouván dle předem definovaného vzorce do jednotlivých pozic odpovídajícím například různým orgánovým soustavám. Z těchto oblastí je prostřednictvím pulsu laseru a postupů popsanych v kapitolách výše obdrženo a zaznamenáno hmotnostní spektrum (Mascini a Heeren, 2012). Rozložení naměřených dat (identifikované molekuly) je pomocí příslušného softwaru zobrazeno na optickém snímku tkáně (Stoeckli et al., 1999). Vytvořený obraz pak informuje o distribuci konkrétní molekuly (Obr. 18).

Obr. 18: Postup MALDI MSI metody (upraveno podle Franck et al., 2009).



4.1.2. Možnosti a omezení využití MALDI MSI

Metoda MALDI MSI se v současné době využívá především k analýze malých molekul, jako jsou například metabolity léčiv (Cornett et al., 2008), lipidy (Toghi Eshghi et al., 2014) nebo neuropeptidy (DeKeyser et al., 2007). Přestože výše uvedené typy molekul jsou pomocí metody MALDI MSI zkoumány téměř rutinně, analýza větších biomolekul jako jsou proteiny je stále komplikovaná. K desorpci a ionizaci velkých molekul je zapotřebí dodat vzorku velké množství energie. Toho je dosaženo změnou fokusace paprsku laseru, jeho rozšířením. Velké množství dodané energie však způsobuje uvolnění nejen iontů našeho zájmu, ale i „balastních molekul“ (směs molekul tvořících danou tkáň). Analýza nepurifikovaných neseparovaných komplexních vzorků, jakým je například kompletní tkáň, sebou přináší vznik velkého množství „balastních“ spekter, které komplikují vyhodnocení. Často pouze několik ze stovek signálů příslušejícím analyzovaným molekulám prostřednictvím MSI lze snadno interpretovat. Možnosti a omezení využití metody MALDI MSI jsou shrnuty níže (Tab. 13).

Tab. 13: Možnosti a omezení využití MALDI MSI (T. Siegel).

Výhody	Nevýhody
<ul style="list-style-type: none">- rychlá a snadná příprava vzorku (biopsie, kryořez)- rychlost měření- detekce velkého počtu molekul během jedné analýzy- přímá identifikace a lokalizace molekul ve vzorku- stanovení distribuce a relativního množství molekul ve vzorku- možnost analýzy komplexní proteinové směsi	<ul style="list-style-type: none">- správná volba matrice a jejího nanesení- limitované prostorové rozlišení- složité zpracování a vyhodnocení naměřených dat- interference nízkomolekulárních molekul s maticí- vznik „balastních“ spekter při analýze biomolekul

4.1.3. Využití v experimentální biologii

Identifikace a lokalizace molekul ve tkáni umožňuje například lepší odhad funkce dané molekuly a tím odhad jejího zapojení do biochemických pochodů daného organismu, což ve výsledku může napomoci například vývoji nových léků či stanovení metod léčby. Většina studií s využitím techniky MALDI MSI byla doposud zaměřená především na studium proteinů v lidských a zvířecích tkáňových řezech (Cornett et al., 2007), na zjišťování léčiv a jejich metabolitů v dané tkáni (Drexler et al., 2007), na zkoumání patologie tkáně (Shimma et al., 2007), za účelem klinické diagnózy a stanovení následné léčby (Seeley a Caprioli, 2011).

Průlomem z pohledu parazitologie je publikace autorů Ferreira a kol. (Ferreira et al., 2014) z roku 2014, kteří jako první využili metodu MALDI MSI k analýze molekul parazitických helmintů. Autoři srovnávali molekuly lipidů motolice *S. mansoni* dvou různých populací. Zjistili, že spektrum molekul parazita je závislé na pohlaví a konkrétní populaci. Na základě výsledků této analýzy identifikovali prostorovou distribuci šestnácti lipidů, které by mohly sloužit jako markery vhodné k vývoji léčiv proti schistosomóze. Tato publikace prezentuje jeden ze způsobů využití metody MALDI MSI v parazitologii. Díky možnosti rychle a účinně identifikovat a lokalizovat konkrétní molekulu, by tato metoda mohla v budoucnosti posloužit lepšímu porozumění zapojení konkrétní molekuly do interakce parazit-hostitel.

4.1.4. Srovnání s jinými přístupy pro identifikaci a lokalizaci molekul

Hmotnostní zobrazovací spektrometrie má ve srovnání s jinými zobrazovacími technikami využívanými ke sledování distribuce proteinu v tkáňovém řezu, jako jsou například imunohistochemie (IHC), magnetická rezonance (MR) nebo pozitronová emisní tomografie (PET), několik výhod. K analýze není nutné specifické značení například pomocí protilátek, fluorescenčních barviv, sond nebo radioaktivního značení a lze proto vzorek studovat v nezměněném stavu (Mascini a Heeren, 2012). Současně nedochází ke vzniku artefaktů způsobených extrakcí, očišťování a značením vzorku před analýzou. Díky absenci relativně složité přípravy vzorku před analýzou je MALDI MSI oproti ostatním metodám časově méně náročná. Techniku MSI lze také využít k ověření a podpoře dat získaných jinými histologickými technikami jako je Western blot nebo imunohistochemie (Chaurand et al., 2008). Analýza vzorku metodou MSI, který byl předtím zkoumán pomocí některé z histologických metod je rovněž možný, je však nutné nejprve odstranit zalévací médium, například parafin (Lemaire et al., 2007).

5. Postup identifikace a lokalizace vybraného proteinu na příkladu

Fascioloides magna

Techniku MALDI MSI lze využít k přímé detekci a sledování distribuce léčiv a jejich metabolitů v tkáni parazita, identifikaci potenciálních biomarkerů parazitózy nebo molekul důležitých v interakci parazit-hostitel. Zobrazovací hmotnostní spektrometrie MALDI MSI je

však kvůli nesnadné desorpci a ionizaci biomolekul obtížně aplikovatelná pro analýzu proteinů, a proto jsou testovány různé další přístupy.

V souvislosti se vznikem této práce byl testován alternativní postup lokalizace proteinových molekul v tkáni modelového parazita – *Fascioloides magna* (Platyhelminthes, Trematoda). K identifikaci a lokalizaci vybraného proteinu bylo využito spojení technik laserové mikrodisekce (technika umožňující izolaci tkáňových struktur z řezu - Olympus mmi® SmartCut®) a hmotnostní spektrometrie (UltiMate® 3000 RSLCnano LC a Orbitrap-Elite MS systém). Postup identifikace a lokalizace vybrané proteinové molekuly je shrnut v následujících bodech:

- 1) příprava kryorezu (kryotom Leica 3050)
- 2) izolace vzorku pomocí laserové mikrodisekce
- 3) štěpení trypsinem
- 4) separace molekul vzorku pomocí kapalinové chromatografie
- 5) analýza vzorku pomocí technik hmotnostní spektrometrie
- 6) identifikace proteinu

Příprava vzorku pro laserovou mikrodisekce zahrnovala zmražení živého parazita v tekutém dusíku, jeho následné zamontování do OCT média (Optimal Cutting Temperature) a nařezání pomocí kryotomu (kryorezy o velikosti přibližně 10µm). Takto vytvořený vzorek je přenesen na mikrodisekční membránu v rámečku (frame slide with membrane) a pomocí laserové mikrodisekce (Olympus mmi® SmartCut®) je disekována požadovaná část tkáně parazita - střevo. Disekovaný vzorek byl štěpen trypsinem a poté separován pomocí kapalinové chromatografie (UltiMate® 3000 RSLCnano LC). Identifikace proteinu je realizována pomocí hmotnostní spektrometrie (Orbitrap-Elite MS systém).

Tímto postupem byla ve vzorku střeva *F. magna* potvrzena přítomnost proteolytického enzymu katepsinu L1 (UniProtKB: B5AXI5).

6. Závěr

V práci byly popsány základní techniky hmotnostní spektrometrie a principy jejich fungování. Byla prostudována odborná literatura pojednávající o využití hmotnostní spektrometrie k charakterizaci molekul parazitických helmintů. Prostřednictvím literární rešerše bylo zjištěno, že k identifikaci molekul parazitických helmintů se nejčastěji využívá

tandemová hmotnostní spektrometrie s hybridním uspořádáním analyzátorů (kvadrupól-TOF a TOF-TOF).

Ve druhé části práce byla prezentována metoda zobrazovací hmotnostní spektrometrie – MALDI MSI a její využití v experimentální biologii. Kromě publikace autora Ferreira z roku 2014 nebyla metoda MALDI MSI uplatněna k identifikaci molekul parazitických helmintů. Z odborné literatury vyplývá, že tato metoda není vhodná k identifikaci proteinů.

V poslední části práce byl navržen alternativní postup identifikace a prostorové lokalizace proteinu v komplexní tkáni, který byl testován na vzorcích motolice *F. magna*. Postup počítá s využitím kombinace laserové mikrodisekce a hmotnostní spektrometrie.

Publikované texty vzniklé v průběhu studia:

Publikace v impaktovaných časopisech:

Kašný M., Beran L., Siegelová V., Siegel T., Leontovyč R., Beránková K., Pankrác J., Košťáková M., Horák P., 2012. “Geographical distribution of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) in the Czech Republic and potential risk of its further spread.” *Veterinarni Medicina* 57, 101–109.

Publikace v neimpaktovaných časopisech:

Siegelová V., Pankrác J., Košťáková M., Melounová K., Siegel T., Leontovyč R., Kašný M. 2012. “Nález motolice obrovské u skotu a odhad možných rizik fascioloidózy v České republice.” *Veterinářství* 7, 438–441

Kašný M., Siegelová V., Siegel T., Beránková K. 2010. “Aktuální rozšíření motolice velké (*Fascioloides magna*) v České republice.” *Myslivost* 10, 58.

Seznam použité literatury

sekundární citace jsou označeny *

Abdel-Hafeez E.H., Kikuchi M., Watanabe K., Ito T., Yu C., Chen H., Nara T., Arakawa T., Aoki Y., Hirayama K. 2009. “Proteome approach for identification of schistosomiasis japonica vaccine candidate antigen.” *Parasitology International* 58, 36-44.

Aziz A., Zhang W., Li J., Loukas A., McManus D.P., Mulvenna J. 2011. “Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans.” *Journal of Proteomics* 74, 1560-1572.

- Baldwin M.A., McLafferty F.W.** 1973. "Liquid chromatography-mass spectrometry interface-I: The direct introduction of liquid solutions into a chemical ionization mass spectrometer", *Organic Mass Spectrometry* 7, 1111–1112.
- Balluff B., Rauser S., Meding S., Elsner M., Schöne C., Feuchtinger A., Schuhmacher C., Novotný A., Juttig U., Maccarrone G., Sarioglu H., Ueffing M., Braselmann H., Zitzelsberger H., Schmidt R.M., Hofler H., Ebert M.P., Walch A.** 2011. "MALDI imaging identifies prognostic seven-protein signature of novel tissue markers in intestinal-type gastric cancer." *The American Journal of Pathology* 179, 2720–2729.
- Banerjee S., Mazumdar S.** 2012. "Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte." *International Journal of Analytical Chemistry* 2012, 40.*
- Bernal D., De la Rubia J.E., Carrasco-Abad A.M., Toledo R., Mas-Coma S., Marcilla A.** 2004. "Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*." *FEBS Letters* 563, 203–206.
- Boukli N.M., Delgado B., Ricaurte M., Espino A.M.** 2011. "*Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*: identification of common proteins by comparative proteomic analysis." *The Journal of Parasitology* 97 (5), 852–861.
- Caprioli R.M., Farmer T.B., Gile J.** 1997. "Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS." *Analytical Chemistry* 69 (23): 4751–4760.
- Castro-Borges W., Dowle A., Curwen R.S., Thomas-Oates J., Wilson R.A.** 2011. "Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5, e993.
- Cazares L.H., Troyer D., Mendrinós S., Lance R.A., Nyalwidhe J.N., Beydoun H.A., Clements M.A., Drake R.R., Semmes O.J.** 2009. "Imaging mass spectrometry of a specific fragment of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 2 discriminates cancer from uninvolved prostate tissue." *Clinical Cancer Research* 15, 5541–5551.
- Cole R.B. (ed.)** 2010. "Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities and Biological Applications." druhé vydání. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 896.*
- Comisarow M.B., Marshall A.G.** 1974. "Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy." *Chemical Physics Letters* 25, 282–283.
- Cornett D.S., Frappier S.L., Caprioli R.M.** 2008. "MALDI-FTICR Imaging Mass Spectrometry of drugs and metabolites in tissue." *Analytical Chemistry* 80, 5648–5653.
- Cornett D.S., Reyzer M.L., Chaurand P., Caprioli R.M.** 2007. "MALDI Imaging Mass Spectrometry: Molecular snapshots of biochemical systems" *Nature methods* 4, 828–833.*

- Cui S.J., Xu L.L., Zhang T., Xu M., Yao J., Fang C.Y., Feng Z., Yang P.Y., Hu W., Liu F.** 2013. “Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host-parasite interactions.” *Journal of Proteomics* 84, 158–175.
- Dass Ch.** 2007. “Fundamentals of contemporary mass spectrometry.” John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 608.*
- DeKeyser S.S., Kutz-Naber K.K., Schmidt J.J., Barrett-Wilt G.A., Li L.** 2007. “Imaging Mass Spectrometry of neuropeptides in decapod crustacean neuronal tissues.” *Journal of Proteome Research* 6, 1782–1791.
- Denery J.R., Nunes A.A.K., Hixon M.S., Dickerson T.J., Janda K.D.** 2010. “Metabolomics-based discovery of diagnostic biomarkers for onchocerciasis.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, e834.
- DeWalick S., Bexkens M.L., van Balkom B.W.M., Wu Y.P., Smit C.H., Hokke C.H., de Groot P.G., Heck A.J.R., Tielens A.G.M., van Hellemond J.J.** 2011. “The proteome of the insoluble *Schistosoma mansoni* eggshell skeleton.” *International Journal for Parasitology* 41, 523–532.
- Drexler D.M., Garrett T.J., Cantone J.L., Diters R.W., Mitroka J.G., Conaway M.C.P., Adams S.P., Yost R.A., Sanders M.** 2007. “Utility of imaging mass spectrometry (IMS) by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) on an ion trap mass spectrometer in the analysis of drugs and metabolites in biological tissues.” *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 55, 279–288.
- Edman P.** 1949. “A method for the determination of amino acid sequence in peptides.” *Archives of Biochemistry* 22, 475–483.
- Ekman R., Silberring J., Westman-Brinkmalm A., Kraj A. (eds.)** 2009. “Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications.” John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 388.*
- Fæste C.K., Jonscher K.R., Dooper M.M.W.B., Egge-Jacobsen W., Moen A., Daschner A., Egaas E., Christians U.** 2014. “Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex*.” *EuPA Open Proteomics* 4, 140–155.
- Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M.** 1989. “Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.” *Science* 246, 64–71.
- Ferreira M.S., de Oliveira D.N., de Oliveira R.N., Allegretti S.M., Vercesi A.E., Catharino R.R.** 2014. “Mass spectrometry imaging: a new vision in differentiating *Schistosoma mansoni* strains.” *Journal of Mass Spectrometry* 49, 86–92.
- Franck J., Arafah K., Elayed M., Bonnel D., Vergara D., Jacquet A., Vinatier D., Wisztorski M., Day R., Fournier I., Salzert M.** 2009. “MALDI Imaging Mass Spectrometry: State of the art technology in clinical proteomics.” *Molecular & Cellular Proteomics* 8, 2023–2033.*

- Friedecký D., Lemr K.** 2012. “Úvod do hmotnostní spektrometrie.” *Klinická biochemie a metabolismus* 20, 152–157.*
- Gohlke R.S.** 1959. “Time-of-Flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography” *Analytical Chemistry* 31, 535–541.
- González-Miguel J., Morchón R., Gussoni S., Bossetti E., Hormaeche M., Kramer L.H., Simón F.** 2014. “Immunoproteomic approach for identification of *Ascaris suum* proteins recognized by pigs with porcine ascariasis.” *Veterinary Parasitology* 203, 343–348.
- Graves P.R., Haystead T.A.J.** 2002. “Molecular biologist’s guide to proteomics.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 39–63.*
- Gross J.H.** 2004. “Mass spectrometry: A Textbook.” Springer, Berlin, Heidelberg, 518.*
- Haçarız O., Baykal A.T., Akgün M., Kavak P., Sağıroğlu M.Ş., Sayers G.P.** 2014. “Generating a detailed protein profile of *Fasciola hepatica* during the chronic stage of infection in cattle.” *Proteomics* 14, 1519–1530.
- Hariri M.** 1974. “Quantitative measurements of endogenous levels of acetylcholine and choline in tetrahyridia of *Mesocestoides corti* (Cestoda) by means of combined gas chromatograph-mass spectrometry.” *The Journal of Parasitology* 60, 227–230.
- Hoffmann E., Stroobant V.** 2007. “Mass Spectrometry: Principles and Applications.” třetí vydání. John Wiley & Sons, Chichester, 489.*
- Holčapek M.** 1998. “Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS).” *Chemické Listy* 92, 278–286.*
- Holmes J.C., Morrel F.A.** 1957. “Oscillographic mass spectrometric monitoring of gas chromatography.” *Applied Spectroscopy* 11, 86–87.
- Hughes C., Ma B., Lajoie G.A.** 2010. “De Novo sequencing methods in proteomics.” *Methods in Molecular Biology* 604, 105–121.*
- Hunt D.F., Yates J.R. 3rd, Shabanowitz J., Winston S., Hauer C.R.** 1986. “Protein sequencing with tandem mass spectrometry.” *Methods in Molecular Biology* 83, 6233–6237.
- Chamekh M., Gras-Masse H., Bossus M., Facon B., Dissous C., Tartar A., Capron A.** 1992. “Diagnostic value of a synthetic peptide derived from *Echinococcus granulosus* recombinant protein.” *The Journal of Clinical Investigation* 89, 458–464.
- Chaurand P., Rahman M.A., Hunt T., Mobley J.A., Gu G., Latham J.C., Caprioli R.M., Kasper S.** 2008. “Monitoring mouse prostate development by profiling and imaging mass spectrometry.” *Molecular and Cellular Proteomics* 7, 411–423.
- Chaurand P., Schwartz S.A., Reyzer M.L., Caprioli R.M.** 2005. “Imaging mass spectrometry: principles and potentials.” *Toxicologic Pathology* 33, 92–101.*

- Chemale G., Morphey R., Moxon J.V., Morassuti A.L., Lacourse E.J., Barrett J., Johnston D.A., Brophy P.M.** 2006. "Proteomic analysis of glutathione transferases from the liver fluke parasite, *Fasciola hepatica*." *Proteomics* 6, 6263–6273.
- Jefferies R., Morgan E.R., Shaw S., Heesom K.** 2011. "Identification of immuno-reactive adult *Angiostrongylus vasorum* proteins using mass spectrometry." *Molecular and Biochemical Parasitology* 180, 56–61.
- Jensen O.N., Podtelejnikov A.V., Mann M.** 1997. "Identification of the components of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching." *Analytical Chemistry* 69, 4741–4750.
- Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F.** 1985. "Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules." *Analytical Chemistry* 57, 2935-2939.
- Karas M., Hillenkamp F.** 1988. "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons." *Analytical chemistry* 60, 2299–2301.
- Kimura Y., Tsutsumi K., Sugiura Y., Setou M.** 2009. "Medical molecular morphology with imaging mass spectrometry." *Medical Molecular Morphology* 42, 133–137.*
- Lemaire R., Desmons A., Tabet J.C., Day R., Salzet M., Fournier I.** 2007. "Direct Analysis and MALDI Imaging of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Sections." *Journal of Proteome Research* 6 (4): 1295–1305.
- Makarov A.,** 2000. "Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis." *Analytical Chemistry* 72, 1156–1162.
- Mann M., Wilm M.** 1994. "Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags." *Analytical Chemistry* 66, 4390–4399.
- Mann M., Kelleher N.L.** 2008. "Precision Proteomics: The case for high resolution and high mass accuracy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 18132–18138.*
- Mascini N.E., Heeren R.M.A.** 2012. "Protein identification in mass-spectrometry imaging." *Trends in Analytical Chemistry* 40, 28–37.*
- Morphey R.M., Wright H.A., LaCourse E.J., Porter J., Barrett J., Woods D.J., Brophy P.M.** 2011. "Towards delineating functions within the *Fasciola* secreted cathepsin L protease family by integrating in vivo based sub-proteomics and phylogenetics." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5, e937.
- Morphey R.M., MacKintosh N., Hart E.H., Prescott M., LaCourse E.J., Brophy P.M.** 2014. "In vitro biomarker discovery in the parasitic flatworm *Fasciola hepatica* for monitoring chemotherapeutic treatment." *EuPA Open Proteomics* 3, 85–99.

- Morris H.R., Paxton T., Panico M., McDowell R., Dell A.** 1997. "A novel geometry mass spectrometer, the Q-TOF, for low-femtomole/attomole-range biopolymer sequencing." *Journal of Protein Chemistry* 16, 469–479.
- Moxon J.V., Flynn R.J., Golden O., Hamilton J.V., Mulcahy G., Brophy P.M.** 2010. "Immune responses directed at egg proteins during experimental infection with the liver fluke *Fasciola hepatica*." *Parasite Immunology* 32, 111–124.
- Munson M.S.B., Field F.H.** 1966. "Chemical ionization mass spectrometry." *Journal of the American Chemical Society* 88, 2621–2630.
- Paul W., Steinwedel H.** 1953. "Ein neues massenspektrometer ohne magnet feld." *Zeitschrift Naturforschung* 8a, 448.
- Quadroni M., James P.** 1999. "Proteomics and automation." *Electrophoresis* 20, 664–677.*
- Robinson M.W., Tort J.F., Lowther J., M Donnelly S., Wong E., Xu W., Stack C.M., Padula M., Herbert B., Dalton J.P.** 2008. "Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: expansion of a repertoire of virulence-associated factors." *Molecular & Cellular Proteomics* 7, 1111–1123.
- Řehulka P., Řehulková H., Chmelík J.** 2007. "Měření proteomických dat hmotnostní spektrometrií a jejich bioinformatická interpretace." *Chemické Listy* 101, 279–286.*
- Seeley E.H., Caprioli R.M.** 2011. "MALDI imaging mass spectrometry of human tissue: method challenges and clinical perspectives." *Trends in Biotechnology* 29, 136–143.*
- Shimma S., Sugiura Y., Hayasaka T., Hoshikawa Y., Noda T., Setou M.** 2007. "MALDI-based imaging mass spectrometry revealed abnormal distribution of phospholipids in colon cancer liver metastasis." *Journal of Chromatography B* 855, 98–103.
- Shimma S., Sugiura Y., Hayasaka T., Zaima N., Matsumoto M., Setou M.** 2008. "Mass imaging and identification of biomolecules with MALDI-QIT-TOF-based system." *Analytical Chemistry* 80, 878–85.
- Stephens W.E., Serin B., Meyerhof W.E.** 1946. "A method for measuring effective contact e.m.f. between a metal and a semi-conductor." *Physical Review* 69, 42–43.
- Stoeckli M., Farmer T.B., Caprioli R.M.** 1999. "Automated mass spectrometry imaging with a Time-of-Flight instrument." *Journal of American Society for Mass Spectrometry* 10, 67–71.
- Thomson, J.J.** 1913. "Rays of positive electricity and their application to chemical analyses." in **Thomson J.J., Horton F. (eds.)** "Monographs on physics." Longmans, Green and Co., Londýn, New York, Bombaj, Kalkata.
- Toghi Eshghi S., Yang S., Wang X., Shah P., Li X., Zhang H.** 2014. "Imaging of N-linked glycans from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using MALDI mass spectrometry." *ACS Chemical Biology*, in press.

- Valaskovic G.A., Kelleher N.L., McLafferty F.W.** 1996. "Attomole protein characterization by capillary electrophoresis-mass spectrometry." *Science* 273, 1199–1202.
- Van Balkom B.W.M., Gestel R.A., Brouwers J.F.H.M., Krijgsveld J., Tielens A.G.M., Heck A.J.R., Hellemond J.J.** 2005. "Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome", *Journal of Proteome research* 4, 958–966.
- Wittmann Ch.** 2007. "Fluxome analysis using GC-MS." *Microbial Cell Factories* 6, 6.*
- Yao I., Sugiura Y., Matsumoto M., Setou M.** 2008. "In situ proteomics with imaging mass spectrometry and principal component analysis in the Scrapper-knockout mouse brain." *Proteomics* 8, 3692–3701.
- Yates J.R. 3rd, Eng J.K., McCormack A.L.** 1995. "Mining genomes: correlating tandem mass spectra of modified and unmodified peptides to sequences in nucleotide databases." *Analytical Chemistry* 67, 3202-3210.
- Yost R.A., Enke C.G.** 1978. "Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer." *Journal of the American Chemical Society* 100, 2274–2275.
- Zheng M., Hu K., Liu W., Li H., Chen J., Yu X.** 2013. "Proteomic analysis of different period excretory secretory products from *Clonorchis sinensis* adult worms: molecular characterization, immunolocalization, and serological reactivity of two excretory secretory antigens-methionine aminopeptidase 2 and acid phosphatase." *Parasitology Research* 112, 1287–1297.

Internetové zdroje

Obr. 10: Schéma analyzátoru FTICR nalezeno online:

http://people.whitman.edu/~dunnivfm/C_MS_Ebook/CH5/5_5_6.html

Obr. 19: Získání sekvence aminokyselin metodou de novo sekvenování nalezeno online:

<http://www.bioinfor.com/images/stories/denovo%20screenshot.png>