

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**SEPARACE HEPCIDINU NA MAGNETICKÝCH
SORBENTECH S NÁSLEDNOU ANALÝZOU POMOCÍ
MALDI-TOF MS**

**Separation of hepcidin using magnetic sorbents with
subsequent MALDI-TOF MS analysis**

Diplomová práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Bc. Jana Vávrová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky prof. RNDr. Věry Pacákové, CSc. a konzultantky Ing. Zdenky Kučerové, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 29. dubna 2010

Abstrakt

Hepcidin je peptid, který se tvoří v hepatocytech a který je sekretován do krevní plazmy a vylučován močí. Předpokládá se, že tento peptid hraje důležitou regulační úlohu v metabolismu železa a určení změn jeho hladiny v moči a krevním séru má význam pro diagnózu závažných onemocnění. Dosud popsané metody pro stanovení hepcidinu v moči a séru mají omezení a nelze je obecně používat. V současné době se pro konečnou analýzu hepcidinu používá MALDI-TOF MS. Před tímto závěrečným krokem je však nutná separace peptidu ze vzorků moči nebo séra.

Předmětem diplomové práce bylo studium separačních metod, které by následně umožnily MALDI-TOF MS analýzu hepcidinu. V naší práci jsme použili magnetické sorbenty lišící se gelovou maticí a funkčními skupinami. Byly použity jednak komerční magnetické sorbenty obsahující –COOH skupiny a jednak hydrofilní polymetakrylátové mikročástice P(HEMA-co-GMA)-IDA s imobilizovanými kovovými ionty (přípravené na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR).

Naše výsledky prokázaly, že pro adsorpci hepcidinu při pH 6,8 je možné použít komerční magnetické částice fluidMAG-CMX, SiMAG-Carboxyl a SiMAG-Silanol. Magnetické částice P(HEMA-co-GMA)-IDA s imobilizovanými měďnatými ionty jsou pro adsorpci standardu hepcidinu použitelné v širokém rozmezí pH, zatímco v případě imobilizovaných Co(II), Zn(II) a Fe(III) byla adsorpce hepcidinu pozorována pouze při kyselém pH.

Bylo prokázáno, že optimalizované podmínky pro adsorpci standardu hepcidinu na různých magnetických částicích jsou použitelné i pro analýzu kontrolního vzorku moči zdravého jedince.

Klíčová slova: hepcidin; magnetické sorbenty; MALDI-TOF MS

Abstract

Hepcidin is cysteine-rich cationic peptide produced by hepatocytes, secreted into blood plasma, and excreted in urine. Hepcidin is proposed to be the key regulator of iron metabolism and an evaluation of changes in the hepcidin level is important for diagnosis of several diseases. However, methods used for the hepcidin detection and determination in urine and serum have certain limitations. At present time MALDI-TOF MS based approaches have been applied for final analysis of urinary and/or serum hepcidin levels. Before MS analysis, separation of hepcidin from analyzed samples is an important and necessary step.

The aim of this study was to compare the ability of several magnetic sorbents with different coating matrix and/or different terminal functionalized groups to adsorb hepcidin prior MS analysis. Either commercial magnetic sorbents containing $-\text{COOH}$ groups or magnetic hydrophilic IDA-modified polymethacrylate microparticles P(HEMA-co-GMA)-IDA with immobilized metal ions were used for this purpose. Hepcidin was adsorbed to magnetic sorbents containing linked carboxyl groups (i.e. to weak cation exchange magnetic particles) at pH 6.8 independently on a nature of magnetic particle coating layer. Magnetic particles P(HEMA-co-GMA)-IDA with immobilized Cu(II) ions were found to adsorb hepcidin in a wide region of pH, while in the case of immobilized Co(II), Zn(II) and Fe(III) ions the peptide adsorption was observed only in acidic pH.

Obtained results have shown, that found optimized condition for the adsorption of hepcidin standard to different magnetic sorbents can be applied for the peptide adsorption from samples of human urine.

Keywords: hepcidin; magnetic sorbents; MALDI-TOF MS

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Ing. Zdence Kučerové, CSc. a prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. za odborné vedení a cenné rady k mé diplomové práci.

Děkuji také všem pracovníkům Ústavu patologické fyziologie a CEH 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy zejména pak RNDr. Petru Přikrylovi, Ph.D. za cenné rady týkající se práce s MALDI-TOF/TOF hmotnostním spektrometrem a Mgr. Janě Frýdlové, Ph.D. a Mgr. Lence Novotné, Ph.D. za konzultace a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Ráda bych také poděkovala rodičům a přátelům za podporu během mého studia.

Na závěr bych chtěla poděkovat Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy za finanční prostředky poskytnuté pro vypracování této práce (granty MSM 0021620806 a LC 06044).

Obsah

Katedra analytické chemie	1
1 Teoretická část	10
1.1 Hepcidin.....	10
1.1.1 Struktura hepcidinu	10
1.1.2 Funkce hepcidinu.....	11
1.1.3 Stanovení hepcidinu a jeho význam v klinické praxi	13
1.1.4 Metody detekce a stanovení hepcidinu.....	13
1.1.4.1 Imunochemické metody	14
1.1.4.2 Metody založené na principu SELDI-TOF MS.....	14
1.1.4.3 Metody založené na principu LC-MS/MS	14
1.1.4.4 Metody založené na principu MALDI-TOF MS.....	15
1.1.5 Klinický význam hepcidinu.....	15
1.2 Magnetické částice.....	16
1.2.1 Vlastnosti magnetických částic	16
1.2.2 Princip a výhody magnetické separace.....	17
1.3 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	17
1.4 Peptidové mapování	20
2 Cíl práce	22
3 Experimentální část.....	23
3.1 Použité chemikálie	23
3.2 Přístroje	24
3.3 Podmínky separace hepcidinu	24
3.3.1 Imobilizace kovů na magnetické částice	24
3.3.2 Obecný postup separace hepcidinu na magnetických částicích různého typu	25

3.3.3	Optimalizace podmínek adsorpce hepcidinu na komerčně dostupných magnetických částicích.....	26
3.3.4	Optimalizace podmínek adsorpce hepcidinu na polymetakrylátové magnetické částice obsahující imobilizované kovové ionty	27
3.3.4.1	Vliv pH	27
3.3.4.2	Vliv iontové síly	28
3.3.5	Adsorpce hepcidinu na jednotlivých komponentách hydrofilních metakrylátových magnetických částic.....	28
3.3.5.1	Vliv iontové síly	29
3.3.5.2	Vliv přídavku činidel.....	29
3.3.6	Separace hepcidinu ze lidské moči při použití různých magnetických částic s následnou detekcí MALDI-TOF MS.....	30
4	Výsledky a diskuze	32
4.1	Separace hepcidinu.....	32
4.1.1	Komerčně dostupné magnetické částice použité pro adsorpci hepcidinu	32
4.1.2	Hydrofilní magnetické částice P(HEMA-co-GMA) s navázanou iminodiocetovou kyselinou	34
4.2	Podmínky separace hepcidinu.....	35
4.2.1	Optimalizace podmínek adsorpce hepcidinu na komerčně dostupných magnetických částicích.....	35
4.2.2	Optimalizace podmínek adsorpce hepcidinu na polymetakrylátové magnetické částice obsahující imobilizované kovové ionty	39
4.2.3	Adsorpce hepcidinu na jednotlivých komponentách hydrofilních metakrylátových magnetických částic.....	42
4.2.4	Shrnutí	44
4.3	Separace hepcidinu ze lidské moči při použití různých magnetických částic s následnou detekcí MALDI-TOF MS.....	45
5	Závěr.....	52
6	Seznam použité literatury	54

Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
IDA	iminodioctová kyselina
IMAC	afnitní chromatografie na imobilizovaných kovových iontech
IL-6	interleukin-6
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight
MB WCX	Magnetic Beads based Weak Cation Exchange Chromatography
MS	hmotnostní spektrometrie
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
TFA	kyselina trifluoroctová
SELDI-TOF MS	Surface Enhanced Laser Desorption Ionization
P(HEMA)	sorbent poly(2-hydroxyethyl methakrylát)
P(HEMA-co-GMA)	sorbent poly(2-hydroxyethyl methakrylát-co-glycidyl methakrylát)
P(GMA)	sorbent poly(glycidyl methakrylát)
ÚMCH AV	Ústav makromolekulární chemie Akademie věd

Úvod

Hepcidin je 25-aminokyselinový antimikrobiální peptid, který má důležitou úlohu v regulaci metabolismu železa, tvoří se v hepatocytech a je sekretován do krevní plazmy a vylučován močí. Syntéza hepcidinu je stimulována nadbytkem železa a naopak potlačována u anémie a hypoxie. Detekce a kvantifikace bioaktivního hepcidinu by podstatně usnadnila diagnózu některých onemocnění (např. genetické hemochromatózy a anémie chronických chorob).

V poslední době byla věnována zvýšená pozornost vývoji a aplikaci separačních technik, které používají magnetické částice. Ty jsou díky svému velkému specifickému povrchu vhodné pro adsorpci peptidů a různě modifikované magnetické částice se používají k selektivní separaci peptidů před analýzou na MS.

V současnosti je nejrozšířenější MS technikou v analýze proteinů a peptidů hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice (MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization). MALDI je šetrná ionizační technika vhodná k ionizaci netěkavých vysokomolekulárních látek z pevné fáze. Nejvýznamnější uplatnění nachází MALDI v proteomice při identifikaci proteinů a peptidů.

1 Teoretická část

1.1 Hecpidin

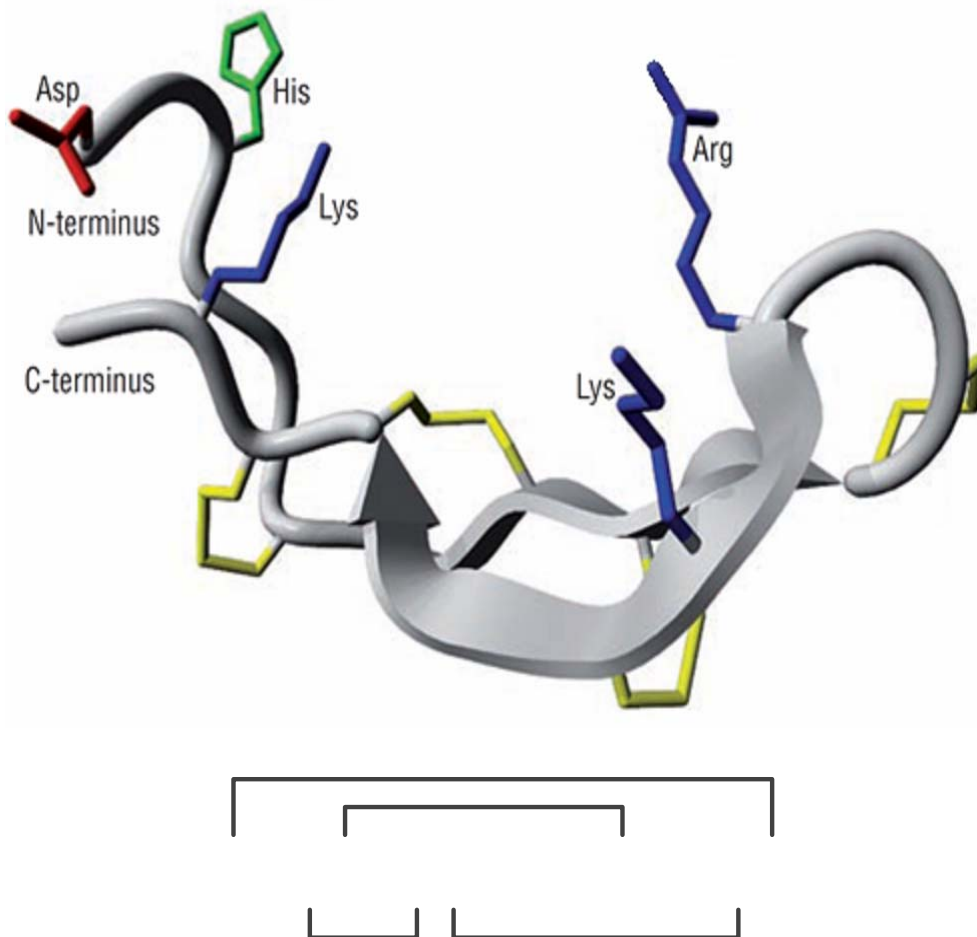
Hecpidin je 25-aminokyselinový antimikrobiální peptid účastnící se regulace metabolismu železa v organismu.^{1,2} Tento peptid byl poprvé objeven v lidské moči a plazmě.^{3,4} Hecpidin existuje ve třech různých formách, Park et al. identifikovali v lidské moči také hecpidin-20 a hecpidin-22, což jsou formy hecpidinu-25 zkrácené na N-koncové straně peptidového řetězce.³ V lidské moči a séru je možno detegovat hecpidin-25 a hecpidin-20, zatímco hecpidin-22 byl nalezen pouze v moči.⁶ Regulace železa je téměř výlučně způsobená hecpidinem-25 a zkrácené formy peptidu jsou téměř neaktivní.^{6,7}

Hecpidin je produkovaný zejména v hepatocytech, sekretován v plazmě a vylučován v moči. Hecpidin vzniká z většího prekursoru preprohecpidinu, který obsahuje 84 aminokyselin. Preprohecpidin je štěpen signální peptidasou na prohecpidin obsahující 60 aminokyselin, který je pak následně štěpen furinem na kratší formy peptidu: hecpidin-20 a hecpidin-22 (cit.^{3,8,9}). Ačkoli byl hecpidin poprvé objeven v lidské moči a séru, nejvíce informací o jeho struktuře, funkci, expresi a regulaci bylo získáno *in vitro* přístupy a studii na myších modelech.¹⁰

1.1.1 Struktura hecpidinu

NMR (nukleární magnetická rezonance) spektroskopii zjištěná struktura lidského hecpidinu-25 je znázorněna na obr. 1.1. Bylo zjištěno, že tento malý peptid obsahující 8 cysteinů tvoří jednoduchou vlásenkovou strukturu obsahující β -strukturu, která je stabilizována 4 disulfidickými můstky mezi dvěma antiparalelními řetězci.¹⁰ Jeden z disulfidických můstků je umístěn v nejbližším okolí vlásenkové kličky, která ukazuje na možnou rozhodující oblast v aktivitě molekuly. Přítomnost více cysteinů a vzájemné propojení disulfidickými můstky je vysoce konzervováno mezi různými živočišnými druhy.³ Hecpidin je bohatý na bazické aminokyseliny, a má izoelektrický bod 8,2 (cit.⁴).

Pokusy *in vivo* (na myších) a *in vitro* s použitím syntetického hepcidinu ukázaly, že regulace železa je téměř výlučně závislá na hepcidinu-25, nejvíce se na této funkci uplatňuje pět N-koncových aminokyselin. Typická β -struktura s amfipatickými vlastnostmi je známkou antimikrobiální funkce.^{6,7}



Obr.1.1 Molekulová struktura a sekvence lidského hepcidinu-25 (cit.¹¹)
Červeně - záporně nabitý zbytek kyseliny asparagové, modře - kladně nabitě zbytky argininu a lysinu a histidinu, žlutě - disulfidické můstky, zeleně - histidinový zbytek, který se uplatňuje při IMAC separaci

1.1.2 Funkce hepcidinu

Bioaktivní hepcidin-25 hraje rozhodující roli v metabolismu železa. Lidé a ostatní savci nemají žádný účinný mechanismus, jak se zbavit nadbytečného železa. Regulace zásob železa je uskutečňována na úrovni regulace jeho střevní absorpce. Nedojde-li při zvyšujících se zásobách železa k výraznému omezení jeho další střevní absorpce, dochází ke kumulaci železa v játrech a řadě dalších orgánů. Zvýšený příjem

železa v dietě (ale i parenterální podání železa) indukuje zvýšenou syntézu hepcidinu v játrech. Molekulární detaily aktivace hepcidinu železem nejsou zcela jasné, určitou roli zřejmě hraje receptor pro transferin 2, receptor pro BMP (bone morphogenetic protein) a rovněž nedávno indentifikovaný protein hemojuvelin. Heparin blokuje uvolňování železa z enterocytů a tím zastavuje jeho střevní absorpci. Blokuje také uvolňování železa z makrofágů a to tak, že se váže na ferroportin a indukuje jeho internalizaci a degradaci v lysozómech. Produkce hepcidinu ale není vázána jen na stav zásob železa. Jaterní syntéza hepcidinu je inhibována u pacientů s anémií a hypoxií; mobilizace železa z trávicího traktu a makrofágů je nezbytná pro aktivaci erythropoézy a dostatečnou účinnost erythropoetinu. Snížená hladina hepcidinu může být zodpovědná za většinu případů hereditární (genetická) hemochromatózy¹²⁻¹⁹

Naopak zánět, např. prostřednictvím IL-6 (interleukin-6), stimuluje jaterní syntézu hepcidinu. Nadbytek hepcidinu může být hlavním znakem u anémie způsobené zánětem. Anémie chronických chorob je tak spojena s dlouhodobou stimulací produkce hepcidinu, který inhibuje střevní absorpci železa a uvolňování železa z makrofágů, a významně tak přispívá k rezistenci na erythropoetin. Heparin reaguje např. na zvýšený příjem železa v dietě mnohem rychleji než ferritin, informuje nás tedy o krátkodobé regulaci metabolismu železa.²⁰⁻²³

Heparin se také podílí na hostitelské obraně prostřednictvím klesající koncentrace extracelulárního železa a zpomaluje tak růst mikrobů, jejichž růst je vysoce závislý na tomto zdroji železa.^{4,10,24-26}

Hlavní funkce hepcidinu:

- je klíčový regulátor systémového metabolismu železa v organismu
- tlumí vstřebávání železa
- snižuje resorpci železa a jeho uvolňování z makrofágů
- snižuje množství železa v organismu a koncentraci železa v plazmě
- zvýšená exprese při infekčních onemocněních, zánětová stimulace (IL-6) zvyšuje jeho tvorbu a přispívá ke změnám metabolismu železa u anémie chronických chorob

1.1.3 Stanovení hepcidinu a jeho význam v klinické praxi

Spolehlivá metoda detekce a kvantifikace bioaktivního hepcidinu by podstatně usnadnila diagnózu a stanovení příčiny hereditární (genetické) hemochromatózy, u níž je porušena regulace hepcidinu, zejména pokud by byla kombinovaná se sérovými parametry metabolismu železa a koncentrací železa v játrech.^{18,27} Stanovení hepcidinu by také významně přispělo k diagnostice anémie chronických chorob i u pacientů s chronickým selháním ledvin a ke zjištění příčin rezistence na erytropoetin.¹⁹

Stanovení hepcidinu je ovšem vzhledem k velikosti molekuly a malým rozdílům mezi hepcidinem u různých savčích druhů obtížné. Jsou používány jednak imunochemické metody (jako např. ELISA) a jednak metody založené na hmotnostní spektrometrii (SELDI-TOF MS, LC-MS/MS, MALDI-TOF MS), které však mají ve stanovení hepcidinu určitá omezení. Doposud nebyla popsána žádná spolehlivá analytická metoda k rutinnímu stanovení bioaktivního hepcidinu v séru a moči.

1.1.4 Metody detekce a stanovení hepcidinu

Pro detekci a stanovení hepcidinu bylo vyvinuto několik metod, které využívají různé externí kalibrační standardy,^{28,29} zkrácené analogy hepcidinu^{30,31} nebo stabilně izotopicky značený hepcidin.³²⁻³⁶ Každá z metod má ovšem určitá omezení. Používání externích standardů umožňuje pouze semikvantitativní stanovení hepcidinu, zatímco používání izotopicky značeného hepcidinu je ekonomicky drahé a jeho syntéza není snadná.

Obecně, při porovnání s většinou ELISA testů je stanovení proteinů/peptidů pomocí MALDI-TOF MS výhodné, protože umožňuje současně rozlišit a kvantifikovat různé jejich izoformy/varianty. LC-MS metody jsou časově náročnější, vyžadují okolo 10 minut pro každou analýzu, zatímco u MALDI-TOF MS je to přibližně 1 minuta, nicméně obě tyto techniky se vzájemně doplňují. V případě hepcidinu může být LC-MS použita k jeho hlubším strukturním analýzám, zatímco MALDI-TOF MS je schopna rychlé a přesné detekce hepcidinu.^{5,28,29,30,32,33}

1.1.4.1 Imunochemické metody

V roce 2008 byla prezentována první úspěšná imunoanalýza hepcidinu, umožňující stanovení hepcidinu v séru i moči s limitem detekce 5 ng/ml (cit.³⁷). Koliaraki et al. zjistil dobrou korelaci mezi stanovením hepcidinu v séru ELISA testem a kvantitativním SELDI-TOF měřením provedeném na šesti vzorcích.³⁸ Kulaksiz et al. vyvinul ELISA test pro detekci prohepcidinu.³⁹

1.1.4.2 Metody založené na principu SELDI-TOF MS

V současnosti existuje mnoho prací popisujících vhodnost použití technik na principu TOF MS pro cílenou kvantifikaci peptidů.⁴⁰ V první řadě byl v několika studiích kvantifikován hepcidin-25 pomocí metody SELDI-TOF MS.^{5,28-30} Ward et al. použil stabilně izotopicky značený vnitřní standard hepcidinu v kombinaci s metodou SELDI-TOF MS (cit.³²).

Altramure et al. vyvinul semikvantitativní stanovení hepcidinu v moči metodou SELDI-TOF MS za použití externích nízkomolekulárních standardů jako je adrenokortikotropní hormon, hovězí inzulin nebo syntetický lidský hepcidin. Pro separaci hepcidinu použil dva druhy proteinových čipů: slabý katex (weak cation exchange CM10) a normální fáze (Normal Phase Chip NP20). Koncentrace hepcidinu pak normalizoval na množství kreatininu a močoviny v těle.²⁹ Tomosugi et al. použil stejné čipy ke stanovení hepcidinu ve vzorcích séra a moči za pomoci externího syntetického standardu hepcidinu-25 (cit.²⁸). Kroot et al. vylepšil semikvantitativní stanovení hepcidinu SELDI-TOF MS nepatrnými změnami při úpravě vzorků.⁴¹

Kemna et al. (cit.⁵) a Swinkels et al. (cit.³⁰) použili chromatografické čipy s imobilizovanými měďnatými ionty (IMAC30-Cu²⁺) pro IMAC separaci a stanovení hepcidinu za použití vnitřního standardu syntetického hepcidinu, jehož sekvence byla zkrácena z N-konce o kyselinu asparagovou. Metoda popsaná Swinkelsem et al. vyžaduje 495 μ l moči a její nevýhodou je obtížná automatizace separace na chromatografických čipech.³⁰

1.1.4.3 Metody založené na principu LC-MS/MS

Bansal et al. jako první použil pro stanovení hepcidinu kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou MS s iontovou pastí. V tomto případě byly ke stanovení hepcidinu v moči pomocí vnitřního izotopického standardu

[¹³C/¹⁵N]Gly^{12,20}hepcidinu použity magnetické nanočástice se slabým měničem kationtů.³⁶

1.1.4.4 Metody založené na principu MALDI-TOF MS

Bansal et al. použil magnetické nanočástice se slabým měničem kationtů a MALDI-TOF MS ke stanovení hepcidinu v moči pomocí [¹³C/¹⁵N]Gly^{12,20}hepcidinu jako vnitřního izotopického standardu. Tato metoda byla založena na stejném principu jako jeho dříve popsaná metoda LC-MS/MS a je pouze pro stanovení hepcidinu v moči.^{33,36} Anderson et al. popsal novou metodu kvantifikace hepcidinu v lidské moči MALDI-TOF MS na Mass Spec Turbo čipu s pomocí hepcidinu-25[Lys¹⁵N²,¹³C₆]₂ jako vnitřního izotopického standardu.⁴² Gay et al. popsal kvantitativní stanovení hepcidinu v moči s vnitřním standardem pro MALDI-TOF MS s předcházející extrakcí na pevné fázi.⁴³

1.1.5 Klinický význam hepcidinu

Díky první úspěšné imunoanalýze hepcidinu, kterou provedl Ganz v roce 2008, bylo možno prokázat zvýšené sérové koncentrace hepcidinu u pacientů se zvýšeným CRP (C-Reaktivní Protein), mnohočetným myelomem a chronickým selháním ledvin, naopak u pacientů se sideropenickou anémií byly koncentrace hepcidinu na hranici detekce.³⁷

Pacienti s chronickou renální insuficiencí mají zvýšený sérový prohepcidin. Ještě vyšší koncentrace prohepcidinu byly nalezeny u pacientů s chronickým selháním ledvin, kteří podstoupili dialýzu, a u pacientů po transplantaci ledvin.¹⁹ Koncentrace prohepcidinu ale zřejmě korelují s koncentracemi hepcidinu jen velmi volně a měření prohepcidinu se pro klinickou praxi nedoporučuje.⁴⁴

Pomocí metody, při které byly použity chromatografické čipy s imobilizovanými měďnatými ionty, bylo možno prokázat korelaci mezi koncentracemi hepcidinu a ferritinu. Podání lipopolysacharidu stimulovalo vzestup sérových koncentrací i močové exkrece hepcidinu, pacienti se sideropenickou anémií měly hodnoty hepcidinu ve srovnání s kontrolami sníženy.^{5,30}

Je zřejmé, že dosavadní informace o koncentracích hepcidinu u pacientů s chronickými zánětlivými onemocněními a s chronickým selháním ledvin jsou z

metodických důvodů velmi omezené. Opakované vyšetření hepcidinu by mohlo odlišit pacienty s akutně zvýšenou koncentrací hepcidinu v důsledku akutního zánětlivého onemocnění od pacientů s chronickým zánětlivým onemocněním. Je také možné, že v budoucnu by u pacientů s dlouhodobě vyššími sérovými koncentracemi hepcidinu mohly být cílové hodnoty hemoglobinu definovány odlišně od pacientů s normální koncentrací hepcidinu.⁴⁵

1.2 Magnetické částice

V poslední době byla věnována zvýšená pozornost vývoji a aplikaci magnetických separačních technik, které používají magnetické částice. Magnetické separace jsou jednou z perspektivních možností, jak ve vybraných případech urychlit nebo usnadnit některé běžně používané separační postupy a metody. Magnetické částice mohou být modifikovány biologicky aktivními látkami a různými funkčními skupinami (např. hydroxylové, karboxylové, aminové), které jsou navázané na povrchu magnetických částic a uplatňují se při separacích a vazbě vhodných ligandů.⁴⁶⁻⁴⁸ Magnetická separace ve spojení s hmotnostní analýzou představuje velmi citlivou a rychlou metodu pro identifikaci proteinů a peptidů z biologických vzorků.⁴⁹

1.2.1 Vlastnosti magnetických částic

Nejčastěji používanými materiály pro přípravu jader magnetických částic jsou práškové oxidy železa magnetit (Fe_3O_4) nebo jejich oxidovaná forma maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Magnetická jádra mohou být obalena různými syntetickými polymery (např. polyakrylamid, polystyren, polyvinylalkohol), k dostání jsou také částice založené na celulóze, agaróze, křemenu a porézním skle.⁴⁶⁻⁴⁸

Magnetické částice mají průměr v rozmezí nano- až mikrometrů a jejich výhodou je velký specifický povrch. Většina biologických materiálů má diamagnetické vlastnosti, které umožňují účinně oddělit magnetický a magneticky upravený materiál. Mnoho z částic má superparamagnetické vlastnosti, takže reagují na vnější magnetické pole, ale za nepřítomnosti magnetického pole se vzájemně neovlivňují, díky tomu

mohou být snadno resuspendovány a ponechány v suspenzi dlouho.⁴⁶⁻⁴⁸

1.2.2 Princip a výhody magnetické separace

Principem magnetické separace je adsorpce cílové sloučeniny nebo buňky na magnetické částice a následné odstranění vytvořeného komplexu ze studovaného systému pomocí vnějšího magnetického pole, například vhodným magnetickým separátorem, permanentním magnetem, či elektromagnetem. Po promytí, může být izolovaná sloučenina nebo buňka z magnetických částic eluována a použita k další práci.

Ve srovnání se standardními separačními metodami má magnetická separace několik výhod. Není potřeba drahého přístrojového vybavení, pracovní postup je obvykle velmi jednoduchý, je zde méně manipulačních kroků. Separační proces může být proveden přímo v surových vzorcích a lze ho použít také k zakoncentrování zředěného roztoku bílkovin. Magnetické separační techniky jsou základem různých automatizovaných metod pro stanovení různých druhů analytů, např. proteinů a peptidů.⁴⁶⁻⁴⁸

1.3 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

V současnosti je nejrozšířenější MS technikou v analýze proteinů a peptidů hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice (MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization). MALDI je šetrná ionizační technika vhodná k ionizaci netěkavých vysokomolekulárních látek z pevné fáze.^{50,51,52}

Principem metody je nanesení malého množství vzorku společně s vhodnou matricí na terčík, který je nejdříve nejčastěji za laboratorní teploty a následně ve vakuu vysušen. Vzorek s matricí je ozařován krátkými pulsy desorpčního laseru nejčastěji dusíkového (UV laser, $\lambda = 337$ nm), které trvají řádově nanosekundy. Energie laserového pulsu je absorbována převážně matricí, čímž dochází k její rychlé desorpci. Odpařující se částice matrice sebou strhávají molekuly analytu a převádějí je do plynného skupenství. Excitované molekuly matrice dále ionizují molekuly analytu přenosem protonu. Takto

ionizované molekuly jsou usměrněny elektrickým polem, které je udržováno pomocí vysokého napětí na extrakčních mřížkách, do průletového hmotnostního analyzátoru (TOF - Time Of Flight).⁵² V TOF analyzátoru jsou ionizované molekuly urychleny na stejnou kinetickou energii a prolétávají letovou trubicí. Ionty s nižší hmotností se pohybují rychleji než ionty s vyšší hmotností. Dobu letu (t) každého iontu můžeme vypočítat ze vztahu:

$$\frac{m}{z} = 2eU \frac{t^2}{L^2}, \quad (1.1)$$

kde m je hmotnost, z náboj, e elementární náboj, U urychlovací napětí a L délka driftové zóny.⁵²

Výhodami TOF analyzátoru jsou vysoká citlivost, rozsah m/z je prakticky neomezen, velmi krátká doba analýzy, jednoduchá konstrukce a s použitím iontového zrcadla (reflektronu) nebo pulzní (zpožděné) extrakce iontů lze dosáhnout vysokého rozlišení.^{53,54}

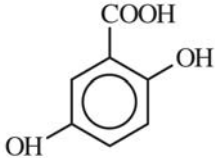
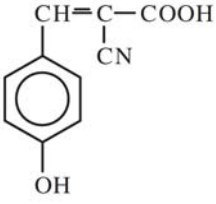
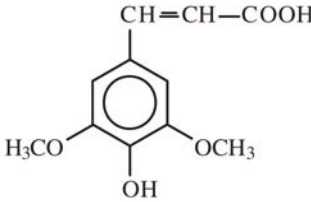
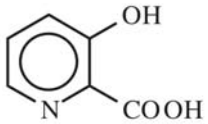
Reflektron je elektrostatické iontové zrcadlo, které slouží k sjednocení kinetických energií iontů se stejným m/z . Iontové zrcadlo je tvořeno soustavou elektrod umístěných na konci letové trubice. Na každou elektrodu je přiváděno napětí o stejné polaritě. Ionty s vyšší hodnotou kinetické energie proniknou hlouběji do opačně orientovaného elektrického pole reflektoru, čímž dojde k jejich zpoždění oproti iontům s nižší kinetickou energií a tím i k vyrovnání celkové doby strávené v letové trubicí. Délka průniku iontů do elektrického pole reflektoru nezávisí na m/z , ale pouze na kinetické energii, ionty se stejnou m/z se tak dostanou na stejnou pozici. Vysoké rozlišení je však na úkor citlivosti a snížení hmotnostního rozsahu.⁵³

Druhou možností pro zvýšení rozlišení je použití zpožděné (pulsní) extrakce, u které není extrakční napětí aplikováno ihned, ale po uplynutí doby 100 až 1000 ns. Během tohoto zpoždění se distribuce iontů v iontovém zdroji změní tak, že ionty o stejném m/z , ale s vyšší kinetickou energií se budou nacházet dále od nosiče vzorku než ionty s nižší kinetickou energií. Následnou aplikací extrakčního napětí dojde k vyrovnání distribuce počátečních kinetických energií pro ionty o stejném m/z (cit.⁵⁴).

Z mechanismu MALDI vyplývají i základní požadavky na matici, která musí splňovat určitá kritéria. Matrice musí absorbovat při vlnové délce použitého laseru,

musí být schopna v excitovaném stavu předat proton, neměla by se vzorkem reagovat a vzorek by měl krystalizovat společně s roztokem matrice.⁵² Vzorek i matrice musí být rozpuštěny ve stejném rozpouštědle nebo v rozpouštědlech navzájem mísitelných. Jako matrice se nejčastěji používají organické kyseliny (tab.1.1).

Tab. 1.1 Výběr běžně užívaných MALDI matric

Matrice	Struktura	Vlnová délka	Použití
kyselina 2,5- dihydroxybenzoová (DHB)		337 nm 353 nm	peptidy proteiny lipidy
kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CCA)		337 nm 353 nm	peptidy
kyselina sinapová (SA)		337 nm 353 nm	peptidy proteiny
kyselina 3-hydroxypikolinová (HPA)		337 nm 353 nm	nukleové kyseliny

Kvalita získaného spektra závisí na použité energii laserového pulsu, nazývané hustotě výkonu laseru. V praxi obvykle během měření pomalu zvyšujeme energii za současného posouvání terčíku se vzorkem a sledujeme spektra z jednotlivých laserových pulsů. Signál se začne objevovat až po dosažení prahové energie, po jejím překročení je signál exponenciálně závislý na energii laserového paprsku. Malá změna energie vede k velké změně signálu analytu, vlastní měření se provádí při energii asi 10-30% nad prahovou hodnotou.

1.4 Peptidové mapování

Pravděpodobně nejvýznamnější uplatnění nachází MALDI v proteomice při identifikaci proteinů a peptidů. Úspěch při identifikaci bílkovin závisí na kvalitě dat získaných hmotnostní spektrometrií a jejich interpretaci. S vývojem jemných ionizačních technik⁵⁵ se rozvíjely také metody identifikace bílkovin. Směs bílkovin se rozdělí vhodnou separační technikou a separované bílkoviny se enzymaticky štěpí na směsi peptidů, které se dále analyzují hmotnostní spektrometrií. Nejcitlivější a rychlou metodou je peptidové mapování^{56,57} (peptide mass fingerprinting PMF), ve kterém jsou přesně změřené molekulové hmotnosti peptidů porovnány s teoreticky vypočítanými hmotnostmi peptidů z bílkoviny přítomné v databázi, přičemž toto srovnání je provedeno pro každou bílkovinu v databázi zvlášť. Bílkovina z databáze vykazující největší shodu při použití vhodného skórovacího algoritmu identifikuje analyzovanou bílkovinu. Jinou možností identifikace bílkovin je odvodit krátký sekvenční úsek některého z peptidů přítomných v peptidové směsi na základě jeho fragmentace a použitím jiného vhodného vyhledávacího programu identifikovat bílkovinu v databázi (např. SwissProt, NRDB, TrEMBL).

Databázové vyhledávací programy (např. Protein Prospector, Mascot, , Proteomics) akceptují na vstupu experimentální data a při průchodu vybranou databází specificky porovnávají tato vstupní data s každou položkou v databázi.

Pro identifikaci bílkovin existují tři hlavní kategorie databázových vyhledávacích programů.⁵⁸

Programy využívající jakožto vstup pro databázové vyhledávání:

- molekulové hmotnosti peptidů
- hmotnosti fragmentových iontů z fragmentačního spektra
- interpretované sekvence aminokyselin

Počátky peptidového mapování spadají do roku 1989, kdy Henzel at. al analyzoval bílkovinné lyzáty hmotnostní spektrometrií.⁵⁹ Bílkoviny separované gelovou elektroforézou byly převedeny z gelu na membránu a po jejich redukci a alkylyci byly

štěpeny trypsinem nebo bromkyanem. Vzniklé peptidy byly analyzovány sektorovým hmotnostním analyzátozem s ionizační technikou „fast atom bombardement“ (FAB). Citlivost této metody však byla malá, což zabránilo jejímu využití jako běžného nástroje pro identifikaci bílkovin.⁵⁸

Poté, co se začaly vyrábět první komerční přístroje typu MALDI-TOF MS, nahradila citlivější technika MALDI-TOF MS techniky dříve používané v PMF. Technická zlepšení TOF hmotnostní analýzy (použití zpožděné extrakce a reflektoru) byla příčinou dalšího zvýšení citlivosti a přesnosti analýzy, což mělo za následek rozšíření techniky PMF jako hlavního nástroje pro identifikaci bílkovin.⁵⁸

Výhodou PMF je vedle citlivosti a rychlosti této metody i skutečnost, že pro vlastní analýzu se spotřebuje pouze malá část vzorku (přibližně 5 - 10 %). To poskytuje možnost využití téhož vzorku pro další analýzy, například pro sekvenování peptidů metodou MS/MS a studium posttranslačních modifikací.⁵⁸

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo vypracování jednoduché metody separace a hepcidinu z biologických vzorků za použití magnetických sorbentů a hmotnostně spektrometrické detekce.

Pro splnění tohoto cíle bylo konkrétně potřeba:

- najít podmínky pro adsorpci hepcidinu na komerčních magnetických částicích obsahujících různé modifikující skupiny;
- použít magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) modifikované iminodioctovou kyselinou s immobilizovanými Cu(II) ionty, připravené na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd České republiky pro adsorpci hepcidinu;
- sledovat vliv jednotlivých komponent sorbentů na adsorpci hepcidinu;
- podmínky nalezené pro adsorpci standardu hepcidinu na různé magnetické sorbety pak použít pro adsorpci hepcidinu ze vzorků lidské moče.

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

fluidMAG-CMX (Chemicell GmbH, Německo)
SiMAG-Carboxyl (Chemicell GmbH, Německo)
SiMAG-Silanol (Chemicell GmbH, Německo)
MB-WCX (Bruker-Daltonics, Německo)
Magnetic Carboxymethyl 6% Agarose Beads (BioScience Bead Division, USA)
P(HEMA) (ÚMCH, akademie věd, ČR)
P(GMA) (ÚMCH, akademie věd, ČR)
P(HEMA-*co*-GMA) (ÚMCH, akademie věd, ČR)
P(HEMA-*co*-GMA)-IDA (ÚMCH, akademie věd, ČR)
standard hepcidinu (Clonestar Peptide Services, ČR)
lidská moč (Klinika nefrologie, 1.lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze, ČR)
kyselina octová (IPL, ČR)
dioxan (IPL, ČR)
dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, ČR)
chlorid sodný (IPL, ČR)
hydroxid amonný (IPL, ČR)
acetonitril (Merck, ČR)
hydrogenuhličitan sodný (Lachema, ČR)
hydrogenfosforečnan sodný (IPL, ČR)
acetát amonný (Sigma-Aldrich, ČR)
kyselina trifluoroctová (Merck, ČR)
kyselina chlorovodíková (IPL, ČR)
kyselina α -kyano-4-hydroxyiskořicová (Bruker-Daltonics, Německo)
hexahydrát chloridu kobaltnatého (Sigma-Aldrich, ČR)
hexahydrát chloridu železitého (IPL, ČR)
pentahydrát síranu měďnatého (Lachema, ČR)
heptahydrát síranu zinečnatého (Lachema, ČR)

3.2 Přístroje

hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Německo)

analytické váhy XT 120 A (Precisa, Švýcarsko)

váhy BL 510 (Sartorius, Německo)

pH metr 3305 (Jenway, Velká Británie)

ultrazvuk (Ultrasonic Compact Cleaner 1 L PS 01000 od Powersonic, Slovensko)

centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)

milli-Q systém (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)

magnetický separátor (Bruker Daltonics, Německo)

MixMate PCR 96 (Eppendorf, Německo)

3.3 Podmínky separace hepcidinu

3.3.1 Imobilizace kovů na magnetické částice

Magnetické částice P-HEMA-co-GMA s navázanou iminodioctovou kyselinou (IDA) byly připraveny Dr. Horákem na Ústavu makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky disperzní kopolymerací 2-hydroxyethyl metakrylátu (HEMA) s glycidyl metakrylátem (GMA) v přítomnosti koloidního oxidu železitého. Pracovali jsem s magnetickými částicemi o průměru 2,3 μm obsahující 1,3 mmol $-\text{COOH}/\text{g}$. Bylo naváženo 50 mg magnetických částic, které byly nejdříve třikrát promyty 1000 μl 50 mM disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA-Na_2) s přídavkem 1 M NaCl a poté třikrát 1000 μl destilované vody. K takto promytým magnetickým částicím bylo přidáno 1000 μl roztoku PBS (Phosphate Buffered Saline) a byly skladovány při 4 °C připraveny pro další použití.

Na tyto magnetické částice byly imobilizovány měďnaté, kobaltnaté, zinečnaté a železité ionty. Pro imobilizaci kovů bylo použito 50 μl magnetických částic P-HEMA-co-GMA-IDA vyrobené Dr. Horákem. Pomocí magnetického separátoru byl od magnetických částic odstraněn roztok a k samotným magnetickým částicím bylo přidáno 500 μl roztoku: 1 M $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1 M $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Magnetické částice byly 2 hodiny třepány za laboratorní teploty. Pro odstranění nenavázaných iontů kovů byly magnetické částice promyty třikrát 500 μl destilované vody, jednou 500 μl 0,1% TFA a nakonec třikrát 500 μl destilované vody.

Tímto postupem připravené magnetické částice obsahující imobilizované ionty kovů byly uchovávány v roztoku PBS a skladovány při 4 °C.

3.3.2 Obecný postup separace hepcidinu na magnetických částicích různého typu

Používané magnetické částice:

Magnetic Carboxymethyl 6% Agarose Beads, fluidMAG-CMX, SiMAG-Carboxyl, SiMAG-Silanol, MB-WCX, P(HEMA), P(GMA), P(HEMA-co-GMA), P(HEMA-co-GMA)-IDA, P(HEMA-co-GMA)-IDA s imobilizovanými měďnatými, kobaltnatými, zinečnatými a železitými ionty

Používané vzorky:

- a) standard hepcidinu (Clonestar Peptide Services, ČR) uchováván při -18°C
- b) lidská moč (Klinika nefrologie, 1.lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze, ČR); moč byla centrifugována 20 minut při 4 °C a 12 000 rpm, supernatant byl dlouhodobě uchováván ve zmraženém stavu při -80 °C

Do mikrozkušavky bylo odebráno 10 µl magnetických částic, které byly pomocí magnetického separátoru třikrát promyty 100 µl adsorpčního roztoku. K promytým magnetickým částicím bylo přidáno 80 µl adsorpčního roztoku a 20 µl roztoku vzorku, směs byla třepána 30 minut při laboratorní teplotě. Pomocí magnetického separátoru byl roztok vzorku odebrán a magnetické částice byly jednou promyty 100 µl adsorpčního roztoku a poté třikrát 100 µl destilované vody. Hecpidin adsorbovaný na magnetických částicích byl eluován vhodným elučním roztokem. Získaný eluát byl podroben analýze na hmotnostním spektrometru Autoflex II TOF/TOF, jehož součástí je dusíkový laser (337 nm) a FlexControl software. MALDI-TOF spektra byla naměřena v pozitivním módu. Přístroj byl před analýzou vzorků kalibrován pomocí standardu „Peptide Calibration Standard“, který obsahoval angiotensin II, angiotensin I, substanci P, bombesin, ACTH - adenokortikotropní hormon (1-17), ACTH (18-39) a somatostatin 28. Na ocelový terčik bylo napipetováno

0,5 µl získaného eluátu, po zaschnutí na vzduchu byl vzorek převrstven 0,5 µl roztoku matrice CCA (3 mg kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicové/ 1 ml 2% trifluoroctové kyseliny obsahující 50% acetonitril). Po zaschnutí na vzduchu byl terčik se vzorkem podroben MS analýze na hmotnostním spektrometru. Ze spekter naměřených v pozitivním módu byly k identifikaci hepcidinu použity programy FlexAnalysis a BioTools (Bruker Daltonics, Germany).

3.3.3 Optimalizace podmínek adsorpce hepcidinu na komerčně dostupných magnetických částicích

1) magnetické částice: fluidMAG-CMX, SiMAG-Carboxyl, SiMAG-Silanol, MB-WCX, Magnetic Carboxymethyl 6% Agarose Beads

množství magnetických částic: 10 µl

promytí:

- a) 3krát 100 µl 0,5% kyseliny octové pH 3,0
- b) 3krát 100 µl 25 mM acetátu amonného pH 6,8

vzorek:

- a) 0,1 µg hepcidinu/ml 0,5% kyseliny octové pH 3,0
- b) 0,1 µg hepcidinu/ml 25 mM acetátu amonného pH 6,8

promytí:

- a) 1krát 100 µl 0,5% kyselinou octovou pH 3,0; 3krát 100 µl destilované vody
- b) 1krát 100 µl 25 mM acetátu amonného pH 6,8; 3krát 100 µl destilované vody

eluce: 5 µl 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA

2) magnetické částice: MB-WCX

množství magnetických částic: 10 µl

promytí:

- a) 3krát 100 µl 200 mM fosfátového pufru pH 7,2
- b) 3krát 100 µl 100 mM uhličitanu sodného pH 10,1

vzorek:

- a) 0,1 µg hepcidinu/ml 200 mM fosfátového pufru pH 7,2

b) 0,1 µg hepcidinu/ml 100 mM uhličitanu sodného pH 10,1

promytí:

a) 1krát 100 µl 200 mM fosfátového pufru pH 7,2; 3krát 100 µl destilované vody

b) 1krát 100 µl 100 mM uhličitanu sodného pH 10,1; 3krát 100 µl destilované vody

eluze: 5 µl 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA

3.3.4 Optimalizace podmínek adsorpce hepcidinu na polymetakrylátové magnetické částice obsahující imobilizované kovové ionty

3.3.4.1 Vliv pH

magnetické částice: P(HEMA-co-GMA)-IDA s imobilizovanými měďnatými, kobaltnatými, zinečnatými a železitými ionty

množství magnetických částic: 10 µl

promytí:

a) 3krát 100 µl 0,5% kyselinou octovou pH 3,0

b) 3krát 100 µl 25 mM acetátu amonného pH 6,8

c) 3krát 100 µl 100 mM Tris-HCl pH 8,0

d) 3krát 100 µl 5 mM hydroxidem amonným pH 10,0

vzorek:

a) 1 µg hepcidinu/ml 0,5% kyseliny octové pH 3,0

b) 1 µg hepcidinu/ml 25 mM acetátu amonného pH 6,8

c) 1 µg hepcidinu/ml 100 mM Tris-HCl pH 8,0

d) 1 µg hepcidinu/ml 5mM hydroxidu amonného pH 10,0

promytí:

a) 1krát 100 µl 0,5% kyselinou octovou pH 3,0; 3krát 100 µl destilované vody

b) 1krát 100 µl 25 mM acetátu amonného pH 6,8; 3krát 100 µl destilované vody

c) 1krát 100 µl 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 3krát 100 µl destilované vody

d) 1krát 100 µl 5 mM hydroxidem amonným pH 10,0; 3krát 100 µl destilované vody

eluze: 5 µl 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA

3.3.4.2 Vliv iontové síly

magnetické částice: P(HEMA-co-GMA)-IDA s imobilizovanými měďnatými, kobaltnatými, zinečnatými a železitými ionty

množství magnetických částic: 10 μ l

promytí:

- a) 3krát 100 μ l 0,5% kyselinou octovou pH 3,0 s přídavkem 1 M NaCl
- b) 3krát 100 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8 s přídavkem 1 M NaCl

vzorek:

- a) 1 μ g hepcidinu/ml 0,5% kyseliny octové pH 3,0 s přídavkem 1 M NaCl
- b) 1 μ g hepcidinu/ml 25 mM acetátu amonného pH 6,8 s přídavkem 1 M NaCl

promytí:

- a) 1krát 100 μ l 0,5% kyselinou octovou pH 3,0 s přídavkem 1 M NaCl; 3krát 100 μ l destilované vody
- b) 1krát 100 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8 s přídavkem 1 M NaCl; 3krát 100 μ l destilované vody

eluce: 5 μ l 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA

3.3.5 Adsorpce hepcidinu na jednotlivých komponentách hydrofilních metakrylátových magnetických částic

magnetické částice: P(HEMA-co-GMA)-IDA, P(HEMA), P(HEMA-co-GMA), P(GMA)

množství magnetických částic: 10 μ l

promytí:

- a) 3krát 100 μ l 0,5% kyselinou octovou pH 3,0
- b) 3krát 100 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8

vzorek:

- a) 0,1 μ g hepcidinu/ml 0,5% kyselinou octovou pH 3,0
- b) 0,1 μ g hepcidinu/ml 25 mM acetátu amonného pH 6,8

promytí:

- a) 1krát 100 μ l 0,5% kyselinou octovou pH 3,0; 3krát 100 μ l destilované vody
- b) 1krát 100 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8; 3krát 100 μ l destilované vody

eluce: 5 μ l 50% acetonitrilu v 0,1% TFA

3.3.5.1 Vliv iontové síly

magnetické částice: P(HEMA-co-GMA)-IDA, P(HEMA), P(HEMA-co-GMA), P(GMA),

množství magnetických částic: 10 μ l

promytí:

- a) 3krát 100 μ l 0,5% kyselinou octovou pH 3,0 s přidavkem 1 M NaCl
- b) 3krát 100 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8 s přidavkem 1 M NaCl

vzorek:

- a) 1 μ g hepcidinu/ml 0,5% kyseliny octové pH 3,0 s přidavkem 1 M NaCl
- b) 1 μ g hepcidinu/ml 25 mM acetátu amonného pH 6,8 s přidavkem 1 M NaCl

promytí:

- a) 1krát 100 μ l 0,5% kyselinou octovou pH 3,0 s přidavkem 1 M NaCl, 3krát 100 μ l destilované vody
- b) 1krát 100 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8 s přidavkem 1 M NaCl, 3krát 100 μ l destilované vody

eluce: 5 μ l 50% acetonitrilu v 0,1% TFA

3.3.5.2 Vliv přidavku činidel

magnetické částice: P(HEMA-co-GMA)-IDA, P(HEMA), P(HEMA-co-GMA), P(GMA)

množství magnetických částic: 10 μ l

promytí:

- a) 3krát 100 μ l 0,5% kyselinou octovou pH 3,0 v 50% dimethylsulfoxidu
- b) 3krát 100 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8 v 50% dimethylsulfoxidu

vzorek:

- a) 1 μ g hepcidinu/ml 0,5% kyseliny octové pH 3,0 v 50% dimethylsulfoxidu

b) 1 µg hepcidinu/ml 25 mM acetátu amonného pH 6,8 v 50% dimethylsulfoxidu
promytí:

a) 1krát 100 µl 0,5% kyselinou octovou pH 3,0 v 50% dimethylsulfoxidu; 3krát
100 µl destilované vody

b) 1krát 100 µl 25 mM acetátu amonného pH 6,8 v 50% dimethylsulfoxidu; 3krát
100 µl destilované vody

eluce: 5 µl 50% acetonitrilu v 0,1% TFA

magnetické částice: P(HEMA-co-GMA)-IDA, P(HEMA), P(HEMA-co-GMA),
P(GMA)

množství magnetických částic: 10 µl

promytí:

a) 3krát 100 µl 0,5% kyselinou octovou pH 3,0 v 50% dioxanu

b) 3krát 100 µl 25 mM acetátu amonného pH 6,8 v 50% dioxanu

vzorek:

a) 1 µg hepcidinu/ml 0,5% kyseliny octové pH 3,0 v 50% dioxanu

b) 1 µg hepcidinu/ml 25 mM acetátu amonného pH 6,8 v 50% dioxanu

promytí:

a) 1krát 100 µl 0,5% kyselinou octovou pH 3,0 v 50% dioxanu; 3krát 100 µl
destilované vody

b) 1krát 100 µl 25 mM acetátu amonného pH 6,8 v 50% dioxanu; 3krát 100 µl
destilované vody

eluce: 5 µl 50% acetonitrilu v 0,1% TFA

3.3.6 Separace hepcidinu ze lidské moči při použití různých magnetických částic s následnou detekcí MALDI-TOF MS

1) magnetické částice: fluidMAG-CMX, SiMAG-Carboxyl, P(HEMA-co-GMA)-
IDA, MB-WCX, P(HEMA-co-GMA)-IDA s imobilizovanými měďnatými ioty

množství magnetických částic: 10 μ l

promytí: 3krát 100 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8

vzorek: 20 μ l vzorku moči + 80 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8

promytí: 1krát 100 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8; 3krát 100 μ l destilované vody

eluze: 5 μ l 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA

2) magnetické částice: P(HEMA-co-GMA)

množství magnetických částic: 10 μ l

promytí:

a) 3krát 100 μ l 0,5% kyselinou octovou pH 3,0

b) 3krát 100 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8

vzorek:

a) 20 μ l vzorku moči + 80 μ l 0,5% kyseliny octové pH 3,0

b) 20 μ l vzorku moči + 80 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8

promytí:

a) 1krát 100 μ l 0,5% kyselinou octovou pH 3,0; 3krát 100 μ l destilované vody

b) 1krát 100 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8; 3krát 100 μ l destilované vody

eluze: 5 μ l 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA

3) magnetické částice: P(HEMA-co-GMA)-IDA s imobilizovanými měďnatými ioty

množství magnetických částic: 10 μ l

promytí: 3krát 100 μ l 0,5% kyselinou octovou pH 3,0

vzorek: 20 μ l vzorku moči + 80 μ l 0,5% kyseliny octové pH 3,0

promytí: 1krát 100 μ l 0,5% kyselinou octovou pH 3,0; 3krát 100 μ l destilované vody

eluze: 5 μ l 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA

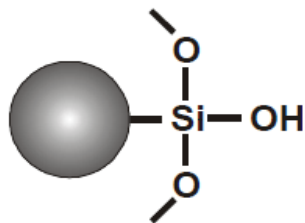
4 Výsledky a diskuze

V diplomové práci jsme se zabývali porovnáváním sorbentů, které je možno použít pro separaci hepcidinu ze složitějších směsí na různých druzích magnetických částic, a zkoumáním vhodných adsorpčních a elučních podmínek, při kterých bude možno hepcidin ve vzorku detegovat pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF. K hledání nejvhodnějšího postupu pro oddělení peptidu jsme v první fázi použili standard hepcidinu. Zvolili jsme magnetické částice a to komerční fluidMAG-CMX, SiMAG-Carboxyl, SiMAG-Silanol (všechny Chemicell), Magnetic Carboxymethyl 6% Agarose Beads (BioScience Bead Division of CSS), MB WCX (Bruker-Daltonics), a také metakrylátové magnetické částice připravené na ÚMCH AV ČR. Nalezené podmínky pro adsorpci standardu hepcidinu na různých magnetických částicích, pak byly použity pro adsorpci hepcidinu z kontrolního vzorku lidské moče.

4.1 Separace hepcidinu

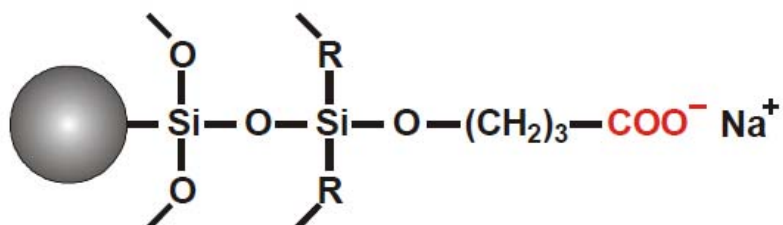
4.1.1 Komerčně dostupné magnetické částice použité pro adsorpci hepcidinu

U magnetických částic SiMAG-Silanol (obr. 4.3) udává výrobce tyto parametry: magnetické částice jsou vhodné na čištění DNA/RNA a adsorpci biomolekul, magnetické jádro je tvořeno maghemitem, matrice je křemenná neporézní, obsahující funkční skupinu -Si-OH a průměr magnetických částic je 1,0 μm .



Obr.4.3 Magnetické částice SiMAG-Silanol

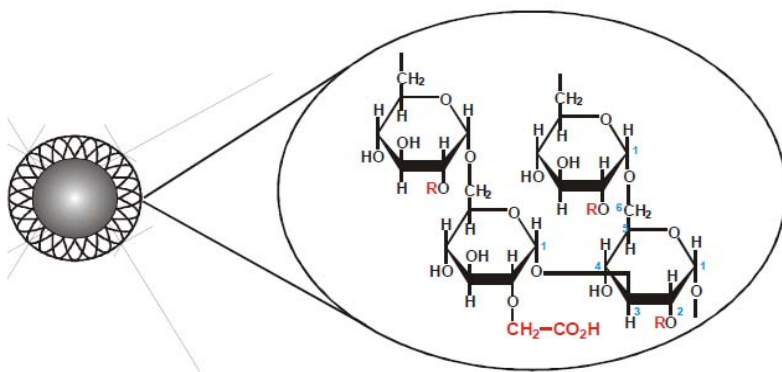
Magnetické částice SIMAG-Carboxyl (obr. 4.4), které jsou používány jako slabý katex, mají uvedeny stejné parametry jako předešlé částice, liší se pouze funkční skupinou $-\text{COO}^-$.



Obr. 4.4 Magnetické částice SIMAG-Carboxyl

Magnetické nanočástice fluidMAG-CMX, které obsahují funkční skupinu $-\text{COO}^-$ a které jsou používány jako slabý katex, jsou na obr. 4.5.

Jejich magnetické jádro je tvořeno magnetitem a je pokryto karboxymethyl-dextranem. Průměr magnetických částic je 200 nm.



Obr. 4.5 Magnetické nanočástice fluidMAG-CMX

MC WCX (Magnetic Beads based Weak Cation Exchange Chromatography) částice obsahují podle informací výrobce (Bruker-Daltonics) super paramagnetické mikročástice s negativně nabitými funkčními skupinami.

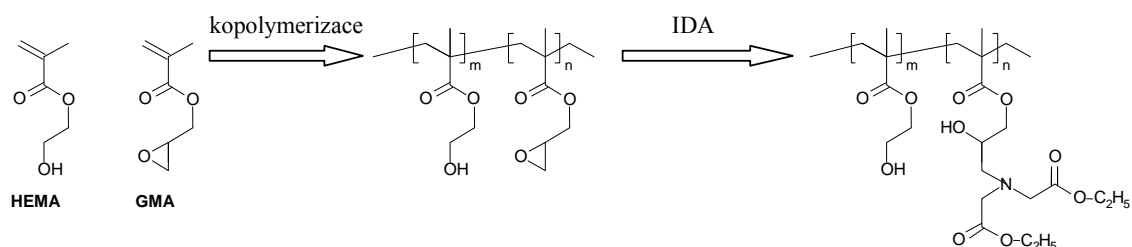
V tab. 4.1 jsou uvedeny všechny komerční magnetické částice a jejich funkční skupiny, které byly v této práci používány. U těchto magnetických částic byl zjišťován vliv pH na adsorpci standardu hepcidinu.

Tab.4.1 Komerční magnetické částice a jejich funkční skupiny

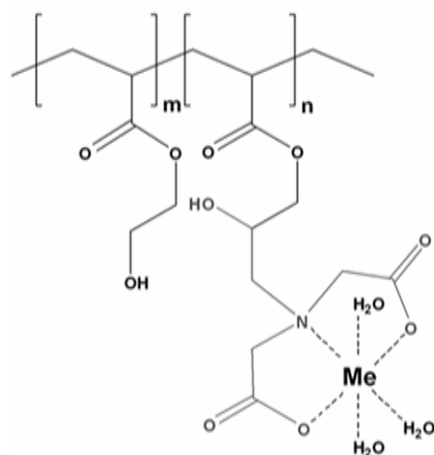
Magnetické částice	Funkční skupina
FluidMAG-CMX	-COOH
MB WCX	-COOH
SiMAG-Carboxyl	-COOH
SiMAG-Silanol	-Si-OH
Carboxymethyl 6% Agarose Beads	-COOH

4.1.2 Hydrofilní magnetické částice P(HEMA-co-GMA) s navázanou iminodioctovou kyselinou

Promytím magnetických částic P(HEMA-co-GMA) s navázanou iminodioctovou kyselinou (IDA) roztoky solí dvojmocných kovových iontů byly připraveny magnetické sorbenty s imobilizovanými měďnatými, kobaltnatými, zinečnatými a železitými ionty.



Obr. 4.1 Schéma přípravy magnetických částic P(HEMA-co-GMA)



Obr. 4.2 Struktura magnetických částic P(HEMA-co-GMA)-IDA s imobilizovaným kovem

4.2 Podmínky separace hepcidinu

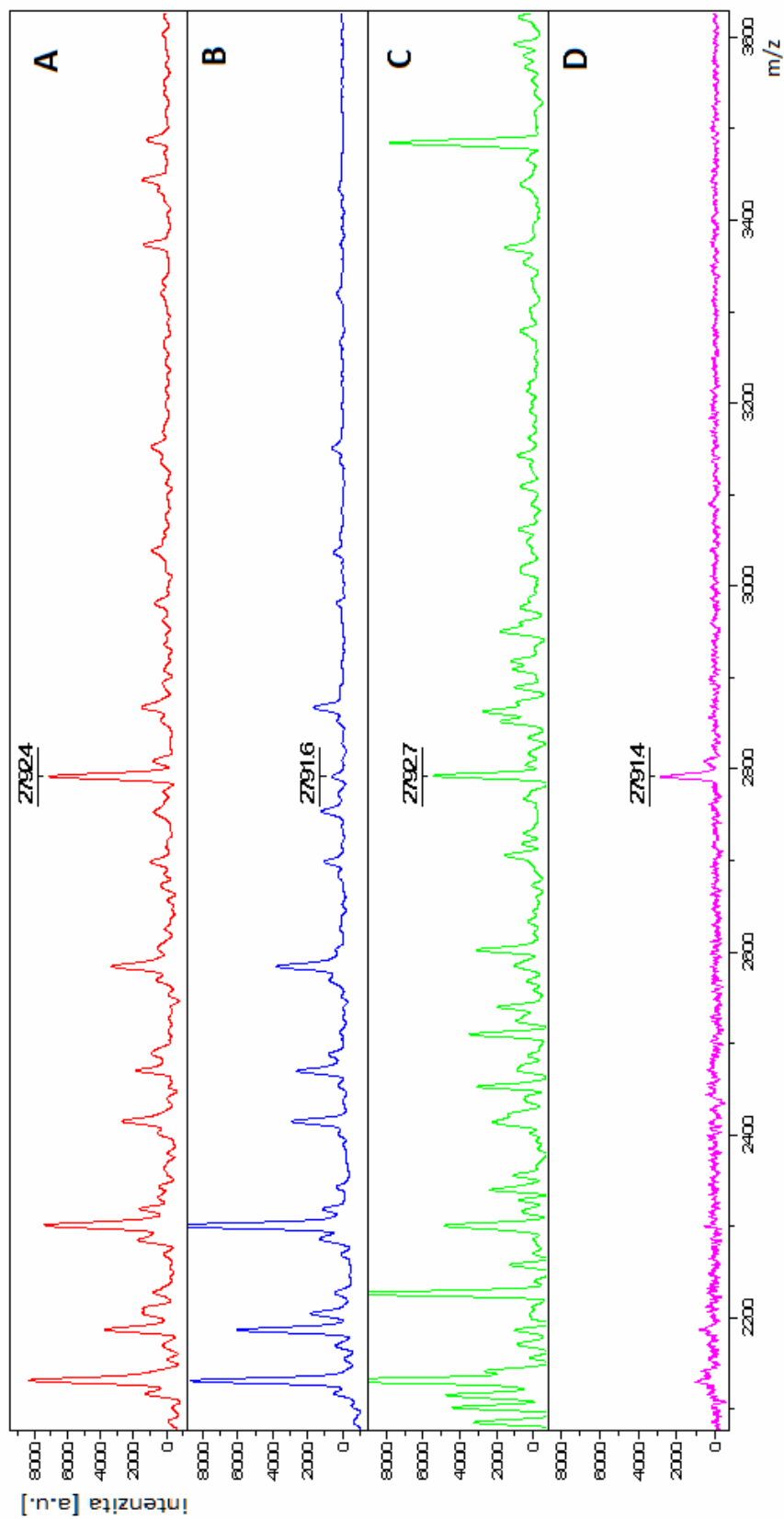
Selektivita adsorpce hepcidinu na magnetickém sorbentu při separaci peptidu z biologického vzorku, která předchází MS analýze, závisí na řadě faktorů:

- na složení matrice (např. SiO₂, agarosa, syntetické polymery), která pokrývá magnetické jádro
- na modifikující skupině navázené na sorbent (např. -COOH, -OH, IDA, IDA s imobilizovanými ionty kovů)
- na adsorpčních podmínkách
- na elučních podmínkách
- při kvantifikaci hepcidinu na použitém standardu

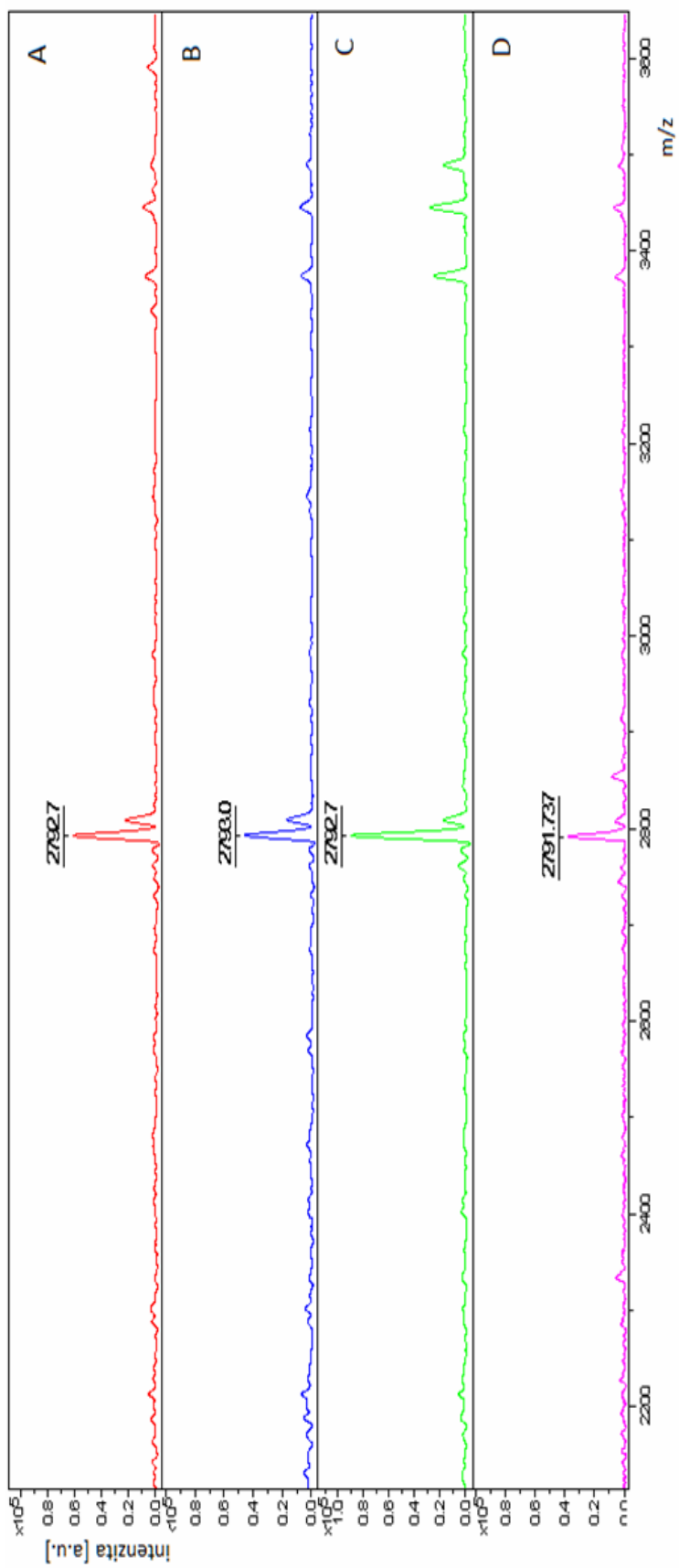
4.2.1 Optimalizace podmínek adsorpce hepcidinu na komerčně dostupných magnetických částicích

Spektra získaná analýzou eluátu z frakce adsorbované na komerční magnetické částice na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF jsou znázorněna na obr.4.6 a

obr.4.7. Z porovnání těchto spekter je patrné, že v kyselém pH nedochází téměř k žádné adsorpci hepcidinu na magnetické částice fluidMAG-CMX, MB WCX, SiMAG-Carboxyl, SiMAG-Silanol, zatímco při pH 6,8 jsou ve spektru viditelné intenzivní píky odpovídající hepcidinu. Výjimku tvořily magnetické částice Magnetic Carboxymethyl 6% Agarose Beads, u nichž nedošlo k adsorpci hepcidinu ani v jednom použitém pH. U komerčních částic MB WCX byly navíc provedeny analýzy eluátů získaných po adsorpci při pH 7,2 (200 mM fosfátový pufr) a pH 10,1 (100 mM uhličitan sodný). Při obou pH bylo možno hepcidin v naměřených spektrech detegovat, tyto komerční magnetické částice jsou tedy vhodné pro detekci hepcidinu v neutrálním a zásaditém pH.



Obr. 4.6 Spektrum MALDI-TOF MS analýzy hepcidinu adsorbovaného na různé magnetické částice při pH 3,0
 Experimentální podmínky: vzorek - 20 μ l standardu hepcidinu (koncentrace 100 ng /ml 0,5% kyseliny octové pH 3,0); adsorpční roztok: 80 μ l 0,5% kyseliny octové pH 3,0; magnetické částice: A - fluidMAG-CMX; B - MB-WCX; C - SiMAG-Carboxyl; D - SiMAG-Silanol, eluce: 5 μ l 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA

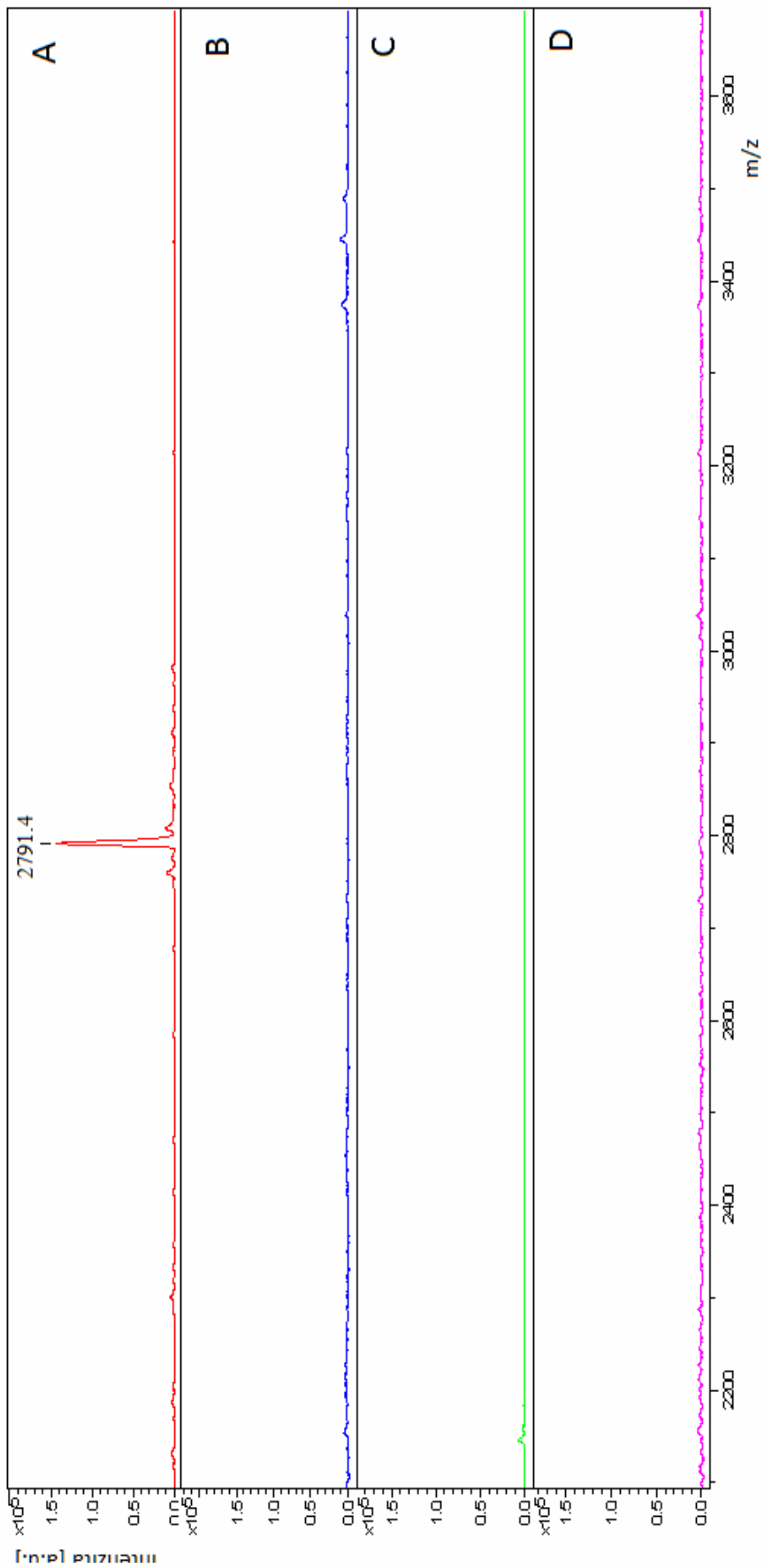


Obr. 4.7 MALDI-TOF MS analýza hepcidinu adsorbovaného na různé magnetické částice při pH 6,8
 Experimentální podmínky: vzorek - 20 μ l standardu hepcidinu (koncentrace 0,1 μ g/ml 25 mM acetátu amonného pH 6,8); adsorpční roztok: 80 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8; magnetické částice: A - fluidMAG-CMX; B - MB-WCX; C - SiMAG-Carboxyl; D - SiMAG-Silanol, eluce: 5 μ l 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA

4.2.2 Optimalizace podmínek adsorpce hepcidinu na polymetakrylátové magnetické částice obsahující imobilizované kovové ionty

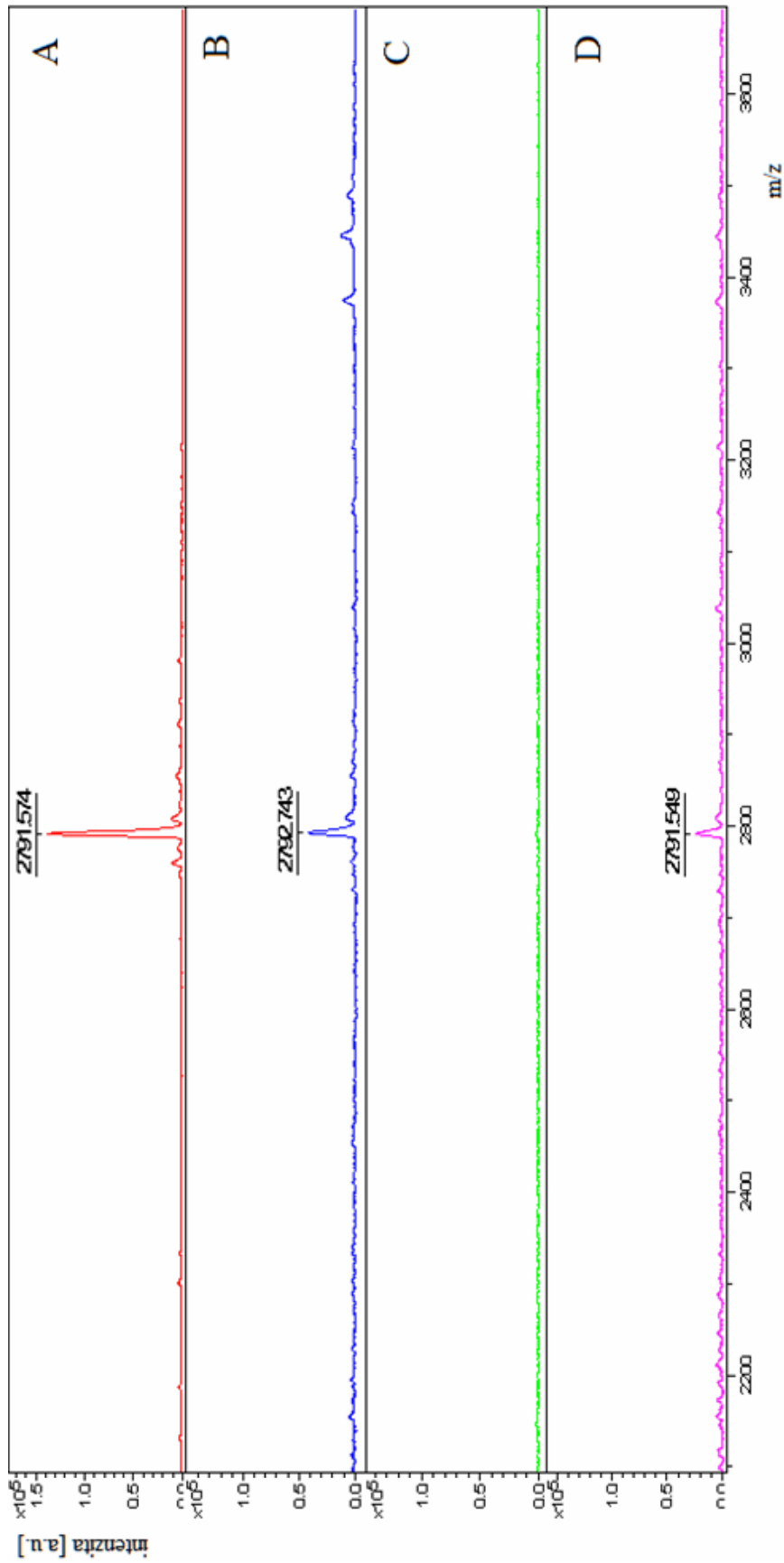
U magnetických částic P(HEMA-co-GMA)-IDA s imobilizovanými měďnatými, kobaltnatými, zinečnatými a železitými ionty byl zkoumán vliv pH a iontové síly na adsorpci hepcidinu. Na obrázku 4.8 jsou znázorněna spektra MALDI-TOF MS analýzy eluátu hepcidinu adsorbovaného na magnetické částice P(HEMA-co-GMA)-IDA+Co²⁺ při různém pH. Jako adsorpční roztoky byly použity 0,5% kyselina octová pH 3,0; 25 mM acetát amonný pH 6,8; 100 mM Tris-HCl pH 8,0 a 5 mM hydroxid amonný pH 10,0. Ze spekter je patrné, že hepcidin se adsorboval na magnetické částice s imobilizovanými kobaltnatými ionty pouze v kyselém pH. Stejně výsledky jsme získali i u magnetických částic s imobilizovanými železitými a zinečnatými ionty. Výjimku tvořily P(HEMA-co-GMA)-IDA+Cu²⁺ (obr.4.9), u nichž bylo možné hepcidin ve spektru eluátu detegovat po adsorpci při pH 3, pH 6,8 i pH 10.

Byl zjišťován také vliv iontové síly (0,5% kyselina octová obsahující 1 M NaCl nebo 25 mM acetát amonný pH 6,8 obsahující 1 M NaCl) na adsorpci hepcidinu. Zvýšení iontové síly adsorpčního roztoku vede k potlačení elektrostatických interakcí proteinů s IMAC sorbenty. Důsledkem by pak mělo být snížení adsorpce proteinů, které interagují s IMAC sorbenty prostřednictvím elektrostatických interakcí. U magnetických částic s imobilizovanými kovy přítomnost 1 M NaCl neovlivnila adsorpci hepcidinu, adsorpce tedy pravděpodobně není založena na elektrostatických interakcích.



Obr. 4.8 MALDI-TOF MS analýza hepcidinu adsorbovaného na magnetické částice P-HEMA-*co*-GMA-IDA+Co²⁺ při různých pH.

Experimentální podmínky: vzorek - 20 μ l standardu hepcidinu (koncentrace 1 μ g/ml adsorpčního roztoku; adsorpční roztok: A - 80 μ l 0,5% kyseliny octové pH 3,0; B - 80 μ l 25 mM acétátu amonného pH 6,8; C - 80 μ l 100 mM Tris-HCl pH 8,0; D - 80 μ l 5 mM hydroxidu amonného pH 10,0; eluce: 5 μ l 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA



Obr. 4.9 MALDI-TOF MS analýza hepcidinu adsorbovaného na magnetické částice P-HEMA-co-GMA-IDA+Cu²⁺ při různých pH
 Experimentální podmínky: vzorek - 20 μ l standardu hepcidinu (koncentrace 1 μ g/ml adsorpčního roztoku; adsorpční roztok: A - 80 μ l 0,5% kyseliny octové pH 3,0; B - 80 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8; C - 80 μ l 100 mM Tris-HCl pH 8,0; D - 80 μ l 5 mM hydroxidu amonného pH 10,0; eluce: 5 μ l 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA

4.2.3 Adsorpce hepcidinu na jednotlivých komponentách hydrofilních metakrylátových magnetických částic

Byla testována schopnost, hepcidinu adsorbovat se na jednotlivé komponenty metakrylátových magnetických částic připravených Dr. Horákem na ÚMCH AV ČR (tab.4.2).

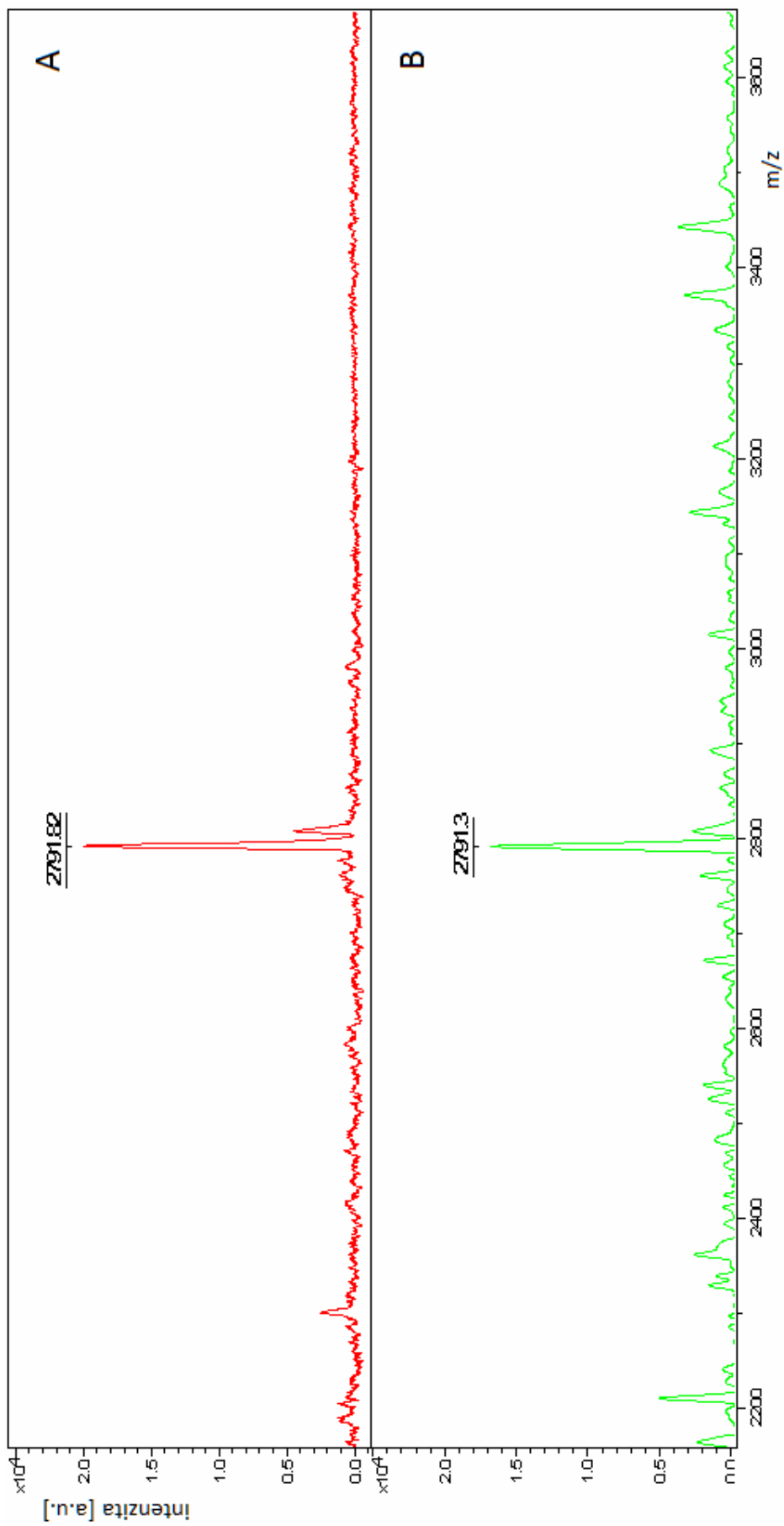
Tab 4.2 Metakrylátové magnetické částice obsahující polymerní matrice vytvořené z jednotlivých složek kopolymeru a jejich funkční skupiny

Magnetické částice	Funkční skupina
P(HEMA-co-GMA) ^a	hydroxylová + epoxy
P(HEMA) ^b	hydroxylová
P(GMA) ^c	epoxy

^a poly(2-hydroxyethyl methakrylát-co-glycidyl methakrylát), ^b poly(2-hydroxyethyl methakrylát),
^c poly(glycidyl methakrylát)

Byl sledován vliv samotné gelové matrice a jejích složek na adsorpci hepcidinu. Bylo zjištěno, že hepcidin byl adsorbován při pH 3 a pH 6,8 na magnetické částice obsahující kopolymer P(HEMA-co-GMA) a polymer P(GMA). Magnetické částice v obou případech obsahovaly aktivní epoxy skupiny. Na obrázku 4.10 jsou znázorněna MALDI-TOF MS spektra získaná analýzou eluátu hepcidinu adsorbovaného na magnetické částice P(HEMA-co-GMA) při různém pH, byly použity 0,5% kyselina octová pH 3,0 a 25 mM acetát amonný pH 6,8. V obou spektrech je možno vidět intenzivní pík m/z 2791 odpovídající hepcidinu. Avšak při použití magnetických částic obsahujících P(HEMA), která epoxy skupiny neobsahuje, nebyl hepcidin ve spektrech eluátů detegován ani v případě adsorpce při pH 3.0 ani 6.8. Při použití částic s navázanou iminodioctovou kyselinou (IDA) bez imobilizovaného kovového iontu byl hepcidin detegován v eluátech pouze po adsorpci v kyselém prostředí.

U magnetických částic P(GMA), P(HEMA-co-GMA) byl hepcidin detegován ve spektrech eluátů po adsorpci při obou pH nezávisle na přítomnosti 1 M NaCl.



Obr. 4.10 MALDI-TOF MS analýza hepcidinu na adsorbovaného na magnetické částice P-HEMA-co-GMA při různém pH

Experimentální podmínky: vzorek - 20 μ l standardu hepcidinu (koncentrace 0,1 μ g/ml adsorpčního roztoku; adsorpční roztok: A - 80 μ l 0,5% kyseliny octové pH 3,0; B - 80 μ l 25 mM acétátu amonného pH 6,8; eluce: 5 μ l 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA

Obdobné výsledky byly získány i při použití magnetických částic P(HEMA-co-GMA-IDA), u kterých přidávkem soli nedošlo k ovlivnění adsorpce, hepcidin byl ve spektrech eluátů detegován ovšem pouze po adsorpci v kyselém pH.

Přítomnost 50% dimethylsulfoxidu a 50% dioxanu v roztocích používaných pro adsorpci hepcidinu (0, 5% kyselina octová pH 3,0 a 25 mM acetát amonný pH 6,8) adsorpci peptidu neovlivnila.

4.2.4 Shrnutí

V této části práce jsme porovnávali různé druhy magnetických částic, které by bylo možné použít pro separaci standardu hepcidinu a zjišťovali jsme vhodné adsorpční podmínky, při kterých je možné hepcidin ve vzorku detegovat pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF.

Byla provedena optimalizace podmínek adsorpce standardu hepcidinu na komerčně dostupné magnetické částice. Bylo zjištěno, že magnetické částice fluidMAG-CMX, SiMAG-Carboxyl, SiMAG-Silanol jsou vhodné pro adsorpci hepcidinu při pH 6,8. K adsorpci standardu hepcidinu nedocházelo u magnetických částic Magnetic Carboxymethyl 6% Agarose Beads. MB WCX jsou vhodné pro adsorpci hepcidinu v neutrálním a zásaditém pH.

Dále byl zkoumán vliv pH a iontové síly na adsorpci hepcidinu u polymetakrylátových magnetických částic s imobilizovanými kovovými ionty připravených Dr. Horákem na ÚMCH AV ČR. Hecpidin se adsorboval na magnetické částice s imobilizovanými kobaltnatými, zinečnatými a železitými ionty pouze v kyselém pH. K adsorpci hepcidinu v kyselém, neutrálním i zásaditém pH došlo u magnetických částic P(HEMA-co-GMA)-IDA s imobilizovanými měďnatými ionty. U všech těchto magnetických částic přítomnost 1 M NaCl adsorpci hepcidinu neovlivnila.

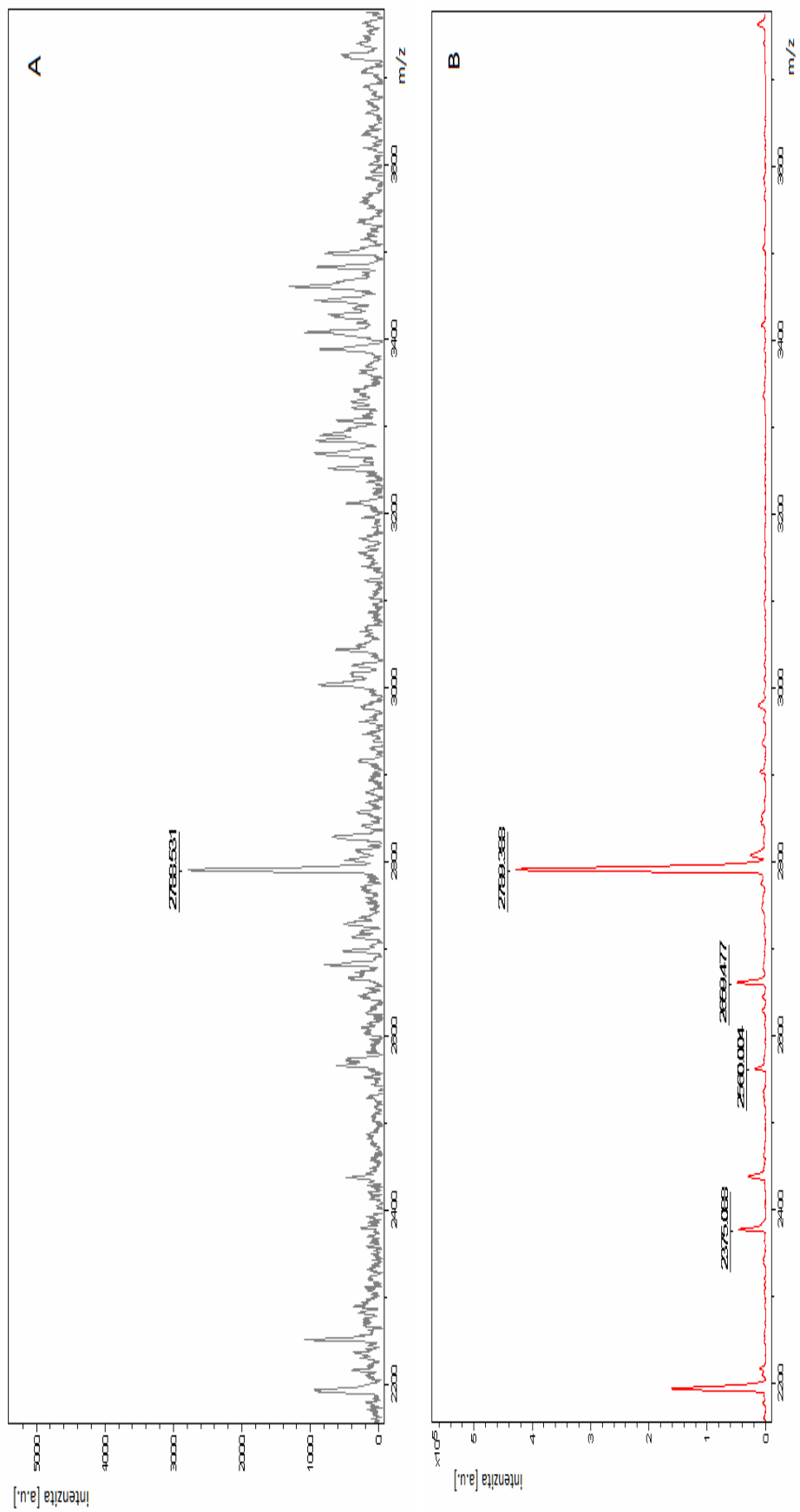
Byl sledován vliv složení matrice na adsorpci hepcidinu. K adsorpci hepcidinu došlo jak u pH 3 tak pH 6,8 u P(HEMA-co-GMA) a P(GMA), naopak k adsorpci hepcidinu nedošlo při použití magnetických částic obsahujících P(HEMA). Použití částic s navázanou iminodioctovou kyselinou (IDA) pro adsorpci hepcidinu je možné pouze v kyselém prostředí. U žádných jednéch magnetických částic není adsorpce hepcidinu ovlivněna přítomností 50% dimethylsulfoxidu, 50% dioxanu a 1 M NaCl v roztocích používaných pro adsorpci hepcidinu.

4.3 Separace hepcidinu ze lidské moči při použití různých magnetických částic s následnou detekcí MALDI-TOF MS

Separace proteinů nebo peptidů z biologických vzorků představuje velmi důležitý krok jejich úspěšné analýzy. Pro stanovení hepcidinu v biologických vzorcích je nutné provést přečištění vzorku, je nutné oddělení hepcidinu od ostatních složek, které se ve vzorku nacházející. Ve spojení s hmotnostní analýzou představuje separace na magnetických sorbentech velmi citlivou a rychlou metodu. Pro separaci hepcidinu z biologického vzorku jsme zvolili modifikované magnetické částice jako sorbent, který je díky svému velkému specifickému povrchu vhodný pro adsorpci peptidů.

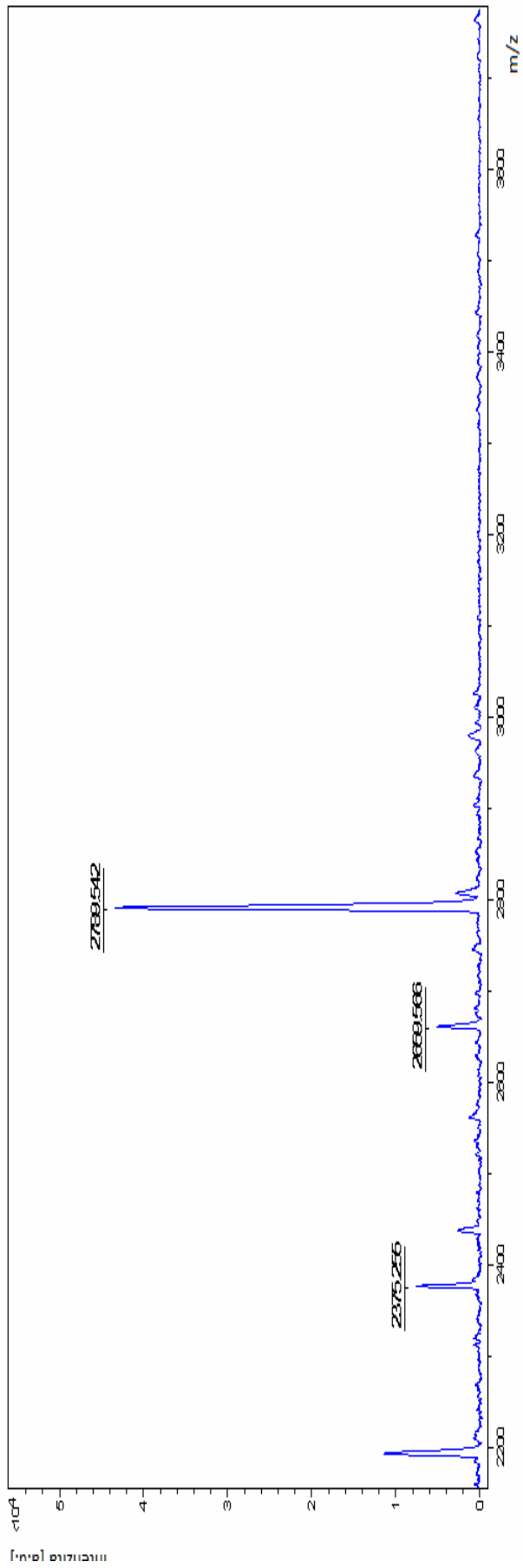
Přestože má hepcidin významnou funkci v regulaci metabolismu železa, zatím nebyla popsána žádná spolehlivá analytická metoda k jeho rutinnímu stanovení v séru a moči. Jsou používány jednak imunochemické metody (jako např. ELISA) a jednak metody založené na hmotnostní spektrometrii (SELDI-TOF MS, LC-MS/MS, MALDI-TOF MS).⁴⁵

V první části práce jsme se standardem hepcidinu vyzkoušeli podmínky separace hepcidinu na různých druzích magnetických částic lišících se ligandem, inertní maticí a svými funkčními skupinami. Byla sledována adsorpce standardu hepcidinu na různé ligandy navázané na magnetické částice a byl zjišťován vliv dalších složek magnetického sorbentu na adsorpci studovaného peptidu. Optimalizované podmínky pro adsorpci standardu hepcidinu na magnetických částicích různého typu byly použity při analýze kontrolního vzorku moči zdravého jedince. MALDI-TOF MS spektrum eluátu z frakce adsorbované na magnetické částice MB WCX z moči je zobrazeno na obr.4.11 B. Na obr.4.11 A je k porovnání zobrazeno spektrum kontrolního vzorku moči bez předcházející separace na magnetických částicích. Z naměřených spekter je patrné, že pro detekci hepcidinu v biologickém materiálu je velmi důležité přečištění vzorku na magnetických částicích před samotnou analýzou na hmotnostním spektrometru.



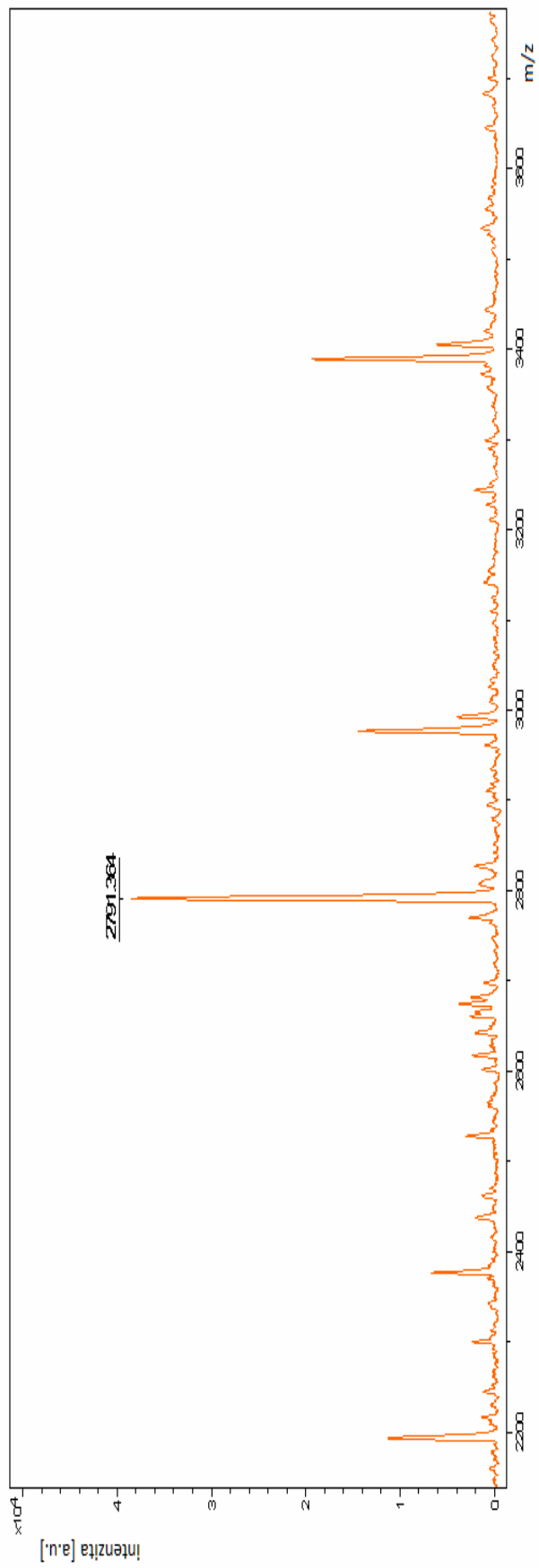
Obr. 4.11 MALDI-TOF MS analýza kontrolního vzorku lidské moči

Experimentální podmínky: A - 20 μ l kontrolního vzorku lidské moči bez separace na magnetických částicích, B - 20 μ l kontrolního vzorku lidské moči bez separace na magnetické částice MB WCX, adsorpční roztok: 80 μ l 25 mM acétátu amonného pH 6,8; eluce: 5 μ l 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA



אבר. 4.12 MALDI-TOF MS אנלזא קאנטראלניו וזרקו לידסע מויע

אקספערמנטלני פודמניק: 20 μ l קאנטראלניו וזרקו לידסע מויע, מגנטיקע צאסטיע פלידMAG-CMX, אדסורפיע רוזטוק: 80 μ l 25 mM אעטאטו אמאננעו pH 6,8; אלויע: 5 μ l 50% אעטאניטרילו אבסאחנייע 0,1% TFA



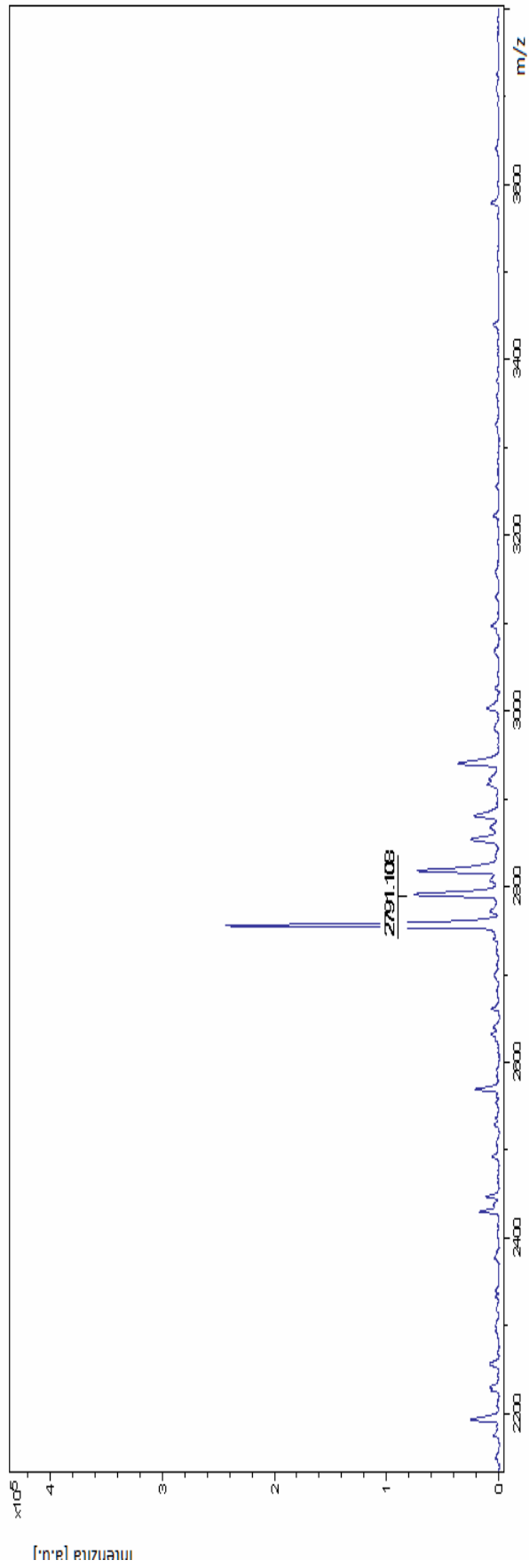
Obr. 4.13 MALDI-TOF MS analýza kontrolního vzorku lidské moči

Experimentální podmínky: 20 μ l kontrolního vzorku lidské moči, magnetické částice SiMAG-Carboxyl, adsorpční roztok: 80 μ l 25 mM acetátu amonného pH 6,8; eluce: 5 μ l 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA

V měřeném kontrolním vzorku lidské moči bylo možné hepcidin detegovat v eluátech po adsorpci při pH 6,8 na magnetických částicích fluidMAG-CMX (obr.4.12) a SiMAG-Carboxyl (obr.4.13).

Na obrázku 4.14 jsou zobrazena MALDI-TOF MS spektra získaná analýzou eluátů z frakcí adsorbovaných na magnetických částicích P(HEMA-*co*-GMA) při různém pH. Hecpidin je adsorbován ze vzorků lidské moče obdobně jako v případě standardu hepcidinu (viz. kapitola 4.2.3).

Spektrum získané analýzou kontrolního vzorku lidské moči na magnetických částicích P(HEMA-*co*-GMA)-IDA s imobilizovanými měďnatými ionty je znázorněno na obr 4.15. Hecpidin bylo možné detegovat v eluátu frakce adsorbované v kyselém prostředí. Ve spektru se vedle píku odpovídající hepcidinu vyskytují i jiné píky, které by mohly detekci hepcidinu ovlivnit.



Obr. 4.15 MALDI-TOF MS analýza kontrolního vzorku lidské moči
 Experimentální podmínky: 20 µl kontrolního vzorku lidské moči, magnetické částice P-HEMA-*co*-GMA-IDA+Cu²⁺
 adsorpční roztok: 80 µl 0,5% kyseliny octové pH 3,0; eluce: 5 µl 50% acetonitrilu obsahující 0,1% TFA

V této části práce byly optimalizované podmínky pro adsorpci standardu hepcidinu na magnetických částicích různého typu použity při analýze kontrolního vzorku moči zdravého jedince. V měřeném kontrolním vzorku lidské moči bylo možné hepcidin detegovat v eluátech po adsorpci při pH 6,8 na magnetických částicích fluidMAG-CMX, MB WCX, SiMAG-Carboxyl a P(HEMA-co-GMA)-IDA s imobilizovanými Cu(II) ionty. Z vyhodnocení naměřených spekter získaných analýzou kontrolního vzorku lidské moči bez předcházející separace a po separaci na magnetických částicích bylo zjištěno, že pro detekci hepcidinu v biologickém materiálu je velmi důležitá jeho separace před samotnou analýzou na hmotnostním spektrometru

5 Závěr

- Byly porovnávány různé druhy magnetických sorbentů, které jsou použitelné pro separaci standardu hepcidinu a byly zkoumány vhodné adsorpční podmínky, při kterých je možno hepcidin ve vzorku detegovat pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF.
- Byla provedena optimalizace podmínek adsorpce standardu hepcidinu na komerčně dostupné magnetické částice, obsahující různé modifikující skupiny. Bylo zjištěno, že magnetické částice: fluidMAG-CMX, SiMAG-Carboxyl, SiMAG-Silanol, je možné použít pro adsorpci standardu hepcidinu při pH 6,8. Magnetické částice Magnetic Carboxymethyl 6% Agarose Beads jsou pro adsorpci hepcidinu nevyhovující a MB WCX jsou použitelné pouze v neutrálním a zásaditém pH.
- U polymetakrylátových magnetických částic s imobilizovanými kovovými ionty připravených Dr. Horákem na ÚMCH AV ČR byla provedena optimalizace podmínek adsorpce standardu hepcidinu. Magnetické částice P(HEMA-co-GMA)-IDA s imobilizovanými měďnatými ionty jsou pro adsorpci hepcidinu použitelné v kyselém, neutrálním i zásaditém pH. Magnetické částice s imobilizovanými kobaltnatými, zinečnatými a železitými ionty jsou vhodné pro adsorpci hepcidinu v kyselém pH. Bylo zjištěno, že iontová síla nemá na adsorpci hepcidinu na magnetické částice s imobilizovanými kovovými ionty žádný vliv.
- Byla sledována adsorpce standardu hepcidinu na jednotlivé komponenty metakrylátových magnetických částic připravených Dr. Horákem na ÚMCH AV ČR. Hecpidin byl adsorbován při pH 3 a pH 6,8 na magnetické částice P(HEMA-co-GMA) a P(GMA). Zatímco na magnetické částice obsahující P(HEMA) peptid adsorbován nebyl. Magnetické částice s navázanou iminodioctovou kyselinou (IDA) adsorbovaly hepcidin v kyselém prostředí.

Bylo prokázáno, že přidavek různých činidel v roztocích používaných pro adsorpci hepcidinu nemá na adsorpci žádný vliv.

- Optimalizované podmínky pro adsorpci standardu hepcidinu na různých magnetických částicích byly použity pro analýzu kontrolního vzorku moči zdravého jedince. Z vyhodnocení naměřených spekter získaných analýzou kontrolního vzorku lidské moči bez předcházející separace a po separaci na magnetických částicích bylo zjištěno, že pro detekci hepcidinu v biologickém materiálu je velmi důležitá jeho separace před samotnou analýzou na hmotnostním spektrometru.

6 Seznam použité literatury

1. Ganz T.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 306, 183–198 (2006)
2. Muckenthaler M. U.: *Cell. Metab.* 8, 1–3 (2008)
3. Park C. H., Valore E. V., Waring A. J., Ganz T.: *J. Biol. Chem.* 276, 7806-7810 (2001)
4. Krause A, Neitz S., Mägert H. J., Schulz A., Forssmann W. G., Schulz-Knappe P., Adermann K. Krause A., Neitz S., Magert H. J.: *FEBS Lett.* 480, 147-150 (2000)
5. Kemna E. H. J. M., Tjalsma H., Podust V. N., Swinkels D. W.: *Clin. Chem.* 53, 620-628 (2007)
6. Rivera S., Nemeth E, Gabayan V., Lopez M. A., Farshidi D., Ganz T.: *Blood* 106, 2196-2199 (2005)
7. Nemeth E., Preza G. C., Jung C. L., Kaplan J., Waring A. J., Ganz T.: *Blood* 107, 328-33 (2006)
8. Valore E. V., Ganz H.: *Blood Cells Mol. Dis.* 40, 132–138 (2008)
9. Gagliardo B., Kubat N., Faye A., Jaouen M., Durel B., Deschemin J. C., Canonne-Hergaux F., Sari M. A., Vaulont S.: *J. Hepatol.* 50, 394–401 (2009)
10. Hunter H. N., Fulton D. B., Ganz T., Vogel H. J.: *J. Biol. Chem.* 277, 37597–37603 (2002)
11. Kemna E. H. J. M., Tjalsma H., Willems J. L., Swinkels D. W.: *Haematologica* 93, 90–97 (2008)
12. Swinkels D. W., Janssen M. C. H., Bergmans J., Marx J. J.: *Clin. Chem.* 52, 950–968 (2006)
13. Ganz T.: *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 507, 29–35 (2006)
14. Nemeth E., Tuttle S. M., Powelson J., Vaughn B. M., Donovan A., McVey-Ward D., Ganz T., Kaplan J.: *Science* 306, 2090–2093 (2004)
15. Nemeth E, Ganz T.: *Annu. Rev. Nutr.* 26, 323–342 (2006)
16. Verga Falzacappa M.V., Muckenthaler M.U.: *Gene* 364, 37–44 (2005)
17. Beutler E.: *Annu. Rev. Med.* 57, 331–347 (2006)
18. Fleming R. E., Sly W.S.: *Annu. Rev. Physiol.* 64, 663–680 (2002)

19. Malyszko J., Mysliwiec M.: *Kidney Blood Press. Res.* 30, 15-30 (2007)
20. Nicolas G., Chauvet C., Viatte L., Danan J. L., Bigard X., Devaux I., Beaumont C., Kahn A., Vaulont S.: *J. Clin. Invest.* 110, 1037–1044 (2002)
21. Nemeth E., Valore E.V., Territo M., Schiller G., Lichtenstein A., Ganz T.: *Blood* 101, 2461–2463 (2003)
22. Nemeth E., Rivera S., Gabayan V., Keller C., Taudorf S., Pedersen B. K., Ganz T.: *J. Clin. Invest.* 113, 1271–1276 (2004)
23. Kemna E. H. J. M., Pickkers P., Nemeth E., Hoeven H., Swinkels D.: *Blood* 106, 1864–1866 (2005)
24. Shike H., Lauth X., Westerman M. E., Ostland V. E., Carlberg J. M., Van Olst J. C., Shimizu C., Bulet P., Burns J. C.: *Eur. J. Biochem.* 269, 2232–2237 (2002)
25. Pigeon C., Ilyin G., Courselaud B., Leroyer P., Turlin B., Brissot P., Loréal O.: *J. Biol. Chem.* 276, 7811–7819 (2001)
26. Papanikolaou G., Tzilianos M., Christakis J. I., Bogdanos D., Tsimirika K., MacFarlane J., Goldberg Y. P., Sakellaropoulos N., Ganz T., Nemeth E.: *Blood* 105, 4103–4105 (2005)
27. Pietrangelo A.: *N. Engl. J. Med.* 350, 2383–2397 (2004)
28. Tomosugi N., Kawabata H., Wakatabe R., Higuchi M., Yamaya H., Umehara H., Ishikawa I.: *Blood* 108, 1381–1387 (2006)
29. Altamura S., Kiss J., Blattmann C., Gilles W., Muckenthaler M. U.: *Biochimie* 91, 1335-1338 (2009)
30. Swinkels D. W., Girelli D., Laarakkers C., Kroot J., Campostrini N., Kemna E. H. J. M., Tjalsma H.: *PLoS ONE* 3, e2706 (2008)
31. Kemna E., Tjalsma H., Laarakkers C., Nemeth E., Willems H., Swinkels D.: *Blood* 106, 3268–3270 (2005)
32. Ward D. G., Roberts K., Stonelake P., Goon P., Zampronio C. G., Martin A., Johnson P. J., Iqbal T., Tselepis C.: *Proteome Sci.* 6, 28 (2008)
33. Bansal S. S., Halket J. M., Fusova J., Bomford A., Simpson R. J., Vasavda N., Thie S. L., Hider C. R.: *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 23, 1531–1542 (2009)
34. Kobold U., Dulffer T., Dangl M., Escherich A., Kubbies M., Roddiger R., Wright J. A.: *Clin. Chem.* 54, 1584–1586 (2008)

35. Li H., Rose M. J., Tran L., Zhang J., Miranda L. P., James C. A., Sasu B. J.: *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 59, 171–180 (2009)
36. Bansal S. S., Halket J. M., Bomford A., Simpson R. J., Vasavda N., Thein S. L., Hider R. C.: *Anal. Biochem.* 384, 245–253 (2008)
37. Ganz T., Olbina G., Girelli D., Nemeth E., Westerman M.: *Blood* 112, 4292–4297 (2008)
38. Koliaraki V., Marinou M., Vassilakopoulos T. P., Vavourakis E., Tsochatzis E., Pangalis G. A., Papatheodoridis G., Stamoulakatou A., Swinkels D. W., Papanikolaou G., Mamalaki A.: *PLoS ONE* 4, e4581 (2009)
39. Kulaksiz H., Gehrke S. G., Janetzko A., Rost D., Bruckner T., Kallinowski B., Stremmel W.: *GUT* 53, 735–743 (2004)
40. Amini A., Nilsson E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46, 411-417 (2008)
41. Kroot J. J., Hendriks J. C., Laarakkers C. M., Klaver S. M., Kemna E. H. J. M., Tjalsma H., Swinkels D. W.: *Anal. Biochem.* 389, 124-129 (2009)
42. Anderson S. D., Heeney M. M., Roth U., Menzel Ch., Fleming D. M., Steen H.: *Anal. Chem.* 82, 1551-1555 (2010)
43. Gay C. L. M., Mullaney I., Trinder D., Olynyk K. J., Trengove D. R.: *Anal. Methods* 2, 268 - 274 (2010)
44. Beirão I., Almeida S., Swinkels D., Costa P. M., Moreira L., Fonseca I., Freitas C., Cabrita A., Porto G.: *Blood Cells Mol. Dis.* 41, 175-178 (2008)
45. Busbridge M., Griffiths C., Ashby D., Gale D., Jayantha A., Sanwaiya A., Chapman R. S.: *Br. J. Biomed. Sci.* 66, 150-157 (2009)
46. Šafařík I., Šafaříková M.: *Chem. Listy* 63, 497-505 (2009)
47. Šafařík I., Šafaříková M.: *BioMagn. Res. Technol.* 2, 7 (2004)
48. Šafaříková M., Šafařík I.: *Chem. Listy* 89, 280-287 (1995)
49. Peter J. F., Otto A. M.: *Proteomics* 10, 628-633 (2010)
50. Deisewerd K.: *Chem. Rev.* 103, 395–425 (2003)
51. Karas M., Krüger G.: *Chem. Rev.* 103, 427–439 (2003)
52. Hillenkamp, F.; Peter-Katalinic, J.: *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*. Weinheim, WILEY-VCH 2007.

53. Juhasz P., Roskey M.T., Smirnov I.P., Haff L.A., Vestal M.L., Martin S.A.:
Anal. Chem. 68, 941–946 (1996)
54. Mamyrin B.A., Karataev V.I., Schmikk D.B., Zagulin B.A.: Anal. Chem. 70,
3735–3741 (1998)
55. Karas M., Hillenkamp F.: Anal. Chem. 60, 2299 (1988)
56. Mann M., Hojrup P., Roepstorff P.: Biol. Mass Spectrom. 22, 338 (1993)
57. Pappin D. J. C., Hojrup P., Bleasby A. J.: Curr. Biol. 3, 327 (1993)
58. Řehulka P., Řehulová H., Chmelík J.: Chem. Listy 101, 279-286 (2007)
59. Henzel W. J., Billeci T. M., Stults J. T., Wong S. C., Grimley C., Watanabe C.:
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90, 5011 (1993)