

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Josef Dvořák

**Kvantifikace procalcitoninu v lidském séru pomocí  
afinitních nosičů a hmotnostní spektrometrie**

Quantification of procalcitonin in human serum by affinity surfaces and  
mass spectrometry

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Školitel: RNDr. Petr Pompach, Ph.D.  
Konzultant: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Praha, 2020



## Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně pod vedením RNDr. Petra Pompacha, Ph.D., a že jsem řádně citoval všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

.....  
Josef Dvořák



## Poděkování:

Chci poděkovat RNDr. Petru Pompachovi, Ph.D. za veškerou pomoc a trpělivost během práce v laboratoři i při psaní diplomové práce. Dále chci poděkovat svému konzultantovi RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. a týmu laboratoře Strukturní biologie a buněčné signalizace za přátelskou a profesionální atmosféru v laboratoři i mimo ní. V neposlední řadě patří vděk mým nejbližším a mé rodině.



## Abstrakt

Sepse je celosvětově rozsáhlé akutní onemocnění vyvolané nepřiměřenou reakcí imunitního systému na přítomnost patogenu v těle pacienta. Rychlá a správná diagnostika sepse umožňuje lékařům nasadit vhodnou léčbu, na které závisí pacientův život.

Jako její specifický ukazatel se v klinické diagnostice používá protein prokalcitonin (PCT). Koncentrace PCT v krevním oběhu se při sepsi zvýší až tisícinásobně během krátkého časového úseku. Míra závažnosti sepse koreluje se zvyšující se koncentrací PCT. Všechny metody detekce prokalcitoninu v klinických laboratořích vycházejí z měření interakce PCT s protilátkou. Koncentrace prokalcitoninu je následně stanovena metodou kalibrační křivky. U metod využívaných v klinické praxi může dojít k nespecifickým interakcím použité protilátky s biomolekulami přítomnými ve vzorku. Nespecifické interakce mohou zkreslovat laboratorní výsledky. Další nevýhodou je potřeba specializovaných přístrojů pro detekci prokalcitoninu.

Díky svým vlastnostem by mohla hmotnostní spektrometrie představovat vhodnou alternativní nebo doplňkovou metodu při kvantifikaci PCT. Cílem této diplomové práce bylo *in situ* nabohacení PCT na povrchově upravených afinitních nosičích s imobilizovanou protilátkou, které jsou kompatibilní s hmotnostní spektrometrií s laserovou ionizací/desorpcí za přítomnosti matrice s analyzátozem doby letu (MALDI-ToF MS). Ze získaného spektra lze pak identifikovat signály PCT i nespecificky navázaných molekul.

Afinitní nosiče byly připraveny imobilizací protilátky proti PCT s využitím metody měkkého přistávání iontů za atmosférického tlaku. Protilátka byla imobilizována na vodivém skle povrchově upraveném vrstvou oxidu india a cínu. Použití afinitních nosičů umožnilo nabohacení PCT ze vzorku a následnou detekci za použití MALDI-ToF MS. Dosažený detekční limit rekombinantního PCT ve vzorku séra byl 7 ng/ml.

**Klíčová slova:** hmotnostní spektrometrie, funkcionalizované povrchy, MALDI, prokalcitonin, kvantifikace

## Abstract

Sepsis is a worldwide health condition. It is caused by disproportionately large immunity system response for pathogen presence. Fast and accurate diagnosis of sepsis can make difference between life and death.

For clinical diagnosis of sepsis is used serum protein procalcitonin (PCT) as biomarker. Procalcitonin concentration level in patient bloodstream increases up to thousand times in short time period. Severity of sepsis can be determined by correlation with its concentration in bloodstream. To determine PCT level in patient bloodstream a broad variety of specialized instrument is used. All methods have same principle of measurement – PCT-antibody interaction. Procalcitonin level is then quantified by calibration curve method. During these measurements non-specific protein-antibody interactions can occur and distort the quantification of PCT level.

Mass spectrometry due to its properties comes into consideration as an alternative method, that can be used for PCT determination. Aim of this diploma thesis was *in situ* enrichment of PCT on surface modified affinity carriers with immobilized antibody against PCT. These carriers are compatible with matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Mass spectrometry provides mass spectrum, where PCT and other signals representing non-specific interactions can be identified.

Affinity carriers were prepared by ambient ion soft landing method. The antibody was immobilized on glass, which was surface modified with thin layer of indium-tin oxide. Detection by MALDI-ToF MS was possible due to the *in situ* enrichment of PCT and application of precipitation protocol on the sample. The detection limit of recombinant PCT in serum sample was 7 ng/ml.

**Key words:** mass spectrometry, functionalized surfaces, MALDI, procalcitonin, quantification

[In Czech]



# Obsah

1	Úvod.....	12
2	Literární přehled.....	13
2.1	Hmotnostní spektrometrie .....	13
2.1.1	Laserní ionizace a desorpce za účasti matrice v kombinaci s analyzáto- rem doby letu nebo s iontovou cyklotronovou rezonancí s Foureirovou transformací.....	14
2.2	Afinitní nosiče.....	17
2.2.1	Afinitní nosiče na bázi funkcionalizovaných povrchů připravených metodou měkkého přistávání iontů.....	19
2.2.2	Hypertermální kolize.....	20
2.2.3	Příprava modifikovaných proteinových povrchů pomocí metody měkkého přistávání iontů.....	21
2.2.4	Proteinové povrchy.....	24
2.3	Imunoprecipitace .....	27
2.4	Sepse .....	29
2.5	Prokalcitonin .....	31
2.6	Prokalcitonin v klinické diagnostice .....	33
2.6.1	Současné metody stanovení prokalcitoninu nejen v klinické diagnostice ....	35
3	Cíle práce .....	36
4	Materiál a metody .....	37
4.1	Použité chemikálie .....	37
4.1.1	Použité pufry.....	38
4.2	Použité vzorky .....	39
4.3	Použité přístroje a pomůcky .....	39
4.4	Použité metody .....	40
4.4.1	Práce s imunoafinitními povrchy .....	40
4.4.2	Optimalizace způsobu srážení séra obsahující prokalcitonin .....	42
4.4.3	Validace protokolu srážení séra obsahující prokalcitonin za využití metody western blot.....	42
4.4.4	Stanovení limitu detekce a koeficientu variace.....	44
4.4.5	Izolace prokalcitoninu ze séra septických pacientů pomocí ko-immunoprecipitace na magnetických kuličkách .....	44
4.4.6	Odsolení eluátu obsahujícího prokalcitonin .....	46

4.4.7	Proteolytické štěpení vzorku pomocí trypsinu .....	46
4.4.8	Odsolení proteolyticky štěpeného vzorku .....	47
4.4.9	Měření MALDI-ToF a MALDI FT-ICR .....	47
5	Výsledky .....	49
6	Diskuze .....	59
7	Závěr .....	65
8	Seznam použité literatury.....	66

## SEZNAM ZKRATEK

AK	aminokyseliny
ASL	metoda měkkého přistávání iontů za atmosférického tlaku
CID	kolizí vyvolaná disociace
CRP	C-reaktivní protein
CS	chemické vyražení iontů
CT	kalcitonin
cytC	cytochrom C
DHAP	2,5-dihydroxyacetofenon
DTT	1,4-dithiotreitol
ESI	ionizace pomocí elektrospreje
ESSI	ionizace za pomoci elektrosonického spreje
FAB	metoda bombardování rychlými atomy
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IP	imunoprecipitace
ko-IP	ko-immunoprecipitace
LES	nízko-energetické vyražení iontů
LSIMS	hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů v kapalně fázi
MALDI	laserová desorpce/ionizace za účasti matrice
MS	hmotnostní spektrometrie
m/z	poměr hmoty ku náboji
PBS	fosfátem pufovaný izotonický roztok
PCT	prokalcitonin
RIS	reaktivní rozptyl iontů
RL	reaktivní deponování
S/N	poměr signál k šumu
SA	kyselina sinapová
SAM	samo-skládající se monovrstvy organických molekul
SDS	dodecylsulfát sodný
SELDI	vazba na povrch pevné fáze proteinového čipu
SID	povrchem vyvolaná disociace
SIMS	hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů
SL	měkké přistávání iontů
TBST	tris, chlorid sodný, tween pufr
TFA	trifluoroctová kyselina
TGS	tris, glycin, SDS
ToF	analyzátor doby letu
Tris	tris(hydroxymethyl)amoniummethan

# 1 Úvod

Sepse je celosvětově rozšířená zdravotní komplikace, při které dochází k neúměrné odpovědi organismu na přítomnost patogenu. Nevyrovnanost procesů stimulující imunitní odpověď má za následek neúměrnou imunosupresivní odpověď, která může vést až k imunoparalýze. Imunoparalýza představuje pro pacienta kritický stav, při kterém se není sám schopný bránit patogenu, který imunitní odpověď způsobil. Včasné odhalení a řešení sepse je kritické pro přežití pacientů.

Prokalcitonin (PCT) je jedním z biochemických ukazatelů sepse při klinické diagnostice pacientů. Jeho specifita a rychlý nástup do maximálních hodnot koncentrace v krevním oběhu z něj dělají vhodný ukazatel nejen při diagnostice, ale také při sledování průběhu léčby.

Bylo vyvinuto několik metod stanovení PCT a všechny jsou založeny na interakci PCT s protilátkou. Množství PCT je pak stanoveno metodou kalibrační křivky. Právě nespecifické interakce a štěpné produkty PCT, které pravděpodobně vznikají během sepse vlivem vyššího obsahu proteas v krevním oběhu, mohou vést ke zkreslování výsledků.

Hmotnostní spektrometrie může představovat alternativní, nebo doplňkovou metodu při kvantifikaci PCT z patientského séra. Její největší výhodou je naměřené hmotnostní spektrum. V daném spektru je možné identifikovat signály, které představují PCT nebo jeho zkrácené formy. Metoda *in situ* nabohacení PCT představená v této diplomové práci je kompatibilní s hmotnostní spektrometrií s laserovou desorpčí/ionizací za přítomnosti matrice s analyzátozem doby letu (z angl. *matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*; MALDI-ToF MS), která je hojně využívána v klinických laboratořích.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Hmotnostní spektrometrie

V roce 1912 byl představen J. J. Thomsonem tzv. parabolický spektrograf – první hmotnostní spektrometr, který dokázal analyzovat malé anorganické molekuly<sup>1</sup>. Od té doby došlo k prudkému rozvoji hmotnostní spektrometrie (MS) a během posledních 30 let pronikla díky možnosti různorodé aplikace do téměř každé disciplíny vědních oborů zabývajících se lidským zdravím a potřebami běžného života<sup>2-4</sup>. Dnešní hmotnostní spektrometry jsou schopny analyzovat velké biologické makromolekuly a jejich využití je vhodné mimo jiné pro proteomiku<sup>2,5</sup>.

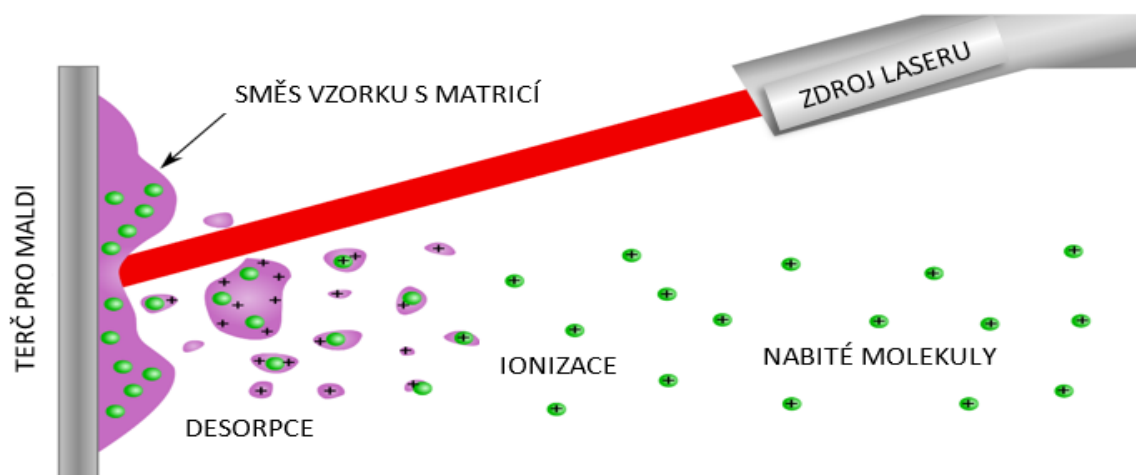
Základní charakteristikou hmotnostní spektrometrie je tvorba nabitých částic (pozitivně/negativně) v plynné fázi, které se poté separují na základě jejich poměru hmoty k náboji ( $m/z$ ) v elektrickém nebo magnetickém poli<sup>6</sup>. Naměřené hmotnostní spektrum vzorku má na ose x poměr  $m/z$  a na ose y relativní intenzitu. Získané spektrum nám může poskytnout informace o struktuře, složení a čistotě analytu<sup>6</sup>.

Pro analýzu proteinů a peptidů se nejvíce uplatňují hmotnostní spektrometry s tzv. měkkou ionizační technikou, při které nedochází k destrukci ionizovaných biomolekul. Termín měkká ionizační technika napovídá, že dochází k minimálnímu přenosu vnitřní energie na analyt během procesu ionizace<sup>6,7</sup>. Mezi tyto techniky patří bombardování rychlými atomy (z angl. *fast atom bombardment*; FAB)<sup>8</sup>, metoda hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů v kapalně fázi (z angl. *liquid secondary mass spectrometry*; LSIMS), ionizace za pomoci elektrospreje (z angl. *electrospray ionization*; ESI) a hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice (z angl. *matrix assisted laser desorption/ionisation*; MALDI), která je nejčastěji kombinována s analyzátozem doby letu (z angl. *time of flight*; ToF) nebo iontovou cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací (FT-ICR)<sup>9,10</sup>.

### 2.1.1 Laserová ionizace a desorpce za účasti matrice v kombinaci s analyzátozem doby letu nebo s iontovou cyklotronovou rezonancí s Foureirovou transformací

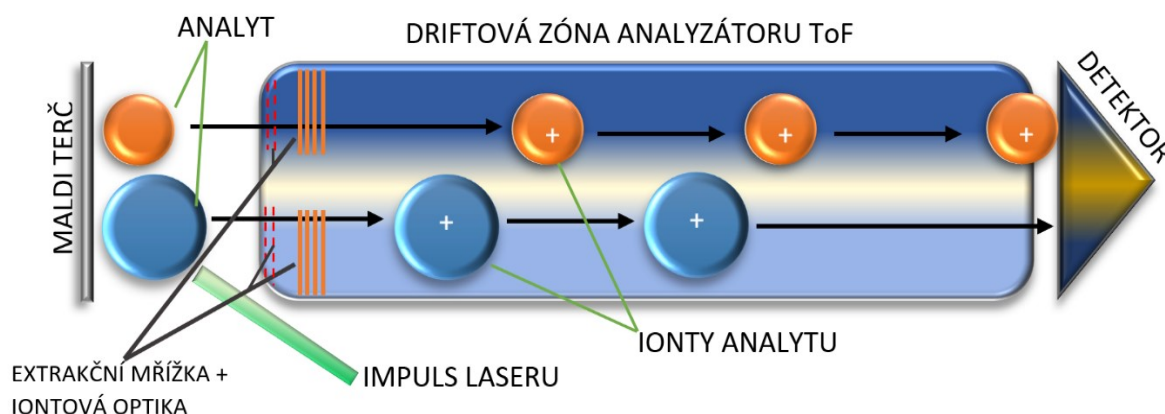
Hmotnostní spektrometrie v kombinaci s MALDI ionizací se rutinně využívá pro širokou škálu různých aplikací. Vzorek pro MALDI MS je nejprve rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle a následně nanesen na speciální MALDI terč z vodivého materiálu<sup>11</sup>. V závislosti na charakteru vzorku a zvolené matrici se vzorek na terči buď před vyschnutím promíchá s definovaným množstvím matrice, anebo je matrice aplikována až po vyschnutí vzorku na terči<sup>6</sup>. Mezi používané matrice patří organické aromatické kyseliny, které absorbují při vlnové délce použitého laseru a dobře krystalizují. Na příklad kyselina  $\alpha$ -kyano-hydroxyskořicová, 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová, sinapová nebo 2,5-dihydroxyacetofenon<sup>12</sup>.

Jedná se o dvoustupňový proces (*Obr. 1*), při kterém dochází v první kroku k ozáření vzorku na terči (analyt + matrice) krátkými pulsy laseru v řádu nanosekund<sup>6</sup>. Přítomná matrice pohltí převážné množství energie laserového pulsu, čímž dojde k její rychlé desorpci. Desorbovaná matrice s sebou strhne molekuly analytu a dochází k přechodu analytu z pevného skupenství do plynného. Během druhého kroku dochází k přenosu náboje ve formě  $H^+$  z matrice (aromatická org. kyselina) na analyt za vzniku pseudomolekulárních iontů  $[A+H]^+$ . Pohlcení velké části energie laserového pulsu matricí má za následek velmi nízký stupeň fragmentace analytu<sup>6</sup>.



*Obr. 1* – Schéma desorpce/ionizace pomocí laseru za účasti matrice. V prvním kroku je matricí pohlcena energie krátkého ( $\sim ns$ ) laserového pulsu o vhodné vlnové délce. To má za následek desorpci matrice, která s sebou strhne molekuly analytu a zároveň dochází k přenosu náboje z matrice na analyt ve formě  $H^+$ . Vznikají tak ionty analytu  $[A+H]^+$ . Ionty potom v případě MALDI-ToF MS putují analyzátozem doby letu a dopadají na detektor. Upraveno dle<sup>13</sup>.

Technika MALDI je nejčastěji kombinována s analyzátozem doby letu<sup>14</sup>. Analyzátozem doby letu je používán od 90. let 20. století, přestože byl poprvé popsán již v jejich polovině<sup>15,16</sup>. Je jednou z nejjednodušších metodologií separace iontů<sup>6</sup>. Jeho principem je měření času, který ion potřebuje k překonání vzdálenosti od zdroje k detektoru (Obr. 2).



Obr. 2 – Schéma lineárního analyzátozu ToF. Ze schématu je zřejmé, že různě velké ionty (modře a oranžově) se stejným nábojem, které odstartovaly současně z MALDI terče se při průletu analyzátozem separují na základě  $m/z$ . Za předpokladu, že jim byla udělena stejná kinetická energie, platí pro výpočet  $m/z$  z naměřené doby letu vztah (1). O kompenzaci rozdílů kinetické energie iontů se starají extrakční mřížka a iontová optika.

Hovoří se o tzv. době letu,  $t$ . Výsledný poměr  $m/z$  je za předpokladu, že všem iontům je udělena stejná kinetická energie ( $E_k$ ), vypočten dle následujícího vztahu<sup>17</sup>:

$$\frac{m}{z} = 2eU \frac{t^2}{L^2} \quad (1),$$

kde  $m$  je hmotnost (kg),  $z$  je náboj,  $L$  je délka driftové zóny (m),  $U$  je urychlovací napětí (V) a  $e$  je elementární náboj ( $\approx 1,602 \times 10^{-19}$  C). Pro daný přístroj jsou hodnoty  $L$ ,  $e$ ,  $U$  fixní. Tím pádem může být rovnice (1) zjednodušena do tvaru<sup>17</sup>:

$$\frac{m}{z} = K t^2 \quad (2),$$

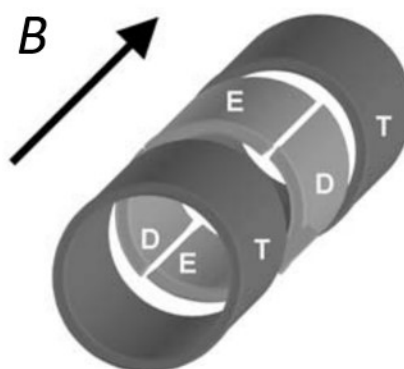
kde  $K$  je kalibrační konstanta pro daný přístroj. Je tedy pro každý přístroj jiná, ale ukazuje přímo úměrný vztah mezi poměrem  $m/z$  a dobou letu  $t$  (cit. 6). Výhodou ToF analyzátozu jsou krátká doba analýzy (1 spektrum se naměří 1 pulsem laseru), vysoká citlivost a velký rozsah měřené hmoty<sup>17</sup>.

Pro zvýšení rozlišení a kompenzaci lineárního ToF analyzátoru se využívají 2 prvky. Prvním je tzv. pulzní extrakce, kdy je extrakční napětí na MALDI terč aplikováno až po uplynutí krátkého časového úseku ( $\sim 100$  ns)<sup>18</sup>. Druhým prvkem je tzv. iontové zrcadlo, které také zvyšuje rozlišení kompenzací nerovnoměrnosti v kinetické energii iontů ( $E_k$ ) se stejnou  $m/z$  (cit. <sup>19</sup>). Je tvořeno soustavou prstencových elektrod, na které je přivedeno napětí o stejné polaritě jako na elektrody urychlovací. Ionty s vyšší hodnotou  $E_k$  proniknou hlouběji do elektrického pole reflektoru. Tím dojde k opoždění těchto iontů oproti iontům s nižší hodnotou  $E_k$  a tím pádem i ke srovnání celkové letové doby. S použitím iontového zrcadla dochází ke snížení citlivosti kvůli vyšším ztrátám zapříčiněné delším pobytem iontů v letové trubici<sup>19</sup>.

Díky jednoduchosti, rychlosti a malé náročnosti na množství vzorku spolu s dobrým rozlišením a velkým rozsahem měřené  $m/z$  je MALDI-TOF MS využívána pro velké množství aplikací. Využívá se v klinických laboratořích například při identifikaci bakterií v mikrobiologické diagnostice<sup>14</sup>. Další uplatnění nalézá na příklad při analýze lipidů, peptidů, nukleových kyselin a sacharidů, proteomice a nebo genomice<sup>20-24</sup>.

Kromě kombinace s analyzátozem ToF může být MALDI kombinována s iontovou cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací<sup>25</sup>. Hmotnostní spektrometry vybavené ICR celou se vyznačují možností měření analytu s vysokým rozlišením. Iontově cyklotronová cela umístěná v silném homogenním magnetickém poli (5–21 T) se skládá z přední a zadní koncové elektrody a z excitačních elektrod umístěných proti detekčním elektrodám (*Obr. 3*, str. 17). V cele je velice nízký tlak ( $\sim 10^{-8}$  Pa) a je možné v ní uchovávat ionty po delší dobu během měření<sup>11</sup>. Možnost uchování iontů v cele během měření je jednou z výhod FTI-ICR MS. Účelem cely analyzátoru je určení poměru  $m/z$  iontů, které se v ní nacházejí. Každý ion se pohybuje v silném magnetickém poli, které je konzistentní v prostoru. Ionty tak opisují kruhový, tzv. cyklotronový, pohyb jakožto výsledek Lorentzovy síly a odstředivé síly, kterými na ionty ICR cela působí. Úhlová frekvence iontu pak závisí na magnetickém poli a na poměru  $m/z$ . Naměřená data je nutno převést pomocí Fourierovy transformace<sup>11</sup>.





Obr. 3 – Schéma ICR cely.  $B$  je magnetické pole. T jsou označeny koncové elektrody, E jsou označeny elektrody excitační a D jsou elektrody detekční. Převzato z<sup>11</sup>.

## 2.2 Afinitní nosiče

Hmotnostní spektrometrie s měkkou ionizací představuje velice účinný nástroj pro analýzu biomolekul, které musí splňovat požadavky na čistotu<sup>11,17</sup>. Velkým úskalím je však skutečnost, že biomolekuly, které je potřeba analyzovat jsou součástí komplexní směsi například séra nebo buněčného lyzátu. V komplexní směsi není jen směr analytu s dalšími biomolekulami, ale jsou zde přítomny i organické a anorganické soli a v některých případech i části buněčných organel<sup>17</sup>. Analyt je proto před MS analýzou potřeba nabohatit a zbavit solí<sup>26,27</sup>. K tomuto účelu se používají čistící metody, při kterých je analyt na základě fyzikálně-chemických vlastností oddělen od zbytku. Mezi tyto metody patří například membránová dialýza, centrifugace, elektroforetická separace, imunoprecipitace nebo kapalinová chromatografie<sup>17,26,27</sup>. Kapalinová chromatografie představuje účinný separační nástroj a používá se v široké škále různých variant včetně afinitní kapalinové chromatografie<sup>26,27</sup>.

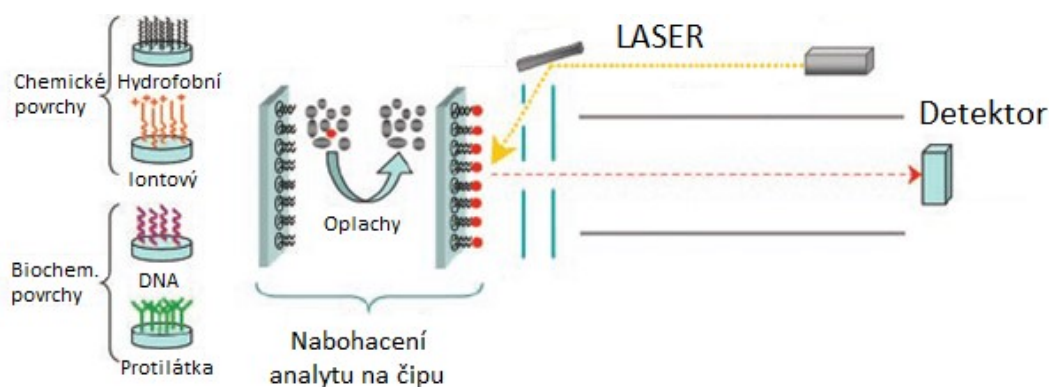
Při afinitní kapalinové chromatografii se využívá stacionární fáze, která má na svém povrchu imobilizovaný ligand, ke kterému má separovaný protein nebo skupina proteinů vysokou afinitu a tvoří s ligandem silné vazby. Zbytek separované směsi protéká beze změny<sup>28</sup>. Afinitní chromatografie je dobrým příkladem účinnosti nabohacení proteinů na afinitních nosičích.

Afinitní nosiče jsou skupinou materiálů, které mají samy o sobě určitou afinitu k požadované skupině proteinů, nebo materiály, které mají na povrchu imobilizovaný ligand nebo protilátku<sup>29</sup>. Mezi materiály, které mají afinitu k určité skupině proteinů, patří např. oxid titaničitý nebo zlato<sup>30,31</sup>. Oxid titaničitý má afinitu k proteinům, které obsahují fosfátové skupiny a zlaté povrchy mají afinitu k proteinům obecně. Výhodou

zlatých povrchů je jejich jednoduché použití, které nevyžaduje povrchovou úpravu, ale velkou nevýhodou je jejich nespecifita<sup>30-32</sup>.

V případě, kdy je kladen důraz na separaci určitého proteinu, přichází v úvahu materiály, které jsou povrchově upravené ligandem nebo protilátkou, na které se požadovaný protein specificky váže. Příkladem takto upravených nosičů mohou být stacionární fáze využívané v afinitní kapalinové chromatografii nebo magnetické kuličky s imobilizovaným afinitním ligandem nebo imobilizovanou protilátkou<sup>28,33</sup>.

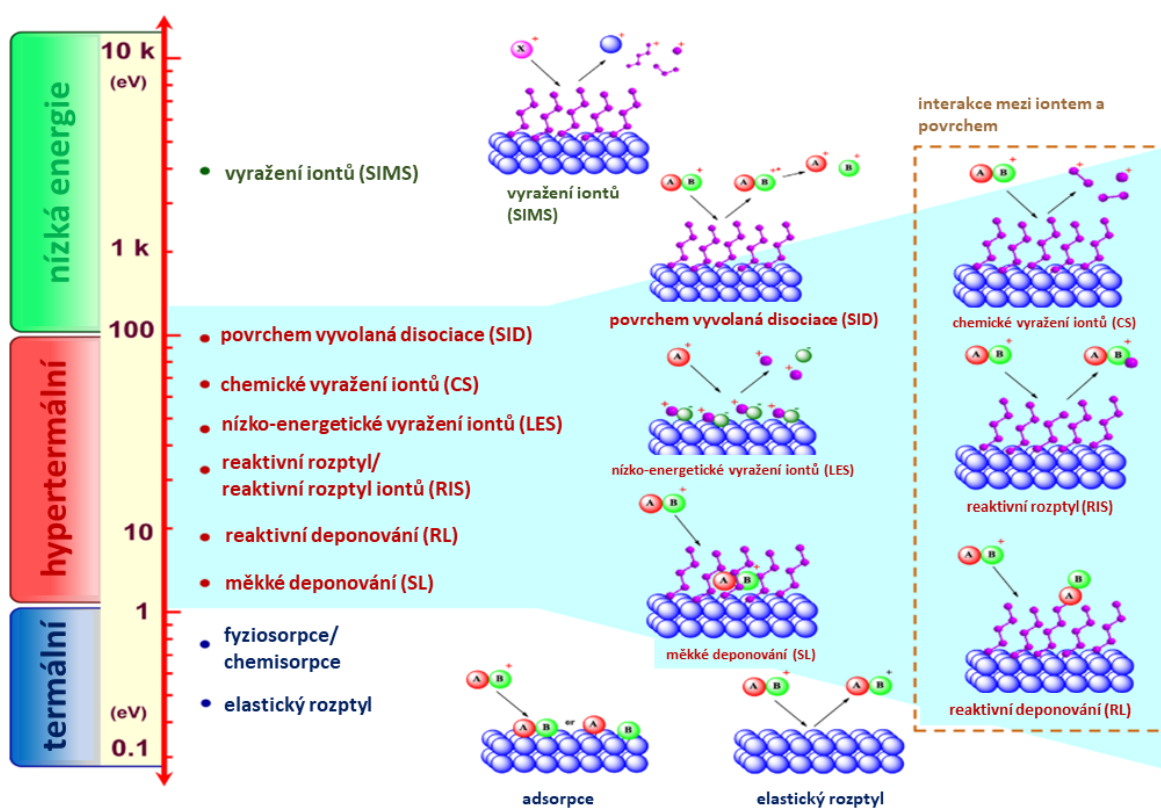
Nabohacení proteinu je časově náročný proces, při kterém dochází ke ztrátě analytu, a často vyžaduje kombinaci několika metod<sup>17</sup>. V roce 1993 byla publikována variace měkké ionizační techniky MALDI – metoda analýzy proteinů pomocí vazby na povrch pevné fáze proteinového čipu (z angl. *surface enhanced laser desorption ionization*, SELDI), která umožňuje jednoduché nabohacení požadovaného proteinu na předem připraveném povrchově upraveném čipu<sup>34</sup>. Metoda SELDI využívá k afinitnímu nabohacení povrchově upravené čipy, které lze přímo použít pro hmotnostní spektrometrii s laserovou ionizací (Obr. 4). Povrchově upravené čipy představují rychlejší a jednodušší alternativu nabohacení biomolekul. Jejich přípravě a použití bylo věnováno velké množství studií<sup>32,35-38</sup>.



Obr. 4 – Princip SELDI MS. V prvním kroku je na předem připraveném čipu s afinitní povrchovou úpravou o určitých chemických nebo fyzikálních vlastnostech nabohacen analyt ze vzorku. V dalším kroku jsou opakovanými oplachy odstraněny ostatní molekuly a analyt zůstává nabohacen na čipu. Na připravený čip s nabohaceným analytem je nanášena matrice a takto je čip připraven pro měření pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou ionizací. Upraveno dle<sup>39</sup>.

## 2.2.1 Afinitní nosiče na bázi funkcionalizovaných povrchů připravených metodou měkkého přistávání iontů

Jako afinitní nosiče byly v této diplomové práci použity povrchy modifikované metodou měkkého přistávání iontů (z angl. *ion soft landing*; SL) využívající fenomén nízkoenergetických kolizí iontů, během kterého dochází ke kolizím iontů s daným povrchem (substrátem)<sup>37</sup>. Kromě měkkého přistávání iontů může dojít k několika kompetitivním procesům v závislosti na kinetické energii, která je iontům dodána při ionizaci. Obr. 5 graficky znázorňuje pravděpodobnost kompetitivních procesů v závislosti na kinetické energii.



Obr. 5 – Procesy, ke kterým dochází v rámci kolize iontů s povrchem v závislosti na jejich kinetické energii. Upraveno dle<sup>37</sup>.

Krátký úvod do historie výzkumu kolize iontů se substrátem a nejvýznamnější kompetitivní procesy měkkého přistávání iontů včetně jejich spojení s hmotnostní spektrometrií jsou uvedeny v následujících částech práce. Metodě měkkého přistávání je věnována samostatná *kap. 2.2.3*, str. 21.

Jedním z historicky prvních pozorovaných procesů fenoménu kolize iontů se substrátem při nízké kinetické energii bylo vyražení sekundárních částic z povrchu indukované primárními ionty<sup>1</sup>. Kombinací tohoto procesu s hmotnostní spektrometrií vzniká tzv. hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (z angl. *secondary ion mass spectrometry*; SIMS). Během SIMS dochází k uvolňování nabitých částic z povrchu vlivem bombardování proudem iontů o kinetické energii v řádu kiloelektronvoltů (keV). SIMS se vyvíjela přibližně od 70. let 20. století a našla řadu využití například při nedestruktivní analýze molekulárních povrchů a organických materiálů nebo při chemickém zobrazování s vysokým prostorovým rozlišením<sup>3,37,40</sup>.

Souběžně s vývojem SIMS byly prováděny experimenty využívající proces povrchem vyvolané disociace (z angl. *surface induced dissociation*; SID). Při SID dochází ke kolizi molekulárních iontů s povrchem, který má za následek jejich fragmentaci<sup>41</sup>. Tato metoda se kombinuje s hmotnostní spektrometrií a je komplementární ke kolizí vyvolané disociaci (z angl. *collision induced dissociation*; CID), která je nejběžnějším způsobem fragmentace iontů v plynné fázi a používá se při tandemové hmotnostní spektrometrii<sup>37,41</sup>.

Výše zmíněné neelastické procesy jsou výsledkem kolizí při kinetické energii  $10^2$ – $10^4$  eV a patří mezi historicky první pozorované. Klíčové pro tuto diplomovou práci jsou však elastické procesy, které nastávají při kinetické energii 1–100 eV nazývané se **hypertermální kolize**<sup>37,41–43</sup>.

### 2.2.2 Hypertermální kolize

Mezi důležité procesy hypertermálních kolizí iontů s povrchem (*Obr. 5*, str. 19) patří chemické vyražení iontů (z angl. *chemical sputtering*; CS) a podobný proces nízkoenergetické vyražení iontů (z angl. *low-energy sputtering*; LES) nebo reaktivní rozptyl iontů (z angl. *reactive ion scattering*; RIS)<sup>37</sup>. V neposlední řadě je třeba zmínit proces reaktivního deponování (z angl. *reactive landing*; RL) a především měkké přistávání iontů (z angl. *ion soft landing*; SL).

Během CS a LES dochází při kolizi s iontem k ionizaci a vyražení atomů, molekul nebo skupiny atomů již přítomných na povrchu<sup>37</sup>. Dalším hypertermálním procesem je vznik a zánik chemických vazeb během reaktivních kolizí, přičemž dochází k vzájemné výměně atomů či skupin atomů při interakci iontů s molekulárním povrchem. Reaktivní

deponování (RL) je proces patřící mezi reaktivní kolize, díky kterému je možné docílit modifikace molekulárního povrchu pomocí deponace iontů. Pro nedestruktivní modifikaci běžných povrchů je vhodné využít metodu měkkého přistávání iontů (SL)<sup>37</sup>.

Povrchy mohou být modifikovány v případě SL nebo RL molekulárními ionty, které se deponují v plynné fázi. Imobilizované molekulární ionty dodávají povrchu požadované vlastnosti<sup>37</sup>. Nejvhodnější k povrchové modifikaci pomocí SL jsou vodivé nebo polovodivé materiály. Ty zaručují, že nedochází k přenosu náboje z iontu na povrch<sup>44</sup>. Vodivost povrchu tak umožňuje vložení náboje opačné polaroty na povrch a zamezí tak jeho nabití dopadajícími ionty. Vložením napětí na povrch se eliminuje vzájemné odpuzování již imobilizovaných iontů na povrchu a dopadajících iontů, čímž se zvyšuje efektivita modifikace povrchu<sup>37,44</sup>. Mezi vodivé materiály používané pro SL patří např. tzv. samo-skládající se monovrstvy organických molekul (z angl. *self-assembled monolayers*; SAM)<sup>45</sup>, kovové povrchy (nerezová ocel, zlato nebo měď), ale i povrchy potažené tenkou vrstvou oxidu kovu<sup>44</sup>.

Hypertermální procesy si navzájem konkurují. Výsledný proces závisí na kolizní energii, ale také na vlastnostech iontů a povrchu<sup>37</sup>. Například elastické kolizi měkkého deponování iontů konkuruje několik procesů reaktivní kolize nebo proces neelastické srážky SID, při které dochází k disociaci iontu vlivem srážky s povrchem<sup>37</sup>.

V rámci této diplomové práce bylo pro přípravu afinitních nosičů využito takové napětí a rychlost hnacího plynu, aby se kinetická energie při kolizi iontů s povrchem pohybovala na spodní hranici hypertermálních hodnot. Nejpravděpodobnějším procesem, který tak mohl nastat při interakci iontů s povrchem, je **měkké přistávání iontů**, kterému je věnována následující podkapitola.

### 2.2.3 Příprava modifikovaných proteinových povrchů pomocí metody měkkého přistávání iontů

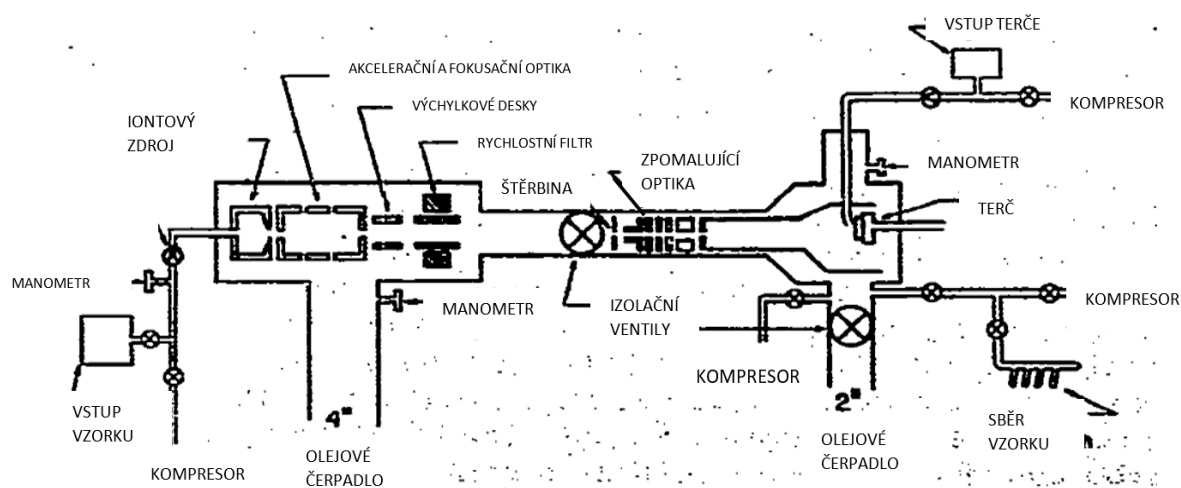
Správná volba chemické kompozice povrchů hraje klíčovou roli v nanotechnologii, biotechnologii a při přípravě funkcionalizovaných materiálů<sup>46</sup>. Při nízké kinetické energii v řádu desítek eV je možné deponovat neporušené polyatomické ionty na povrch, který je modifikován<sup>47</sup>. Tento proces se nazývá metoda měkkého přistávání iontů. Dopadající částice musí rozložit svoji kinetickou energii při dopadu, a to bez

porušení kovalentních vazeb. Energie musí být rozložena do vibračních a elektronických stupňů volnosti částice a povrchu<sup>37</sup>.

Velkou výhodou metody měkkého přistávání iontů je možnost vybrat ionty o chemické, strukturní nebo izotopové čistotě. Hodnota vkládaného napětí na elektrosprej a tlak hnacího plynu ovlivňují kinetickou energii dopadajících iontů, a tím i umožňují výběr výsledného hypertermálního procesu<sup>37</sup>. Konkurenčním procesem SL může být RL, a to v případě, že deponované ionty ochotně reagují s atomy nebo funkčními skupinami již přítomnými na povrchu<sup>44,48</sup>. První SL byla prováděna ve vakuu (kap. 2.2.3.1), ale nyní je možná i instrumentace za atmosférického tlaku (kap. 2.2.3.2)<sup>49</sup>.

### 2.2.3.1 Instrumentace měkkého přistávání iontů ve vakuu

Metoda měkkého přistávání ve vakuu umožňuje výběr deponovaných iontů na základě poměru  $m/z$ . Je tak vhodná pro vysoce kontrolovanou modifikaci povrchů<sup>50</sup>. V roce 1977 demonstrovali Cooks a jeho kolegové možnost modifikace povrchů chemicky čistými látkami pomocí metody měkkého přistávání ve vakuu<sup>51</sup>. Deponovány byly polyatomické molekuly sloučenin síry s uhlíkem ( $CS_2^+$ ,  $CS_2^{2+}$ ,  $CS^+$ ,  $S^+$ ,  $S_2^+$ ). Byl zde ukázán potenciál modifikace povrchů pomocí polyatomických iontů o nízké energii v kontrastu s ionty o vysoké energii<sup>51</sup>. Takto položil základ budoucímu využití při deponování biomolekul. Schéma přístroje, který Cooks ve své studii použil je zobrazen na Obr. 6.



Obr. 6 – Schéma aparatury, kterou v roce 1977 použil Cooks při deponování iontů metodou měkkého přistávání. Takto sestavená aparatura umožňuje selekci iontů na základě  $m/z$ . Upraveno dle<sup>51</sup>.

Při použití instrumentace ve vakuu se odehrává celý proces ionizace, filtrování na základě  $m/z$  a depozice na povrch v hmotnostním spektrometru. K ionizaci dochází iontovým zdrojem spektrometru a následně je směs vzniklých iontů filtrována na základě  $m/z$  pomocí přítomných hmotnostních filtrů<sup>50,52</sup>.

Experimenty využívající SL ve vakuu byly provedeny na speciálně upravených přístrojích<sup>53</sup> nebo i na komerčně dostupných instrumentech<sup>54</sup>. Zároveň bylo SL využito pro řadu aplikací např. při nabohacení sloučenin z komplexních směsí<sup>55</sup> nebo při přípravě proteinových čipů<sup>56</sup>.

Možnost deponovat ionty vybrané na základě  $m/z$  je velkou výhodou sestavy ve vakuu<sup>37,48,51</sup>. Na druhou stranu jsou na tuto technologii kladeny velké instrumentální nároky. Navíc se ukázalo, že množství deponovaných iontů na povrch je malé a jejich příprava je tak časově a finančně náročná. Alternativou k výše uvedené metodě depozice iontů na povrch metodou měkkého přistávání iontů je instrumentace za atmosférického tlaku (z angl. *ambient ion soft landing*; ASL)<sup>42,50,52,57</sup>.

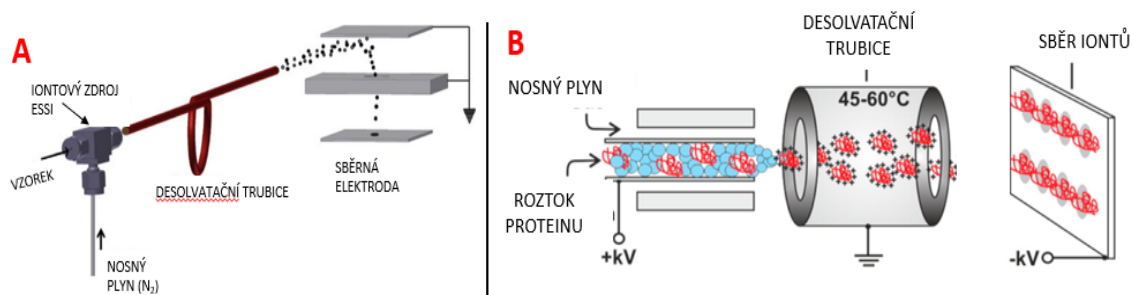
#### 2.2.3.2 Instrumentace měkkého přistávání iontů za atmosférického tlaku

V roce 2011 Cooks a kolegové zkonstruovali nové depoziční zařízení umožňující deponovat ionty za atmosférického tlaku (z angl. *ambient ion soft landing*; ASL)<sup>38,49</sup>.

Během ASL experimentů jsou generované ionty měkkou ionizační technikou (str. 13 posl. odstavec) deponovány na povrch za podmínek atmosférického tlaku, a to bez použití hmotnostních filtrů<sup>38</sup>. Toto uspořádání dává příležitost provádět depozici významně koncentrovanějším iontovým paprskem. Iontový paprsek je koncentrovanější oproti SL ve vakuu, protože zde nedochází ke ztrátě proudu iontů vlivem použití analyzátorů hmotnostního spektrometru pro filtraci na základě  $m/z$ <sup>38,58</sup>.

Přístroj pro ASL umožňuje separaci iontů od neutrálních částic a polarita iontů je definována nastavením polarity napětí<sup>49</sup>. Vhodné je používat sloučeniny, které vytvoří ionizací elektrosprejem požadovaný druh iontů. Analyt určený pro depozici je vhodné předem charakterizovat pomocí hmotnostního spektrometru spojeného s elektrosprejem z důvodu ověření jeho kvality a schopnosti tvorby iontů<sup>49</sup>.

Přístroje pro ASL jsou obecně složeny z iontového zdroje, desolvatační trubice a deflektorové elektrody v případě, že není sběrná elektroda vodorovně ve směru proudu elektronů<sup>38</sup>. Konstrukce se sběrnou elektrodou kolmo na proud iontů s deflektorovou elektrodou v porovnání s konstrukcí, kde je umístěna sběrná elektroda ve směru proudu elektronů, lze vidět na *Obr. 7*. Jako ionizační metoda se využívá buď elektrosonický sprej (z angl. *electrosonic spray ionisation*; ESSI) nebo ESI<sup>38,49</sup>. Desolvatační trubice může mít více tvarů – zatočená pro depozici suchých iontů bez rozpouštědla, nebo rovná solvatační trubice pro depozici nabitých mikrokapiček<sup>36,38</sup>.

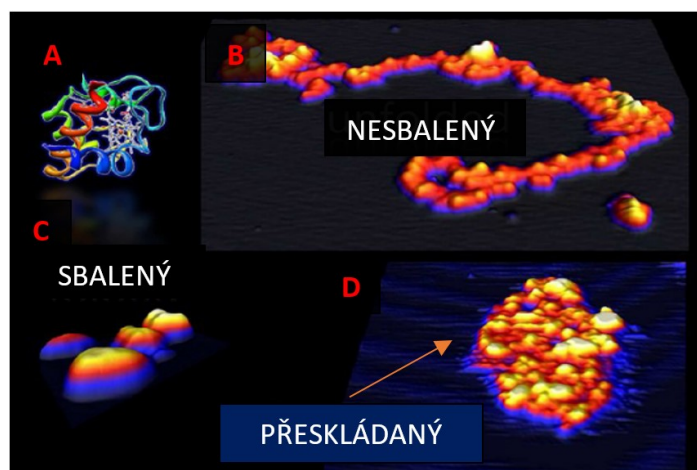


*Obr. 7* – Obrázek 7A reprezentuje instrumentaci s ESSI a zatočenou desolvatační trubicí. Disponuje také sběrnou elektrodou kolmo na směr iontového paprsku. Je tedy potřeba doplnit instrumentaci o deflektorovou elektrodu. Upraveno dle<sup>58</sup>. Na obrázku 7B je depoziční zařízení ASL se sběrnou elektrodou ve směru proudu iontů. Upraveno dle<sup>32</sup>.

## 2.2.4 Proteinové povrchy

V roce 2004 potvrdil Cooks zachování biologické aktivity lysozymu deponovaného na kapalně povrchy obsahující glycerol pomocí klasického SL ve vakuu<sup>55</sup>. V další studii Deng a kolektiv zkoumali chování cytochromu c (cytC) při deponování jeho sbalených a nesbalených molekul pomocí elektrospreje<sup>59</sup>. Chování zmíněných molekul cytC nanesených na povrch bylo zkoumáno pomocí skenovací tunelové mikroskopie. U sbalených molekul bylo pozorováno zachování jejich prostorové struktury a naproti tomu nesbalené molekuly cytC tvořili na povrchu prodloužené polymerní řetězce. Dalším zjištěním bylo chování nesbalených molekul cytC na slabě interagujících površích. V tomto případě došlo k přeskládání nesbaleného proteinu do plochých a nepravidelných dvoudimenzionálních útvarů<sup>59</sup>. Snímky ze skenovací tunelové mikroskopie představuje *Obr. 8*, str. 25.

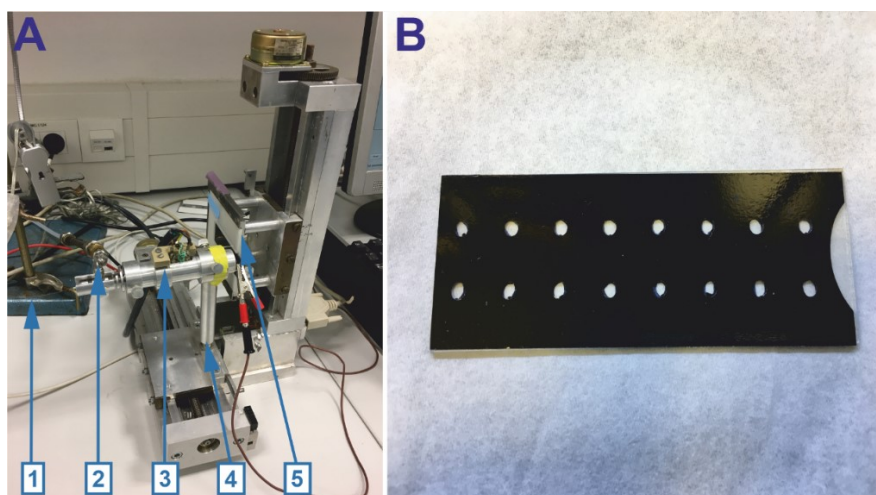




Obr. 8 – Snímky skenovací tunelové mikroskopie molekul cytC deponovaných na povrch. **A** – „ribbon“ zobrazení struktury cytochromu C; **B** – nesbalený cytC; **C** – sbalený cytC; **D** – přeskládaný nesbalený cytC po deponování na slabě interagující povrch. Upraveno dle<sup>59</sup>.

Vývoj v metodě ASL v kombinaci s faktem, že si proteiny po SL depozici na povrch ponechávají svou biologickou aktivitu<sup>55</sup>, otevírá nové možnosti přípravy funkcionalizovaných proteinových povrchů<sup>32</sup>.

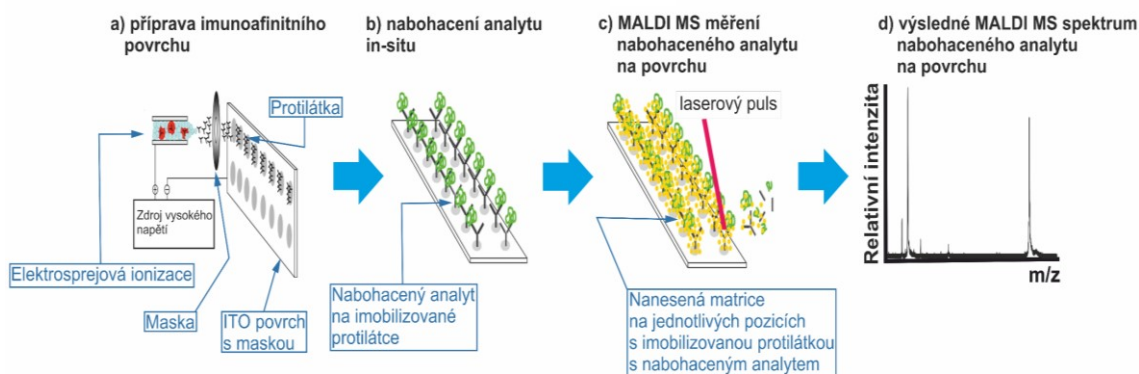
Zásadní pro tuto práci jsou proteinové povrchy kompatibilní s MALDI hmotnostní spektrometrií připravené pomocí zařízení pro ASL (Obr. 9A)<sup>32</sup>. Geometrie jednotlivých pozic lze dle potřeby měnit volbou různých masek, které se nejčastěji lepí na povrch (Obr. 9B)<sup>32,36</sup>.



Obr. 9 – **A**) Obrázek depozičního zařízení v laboratoři. Lze vidět držák pro vložení ITO skla, který je přidělán k polohovacímu zařízení ve směru osy y (5). Samotná desolvatační trubice (3), která se nachází naproti povrchu, se pohybuje po ose x díky polohovacímu zařízení (4). K desolvatační trubici je přidělena kapilára (1) s kontinuálním zdrojem (není vidět na obrázku) roztoku deponované látky. Na kapiláru se vzorkem i „slot“ na povrch se přivádí napětí. Napětí se přivádí za použití 2 zdrojů. K desolvatační trubici je také připojen přívod hnacího plynu (v tomto případě dusíku) (2). **B**) ITO sklo s nalepenou maskou, která umožňuje zvolení libovolné geometrie připravených pozic s imobilizovanou biomolekulou<sup>36</sup>.

Mezi materiály, které jsou vhodné pro povrchovou úpravu pomocí ASL a jsou nejčastěji používány pro výrobu proteinových povrchů, patří sklo potažené tenkou vodivou vrstvou směsi oxidu cínu a india (z angl. *indium tin oxide glass*; ITO)<sup>32</sup> nebo komerčně dostupný terčík dodávaný firmou Bruker Daltonics s názvem „Biotarget“<sup>60</sup>. Kromě těchto materiálu, lze použít i například hliník, nerezovou ocel nebo vodivý plast. Geometrie terčíků musí být kompatibilní s držáky určenými pro standardní MALDI desky<sup>32,60</sup>.

Zachování prostorového uspořádání proteinu i jeho biologických vlastností po depozici na povrch pomocí ASL umožňuje přípravu proteinových povrchů s pestrou možností využití<sup>32</sup>. Daná vlastnost závisí na použitém proteinu. Byla ověřena možnost proteolytického štěpení myoglobinu *in situ* pomocí proteinového povrchu s imobilizovaným trypsinem<sup>32</sup>. Své využití mohou proteinové povrchy nalézt i při nabohacování glykopeptidů pomocí povrchů s imobilizovanými lektiny<sup>32</sup>. V neposlední řadě stojí za zmínku fenotypizace haptoglobinu nebo ověření glykosylace transferrinu nabohacených na proteinových površích s příslušnou protilátkou<sup>35,61</sup>. Schéma postupu nabohacení proteinů pomocí protilátky je zobrazeno na *Obr. 10*.



*Obr. 10* – Postup použití povrchů s imobilizovanou protilátkou. Prvním krokem je příprava proteinového povrchu pomocí ASL. Druhým krokem je nabohacení analytu na imobilizované protilátce. Následuje nanesení matrice a měření pomocí MALDI MS. Upraveno dle<sup>35</sup>.

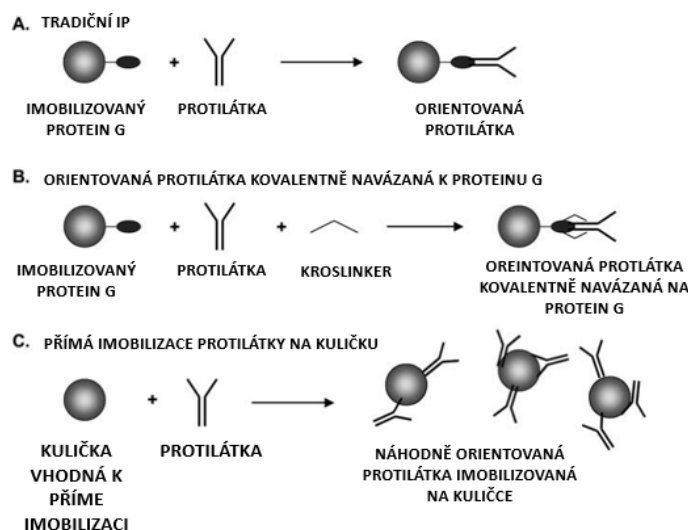
## 2.3 Imunoprecipitace

Výše zmíněné proteinové povrchy s imobilizovanou protilátkou (*kap. 2.2.4, str. 24*) se dají zařadit mezi širokou skupinu metod imunoprecipitace (IP).

Společným principem všech imunoprecipitačních metod je interakce antigenu se specifickou protilátkou<sup>62</sup>. Jedná se o skupinu metod, které se využívají k izolaci antigenů nebo požadovaných proteinů z komplexních směsí jako jsou například buněčný lyzát, sérum nebo homogenizovaný vzorek tkáně<sup>63-65</sup>. Své využití v kombinaci s dalšími metodami najde IP při vyhodnocení změny exprese proteinu, zjištění molekulové hmotnosti proteinu a jeho posttranslačních modifikací nebo může poskytnout informace o interagujících ligandech<sup>33</sup>. Použité protilátky mohou být buď polyklonální (proti více epitopům) nebo monoklonální (specifické proti jedné antigenní determinantě). Dále mohou být specifické vůči požadovanému proteinu, určité posttranslační modifikaci nebo epitopové značce v případě, že se jedná o protein, který je vytvořen pomocí rekombinantní exprese<sup>66,67</sup>.

Tradiční metoda IP nejprve vyžaduje inkubaci protilátky se vzorkem obsahujícím požadovaný protein (antigen)<sup>33</sup>. Po vytvoření komplexu antigen-protilátka je tento komplex navázán na kuličky (agarosové, magnetické) o poloměru v řádu mikrometrů, které obsahují kovalentně navázaný protein A nebo protein G. Tyto kuličky jsou následně odděleny od vzorku a opláchnuty, aby se zamezilo kontaminaci eluátu látkami, které nejsou přímo navázané na protilátku<sup>68</sup>. Kuličky jsou poté vystaveny denaturačním podmínkám nebo nízkému pH, aby došlo k disociaci komplexu antigen-protilátka. Při tomto způsobu dojde při eluci k uvolnění jak požadovaného proteinu, tak i protilátky, na kterou byl navázan. Přítomnost protilátky v eluátu může být problematické zejména při 1D nebo 2D elektroforetické analýze požadovaného proteinu, který má podobnou molekulární hmotnost jako těžký nebo lehký řetězec protilátky<sup>62,69</sup>.

Kvůli kontaminaci eluátu proteinu protilátkou byly vyvinuty alternativní metody. Alternativou je kovalentní zesíťování protilátky s proteinem A nebo G přítomnými na povrchu kuliček nebo přímé navázání protilátky na povrch kuličky, ve kterém se nepoužívají A a G proteiny<sup>70,71</sup>. Grafické znázornění jednotlivých metod vazby protilátky při různých IP (*Obr. 11, str. 28*).



Obr. 11 – Grafické shrnutí 3 základních možností navázání protilátky při imunoprecipitaci. **A** – tradiční navázání protilátky na magnetické/agarosové kuličky; **B** – navázání protilátky na imobilizovaný protein G s kroslinkerem; **C** – Přímá imobilizace protilátky na magnetickou/agarosovou protilátku, která má na svém povrchu organické molekuly vhodné pro vytvoření vazby s protilátkou (např. epoxy skupiny). Upraveno dle<sup>62</sup>.

Další modifikací je ko-immunoprecipitace (ko-IP), která využívá komplex antigen-protilátka pro vychytávání proteinů ve vzorku, které se navazují na daný antigen<sup>62</sup>. Tento mechanismus „návnada s kořistí“ je ceněným *in vitro* nástrojem pro ověření interakce receptor-ligand nebo zkoumání interakce enzym-substrát. Využít se dá také ke zkoumání formace multiproteinových komplexů<sup>67</sup>.

Základní principy imunoprecipitace mohou být aplikovány i u proteinových povrchů<sup>35,61</sup>. Povrchy s deponovanou protilátkou (imunoafinitní povrchy) lze použít obdobně jako kuličky s imobilizovanou protilátkou. Prvním krokem je inkubace vzorku (např. sérum) na terči s imobilizovanou protilátkou. Následuje vhodný oplach povrchu, aby se minimalizovalo množství nežádoucích nenavázaných látek. Do kroku oplachu se jedná o velice analogický proces. Změna u proteinových povrchů přichází v následném nanesení matrice a měření pomocí MALDI MS (Obr. 10, str. 26)<sup>35,61</sup>.

V této diplomové práci je zkoumána možnost využití *in situ* imunoprecipitace PCT na imunoafinitních površích a MALDI ToF MS při klinické diagnostice sepse.

## 2.4 Sepse

Sepse je velice častým a smrtelným onemocněním. Každoroční náklady spojené s její léčbou jsou velmi vysoké. Robustní epidemiologická hodnocení předpokládají, že se každoročně vyskytne 31,5 milionů případů sepse, z nichž přibližně 5,3 milionu končí smrtí. Míra nemocniční smrtnosti u pacientů trpících sepsí se odhaduje až na 35,3 %<sup>72</sup>. Včasné a správné diagnostikování pacientů, kteří jsou rizikováni, je klíčové pro snížení úmrtnosti a celkové zlepšení patientské péče<sup>73</sup>.

Na začátku se sepsa projevuje jako masivní uvolnění zánětlivých mediátorů (někdy označované jako „cytokinová bouře“)<sup>73,74</sup>. Složky vrozeného imunitního systému (epitelové buňky, makrofágy, žírné buňky a vrozené lymfocyty) v místě expozice patogenu aktivují a shromažďují cirkulující imunitní buňky (neutrofilie, NK buňky, dendritické buňky, monocyty a eozinofily). Tyto buňky mají na svém povrchu receptory, kterými jsou schopny rozpoznávat patogeny. Receptory dávají buňkám schopnost být aktivovány přítomností určitého molekulárního vzoru, který je asociován s patogenem<sup>73,74</sup>. Rozpoznávanými vzory mohou být např. molekuly přítomné na bakteriální buněčné stěně nebo molekuly uvolňující se při poškození vlastní tkáně. Molekulární vzor poškozené tkáně jsou molekuly těla vlastní, které jsou uvolněny vlivem poškození způsobeného např. během napadení patogenem, popálení nebo fyzickém traumatu. Aktivované imunitní buňky jsou pak schopny vázat tyto molekulární vzory<sup>73,74</sup>.

Tato vazba na receptor iniciuje intracelulární signální kaskádu v daných cirkulujících imunitních buňkách<sup>73,74</sup>. Signální kaskáda má za následek aktivaci transkripčních faktorů např. NF- $\kappa$ B a aktivační protein 1, které následně vedou k produkci několika reaktantů akutní fáze. Mezi tyto reaktanty patří cytokiny, koagulační faktory a inducibilní NOsynthasy. Syntézou reaktantů akutní fáze se iniciuje imuno-zánětlivá kaskáda<sup>73,74</sup>.

Následná řetězová reakce zahrnuje aktivaci adaptivního imunitního systému. Skoková aktivace adaptivní imunitní reakce v kombinaci s výslednou „cytokinovou bouří“ jsou považovány za příčinu septického šoku<sup>74</sup>.

Výsledná odpověď imunitního systému je často kombinací pro- a proti-zánětlivých kaskád. Jakmile infekce ustoupí, utvoří se rovnováha mezi imunitu podporujícími

a tlumícími procesy. Výsledkem je vytvoření imunitní paměti, která chrání před budoucími konfrontacemi s patogenem, kterému byl organismus již vystaven<sup>75</sup>. Pokud je však počáteční imunitní reakce na expozici patogenu nadměrná nebo nedostatečně regulovaná, může tento vyrovnávací proces ztratit účinnost. Pokud sepse trvá přibližně 24–48 hodin, je pozorováno překlenutí do protizánětlivé fáze. U těchto pacientů se vyvinou příznaky odpovídající imunoparalýze. Tato fáze je známa pod názvem „sepsí vyvolaná imunoparalýza“<sup>75</sup>.

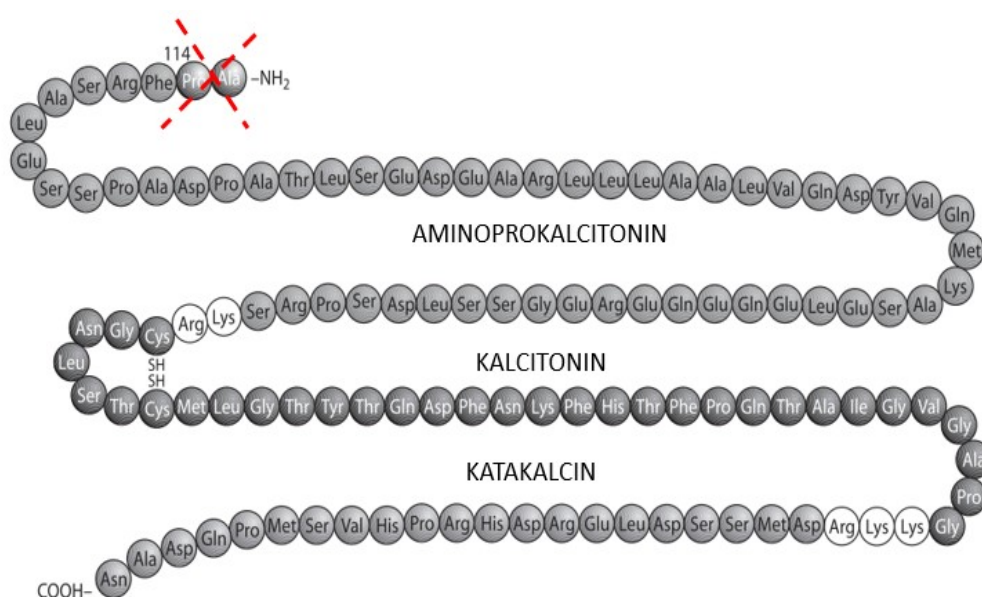
Většina úmrtí související se septickým šokem nastává právě během fáze imunoparalýzy. Pacienti nejsou během imunoparalýzy schopni porazit počáteční infekci, a navíc jsou náchylní k nozokomiálním infekcím<sup>76,77</sup>. Nozokomiální infekce představují nežádoucí komplikace během zdravotnické péče a nastávají především u pacientů na jednotkách intenzivní péče. Vyčerpání T-buněk, apoptóza a anergie jsou pozorovanými projevy imunoparalýzy u pacientů s fatální sepsí<sup>76,77</sup>.

Terminologie kolem různých stupňů zánětlivé odpovědi organismu se neustále vyvíjí. V článku z roku 2016, ve kterém autoři ze zhruba 5 000 anglicky psaných článků věnujících se tématice sepse nebo jí blízké postulovali následující definice<sup>78</sup>. Definice jsou seřazeny dle stupně závažnosti, který představují, od nejméně závažného až po fatální. **Syndrom systémové zánětlivé odpovědi** – představuje stav pacienta, který má teplotu > 38 °C nebo < 36 °C, tep je méně než 90 úderů za minutu a má menší či větší množství bílých krvinek, než je norma. **Sepse** – život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená špatnou regulací imunitního systému pacienta v reakci na infekci. **Těžká seps** – seps s prokázanou akutní dysfunkcí orgánu (projevuje se např. hypotenzí, laktátovou acidózou, zvýšeným množstvím kreatininu nebo bilirubinu v séru atd.). **Septický šok** – seps spolu s potřebou vazopresorové terapie ke zvýšení středního arteriálního tlaku a udržení laktátu ve správných hodnotách, a to i přes adekvátní fluidní resuscitaci<sup>78</sup>.

Jak již bylo zmíněno, rychlost diagnózy sepse je ve většině případů rozhodujícím faktorem mezi životem a smrtí. Přestože projevy sepse se u jednotlivých pacientů mohou značně lišit, objevily se projevy a biomarkery (*kap. 2.6, str. 33*), které pomáhají sepsi i její míru odhalit včas<sup>73,78,79</sup>. Mezi biomarkery, které se používají, patří protein prokalcitonin (*kap. 2.5*)<sup>80</sup>.

## 2.5 Prokalcitonin

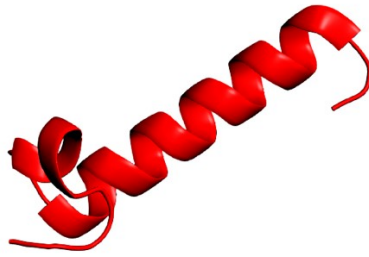
Prokalcitonin (PCT) je prekurzorovým proteinem hormonu kalcitoninu (CT)<sup>81</sup>. Samotný protein, který vznikne translací mRNA genu pro kalcitonin, má délku sekvence 116 aminokyselin (AK), ale vlivem rychlého štěpení dipeptidasami se aminokyselinová sekvence zkrátí na 114 AK. Prokalcitonin o molekulové hmotnosti 12 628 Da je možné identifikovat v lidské oběhové soustavě<sup>81-83</sup>. Jeho prostorová struktura nebyla doposud prozkoumána. Schéma aminokyselinové sekvence včetně umístění disulfidového můstku a míst, ve kterých dochází ke štěpení na jednotlivé menší peptidy, je zobrazeno na *Obr. 12*.



*Obr. 12* – Schématická ilustrace lidského PCT. Prokalcitonin i peptidy, kterými je tvořen, je možné nalézt volně se vyskytující v lidském séru. Počáteční forma PCT je o 2 AK (přeškrnuty červeně přerušovaně) delší než jeho forma výsledná. To je způsobeno vlivem dipeptidas velice krátce po jeho sekreci. Samotný PCT je pak štěpen na prekurzor kalcitoninu, ze kterého dalším štěpením vzniká kalcitonin. Dalšími štěpnými produkty jsou aminoprokalcitonin a katakalcin, který je dnes známý jako kalcitoninkarboxypeptid I. Upraveno dle<sup>82</sup>.

Po translaci mRNA genu pro kalcitonin je PCT enzymaticky štěpen na menší peptidy. Výsledkem štěpení je protein kalcitonin, který obsahuje 32 aminokyselin<sup>83</sup>. Prostorová struktura kalcitoninu byla vyřešena metodou NMR<sup>84</sup> (*Obr. 13*, str. 32). Dalšími štěpnými produkty jsou aminoprokalcitonin a katakalcin, který je dnes lépe známý jako kalcitoninkarboxypeptid I (cit. <sup>81-83</sup>).





Obr. 13 – Prostorová struktura kalcitoninu zjištěna pomocí NMR. Upraveno dle souboru PDB 2JXZ (cit.<sup>84</sup>).

Objev kalcitoninu byl publikován v roce 1962 (cit.<sup>85</sup>). Název proteinu je odvozen od jeho funkce při hyperkalcémii, při které dochází ke snižování koncentrace vápenatých iontů v krevním oběhu<sup>86</sup>. Původně bylo mylně předpokládáno, že prohormon kalcitoninu je produkován příštítnými tělísky, ale nakonec bylo zjištěno, že PCT, a tedy i CT jsou produkovány C-buňkami štítné žlázy<sup>87</sup>. Po jeho objevu bylo předpokládáno, že CT hraje významnou roli při kosterní homeostáze<sup>86</sup>. Později se však prokázalo u pacientů, kteří podstoupili tyreoidektomii, že absence CT nemá signifikantní vliv na změnu hustoty kostí<sup>88</sup>. Předpokládá se, že CT měl evolučně důležitou roli ochrany kostí v případě stresu vznikajícího nedostatkem vápníku. Změny v jeho aminokyselinové sekvenci během evoluce pak měly efekt ztráty aktivity. Ukazuje se tedy, že se nejedná o esenciální hormon<sup>89</sup>.

Předmětem této diplomové práce je však jeho prohormon prokalcitonin. Vzhledem k několikanásobnému růstu koncentrace PCT v lidském séru během sepse je hojně využíván v klinické diagnostice jako biomarker<sup>80,82,90</sup>. Byly provedeny i vědecké studie, které se zabývali terapeutickými účinky regulace PCT v organismu.

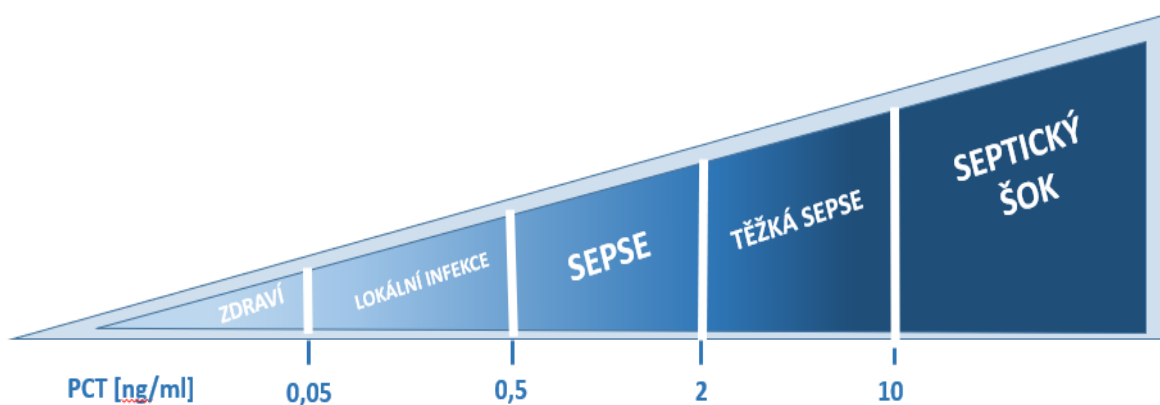
Prokalcitonin pravděpodobně s dalšími prekurzory kalcitoninu přispívá ke škodlivým účinkům systémové infekce. Podání PCT septickým křečkům s peritonitidou zdvojnásobilo jejich úmrtnost. Úmrtnost křečků dosáhla 90 % (cit. <sup>91,92</sup>). Dále studie, která využila k léčbě hodinovou intravenózní imunoneutralizaci antisérem reagujícím specificky s prasečím PCT, zlepšila metabolické a fyziologické parametry septických prasat a výrazně zvýšila jejich krátkodobé přežití<sup>93</sup>. Několik pozorování naznačuje, že PCT není jen prekurzorem pro biosyntézu CT, ale také při vysokých koncentracích, ve kterých se vyskytuje během sepse, je potenciálně škodlivým mediátorem zapojeným do septické odpovědi. Ukázalo se, že PCT působí jako modulátor



zánětlivé/imunologické odpovědi hostitele<sup>94</sup>. Koncentrace CT v séru navzdory několikanásobně vyšší koncentraci PCT neroste<sup>82,95</sup>. Dále bylo zjištěno, že se množství prekursorů kalcitoninu v lidském séru zvyšuje velmi často při zjevné sepsi s časným nástupem. Vlastnosti PCT z něj dělají vhodný diagnostický ukazatel<sup>82</sup>.

## 2.6 Prokalcitonin v klinické diagnostice

Během sepse, systémové infekce nebo během těžkého zánětu se může množství PCT v krevním oběhu zvýšit deset až tisíckrát oproti normálním podmínkám. Jeho koncentrace může vzrůst ze setin ng/ml až na hodnoty nad 100 ng/ml (cit. <sup>96,97</sup>). Tento trend je možné pozorovat kromě člověka i u některých zvířecích druhů např. křečků nebo prasat<sup>91-93</sup>. Hodnoty PCT v lidském séru bezpochyby rostou nejvíce během sepse. Nárůst hodnot (hyperkalcitoninémie) však můžeme pozorovat například i během zápalu plic<sup>98</sup>, akutním poranění dýchacích cest nebo popáleninách<sup>99</sup>. Hyperkalcitoninémie je projevem také dalších těžkých infekcí nebo zánětů jako je například pankreatitida<sup>100</sup>, popáleniny<sup>99</sup>, apendicitida<sup>101</sup>, úpal<sup>102</sup> nebo rozsáhlé chirurgické operace<sup>103</sup>. Obecně lze tvrdit, že u lidí a experimentálních zvířat koreluje koncentrace se závažností daného zdravotního stavu (*Obr. 14*) a zůstává zvýšená během zánětlivých procesů. Nejvyšší hyperkalcitoninémie je bezpochyby během sepse. Lze také tvrdit, že u většiny virových nákaz je hyperkalcitoninémie menší než u nákaz bakteriálních<sup>97</sup>.



*Obr. 14* – Schématické zobrazení závislosti závažnosti sepse v korelaci se zjištěnou koncentrací PCT v lidském séru. Při velice těžkých průbězích onemocnění s dodatečnými komplikacemi lze naměřit koncentrace PCT > 100 ng/ml. Vytvořeno dle<sup>104</sup>.

Hodnoty PCT během akutních stavů se nemění. Lze však díky poklesu hyperkalcitoninémie pozorovat zlepšující se terapii pacientů, kteří trpěli akutním infekčním onemocněním<sup>105</sup>. Je však důležité podotknout, že během septického procesu mohou nastat komplikace, jakými jsou např. hypotenze, šok, srdeční selhání, respirační nedostatečnost nebo diseminovaná vaskulární koagulace. Tyto podmínky výrazně ovlivňují průběh a konečný výsledek onemocnění, aniž by samy o sobě ovlivňovaly hladiny PCT<sup>97</sup>.

Během sepse dochází k syntéze PCT mimo jiné i v tkáních mimo C-buňky štítné žlázy<sup>83,106</sup>. Během sepse je také možné, že dochází ke štěpení PCT vlivem septického prostředí s vysokou koncentrací proteas<sup>83</sup>. Bohužel k této tématice nebylo provedeno doposud mnoho studií.

Pro ilustraci kvality PCT jakožto biomarkeru je dobré jeho porovnání s jedním z nejpoužívanějších biomarkerů zánětlivé bakteriální odpovědi – C-reaktivním proteinem (CRP)<sup>107</sup>. C reaktivní protein je protein akutní fáze syntetizovaný játry<sup>108</sup>. Koncentrace CRP v krvi začne stoupat 4–6 hodin po zánětlivém podnětu a dále se zdvojnásobuje každých 8 hodin. Horní hranice dosahuje během 36–50 hodin<sup>90,107,108</sup>. Ve srovnání s CRP může PCT nabídnout několik vlastností, které jsou vhodné při klinické diagnostice sepse. Nástup koncentrace PCT je rychlejší a nabývá horní hranice 24 hodin od vystavení infekci. S rychlejším nástupem PCT je také spojen jeho rychlejší pokles, při správném průběhu léčby<sup>97</sup>. Prokalcitonin je některými vědci shledáván také jako mnohem citlivější biomarker prognózy sepse<sup>90,92,109</sup>.

Vzhledem ke své specifitě je brán v úvahu i potenciál PCT jako vodítka správnosti nasazení antibiotik při léčbě, ale výsledky a názory výzkumů se liší v závislosti na dalších okolnostech průběhu zánětlivého onemocnění<sup>110</sup>. V následující kapitole jsou shrnuty možné metody pro stanovení koncentrace PCT.

### 2.6.1 Současné metody stanovení prokalcitoninu nejen v klinické diagnostice

Všechny v současnosti dostupné testy pro kvantifikaci PCT jsou založeny na analýze pomocí protilátek<sup>90</sup>. Prvním komerčně dostupným testem byl BRAHMS PCT LIA® od firmy Thermo Fisher. Jedná se o manuální luminometrický imunotest. Následně byl vyvinut rychlejší a citlivější automatizovaný test známý jako BRAHMS PCT Kryptor® (cit. <sup>104</sup>). Kryptor® je prvním testem, který byl schválen v roce 2008 Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv pro použití při diagnóze těžkých sepsí a septického šoku<sup>90</sup>.

Následně vzniklé metody pro diagnostiku PCT byly vyvinuty firmou Thermo Fisher BRAHMS ve spolupráci s dalšími diagnostickými společnostmi<sup>90</sup>. Jednotlivé platformy se liší ve vlastnostech (rozsah měření, funkční citlivost) a v použité imunoluminometrické technologii, (imunofluorescenční, chemiluminiscenční, elektrochemiluminiscenční)<sup>90</sup>. Další metodou stanovení PCT v klinické diagnostice je imunoturbidimetrický test s protilátkou proti PCT navázanou na latexové částice vyvinutá společností Diazyme Laboratories<sup>90,111</sup>. Imunoturbidimetrický test nevyžaduje speciální instrumentaci a je kompatibilní s přístroji, které se běžně vyskytují v klinických laboratořích, např. spektrofotometr<sup>90,111</sup>.

Mezi další komerčně dostupné testy patří tzv. „point of care“ test BRAHMS PCT-Q. Jedná se o testovací proužek, který využívá imunochromatografii<sup>112</sup>. Barevný proužek se objeví během 30 minut po aplikaci 200 µl séra nebo plasmy. Je možné porovnat intenzitu vzniklého proužku s referenční kartou. Výsledkem testu jsou mezní hodnoty s přibližným charakterem<sup>112</sup>.

### 3 Cíle práce

- 1) Příprava imunoafinitních povrchů s imobilizovanou protilátkou proti prokalcitoninu metodou měkkého přistávání iontů za atmosférického tlaku.
- 2) Nabohacení rekombinantního prokalcitoninu z komplexní matrice, stanovení detekčního limitu a koeficientu variace měření pomocí MALDI ToF MS.
- 3) Stanovení prokalcitoninu v séru septických pacientů.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Použité chemikálie

0,5M kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	<i>Thermo Scientific, USA</i>
1,4-dithiotreitol (DTT)	<i>Serva, Německo</i>
10× tris, glycin, SDS pufr	<i>Bio-Rad, USA</i>
2,5-dihydroxyacetofenon (DHAP)	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>
4× Laemmli vzorkový pufr pro SDS elektroforézu	<i>Bio-Rad, USA</i>
acetonitril, LiChrosolv® hypergrade LC-MS	<i>Merck, Německo</i>
blokátor pro western blot	<i>Bio-Rad, USA</i>
cytochrom C z hovězího srdce	<i>Merck, Německo</i>
diamoniumhydrogencitrát	<i>Fluka Analytical, Švýcarsko</i>
dihydrogenfosforečnan draselný	<i>Lach-Ner, ČR</i>
dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	<i>Lach-Ner, ČR</i>
ethanol Uvasol® pro spektroskopii	<i>Merck, Německo</i>
glycin	<i>Carl Roth, Německo</i>
hydrogenuhlíčan amonný	<i>Merck, Německo</i>
chlorid draselný	<i>Merck, Německo</i>
chlorid sodný	<i>Lach-Ner, ČR</i>
jodoacetamid	<i>Thermo Scientific, USA</i>
ko-imunuprecipitační komerční sada Dynabeads™	<i>Thermo Scientific, USA</i>
kozí protilátka proti myši s křenovou peroxidasou # H2213	<i>Santa Cruz Biotechnology, USA</i>
kyselina kumarová	<i>Merck, Německo</i>
kyselina octová HPLC	<i>Merck, Německo</i>
kyselina sinapová (SA)	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>
kyselina trifloroctová	<i>Merck, Německo</i>
LC-MS voda LiChrosolv®	<i>Merck, Německo</i>
luminol pro western blot	<i>Thermo Scientific, USA</i>

methanol, LiChrosolv® hypergrade LC-MS	<i>Merck, Německo</i>
monoklonální protilátka proti prokalcitoninu # 10-7943; # 10-7944	<i>Fitzgerald, USA</i>
myoglobin z koňského srdce	<i>Merck, Německo</i>
proteinový standard 10–250 kDa All Blue	<i>Bio-Rad, USA</i>
peptidový kalibrační standard II	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>
peroxid vodíku 30 %	<i>Fluka Analytical, Švýcarsko</i>
rekombinantní protein prokalcitonin exprimovaný v <i>E. Coli</i> # AP-18-066	<i>BioVendor, ČR</i>
tris(hydroxymethyl)amoniummethan (Tris)	<i>Bio-Rad, USA</i>
trypsin Gold	<i>Promega Global, USA</i>
tween® 20	<i>Merck, Německo</i>

U všech chemických látek, u kterých není napsána čistota, se předpokládá nejvyšší čistota vhodná pro danou metodu, při které jsou používány.

#### 4.1.1 Použité pufrы

- pufr pro depozici protilátky na povrch:  
50 mmol·dm<sup>-3</sup> hydrogenuhličitan amonný, pH 7,8
- pufr pro oplach povrchů 1× PBS, pH 7,4:  
137 mmol·dm<sup>-3</sup> chlorid sodný; 2,7 mmol·dm<sup>-3</sup> chlorid draselný; 10 mmol·dm<sup>-3</sup> hydrogenfosforečnan sodný; 1,8 mmol·dm<sup>-3</sup> dihydrogenfosforečnan sodný
- komerčně dostupný vzorkový pufr 4× Laemmli pro SDS elektroforézu (Bio-Rad, Německo)
- komerčně dostupný TGS pufr pro SDS elektroforézu (Bio-Rad, Německo)
- přenosový pufr pro polosuchý (z angl. *semi-dry*) western blot:  
48 mmol·dm<sup>-3</sup> Tris, 39 mmol·dm<sup>-3</sup> glycin, 20 % (v/v) methanol, pH 9,2
- pufr pro přípravu roztoku western blot blokátoru 1× TBST:  
20 mmol·dm<sup>-3</sup> Tris, 150 mmol·dm<sup>-3</sup> NaCl, 0,1 % (w/v) Tween® 20, vodný roztok

## 4.2 Použité vzorky

Vzorky lidského séra zdravých jedinců a septických pacientů poskytla Laboratoř antibiotické resistance a aplikací hmotnostní spektrometrie v mikrobiologii, Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni pod vedením doc. Ing. Jaroslava Hrabáka, Ph.D. a Klinika infekčních nemocí 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Ústřední vojenské nemocnice pod vedením prof. MUDr. Michala Holuba, Ph.D.

## 4.3 Použité přístroje a pomůcky

analytické váhy	<i>Mettler Toledo, Švýcarsko</i>
automatické pipety	<i>Mettler Toledo, Švýcarsko</i>
centrifuga 5424 R	<i>Eppendorf, Německo</i>
depoziční zařízení	<i>Mikrobiologický ústav AV ČR, ČR</i>
elektroforetická souprava Mini PROTEAN® Tetra Cell	<i>Bio-Rad, USA</i>
fluorimetr/spektrofotometr DS-11 FX+	<i>DeNovix, USA</i>
hmotnostní spektrometr MALDI/FT-ICR 15T solariX XR ESI MALDI	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>
hmotnostní spektrometr MALDI/ToF Autoflex speed	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>
komerčně dostupné gely pro SDS elektroforézu 4-15 % Mini-Protean® TGX™	<i>Bio-Rad, USA</i>
koncentrátor RC 10-10	<i>Jouan, Francie</i>
laminární box biohazard BSC-EN 2-4	<i>MERCI, ČR</i>
magnetická míchačka Mono Direct	<i>H+P Labortechnik, Německo</i>
mikrostříkačka Hamilton 250 µl	<i>Hamilton, Švýcarsko</i>
nitrocelulosová membrána o pórovitosti 0,2 µm	<i>Bio-Rad, USA</i>
software PEAKS Studio	<i>Bioinformatics Solutions, Kanada</i>
pH metr Orion2 Star	<i>Thermo Scientific, USA</i>
předvážky EMB 1000-2	<i>Kern, Německo</i>
rotator Bio RS-24	<i>Biosan, Litva</i>
skleněné povrchy s oxidem india a cínu (ITO; In <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /SnO <sub>2</sub> )	<i>Bruker Daltonics, Německo</i>

sonikační lázeň Sonorex RK52H	<i>Bandelin, Německo</i>
stolní centrifuga miniSpin	<i>Eppendorf, Německo</i>
Vortex Wizard	<i>Velp Scientifica, Itálie</i>
Western blot přenosová cela Trans-Blot® SD	<i>Bio-Rad, USA</i>
zdroj napětí PowerPac™ HC	<i>Bio-Rad, USA</i>
zobrazovací systém s CCD kamerou	<i>Bio-Rad, USA</i>
ChemiDoc™ MP	

## 4.4 Použité metody

### 4.4.1 Práce s imunoafinitními povrchy

#### 4.4.1.1 Příprava imunoafinitních povrchů

Komerčně dostupné skleněné povrchy ITO byly modifikovány protilátkou proti PCT. Povrch s maskou nalepenou na jeho vodivé straně byl umístěn do přístroje pro depozici metodou měkkého přistávání za atmosférického tlaku. Použití masky umožňuje modifikovat rozměr, rozmístění a velikost pozic. V tomto experimentu byla na jednom ITO skleněném povrchu (75 × 25 × 1,1 mm) umístěna maska s pozicemi ve dvou řadách po osmi o průměru pozice 2 mm. Středů jednotlivých pozic byly od sebe vzdáleny 9 mm. Všechny údaje, kromě velikosti bodu, spolu s dobou setrvání na jedné pozici (v sekundách) byly zadány do programu ovládající posuvný modul přístroje.

Protilátka proti PCT byla ředěna v 50 mmol·dm<sup>-3</sup> hydrogenuhličitanu amonném (pH 7,8) na výslednou koncentraci 0,6 mg/ml. Pumpou s 250 μl mikrostríkačkou byl roztok protilátky dopraven do kapiláry s průměrem 20 μm, průtokovou rychlostí 1 μl·min<sup>-1</sup>. Na spojení s kapilárou elektrospreje bylo přiváděno napětí +1,5 kV z vnějšího vysokonapěťového zdroje. Jako nosný plyn byl využit plynný dusík, který byl přehříván na teplotu 45 °C. K dehydrataci vzniklých iontů sloužila desolvatační trubice o délce 10 cm a průměru 4 mm. Desolvatační trubice byla uzemněná a vyhřátá na 45 °C. Kladně nabitě ionty po průchodu desolvatační trubicí byly deponovány na skleněný ITO povrch, na který bylo vloženo napětí -1,5 kV pomocí externího zdroje vysokého napětí. Doba depozice na každou pozici byla 300 s. Po dokončení depozice byly modifikované pozice zvýrazněny z nevodivé strany permanentním popisovačem. Po odstranění masky byl modifikovaný ITO skleněný povrch opláchnut 3× krátce destilovanou vodou v Petriho misce. Po oplachu se povrch nechal uschnout.

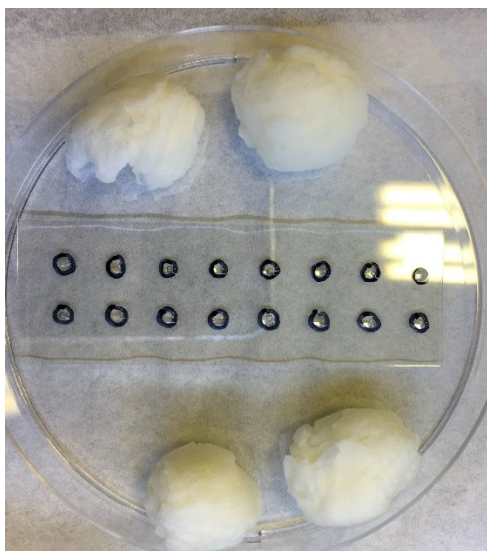


#### 4.4.1.2 Nabohacení prokalcitoninu na imunoafinitních površích

Pacientské sérum a sérum s přidáním rekombinantním proteinem o různých koncentracích byly zpracovány dle postupu srážení pomocí acetonitrilu (*kap. 4.4.2.2, str. 42*). Pro nabohacení PCT na imunoafinitních površích bylo použito 100  $\mu$ l séra.

Lyofilizovaný supernatant vzniklý po acetonitrilovém srážení byl rozpuštěn v 6  $\mu$ l LC-MS vody a sonikován po dobu 3 minut. Roztok byl centrifugován pomocí stolní mikrocentrifugy miniSpin při 5 000 $\times$  g za laboratorní teploty po dobu 20 s.

Dva mikrolitry vzorku byly nanесeny na pozici na modifikovaném ITO povrchu a inkubovány ve vlhké komoře, která byla vytvořena v Petriho misce použitím mokrých ubrousků (*Obr. 15*), po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě.



*Obr. 15* – In situ nabohacení PCT na imunoafinitním povrchu s imobilizovanou protilátkou. Povrch byl umístěn do Petriho misky spolu s vodou vlhčenými papírovými ubrousky, aby nedošlo k odpaření vzorku během inkubace.

Kapka vzorku po inkubaci byla z jednotlivých pozic opatrně odsáta bezprašným ubrouskem, aniž by došlo ke kontaktu ubrousku s povrchem. Po odsátí vzorku z pozice byl celý povrch promyt 3 $\times$  po dobu 3 minut 1 $\times$  PBS pufrem (pH 7,4). Následně byl povrch krátce promyt destilovanou vodou a ponechán uschnout.

Na suchý povrch byl nanесen 1  $\mu$ l matrice 2,5-dihydroxyacetofenon (DHAP), která byla připravena dle návodu výrobce<sup>12</sup>. Roztok matrice byl při nanášení na pozici 7 $\times$  promíchán opakovaným nasátím a vypuzením pomocí automatické pipety. Takto připravený povrch byl vložen do hmotnostního spektrometru s MALDI ionizací (*kap. 4.4.9, str. 47*).

#### 4.4.2 Optimalizace způsobu srážení séra obsahující prokalcitonin

Pro optimalizaci protokolu srážení séra obsahujícího PCT, které vedlo k zakoncentrování PCT ve vzorku, byly vyzkoušeny dvě metody.

Pro obě metody srážení lidského séra byl použit roztok rekombinantního PCT o koncentraci 14 µg/ml v lidském séru, které bylo připravené smícháním čtyř sér zdravých jedinců v poměru 1 : 1 : 1 : 1 (v, v).

##### 4.4.2.1 Srážení pomocí 0,1% roztoku kyseliny trifluoroctové v acetonitrilu

Sto mikrolitrů séra obsahující rekombinantní prokalcitonin bylo smícháno s 200 µL 0,1% roztoku kyseliny trifluoroctové (TFA) v acetonitrilu. Vzorek byl promíchán pomocí vortexu po dobu 15 s. Pro oddělení sraženiny byla použita centrifugace za teploty 4 °C po dobu 5 minut při 9 000× g. Supernatant byl odebrán pomocí automatické pipety a dále lyofilizován v koncentrátoru RC 10-10. Pelet i lyofilizovaný supernatant byly uchovány při -80 °C pro další použití.

##### 4.4.2.2 Srážení pomocí acetonitrilu

Sto mikrolitrů séra obsahující rekombinantní PCT bylo smícháno s LC-MS vodou v poměru 1 : 2 (sérum:voda) a promícháno pomocí vortexu po dobu 15 s. Následně byl přidán LC-MS acetonitril v poměru 1 : 4,5 (sérum:acetonitril). Po přidání acetonitrilu byl roztok se vzniklou sraženinou znovu promíchán pomocí vortexu po dobu 15 s. Promíchaný roztok se sraženinou byl vložen do ultrazvukové vodní lázně po dobu 10 min a nízká teplota byla udržována přidáváním ledové tříště. Tento krok byl následně jedenkrát zopakován. Po vyjmutí vzorku následovalo další promíchání pomocí vortexu po dobu 15 s. Vzorek byl centrifugován za teploty 4 °C po dobu 10 min při 6 000× g. Supernatant byl oddělen od pelety pomocí automatické pipety. Supernatant byl vysušen lyofilizací za použití koncentrátoru RC 10-10. Pelet a lyofilizát supernatantu byly uskladněny při -80 °C pro další použití.

#### 4.4.3 Validace protokolu srážení séra obsahující prokalcitonin za využití metody western blot

K ověření účinnosti nabohacení rekombinantního prokalcitoninu přidaného do lidského séra byla využita metoda imunobarvení v kombinaci s SDS elektroforézou a western blotem.

#### 4.4.3.1 Elektroforetická separace vzorků v polyakrylamidovém gelu v denaturujícím prostředí SDS

Vzorky pro SDS elektroforézu v polyakrylamidovém gelu byly připraveny rozpuštěním jednotlivých produktů srážení séra.

Produkty srážení byly opětovně rozpuštěny ve 100  $\mu$ l 1 $\times$  Laemmli pufru, vloženy do ultrazvukové lázně po dobu 5 minut a následně centrifugovány po dobu 1 minuty při 5 000 $\times$  g a 4 °C. Před nanesením na gel byly vzorky ředěny 1 $\times$  Laemmli pufrém. Supernatant byl ředěn 1 : 1 (v, v) a pelet 1 : 9 (v, v).

Vzorky (10  $\mu$ l) byly nanесeny na komerčně dostupný gradientový gel 4-15% Mini-Protean® TGXTM. Elektroforetická separace na polyakrylamidovém gelu byla provedena v prostředí 1 $\times$  TGS pufru.

Elektroforetická separace byla provedena po dobu přibližně 55 minut. Prvních 10 minut při napětí 100 V, které bylo následně zvýšeno na 140 V.

#### 4.4.3.2 Přenos na nitrocelulóзовou membránu po elektroforetické separaci

Po elektroforetické separaci vzorků v polyakrylamidovém gelu následoval přenos na nitrocelulosovou membránu. Nitrocelulosová membrána 0,2  $\mu$ m byla na 10 minut vložena spolu s filtračním papírem určeným pro western blot do přenosového „semi-dry“ pufru.

Polyakrylamidový gel byl umístěn mezi filtrační papíry a spolu s nimi vložen do cely pro polosuchý přenos western blot. Přenos probíhal 1 hodinu při napětí 15 V.

#### 4.4.3.3 Imunobarvení

Membrána byla po vyjmutí z cely 1 hodinu blokována v 5% roztoku blokátoru pro western blot v 1 $\times$  TBST pufru. Po blokaci následovala inkubace přes noc při 4 °C s primární monoklonální protilátkou proti PCT o koncentraci 0,4  $\mu$ g/ml v 5% roztoku blokátoru v 1 $\times$  TBST pufru.

Membrána po inkubaci s primární protilátkou byla 3 $\times$  10 minut promyta v 1 $\times$  TBST pufru. Následovala inkubace za pokojové teploty po dobu 45 minut v roztoku kozí proti myší sekundární protilátky o koncentraci 2,5  $\mu$ g/ml v 1% roztoku blokátoru v 1 $\times$  TBST pufru.

Membrána byla po inkubaci se sekundární protilátkou promyta 3× 5 minut v 1× TBST puftru.

Pro vizualizaci byly připraveny 2 roztoky. **Roztok A:** 0,7 mmol·dm<sup>-3</sup> roztoku peroxidu vodíku v 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> vodném roztoku Tris, pH 8,8. **Roztok B:** 0,4 mmol·dm<sup>-3</sup> kyselina kumarová, 2,5 mmol·dm<sup>-3</sup> luminol v 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> vodném roztoku Tris, pH 8,8.

Roztok A byl smíchán s roztokem B v poměru 1 : 1 (v, v). Nitrocelulosevá membrána byla ve vzniklém roztoku inkubována po dobu 20–40 sekund. Následně byla vložena do zobrazovacího systému se CCD kamerou ChemiDoc™ MP. Systém byl nastaven na snímací mód western blot chemiluminiscence se zachycením snímku každých 5 s po dobu 2 minut. Proteinový marker na nitrocelulosevé membráně byl zachycen v módu kolorimetrie.

Vyhodnocení bylo provedeno za použití softwaru Image Lab™.

#### 4.4.4 Stanovení limitu detekce a koeficientu variace

Limit detekce PCT byl stanoven pomocí rekombinantního PCT přidaného do lidského séra pro oba způsoby přípravy vzorků zahrnující: 1) přímé nanesení séra na modifikovaný povrch a 2) prekoncentraci vzorku pomocí acetonitrilového srážení.

Koncentrace rekombinantního PCT v séru byla v případě přímého nanesení vzorku na povrch: 126; 42; 14; 4,7; 1,6 a 0,6 µg/ml a v případě acetonitrilového srážení 14 000; 1 400; 140; 14 a 7 ng/ml.

Koeficient variace byl určen z měření 26 vzorků sér s přidaným rekombinantním PCT o koncentraci 140 ng/ml.

#### 4.4.5 Izolace prokalcitoninu ze séra septických pacientů pomocí ko-immunoprecipitace na magnetických kuličkách

K identifikaci forem prokalcitoninu byla použita metoda ko-immunoprecipitace magnetickými kuličkami z komerční sady Dynabeads™. Ověření funkčnosti magnetických kuliček bylo provedeno na vzorcích séra s přidaným rekombinantním PCT. Všechny vzorky séra byly připraveny dle protokolu acetonitrilového srážení (*kap. 4.4.2.2, str. 42*).

#### 4.4.5.1 Imobilizace protilátky proti prokalcitoninu na magnetické kuličky

Na analytických vahách bylo naváženo přibližně 7,5 mg magnetických kuliček Dynabeads™. Kuličky byly promyty opakovaným nasátím a vypuzením automatickou pipetou 1 ml roztoku C1. V magnetickém stojánku byly kuličky odděleny na stěnu mikrozkuhavky a roztok byl odebrán automatickou pipetou.

Ke kuličkám byl následně přidán roztok C1 s protilátkou (365 µl roztoku C1 + 10 µl protilátky o koncentraci 5 mg/ml). Kuličky byly několikrát promíchány s roztokem C1 s protilátkou automatickou pipetou. Následovalo přidání 375 µl roztoku C2. Takto připravené kuličky v roztoku C1 + C2 + protilátka byly míchány za pokojové teploty na rotátoru 16–24 hodin.

#### 4.4.5.2 Nabohacení prokalcitoninu ze vzorku séra pomocí magnetických kuliček

Po odebrání kapalně fáze bylo ke kuličkám přidáno 800 µl HB roztoku a následně 800 µl LB roztoku. Magnetické kuličky byly dvakrát promyty 800 µl SB roztokem. Následně bylo k magnetickým kuličkám přidáno 800 µl čerstvého SB roztoku. Kuličky v roztoku byly míchány 15 minut na rotátoru za laboratorní teploty.

Po promíchání kuliček na rotátoru byla celá suspenze přenesena do nové mikrozkuhavky, u které dochází k menšímu navázání proteinů na stěny než u běžných mikrozkuhovek (Lo-Bind). K oddělení kapalně fáze suspenze byl znovu použit magnetický stojánek a automatická pipeta. Následně byly kuličky krátce promyty 2× 800 µl 0,1% roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) v 1× PBS pufru.

Vzorky séra po acetonitrilovém srážení byly rozpuštěny v 800 µl 0,1% BSA v 1× PBS pufru. Pro snadnější rozpuštění byla použita ultrazvuková vodní lázeň po dobu 3 min. Vzorky byly přidány k magnetickým kuličkám a inkubovány po dobu 30–45 minut za stálého míchání pomocí rotátoru při teplotě 4 °C.

Po 30 min inkubaci vzorků byla v magnetickém stojánku odstraněna kapalně fáze. Zbylé kuličky byly promyty 3× 900 µl 0,1% BSA v 1× PBS. Následně bylo ke kuličkám přidáno 900 µl 1× LWB roztoku a za stálého míchání na rotátoru byly kuličky ponechány 5 minut. Po promíchání byla suspenze kuliček s roztokem LWB přenesena do nové „Lo-Bind“ mikrozkuhavky. Kapalně fáze byla znovu odstraněna

v magnetickém stojánku. Magnetické kuličky byly následně promyty 3× 900 µl roztokem 1× LWB.

#### 4.4.5.3 Eluce prokalcitoninu z magnetických kuliček

Po odstranění kapalné fáze v magnetickém stojánku bylo přidáno 250 µl elučního pufru (0,5 mmol·dm<sup>-3</sup> kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), 0,2 mol·dm<sup>-3</sup> hydroxid amonný v LC-MS vodě). Eluce probíhala po dobu 20 minut při 4 °C za stálého míchání. Po odebrání eluátu od magnetických kuliček byl tento krok zopakován, s dobou eluce 10 minut. Výsledný eluát o objemu 500 µl byl vysušen v koncentrátoru RC 10-10 a uchován při -80 °C.

#### 4.4.6 Odsolení eluátu obsahujícího prokalcitonin

Lyofilizovaný eluát po ko-imunoprecipitaci byl rozpuštěn ve 200 µl 5% vodného roztoku kyseliny octové opakovaným nasátím a vysátím automatickou pipetou. Odsolení vzorku bylo provedeno pomocí zařízení MicroTrap obsahující patronu s C4 reversní fází.

Prvním krokem bylo promytí odsolovací kolony 3× 200 µl roztokem 80 % acetonitrilu, 5 % kyseliny octové ve vodě. Po promytí byla kolona převedena na vodnou fázi promytím 3× 200 µl roztokem 5% kyseliny octové ve vodě. Následně byl vzorek nanesen pomocí skleněné stříkačky Hamilton na odsolovací patronu.

Patrona s naneseným vzorkem byla promyta 3× 200 µl 5% vodným roztokem kyseliny octové. Pro eluci proteinu z kolony bylo použito 2× 200 µl 80% vodného roztoku acetonitrilu s 5 % kyseliny octové. Vzorek byl následně zahuštěn na objem přibližně 10 µl.

#### 4.4.7 Proteolytické štěpení vzorku pomocí trypsinu

Ke 4 µl odsoleného a zahuštěného eluátu bylo přidáno 20 µl 50 mmol·dm<sup>-3</sup> hydrogenuhličitanu amonného. Indikátorovými papírky bylo ověřeno mírně zásadité pH. Ke vzniklému roztoku byl přidán 1,4-dithiotreitol (DTT) do výsledné koncentrace 10 mmol·dm<sup>-3</sup>. Po přidání DTT následovala inkubace v termobloku po dobu 40 minut při 60 °C.

Po inkubaci a zchladnutí na laboratorní teplotu byl ke vzorku přidán jodoacetamid do výsledné koncentrace 30 mmol·dm<sup>-3</sup>. Roztok s přidaným jodoacetamidem byl

inkubován za nepřístupu světla při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po uplynutí 30 minut byl přidán DTT do výsledné koncentrace 50 mmol·dm<sup>-3</sup>. Poté byl přidán roztok trypsinu do výsledné koncentrace 0,1 µg/ml. Reakční směs byla inkubována přes noc v termobloku při 37 °C.

#### 4.4.8 Odsolení proteolyticky štěpeného vzorku

K odsolení bylo použito stejné zařízení (MicroTrap) jako v předešlé kapitole s patronou tvořenou reversní fází C18 o kapacitě až 200 µg peptidů. Prvním krokem bylo promytí kolony 3× 200 µl roztokem 80% acetonitrilu s 0,1% trifluoroctovou kyselinou (TFA) ve vodě. Po promytí se kolona equilibrovala promytím 3× 200 µl 2% acetonitrilem ve vodě s 0,1 % TFA. Následně byl pomocí skleněné mikrostříkačky Hamilton nanesen vzorek, který byl resuspendován ve 200 µl vodného roztoku 2% acetonitrilu a 0,1% TFA. Vzorek byl promyt 3× 200 µl roztoku 2 % acetonitril s 0,1 % TFA ve vodě. Pro eluci bylo použito 2× 200 µl vodného roztoku 80% acetonitrilu s 0,1 % TFA. Vzorek byl následně zahuštěn na výsledný objem cca 10 µl a byl uchován při -80 °C.

#### 4.4.9 Měření MALDI-ToF a MALDI FT-ICR

Pro detekci PCT pomocí MALDI ionizační techniky byly nejprve testovány dvě matrice běžně používané pro analýzu intaktních proteinů – kyselina sinapová (SA) a 2,5-dihydroxyacetofenon (DHAP). Prokalcitonin byl ředěn v LC-MS vodě o konečných koncentracích: 3; 1; 0,3; 0,1 pmol/µl. Na nerezový terč pro MALDI MS byl nanesen 1 µl roztoku PCT. Po zaschnutí byla jedna ředící řada PCT převrstvena 0,7 µl matrice DHAP a druhá matricí SA. Matrice DHAP a SA byly připraveny dle návodu výrobce Bruker Daltonics<sup>12</sup>. Hmotnostní spektrometr MALDI-ToF byl kalibrován pomocí proteinového standardu obsahující směs cytochromu C a myoglobinu. Během měření v lineárním pozitivním módu byla funkce náhodného krokování (z angl. *random walk*) nastavena na částečný vzorek (z angl. *partial sample*). Frekvence laseru byla nastavena na 200 Hz a celkový počet laserových pulsů na 20 000. Detekční rozsah byl *m/z* 4 400–16 800. Získaná spektra byla vyhodnocena prostřednictvím programu FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics).

Pro identifikaci forem prokalcitoninu u septických pacientů byla využita hmotnostní spektrometrie MALDI FT-ICR s vyšším rozlišením. Frekvence laseru byla nastavena na 200 Hz a celkový počet laserových pulsů na 50. Detekční rozsah byl  $m/z$  600–8 000. Vyhodnocení bylo provedeno v programu Compass DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics).

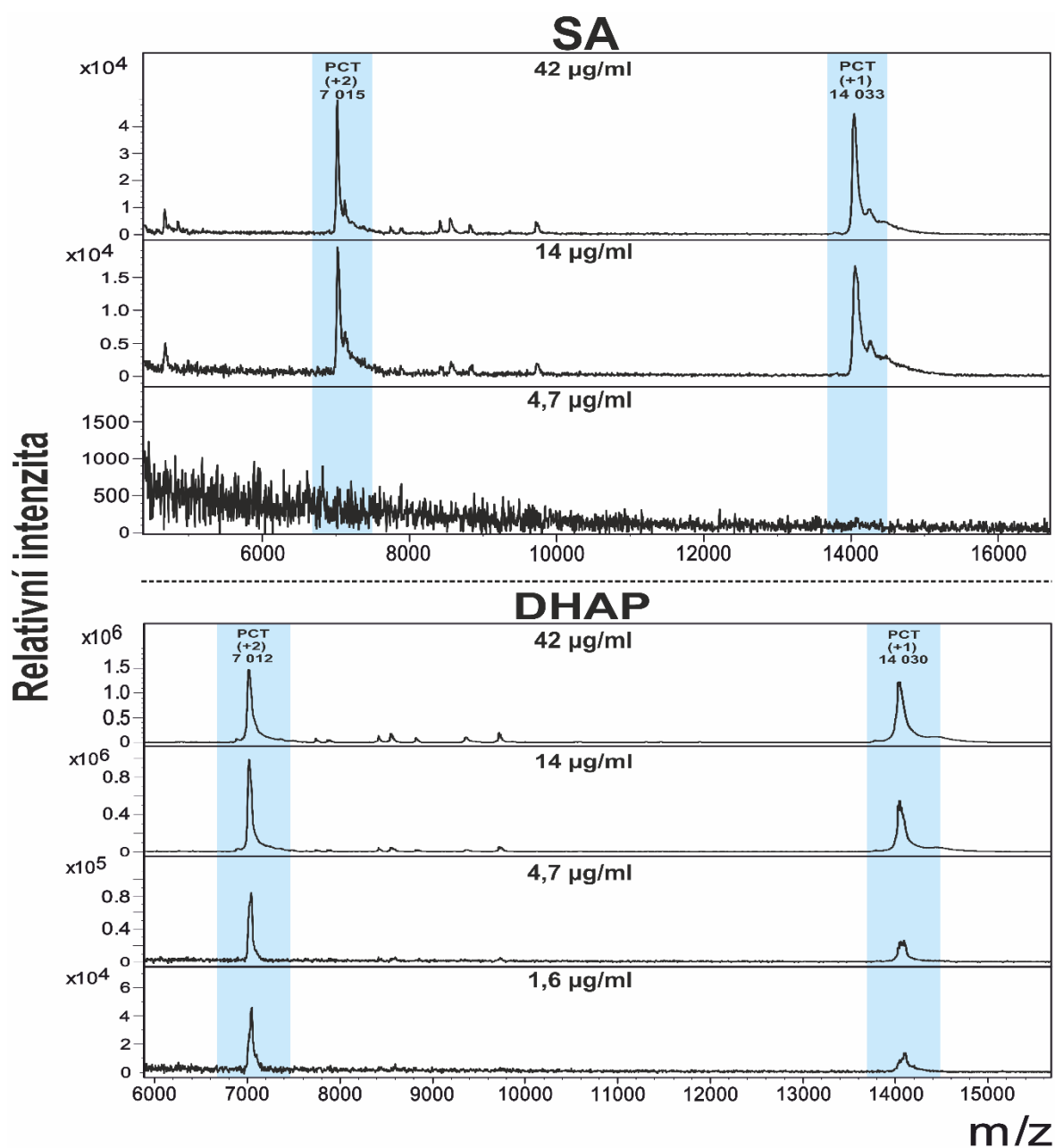
Peptidové mapování bylo provedeno pomocí kapalinové chromatografie spojené přímo s hmotnostním spektrometrem Orbitrap v servisním středisku hmotnostní spektrometrie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy ve Vestci. Data byla vyhodnocena pomocí vyhledávacího programu Peaks Studio.



## 5 Výsledky

### *Výběr matrice pro detekci prokalcitoninu pomocí MALDI hmotnostní spektrometrie*

Při výběru vhodné matrice pro detekci intaktního PCT byla připravena ředící řada jeho vodného roztoku. Prokalcitonin o různých koncentracích byl nanesen na ocelový terč kompatibilní s MALDI-ToF hmotnostním spektrometrem. Naměřená spektra a porovnání obou matric je zobrazeno na Obr. 16.

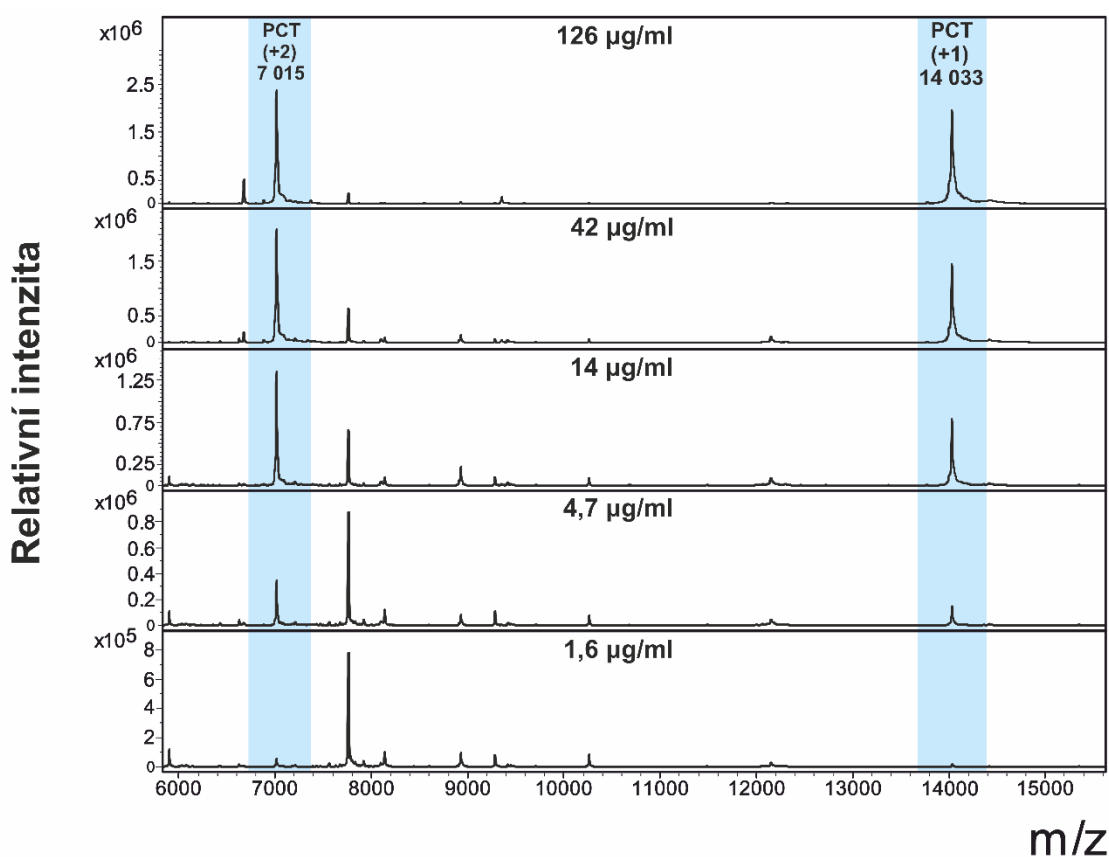


Obr. 16 – Porovnání MALDI ToF MS spekter PCT o různé koncentraci s použitím SA a DHAP matrice. U obou použitých matric lze pozorovat jedenkrát (14 kDa) a dvakrát (7 kDa) nabitý PCT.

U obou matric lze pozorovat nábojové stavy PCT +1 a +2. Dvakrát nabitý PCT lze pozorovat na  $m/z$  okolo 7 010 a jedenkrát nabitý PCT reprezentuje signál  $m/z$  okolo 14 033. Detekční limit dosažený použitím matrice SA byl 14  $\mu\text{g/ml}$  a použitím matrice DHAP byl 1,6  $\mu\text{g/ml}$  koncentrace PCT.

### ***Stanovení detekčního limitu metody imunoafinitního nabohacení prokalcitoninu v kombinaci s MALDI-ToF***

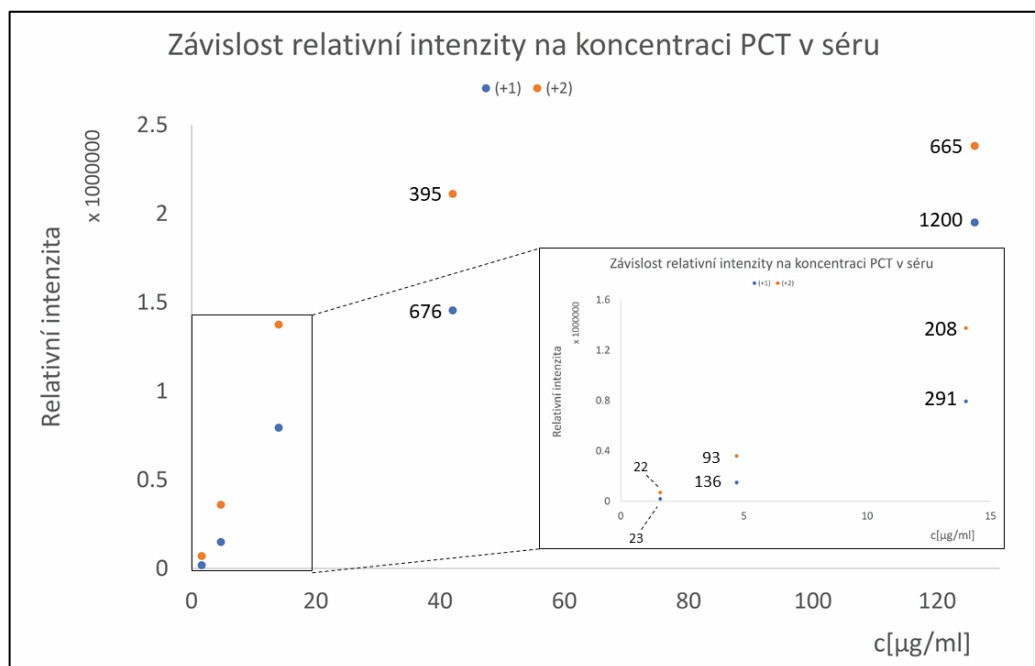
Pro stanovení limitu detekce imunoafinitní metody byla připravena séra s různou koncentrací rekombinantního PCT. Jeden mikrolitr séra byl nanesen na povrch funkcionalizovaný protilátkou proti PCT. Po inkubaci a promytí byla nanesena DHAP matrice. Prokalcitonin byl analyzován pomocí MALDI-ToF MS (*Obr. 17*).



*Obr. 17* – MALDI ToF MS spektra rekombinantního PCT přidaného o různém množství do lidského séra nabohaceného na imunoafinitních površích.

Ve všech naměřených spektrech ředící řady PCT přidaného do séra lze pozorovat oba nábojové stavy PCT. Nejnižší dosažená detekovatelná koncentrace byla 1,6  $\mu\text{g/ml}$  PCT v séru. Závislost relativní intenzity na koncentraci je graficky vyobrazena pro oba

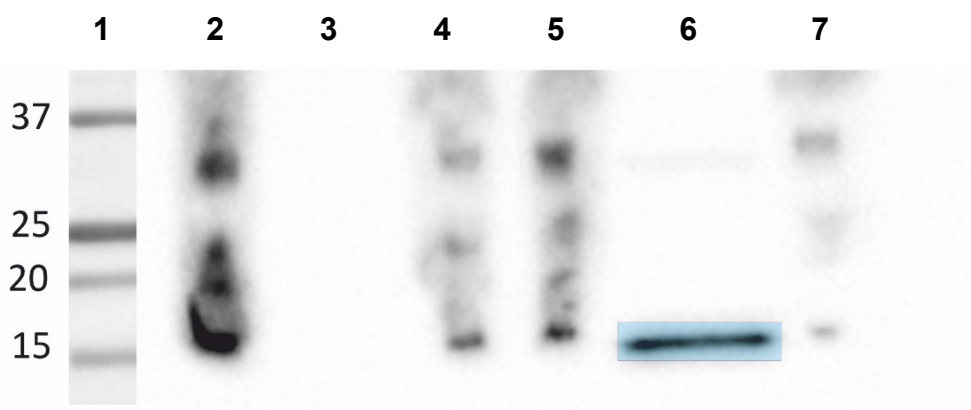
nábojové stavy včetně hodnot poměru signálu k šumu, které jsou uvedeny u jednotlivých bodů (Obr. 18).



Obr. 18 – Závislost relativní intenzity signálu na koncentraci PCT v séru pro oba nábojové stavy PCT. Modré jsou body pro jedenkrát nabitý PCT a oranžově body pro dvakrát nabitý. Ke každému bodu je připsána hodnota poměru S/N.

### ***Výběr metody srážení lidského séra pro zvýšení zastoupení prokalcitoninu ve vzorku.***

Pro zlepšení detekčního limitu metody byly testovány dva způsoby srážení séra s přidaným rekombinantním PCT. Pro vizualizaci jednotlivých kroků srážení byla zvolena metoda western blot s imunodetekcí. (Obr. 19).

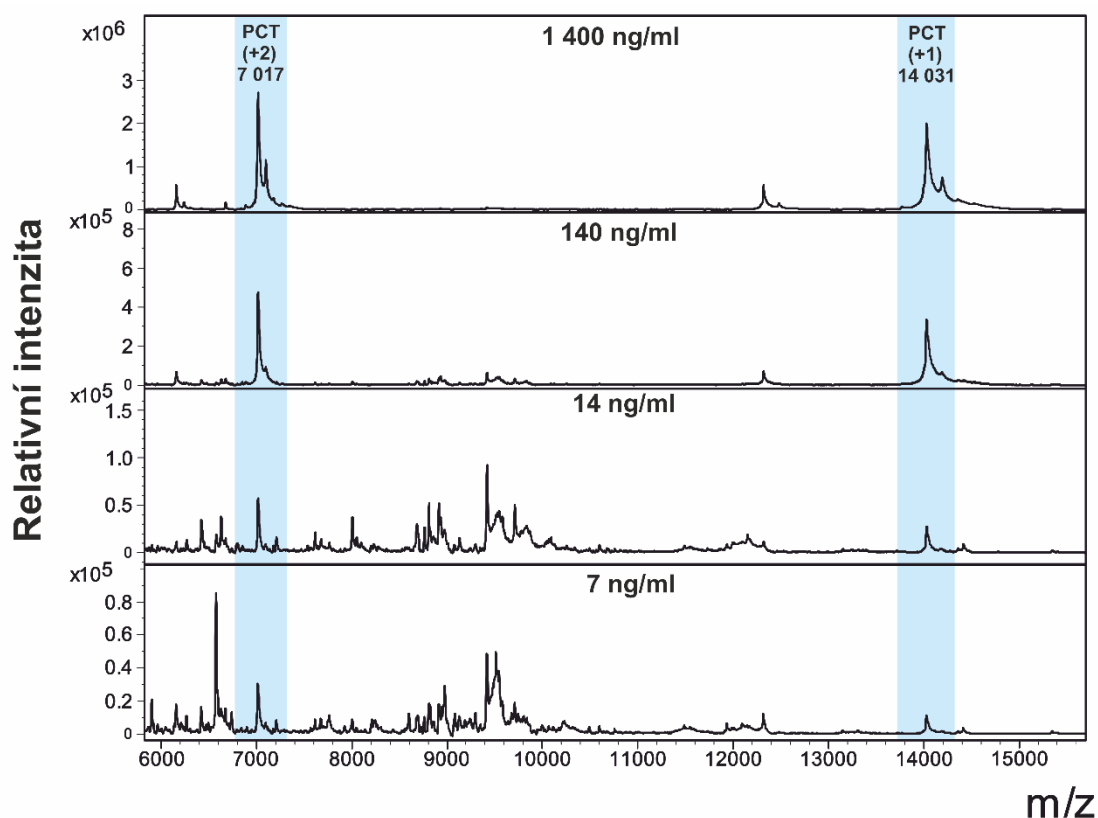


Obr. 19 – Nitrocelulosová membrána po přenosu western blot s imunodetekcí. 1 – Proteinový standard; 2 – Sérum s přidaným rekombinantním PCT jako kontrola; 3 – Supernatant po použití protokolu kyselého srážení séra s přidaným rekombinantním PCT; 4 - Pelet po použití protokolu kyselého srážení séra s přidaným rekombinantním PCT; 5 - Sérum s přidaným rekombinantním PCT jako kontrola; 6 – Supernatant získaný acetonitrilovým srážením séra s přidaným rekombinantním PCT; 7 – Pelet získaný acetonitrilovým srážením séra s přidaným rekombinantním PCT.

Na nitroceluloseové membráně si lze povšimnout proužku v dráze 6, který odpovídá molekulové hmotnosti okolo 14–15 kDa. V dráze 6 byl separován supernatant vzniklý acetonitrilovým srážením séra s přidaným rekombinantním PCT. Na základě metody western blot s imunodetekcí produktů různých metod srážení lze říci, že acetonitrilové srážení séra je vhodnou metodou pro zvýšení zastoupení PCT ve vzorku.

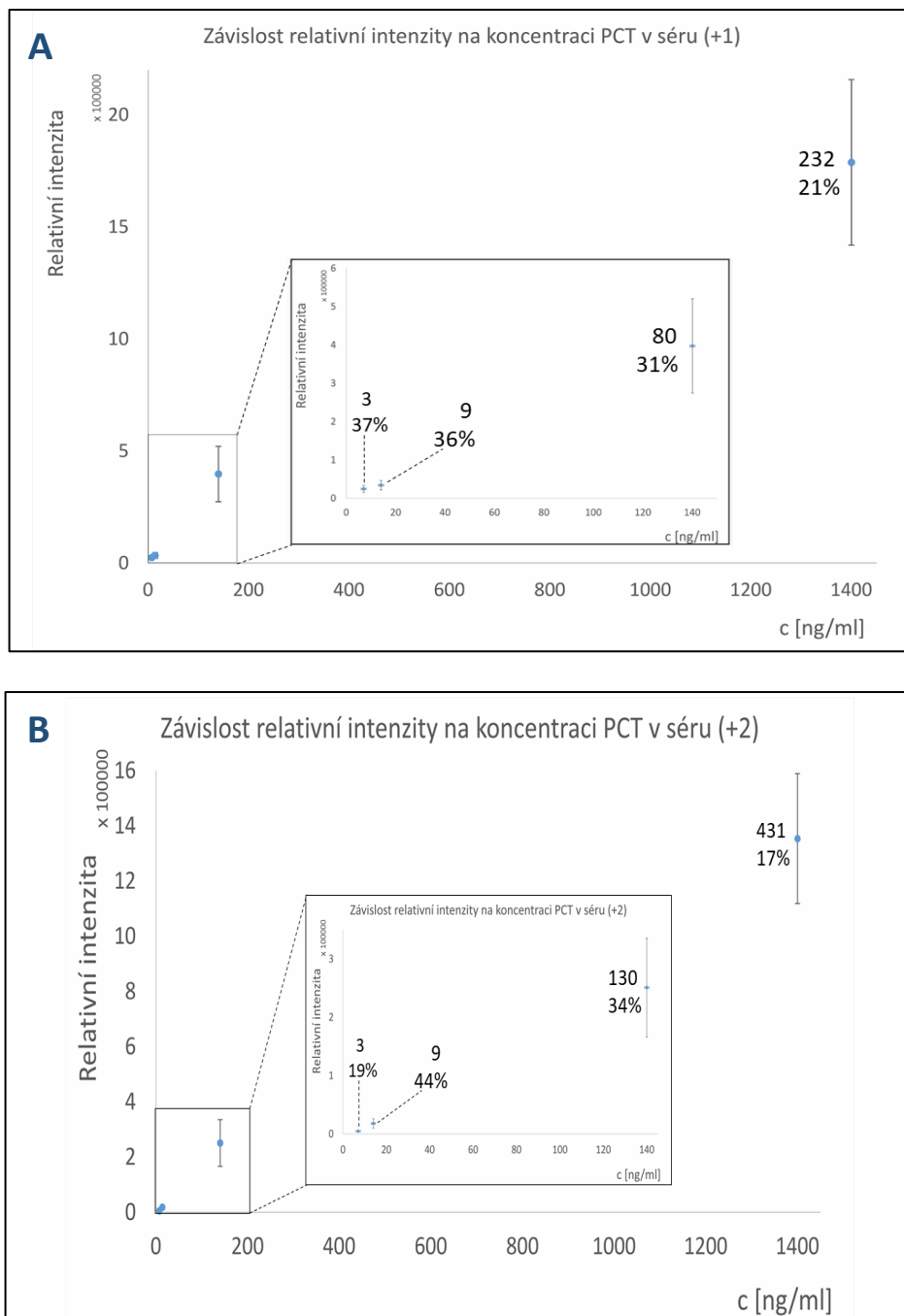
### ***Stanovení detekčního limitu metody imunoafinitního nabohacení prokalcitoninu v kombinaci s MALDI-ToF s využitím acetonitrilového srážení.***

Pro zvýšení detekčního limitu metody stanovení PCT pomocí imunoafinitních povrchů a MALDI ToF MS bylo použito acetonitrilové srážení vzorků séra. Po acetonitrilovém srážení séra byly vzorky nabohaceny na imunoafinitním povrchu a následně analyzovány pomocí MALDI ToF. Spektra PCT o různé koncentraci jsou zobrazena na Obr. 20.



Obr. 20 – MALDI ToF MS spektra naměřená po nabohacení rekombinantního PCT v séru po acetonitrilovém srážení. Nejnižší detekovatelná dosažená koncentrace rekombinantního PCT v séru byla 7 ng/ml.

Závislost intenzity jedenkrát a dvakrát nabitého iontu PCT na jeho koncentraci v séru je ukázána na *Obr. 21*. Pro každou koncentraci PCT (1400, 140, 14 a 7 ng/ml) bylo provedeno 6 analýz.

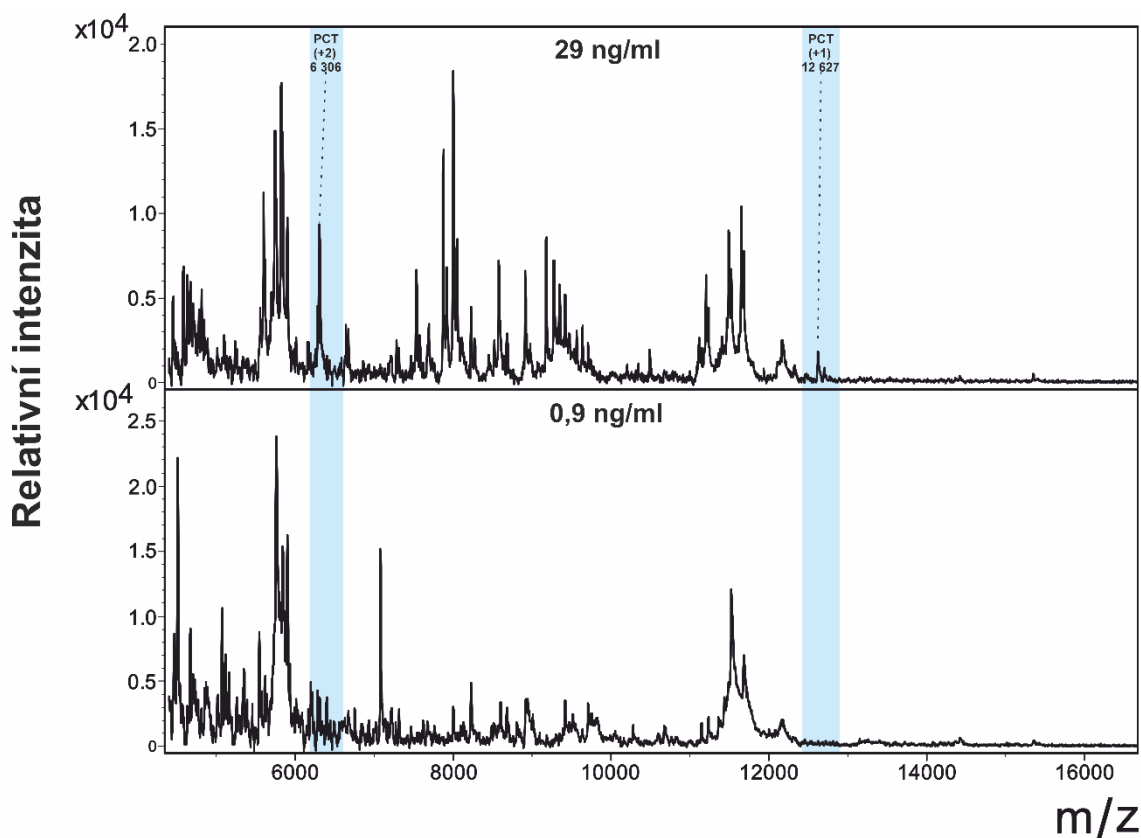


*Obr. 21* – Graf závislosti relativní intenzity na koncentraci přidaného rekombinantní PCT do séra. Do grafu jedenkrát nabitého PCT (**A**) a dvakrát nabitého PCT (**B**) jsou u každého bodu uvedeny hodnoty poměru S/N a hodnoty směrodatných odchylek v procentech.

Koeficient variace metody *in situ* nabohacení PCT v kombinaci s MALDI-ToF deketcí a srážením acetonitrilem byl stanoven analýzou 26 vzorků o koncentraci rekombinantního PCT 140 ng/ml. Nabohacení PCT bylo provedeno na jednom ITO povrchu s imobilizovanou protilátkou dle metody popsané výše. Měření bylo provedeno pomocí MALDI-ToF MS AutoflexSpeed. Výsledný **koeficient variace** byl stanoven pro relativní intenzitu jedenkrát a dvakrát nabitých iontů PCT. Koeficient variace relativní intenzity byl 55 % pro jedenkrát a 45 % pro dvakrát nabitý iont PCT.

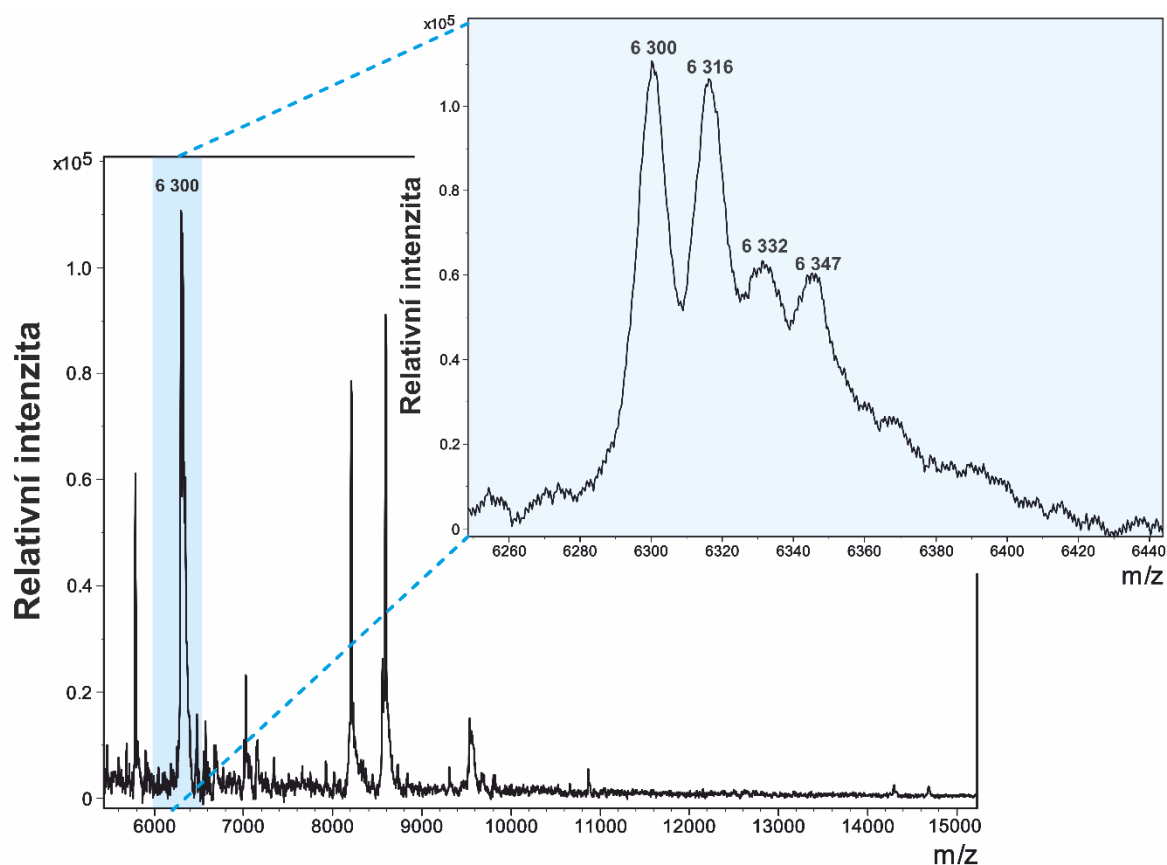
### **Detekce prokalcitoninu v sérech septických pacientů**

Metoda *in situ* nabohacení a následné detekce PCT pomocí funkcionalizovaných povrchů byla využita pro sledování hladiny PCT u pacientů s různou úrovní sepse. Hladina PCT byla také u těchto pacientů stanovena spolupracující laboratoří pomocí turbidimetrie a ELISA. Na Obr. 22 jsou MALDI spektra dvou patientských vzorků po nabohacení na funkcionalizovaném povrchu o koncentraci PCT 29 ng/ml a 0,9 ng/ml. Ve spektru s PCT o koncentraci 29 ng/ml byly identifikovány dva signály o  $m/z$  12 627 a 6 306, které odpovídají jedenkrát a dvakrát nabitému iontu nativního PCT. Ve spektru s prokalcitonimem o koncentraci 0,9 ng/ml nebyly tyto signály nalezeny, jelikož hladina PCT je pod limitem detekce metody.



Obr. 22 – MALDI ToF spektra použití metody imunoafinitních povrchů s acetonitrilovým srážením na skutečných patientských vzorcích. U koncentrace 29 ng/ml byla ověřena funkčnost metody.

V MALDI-ToF spektrech pacientů s velmi vysokou hladinou PCT (100 ng/ml) byl pozorován pouze ion o  $m/z$  6 303 (Obr. 23). Detailní zobrazení signálu ukázalo, že se jedná o jedenkrát nabitý ion až se třemi oxidovanými stavy, které odpovídají jednotlivým hmotnostním přírůstkům 16 Da.

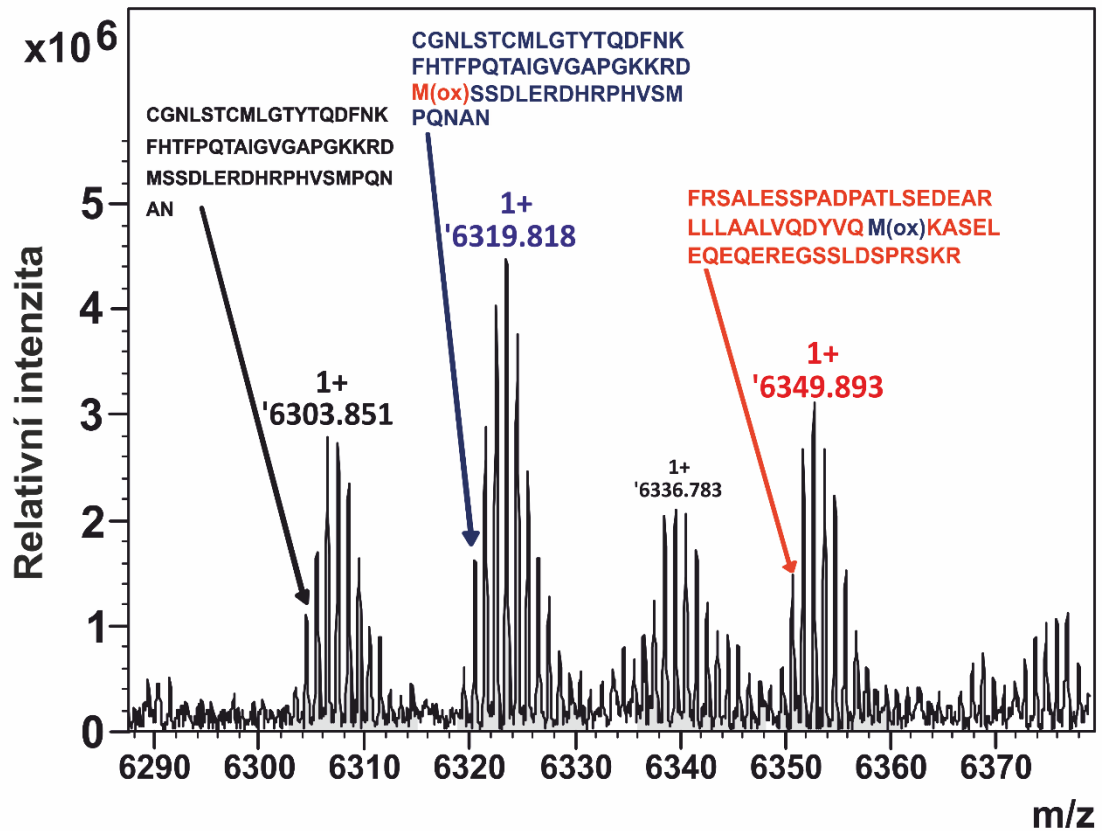


Obr. 23 – MALDI-ToF spektrum PCT nabohaceného ze séra pacienta s hladinou PCT 100 ng/ml pomocí imunoprecipitace za použití magnetických kuliček.

Pro určení přesné molekulové hmotnosti tohoto iontu bylo zapotřebí větší množství analytu a hmotnostně spektrometrická analýza s vysokým rozlišením a přesností. K tomuto účelu byla použita metoda nabohacení PCT pomocí magnetických kuliček a následná identifikace analytu pomocí hmotnostního spektrometru s iontově cyklotronovou celou a vysokým magnetickým polem (15 T solariX XR). Na Obr. 24 (str. 57) je ukázán detail MALDI-FTICR spektra oblasti sledovaného iontu. Díky vysokému rozlišení se podařilo identifikovat na základě přesných hmot jednotlivé formy PCT. Ve spektru byly pozorovány ionty odpovídající molekulovým hmotnostem fragmentů PCT a jejich oxidovaných forem. Ze získaných dat vyplývá, že u pacientů se

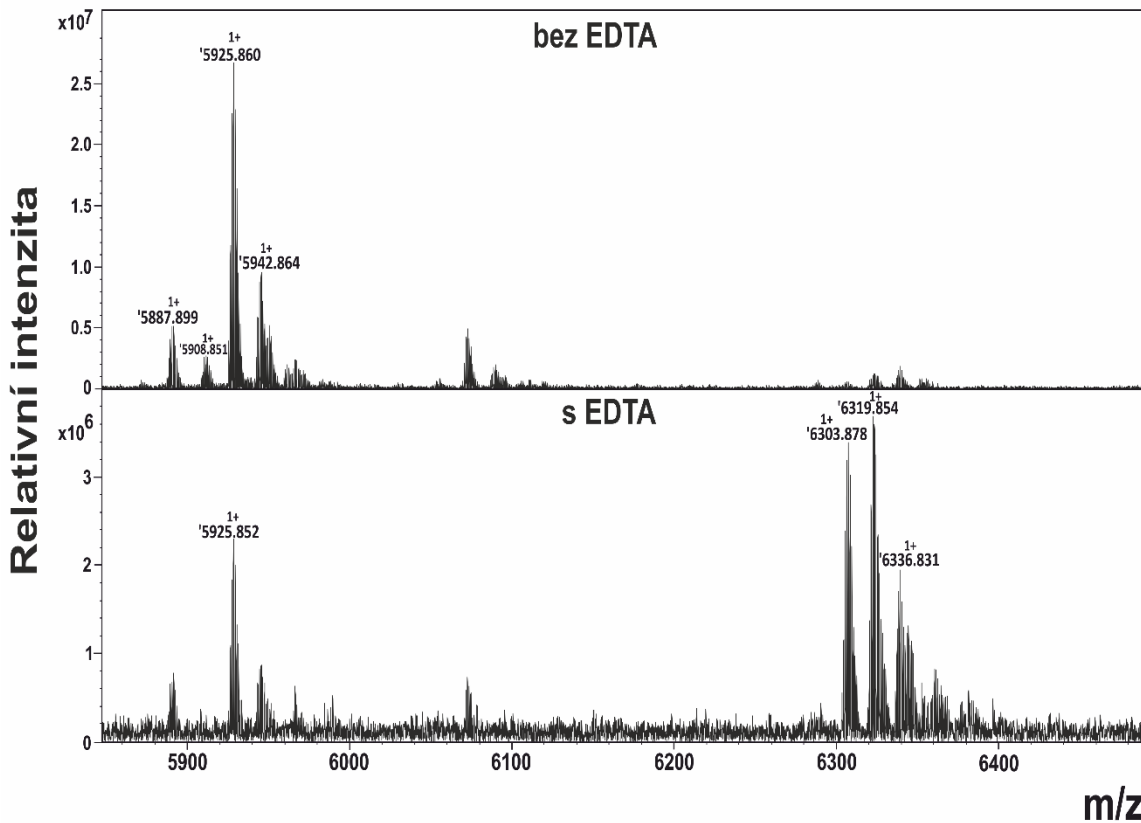


septickým šokem s vysokou hladinou PCT dochází k rozštěpení PCT na dva fragmenty. Ke štěpení dochází mezi argininem 57 a cysteinem 58.



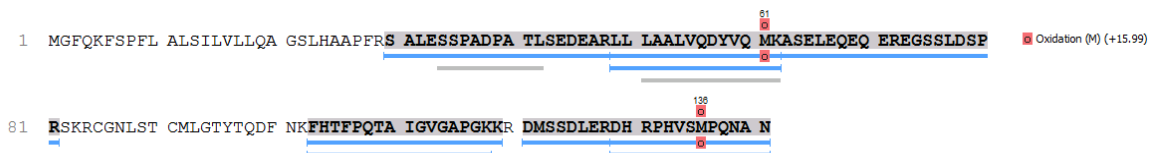
Obr. 24 – MALDI-FTICR spektrum nabohaceného PCT pacienta s PCT hladinou 100 ng/ml. Přiblížení oblasti pro jedenkrát nabitý prokalcitonin. Signálům o  $m/z$  6 303; 6 319 a 6 350 byly přiřazeny aminokyselinové sekvence odpovídající fragmentům PCT.

Vliv chelatačního činidla EDTA při odběru krve pacientů se sepsí na štěpení PCT je ukázán na Obr. 25 (str. 58). Ze spekter je patrné, že v nepřítomnosti EDTA dochází ke snížení intenzity signálu forem vzniklých štěpením vazby R57-C58. Naopak jsou ve spektru bez EDTA pozorovány signály v oblasti  $m/z$  5 925. Intenzita těchto forem je ve spektrech s EDTA nižší v porovnání se signály v oblasti  $m/z$  6 303.



Obr. 25 – MALDI FT-ICR spektra PCT ze vzorků pacientů s hladinou PCT 100 ng/ml odebraných do zkumavek s a bez EDTA.

Pro potvrzení přítomnosti PCT v eluátu po ko-imunoprecipitaci byla použita metoda peptidového mapování v kombinaci se štěpením trypsinem. Měření bylo provedeno pomocí kapalinové chromatografie spojené přímo s hmotnostním spektrometrem Orbitrap v servisním středisku hmotnostní spektrometrie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy ve Vestci. Pomocí vyhledávacího programu Peaks Studio byl ve vzorku identifikován PCT o sekvenčním pokrytí 77 % (Obr. 26).



Obr. 26 – Sekvenční pokrytí lidského PCT získané na základě dat z peptidového mapování. Modře podtržené sekvence odpovídají nalezeným peptidům.

## 6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo ověření možnosti detekce PCT ze séra pacientů, kterým byla diagnostikována sepse, pomocí imunoafinitních povrchů v kombinaci s MALDI-ToF hmotnostní spektrometrií. Koncentrace PCT v lidském séru je velice nízká, a to i přes to, že během sepse stoupne na koncentraci v řádu desítek až stovek vyšší, než je jeho přirozená. Pohybuje se v rozmezí spodní hranice 10 a horní hranice více než 100 ng/ml. Stanovení koncentrace PCT v lidském séru je využíváno pro diagnostiku sepse. Vzhledem ke komplexnímu složení séra a velkému počtu dominantně zastoupených proteinů představuje detekce PCT nelehký úkol.

Metody zahrnující imunoafinitní povrchy představují relativně novou technologii, která umožňuje *in situ* nabohacení analytu ze vzorku. Účinnost metody již byla potvrzena například při nabohacení transferrinu či haptoglobinu ze vzorků lidského séra. Tuto metodu je možné kombinovat s hmotnostní spektrometrií s měkkou ionizační technikou MALDI.

Hmotnostní spektrometrie MALDI-ToF si našla cestu do většiny klinických laboratoří, jakožto velice účinný nástroj především k fenotypizaci bakterií a k dalšímu využití pro identifikaci lipidů, peptidů, proteinů nebo sacharidů. MALDI-ToF hmotnostní spektrometry jsou běžnou součástí přístrojového vybavení mikrobiologických laboratoří. Možnost detekce PCT jako biomarkeru sepse nabohaceného *in situ* na imunoafinitních površích by byla z mnoha pohledů výhodná.

Prvním krokem optimalizace metody bylo nalezení vhodné matrice pro detekci PCT pomocí MALDI-ToF MS (*Obr. 16*, str. 49). Porovnány byly dvě matrice – DHAP a SA, které jsou vhodné pro detekci proteinů. Použití matrice DHAP vedlo k dosažení lepšího detekčního limitu a vyšší relativní intenzity signálů. Matrice DHAP navíc poskytuje lepší rozlišení a podporuje tvorbu vícenásobných iontů oproti SA matici. Na druhou stranu DHAP matrice netvoří homogenní krystaly. Z tohoto důvodu bylo nutné nastavit automatický pohyb MALDI terčíku jen jako částečný krok a akumulovat více spekter. I přes tyto nedostatky, byla matrice DHAP zvolena pro další použití při měření *in situ* nabohaceného PCT pomocí MALDI MS.

Po výběru vhodné matrice byla dalším krokem optimalizace metody měření PCT na přístroji MALDI-ToF MS. K optimalizaci byl zvolen vodný roztok rekombinantního PCT nanesený na ocelový MALDI terč převrstvený matricí DHAP. Prokalcitonin byl analyzován v lineárním pozitivním módu z důvodu větší citlivosti oproti reflektrotonovému módu.

Pro stanovení detekčního limitu metody využívající *in situ* nabohacení prokalcitoninu byl použit komerčně dostupný rekombinantní PCT, který byl přidán do lidského séra vytvořeného smícháním čtyř sér zdravých jedinců. Použití směsi sér by mělo potlačit případnou výjimečnost, která by mohla ovlivnit ionizaci či separaci PCT během měření nebo zkreslit výsledky experimentu a mohla by se projevit při ředění PCT pouze v jednodruhovém vzorku séra. Rekombinantí PCT z ředící řady byl nabohacen pomocí ITO povrchu s imobilizovanou protilátkou proti PCT. Tímto způsobem bylo dosaženo detekčního limitu koncentrace PCT 1,6 µg/ml (*Obr. 17*, str. 50).

Spodní mez koncentrace PCT během sepse dosahuje hodnot kolem 1 ng/ml. Je tedy zřejmé, že pouhé nabohacení PCT ze séra nesplňuje požadavek na dostatečný detekční limit, který je řádově v jednotkách ng/ml. Je potřeba zvolit vhodný způsob zvýšení zastoupení PCT ve vzorku. Pro tento účel bylo zvoleno srážení séra. Způsobů srážení lidského séra je velké množství. Bylo tedy nutné nalézt takový způsob srážení, při kterém dojde k vysrážení hojně zastoupených proteinů (např. albumin) a samotný PCT zůstane rozpuštěný v kapalné fázi. Proces srážení musí být jednoduchý, časově a finančně nenáročný. Tyto požadavky splňují dva způsoby srážení proteinů, které byly testovány. První bylo kyselé srážení 0,1% roztokem TFA v acetonitrilu a druhý použitý způsob bylo acetonitrilové srážení. V případě supernatantu po aplikaci protokolu acetonitrilového srážení se na nitrocelulosové membráně vyskytoval pruh, který svou pozicí odpovídal hmotnosti PCT (*Obr. 19*, str. 51). Vzhledem k faktu, že byla použita specifická primární protilátka proti PCT bylo ověřeno, že acetonitrilový způsob srážení umožnil vysrážení části sérových proteinů a PCT zůstal v kapalné fázi. Acetonitrilový způsob srážení je tedy vhodný pro zvýšení zastoupení PCT ve vzorku.

Použití vhodného způsobu srážení séra mohlo potenciálně zlepšit detekční limit metody detekce *in situ* nabohaceného PCT ze séra pomocí MALDI-ToF MS. Byla připravena ředící řada rekombinantního PCT v séru. Roztoky PCT v séru byly vysráženy dle protokolu acetonitrilového srážení. Nabohacení rozpuštěného PCT bylo provedeno na imunoafinitním povrchu s imobilizovanou protilátkou proti PCT. Nejnižší detekovatelná koncentrace PCT byla 7 ng/ml. Tento dosažený detekční limit se vyskytuje v rozmezí hodnot pro orientační diagnostiku těžké sepse (2–10 ng/ml). Na základě dosaženého detekčního limitu lze tvrdit, že s využitím této metody je potenciálně možné detekovat PCT u pacientů se závažnější formou sepse. Dalším krokem byla statistická validace metody.

Během statistické validace byl stanoven koeficient variace, a také byly stanoveny standardní chybové úsečky. Koeficient variace byl stanoven naměřením 24 pozic na jednom imunoafinitním povrchu s nabohaceným PCT. Koeficient variace relativní intenzity pro nábojový stav +1 byl 55 % a pro +2 byl 45 %. Jedná se o vysoké koeficienty variace. Příčinou vysokých hodnot koeficientu variace může být několik. V první řadě může vzniknout nerovnoměrnost v orientaci imobilizované protilátky a hustoty jejího zastoupení po celé ploše pozice. Další příčinou může být nerovnoměrné odmytí nabohaceného PCT během oplachů a také hraje roli nedokonalá specifita protilátky proti PCT. I přes snahu není nanosená matrice DHAP rovnoměrně rozmístěna a vytváří „ostrůvky“ krystalků. Samotná metoda *in situ* nabohacení má velké množství kroků zahrnující i srážení. Malá odchylka v jednotlivých krocích se může akumulovat a vést tak k vysokým hodnotám koeficientu variace, přičemž limitní hodnota koeficientu variace by měla být méně než 20 %. Při stanovení koeficientu variace byla zvolena koncentrace PCT 140 ng/ml, která se nachází v rozmezí koncentrace, při které je závislost relativní intenzity na koncentraci lineární (Obr. 21, str. 53). Závislost se jeví lineární v oblasti od nejmenší měřené koncentrace 7 ng/ml do koncentrace 140 ng/ml. Lineární závislost odpovídá kvantitativní linearitě analyzátorů doby letů, která se pohybuje v rozmezí dvou řádů. Předpoklad lineární závislosti však vychází z vynesení tří bodů, které jsou zatíženy chybou. Je možné, že použitá koncentrace 140 ng/ml se nenachází v rozmezí, kde je závislost lineární což by mohlo následně vést k vyšším hodnotám koeficientů variace. Tuto možnost je však nutno ověřit opakovaním experimentu s nižší koncentrací PCT.

Pro stanovení standardních odchylek bylo připraveno pět ITO povrchů s imobilizovanou protilátkou a na každém byla *in situ* nabohacena jedna ředící řada rekombinantního PCT v lidském séru. Pro každou koncentraci PCT připadala na jednom ITO povrchu jedna pozice. Celkově bylo pro každou koncentraci naměřeno pět různých spekter z pěti různých povrchů. Výsledné průměrné intenzity s chybovými úsečkami pro jedenkrát a dvakrát nabitou formu byly vyneseny do grafu závislosti relativní intenzity na koncentraci (Obr. 21, str. 53). Z výsledků je zřejmé, že s klesající koncentrací PCT se zvyšuje chyba měření. Po statistické validaci metody následovalo využití optimalizované metody pro detekci PCT u pacientů, kterým byla diagnostikována seps.

K ověření možnosti použití metody u patientských vzorků byla k dispozici séra pacientů, kteří prodělali sepsi s různými koncentracemi PCT. Koncentrace PCT byla stanovena turbidimetricky nebo metodou ELISA. První dva patientské vzorky měli koncentraci PCT stanovenou turbidimetrií 29 ng/ml a 0,9 ng/ml. U pacienta s nižší koncentrací nebylo možné PCT detekovat. Na druhé straně bylo u pacienta s vyšším množstvím PCT (29 ng/ml) možné pozorovat signál pro jedenkrát nabitý PCT (12 627) a dvakrát nabitý ion V oblasti, kde se měl vyskytovat dvakrát nabitý ion PCT, byl pozorován signál s větší intenzitou.

U pacientů s vysokou hodnotou PCT (100 ng/ml) byl ve spektrech pozorován pouze signál o  $m/z$  6 300. Relativně malá přesnost a rozlišení MALDI-ToF hmotnostního spektrometru neumožňovala tento ion přiřadit. Bylo proto nutné zvýšit účinnost nabohacení PCT. Pro nabohacení byly v tomto případě použity magnetické kuličky s kovalentně navázanou protilátkou specifickou vůči PCT. Byla použita stejná protilátka jako při přípravě imunoafinitních povrchů. Prvním vzorkem pro koimunoprecipitaci bylo sérum pacienta (Pacient 1), který prodělal sepsi s neznámou příčinou a koncentrace PCT byla stanovena na hodnotu 100 ng/ml. Druhým vzorkem bylo sérum pacienta (Pacient 2) s koncentrací PCT 100 ng/ml, ale tentokrát byla identifikována infekce bakterií *S. Aureus*. Vzorek Pacienta 2 je rozdělen do dvou variant. Jednou variantou je sérum odebrané do zkumavky s přidáním EDTA a druhá varianta byla odebrána bez přídavku.

U pacienta 1 bylo pomocí MALDI ToF MS zjištěno, že v ko-imunoprecipitátu není žádná jedenkrát nabitá forma přirozeně se vyskytujícího PCT – nebyl pozorován žádný signál na  $m/z$  12 628. Byl však pozorován signál na hodnotě  $m/z$  6 300, který byl nejintenzivnější v celém spektru (*Obr. 23*, str. 56). Pro lepší rozlišení bylo zvoleno měření v módu s iontovými zrcadly. V naměřeném spektru byl signál 6 300 rozlišen do série několika signálů, z nichž nejmenší byl 6 300 a nejvyšší 6 347. Byly tedy prokázány až 3 oxidované formy. Konstantní přírůstek hmoty +16 naznačuje, že se jedná o jedenkrát nabitý iont. Tímto experimentem bylo potvrzeno, že se nejedná o nábojový stav +2 přirozeného PCT.

Data naměřená pomocí MALDI FT-ICR potvrdila, že se jedná skutečně o jedenkrát nabitou molekulu. Na základě dat získaných s vysokým rozlišením a vysokou přesností byly k jednotlivým signálům přiřazeny sekvence zkrácených forem PCT (*Obr. 24*, str. 57). Výchozí sekvence PCT byla:

FRSALESSPADPATLSEDEARLLLLAALVQDYVQMKASELEQEQEREGSSLDSPRSKRCGNL  
STCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAPGKKRDMSSDLERDHRPHVSMQPQAN.

První identifikovanou formou PCT byla část sekvence 58–114 o relativní molekulové hmotnosti 6 303,95 s chybou 27 ppm. Další formou byla oxidovaná forma sekvence 58–114, která měla oxidovaný pouze jeden z methioninů, o relativní molekulové hmotnosti 6 319,94 s chybou 24 ppm. Bylo možné nalézt s chybou 38 ppm také druhou polovinu sekvence PCT 1–57, která měla oxidovaný methionin o relativní molekulové hmotnosti 6 350,15. K proteolytickému štěpení může docházet z důvodu zvýšeného obsahu serinových a metalo- proteas v krevním řečišti během sepse. Pro ověření tohoto tvrzení je potřeba uskutečnit další experimenty.

U pacienta 2 se známou příčinou sepse byla měřeními ko-imunoprecipitátu získána dvě spektra (*Obr. 25*, str. 58). První spektrum bylo získáno ze vzorku odebraného pacientovi s přidáním EDTA (s EDTA) a druhé bez přidání EDTA (bez EDTA) do odběrové zkumavky. Bylo pozorováno, že v MALDI FT-ICR spektru pacienta 2 s EDTA byly přítomny formy PCT jako u pacienta 1. U pacienta 2 bez EDTA nebyly pozorovány formy PCT v oblasti  $m/z$  6 300–6 350. Je možné, že přítomnost EDTA vytváří komplexy s přítomnými ionty kovů, které metaloproteasy potřebují pro svou proteolytickou

aktivitu. V porovnání se spektrem pacienta 2 s EDTA však byl s řádově vyšší intenzitou, než u pacienta bez EDTA pozorován signál o  $m/z$  5 925,65. Tento signál se nepodařilo přiřadit žádnému fragmentu PCT.

K potvrzení přítomnosti PCT v ko-imunoprecipitátu bylo provedeno také peptidové mapování a analýza pomocí hmotnostního spektrometru Orbitrap. U všech 3 vzorků byla potvrzena přítomnost PCT s minimálně 70% pokrytím aminokyselinové sekvence (*Obr. 26*, str. 58).

Cílem této diplomové práce bylo ověřit možnost využití *in situ* nabohacení a hmotnostně spektrometrické detekce PCT v klinické praxi. Dosažený detekční limit metody 7 ng/ml není dostatečný pro identifikaci sepse, ale může sloužit pro určení těžké sepse a septického šoku. Výhodou této metody je přímé sledování molekuly PCT a jeho forem, které neumožňují ostatní standardní metody jako je turbidimetrie či ELISA. Velice zajímavým a doposud v literatuře nepopsaným výsledkem je štěpení PCT u pacientů v septickém šoku.



## 7 Závěr

Imunoafinitní povrchy s imobilizovanou protilátkou proti PCT byly úspěšně použity pro *in situ* nabohacení a hmotnostně spektrometrickou detekci PCT s detekčním limitem 1,6 µg/ml. Detekční limit metody byl snížen na hodnotu 7 ng/ml použitím acetonitrilového způsobu srážení lidského séra.

Metoda byla dále úspěšně použita pro detekci PCT u pacientů s těžkou sepsí a septickým šokem. U pacientů s těžkou sepsí se navíc ukázalo, že dochází k rozštěpení PCT na dvě formy. Dalším předmětem studia bude sledování forem PCT u pacientů s různou úrovní sepse.

## 8 Seznam použité literatury

- (1) Thomson, J. J.: XXVI. Rays of positive electricity. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* 21, 225–249 (1911).
- (2) Everley, P. A., Krijgsveld, J., Zetter, B. R., Gygi, S. P.: Quantitative cancer proteomics: Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) as a tool for prostate cancer research. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 729–735 (2004).
- (3) Eicke, A., Sichtermann, W., Benninghoven, A.: Secondary ion mass spectrometry of nucleic acid components: Pyrimidines, purines, nucleosides and nucleotides. *Org. Mass Spectrom.* 15, 289–294 (1980).
- (4) Banoub, J. H., Newton, R. P., Esmans, E., Ewing, D. F., Mackenzie, G.: Recent Developments in Mass Spectrometry for the Characterization of Nucleosides, Nucleotides, Oligonucleotides, and Nucleic Acids. *Chem. Rev.* 105, 1869–1916 (2005).
- (5) Han, X., Aslanian, A., Yates, J. R.: Mass spectrometry for proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 483–490 (2008).
- (6) El-Aneed, A., Cohen, A., Banoub, J.: Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl. Spectrosc. Rev.* 44, 210–230 (2009).
- (7) Vestal, M. L.: Ionization techniques for nonvolatile molecules. *Mass Spectrom. Rev.* 2, 447–480 (1983).
- (8) Barber, M., Bordoli, R. S., Sedgwick, R. D., Tyler, A. N.: Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry. *Nature* 293, 270–275 (1981).
- (9) Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T.: Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2, 151–153 (1988).
- (10) Yamashita, M., Fenn, J. B.: Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 88, 4451–4459 (1984).
- (11) Heeren, R. M. A., Kleinnijenhuis, A. J., McDonnell, L. A., Mize, T. H.: A mini-review of mass spectrometry using high-performance FTICR-MS methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1048–1058 (2004).
- (12) Uživatelská příručka „Instructions for Use - Bruker Guide to MALDI Sample Preparation - Revision E". Bruker Daltonics (2015).
- (13) Obrázek MALDI Ionizace schéma.  
dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maldi.svg>  
(přístup 20. 4. 2020).
- (14) Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S.: MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl. Microbiol. Biotechnol* 93, 965–974 (2012).
- (15) Wolff, M. M., Stephens, W. E.: A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Rev. Sci. Instrum.* 24, 616–617 (1953).
- (16) Brown, R. S., Lennon, J. J.: Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* 67, 1998–2003 (1995).

- (17) Merchant, M., Weinberger, S. R.: Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21, 1164–1177 (2000).
- (18) Vestal, M. L., Juhasz, P., Martin, S. A.: Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9, 1044–1050 (1995).
- (19) Mamyrin, B. A.: Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 131, 1–19 (1994).
- (20) Bray, M. S., Boerwinkle, E., Doris, P. A.: High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: Practice, problems and promise. *Hum. Mutat.* 17, 296–304 (2001).
- (21) Bonk, T., Humeny, A.: MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA. *Neuroscientist.* 7, 6–12 (2001).
- (22) Jackson, S. N., Wang, H. Y. J., Woods, A. S., Ugarov, M., Egan, T., Schultz, J. A.: Direct tissue analysis of phospholipids in rat brain using MALDI-TOFMS and MALDI-ion mobility-TOFMS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 133–138 (2005).
- (23) Putignani, L., Del Chierico, F., Onori, M., Mancinelli, L., Argentieri, M., Bernaschi, P., Coltella, L., Lucignano, B., Pansani, L., Ranno, S., Russo, C., Urbani, A., Federici, G., Menichella, D.: MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Mol. Biosyst.* 7, 620–629 (2011).
- (24) Snovida, S. I., Rak-Banville, J. M., and Perreault, H.: On the Use of DHB/Aniline DHB/N,N-Dimethylaniline Matrices for Improved Detection of Carbohydrates: Automated Identification of Oligosaccharides and Quantitative Analysis of Sialylated Glycans by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, 1138–1146 (2008).
- (25) Fleurbaaij, F., Kraakman, M. E. M., Claas, E. C. J., Knetsch, C. W., Van Leeuwen, H. C., Van Der Burgt, Y. E. M., Veldkamp, K. E., Vos, M. C., Goessens, W., Mertens, B. J., Kuijper, E. J., Hensbergen, P. J., Nicolardi, S.: Typing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates with Ultrahigh Resolution MALDI-FTICR Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 88, 5996–6003 (2016).
- (26) Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., dhe-Paganon, S., Park, H. W., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, C., Kim, R., Kim, S. H., Rao, Z., Shi, Y., Terwilliger, T. C., Kim, C. Y., Hung, L. W., Waldo, G. S., Peleg, Y., Albeck, S., Unger, T., Dym, O., Prilusky, J., Sussman, J. L., Stevens, R. C., Lesley, S. A., Wilson, I. A., Joachimiak, A., Collart, F., Dementieva, I., Donnelly, M. I., Eschenfeldt, W. H., Kim, Y., Stols, L., Wu, R., Zhou, M., Burley, S. K., Emtage, J. S., Sauder, J. M., Thompson, D., Bain, K., Luz, J., Gheyi, T., Zhang, F., Atwell, S., Almo, S. C., Bonanno, J. B., Fiser, A., Swaminathan, S., Studier, F. W., Chance, M. R., Sali, A., Acton, T. B., Xiao, R., Zhao, L., Ma, L. C., Hunt, J. F., Tong, L., Cunningham, K., Inouye, M., Anderson, S., Janjua, H., Shastry, R., Ho, C. K., Wang, D., Wang, H., Jiang, M., Montelione, G. T., Stuart, D. I., Owens, R. J., Daenke, S., Schütz, A., Heinemann, U., Yokoyama, S., Büssow, K., Gunsalus, K. C. Protein production and purification. *Nat. Methods.* 5, 135–146 (2008).
- (27) Wingfield, P. T.: Overview of the purification of recombinant proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 80, 6.1.1–6.1.35 (2015).

- (28) Hage, D. S.: Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications. *Clin. Chem.* 45, 593–615 (1999).
- (29) Mahmoodi, S., Pourhassan-Moghaddam, M., Wood, D. W., Majdi, H., Zarghami, N.: Current affinity approaches for purification of recombinant proteins. *Cogent Biol.* 5, 1665406 (2019).
- (30) Horovitz, O., Tomoiaia, G., Mocanu, A., Yupsanis, T., Tomoiaia-Cotisel, M.: Protein binding to gold colloids. *Gold Bull.* 40, 213–218 (2007).
- (31) Yu, L. R., Veenstra, T.: Phosphopeptide enrichment using offline titanium dioxide columns for phosphoproteomics. *Methods Mol. Biol.* 1002, 93–103 (2013).
- (32) Pompach, P., Benada, O., Rosulek, M., Darebná, P., Hausner, J., Růžička, V., Volný, M., Novák, P.: Protein Chips Compatible with MALDI Mass Spectrometry Prepared by Ambient Ion Landing. *Anal. Chem.* 88, 8526–8534 (2016).
- (33) Kaboord, B., Perr, M.: Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol. Biol.* 424, 349–364 (2008).
- (34) Hutchens, T. W., Yip, T. -T.: New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7, 576–580 (1993).
- (35) Pompach, P., Nováková, J., Kavan, D., Benada, O., Růžička, V., Volný, M., Novák, P.: Planar Functionalized Surfaces for Direct Immunoaffinity Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* 62, 270–278 (2016).
- (36) Krásný, L., Pompach, P., Strohmalm, M., Obsilova, V., Strnadová, M., Novák, P., Volný, M.: In-situ enrichment of phosphopeptides on MALDI plates modified by ambient ion landing. *J. Mass Spectrom.* 47, 1294–1302 (2012).
- (37) Cyriac, J., Pradeep, T., Kang, H., Souda, R., Cooks, R. G.: Low-energy ionic collisions at molecular solids. *Chem. Rev.* 112, 5356–5411 (2012).
- (38) Badu-Tawiah, A. K., Wu, C., Cooks, R. G.: Ambient ion soft landing. *Anal. Chem.* 83, 2648–2654 (2011).
- (39) Cristea, I. M., Gaskell, S. J., Whetton, A. D.: Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood.* 103, 3624–3634 (2004).
- (40) Chughtai, K., Heeren, R. M. A.: Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis. *Chem. Rev.* 110, 3237–3277 (2010).
- (41) Grill, V., Shen, J., Evans, C., Cooks, R. G.: Collisions of ions with surfaces at chemically relevant energies: Instrumentation and phenomena. *Rev. Sci. Instrum.* 72, 3149–3179 (2001).
- (42) Cooks, R. G., Jo, S.-C., Green, J.: Collisions of organic ions at surfaces. *Appl. Surf. Sci.* 231–232, 13–21 (2004).
- (43) Samavat, F., Gladys, M. J., Jenks, C. J., Lograsso, T. A., King, B. V., O'Connor, D. J.: Surface layer self diffusion in icosahedral Al–Pd–Mn quasicrystals. *Surf. Sci.* 601, 5678–5682 (2007).
- (44) Volný, M., Elam, W. T., Branca, A., Ratner, B. D., Tureček, F.: Preparative soft and reactive landing of multiply charged protein ions on a plasma-treated metal surface. *Anal. Chem.* 77, 4890–4896 (2005).

- (45) Laskin, J., Hu, Q.: Reactive Landing of Gramicidin S and Ubiquitin Ions onto Activated Self-Assembled Monolayer Surfaces. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28, 1304–1312 (2017).
- (46) Mozetič, M.: Surface Modification to Improve Properties of Materials. *Materials.* 12, 441 (2019).
- (47) Miller, S. A.: Soft-Landing of Polyatomic Ions at Fluorinated Self-Assembled Monolayer Surfaces. *Science.* 275, 1447–1450 (1997).
- (48) Johnson, G. E., Gunaratne, D., Laskin, J.: Soft- and reactive landing of ions onto surfaces: Concepts and applications. *Mass Spectrom. Rev.* 35, 439–479 (2016).
- (49) Tata, A., Salvitti, C., Pepi, F.: From vacuum to atmospheric pressure: A review of ambient ion soft landing. *Int. J. Mass Spectrom.* 450, 116309 (2020).
- (50) Laskin, J., Johnson, G. E., Warneke, J., Prabhakaran, V.: From Isolated Ions to Multilayer Functional Materials Using Ion Soft Landing. *Angew. Chemie Int. Ed.* 57, 16270–16284 (2018).
- (51) Franchetti, V., Solka, B. H., Baitinger, W. E., Amy, J. W., Cooks, R. G.: Soft landing of ions as a means of surface modification. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 23, 29–35 (1977).
- (52) Gologan, B., Green, J. R., Alvarez, J., Laskin, J., Graham Cooks, R.: Ion/surface reactions and ion soft-landing. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7, 1490–1500 (2005).
- (53) Peng, W. P., Goodwin, M. P., Nie, Z., Volný, M., Ouyang, Z., Cooks, R. G.: Ion soft landing using a rectilinear ion trap mass spectrometer. *Anal. Chem.* 80, 6640–6649 (2008).
- (54) Pepi, F., Ricci, A., Tata, A., Favero, G., Frasconi, M., Delle Noci, S., Mazzei, F.: Soft landed protein voltammetry. *Chem. Commun.* 33, 3494–3496 (2007).
- (55) Gologan, B., Takáts, Z., Alvarez, J., Wiseman, J. M., Talaty, N., Ouyang, Z., Cooks, R. G.: Ion soft-landing into liquids: Protein identification, separation, and purification with retention of biological activity. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15, 1874–1884 (2004).
- (56) Rinke, G., Rauschenbach, S., Harnau, L., Albarghash, A., Pauly, M., Kern, K.: Active conformation control of unfolded proteins by hyperthermal collision with a metal surface. *Nano Lett.* 14, 5609–5615 (2014).
- (57) Verbeck, G., Hoffmann, W., Walton, B.: Soft-landing preparative mass spectrometry. *Analyst* 137, 4393–4407 (2012).
- (58) Espy, R. D., Badu-Tawiah, A., Cooks, R. G.: Analysis and modification of surfaces using molecular ions in the ambient environment. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 741–747 (2011).
- (59) Deng, Z., Thontasen, N., Malinowski, N., Rinke, G., Harnau, L., Rauschenbach, S., Kern, K.: A close look at proteins: Submolecular resolution of two- and three-dimensionally folded cytochrome c at surfaces. *Nano Lett.* 12, 2452–2458 (2012).
- (60) Oficiální návod k povrchům Biotarget. Bruker Daltonics 2012.
- (61) Darebna, P., Spicka, J., Kucera, R., Topolcan, O., Navratilova, E., Ruzicka, V., Volny, M., Novak, P., Pompach, P.: Detection and Quantification of Carbohydrate-Deficient Transferrin by MALDI-Compatible Protein Chips Prepared by Ambient Ion Soft Landing. *Clin. Chem.* 64, 1319–1326 (2018).

- (62) Kaboord, B., Perr, M.: Isolation of Proteins and Protein Complexes by Immunoprecipitation. *Methods Mol Biol.* 424, 349-364 (2008)
- (63) Prinetti, A., Prioni, S., Chigorno, V., Karagogeos, D., Tettamanti, G., Sonnino, S.: Immunoseparation of sphingolipid-enriched membrane domains enriched in Src family protein tyrosine kinases and in the neuronal adhesion molecule TAG-1 by anti-GD3 ganglioside monoclonal antibody. *J. Neurochem.* 78, 1162–1167 (2001).
- (64) Fujita, N., Kaito, M., Tanaka, H., Horiike, S., Urawa, N., Sugimoto, R., Konishi, M., Watanabe, S., Adachi, Y.: Hepatitis C virus free-virion and immune-complex dynamics during interferon therapy with and without ribavirin in genotype-1b chronic hepatitis C patients. *J. Viral Hepat.* 13, 190–198 (2006).
- (65) Stam, H., Hülsmann, W. C.: Effects of hormones, amino acids and specific inhibitors on rat heart heparin-releasable lipoprotein lipase and tissue neutral lipase activities during long-term perfusion. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 794, 72–82 (1984).
- (66) Döppler, H., Storz, P., Li, J., Comb, M. J., Toker, A.: A phosphorylation state-specific antibody recognizes Hsp27, a novel substrate of protein kinase D. *J. Biol. Chem.* 280, 15013–15019 (2005).
- (67) Monferran, S., Paupert, J., Dauvillier, S., Salles, B., Muller, C.: The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9. *EMBO J.* 23, 3758–3768 (2004).
- (68) Greenfield, E. A.: *Antibodies: A laboratory manual*, Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2014)
- (69) Qoronfleh, M. W., Ren, L., Emery, D., Perr, M., Kaboord, B.: Use of Immunomatrix Methods to Improve Protein-Protein Interaction Detection. *J. Biomed. Biotechnol.* 2003, 291–298 (2003).
- (70) Domen, P. L., Nevens, J. R., Mallia, A. K., Hermanson, G. T., Klenk, D. C.: Site-directed immobilization of proteins. *J. Chromatogr. A* 510, 293–302 (1990).
- (71) Sisson, T. H., Castor, C. W.: An improved method for immobilizing IgG antibodies on protein A-agarose. *J. Immunol. Methods* 127, 215–220 (1990).
- (72) Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N. K. J., Hartog, C. S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D. C., Reinhart, K.: Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 259–272 (2016).
- (73) Wentowski, C., Mewada, N., Nielsen, N. D.: Sepsis in 2018: a review. *Anaesth. Intensive Care Med.* 20, 6-13 (2019).
- (74) Hotchkiss, R. S., Karl, I. E.: The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *N. Engl. J. Med.* 348, 138–150 (2003).
- (75) Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Cooper-Smith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., Poll, T. Der, Vincent, J. L., Angus, D. C.: The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *Am. Med. Assoc.* 315, 801–810 (2016).

- (76) Heidecke, C. D., Hensler, T., Weighardt, H., Zantl, N., Wagner, H., Siewert, J. R., Holzmann, B.: Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. *Am. J. Surg.* 178, 288–292 (1999).
- (77) Hotchkiss, R. S., Tinsley, K. W., Swanson, P. E., Schmiege, R. E., Hui, J. J., Chang, K. C., Osborne, D. F., Freeman, B. D., Cobb, J. P., Buchman, T. G., Karl, I. E.: Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD4 + T Lymphocytes in Humans. *J. Immunol.* 166, 6952–6963 (2001).
- (78) Gotts, J. E., Matthay, M. A.: Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ* 353, i1585 (2016).
- (79) Kumar, S., Tripathy, S., Jyoti, A., and Singh, S. G.: Recent advances in biosensors for diagnosis and detection of sepsis: A comprehensive review. *Biosens. Bioelectron.* 124–125, 205–215 (2019).
- (80) Tang, B. M., Eslick, G. D., Craig, J. C., McLean, A. S.: Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 210–217 (2007).
- (81) Becker, K. L., Nylén, E. S., White, J. C., Müller, B., Snider, R. H.: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: A journey from calcitonin back to its precursors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 1512–1525 (2004).
- (82) Christ-Crain, M., Müller, B.: Procalcitonin on the Dusty Way to the Holy Grail: A Progress Report, in *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine 2005*. 461–476 (2005).
- (83) Weglöhner, W., Struck, J., Fischer-Schulz, C., Morgenthaler, N. G., Otto, A., Bohuon, C., Bergmann, A.: Isolation and characterization of serum procalcitonin from patients with sepsis. *Peptides* 22, 2099–2103 (2001).
- (84) Andreotti, G., Vitale, R. M., Avidan-Shpalter, C., Amodeo, P., Gazit, E., Motta, A. Converting the highly amyloidogenic human calcitonin into a powerful fibril inhibitor by three-dimensional structure homology with a non-amyloidogenic analogue. *J. Biol. Chem.* 286, 2707–2718 (2011).
- (85) Copp, D. H., Cheney, B.: Calcitonin - A hormone from the parathyroid which lowers the calcium-level of the blood. *Nature* 193, 381–382 (1962).
- (86) Copp, D. H., Cameron, E. C., Cheney, B. A., Davidson, A. G. F., Henze, K. G.: Evidence for calcitonin-a new hormone from The parathyroid that lowers blood calcium. *Endocrinology* 70, 638–649 (1962).
- (87) Pearse, A. G. :The cytochemistry of the thyroid C cells and their relationship to calcitonin. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 164, 478–487 (1966).
- (88) Zaidi, M., Moonga, B. S., Abe, E. Calcitonin and bone formation: A knockout full of surprises. *J. Clin. Invest.* 110, 1769–1771 (2002).
- (89) Hirsch, P. F., Baruch, H.: Is calcitonin an important physiological substance? *Endocrine.* 21, 201-208 (2003).
- (90) Samsudin, I., Vasikaran, S. D.: Clinical utility and measurement of procalcitonin. *Clin. Biochem. Rev.* 38, 59–68 (2017).

- (91) Nylén, E. S., Whang, K. T., Snider, R. H., Steinwald, P. M., White, J. C., Becker, K. L.: Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis. *Crit. Care Med.* 26, 1001–1006 (1998).
- (92) Steinwald, P. M., Whang, K. T., Becker, K. L., Snider, R. H., Nylén, E. S., White, J. C.: Elevated calcitonin precursor levels are related to mortality in an animal model of sepsis. *Crit. Care* 3, 11–16 (1999).
- (93) Wagner, K. E., Martinez, J. M., Vath, S. D., Snider, R. H., Nylén, E. S., Becker, K. L., Müller, B., White, J. C.: Early immunoneutralization of calcitonin precursors attenuates the adverse physiologic response to sepsis in pigs. *Crit. Care Med.* 30, 2313–2321 (2002).
- (94) Hoffmann, G., Czechowski, M., Schloesser, M., Schobersberger, W.: Procalcitonin amplifies inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in vascular smooth muscle cells. *Crit. Care Med.* 30, 2091–2095 (2002).
- (95) Müller, B., Becker, K. L., Kränzlin, Schächinger, H., Huber, P. R., Nylén, E. S., Snider, R. H., White, J. C., Schmidt-Gayk, C., Zimmerli, W., Ritz, R.: Disordered calcium homeostasis of sepsis: Association with calcitonin precursors. *Eur. J. Clin. Invest.* 30, 823–831 (2000).
- (96) Müller, B., Becker, K. L., Schächinger, H., Rickenbacher, P. R., Huber, P. R., Zimmerli, W., Ritz, R.: Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit. Care Med.* 28, 977–983 (2000).
- (97) Becker, K. L., Snider, R., Nylén, E. S.: Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: a harmful biomarker and a therapeutic target. *Br. J. Pharmacol.* 159, 253–264 (2010).
- (98) Nylén, E. S., Rohatgi, P., Becker, K. L., Snider, R. H., Thompson, K. A.: Pneumonitis-Associated Hyperprocalcitoninemia. *Am. J. Med. Sci.* 312, 12–18 (1996).
- (99) Nylén, E. S., O'Neill, W., Jordan, M., Snider, R., Moore, C., Lewis, M., Silva, O., Becker, K.: Serum Procalcitonin as an Index of Inhalation Injury in Burns. *Horm. Metab. Res.* 24, 439–442 (1992).
- (100) Ammori, B. J., Becker, K. L., Kite, P., Snider, R. H., Nylén, E. S., White, J. C., Larvin, M., McMahon, M. J.: Calcitonin precursors in the prediction of severity of acute pancreatitis on the day of admission. *Br. J. Surg.* 90, 197–204 (2003).
- (101) Kafetzis, D. A., Velissariou, I. M., Nikolaidis, P., Sklavos, M., Maktabi, M., Spyridis, G., Kafetzis, D. D., Androulakakis, E.: Procalcitonin as a predictor of severe appendicitis in children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24, 484–487 (2005).
- (102) Nylén, E. S., Al Arifi, A., Becker, K. L., Snider, R. H., Alzeer, A.: Effect of classic heatstroke on serum procalcitonin. *Crit. Care Med.* 25, 1362–1365 (1997).
- (103) Meisner, M., Tschakowsky, K., Hutzler, A., Schick, C., Schüttler, J.: Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. *Intensive Care Med.* 24, 680–684 (1998).
- (104) Inspirace schématu korelace závažnosti sepse s hladinou PCT: Thermo Fisher Sepsis Marker PCT - B·R·A·H·M·S PCT.  
dostupné na: <https://www.procalcitonin.com/clinical-utilities/sepsis/sepsis-marker-pct.html> (přístup 23. 4. 2020)



- (105) Jensen, J. U., Heslet, L., Jensen, T. H., Espersen, K., Steffensen, P., Tvede, M.: Procalcitonin increase in early identification of critically ill patients at high risk of mortality. *Crit. Care Med.* 34, 2596–2602 (2006).
- (106) Morgenthaler, N. G., Struck, J., Chancerelle, Y., Weglöhner, W., Agay, D., Bohuon, C., Suarez-Domenech, V., Bergmann, A., Müller, B.: Production of procalcitonin (PCT) in non-thyroidal tissue after LPS injection. *Horm. Metab. Res.* 35, 290–295 (2003).
- (107) Eschborn, S., Weitkamp, J.-H.: Procalcitonin versus C-reactive protein: review of kinetics and performance for diagnosis of neonatal sepsis. *J. Perinatol.* 39, 893–903 (2019).
- (108) Pepys, M. B., Hirschfield, G. M.: C-reactive protein: a critical update. *J. Clin. Invest.* 111, 1805–1812 (2003).
- (109) Hatzistilianou, M.: Diagnostic and Prognostic Role of Procalcitonin in Infections. *Sci. World J.* 10, 1941–1946 (2010).
- (110) Oliveira, C. F., Botoni, F. A., Oliveira, C. R. A., Silva, C. B., Pereira, H. A., Serufo, J. C., Nobre, V.: Procalcitonin versus C-reactive protein for guiding antibiotic therapy in sepsis: A randomized trial. *Crit. Care Med.* 41, 2336–2343 (2013).
- (111) Popis produktu: Diazyme Procalcitonin Assay.  
dostupné na: <https://www.diazyme.com/procalcitonin-pct-assay>  
(přístup 25. 4. 2020)
- (112) Popis produktu: B·R·A·H·M·S PCT-Q Assay.  
dostupné na: <https://www.procalcitonin.com/pct-assays/pct-q-rapid.html>  
(přístup 25. 4. 2020)