

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Doktorský studijní program:
Biochemie a patobiochemie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Vývoj a implementace nových přístupů umožňujících proteomickou
charakterizaci kostních tkání ve stomatochirurgii

Development and implementation of new approaches enabling proteomic
characterization of bone tissues in oral surgery

MDDr. Iva Michalus

Autoreferát

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. Dr. Ing. Radovan Hynek

Praha, 2023

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor:	Biochemie a patobiochemie
Předseda oborové rady:	prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.
Školící pracoviště:	Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko – technologická v Praze
Školitel:	prof. Dr. Ing. Radovan Hynek

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
1 Úvod	6
2 Cíle disertační práce	8
3 Hypotézy	9
4 Materiál a metodika	9
5 Výsledky a komentáře	10
5.1 Ověření specifického štěpení proteinů přímo kostní tkání	10
5.2 Charakterizace odoperovaných lidských maxilárních a mandibulárních kostních tkání ve stomatochirurgii pomocí techniky přímého štěpení (“in-bone” digestion) následovaného tandemovou hmotnostní spektrometrií s předřazenou kapalinovou chromatografií	12
5.3 Rychlé rozlišení a charakterizace indukovaných patologických stavů v modelech lidských kostních tkání metodou založenou na přímém specifickém enzymovém štěpení (in-sample digestion) s aplikací ve stomatochirurgii	13
5.4 Přímé štěpení vzorků kostních tkání (in-bone digestion) s koncovkou kapilární elektroforézy s UV detektorem	14
6 Diskuse	16
6.1 Vývoj techniky s využitím modelových vzorků prasečích čelistních kostních tkání	16
6.2 Využití techniky přímého štěpení v kostních tkáních (in-bone digestion) pro charakterizaci vzorků lidských maxilárních a mandibulárních kostí	17
6.3 Charakterizace indukovaných patologických stavů v in-vitro modelech lidských kostních tkání	18
6.4 Přímé štěpení vzorků kostních tkání (in-bone digestion) s koncovkou kapilární elektroforézy s UV detektorem	19
7 Závěry	20
8 Použitá literatura	22
9 Publikace, které jsou podkladem disertační práce	25
9.1 Publikace, které jsou podkladem disertační práce	25
9.2 Publikace bez vztahu k tématu disertační práce	25

Abstrakt

Proteomika je bouřlivě se rozvíjející obor, který nachází uplatnění v mnoha oblastech medicíny, včetně stomatologie. Přesto proteomická charakterizace kostních tkání ve stomatochirurgii není stále běžně využívána. Hlavní příčinou je značná komplikovanost používaných analytických přístupů, která vyplývá z nerozpustného charakteru kostních tkání. Cílem této práce bylo vyvinout a aplikovat přímočarou metodiku, která by mohla vést k rutinnímu využití proteomiky i v této oblasti.

Nejprve byla, s využitím prasečích čelistních kostí, jako modelových vzorků, vyvinuta technika umožňující identifikovat až stovky proteinů díky jejich štěpení trypsinem přímo v kostních tkáních („in-bone digestion“) následovaného analýzou pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS). Tato technika byla následně aplikována na analýzu odoperovaných tkání lidských maxilárních a mandibulárních kostních tkání. Jak ve vzorcích maxilárních, tak mandibulárních kostí, bylo možné technikou přímého štěpení identifikovat značné množství proteinů. Navíc matematická analýza získaných dat umožnila též rozlišit mezi tkáněmi postiženými zánětem a zdravými tkáněmi. Přístup založený na přímém štěpení byl následně úspěšně rozšířen též na analýzu *in vitro* modelů lidských kostních tkání. Přímé štěpení následované analýzou uvolněných peptidových fragmentů pomocí LC-MS/MS a následná matematická analýza získaných dat umožnila nejen rozlišit vzorky modelů s indukovanými patologickými stavy od kontrolních, ale bylo možné i vzájemné rozlišení dvou různých patologických stavů. V rámci řešení disertační práce byla také otestována možnost využít po technice založené na přímém štěpení v kostních tkáních („in-bone digestion“) i jinou koncovku než LC-MS/MS, konkrétně kapilární elektroforézu s detekcí v ultrafialové oblasti (CE-UV). Po vyhodnocení získaných CE-UV profilů matematickou analýzou bylo možné odlišit vzorky kostní tkáně postižené zánětem od tkáně zdravé.

Využití výše zmíněných netradičních a velmi přímočarých metodických přístupů umožňuje vnést do oblasti stomatochirurgie rutinní vzhled na molekulární úrovni. Tak by například mělo být možné sledovat, jaké jsou proteomické reflexe určitých patologických stavů, což by mělo napomoci porozumět mechanismu jejich vzniku i volbě vhodné léčby. Proteomické analýzy odoperovaných čelistních kostí by rovněž mohly sloužit jako vhodný doplněk, případně i alternativa, k jejich tradičnímu histologickému hodnocení.

Abstract

Proteomics is a booming field with application in many areas of medicine, including dentistry. Nevertheless, proteomic characterization of bone tissues in oral surgery is not still commonly used. The main reason is involvement of demanding analytical approaches due to insoluble character of bone tissues. The goal of this work was to develop and apply straightforward methodology that could lead to the routine use of proteomics in this area as well.

Using porcine jawbones as a model samples, a technique was developed allowing identifying about hundreds of proteins thanks to their trypsin digestion directly in bone tissues ("in-bone digestion") followed by analysis using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). This technique was subsequently applied to the analysis of human maxillary and mandibular bone tissues obtained during surgical procedures. In both maxillary and mandibular bone samples, it was possible to identify a considerable amount of proteins using the "in-bone digestion" technique. Additionally, the mathematical analysis of the obtained data was able to distinguish between the inflammatory and healthy tissues. The approach based on direct cleavage was subsequently successfully extended to the analysis of *in vitro* models of human bone tissues. Direct cleavage followed by analysis of the released peptide fragments using LC-MS/MS and subsequent mathematical analysis of the obtained data was able not only to distinguish the samples of models with induced pathological conditions from the control ones, but also allowed distinguishing between two different pathological conditions. The possibility of using a technique of "in-bone digestion" followed by different analysis than LC-MS/MS was verified. Namely capillary electrophoresis with ultraviolet detection (CE-UV) was tested. After evaluating of the obtained CE-UV profiles by mathematical analysis, it was possible to distinguish between inflammatory and healthy bone tissue samples.

The use of the above-mentioned non-traditional and very straightforward methodological approaches makes it possible to introduce routine insight at the molecular level into the field of oral surgery. For example, it should be possible to monitor the proteomic reflections of certain pathological conditions, which should help to understand the mechanism of their occurrence and the choice of appropriate treatment. Proteomic analyzes of jaw bones after surgical procedures could also serve as a suitable supplement, or even an alternative, to their traditional histological evaluation.

1 Úvod

Tak jako v jiných oblastech medicíny, nacházejí proteomické analýzy uplatnění též ve stomatologii. Současné možnosti jejich rutinního využití však závisí na charakteru analyzovaných vzorků. Relativně nejméně technicky komplikované jsou analýzy kapalných vzorků. Není proto překvapivé, že již nalezneme řadu příkladů analýz ústních tekutin. Při zákrocích ve stomatochirurgii jsou ovšem často odoperovány kostní tkáně, které by bylo užitečné rutinně charakterizovat na molekulární úrovni.

Proteomická analýza kostních tkání je analyticky mnohem náročnější než charakterizace tekutých vzorků. Hlavní příčinou je skutečnost, že proteiny, které je třeba analyzovat, jsou obsaženy v nerozpustné matrici. Část z nich může být extrahována do roztoku a následně již poměrně snadno analyzována běžnými postupy používanými v současné proteomice, jako je specifické štěpení trypsinem následované analýzou peptidových fragmentů pomocí LC-MS/MS (Salmon et al., 2013). V uvedené studii byly proteiny extrahovány jak z alveolárních kostí, tak ze vzorků zubního cementu. Tímto způsobem bylo identifikováno ve vzorcích alveolárních kostí a vzorcích zubního cementu celkem 318 proteinů, z toho 105 proteinů bylo přítomno výlučně v alveolárních kostech a 83 výlučně ve vzorcích zubního cementu (Salmon et al., 2013). Jedná se sice o relativně jednoduchý postup, nicméně jeho nevýhodou je skutečnost, že významná část proteinů zůstane pevně „uvězněna“ ve struktuře nerozpustné matrice. Proto tyto proteiny nemohou být extrahovány do roztoku, a tudíž zůstanou bez možnosti poskytnout proteomická data.

Řešením může být již delší dobu známá demineralizace tvrdých zubních tkání využitelná také pro dentoalveolární tkáně (Hubbard & Kon, 2002; Salmon et al., 2017; Termine et al., 1980a, 1980b). Nevýhodou tohoto přístupu je časová náročnost a skutečnost, že obsahuje příliš mnoho kroků. Dalším problémem je špatná rozpustnost mnoha matricových proteinů obsažených v tvrdých tkáních, což při využití výše uvedených přístupů představuje další překážku (Termine et al., 1980a, 1980b). Již zmíněná relativně nedávno publikovaná studie dentoalveolárních tkání u myši vedla k úspěšné identifikaci řady proteinů, včetně těch, které jsou charakteristické pro extracelulární matrix, jak v zubním cementu, tak i dentinu a alveolárních kostech. S využitím specifického štěpení trypsinem a analýze uvolněných specifických peptidových fragmentů pomocí LC-MS/MS bylo identifikováno 193 proteinů v zubním cementu, 135 v dentinu a 147 v alveolárních kostech. Použitý postup ovšem zahrnoval demineralizaci vzorků uvedených

tkání v roztoku obsahujícím EDTA, která trvala 20 dní (Salmon et al., 2017). Celý proces je tak extrémně zdoluhavý, a tudíž nevhodný pro rychlou a efektivní proteomickou charakterizaci odoperovaných tkání. Nedávno byla publikována proteomická studie, která vedla mimo jiné též k identifikaci proteinů v lidských alveolárních kostech s využitím specifického štěpení trypsinem následovaného LC-MS/MS (Fretwurst et al., 2022). I v této studii však štěpení trypsinem předcházelo komplikované a časově náročné zpracování tvrdých tkání. Publikace uvádí, že 40 mg tkáně, což je poměrně značné množství, bylo nejprve rozemleto na prášek, ten byl následně podroben zdoluhavému extrakčnímu procesu, kde teprve čtvrtý den bylo možné s proteiny dále pracovat. Využití EDTA může naznačovat, že proces kromě extrakce využívá též dekalifikaci tkáně, která by mohla napomoci uvolnění proteinů (Fretwurst et al., 2022). Ani tento postup se pro svou náročnost, jak časovou, tak na množství analyzované tkáně, příliš nehodí pro rutinní proteomickou charakterizaci kostních vzorků.

Lze konstatovat, že kvůli značné komplikovanosti i časové náročnosti se výše zmíněné postupy nejeví vhodné pro implementaci do běžné stomatochirurgické praxe. Proto hlavním cílem předkládané disertační práce bylo navržení a ověření podstatně přímočařejší techniky, která by s využitím minimálního množství kroků vedla k rychlé proteomické charakterizaci tkání lidských maxilárních i mandibulárních kostních tkání odoperovaných při stomatochirurgických zákrocích (viz cíle práce).

2 Cíle disertační práce

1. S využitím modelových vzorků (prasečí kostní tkáň) vyvinout rychlou a přímočarou metodu založenou na proteomické analýze, která by umožňovala co nejjednodušším způsobem charakterizovat významné množství proteinů v tkáních čelistních kostí. V ideálním případě s využitím specifického enzymového štěpení proteinů v přímo v kostních tkáních. Nejpoužívanější analytickou koncovkou by měla být LC-MS/MS (tandemová hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií).

2. Ověřit potenciál metody pro rutinní proteomické analýzy lidských maxilárních a mandibulárních kostních tkání odoperovaných při stomatochirurgických zákrocích.

3. Adaptovat techniku i na alternativní a běžněji dostupnou analytickou koncovku, jakou představuje například CE-UV (kapilární elektroforéza s detekcí v UV oblasti).

4. Otestovat využitelnost metody též pro rozlišení *in-vitro* modelových kostních kultur s indukovanými různými patologickými stavy.

3 Hypotézy

1. Relativně malé molekuly trypsinu by z roztoku, ve kterém je ponořen vzorek kosti, měly pronikat porézní kostní tkání až k jednotlivým proteinům, které budou specificky štěpit. Odštěpené specifické peptidové fragmenty by pak měly difundovat do roztoku. Po jejich přečištění by mělo být možné charakterizovat proteiny obsažené v kostní tkáni vhodnou analytickou technikou, jakou je například LC-MS/MS, aniž by bylo předem nutné proteiny z kostních tkání izolovat.

2. Matematická analýza hmotnostně spektrometrických dat by mohla napomoci například k rozlišení patologických a nepatologických stavů kostních tkání.

3. Výše uvedené přímé štěpení proteinů v kostních tkáních (in-bone digestion) by mohlo být zakončeno i jinou, dostupnější analytickou koncovkou, jakou je například CE-UV, která separuje jednotlivé peptidové fragmenty na základě jejich nábojových vlastností v roztoku. Porovnáním profilů získaných elektroferogramů pomocí matematické analýzy by pak mohlo umožnit rozlišit patologickou kostní tkáň od tkáně zdravé.

4. Pokud je možné použít postup využívající přímého štěpení ve vzorcích s koncovkou LC-MS/MS ke studiu proteinů obsažených v kostních tkáních, měl by být využitelný i pro *in vitro* vzorky modelů kostních kultur s různými indukovanými patologickými stavy, protože jsou podobně jako kostní tkáň porézního charakteru.

4 Materiál a metodika

Použité metody jsou podrobně popsány v jednotlivých publikacích (viz přílohy 1-4 předložené disertační práce). Tím, že se jedná o interdisciplinární práci, je spektrum použitých metod velmi široké. V podstatě lze říci, že sahá od chirurgických zákroků, přes specifické enzymové štěpení, následované tandemovou hmotnostní spektrometrií s předřazenou kapalinovou chromatografií, nebo též kapilární elektroforézou s UV detekcí, až po vyhodnocování dat matematickou

analýzou. Jako koncovka následující specifické enzymové štěpení byla též využita kapilární elektroforéza s UV detekcí. Z důvodu pestré škály použitých metod je níže specifikován podíl autorky.

Autorka předložené disertační práce prováděla chirurgické zákroky, které vedly k získání všech analyzovaných vzorků lidských maxilárních a mandibulárních kostních tkání. Dále prováděla zpracování všech vzorků (podrobněji viz příložené publikace), následované specifickým enzymovým štěpením, přečištěním získaných směsí peptidových fragmentů pomocí ZipTip s následným odpařením roztoku. Dále byly vzorky předány školiteli, který je předal k analýze pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií Ing. Jiřímu Šantrůčkovi, Ph.D. Vzorky analyzované s využitím koncovky kapilární elektroforézy byly předány školiteli, který je předal RNDr. Václavu Kašičkovi, CSc. Hmotnostně spektrometrická profilová spektra, i data získaná využitím kapilární elektroforézy, byla hodnocena pomocí matematických analýz, které prováděl RNDr. Mgr. Pavel Cejnar, Ph.D. Autorka disertace následně získané výsledky vyhodnocovala, interpretovala a navrhovala další postupy. Měla zásadní podíl na přípravě publikačních výstupů, včetně napsání draftů manuskriptů. Autorský podíl na jednotlivých publikacích, které jsou podkladem disertace je blíže specifikován na počátku kapitol 5.1–5.4. předložené disertační práce.

5 Výsledky a komentáře

Řešení mé disertační práce vedlo ke vzniku čtyř publikací v impaktovaných časopisech, které prošly recenzním řízením. Na dvou publikacích jsem první autorkou (příloha 1 a 3) a na dalších dvou je mé prvoautorství sdílené. Mé role jsou uvedeny v předchozí kapitole. V této části, jsou uvedeny pouze vybrané nejpodstatnější výsledky ze čtyř publikací, které jsou uvedeny na začátku každé podkapitoly a jsou dostupné v přílohách k disertační práci 1-4.

5.1 Ověření specifického štěpení proteinů přímo kostní tkáni

Michalusova I., Trubacova D., Cejnar P., Kuckova S., Santrucek J., Hynek R.: Direct tryptic cleavage in bone tissue followed by LC-MS/MS as a first step towards routine characterization of proteins embedded in alveolar bones. *International Journal of Mass Spectrometry* 455, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2020.116375>. IF₂₀₂₀ 1,98

Můj autorský podíl

Po konzultaci se svým školitelem jsem navrhla experimentální postupy a provedla preparaci modelových vzorků z prasečích čelistních kostí. Na získané modelové vzorky jsem aplikovala popsané metodické postupy (viz Příloha 1) zahrnující mimo jiné preinkubační krok, specifické enzymové štěpení trypsinem, přečištění získaných peptidových fragmentů pomocí ZipTip a odpaření rozpouštědla. Následně jsem vzorky předala svému školiteli, který je předal k analýze pomocí LC-MS/MS (prováděl Ing. Jiří Šantrůček, Ph.D.). Hmotnostně spektrometrická data byla analyzována pomocí programu MaxQuant a matematické analýzy (prováděl RNDr. Mgr. Pavel Cejnar, Ph.D.). Takto získané výstupy jsem zpracovala, interpretovala a na jejich základě sepsala původní verzi manuskriptu.

Nejprve bylo nutné ověřit, zda by rychlá a jednoduchá technika založená na specifickém štěpení proteinů trypsinem přímo ve vzorku („in-sample digestion“) mohla být využitelná též pro vzorky kostních tkání v tom smyslu, že by při minimálním počtu kroků vedla k identifikaci významného počtu proteinů, z nichž nezanedbatelné množství souvisí s funkcí kostních tkání. Jako model byly zvoleny prasečí čelistní kosti, protože mají podobné vlastnosti jako lidské, a navíc se mohou používat jako náhradní kostní materiál při řízené kostní regeneraci ve stomatochirurgii a v maxilofaciální chirurgii (Calvo Guirado et al., 2013; Iezzi et al., 2017; Pagliani et al., 2012). Protože studie byla zaměřená na proteiny pevně vázané v kostní tkáni, byla snaha v preinkubačním kroku alespoň redukovat množství jiných (například krevních proteinů). K preinkubaci byla použita s deionizovaná voda, 8 M močovina a propan-2-ol.

Po aplikaci přímého specifického štěpení trypsinem na vzorky čelistních kostí, podrobené výše zmíněným preinkubačním krokům, bylo následně pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií identifikováno nejvíce proteinů ve vzorcích po preinkubaci propan-2-olem. Při využití tohoto rozpouštědla bylo identifikováno 487 proteinů ve vzorcích horních čelistních kostí a 443 proteinů ve vzorcích dolních čelistních kostí.

5.2 Charakterizace odoperovaných lidských maxilárních a mandibulárních kostních tkání ve stomatochirurgii pomocí techniky přímého štěpení (“in-bone” digestion) následovaného tandemovou hmotnostní spektrometrií s předřazenou kapalinovou chromatografií

Hynek R.*, Michalus I.*, Cejnar P., Santrucek J., Seidlova S., Kuckova S., Sazelova P., Kasicka V.: In-bone protein digestion followed by LC-MS/MS peptide analysis as a new way towards the routine proteomic characterization of human maxillary and mandibular bone tissue in oral surgery. *Electrophoresis* 42, 2552-2562, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.202100211>. IF₂₀₂₁ 3,59 *Sdílené prvoautorství.

Můj autorský podíl

Prováděla jsem všechny operační zákroky, které vedly k získání vzorků kostních tkání použitých v této práci. Vzorky jsem následně zpracovala a aplikovala na ně popsané metodické postupy (viz Příloha 2) zahrnující mimo jiné specifické enzymové štěpení trypsinem, přečištění získaných peptidových fragmentů pomocí ZipTip a odpaření rozpouštědla. Následně jsem vzorky předala svému školiteli, který je předal k analýze pomocí LC-MS/MS (prováděl Ing. Jiří Šantrůček, Ph.D.). Hmotnostně spektrometrická data byla analyzována pomocí programu MaxQuant a matematické analýzy (prováděl RNDr. Mgr. Pavel Cejnar, Ph.D.). Získané výstupy jsem zpracovala, interpretovala a na jejich základě jsem ve spolupráci se svým školitelem sepsala původní verzi manuskriptu.

Metoda založená na přímém specifickém štěpení proteinů trypsinem v kostních tkáních („in-bone digestion“) byla využita pro analýzu vzorků odoperovaných lidských maxilárních a mandibulárních kostí. Protože byla snaha mít k dispozici metodu s nejmenším počtu kroků, byla testována také varianta bez preinkubačního kroku. Výsledky byly porovnávány s experimenty, při kterých byl, na základě předchozích zkušeností s hledáním vhodných podmínek na vzorcích prasečích čelistních kostí, použit pro preinkubační krok propan-2-ol. Získané výsledky jsou shrnuty v Tabulce 1 předložené disertační práce.

Celkově se podařilo identifikovat 1120 proteinů v odoperovaných vzorcích lidských maxilárních a 1151 proteinů lidských mandibulárních kostí. Použití propan-2-olu v preinkubačním kroku vedlo ke zvýšení počtu identifikovaných proteinů jak v případě vzorků

maxilárních, tak mandibulárních kostí. Řada identifikovaných proteinů je v kostních tkáních významná z biologického a klinického hlediska. Jejich role jsou diskutovány v disertační práci. Rozlišení mezi vzorky zdravých a zánětlivých kostí dosáhl 73 %, když nebyl použit preinkubační krok. Při zařazení preinkubačního kroku s propan-2-olem se přesnost vzájemného rozlišení obou skupin (zdravé tkáně x zánětlivé tkáně) zvýšila na 100 %.

5.3 Rychlé rozlišení a charakterizace indukovaných patologických stavů v modelech lidských kostních tkání metodou založenou na přímém specifickém enzymovém štěpení (in-sample digestion) s aplikací ve stomatochirurgii

Michalus I., Van Nguyen T., Viktorová J., Cejnar P., Šantrůček J., Kučková, Š., Sázelová P., Kašička V., Hynek R.: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of peptides separated from the insoluble matrix by in-sample tryptic protein digestion for rapid discrimination of various induced pathological states of human bone models in oral surgery. *Journal of Separation Science*, 2022; 45:4388–4396. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.202200694>. IF₂₀₂₂ 3,1

Můj autorský podíl

Prováděla jsem zpracování vzorků lidských *in vitro* kostních kultur s různými indukovanými patologickými stavy (tyto kostní kultury byly připraveny doc. Ing. Jitkou Viktorovou, Ph.D. a Ing. Tran Van Nguyenem, Ph.D.). Vzorky jsem následně zpracovala a aplikovala na ně popsané metodické postupy (viz Příloha 3) zahrnující mimo jiné specifické enzymové štěpení trypsinem, přečištění získaných peptidových fragmentů pomocí ZipTip a odpaření rozpouštědla. Následně jsem vzorky předala svému školiteli, který je předal k analýze pomocí LC-MS/MS (prováděl Ing. Jiří Šantrůček, Ph.D.). Hmotnostně spektrometrická data byla analyzována pomocí programu MaxQuant a matematické analýzy (prováděl RNDr. Mgr. Pavel Cejnar, Ph.D.). Získané výstupy jsem zpracovala, interpretovala a na jejich základě sepsala původní verzi manuskriptu.

Byl ověřen potenciál techniky využívající přímé enzymové štěpení (in-sample digestion) následované tandemovou hmotnostní spektrometrií s předřazenou kapalinovou chromatografií pro charakterizaci proteinů obsažených ve vzorcích *in vitro* lidských kostních tkání s indukovanými patologickými stavy.

Průměrné počty identifikovaných proteinů na vzorek v buněčných kulturách různých kostních modelů *in vitro* a také ve vzorcích z lidských maxilárních kostí z vestibulární lamely byly zhruba podobné, konkrétně 446 proteinů v kultuře kostních buněk s indukovanou rakovinou, 440 v kultuře s indukovaným zánětem, 451 proteinů v kultuře kontrolních buněk a 491 proteinů v lidských maxilárních kostech (z vestibulární lamely).

Aby se zjistilo, zda použitá technika přímého štěpení proteinů ve vzorku má potenciál rozlišovat mezi různými skupinami vzorků kultur kostních buněk *in vitro*, byla použita matematická analýza PLS-DA (partial least square – discriminant analysis). Bylo testováno rozlišení mezi kulturami kostních buněk s indukovanou rakovinou a kontrolní kulturou a rozlišení mezi kulturou kostních buněk s indukovaným zánětem a kontrolní kulturou. Přesnost rozlišení mezi rakovinou a kontrolou byla 94 % a přesnost mezi zánětem a kontrolou byla 83 %.

Navíc bylo též možné rozlišit mezi dvěma různými patologickými stavy, jmenovitě mezi rakovinou a zánětem s dosaženou přesností z 94 %. Rozlišení mezi všemi třemi kostními kulturami *in vitro* doshovalo přesnosti 77 %.

V *in vitro* modelech lidských kostních tkání byly též charakterizovány proteiny. Pomocí matematické analýzy (PLS-DA) byl jako nejvýznamnější protein pro rozlišení mezi modelem rakovinných kostních buněk a kontrolní kulturou určen Galectin-1. Hladina Galectinu-1 byla přibližně 16krát vyšší v *in vitro* modelových vzorcích kostních tkání s indukovanou rakovinou než v kontrolních vzorcích.

5.4 Přímé štěpení vzorků kostních tkání (in-bone digestion) s koncovkou kapilární elektroforézy s UV detektorem

Michalusova I.*, Sazelova P.*, Cejnar P., Kuckova S., Hynek R., Kasicka V.: Capillary electrophoretic profiling of in-bone tryptic digests of proteins as a potential tool for the detection of inflammatory states in oral surgery. *Journal of Separation Science* 43(20), 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.202000718>. IF₂₀₂₀ 3,64 **Sdílené prvoautorství*.

Můj autorský podíl

Po konzultaci se svým školitelem jsem navrhla alternativní koncovku (kapilární elektroforézu) pro separaci specifických peptidových fragmentů. Provedla jsem preparaci modelových vzorků z prasečích kostí. V této publikaci, byly využity též vzorky tkání lidských čelistních kostí, které byly získány při mnou provedených operačních zákrocích. Na všechny analyzované vzorky

jsem aplikovala popsané metodické postupy (viz Příloha 4) zahrnující mimo jiné, specifické enzymové štěpení. Následně jsem vzorky předala svému školiteli, který je předal k analýze pomocí kapilární elektroforézy na ÚOCHB AV ČR (prováděli RNDr. Václav Kašička, CSc. a RNDr. Petra Sázellová). Data získaná z elektroforézy byla zpracována pomocí matematické analýzy (prováděl RNDr. Mgr. Pavel Cejnar, Ph.D.). Takto získané výstupy jsem zpracovala, interpretovala a na jejich základě sepsala větší část původní verze manuskriptu (část týkající se speciálnějších záležitostí kapilární elektroforézy byla dodána od výše zmíněných spoluautorů z ÚOCHB AV ČR).

Protože kapilární elektroforéza (CZE) vybavená UV detektorem patří mezi dostupnější techniky než tandemová hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií, bylo ověřeno, zda by ji bylo možné využít jako koncovku po přímém specifickém štěpení proteinů ve vzorcích kostních tkání.

Nejprve byla otestována možnost rozlišit pomocí této techniky peptidové fragmenty vzniklé přímým specifickým štěpením trypsinem a chymotrypsinem. Byly získány elektroferogramy odlišnými profily. Následující matematická analýza dat PCA (Principal component analysis) byla schopná obě skupiny spolehlivě rozlišit. Dále bylo testováno specifické štěpení pouze trypsinem. Určité rozdíly elektroferogramů po specifickém štěpení lze nalézt mezi vzorky prasečích čelistních a lýtkových kostí. Obě skupiny vzorků bylo též možné rozlišit pomocí matematické analýzy získaných profilů.

Takto ověřená technika byla následně aplikována na vzorky lidských čelistních kostí. Jisté rozdíly v CE-UV profilech byly zjištěny mezi skupinami kostních tkání postiženým zánětem a mezi vzorky zdravých kostních tkání. Díky matematické analýze PCA získaných dat bylo možné vzorky zdravých tkání lidských čelistních spolehlivě rozlišit od tkání postižených zánětem.

6 Diskuse

6.1 Vývoj techniky s využitím modelových vzorků prasečích čelistních kostních tkání

Disertační práce byla zaměřena na rozvoj nových metodických přístupů, které by umožnily rutinní proteomickou charakterizaci kostních tkání odoperovaných při stomatochirurgických zákrocích. Nejprve jsem se soustředila na navržení a vývoj velmi jednoduché a rychlé techniky, která by umožnila identifikovat významný počet proteinů obsažených v tkáních čelistních kostí. Tradiční techniky využívající demineralizace jsou totiž časově velmi náročné, a tudíž nevhodné k rutinnímu využití. Proto byl zvolen přístup přímého specifického enzymového štěpení ve zkoumaném vzorku, který sice není obvyklý, ale byl již úspěšně použit pro analýzu proteinů zachycených v barevných vrstvách historických obrazů a později i proteinů obsažených v dalších nerozpustných materiálech, jakými jsou například historické malty nebo osifikované tkáně srdečních chlopní (Hynek et al., 2004; Křížková et al., 2014; Zeman et al., 2013).

Vycházeli jsme z předpokladu, že analogický postup by mohl být použitelný i pro analýzu vzorků tkání čelistních kostí. Kostní tkáně jsou totiž dosti porézní a vycházeli jsme z hypotézy, že relativně malé molekuly trypsinu jimi mohou pronikat až k proteinům, které jsou v nich zachycené a specificky je štěpit. Uvolněné specifické peptidové fragmenty by pak měly snadno difundovat do roztoku a po purifikaci by mohly být analyzovány například pomocí hmotnostní spektrometrie. Uvedenou hypotézu jsme se rozhodli nejprve ověřit s využitím modelových vzorků, které představovaly prasečí čelistní kosti. Byly použity vzorky jak z dolní, tak horní čelisti, protože jejich vlastnosti, jako je například minerální denzita, jsou rozdílné (Devlin et al., 1998). Bylo tedy třeba mimo jiné otestovat, zda navržený postup bude v obou případech poskytovat srovnatelné výsledky. Rozhodli jsme se zcela rezignovat na zdlouhavé snahy o izolaci intaktních proteinů z kostních tkání a postupovat zcela jinou cestou – tedy cestou přímého štěpení vzorků v kostních tkáních. Protože jsme se zaměřili na proteiny „uvězněné“ v kostních tkáních, rozpustné proteiny jsme považovali za kontaminaci. Proto byl do postupu zařazen preinkubační krok, který měl jejich množství výrazně redukovat.

Na základě experimentů s prasečími čelistními kostmi jsme dospěli k závěru, že netradiční přístup přímého štěpení proteinů v kostní tkáni představuje techniku využitelnou pro rychlou a efektivní charakterizaci proteinů ve stomatochirurgii.

6.2 Využití techniky přímého štěpení v kostních tkáních (in-bone digestion) pro charakterizaci vzorků lidských maxilárních a mandibulárních kostí

Technika využívající specifické štěpení trypsinem přímo v kostní tkáni (in-bone digestion) k identifikaci proteinů byla následně aplikována na vzorky lidských maxilárních i mandibulárních kostí (Michalusová et al., 2020). Celý postup začíná chirurgickým zákrokem, při němž jsou odoperovány kostní tkáně, které jsou následně podrobeny proteomické analýze. Velmi pozitivním zjištěním bylo, že se podařilo dosáhnout ještě vyššího množství identifikovaných proteinů než v případě modelových prasečích kostí (Michalusová et al., 2020). Dalším pozitivem byla identifikace přibližně stejného množství proteinů ve vzorcích maxilárních i mandibulárních kostních tkání, což by vzhledem k různému charakteru těchto kostních tkání, včetně jejich minerální denzity, nemuselo být zdaleka samozřejmé (Devlin et al., 1998).

Dále byla aplikována matematická analýza PLS-DA na data získaná pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s předřazenou kapalinovou chromatografií pro rozlišení vzorků zdravých čelistních tkání (získaných po chirurgických extrakcích) a rozlišení vzorků patologických tkání. Bez zařazení preinkubačního kroku dosahovalo rozlišení mezi vzorky zdravých a patologických tkání 73 %. Při zařazení preinkubačního kroku s propan-2-olem se přesnost se vzájemného rozlišení obou skupin (zdravé tkáně x zanětlivé tkáně) zvýšila na 100 %. Z výše uvedeného se tedy zdá odůvodněné zařazovat preinkubační krok s propan-2-olem, protože vede k úspěšnější charakterizaci vzorků, aniž by představoval významnější komplikaci metody.

Doposud publikované srovnatelné analýzy tvrdých tkání využívaly komplikované a zdlouhavé postupy (Fretwurst et al., 2022; Salmon et al., 2017). Jak vyplývá ze schématu pracovního postupu a vyhodnocení získaných dat, je možné velmi rychlou a přímočarou technikou charakterizovat na molekulární úrovni vzorky čelistních kostních tkání odoperovaných při stomatochirurgických zákrocích. Je to dáno zejména skutečností, že pracovní postup vyvinutý pro analýzy maxilárních a mandibulárních kostních tkání v rámci řešení této disertační práce nevyžaduje izolaci intaktních proteinů.

V analyzovaných vzorcích se navíc podařilo identifikovat celou řadu proteinů hrajících významné biologické a klinické role v kostních tkáních. Skupiny proteinů charakteristických pro kostní tkáně ve vzorcích maxilárních a mandibulárních kostí jsou velmi podobné. To není samozřejmé zjištění vzhledem k rozdílnému charakteru maxilárních a mandibulárních kostí, které se vyznačují například rozdílnou minerální denzitou (Devlin et al., 1998). Pro využitelnost

metody přímého štěpení (*in-bone digestion*) ve stomatochirurgii je to ovšem velmi významné a pozitivní zjištění.

Z výše uvedeného vyplývá, že technika přímého štěpení proteinů v kostní tkáni („*in-bone digestion*“) následovaná tandemovou hmotnostní spektrometrií s předřazenou kapalinovou chromatografií má potenciál nejen rozlišit mezi patologickou a zdravou tkání, ale může též přinést do stomatochirurgie vzhled na molekulární úrovni.

6.3 Charakterizace indukovaných patologických stavů v *in-vitro* modelech lidských kostních tkání

Některé patologické stavy, jako například kostní nádory nepatří ve stomatochirurgii mezi nejčastěji se vyskytující diagnózy, a tudíž pro jejich studium není k dispozici dostatek vzorků. Kostní modely *in-vitro* umožňují použití lidských buněk k získání relevantnějších výsledků preklinického výzkumu, protože tyto modely mohou simulovat interakce a mechanismy, které obvykle představují zjednodušenou situaci *in vivo* (Sieberath et al., 2020). Již byly vytvořeny různé modely založené na buňkách tvořících kost (osteoblasty) a buňkách resorbujících kost (osteoklasty), aby bylo možné simulovat proces remodelace kosti i související onemocnění (Borciani et al., 2020; Jeon et al., 2016; Lambertini et al., 2021; Mandatori et al., 2021). Protože *in-vitro* modely kostních tkání mají podobný charakter jako samotné kostní tkáně, v tom smyslu, že v nich obsažené proteiny jsou „uvězněny“ v porézní nerozpustné matici, předpokládali jsme, že by k jejich charakterizaci mohla být využita technika přímého specifického štěpení trypsinem, která byla vyvinuta na vzorcích prasečích kostí a po té úspěšně využita k charakterizaci vzorků lidských maxilárních i mandibulárních kostních tkání (Hynek et al., 2021; Michalusová et al., 2020).

V *in-vitro* modelových kostních kulturách s indukovanou rakovinou, zánětem i kontrolní kulturou se podařilo identifikovat řádově stovky proteinů, jejichž počty jsou shrnuty v tabulce 2 (viz kap. 5.3 předložené disertační práce), která pro srovnání uvádí i proteiny identifikované ve vzorcích lidských čelistních kostí. Jak vzorky s indukovanou rakovinou, tak vzorky s indukovaným zánětem, bylo možné pomocí matematické analýzy PLS-DA rozlišit od kontroly. Navíc bylo možné rozlišit oba indukované patologické stavy (rakovina a zánět) a dokonce všechny tři skupiny studovaných modelových kostních kultur (rakovina, zánět, kontrola).

Matematická analýza PLS-DA rovněž identifikovala jako nejdůležitější protein pro rozlišení mezi modelem rakovinných kostních buněk a kontrolním modelem kostních buněk Galektin-1. Hladina galektinu-1 byla v *in vitro* modelových vzorcích rakovinné kosti v průměru přibližně 16krát zvýšena ve srovnání s kontrolními vzorky *in vitro* modelové kultury. Zvýšení exprese galektinu-1 přispívá růstu nádoru, protože může modulovat buněčnou adhezi, migraci, přežití a signalizaci (Elola et al., 2007). Bylo publikováno, že hladina galektinu-1 se výrazně zvýšila u pacientů s duktálním adenokarcinomem pankreatu, karcinomem ovaria a karcinomem plic (Carlini et al., 2014; Chen et al., 2015; Martinez-Bosch et al., 2018). Galektin-1 hraje důležitou roli v progresi rakoviny s různými mechanismy, jako je schopnost podporovat růst nádoru prostřednictvím regulace hypoxií indukovatelného faktoru-1 α a vlivem na migraci nádoru zprostředkováním signální dráhy Akt/mTOR (White et al., 2014; Zhao et al., 2010). Kromě toho byly v kultuře kostních buněk s indukovanou rakovinou identifikovány níže diskutované proteiny, které naopak nebyly nalezeny v kultuře kontrolní. Jejich biologické role jsou diskutovány v disertační práci.

6.4 Přímé štěpení vzorků kostních tkání (in-bone digestion) s koncovkou kapilární elektroforézy s UV detektorem

Výhodou přímého štěpení vzorků v kostních tkáních (in-bone digestion) s koncovkou LC-MS/MS je možnost rychlé identifikace značného množství proteinů. Na druhé straně ještě tandemová hmotnostní spektrometrie nepatří k zcela běžnému vybavení. Proto byla studována i možnost využití jiné koncovky, konkrétně CE-UV (kapilární elektroforézy s UV detektorem). CE-UV je efektivní separační technika využívaná pro analýzu celé řady různých molekul, včetně proteinů a peptidů (Dawod et al., 2017; Kašička, 2018, 2020; Štěpánová & Kašička, 2016). Je využitelná též k separaci jejich komplexních směsí (Latosinska et al., 2019; Shen et al., 2019; Štěpánová & Kašička, 2019; Zhang et al., 2017)

Pracovní postup mohl být prováděn dokonce v ještě jednodušším uspořádání, protože místo purifikace vzorků pomocí ZipTip, který byl využíván v případě koncovky LC-MS/MS, byl zařazen pouze krátký centrifugační krok k odstranění mechanických nečistot (Hynek et al., 2021; Michalusová et al., 2020). Nejprve bylo otestováno, zda metoda po přímém specifickém štěpení vzorků prasečích kostních tkání trypsinem a chymotrypsinem poskytne různé profily. Podle předpokladu bylo dosaženo výrazně různých profilů CE-UV elektroferogramů a následující matematická analýza PCA byla schopna obě skupiny spolehlivě rozlišit. Různé CE-UV profily byly získány i v případě porovnání vzorků prasečí čelistní a lýtkové kosti štěpené

trypsinem. Nelišily se samozřejmě tak výrazně, protože v obou případech se již jednalo pouze o tryptické štěpy kostních tkání, nicméně matematická analýza PCA byla schopna obě skupiny vzorků vzájemně odlišit. Jen nepatrné rozdíly v elektroferogramech jsou viditelné mezi vzorky zdravých lidských čelistních kostí a kostních tkání postižených zánětem. Díky matematické analýze PCA získaných dat však bylo možné i tyto skupiny vzájemně odlišit. Získané výsledky naznačují, že CE-UV by mohla být alespoň v některých případech využívána jako alternativní koncovka následující přímé enzymové štěpení v kostní tkáni („in-bone digestion“). Výhodou této techniky je větší dostupnost a nižší náklady na analýzy, než je tomu v případě hmotnostní spektrometrie. Na druhou stranu, pokud je dostupná jako koncovka LC-MS/MS, je lepší ji upřednostnit, protože tím, že identifikuje jednotlivé proteiny, nabízí více dat k objasnění příčin rozdílného charakteru studovaných vzorků.

7 Závěry

Řešení předložené disertační práce vedlo k vyvinutí inovativní techniky umožňující rychlou a efektivní proteomickou charakterizaci kostních tkání odoperovaných při stomatochirurgických zákrocích. Vycházeli jsme z hypotézy, že relativně malé molekuly trypsinu mohou difundovat porézní kostní tkáni k proteinům „uvězněným“ v nerozpustné kostní matici a specificky je štěpit; uvolněné specifické peptidové fragmenty pak difundují do roztoku. Aplikace vhodné koncovky, jakou může být například LC-MS/MS by pak měla vést identifikaci značného množství proteinů. Technika by tak nevyžadovala komplikovanou a časově náročnou izolaci intaktních proteinů z kostních tkání.

S využitím tkání prasečích čelistních kostí se podařilo výše zmíněnou hypotézu ověřit a nalézt vhodné podmínky, které vedly k identifikaci významného množství proteinů pomocí LC-MS/MS. Velmi se osvědčilo použití propan-2-olu v preinkubačním kroku (detaily viz příloha 1). Zmíněný přístup využívající přímé štěpení („in-bone digestion“) byl následně využit k proteomické charakterizaci odoperovaných lidských maxilárních i mandibulárních kostních tkání. Umožnil identifikaci značného množství proteinů, včetně těch, které mají značný biologický i klinický význam v kostních tkáních. Matematická analýza dat získaných pomocí LC-MS/MS pak umožnila rozlišit mezi vzorky zdravých a patologických tkání.

Přístup využívající přímé štěpení byl též úspěšně využit pro charakterizaci *in vitro* modelů lidských kostních tkání s různými indukovanými patologickými stavy. I v tomto případě bylo s využitím koncovky LC-MS/MS identifikováno značné množství proteinů. Matematická

analýza získaných dat následně umožnila rozlišit mezi *in vitro* modely kostních tkání s indukovanou rakovinou a kontrolou, s indukovaným zánětem a kontrolou. Rozlišit bylo možné též vzájemně oba zmíněné patologické stavy.

Byla též ověřena možnost využití alternativní koncovky – CE-UV pro separaci specifických peptidových fragmentů uvolněných přímým štěpením vzorků kostních tkání („in-bone digestion“). Pomocí matematické analýzy získaných elektroferogramů bylo možné rozlišit mimo jiné též vzorky zánětlivých a zdravých tkání lidských kostí.

Závěrem lze konstatovat, že nové přístupy k proteomické charakterizaci kostních tkání ve stomatochirurgii založené na přímém štěpení mají potenciál přinést do této oblasti vzhled na molekulární úrovni v měřítku podstatně větším, než bylo doposud běžné. Mohly by tak představovat příspěvek k hlubšímu porozumění fyziologickým i patologickým procesům v čelistních kostech. Navíc lze uvažovat o tom, že takto jednoduchá a rychlá analýza kostních tkání by mohla představovat doplněk nebo dokonce alternativu k jejich tradičnímu histologickému hodnocení. Snadný a rutinně zvládnutelný postup zakončený poloautomatickými postupy jako například LC-MS/MS s následnou matematickou analýzou získaných dat nevyžadují zkušeného histologa a značně omezují možnost subjektivní interpretace.

8 Použitá literatura

- Borciani, G., Montalbano, G., Baldini, N., Cerqueni, G., Vitale-Brovarone, C., & Ciapetti, G. (2020). Co-culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating in vitro bone remodeling in regenerative approaches. *Acta Biomaterialia*, 108, 22–45. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.043>
- Calvo Guirado, J. L., Ramírez Fernández, M. P., Negri, B., Delgado Ruiz, R. A., Maté Sánchez de-Val, J. E., & Gómez-Moreno, G. (2013). Experimental model of bone response to collagenized xenografts of porcine origin (OsteoBiol® mp3): a radiological and histomorphometric study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 15(1), 143–151. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2011.00337.x>
- Carlini, M. J., Roitman, P., Nuñez, M., Pallotta, M. G., Boggio, G., Smith, D., Salatino, M., Joffé, E. D. B. de K., Rabinovich, G. A., & Puricelli, L. I. (2014). Clinical relevance of galectin-1 expression in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 84(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.01.016>
- Chen, L., Yao, Y., Sun, L., Zhou, J., Liu, J., Wang, J., Li, J., & Tang, J. (2015). Clinical implication of the serum galectin-1 expression in epithelial ovarian cancer patients. *Journal of Ovarian Research*, 8, 78. <https://doi.org/10.1186/s13048-015-0206-7>
- Dawod, M., Arvin, N. E., & Kennedy, R. T. (2017). Recent advances in protein analysis by capillary and microchip electrophoresis. *The Analyst*, 142(11), 1847–1866. <https://doi.org/10.1039/c7an00198c>
- Devlin, H., Horner, K., & Ledgerton, D. (1998). A comparison of maxillary and mandibular bone mineral densities. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 79(3), 323–327. [https://doi.org/10.1016/s0022-3913\(98\)70245-8](https://doi.org/10.1016/s0022-3913(98)70245-8)
- Elola, M. T., Wolfenstein-Todel, C., Troncoso, M. F., Vasta, G. R., & Rabinovich, G. A. (2007). Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 64(13), 1679–1700. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7044-8>
- Fretwurst, T., Tritschler, I., Rothweiler, R., Nahles, S., Altmann, B., Schilling, O., & Nelson, K. (2022). Proteomic profiling of human bone from different anatomical sites - A pilot study. *Proteomics. Clinical Applications*, 16(5), e2100049. <https://doi.org/10.1002/prca.202100049>
- Hubbard, M. J., & Kon, J. C. (2002). Proteomic analysis of dental tissues. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 771(1–2), 211–220. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(02\)00042-9](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(02)00042-9)
- Hynek, R., Kuckova, S., Hradilova, J., & Kodicek, M. (2004). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as a tool for fast identification of protein binders in color layers of paintings. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, 18(17), 1896–1900. <https://doi.org/10.1002/rcm.1570>
- Hynek, R., Michalus, I., Cejnar, P., Šantrůček, J., Seidlová, S., Kučková, Š., Sázellová, P., & Kašička, V. (2021). In-bone protein digestion followed by LC-MS/MS peptide analysis as a new way towards the routine proteomic characterization of human maxillary and mandibular bone tissue in oral surgery. *Electrophoresis*, 42(23), 2552–2562. <https://doi.org/10.1002/elps.202100211>
- Iezzi, G., Piattelli, A., Giuliani, A., Mangano, C., Barone, A., Manzon, L., Degidi, M., Scarano, A., Filippone, A., & Perrotti, V. (2017). Molecular, Cellular and Pharmaceutical Aspects of Bone Grafting Materials and Membranes During Maxillary Sinus-lift Procedures. Part 2: Detailed Characteristics of the Materials.

- Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18(1), 33–44.
<https://doi.org/10.2174/1389201017666161202104002>
- Jeon, O. H., Panicker, L. M., Lu, Q., Chae, J. J., Feldman, R. A., & Elisseff, J. H. (2016). Human iPSC-derived osteoblasts and osteoclasts together promote bone regeneration in 3D biomaterials. *Scientific Reports*, 6, 26761. <https://doi.org/10.1038/srep26761>
- Kašička, V. (2018). Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2015–mid 2017). *Electrophoresis*, 39(1), 209–234. <https://doi.org/10.1002/elps.201700295>
- Kašička, V. (2020). Recent developments in capillary and microchip electroseparations of peptides (2017–mid 2019). *Electrophoresis*, 41(1–2), 10–35. <https://doi.org/10.1002/elps.201900269>
- Křížková, M., Kuckova, S., Santrucek, J., & Hynek, R. (2014). Peptide mass mapping as an effective tool for historical mortar analysis. *Construction and Building Materials*, 50, 219–225.
<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2013.09.059>
- Lambertini, E., Penolazzi, L., Pandolfi, A., Mandatori, D., Sollazzo, V., & Piva, R. (2021). Human osteoclasts/osteoblasts 3D dynamic co-culture system to study the beneficial effects of glucosamine on bone microenvironment. *International Journal of Molecular Medicine*, 47(4).
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4890>
- Latosinska, A., Siwy, J., Mischak, H., & Frantzi, M. (2019). Peptidomics and proteomics based on CE-MS as a robust tool in clinical application: The past, the present, and the future. *Electrophoresis*, 40(18–19), 2294–2308. <https://doi.org/10.1002/elps.201900091>
- Mandatori, D., Penolazzi, L., Pelusi, L., Lambertini, E., Michelucci, F., Porreca, A., Cerritelli, P., Pipino, C., Di Iorio, A., Bruni, D., Di Nicola, M., Buda, R., Piva, R., & Pandolfi, A. (2021). Three-Dimensional Co-Culture System of Human Osteoblasts and Osteoclast Precursors from Osteoporotic Patients as an Innovative Model to Study the Role of Nutrients: Focus on Vitamin K2. *Nutrients*, 13(8).
<https://doi.org/10.3390/nu13082823>
- Martinez-Bosch, N., Barranco, L. E., Orozco, C. A., Moreno, M., Visa, L., Iglesias, M., Oldfield, L., Neoptolemos, J. P., Greenhalf, W., Earl, J., Carrato, A., Costello, E., & Navarro, P. (2018). Increased plasma levels of galectin-1 in pancreatic cancer: potential use as biomarker. *Oncotarget*, 9(68), 32984–32996. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26034>
- Michalusová, I., Trubacova, D., Cejnar, P., Kuckova, S., Santrucek, J., & Hynek, R. (2020). Direct tryptic cleavage in bone tissue followed by LC-MS/MS as a first step towards routine characterization of proteins embedded in alveolar bones. *International Journal of Mass Spectrometry*, 455, 116375.
<https://doi.org/10.1016/j.ijms.2020.116375>
- Pagliani, L., Andersson, P., Lanza, M., Nappo, A., Verrocchi, D., Volpe, S., & Sennerby, L. (2012). A collagenated porcine bone substitute for augmentation at Neoss implant sites: a prospective 1-year multicenter case series study with histology. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 14(5), 746–758. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2010.00314.x>
- Salmon, C. R., Giorgetti, A. P. O., Paes Leme, A. F., Domingues, R. R., Kolli, T. N., Foster, B. L., & Nociti, F. H. J. (2017). Microproteome of dentoalveolar tissues. *Bone*, 101, 219–229.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.05.014>
- Salmon, C. R., Tomazela, D. M., Ruiz, K. G. S., Foster, B. L., Paes Leme, A. F., Sallum, E. A., Somerman, M. J., & Nociti, F. H. J. (2013). Proteomic analysis of human dental cementum and alveolar bone. *Journal of*

- Proteomics*, 91, 544–555. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.016>
- Shen, X., Yang, Z., McCool, E., Lubeckyj, R., Chen, D., & Sun, L. (2019). Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry for top-down proteomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 120, 115644. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115644>
- Sieberath, A., Della Bella, E., Ferreira, A. M., Gentile, P., Eglin, D., & Dalgarno, K. (2020). A Comparison of Osteoblast and Osteoclast In Vitro Co-Culture Models and Their Translation for Preclinical Drug Testing Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030912>
- Štěpánová, S., & Kašička, V. (2016). Recent applications of capillary electromigration methods to separation and analysis of proteins. *Analytica Chimica Acta*, 933, 23–42. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.006>
- Štěpánová, S., & Kašička, V. (2019). Recent developments and applications of capillary and microchip electrophoresis in proteomics and peptidomics (2015-mid 2018). *Journal of Separation Science*, 42(1), 398–414. <https://doi.org/10.1002/jssc.201801090>
- Termine, J. D., Belcourt, A. B., Christner, P. J., Conn, K. M., & Nylén, M. U. (1980a). Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(20), 9760–9768.
- Termine, J. D., Belcourt, A. B., Miyamoto, M. S., & Conn, K. M. (1980b). Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. II. Separation and purification of fetal bovine dentin phosphoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(20), 9769–9772.
- White, N. M. A., Masui, O., Newsted, D., Scorilas, A., Romaschin, A. D., Bjarnason, G. A., Siu, K. W. M., & Yousef, G. M. (2014). Galectin-1 has potential prognostic significance and is implicated in clear cell renal cell carcinoma progression through the HIF/mTOR signaling axis. *British Journal of Cancer*, 110(5), 1250–1259. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.828>
- Zeman, A., Šmíd, M., Havelcová, M., Coufalova, L., Kuckova, S., Velčovská, M., & Hýnek, R. (2013). The structure and material composition of ossified aortic valves identified using a set of scientific methods. *Journal of Asian Earth Sciences*, 77, 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.jseaes.2013.07.001>
- Zhang, Z., Zhu, G., Peuchen, E., & Dovichi, N. (2017). Preparation of linear polyacrylamide coating and strong cationic exchange hybrid monolith in a single capillary, and its application as an automated platform for bottom-up proteomics by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Microchimica Acta*, 184. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2084-8>
- Zhao, X.-Y., Chen, T.-T., Xia, L., Guo, M., Xu, Y., Yue, F., Jiang, Y., Chen, G.-Q., & Zhao, K.-W. (2010). Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 31(8), 1367–1375. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq116>

9 Publikace, které jsou podkladem disertační práce

9.1 Publikace, které jsou podkladem disertační práce

V časopisech s impaktovým faktorem

1. **Michalusova I.**, Trubacova D., Cejnar P., Kuckova S., Santrucek J., Hynek R.: Direct tryptic cleavage in bone tissue followed by LC-MS/MS as a first step towards routine characterization of proteins embedded in alveolar bones. *International Journal of Mass Spectrometry* 455, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2020.116375>. IF₂₀₂₀ 1,98
2. Hynek R.*, **Michalus I.***, Cejnar P., Santrucek J., Seidlova S., Kuckova S., Sazelova P., Kasicka V.: In-bone protein digestion followed by LC-MS/MS peptide analysis as a new way towards the routine proteomic characterization of human maxillary and mandibular bone tissue in oral surgery. *Electrophoresis* 42, 2552-2562, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.202100211>. IF₂₀₂₁ 3,59 *Sdílené prvoautorství.
3. **Michalus I.**, Van Nguyen T., Viktorová J., Cejnar P., Šantrůček J., Kučková, Š., Sázellová P., Kašíčka V., Hynek R.: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of peptides separated from the insoluble matrix by in-sample tryptic protein digestion for rapid discrimination of various induced pathological states of human bone models in oral surgery. *Journal of Separation Science*, 2022; 45:4388–4396. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.202200694>. IF₂₀₂₂ 3,1
4. **Michalusova I.***, Sazelova P.*, Cejnar P., Kuckova S., Hynek R., Kasicka V.: Capillary electrophoretic profiling of in-bone tryptic digests of proteins as a potential tool for the detection of inflammatory states in oral surgery. *Journal of Separation Science* 43(20), 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.202000718>. IF₂₀₂₀ 3,64 *Sdílené prvoautorství.

9.2 Publikace bez vztahu k tématu disertační práce

a) V časopisech s impaktovým faktorem

1. Remlova E, Dostalova T, **Michalusova I.**, Jelinkova H, Vranova J. Hubacek M: Infantile Hemangioma – Pulse Dye Laser Versus Surgical Therapy. *Laser Physics* 2014, 24 (5) Article number 055601. DOI: 10.1088/1054-660X/24/5/055601. IF₂₀₁₄ 1,03

2. Remlova E, Dostalova T, **Michalusova I**, Vranova J, Navratil L, Rosina J: Hemangioma Curative Effect of PDL, Alexandrie, Er: YAG and CO(2) Lasers. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2011 29(12):815-25. DOI: <https://doi.org/10.1089/pho.2011.3058>.
IF₂₀₁₁ 1,25

b) V časopisech bez impaktového faktoru

1. **Michalusová I**, Dostálová T, Kozák J, Hubáček M: Vaskulární anomálie – hemangiomy. Možnosti jejich diagnostiky a terapie. (Přehledový článek) *Prakt. zub. Lék.*, roč. 59, 2011, č. 5, s. 94-100.
2. **Michalusová I**, Hubáček M., Dostálová T.: Primární chirurgická terapie 12 denního pacienta s hemangiomem. (Kazuistika) *LKS*, 2012, roč. 22, č.9, str.: 173-196
3. Mališ J., Stará V., Bláhová K., Bučková H., Faberová R., Štěrba J., Klovrzová S., Kynčl M., Černý M., Hrdlička R., Mojžíšová M., Vaculík M., Kozák J., Katra R., **Michalusová I**, Sukop A., Rygl M., Hercogová J., Arenberger P, Šmucler R., Čapková Š.: Infantilní hemangiomy. Současné léčebné postupy. (Přehledový článek) *Česko-Slovenská Pediatrie*, roč. 4/72, 07/2017, s. 245-254