


Detekce rekombinantní ho Spike proteinu v krvi jedinců očkovaných proti SARS-CoV-2: Možné molekulární mechanismy

Carlo Brogna¹ | Simone Cristoni² | Giuliano Marino³ | Luigi Montano⁴ |
Valentina Viduto⁵ | Mark Fabrowski⁶ | Gennaro Lettieri⁷ | Marina Piscopo⁷ 

¹Oddělení výzkumu, Craniomed Group Facility Srl, Bresso, Itálie

²ISB-Iont Source & Biotechnologies Srl, Bresso, Itálie

³Marsanconsulting Srl. Společnost veřejného zdraví, Neapol, Itálie

⁴Andrologická jednotka a služba LifeStyle Medici na v Uro-andrologii, Místní zdravotní úřad (ASL) Salerno, Salerno, Itálie

⁵Long COVID-19 Foundation, Brookfield Court, Garforth, Spojené království

⁶Klinika urgentní medicíny, Royal Sussex County Hospital, Univerzitní nemocnice Sussex, Brighton, Spojené království

⁷Katedra biologie Neapolské univerzity Federico II, Neapol, Itálie

Korespondence

Marina Piscopo, Katedra biologie, Univerzita v Neapoli Federico II, 80126 Neapol, Itálie.

E-mail: marina.piscopo@unina.it

Carlo Brogna, oddělení výzkumu, zařazení skupiny Craniomed Srl, Bresso, 20091, Itálie.

E-mail: dir.brogna@craniomed.it

Abstraktní

Účel: Pandemie SARS-CoV-2 podnítila vývoj a použití nové

generace vakcín. Mezi nimi vakcína na bázi mRNA sestává z injekčního roztoku

mRNA kódující rekombinantní Spike, který je odlišitelný od

proteinu divokého typu v důsledku specifických aminokyselinových variací zavedených k udržení

proteinu v předfúzním stavu. Tato práce představuje proteomický přístup k odhalení

přítomnosti rekombinantního Spike proteinu u očkovaných jedinců bez ohledu na protilátkový

Experimentální design: Bylo použito hmotnostní spektrometrie vyšetření biologických vzorků pro detekci přítomnosti specifických fragmentů rekombinantního Spike proteinu u subjektů

kteří dostali vakcínu na bázi mRNA.

Výsledky: Specifický fragment PP-Spike byl nalezen v 50 % analyzovaných biologických vzorků a jeho

přítomnost byla nezávislá na titru IgG protilátky SARS-CoV-2. Minimální a maximální doba, kdy byl PP-

Spike detekován po očkování, byl 69

respektive 187 dní.

Závěry a klinická relevance: Předložena metoda umožňuje vyhodnotit

poločas molekuly Spikeho proteinu „PP“ a zvažovat rizika nebo přítomnost

pokračování v podávání dalších posilovacích dávek SARS-CoV-2 mRNA vac-

kína. Tento přístup je cennou podporou pro monitorování hladiny protilátek

a představuje první proteomickou detekci rekombinantního Spike u očkovaných

předmětů.

KLÍČOVÁ SLOVA

COVID-19, hmotnostní spektrometrie, SARS-CoV-2, Spike protein, mRNA vakcína

Zkratky: m1P; methyl pseudouridin; HCoV, lidské koronaviry; LNP, lipidová nanočástice; mRNA, messenger ribonukleová kyselina; DBS, suchá krevní skvrna; SARS-CoV-2, koronavirus těžkého akutního respiračního syndromu 2; ACE2, angiotensin-konvertující enzym 2; S, Spike protein; PP, dvojitá prolinová aminokyselina; wt, divoký typ; IgG, imunoglobulin G.

Carlo Brogna a Simone Cristoni přispěli k této studii stejnou měrou.

Toto je článek s otevřeným přístupem za podmínek [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) Licence, která umožňuje použití a distribuci na jakémkoli médiu za předpokladu, že původní dílo je řádně citováno, použité je nekomerční a nejsou prováděny žádné úpravy nebo úpravy. © 2023 Autoři. Proteomika – klinická aplikace vydané společností Wiley-VCH GmbH

1. ÚVOD

Těžký akutní respirační syndrom koronavirus 2019 (COVID-19) je onemocnění dýchacích cest COVID-19 (koronavirové onemocnění 2019), který je zodpovědný za pokračující pandemii, která drží celý svět pod kontrolou. Výzkumníci z celého světa během těchto pandemických let studovali tento virus a snažili se pochopit mechanismus jeho účinku [1–11]. RNA genom SARS-CoV-2 se skládá z přibližně 30 000 nukleotidů a obsahuje 11 hlavních kódujících genů. Ze struktury z hlediska SARS-CoV-2 se vyznačuje velkým počtem glykosylovaných Spike (S) proteinů pokrývajících jeho povrch a usnadňujících vazbu na receptor enzymu konvertujícího angiotenzin 2 (ACE2) hostitelské buňky, zprostředkující vstup virové buňky [12]. Spike protein (S) je jeden ze čtyř hlavních proteinů SARS-CoV-2 [13]. Umožňuje rozpoznání receptoru hostitelské buňky a následný vstup do hostitelské buňky. To sestává z distální podjednotky S1, která je užitečná pro rozpoznávání, a proximální podjednotku S2, která je nezbytná pro fúzi s membránou hostitelské buňky [13]. Během vývoje dvou nejpoužívanějších vakcín na bázi mRNA, Pfizer-BioNTech (BNT162b2- Comirnaty) a Moderna (mRNA-1273), byly všechny uridinové dusíkaté báze nahrazeny methyl pseudouridinem (m¹ψ) – méně imunogenní [14]. Stabilnější dusíkatou bázi [15]. Současně byly vytvořeny mutace ve 4284 nukleotidech tvořících Spike protein v pozicích K986P a V987P, aby se protein produkovaný po ribozomální m¹ψ stal stabilní prefuzní formou stimulující zvýšenou produkci lidských protilátek (obrázek 1A) [15]. Protein S SARS-CoV-2 je vysoce konzervovaný mezi všemi lidskými koronaviry (HCoV) a podílí se na rozpoznávání receptorů připojení viru a vstupu do hostitelských buněk.

Z tohoto důvodu představuje pro část vědců jeden z nejdůležitějších cílů pro vývoj vakcín a terapeutických přístupů proti COVID-19. Mezi vakcínami proti COVID-19 vyvinutými testovanými, které se ukázaly jako nejslibnější výsledky v prevenci infekce COVID-19 jsou novou třídou vakcín produkty složené vlákna messenger ribonukleovému kyseliny (mRNA) zapouzdřené v lipidových nanočásticích (LNP). Dva z nich obdrželi „povolení k nouzovému použití“ (od Federální a lékařské správy) a „podmíněné schválení“ (od Evropské agentury pro léčivé přípravky). Oba se skládají z rekombinantní mRNA, která má být inokulována jako vakcína, která kóduje rekombinantní Spike protein SARS-CoV-2. Ačkoliv jsou mRNA různé obě kódují stejný rekombinantní Spike protein (zde nazývaný PP-Spike). To se liší od přirozeného (wt-Spike, obrázek 1B) dvojitou změnou aminokyselin na pozicích 986 a 987 (K986P a V987P, tj. aminokyseliny lysin a valin jsou obě nahrazeny dvěma prolinovými aminokyselinami) [16, 17], aby se stabilizovala Spike konformace v neaktivním prefuzním stavu (obrázek 1A). Zavedená dvojitá aminokyselinová variace ruší místo štěpení trypsinem. Výsledkem je, že pomocí tryptického štěpení [18] a následné analýzy hmotnostní spektrometrií [19–22] je možné rozlišit syntetické Spike proteiny vzniklé transkripcí mRNA vakcín z přirozeného Spikea cirkulujícího v biologických tekutinách. Zde uvádíme metodu logický přístup, který dokáže specificky detekovat přítomnost PP-Spike v biologických tekutinách lidských a zvířecích organismů, jako je krev, moč, sliny a tekutiny z bronchoalveolární laváže.

Přestože pandemie COVID-19 přinesla celý svět na kolena, umožnila také mnoha vědcům rozvíjet nápady a řešení proti virům. Patří sem mRNA vakcíny, které díky své všestrannosti ve výrobě mohou představovat nový standard očkování. Je to však povinnost vědce nezanedbávat kontroly. V tom spočívá důležitost sledování vakcínou vyvolaného Spike proteinu „PP“ po určité době období po očkování v lidských biologických vzorcích. The prezentovaná metoda umožňuje posoudit poločas rozpadu Spike "PP" proteinová molekula a zvažovat rizika nebo přítomnost pokračování v dalších posilovacích dávkách mRNA SARS-CoV-2 vakcíny.

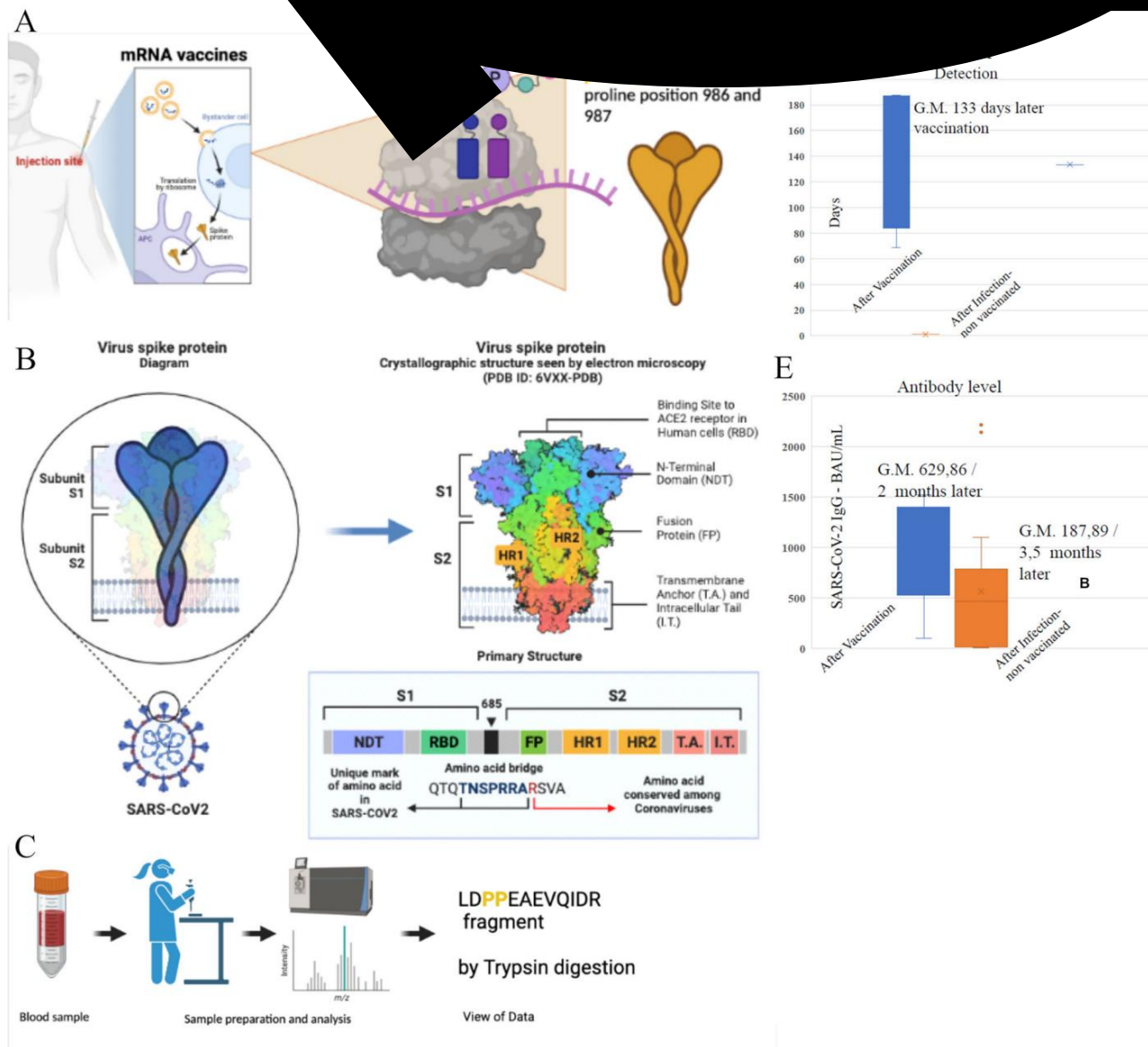
Studijní skupina z jižní Itálie tvořilo 40 subjektů, 20 bylo vakcinováno od dubna 2022 s celým cyklem mRNA vakcín a 20 bylo neočkovaných s negativitou na COVID-19 na nazofaryngeální test a bez titru žádných protilátek. Přibylo dalších 20 neočkovaných osob, které byly pozitivní na COVID-19. Specifický fragment PP-Spike byl nalezen v 50 % analyzovaných biologických vzorků (obrázky 1C–E a 2). Tato přítomnost byla nezávislá na titru protilátek IgG proti SARS-CoV-2. Titry protilátek měly geometrický průměr 629,86 BAU/ml (obrázek 1E). Minimální doba detekce PP-spike byla 69 dní po vakcinaci, zatímco

maximální doba byla 187 dní. Všechny kontroly (vzorky od neočkovaných jednotlivců) byly negativní. Kontrolní skupina (20 neočkovaných osob) byl také testován po nakažení COVID-19 a byl negativní na PP-spike.

Některé studie [23] pozorovaly přítomnost vakcínového Spike proteinu bezprostředně po injekci.

Podle autorů [15] a obecně, vakcíny messenger molekuly nanočástic RNA by měly být zachyceny imunitním systémem buňky v lymfatických uzlinách po injekci do svalu. Nedávno jiné autoři izolovali sekvence messenger RNA vakcín z periferní plazmy po 28 dnech po injekci [24]. Otázka zda nebo ne, vakcínová RNA může být integrována do lymfocytu nebo jiného o tělesných buňkách se hodně diskutuje. Nicméně pozorování produkovaného proteinu, jak je uvedeno v tomto rukopise, přesahuje čistě kognitivní aspekt a definuje metodu, jak ověřit nejen perzistenci vakcinační RNA, ale i kvantifikaci produktu, tedy proteinu, který předpokládá se, že indukuje tvorbu protilátek, aby se ověřil správný poločas a přítomná potřeba aktualizovat stav vakcín. Pomocí hmotnostní spektrometrie vyšetření biologických vzorků jsme detekovali přítomnost specifických fragmentů rekombinantního Spike proteinu asi u 50 % subjektů, které dostaly vakcíny na bázi mRNA. v

v některých případech jsme našli marker PP-Spike u očkováných jedinců více než 30 dnů po očkování, což naznačuje, že je možné detekovat očkovací „spike“ protein i někdy po očkování a v jakákoli organická tkáň (údaje se připravují). Na základě získaných výsledků



OBRÁZEK 1 Schematický diagram produkce PP Spike proteinu. (A) Tvorba Spike PP proteinu po injekci mRNA vakcíny. (B) Přítomnost nemodifikovaného Spike proteinu divokého typu. (C) Schéma extrakce a detekce (podrobněji v textu). (D) kvantifikace titru protilátek u 20 očkovanych případů (E) čas ode dne dokončení vakcinace do objevení Spike proteinu „PP“ indukovaného mRNA vakcíny.

Lze vytvořit hypotézy pro možné nímolekulární mechanismy perzistence „Spike PP“.

Zejména jsou možné jsou tři hypotézy

zobrazeno na obrázku 3.

1. Je možné že mRNA může být integrována nebo re-transkribována do některé buňky.
2. Je možné že pseudouridyly v určité pozici sekvence, jak je popsáno v článku, indukují tvorbu spike proteinu která je vždy konstitutivně aktivní. Ale zdá se velmi vzdálená jako hypotéza.
3. Je možné že bude vybrána nanočástice obsahující mRNA bakteriemi normálně přítomnými na bazální úrovni v krvi. V faktem je existence krevní mikrobioty u klinicky zdravého jedince za posledních 50 let. Opravdu, nepříjemný

radiometrické analýzy naznačují existenci živých mikrobiálních forem v erytrocytech [25]. Navíc pozorování PP

špičkový marker u jedinců očkovanych více než 30 dnů po

vakcíny u asi 50 % subjektů lze také vysvětlit širokým

biodiverzitou eukaryotické a prokaryotické mikrobioty identifikované

krve pomocí sekvenčních technologií nové generace [25].

Závěrem možnost zjištění přítomnosti specifických

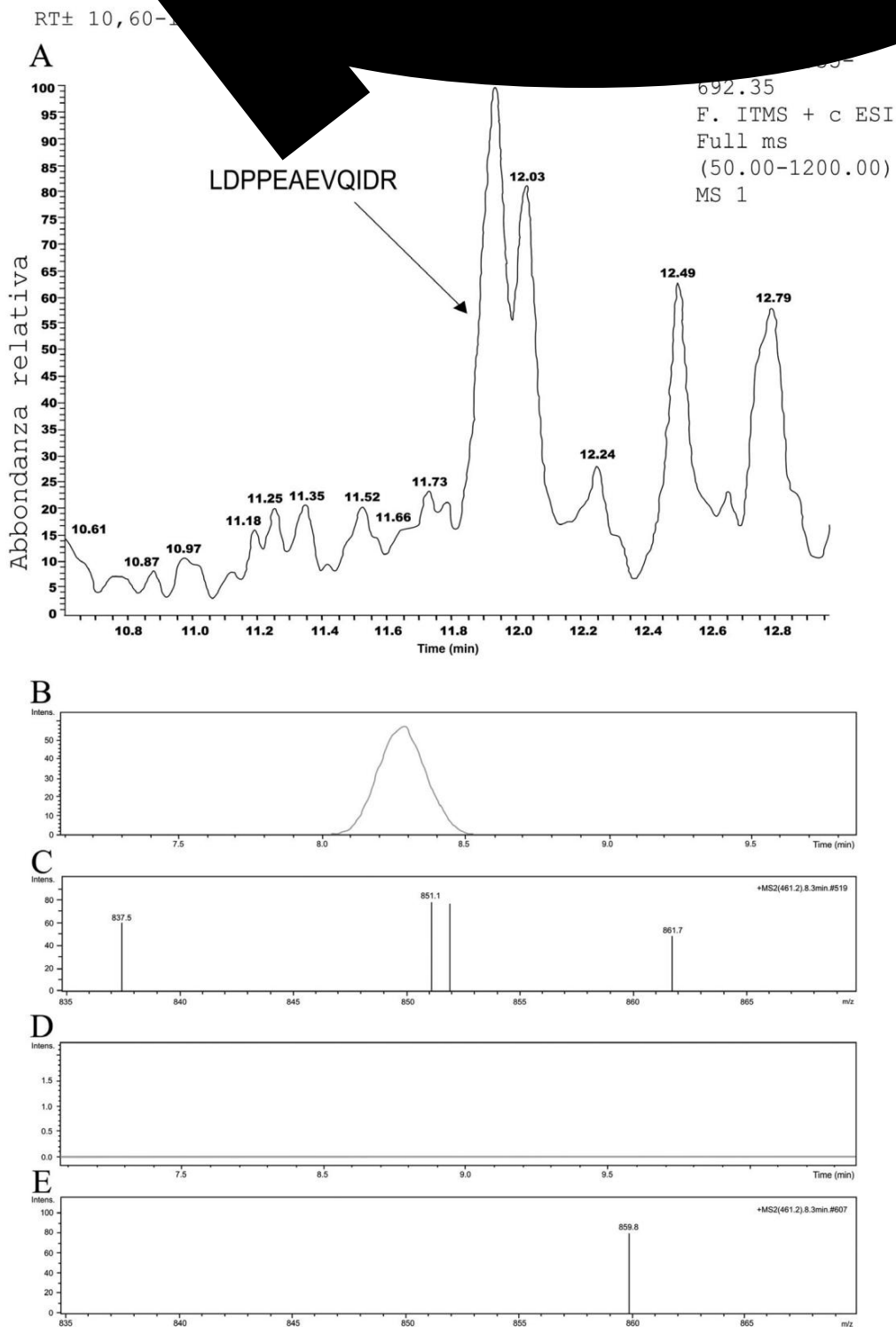
fragmentů rekombinantního Spike proteinu otevře nové možnosti pro monitorování

přítomnosti a položasu rozpadu vakcíny Spike proteinu u vakcinovaných jednotlivců. Předložení hypotézy vyžadují další a rozsáhlejší studie.

V současnosti se tato počáteční pozorování omezují pouze na posouzení

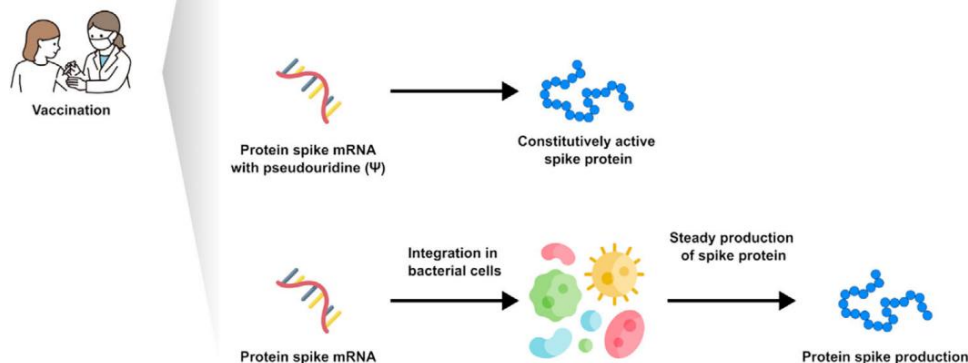
přítomnosti vakcinačního proteinu s cílem poskytnout pomoc

v rozhodnutí jednotlivce podat posilovací dávky nebo nečinit.



OBRÁŽEK 2 Molekulární ion sekvence LDPPEAEVQIDR- Spike „PP” . (A) Ukazuje poměr m/z (molekulární iont) detekce SEQ ID NO:1.

Ukazuje při klad spektra peptidovézóny poznamenanéenzymatickým selhání m štěpení „PP” aminokyselin proteinu „Spike” indukovaný m mRNA vakcí nými. (BE) Extrakční hmotnostní chromatogramy (B) očkovaných subjektů a (D) kontrolní ch vzorků byly zí skány fragmentací [M+3H]³⁺iontu při m/z 461 a monitorování m jednoduše nabitého signálu při m/z 851. jsou tandemová hmotnostní spektra zí skaná analýzou (C) očkovaného subjektu a (E) kontrolního subjektu. Bylo nastří knuto pět mikrolitrů natrávených vzorků a průtok eluentu byl 250 mikrolitrů/min.



OBRÁZEK 3 Možné molekularní mechanismy perzistence „Spike PP“.

2 SOUHRNĚJÍ ČÍ ÚDAJE

Statistická analýza: t-test s © 2023 GraphPad Software byl proveden mezi dvěma skupinami, očkovaná a neočkovaná, pro přítomnost peptidu spike zvaného PP. "P-hodnota a statistika."
 Významnost: Dvoustranná hodnota P je rovna 0,0010. Důvěrný interval: Průměr skupiny jedna minus skupina dvě se rovná 0,40, 95% interval spolehlivosti tohoto rozdílu: 0,17-0,63. Mezihodnoty použité výpočty: $t = 35,590$, $df = 38$, standardní chyba rozdílu $ence = 0,112$. Rozdíl v titru protilátek mezi těmito dvěma skupinami není významný.

3 EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY

V souladu s platnými územními předpisy, kazuistikami, případem série a observační retrospektivní studii nevyžadují etiku schválení výborem. Informovaný souhlas všech účastníků již před odjezdem do Itálie byla získána. Bylo tam dvacet lidských biologických vzorků shromážděných od očkovaných subjektů expresně, zdarma a informovaně se shromážděním a použitím. Geometrický průměr jejich protilátek' titer proti spike proteinu byl 629,86 BAU/ml po 60 dnech od vakcinace. Kromě toho bylo odebráno 20 lidských biologických vzorků neočkovaných subjektů (kontrolní skupina, negativní) s expresními, volnými a informovanými souhlasem se shromážděním a použitím. Kandidáti neměli previ prodělaly COVID-19 a byly negativní na molekulární testy výměrem z nosohltanu a titer protilátek byl negativní. Jiných 20 lidských biologických vzorků od neočkovaných pacientů, kteří byli nemocní s COVID-19, byly získány (geometrický průměr titru protilátek vs. spike protein byl 187,89 BAU/ml později 105 dnů od onemocnění).

3.1 | Předanalytické

Předklinický odběr vzorků suché krve byl proveden v souladu s vědeckou literaturou: technika Dry Blood Spot (DBS) je com pro odběr malého množství krve, zejména od novorozenců pro screeningovou aplikaci. Tuto metodu poprvé publikoval Robert Guthrie na počátku 60. let 20. století a je založen na odběru vzorků z malokrevní skvrny na fil místo natižení několika mililitrů krve do lahvičky. s Technika DBS, vzorkování je snadná rychle bez potřeby vyškoleného profesionála profesora. Nicméně malé množství odebrané krve (~20–40 μl) tvoří tento přístup je z hlediska přípravy vzorků analyticky náročnější a citlivost ve srovnání s tradičním odběrem krve [26, 27]. Krev kapky byly odebrány ve sterilním režimu. Pro zachování bílkovin ve struktuře byl suchý krevní filtr udržován při -20°C, dokud zpracování [28].

3.2 | Odůvodnění

Trypsin [18] je enzym patřící do třídy hydroláz, schopných proteolytickým štěpením redukovat proteiny na menší polypeptidy. se specificitou pro arginin (R) a lysin (K). Syntetický Spike protein a přirozený Spike protein lze tak rozlišit, jak produkují různě tryptické produkty trávení:

- Při štěpení trypsinem je PP-spike kódovaný vakcínová mRNA produkuje fragment LDPPEAEVQIDR (PP-Spike marker) (obrázek 2C).
- Protein SAR-CoV-2 divokého typu, když je štěpen trypsinem, produkuje dva menší fragmenty, jmenovitě LDK + VEAQVQIDR.

TABULKA 1 Chromatografické podmínky gradientové eluce.

čas (min)	% C	Průtok (ml/min)
0	2 %	0,250
2,5	2 %	0,250
3	80 %	0,250
7	80 %	0,250
8	2 %	0,250

Poznámka: Procento eluentu fáze C (CH₃CN) se uvádí spolu s průtokem eluentu při různých dobách gradientové eluce.

Bylo sekvenováno více než 6 600 000 genomů SARS-CoV-2, a zdá se, že žádný z nich nemá mutace K986P a V987P, včetně varianty Omicron [29].

Použití puřiny: Dvojitě destilovaná voda (VWR); hydrogenuhličitán amonný (NH₄HC03) (Sigma Aldrich). Reagencie: Trypsin od Promega.

Příprava činidla: Roztok trypsinu 25 ng/μL.

Postup přípravy: Resuspendujte v lahvičce 20 μg pevného trypsinu 800 ul 50 mM roztoku NH₄HC03. Vortexujte lahvičku až do trypsinu je zcela rozpuštěn.

Peptid odpovídající frekvenci LDPPEAEVQ... (UK)

... na koncentraci ...
... g/ml v dvakrát destilované vodě. Deset mikrolitrů bylo vstříknuto do ...
... MS při stroje pro kontrolní účel. Peptid detekovaný v ...
... byl charakterizován na základě ... EU

3.3 Enzymatické trávení

Postup enzymatického trávení ... kapek se provádí pomocí ...
... digestoř, aby se minimalizovalo vystavení obsluhy jakékoli formy ...
... chemické/biologické nebezpečí. Pro každou krev byla použita ... voda ...
... vzorek. Více než 2 μl kapilární krve do označené Eppendorfovy ...
... 40 ul trypsinu (P... solubilizovaného v 50 mmol NH...
... roztok do vzorku ... dobu 30 s; otestovat pH, ...
... mezi 7 a 8; přečistěte Eppendorfovu trubici do termobloku ...
... 2 dny při 37 °C; přidejte 40 ul ... 0 mmol. S...
... supernatantu získaáno po centrifugaci při 13000 G pro ...
... 10 min a přeneste do Eppendorfovy zkumavky. Přidejte 2 μl čistě kyseliny mravenčí ...
... a přeneste roztok do injekční lahvičky. Lahvička se vloží do ...
... autosampler spojený s hmotnostním spektrometrem a vstříkne se 5 ul ...
... do chromatografické kolony.

3.4 Přístrojové vybavení LC-SACI-MS

Analýza byla provedena pomocí Surveyor MS HPLC (ThermoFisher, USA). Použitá kolona byla Kinetex 50 x 4,6 mm 2,6 μm. Analýza byla provedena pomocí dvoufázového gradientu: Fáze A (H₂O + 0,2 % kyselina mravenčí (HCOOH)) a fáze C (CH₃CN) (tabulka 1). Použitý chromatografický gradient je uveden v tabulce 1. Objem vzorku injektovaného je 5 μl. Použitým ionizačním zdrojem je SACI-ESI. Povrch

potenciál 0 V, tlak plynu v rozprašovači 75 PSI a průtok suchého plynu. Bylo použito 1,0 l/min. Teplota suchého plynu je 320 °C [19–22].

PODĚKOVÁNÍ

Děkujeme všem pacientům, kteří se zúčastnili naší studie. My děkujeme Dr. Aquilino Frongillo za technickou podporu. Tento výzkum neobdržel žádný externí financování.

PROHLÁŠENÍ O STŘETU ZÁJMŮ

Autoři neprohláší žádný střet zájmů.

DATA AVAILABILITY PROHLÁŠENÍ

Údaje jsou k dispozici na vyžádání u autorů.

ORCID



REFERENCE

- Brogna, B., Brogna, C., Petrillo, M., Conte, AM, Benincasa, G., Montano, L., & Piscopo, M. (2021). Detekce SARS-CoV-2 ve vzorku stolice od pacienta s typickými nálezy pneumonie COVID-19 na CT ale negativní na více testů SARS-CoV-2 RT-PCR na orofaryngu a vzorky nasofaryngeálních výtěrů. *Medicina*, 57(3), 3. <https://doi.org/10.3390/medicina57030290>
- Brogna, C., Brogna, B., Bisaccia, DR, Giuliano, M., Montano, L., Cristoni, S., Petrillo, M., & Piscopo, M. (2022). SARS-CoV-2: Reinfekce po 18 měsících předchozího případu s vícečetnými negativními testy z nosohltanových výtěrů a pozitivní molekulární testem. *Medicina*, 58(5), 5. <https://doi.org/10.3390/medicina58050642>
- Brogna, C., Brogna, B., Bisaccia, DR, Lauritano, F., Marino, G., Montano, L., Cristoni, S., Prisco, M., & Piscopo, M. (2022). Mohli SARS-CoV-2 mají bakteriofágové chování nebo indukují aktivitu jiných bakteriofágů? *Vakcíny*, 10(5), 5. <https://doi.org/10.3390/vakciny10050708>
- Brogna, C., Costanzo, V., Brogna, B., Bisaccia, DR, Brogna, G., Giuliano, M., Montano, L., Viduto, V., Cristoni, S., Fabrowski, M., & Piscopo, M. (2023). Analýza bakteriofágového chování lidské RNA virus SARS-CoV-2 prostřednictvím integrovaného přístupu imunofluorescenční mikroskopie, proteomiky a kvantifikace D-aminokyselin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 4. <https://doi.org/10.3390/ijms24043929>
- Brogna, C., Cristoni, S., Brogna, B., Bisaccia, DR, Marino, G., Viduto, V., Montano, L., & Piscopo, M. (2023). Peptidy podobné toxinům z bakteriální kultury pocházející ze střevního mikrobiomu infikovaného SARS-CoV-2—nová data pro možnou roli v dlouhém vzoru COVID. *biomedicines*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11010087>
- Gu, W., Gan, H., Ma, Y., Xu, L., Cheng, ZJ, Li, B., Zhang, X., Jiang, W., Sun, J., Sun, B., & Hao, C. (2022). Molekulární mechanismus SARS-CoV-2 vyhýbající se antivirovému imunitnímu hostiteli. *Virologický časopis*, 19(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01783-5>
- Gusev, E., Sarapultsev, A., Solomatina, L., & Chereshev, V. (2022). SARS-CoV-2-specifická imunitní odpověď a patogenese COVID 19. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1716. <https://doi.org/10.3390/ijms23031716>
- Patel, R., Kaki, M., Potluri, VS, Kahar, P., & Khanna, D. (2022). Komplexní přehled vakcín proti SARS-CoV-2: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 18(1), 2002083. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.2002083>
- Sandulescu, O., Apostolescu, CG, Preoteșcu, LL, Streinu-Cercel, A., & Sandulescu, M. (2023). Terapeutický vývoj pro infekci SARS-CoV-2 – molekulární mechanismy účinku antivirotik a

- strategie pro zmiřování rezistence u vznikajících variant v klinické praxi. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1132501. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1132501>
10. Sasidharan, S., Sarkar, N., & Saudagar, P. (2023). Objev com liber inhibující vířenásobnící le SARS-CoV-2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(6), 2602–2617. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2025149>
11. Silva Andrade, B., Siqueira, S., de Assis Soares, WR, de Souza Rangel, F., Santos, NO, dos Santos Freitas, A., Ribeiro da Silveira, P., Tiwari, S., Alzahrani, KJ, Góes-Neto, A., Azevedo, V., Ghosh, P., & Barh, D. (2021). Long-COVID a post-COVID zdravotní komplikace: Aktuální přehled klinických stavů a jejich možných molekulárních mechanismů. *Viry*, 13(4), 4. <https://doi.org/10.3390/v13040700>
12. Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Funkční hodnocení buněčného vstupu a využití receptorů pro SARS-CoV-2 a další linie B beta koronavirů. *Nature Microbiology*, 5(4), 562–569. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>
13. Dai, L., & Gao, GF (2021). Virovéci le pro vakcíny proti COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, 21(2), 2. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00480-0>
14. Andries, O., McCafferty, S., De Smedt, SC, Weiss, R., Sanders, NN, & Kitada, T. (2015). N(1)-methylpseudouridin-inkorporovaná mRNA provádí pseudouridin-inkorporovanou mRNA tím, že poskytuje zvýšenou proteinovou expresi a snižuje imunogenicitu v savčích buněčných liniích a myších. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 217, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.051>
15. Nance, KD, & Meier, JL (2021). Úpravy v případě nouze: Role N1-methylpseudouridinu ve vakcínách proti COVID-19. *ACS Central Sciences*, 7(5), 748–756. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00197>
16. Corbett, KS, Edwards, DK, Leist, SR, Abiona, OM, Boyoglu Barnum, S., Gillespie, RA, Himansu, S., Schäfer, A., Ziwawo, CT, DiPiazza, AT, Dinnon, KH, Elbashir, SM, Shaw, CA, Woods, A., Fritch, EJ, Martinez, DR, Bock, KW, Minai, M., Nagata, BM, & Graham, BS (2020). Návrh mRNA vakcíny SARS-CoV-2 umožní prototypovou připravenost na patogeny. *Příroda*, 586(7830), 567–571. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>
17. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, KS, Goldsmith, JA, Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, BS, & McLellan, JS (2020). Cryo-EM struktura špičky 2019-nCoV v prefuzní konformaci. *Science*, 367(6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
18. Olsen, JV, Ong, S.-E., & Mann, M. (2004). Trypsin štěpí výhradně C-terminální zbytky na argininové a lysinové zbytky. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(6), 608–614. <https://doi.org/10.1074/mcp.T400003-MCP200>
19. Cristoni, S., & Bernardi, LR (2004). Bioinformatika v analýze dat hmotnostních spekter pro proteomická studia. *Expert Review of Proteomics*, 1(4), 469–483. <https://doi.org/10.1586/14789450.1.4.469>
20. Cristoni, S., Bernardi, LR, Biunno, I., Tubaro, M., & Guidugli, F. (2003). Povrchově aktivovaná chemická ionizace bez výboje za atmosférického tlaku. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(17), 1973–1981. <https://doi.org/10.1002/rcm.1141>
21. Lundgren, DH, Hwang, S.-I., Wu, L., & Han, DK (2010). Role spektrální ho počítání v kvantitativní proteomice. *Expert Review of Proteomics*, 7(1), 39–53. <https://doi.org/10.1586/epr.09.69>
22. Okada, P., Buathong, R., Phuygun, S., Thanadachakul, T., Pammen, S., Wongboot, W., Waicharoen, S., Wacharapluesadee, S., Uttayamakul, S., Vachiraphan, A, Chittaganpitch, M., Mekha, N., Janjai, M., Jamsirithaworn, S., Lee, RT, & Maurer-Stroh, S. (2020). Časné vzorce přenosu koronavirové nemoci 2019 (COVID-19) u cestujících z Wu-chanu do Thajska, leden 2020. *Eurosurveillance*, 25(8), 2000097. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.8.2000097>
23. Cognetti, JS, & Miller, BL (2021). Monitorování sérového vrcholového proteinu pomocí fotonických biosenzorů po vakcinaci proti SARS-CoV-2. *Senzory*, 21(17), 17. <https://doi.org/10.3390/s21175857>
24. Castruita, JAS, Schneider, UV, Mollerup, S., Leineweber, TD, Weis, N., Bukh, J., Pedersen, MS, & Westh, H. (2023). Sekvence mRNA vakcíny s vrcholem SARS-CoV-2 cirkuluje v krvi až 28 dní po očkování proti COVID-19. *Apmis*, 131(3), 128–132. <https://doi.org/10.1111/apm.13294>
25. Tsafarova, B., Hodzhev, Y., Yordanov, G., Tolchkov, V., Kalfin, R., & Panaiotov, S. (2023). Morfologie krevní mikroflóry u zdravých jedinců hodnocená světelnou a elektronovou mikroskopií. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1091341. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.1091341>
26. Yishai Aviram, L., Magen, M., Chapman, S., Neufeld Cohen, A., Lazar, S., & Dagan, S. (2018). Odběr vzorků Dry Blood Spot pro postexpozici monitorování bojových chemických látek – in vivo stanovení fosfonových kyselin pomocí LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1093-1094, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.035>
27. Lékařský poradní sekretariát. (2003). Novorozenecký screening vrozených poruch metabolismu pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie: Analýza založená na důkazech. *Ontario Health Technology Assessment Series*, 3(3), 1–36.
28. Di Girolamo, F., Alessandroni, J., Somma, P., & Guadagni, F. (2010). Preanalytické operační postupy pro profilování nízkomolekulárních proteinů v séru. *Journal of Proteomics*, 73(3), 667–677. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.09.006>
29. Miller, NL, Clark, T., Raman, R., & Sasisekharan, R. (2021). Pohledy na mutační krajinu varianty SARS-CoV-2 Omicron. *Cell Reports Medicine*, 3(2), 100527. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100527>
30. Cristoni, S., Dusi, G., Brambilla, P., Albini, A., Conti, M., Brambilla, M., Bruno, A., Di Gaudio, F., Ferlin, L., Tazzari, V., Mengozzi, S., Barera, S., Sialer, C., Trenti, T., Cantu, M., Rossi Bernardi, L., & Noonan, DM (2017). SANIST: Optimalizace technologie pro identifikaci sloučenin na základě směrnice Evropské unie s aplikacemi ve forenzních, farmaceutických a potravinářských analýzách. *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 52(1), 16–21. <https://doi.org/10.1002/jms.3895>

Jak citovat tento článek: Brogna, C., Cristoni, S., Marino, G., Montano, L., Viduto, V., Fabrowski, M., Lettieri, G., & Piscopo, M. (2023). Detekce rekombinantního Spike proteinu v krvi jedinců očkových proti SARS-CoV-2: Možné molekulární mechanismy. *PROTEOMIKA – klinická aplikace*, 1–7. <https://doi.org/10.1002/prca.202300048>