

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta  
Katedra biochemie

# Studium vlivu kofaktoru na strukturu proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie

---

Characterization of cofactor influence on protein  
structure using mass spectrometry



**Bc. Michal Rosůlek**

Vedoucí práce: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Zdeněk Kukačka

Praha 2015

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Petra Nováka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne:.....

.....  
Michal Rosůlek

## **Poděkování**

Tímto děkuji zejména vedoucímu práce RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Zdeňkovi Kukačkovi za pomoc při realizaci této práce, a to jak v rovině odborné, tak i osobní. Dále děkuji RNDr. Petru Manovi, Ph.D. a Mgr. Alanu Kádkovi za uvedení do problematiky vodík-deuteriové výměny a za pomoc s touto problematikou spojenou.

Mé poděkování patří i členům Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. za možnost vypracovat v jejich prostorách tuto diplomovou práci a za jejich vysokou kolegiálníitu.

V neposlední řadě patří dík i mé rodině za poskytnutí nemalé podpory směřované k mým studiím.

## Abstrakt

Bakteriální protein WrbA z *E. coli* je zakládajícím členem nové rodiny FMN dependentních NAD(P)H oxidoreduktas, tvořící funkční i strukturní vývojový stupeň mezi bakteriálními flavodoxiny a některými savčími NAD(P)H:chinon oxidoreduktasami. Z těchto důvodů je protein WrbA v poslední době intenzivně studován pomocí různých analytických metod i počítačových simulací. Protein WrbA participuje na ochraně buněk před oxidativním stresem, přesná funkce proteinu WrbA *in vivo* je však stále neznámá. Protein WrbA tvoří v roztocích multimery, v  $\mu\text{M}$  koncentracích se při nízkých teplotách ( $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) nachází ve formě dimeru, s rostoucí teplotou tetramerizuje. Dostupné trojrozměrné krystalové struktury obsahují informace pouze o tetramerní formě proteinu, dimerní forma dosud nebyla strukturně charakterizována.

Tato práce byla zaměřena na studium dynamického chování proteinu v roztoku metodami vodík-deuteriové výměny a chemického síťování s následnou analýzou hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (FT-ICR). Sledováno bylo chování proteinu v závislosti na vazbě kofaktoru FMN nebo změnách teploty a koncentrace. Analýzou dat z vodík-deuteriové výměny byly získány informace o přístupnosti rozpouštědla a dynamice pro kompletní sekvenci proteinu. Popsán byl stabilizační vliv kofaktoru na tetramerní strukturu proteinu, nalezeny byly ovšem i velice flexibilní oblasti aminokyselinové sekvence napříč všemi experimentálními podmínkami. Flexibilita částí sekvence byla potvrzena chemickým síťováním. Kombinací dat získaných vodík-deuteriovou výměnou a chemickým síťováním bylo navíc určeno rozhraní vzniku dimeru v roztocích apoproteinu.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, konformace proteinu, chemické zesíťení, vodík-deuteriová výměna, protein vázající tryptofanový represor

## Abstract

Bacterial protein WrbA from *E. coli* is the founding member of a new family of FMN-dependent NAD(P)H oxidoreductases, forming a functional and structural bridge between bacterial flavodoxin and certain mammalian NAD(P)H:quinone oxidoreductase. For these reasons, protein WrbA is recently intensively studied using various analytical and computing methods. Protein WrbA participates in the protection of cells against oxidative stress, but precise function of the protein WrbA *in vivo* is still unknown. Protein WrbA forms multimers in solutions. In  $\mu\text{M}$  concentrations and at low temperature (4 °C) the protein is in the form of a dimer, with increasing temperature becomes tetrameric. Available three-dimensional crystal structure contains the information about the tetrameric form of the protein, the dimeric form has not been structurally characterized.

This thesis was focused on the study of the dynamic behavior of protein WrbA in solution using methods of hydrogen-deuterium exchange and chemical cross-linking followed by mass spectrometric analysis with high resolution (FT-ICR). Behavior of the protein was monitored according to the presence of cofactor FMN. Effect of temperature and protein concentration was also studied. Hydrogen-deuterium exchange provided information about solvent accessibility and dynamics of the entire protein sequence. Cofactor stabilizing effect on the structure of the protein tetramer was described, however, very flexible regions of the amino acid sequences were also found across all experimental conditions. Flexible parts of the sequence were confirmed by chemical cross-linking. Interface of dimer formation in apoprotein solution was also designed combining data obtained by hydrogen-deuterium exchange and chemical cross-linking. (in Czech)

Key words: mass spectrometry, protein conformation, chemical cross-linking, hydrogen-deuterium exchange, Tryptophan repressor binding protein

# Obsah

1. Seznam zkratk	8
2. Teoretický úvod	9
2.1 Protein	9
2.1.1 Sekvenční porovnání	9
2.1.2 Flavodoxin WrbA	11
2.1.3 Experimentální studie proteinu WrbA	12
2.1.3.1 Analytická centrifugace proteinu WrbA	13
2.1.4 Enzymová aktivita WrbA	14
2.1.5 Krystalové struktury proteinů WrbA rodiny	15
2.2 Metody využívající hmotnostní spektrometrii ke studiu struktury biomolekul	19
2.2.1 Vodík-deuteriová výměna	20
2.2.2 Kinetika výměnné reakce	21
2.2.3 Faktory ovlivňující kinetiku výměny	21
2.2.4 Vývoj metody vodík-deuteriové výměny	24
2.3 Chemické síťování	26
2.3.1 Základní uspořádání metod chemického síťování	26
2.3.2 Modifikace síťovacími činidly	29
2.3.2.1 Rozdělení síťovacích činidel	29
2.3.2.2 NHS estery	29
2.3.2.3 Dihydrazidy	31
2.3.3 Distanční geometrie a proteinové modelování	32
3. Cíle práce	33
4. Materiál	34
4.1 Biologický materiál	34
4.2 Seznam chemikálií	34
4.3 Seznam přístrojů a materiálu	35
4.4 Seznam roztoků	36
4.5 Softwarové vybavení	36
5. Metody	37
5.1 MS charakterizace proteinu	37
5.2 Vodík-deuteriová výměna	37
5.2.1 Příprava reakčních směsí	37

5.2.2	Provedení vodík-deuteriové výměny .....	38
5.2.3	Optimalizace proteolýzy proteinu WrbA.....	39
5.2.4	Hmotnostně spektrometrická analýza produktů H-D výměny .....	41
5.3	Síťovací reakce.....	42
5.3.1	Příprava proteinu pro síťovací reakce.....	42
5.3.2	Stanovení koncentrace metodou BCA .....	42
5.3.3	Reakce s činidly chemického síťování .....	42
5.3.4	Elektroforetická separace produktů síťovací reakce.....	43
5.3.5	Proteolýza produktů síťovací reakce .....	43
5.3.5.1	Enzymová proteolýza v gelu .....	43
5.3.5.2	Enzymová proteolýza v roztoku .....	44
5.3.5.3	Chemická proteolýza .....	44
5.3.6	LC-MS analýza produktů síťovací reakce .....	45
5.4	Vyhodnocení LC-MS dat .....	46
6.	Výsledky .....	47
6.1	MS charakterizace proteinu WrbA.....	47
6.2	Vodík-deuteriová výměna .....	48
6.2.1	Optimalizace digesce proteinu WrbA.....	48
6.2.2	Interpretace LC-MS dat vodík-deuteriové výměny .....	49
6.2.2.1	Celková charakterizace.....	49
6.2.2.2	Vliv kofaktoru FMN.....	50
6.2.2.3	Určení multimerizačních rozhraní .....	53
6.3	Chemické síťování .....	55
6.3.1	Elektroforetická separace produktů síťovací reakce.....	55
6.3.2	Produkty síťovací reakce identifikované programem Links.....	56
7.	Diskuze.....	58
8.	Závěr.....	63
9.	Reference.....	64

# 1. Seznam zkratek

ACN	Acetonitril
BCA	Bicinchoninová kyselina
CD	Cirkulární dichroismus
CID	Kolizí indukovaná disociace
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTMM	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chlorid
DSGd0	Disukcinimidyl glutarát
DSGd4	Disukcinimidyl glutarát, 4x deuterovaný
DSSd0	Disukcinimidyl suberát
DSSd4	Disukcinimidyl suberát, 4x deuterovaný
DTT	1,4-dithiothreitol
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
ESI	Ionizace elektrospřejem (electrospray ionization)
FAB	Ionizace kolizí s urychlenými atomy (fast atom bombardment)
FT-ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
H-D	Vodík–deuteriová výměna
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
LC-MS	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem (liquid chromatography-mass spectrometry)
LDS	Dodecylsulfát lithný
MALDI	Ionizace laserem v přítomnosti matrice (matrix assisted laser desorption/ionization)
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
Met10	Methionin v pozici 10
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NHS	N-hydroxysukcinimid
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PDB ID	Identifikační kód struktury v Protein Data Bank <sup>1</sup>
ORF	Otevřený čtecí rámec (open reading frame)
rpm	Počet otáček za 1 minutu
SDS	Dodecylsulfát sodný
TrpR	Tryptofanový represor
WrbA	Protein vázající tryptofanový represor (Tryptophan represor binding protein A)



## 2. Teoretický úvod

### 2.1 Protein

Protein vázající tryptofanový represor (angl. Tryptophan repressor binding protein A) je historický název pro 21 kDa velký, ve vodě rozpustný protein z *Escherichie coli*. Protein je taktéž označován zkratkou WrbA, odvozenou z anglického názvu. Protein byl poprvé charakterizován v roce 1993 Yangem a Somerville<sup>2</sup>, kterým se podařilo izolovat a osekvenovat gen, z něhož byla odvozena 198 aminokyselin dlouhá sekvence. Protein WrbA byl popsán jako protein produkovaný během stacionární fáze buněčného cyklu bakteriální buňky, kopurifikovaný a koprecipitovaný společně s tryptofanovým represorem<sup>2</sup>. Z experimentů, ve kterých byla porovnávána změna mobility tryptofanového represoru (TrpR) v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti a nepřítomnosti proteinu WrbA a z následného porovnání míry protekce DNA před činností endonukleasy, bylo usouzeno, že proteiny WrbA s TrpR spolu nejen interagují, ale navíc tato interakce zvyšuje afinitu TrpR k DNA<sup>2</sup>.

Výsledky těchto experimentů daly vzniknout dodnes používanému názvu tohoto proteinu. Přestože bylo pozdějšími experimenty prokázáno, že interakce proteinu WrbA s tryptofanovým represorem je zcela nespecifická a afinitu TrpR k DNA nikterak neovlivňuje<sup>3</sup>, je původně zvolený název stále používáný.

#### 2.1.1 Sekvenční porovnání

V první polovině devadesátých let minulého století došlo k rozvoji informačních technologií, využitelných pro studium biomolekul. V současnosti běžně využívané webové služby, jako například algoritmus BLAST nebo sekvenční porovnávání proteinů, se v té době teprve rozvíjely. Ve snaze objasnit funkci a získat o proteinu dosud neznámé strukturní informace, byly možnosti výpočetních algoritmů využity i v případě proteinu WrbA. Aminokyselinová sekvence proteinu WrbA byla porovnána výpočetním algoritmem FASTA se sekvencemi všech proteinů zaznamenaných v té době v databázi SwissProt.<sup>4</sup> Nejvyšší shodu s proteinem WrbA vykazoval teoretický protein Ycp4, který může vzniknout posunem čtecího rámce (ORF) chromozomu III kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Jak protein WrbA, tak Ycp4 obsahují na C-konci řetězce sekvenční motivy, které mohou tvořit supersekundární strukturu helix-smyčka-helix. Tento strukturní motiv je zastoupen v široké škále proteinů a jednou z funkčních vlastností těchto proteinů je

i vazba DNA (např. transkripční faktory). Vznikla tak domněnka, že proteiny WrbA a Ycp4 mohou být součástí helix-smyčka-helix DNA vazebné rodiny proteinů<sup>4</sup>.

Na tuto úvahu reagovali Koonin a Bork sdělením<sup>5</sup>, ve kterém odkazovali na svoji dřívější genetickou studii kvasinkového chromozomu III s využitím různých čtecích rámců. Porovnáním teoretického proteinu Ycp4 (ORF systematické názvosloví gen YCR004C) s reálnými proteiny došli ke zjištění, že nejen teoretický Ycp4, ale i protein WrbA obsahují části sekvence téměř totožné s vaznými místy kofaktoru flavin mononukleotidu (FMN) v několika známých flavodoxinech<sup>6</sup> (Obr. 1).

		FMN binding							
		bbbbbbb	hhhhhhhhhhhhhh	bbbbhhh	bbbbbbb		bbb		
sec. struct		..UU..S..G...&A..U...&...G..V...&.....	.....	.....	...U.UFG...@G.		Ga...&....		
consensus		..UU..S..G...&A..U...&...G..V...&.....	.....	.....	...U.UFG...@G.		Ga...&....		
Ycr4c	Sc	3	IAIITYSTYGHIDVLAQAVKKGVEAAGGKADIYR-VEETLPDE	23	EYDAFLFGVPTRFGN	79	PWGAGTLAGP	75	P25349sp
p25	Sp	6	VAVIYIYSTYGHVVKLAEEAKAGIEKAGGKAVIYQ-FPETLSPE	22	QYDAFLFGYPTRYGT	79	SWGAGSYAGA	28	P30821sp
WrbA	Ec	3	VLVLYYSMYGHIEIEMARAFAEGASKVDGAEVVVKRVPETMPPQ	21	DYDAIIFGTPTRFGN	76	PYGATTIAGG	30	M99166sp
EST	rice	?	IYIVVYSMYGHVAKLAEIEKGAASSVEGVEVKLWQVPETLSDD		-----		-----		D28297gb
Flav	Me	1	VEIVYWSGTGNTTEAMANEIEAAVKAA-GADVESVRFEDTNVDD	36	GKKVGLFGSYG-WGS	12	DTGATVIGTA	22	P00321sp
Flav	Cm	0	MKIVYWSGTGNTKMAELIAKGIIES-GKDVTINVSVDVNIDE	36	GKKVALFGSYG-WGD	12	GYGCVVETP	23	P00322sp
Flav	Ds	3	SLIVYGSSTGNTETAAEYVAEAFENK-EIDVELKNVTDVSVAD	3	GYDIVLFGCST-WGE	51	KMGAVVIGDS	25	P18086sp
Flav	Dd	3	VLIVFGSSTGNTESIAQKLEELIAAG-GHEVTLNNAADASAEN	3	GYDAVLFGCSA-WGM	51	ELGATTIAEG	23	P26492sp
MioC	Ec		ITLISGSTLGGAEYVAEHLAEKLEEAG	P03817sp					
P450red	hum		AAVFFGSQTGTAEDFAIRPSTEAKANF	S29123PIR					
NOS	hum		ATILYGETGRAQSYAQQGLRGLPRKAF	P29474sp					
CysJ	Ec		VTLISASQTGNARRVAEALRDDLAAAN	P14782sp					
YihB	Ec		TLILFSTRDGGQTRIEIASYLAASELKELG	P27863sp					

**Obr. 1 – Sekvenční porovnání proteinu WrbA se známými flavodoxiny**

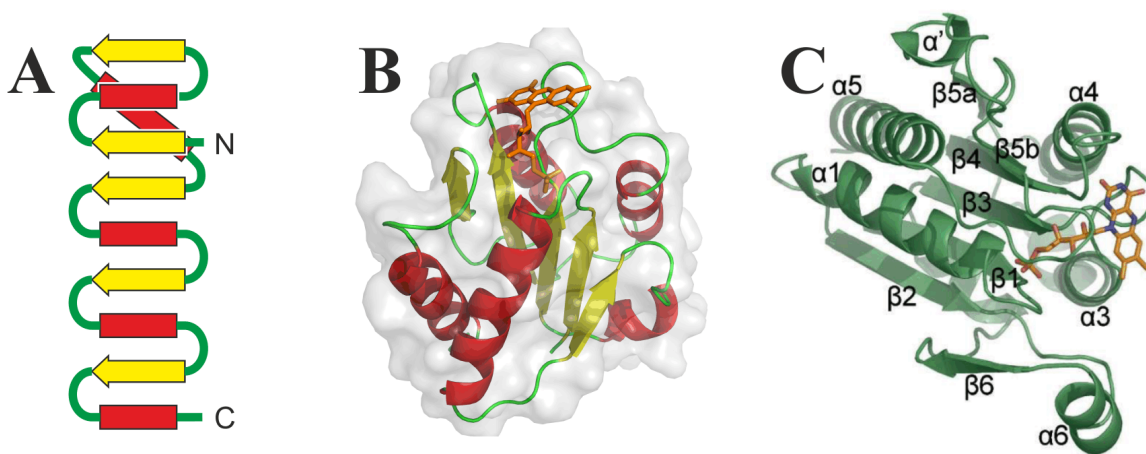
převzato z reference<sup>5</sup>

Na sdělení o teoretickém vazném místě pro FMN v sekvenci proteinu WrbA<sup>5</sup> zareagovali autoři novým sekvenčním porovnáním proteinu WrbA s již strukturně i biochemicky popsanými flavodoxiny (PDB ID: 1FLV, 1OFV, 2FCR, 1FX1, 4FXN)<sup>7</sup>. Tato *in silico* analýza prokázala, že sekvence všech proteinových řetězců si jsou podobné a hojně obsahují i identické úseky. Predikce sekundární struktury aminokyselinové sekvence proteinu WrbA ukázala velmi významnou shodu s již vyřešenými strukturami flavodoxinů.

### 2.1.2 Flavodoxin WrbA

Flavodoxiny jsou bakteriální proteinové elektronové přenašeče využívající FMN jako kofaktor. Strukturální uspořádání flavodoxinů je klasifikováno jako tzv. „ $\alpha/\beta$  twisted open sheet“ supersekundární struktura, kdy hydrofobní jádro proteinu tvoří pět vůči sobě stáječících se paralelních  $\beta$ -listů. Každý  $\beta$ -list je zpravidla zakončen smyčkou následovanou helikální strukturou (Obr. 2 A). Vazné místo kofaktoru v proteinech, složených do takovýchto trojrozměrných útvarů, bývá nejčastěji lokalizováno na C-koncích  $\beta$  listů, kde se na interakci s kofaktorem podílejí smyčky, spojující  $\beta$  struktury s  $\alpha$  helixy<sup>8</sup>. Nejinak je tomu tak i v případě flavodoxinu z *Clostridium beijerinckii*, jehož krystalová struktura je na Obr. 2 B<sup>9</sup>.

Protein WrbA se od flavodoxinů liší aminokyselinovou sekvencí v oblasti helixu  $\alpha 4$  a především pak vloženými sekvencemi helixů  $\alpha'$  a  $\alpha 6$  a jejich okolí<sup>10-11</sup>, atypickými pro známé flavodoxiny (Obr. 2 B a C). V souvislosti s tímto faktem bylo zavedeno označení pro rodinu proteinů podobných flavodoxinům (flavodoxin-like), jejíž je protein WrbA hlavním představitelem. Proto je tato skupina proteinů rovněž označována jako rodina proteinu WrbA (WrbA family)<sup>4</sup>.



**Obr. 2 – Sekundární a terciární struktura flavodoxinů a ustálené značení segmentů sekundární struktury proteinu WrbA**

**A** – schéma segmentů sekundární struktury flavodoxinů, převzato z reference<sup>8</sup>;  
**B** – krystalová struktura flavodoxinu z *Clostridium beijerinckii* (PDB ID: 2FOX);  
**C** – konvenční značení a číslování úseků sekundární struktury proteinu WrbA, převzato z reference<sup>19</sup>

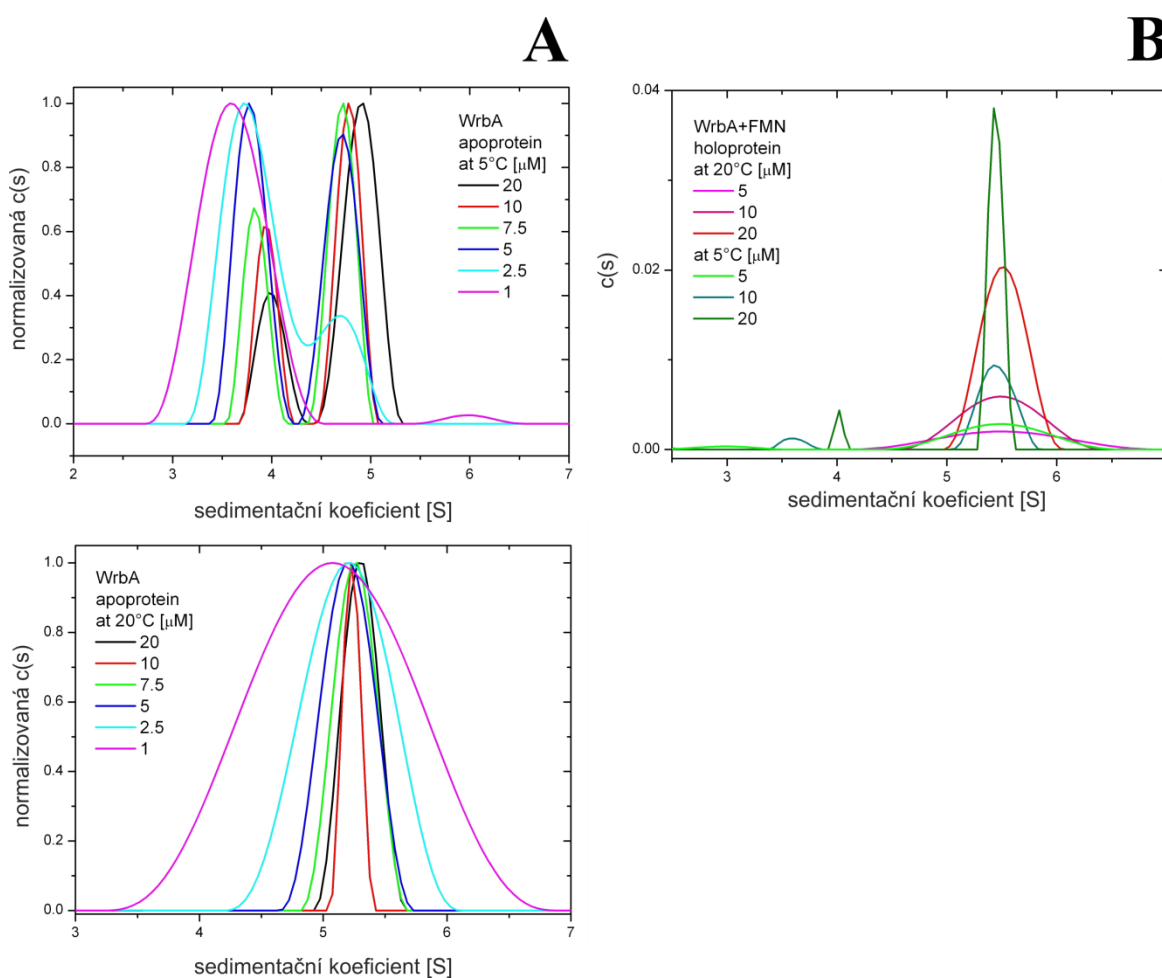
### 2.1.3 Experimentální studie proteinu WrbA

Po několika teoretických analýzách se stal protein WrbA objektem zájmu také prací experimentálních. Práce Grandori a kolektivu v roce 1998<sup>3</sup> experimentálně dokázala roli FMN jako fyziologického kofaktoru proteinu WrbA. Touto publikací byly rovněž vyvráceny závěry o specifické interakci WrbA s TrpR<sup>2</sup>. Mezi proteiny WrbA a TrpR k interakci sice dochází, ovšem stejný efekt byl pozorován i pro směs proteinů BSA a TrpR. Interakce TrpR s WrbA není specifická, ale vysvětluje se tzv. mechanismem snižování povrchu polymerů v roztoku (angl. volume excluded mechanism)<sup>12</sup>. Zvýšení vazného efektu TrpR v interakci s WrbA k DNA, jaké popisovali dříve Somerville a Yang<sup>2</sup> však již pozorováno nebylo<sup>3</sup>. Tato rozsáhlá studie přinesla další výsledky, a to zejména pozorování multimerizace proteinu WrbA v roztoku, kterou umocňuje přítomnost FMN. Kombinací dat získaných analytickou centrifugací, gelovou filtrací a naměřením CD spekter proteinu WrbA došli autoři k závěru, že v roztocích protein WrbA rychle přechází mezi svou dimerní a tetramerní formou, v závislosti na koncentraci proteinu a vlastnostech prostředí.<sup>3</sup> Protože typické flavodoxiny multimerní stavy netvoří, autoři v souladu s předchozí teoretickou prací<sup>7</sup> předpokládali, že za multimerizaci je odpovědná právě část sekvence označovaná jako helix  $\alpha 4$ , která se od typických flavodoxinů sekvenčně liší<sup>3</sup>.

V roce 2004 byla sledována genová exprese v *E. coli* závislá na činnosti  $\sigma^S$  podjednotky RNA polymerasy. RNA polymerasová  $\sigma^S$  podjednotka kontroluje expresi určitých genů v reakci na nutriční, či jiný vnější stres. Mezi geny kontrolované tímto mechanismem patří i gen pro protein WrbA. Z toho je zřejmé, že WrbA není protein produkovaný pouze ve stacionární fázi buněčného cyklu bakterie, ale k jeho expresi dochází i v podmínkách, kdy je organismus vystaven vnějšímu stresu<sup>13</sup>.

### 2.1.3.1 Analytická ultracentrifugace proteinu WrbA

Vliv koncentrace a teploty na multimerizaci proteinu WrbA byl v nedávné době sledován pomocí analytické ultracentrifugace. Měření byla provedena RNDr. Ondřejem Vaňkem, Ph.D. působícím na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (dosud nepublikováno). Z výsledků analýzy vyplývá, že při teplotě 5 °C (Obr. 3 str A nahoře) se protein v roztoku nachází ve dvou multimerních stavech – dimerním i tetramerním. Se snižující se počáteční koncentrací se podíl dimeru zvyšuje. Stav, kdy je poměr koncentrací dimeru a tetrameru v roztoku roven jedné ( $K_D$ ), protein dosahuje při koncentraci, odpovídající přibližně 5  $\mu\text{M}$  monomeru. Při koncentraci proteinu odpovídající 1  $\mu\text{M}$  monomeru se protein v roztoku nachází pouze ve formě dimeru. Naopak při teplotě 20 °C (Obr. 3 A dole) se protein vyskytuje výhradně ve formě tetrameru při všech sledovaných koncentracích. Holoprotein WrbA (vázané FMN) se vyskytuje rovněž ve formě tetrameru, a to při obou teplotách a všech sledovaných koncentracích. (Obr. 3 B). Na základě ultracentrifugačních analýz byly stanoveny výchozí experimentální podmínky pro tuto diplomovou práci.



**Obr. 3 – Experimenty analytické ultracentrifugace**

#### 2.1.4 Enzymová aktivita WrbA

Výše zmíněná práce, sledující produkci proteinu WrbA při stresových podmínkách se stala vodítkem k popsání oxidoreduktasové aktivity<sup>14</sup>. Zároveň byla pro protein WrbA provedena nová *in silico* sekvenční analýza. Po několikastupňovém kriteriálním třídění byl z 30 vybraných sekvencí WrbA podobných proteinů sestaven první fylogenetický strom rodiny WrbA, která v té době čítala přes 200 zástupců napříč různými druhy organismů. Mezi nimi bylo nalezeno i osm NAD(P)H:chinon oxidoreduktas z organismů spadajících do tříd hub a zelených rostlin. To bylo impulsem pro první enzymovou charakterizaci proteinů WrbA. Účinnost přenosu elektronů proteiny WrbA na různé akceptory byla měřena spektrofotometricky při 340 nm. Jako donor elektronů byl použit NADH. Naměřené hodnoty specifické aktivity proteinu v závislosti na elektronovém akceptoru popisuje Tab. 1. Schopnost redukovat oxidované formy chinoidních látek podporuje teorii o roli proteinů WrbA v obraně před oxidativním stresem<sup>13,15</sup>. Enzymová aktivita WrbA proteinů je v rozsahu 2-3 jednotek pH konstantní, avšak protein je aktivní pouze v přítomnosti FMN, jehož vazba je na pH závislá<sup>14</sup>.

**Tab. 1 - Specifické aktivity proteinů WrbA z *E. coli* a *A. fulgidus***

Electron acceptor	Avg sp act (U <sup>a</sup> mg <sup>-1</sup> ) ± SD	
	WrbA <sub><i>E. coli</i></sub>	WrbA <sub><i>A. fulgidus</i></sub>
1,4-Benzoquinone	990 ± 30	25,000 ± 850
1,4-Naphthoquinone	560 ± 30	8,900 ± 260
Menadione	430 ± 10	1,300 ± 10
2,3-Dihydroxy-5-methyl-1,4-benzoquinone	930 ± 60	6,700 ± 140
Potassium ferricyanide	50 ± 1.6	1,400 ± 80
Dichloroindolphenol	160 ± 3.0	1,400 ± 70

<sup>a</sup> Micromoles of NADH oxidized per minute.

Pozn.: Aktivitní experimenty byly vzhledem k rozdílným životním teplotním optimům obou organismů prováděny při různých teplotách. *Archaeoglobus fulgidus* je hypertermofilní sulfát redukující bakterie spadající do taxonomické domény Archea. Převzato z reference<sup>14</sup>.

Skutečnost, že protein WrbA disponuje oxidoredukční aktivitou, využili Noll a kolektiv ve své studii elektrochemických vlastností proteinu, kdy přenos elektronů na protein byl zajištěn flavinem modifikovanou zlatou elektrodou. Autoři v této práci popisují mechanismus výměny elektronů jako dvoukrokový, kdy rychlost přenosu prvního elektronu je krokem určujícím rychlost reakce. U proteinu WrbA však dochází k jevu, který je v kontrastu s chováním obdobných flavodoxinů. U bakteriálních flavodoxinů je akceptor stabilní v takovém stavu, kdy je redukována pouze jedna funkční skupina (semichinon). Naproti tomu v případě proteinu WrbA je stabilní až plně redukována forma

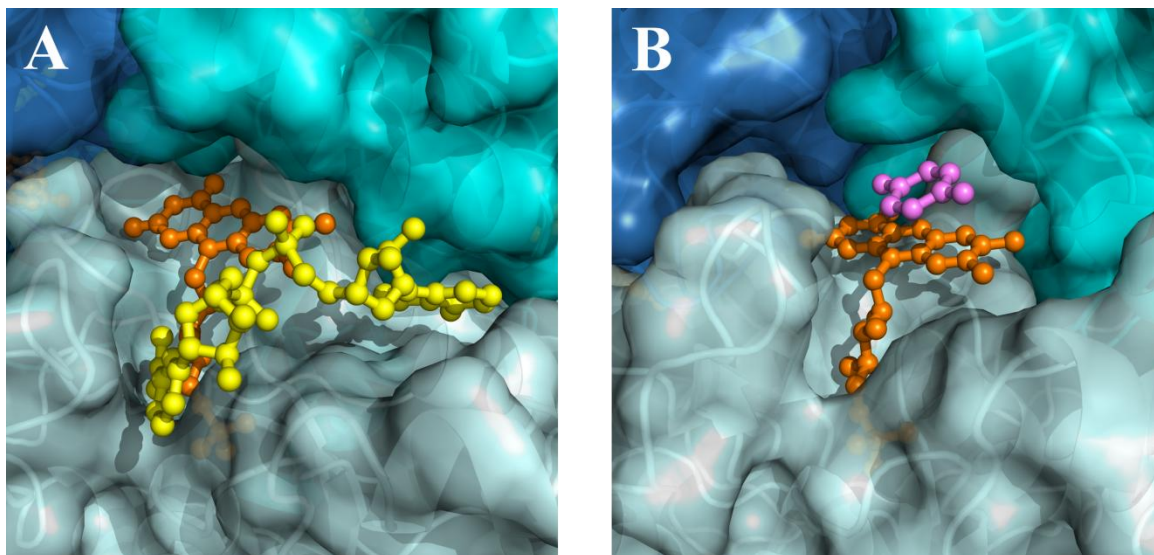
akceptoru. Tímto chováním protein WrbA připomíná spíše FAD dependentní eukaryotické oxidoreduktasy, jakou je například savčí NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa Nqo1, známá též jako DT-diaforasa<sup>16</sup>.

### 2.1.5 Krystalové struktury proteinů WrbA rodiny

Funkce všech proteinů souvisí s jejich trojrozměrnou strukturou, díky které aminokyseliny získávají prostorovou konfiguraci, nezbytnou pro jejich činnost. Strukturální informace o zástupcích rodiny WrbA byly dlouhou dobu odvozeny pouze z aminokyselinové sekvenční podobnosti proteinů rodiny WrbA s flavodoxiny a vykazovaly pouze teoretický charakter.

První krystalová struktura zástupce výše zmíněné rodiny proteinů byla objasněna v roce 2005<sup>10</sup>. Cílovými molekulami této strukturální analýzy byly proteiny WrbA z organismů *Deinococcus radiodurans* a *Pseudomonas aeruginosa*. S proteinem WrbA z *E.coli* mají proteiny z obou zmíněných organismů sekvenční identitu necelých 40 %, zatímco mezi sebou jsou identické pouze z 29 %. Oba proteiny byly krystalovány jak v apo- (bez FMN) tak v holoformě (s FMN). Rozřešení krystalových struktur potvrdilo předpokládanou supersekundární strukturu monomeru podobnou flavodoxinům, tzv. „ $\alpha/\beta$  twisted open sheet“. Jak apo- tak holoforma krystalovaly jako homotetramery, které vznikly nejspíše jako dimer dimerů, kdy jednotlivé homodimery vznikají interakcemi helixu  $\alpha 4$ . Tato skutečnost nebyla do té doby u flavodoxinů popsána. FMN byl vázán k monomeru proteinu v poměru 1:1 v místech, která byla dříve predikována<sup>5</sup>. Krystalové struktury dále odhalily vazná místa kofaktoru, která se nachází na povrchu molekuly v blízkosti dimerizačního rozhraní. Rozdíly apo- a holoproteinu v terciární a kvartérní struktuře jsou ovšem zanedbatelné. Závěrem autoři definitivně vyvrátili teorii<sup>2</sup>, podle které protein WrbA interaguje s tryptofanovým represorem.

První krystalografická strukturální studie proteinu WrbA z *E.coli* byla provedena v roce 2007<sup>11</sup>. Protein byl krystalován pouze ve formě s navázaným FMN, avšak v reakci na publikaci Patridge a Ferryho<sup>14</sup>, popisující protein WrbA jako NAD(P)H:chinon oxidoreduktasu, byl protein krystalován i v přítomnosti elektronového donoru NADH a akceptoru v podobě 1,4-benzochinonu. Lokalizaci FMN vázaného v aktivním místě společně s elektronovým donorem, respektive akceptorem znázorňuje Obr. 4 str. 16.

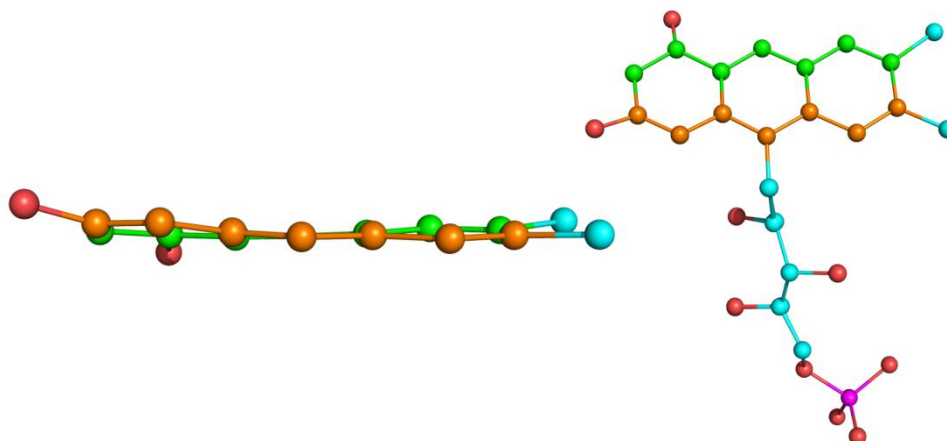


**Obr. 4 – Vazné místo FMN proteinu WrbA**

**A** – pozice FMN (oranžově) a donoru elektronu NADH (žlutě); **B** – akceptor elektronu 1,4-benzochinon (fialově); odstíny modré – různé podjednotky proteinu WrbA, PDB ID: 3B6J (A) a 3B6K (B)

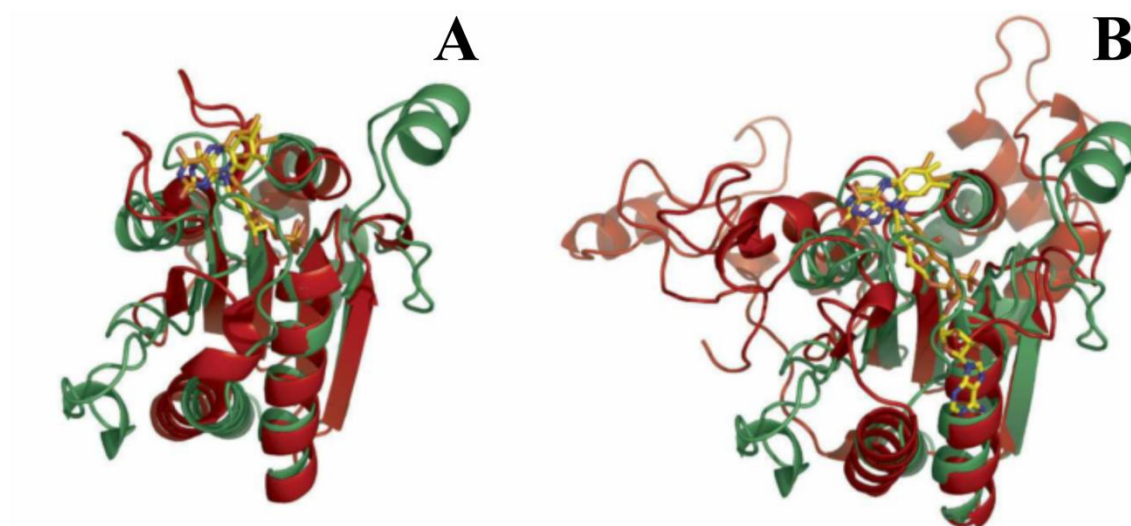
Prozatím poslední publikovaná krystalová struktura, vyznačující se téměř atomickým rozlišením 1.2 Å, byla vyřešena v roce 2013<sup>17</sup>. Krystal, difraktující s takto vysokým rozlišením, se autorům podařilo připravit díky záměně flavin adenindinukleotidu (FAD) místo FMN jako kofaktoru. Mapa elektronové hustoty ve vazném místě a jeho těsném okolí byla relevantní pouze pro isoaloxazinovou část kofaktoru. Proto je ve výsledné struktuře jako kofaktor vyobrazen pouze FMN, ačkoli byl při krystalizaci použit FAD. Vysoké rozlišení umožnilo poprvé v historii pozorovat dříve predikovanou konformaci isoaloxazinového kruhu zvanou propeler twist, kdy jeho atomy neleží v jedné rovině (Obr. 5, str. 17). Poprvé byla díky vysokému rozlišení popsána oxidace methioninu v pozici 10 (Met10). Oxidace Met10 je vázána pouze na přítomnost kofaktoru ve vazebném místě, což bylo potvrzeno tandemovou hmotnostně spektrometrickou analýzou<sup>17</sup>. Během purifikačních procesů protein WrbA ztrácí svůj fyziologicky navázaný kofaktor a výsledný přečištěný produkt se vyskytuje pouze ve formě apoproteinu. V takto připraveném proteinu není oxidace Met10 přítomna, a to dokonce po dobu několika měsíců, přestože purifikace a manipulace s proteinem probíhaly za přístupu vzdušného kyslíku. Po přidání flavinového kofaktoru k apoproteinu lze pozorovat plně oxidovaný Met10 již po pětihodinové inkubaci<sup>18</sup>.





**Obr. 5 – Konformace FMN označovaná jako propeler twist**

Jak již bylo popsáno v kapitole 2.1.4 str. 14, protein WrbA se zdá být funkčním mezistupněm v evoluci oxidoreduktas, spojujícím bakteriální FMN dependentní jednoelektronové flavodoxiny a dvouelektronové FAD dependentní NAD(P)H:chinon oxidoreduktasy z vyšších organismů. Pozičním porovnáním trojrozměrných krystalových struktur bylo zjištěno, že podobnost proteinu WrbA s krátkými bakteriálními flavodoxiny a sekvenčně delšími eukaryotickými oxidoreduktasami není pouze funkční, ale i strukturální<sup>19</sup> (Obr. 6).



**Obr. 6 – Prostorové strukturální porovnání proteinu WrbA**

**A** – porovnání proteinu WrbA (zeleně) s flavodoxinem (červeně) z *Desulfovibrio vulgaris*  
**B** – protein WrbA (zeleně) se savčí NAD(P)H:chinon reduktasou (červeně); PDB ID:1J8Q a 1QRD, převzato z reference<sup>19</sup>

Role proteinu WrbA v organismech je stále předmětem výzkumu. Částečně by na otázku fyziologické funkce tohoto proteinu mohla odpovědět studie chování proteinu v roztoku, především dynamiky vzniku a udržení dimer-tetramerní rovnováhy nebo dílčí konformační změny struktury v závislosti na sledovaných podmínkách. Přestože krystalové struktury detailně mapují celou strukturní hierarchii konfigurace proteinového řetězce, informace o dynamice proteinu tyto struktury neobsahují. Ideální metodou s vysokým prostorovým rozlišením, která umožňuje sledovat dynamiku proteinu v roztoku, je nukleární magnetická rezonance (NMR.) Kvůli velikosti tetrameru přes 80 kDa je však takovéto měření běžnými metodami NMR takřka neproveditelné. K získání informací o konformačních změnách, přístupnosti solventu či celkové dynamice proteinu lze využít alternativní metody studia velikosti, tvaru a struktury molekul, jakými jsou například analytická ultracentrifugace<sup>20</sup> nebo metody využívající hmotnostní spektrometrii, jako iontová mobilita<sup>21</sup>, vodík-deuteriová výměna<sup>22</sup>, či chemické síťování<sup>23</sup>.

## 2.2 Metody využívající hmotnostní spektrometrii ke studiu struktury biomolekul

Studium proteinových struktur tradičními metodami rentgenostrukturní analýzy a NMR s sebou nese jistá omezení. Rentgenostrukturní analýza je limitována nutností připravit krystaly daného proteinu v pokud možno nejvyšší čistotě, což vede k vysoké spotřebě biologického materiálu. Další nevýhoda tkví v tom, že proteiny mohou v krystalové mřížce vlivem krystalografických kontaktů s ostatními molekulami zaujímat jiné, než fyziologické konformace<sup>23</sup>. Nutno podotknout, že biomolekuly v krystalu nejsou zcela rigidní, protože se v jejich těsné blízkosti nachází nezanedbatelné množství vody, která umožňuje biomolekule v krystalu určitou flexibilitu. Z části je tato flexibilita zahrnuta ve veličině zvané teplotní B-faktor.

Analýza pomocí NMR je sice prováděna v roztoku, avšak i zde je nutné připravit velké množství čisté, izotopově značené formy proteinu, která bude obsahovat jádra atomů s nenulovým jaderným spinem. Problémem při měření NMR spekter bývá obvykle časová, či teplotní nestabilita měření molekuly, neboť získání kompletního objemu dat trvá často i týdny. V poslední době se proto stále častěji využívají alternativní přístupy k řešení proteinové struktury, jako například malouhlový rozptyl rentgenových paprsků, kryoelektronová mikroskopie nebo Ramanova spektroskopie. Další alternativou ke studiu struktury biologických makromolekul je využití hmotnostní spektrometrie.

Ačkoli je hmotnostní spektrometrie jako analytická metoda známá více než 100 let, robustní a vysokoenergetické iontové zdroje neumožňovaly dlouhou dobu využít tuto metodu ke studiu biologicky významných makromolekul. Tradiční ionizační techniku, jakou je ionizace proudem elektronů (angl. electron impact), bohužel nelze smysluplně využít ke studiu biomolekul.

Zavedení nedestruktivních ionizačních technik koncem 80. let 20. století umožnilo bez nežádoucí fragmentace ionizovat a následně analyzovat i biologické makromolekuly. Nejvyžívanějšími takzvanými měkkými ionizačními technikami jsou ionizace laserem v přítomnosti matrice (tzv. MALDI z angl. matrix assisted laser desorption/ionization)<sup>24-25</sup> a zejména pak ionizace elektrosprejem (ESI)<sup>26</sup>. Kombinací měkkých ionizačních technik s metodami chemického síťování proteinů nebo vodík-deuteriové výměny, do té doby využívané převážně v NMR, lze pomocí hmotnostní spektrometrie kromě primární struktury proteinů (sekvence) popisovat i strukturu trojrozměrnou. Těmito metodami lze

získat informace o přístupnosti rozpouštědla, dynamice molekul v roztoku, tvorbě nadmolekulárních komplexů či interakce receptorů s ligandy.

Nespornou výhodou metod studia biomolekul pomocí hmotnostní spektrometrie je možnost analyzovat vzorek za fyziologických podmínek. Tyto metody především umožňují sledovat biomolekuly v roztocích o velmi nízkých koncentracích analytu (řádově mikromolárních). Oproti tomu proces krystalizace a NMR experimenty vyžadují množství i koncentraci proteinu o několik řádů vyšší. Takto vysoké koncentrace mohou ovlivnit rovnovážný stav molekuly v roztoku, zejména u proteinu WrbA, jehož multimerizace je závislá na koncentraci<sup>3</sup>. Dalšími výhodami hmotnostní spektrometrie jsou rychlost akvizice a interpretace naměřených dat. Strukturní data získaná pomocí hmotnostně spektrometrických technik nesou nezastupitelné informace, přestože zdaleka nedosahují prostorového rozlišení rentgenové krystalografie ani NMR.

### 2.2.1 Vodík-deuteriová výměna

Princip vodík-deuteriové výměny využívá jevu, kdy kovalentně vázané vodíky v molekule proteinu, podléhají ve vodném prostředí kontinuální výměně za vodíky z roztoku. Toho lze využít při použití deuterium oxidu v nejvyšší možné koncentraci jako rozpouštědla. Vodíky jsou v závislosti na přístupnosti rozpouštědla v různé míře vyměňovány za deuterium a ve spojení s hmotnostním spektrometrem lze se zvyšující se deuterací sledovat hmotnostní posun proteinu nebo jednotlivých peptidů. Ve spojení s hmotnostním spektrometrem se ve vysoké míře využívá až od 90. let 20. století, přestože počátky této metody sahají již do poloviny minulého století.

V návaznosti na Pauligovu a Coreyho predikci vodíkové vazby, jako hlavní interakce umožňující tvorbu  $\alpha$ -helixu a  $\beta$ -listu<sup>27</sup>, vypracovali Lindestrøm-Lang a Hvidt metodu, která přítomnost vodíkových vazeb v proteinech potvrdila. Metoda byla založena na výměně vodíků insulinu s 99,6% deuterium oxidem, ve kterém byl protein rozpuštěn. V určitých časových intervalech byly zamraženy jednotlivé frakce, které byly následně lyofilizovány za sníženého tlaku v přítomnosti  $P_2O_5$ . Vysušené vzorky byly následně rozpuštěny v čisté vodě. Množství vyměněného deuteria bylo vypočítáno z rozdílu hustot vody čisté a vody s obsahem deuteria, vzniklé opětovným rozpuštěním deuterovaného proteinu<sup>28</sup>.

Dále byl popsán jev, kdy dochází v přítomnosti vzdušné vlhkosti k takzvané zpětné výměně (z angl. backexchange) deuteria za vodík a také změnu míry deuterace v závislosti na experimentální teplotě, kdy výměna probíhala při různých teplotách s různou kinetikou<sup>29</sup>.

### 2.2.2 Kinetika výměnné reakce

Vodíky biologické makromolekuly mohou být vyměněny za vodíky rozpouštědla třemi typy reakcí podle způsobu katalýzy. Jedná-li se o reakci katalyzovanou protonem, takzvanou kyselou katalýzu, rychlost je určena konstantou druhého řádu  $k_{\text{H}^+}$ . Analogicky může být reakce katalyzována hydroxidovým aniontem s bazickou rychlostní konstantou  $k_{\text{OH}^-}$  nebo pouze molekulami vody ( $k_{\text{H}_2\text{O}}$ ). Celková kinetika  $k_{\text{r}}$  výměny je součtem příspěvků všech tří typů katalýz, jak popisuje Rovnice (1)<sup>30</sup>.

$$k_{\text{r}} = k_{\text{H}^+} + k_{\text{OH}^-} + k_{\text{H}_2\text{O}} \quad (1)$$

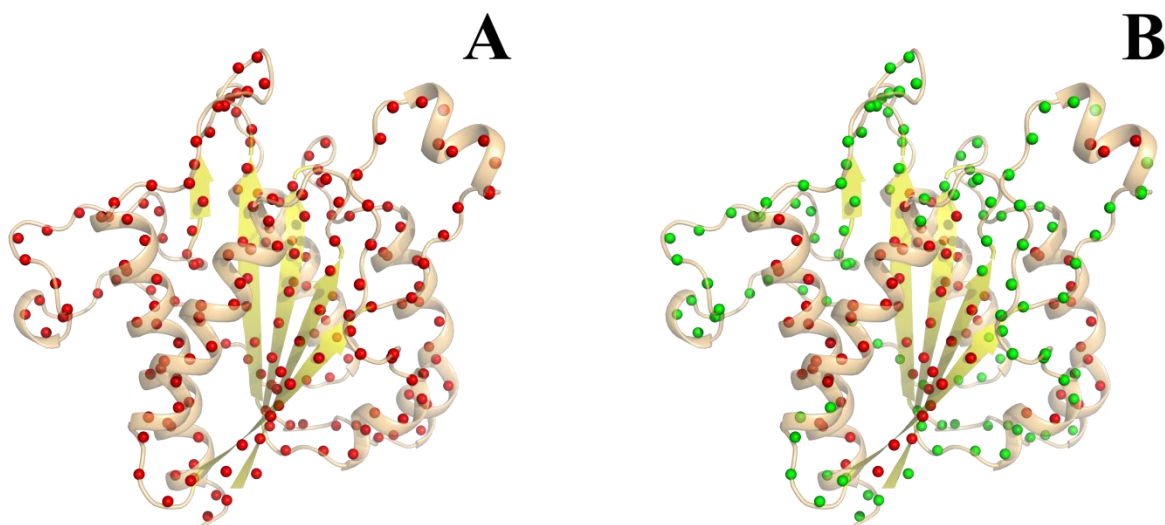
Příspěvek výměny katalyzované vodou je v porovnání s katalýzou protonem a hydroxidovým aniontem mnohem nižší, přestože tato pomalá reakce probíhá neustále při jakýchkoli podmínkách.

### 2.2.3 Faktory ovlivňující kinetiku výměny

Při sledování celkové míry deuterace mohou k výsledné hodnotě teoreticky přispívat tři typy vodíků v závislosti na atomu, se kterým sdílejí vazbu. Vodíky vázané kovalentně na atomy uhlíku podléhají vodík-deuteriové výměně velmi vzácně a lze je tedy s téměř absolutní jistotou vyloučit z možných adeptů na deuteraci. Oproti tomu vodíky, vázané na funkční skupiny postranních řetězců se vyměňují s rozpouštědlem tak rychle, že k deuteraci těchto funkčních skupin dochází téměř okamžitě. Stejnou rychlostí však dochází i ke zpětné výměně deuteria za vodík a proto se na výsledné deuteraci ve většině případů neprojeví. Posledním typem vodíků vyskytujících se v proteinech jsou vodíky amidické, lokalizované na atomu dusíku peptidové vazby. Amidické vodíky se vyskytují u všech aminokyselin s výjimkou prolinu. Z hlediska kinetiky výměny jsou amidické vodíky jediné, pro které lze míru deuterace spolehlivě pozorovat.

Amidické vodíky jsou taktéž velmi důležité z hlediska utváření sekundárních struktur proteinové páteře. Dusíky proteinové páteře jsou totiž donory vodíkových vazeb, které zprostředkovávají amidické vodíky a jejichž akceptory jsou kyslíky karbonylů jiných aminokyselin nebo molekul vody. Tvorba vodíkových vazeb je také jedním z klíčových faktorů, ovlivňujících rychlost výměny. Vodíky, participující na těchto interakcích, podléhají výměně mnohem pomaleji než vodíky v nestructurovaných částech proteinu (Obr. 2).

Rychlost deuterace amidických vodíků je dále ovlivněna přístupností rozpouštědla k danému úseku sekvence proteinu. Aminokyseliny hydrofobního jádra proteinů nebo transmembránové úseky membránových proteinů jsou deuterovány mnohem pomaleji (často dokonce vůbec), než části proteinů přímo interagující s rozpouštědlem.



**Obr. 7 – Výměna amidických vodíků za deuterium**

**A** – stav amidických vodíků na počátku výměny (vodíky barveny červeně)

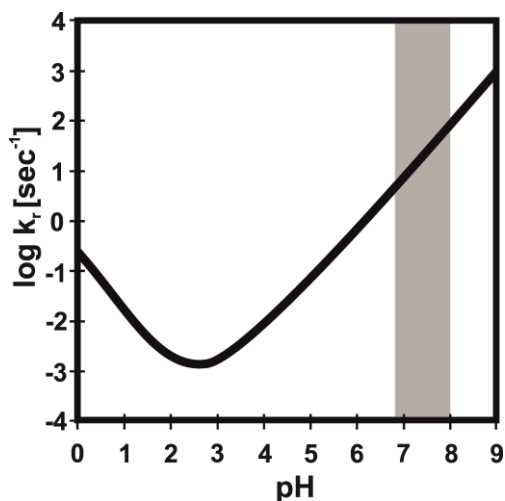
**B** - stav výměny v určitém čase od zahájení výměny (deuterium značeno zeleně), vodíky ve strukturovaných částech nepřístupných rozpouštědлу se vyměňují pomaleji než v částech strukturovaných; ilustrační obrázek

Velmi důležitým faktorem, ovlivňujícím rychlost výměny, je z hlediska možnosti vlastního provedení experimentu hodnota pH. Závislost rychlosti výměny na pH lze vyjádřit Rovnicí (2)<sup>30</sup>

$$k_r = k_{H^+} 10^{-pD} + k_{OH^-} 10^{(pD - pK_D)} + k_{H_2O}, \quad (2)$$

kde  $k_r$  je celková rychlostní konstanta výměny vodíku za deuterium,  $K_D$  je disociační konstanta  $D_2O$ ,  $pD$  je korigovaná hodnota pH pro deuterovaný pufr ( $pD = pH + 0,4$ )<sup>31</sup>.  $k_{H^+}$  a  $k_{OH^-}$  jsou rychlostní konstanty pro katalýzu kyselou a bazickou,  $k_{H_2O}$  je rychlostní konstanta výměny katalyzované vodou. Je-li tato rovnice vynesena do grafu závislosti logaritmu celkové rychlostní konstanty v závislosti na pH (Graf č. 1), lze jednoduše odečíst, že rychlost výměny amidických vodíků proteinové páteře je nejnižší v oblasti pH mezi hodnotami 2-3<sup>30</sup>. Odchýlením od těchto hodnot rychlost výměny prudce narůstá a to

jak směrem k nižšímu, tak i vyššímu pH. Míra nárůstu rychlosti je zhruba 10x na jednu jednotku pH. Proto se v experimentech vodík-deuteriové výměny reakce zháší rychlým okyselením reakční směsi na hodnotu pH 2,5. Šedě zbarvená oblast pH je v H-D experimentech nejčastěji využívána ke značení proteinů a to jak z důvodu velmi vysoké rychlosti výměny, tak převážně kvůli hodnotám pH blízcích se přirozenému prostředí výskytu sledovaných proteinů.



**Graf č. 1 – Závislost rychlosti výměny na pH**

Pozn.: šedě vybarvená oblast odpovídá nejčastějším hodnotám pH, při kterých je značení deuteriem prováděno, výměna probíhá nejnižší rychlostí v oblasti kolem pH 2,5; převzato a upraveno z reference<sup>32</sup>

Posledním a taktéž velmi podstatným faktorem ovlivňujícím rychlost výměny vodíku je teplota, při které reakce probíhá. Tuto skutečnost je známa již z prvních prací Lindestrøma-Langa<sup>29</sup>. Teplotní závislost lze pro modelový polyalaninový peptid při teplotě 20 °C vyjádřit Rovnicí (3)<sup>30</sup>

$$k_r(T) = k_r(293)e^{\frac{-Ea[\frac{1}{T}-\frac{1}{293}]}{R}} \quad (3)$$

kde  $k_r$  je rychlost výměny,  $T$  je teplota reakce,  $Ea$  je aktivační energie reakce a  $R$  je univerzální plynová konstanta. Aktivační energie dosahuje pro různé druhy katalýzy odlišných hodnot. Pro nejčastěji využívanou bazicky katalyzovanou reakci nabývá  $Ea$  hodnoty 17 kcal/mol (71,128 kJ/mol). Z rovnice (3) vyplývá, že snížením teploty o 10 °C se sníží rychlost výměny přibližně 2,8krát. I ovlivnění reakční rychlosti teplotou se

využívá při zhášení výměny. Po prudkém okyselení reakce je roztok navíc rychle ochlazen nebo zamrazen. Tím se velmi razantně potlačí zpětná výměna deuterií za vodíky<sup>30</sup>.

#### 2.2.4 Vývoj metody vodík-deuteriové výměny

Informační hodnota získaná touto metodou byla dlouhou dobu omezena pouze na zjištění poměru vyměněných amidických vodíků a celkového počtu teoreticky vyměnitelných<sup>29</sup>. Poměr byl vypočítáván z rozdílu hustot čistého rozpouštědla a rozpouštědla s obsahem deuteria, vzniklého opětovným rozpuštěním po zastavení výměny lyofilizovaného proteinu. Navíc proces sušení a dlouhodobá manipulace v přítomnosti vzdušné vlhkosti podporovaly nežádoucí zpětnou výměnu deuterií zpět za vodík. Z takto získaných dat nebylo možné lokalizovat pozici vyměněných vodíků.

Počátkem 90. let 20. století přišel s rozšířením měkkých ionizačních technik pro hmotnostní spektrometrii i posun v oblasti H-D výměny. Ionizace proteinu elektrosprejem umožnila pozorovat konformační změnu, indukovanou denaturací proteinu. V souvislosti s rozvolněním prostorové struktury dochází k nárůstu celkové hmoty proteinu vlivem většího počtu vyměněných vodíků za deuterium a současně ke zvyšování ionizovatelnosti molekuly<sup>33</sup>. Analýza produktu výměnné reakce pomocí hmotnostního spektrometru sice přinesla významný posun z hlediska přesnosti a reprodukovatelnosti měření, nicméně v oblasti prostorového rozlišení výměny žádná změna nenastala.

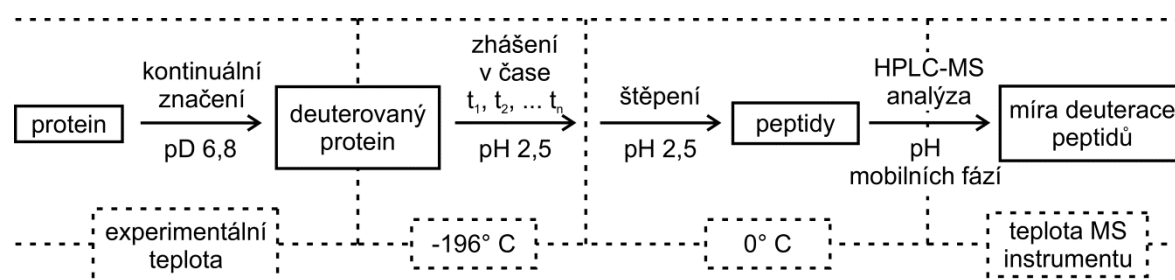
Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru umožnilo využít kyselé aspartátové proteasy, zpočátku zejména pepsin, jako nástroj ke zvýšení prostorového rozlišení vyměněných amidických vodíků<sup>34</sup>. Aspartátové proteasy účinně štěpí v oblasti hodnot pH nižších než 3. Tato vlastnost je velmi důležitá vzhledem ke snaze potlačit zpětnou výměnu během analýzy, neboť rychlost výměny (i zpětné) je v oblasti pH 2,5 nejnižší (viz. 2.2.3, str. 22). Kromě pepsinu se dnes využívají proteasy aspergillopepsin a rhizopuspepsin<sup>35</sup>. Nejnovějšími zástupci aspartátových proteas, využívaných v metodě H-D výměny, jsou pepsin z arktické tresky<sup>36</sup>, plasmepsin II<sup>37</sup> a zejména proteasa nepenthesin I z láčkovky *Nepenthes gracilis*<sup>38</sup>. Využitím různých proteas a jejich možných kombinací lze získat lepší peptidové pokrytí sekvence, což s sebou nese zvýšení prostorového rozlišení H-D výměny. Proteasy jsou často imobilizovány na hydrofobní nosiče, což prodlužuje jejich životnost a výrazně usnadňuje manipulaci s nimi<sup>39</sup>.

Kapalinová chromatografie využívá standardně dvou mobilních fází, fázi polární, kde rozpouštědlem je nejčastěji voda, a nepolární, kde hlavní složku tvoří organické



rozpouštědlo. Z hlediska potlačení zpětné výměny deuteria za vodíky je velmi důležité provádět štěpení proteinu i následnou separaci peptidů při nízké teplotě. Nejnižší možná teplota, při které může být kapalinová chromatografie využívána, je bod tuhnutí polární fáze, tedy hodnota teploty blízká 0 °C.

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem umožnilo díky rychlé analýze produktu zavedení nového přístupu ke značení proteinů deuteriem. Vedle tradičního kontinuálního značení (Obr. 8), které vychází z původního principu Lindeströma-Langa, se začalo používat i značení pulsní<sup>40</sup>. V případě kontinuálního značení je protein vystaven v čase 0 s vysokému nadbytku deuteria. V přesně definovaných časových intervalech jsou z reakční směsi odebírány frakce a rychlým okyselením a zamražením je výměna zastavena. Pulsního značení lze využít například při sledování proteinového skládání (angl. folding). K denaturovanému proteinu se přidá vysoký nadbytek čistého rozpouštědla, čímž je indukováno opětovné sbalení proteinu do nativní konformace (tzv. renaturace metodou rychlého naředění). Z tohoto roztoku se poté v časových intervalech odebírají frakce, které jsou všechny přeneseny do nadbytku deuterovaného pufru na přesně definovanou dobu. Následuje opět zhášení výměny a zamražení<sup>28, 40-41</sup>.



**Obr. 8 - Obecné uspořádání experimentu kontinuální vodík-deuteriové výměny**

Analýzou proteinu pomocí vodík-deuteriové výměny lze ve struktuře velmi dobře lokalizovat místa, kde je protein nebo proteinový komplex přístupný rozpouštědлу během libovolné časové škály. K získání informací o vzájemné pozici a vzdálenosti jednotlivých aminokyselinových zbytků v molekule proteinu s využitím hmotnostní spektrometrie lze využít metodu chemického síťování.

## 2.3 Chemické síťování

Vznik nové kovalentní vazby v proteinu, iniciovaný chemickým činidlem nebo fotochemicky, se nazývá chemické síťování. První experimenty využívající chemického síťování se objevily již v 70. letech 20. století<sup>42-43</sup>, ovšem kvůli absenci výkonných analytických instrumentů neposkytovaly takové experimenty relevantní strukturní data. Až teprve v kombinaci s hmotnostně spektrometrickou analýzou vynikají možnosti této metody. Díky hmotnostním analyzátorům s vysokým rozlišením nebo pomocí fragmentačních metod je možné přesně lokalizovat spojené aminokyseliny. Výsledkem takových analýz je soubor vzdáleností konkrétních funkčních skupin v molekule proteinu. Experimenty jsou prováděny v roztocích, čímž může být simulováno přirozené prostředí výskytu proteinu. Maximální vzdálenost takovýchto funkčních skupin se vypočítává na základě délky raménka použitého síťovacího činidla (Obr. 11, str. 30).

První práce využívající chemické síťování kombinované s hmotnostní analýzou byla publikována v roce 2000 kolektivem autorky Young. K síťování proteinu bylo využito činidlo bis-(sulfosukcinimidyl) glutarát ( $BS^3$ ), které se běžně používá dodnes.<sup>44</sup> Pro snadnější interpretaci hmotnostních spekter byla následně využita i izotopově značená činidla<sup>45-46</sup>. Analytická technika prošla od té doby výraznými technickými změnami, avšak principiálně se dnešní uspořádání metody chemického síťování od této původní výrazně neliší.

### 2.3.1 Základní uspořádání metod chemického síťování

Společným rysem síťovacích reakcí ve spojení s hmotnostní spektrometrií je tvorba nové kovalentní vazby proteinu, která může být iniciována fotochemicky nebo přidavkem modifikačního činidla. Modifikovaný protein je následně analyzován hmotnostním spektrometrem a ze získaných hmotnostních spekter jsou vzniklá zesíťení přesně lokalizována. Výstupem analýzy produktů síťovacích experimentů je soubor vzdálenostních omezení vybraných funkčních skupin v molekule proteinu.

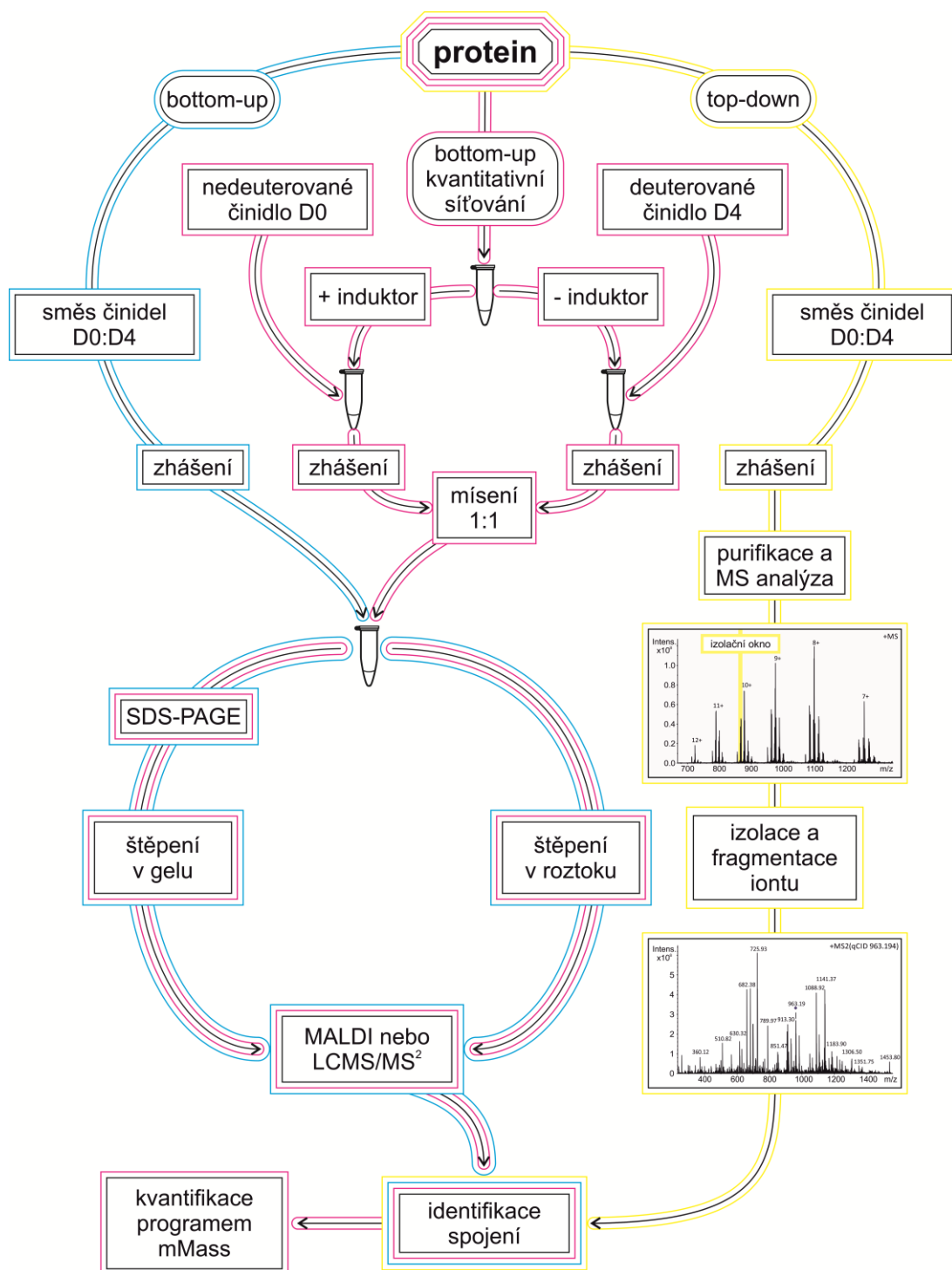
Protein je nutné převést do pufru, který nebude obsahovat žádné složky se stejnými funkčními skupinami, které jsou cílem síťovací reakce. Pokud je síťovací reakcí sledována interakce proteinu s ligandy, kterými mohou být ionty kovů, ribonukleové kyseliny či další proteinová molekula, je nutné před samotnou reakcí vyčkat na ustanovení rovnováhy v reakční směsi. Síťovací činidla jsou do roztoku proteinu přidávána v nízkých objemech

koncentrovaných roztoků. Po určité době je síťovací reakce zastavena přidáním nadbytku látek, obsahující stejné funkční skupiny jako cílová aminokyselina síťovací reakce.

K určení sekvence sledovaného peptidu a s tím spojenou identifikaci zesíťovaných aminokyselin lze využít jeden ze dvou základních přístupů. Častěji využívaný je tradiční, tzv. bottom-up přístup, kdy je analyzovaná molekula nejprve vystavená proteolytickému nebo chemickému štěpení. Nejčastěji jsou využívány specifické proteasy, jako například trypsin. Směs takto získaných peptidů je zpravidla separována na analytických kolonách s obrácenou fází, případně na iontoměničích, a následně přímo analyzována hmotnostním spektrometrem s analyzátozem s vysokým rozlišením, jakým může být iontová cyklotronová rezonance (ICR) nebo orbitrap. Porovnáním naměřených hmot s generovanou knihovnou hmot teoretických spojení, zprostředkovaných použitým činidlem, lze k naměřeným hodnotám přiřadit s určitou statistickou odchylkou sekvenci spojených peptidů. Hmoty s přiřazenou teoretickou sekvencí jsou následně podrobeny fragmentaci. Analýzou fragmentačních spekter je možné přesně identifikovat spojené peptidy i konkrétní aminokyseliny.<sup>47</sup>

Alternativní přístup, analogicky nazývaný top-down,<sup>48</sup> nahrazuje proteolytické nebo chemické štěpení reakční směsi izolací vybraného iontu v plynné fázi přímo v těle hmotnostního spektrometru. Pro kompletní reakční směs, obsahující modifikovaný i nemoifikovaný protein je změřeno hmotnostní spektrum. Na základě znalosti molekulové hmoty proteinu a síťovacího činidla je vybrán z reakční směsi iont, odpovídající hmotou zpravidla jedenkrát modifikovanému proteinu. Vybraný iont je poté izolován a akumulován v ICR cele a následně je fragmentován pomocí některé z fragmentačních technik. Fragmentaci iontu je možné provést v závislosti na povaze analytu disociací elektronovým přenosem<sup>49</sup>, disociací elektronovým záchytem v případě posttranslačně modifikovaného analytu, kolizí indukovanou disociací (CID) nebo infračervenou multifotonovou disociací<sup>50-51</sup>. Přiřazení sekvence fragmentačním iontům se provádí buď ručně, nebo s využitím bioinformatiky na základě znalosti sekvence analyzovaného proteinu. Porovnání obou přístupů k hmotnostně spektrometrické analýze proteinů je znázorněno na Obr. 9 str. 28.

Novinkou v oblasti chemického síťování proteinů je práce Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace Mikrobiologického ústavu AV ČR, kdy je modifikací bottom-up metody analýzy produktů síťovacích reakcí možné sledovat dynamické chování molekul, konkrétně indukované změny jejich konformačních stavů (Obr. 9 str. 28).



**Obr. 9 - Shrnutí tří současných přístupů analýzy produktů síťovacích reakcí**

**Modrá linie** – shrnuje bottom-up přístup modifikace směsí deuterovaných a nedeuterovaných činidel kombinovaný se specifickou proteolýzou v gelu nebo roztoku. Peptidy jsou analyzovány hmotnostním spektrometrem a identifikovány na základě přesné hmoty nebo z kolizních spekter vybraných iontů.

**Fialová linie** – vychází z bottom-up, modifikace deuterovaným nebo nedeuterovaným činidlem v přítomnosti nebo nepřítomnosti induktoru konformační změny.

**Žlutá linie** – přístup top-down – modifikovaný protein je celý analyzován, vybraný stav proteinu je v hmotnostním spektrometru izolován a fragmentován. Spojení jsou identifikována z MS/MS spekter.

### 2.3.2 Modifikace síťovacími činidly

Chemické síťování ve spojení s hmotnostní spektrometrií napomáhá k objasnění především terciárních a kvarterních struktur proteinů v podmínkách simulujících jejich přirozené prostředí. Nesmírnou výhodou jsou díky vysoké přesnosti hmotnostních analyzátorů, nízké požadavky na množství analytu. V současnosti je popsáno nepřeberné množství činidel, které kovalentně modifikují nejrůznější funkční skupiny biologických molekul.

#### 2.3.2.1 Rozdělení síťovacích činidel

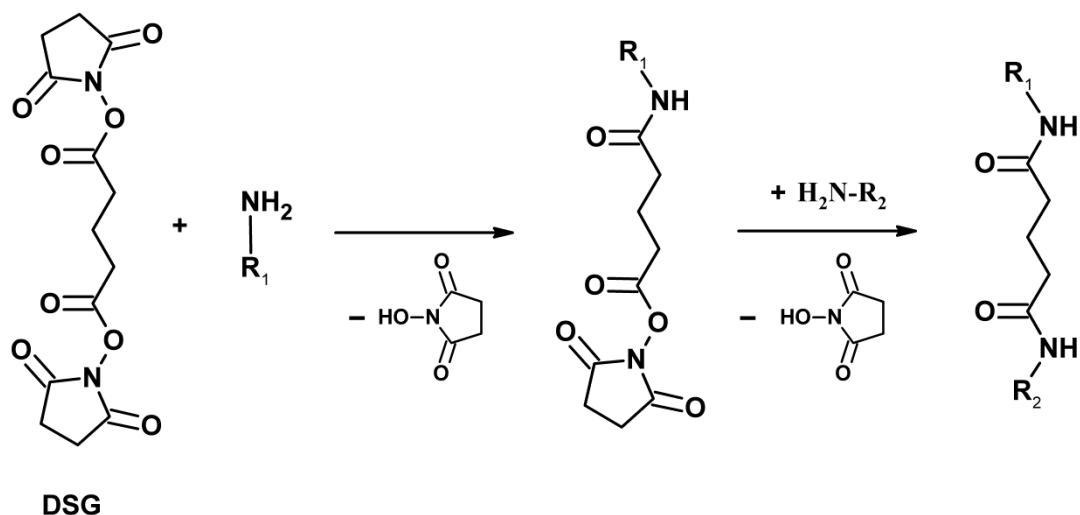
Síťovací činidla lze obecně rozdělit na dvě skupiny. První skupinu tvoří činidla, jejichž reaktivita je modulována přítomností funkčních skupin v molekule. Reaktivními funkčními skupinami jsou například aldehydy nebo primární aminy. Do druhé skupiny činidel se řadí tzv. fotoaktivovatelná činidla, jejichž reaktivitu lze indukovat pulzem ultrafialového záření. Běžně využívaná fotoaktivovatelná činidla obsahují v molekule azidovou funkční skupinu. Fotoaktivovatelné syntetické analogy aminokyselin, obsahující v molekule diazirinové kruhy, se využívají v síťování proteinových molekul<sup>52-53</sup>.

Oba základní typy činidel lze dále dělit podle počtu reaktivních skupin na mono-, bi- nebo polyfunkční. Monofunkční činidla, obsahující pouze jednu reaktivní skupinu, se využívají především ke studiu reaktivity postranních řetězců proteinů, čímž lze získat představu o uspořádání, interakcích a solubilizaci periferních aminokyselin. Bifunkční činidla obsahují dvě funkční skupiny. Reaktivní skupiny mohou být chemicky indukované, fotoaktivovatelné nebo lze použít jejich kombinaci. Jsou-li funkční skupiny síťovacího činidla rozdílné, jedná se o takzvaná činidla heterobifunkční, jsou-li reaktivní skupiny identické, mluvíme o činidlech homobifunkčních<sup>53</sup>.

#### 2.3.2.2 NHS estery

N-hydroxysukcinimid (NHS) estery jsou síťovací činidla, reagující zejména s primárními aminy, v proteinové struktuře s  $\epsilon$ -aminoskupinou lysinu nebo N-koncem řetězce. NHS estery patří k nejvyužívanějším síťovacím činidlům již od 70. let minulého století<sup>43</sup>. Jejich selektivita ovšem není dokonalá, minoritně tato činidla reagují s hydroxylovými skupinami tyrosinu, serinu i treoninu, a to v závislosti na pH reakce<sup>53-54</sup>. NHS estery jsou obtížně rozpustné ve vodě, ve vodném prostředí navíc rychle hydrolyzují za vzniku karboxylových kyselin, které již nejsou reaktivní. Pro modifikaci primárních aminů těmito činidly leží pH

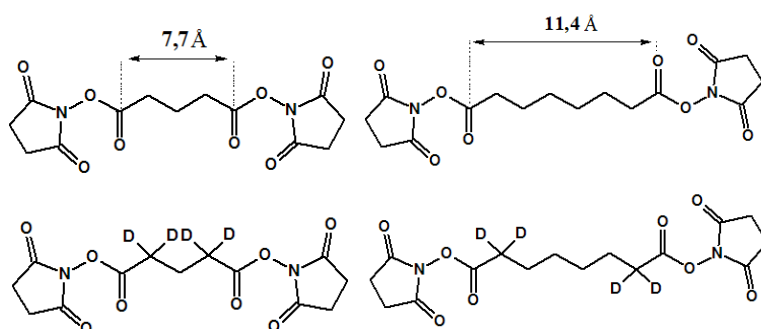
optimum mezi hodnotami 7-9. Z principu reakce je nutné k udržení optimálních hodnot pH využít pufrů, které neobsahují primární aminy<sup>53</sup>. Reakce homobifunkčního NHS esteru disukcinimidyl glutarátu (DSG) s primárními aminy je znázorněna na Obr. 10.



**Obr. 10 - Schéma reakce NHS esteru DSG s primárními aminy**

Disukcinimidyl glutarát (Obr. 11 vlevo) umožňuje spojení primárních aminů ve vzdálenosti až 7,7 Å<sup>55</sup>. Dalším hojně využívaným síťovacím činidlem je disukcinimidyl suberát (Obr. 11 vpravo), jenž umožňuje kovalentní spojení primárních aminů ve vzdálenosti až 11,4 Å<sup>55</sup>. Analogická, ve vodě rozpustná činidla vznikají modifikací imidylových kruhů sulfátovými skupinami.

Většina síťovacích experimentů se v současnosti provádí kombinacemi izotopově značených a neznačených činidel. Izotopově značená činidla se používají z důvodu snadnější interpretace produktů chemického síťování<sup>46</sup>. Ve výsledném spektru závislosti relativní intenzity signálu na  $m/z$  jsou produkty síťovací reakce izotopově značeným činidlem posunuty od signálů činidla neznačeného o hodnotu, odpovídající rozdílu hmot činidel lomenou nábojem. V případě 4krát deuterovaného činidla DSG se jedná o posun o hodnotu 4,025/z.



**Obr. 11 – Homobifunkční NHS estery**

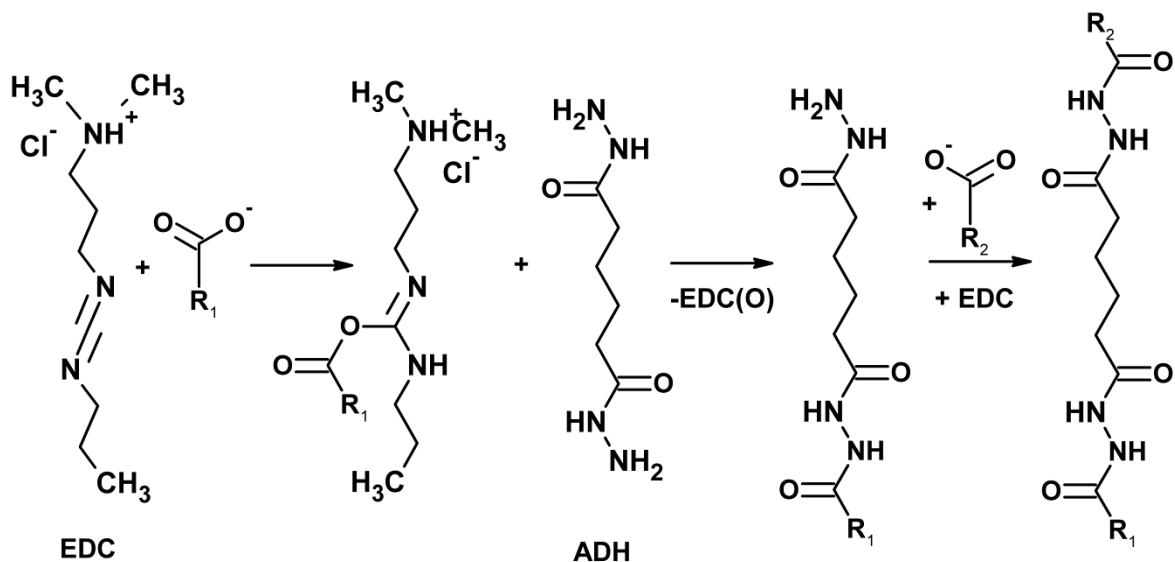
DSG (vlevo) a DSS (vpravo) včetně deuterovaných forem (dole)

### 2.3.2.3 Dihydrazidy

Aminokyseliny asparagová a glutamová, obsahující na konci svého postranního řetězce karboxylovou skupinu  $\text{-COO}^-$ , dosahují v proteinech průměrného celkového zastoupení kolem 12 %. Navíc jsou díky své hydrofilite lokalizovány především na površích proteinů, čímž jsou vhodnými cíli síťovacích reakcí.

Chemické síťování karboxylových skupin v molekule proteinu bylo zavedeno Novákem a Kruppou v roce 2008<sup>56</sup>. K síťování byly využity dihydrazidy kyselin šřavelové, sebakové a adipové (ADH). ADH je nejvíce využívaný vzhledem k dostupnosti a ideální délce spojovacího raménka. Samovolně reagují s hydrazidy pouze aldehydy či ketony, a proto je nutné karboxylové skupiny proteinu nejprve aktivovat. Aktivace je prováděna přidávkem modifikovaného karbodiimid hydrochloridu (EDC)<sup>56</sup>, nebo 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloridu (DMTMM)<sup>57</sup>, jež jsou přidávány k proteinu společně s dihydrazidy. Schéma reakce aktivované EDC popisuje Obr. 12.

Nevýhodou síťování proteinu dihydrazidy s využitím EDC jako aktivátoru karboxylových skupin, je hodnota pH, při které tato činidla reagují. Optimem takovéto reakce je pH mezi hodnotami 5-7, což může ovlivňovat biochemické a strukturní děje v molekule<sup>53,56</sup>. Se zvyšující se hodnotou pH klesá výtěžek reakce. Naopak reakce hydrazidu katalyzovaná DMTMM poskytuje dobré výtěžky i při neutrálním pH<sup>58</sup>.



Obr. 12 - Schéma reakce dihydrazidu kyseliny adipové aktivované přítomností EDC

### 2.3.3 Distanční geometrie a proteinové modelování

Distanční geometrie je matematické odvětví, zabývající se popisem bodů v prostoru pomocí jejich vzájemných vzdáleností. Přínos distanční geometrie pro strukturní biologii objevil Crippen v 80. letech 20. století<sup>59</sup>. Analýzami známých krystalových struktur bylo zjištěno, že konformace proteinů jsou vymezeny geometrickými a energetickými omezeními postranních řetězců aminokyselin. Na tomto poznatku sestavili Havel a Crippen výpočetní algoritmus, díky kterému bylo možné vypočítat na základě výše zmíněných omezení atomové koordináty<sup>60</sup>. Trojrozměrnou strukturu proteinů, které není možné analyzovat rentgenovou difrakcí, je možné sestavit pomocí NMR experimentů právě díky informacím o distanční geometrii jednotlivých rezonujících atomů, nejčastěji atomů vodíku získaných měřeními NOE spekter<sup>61</sup>.

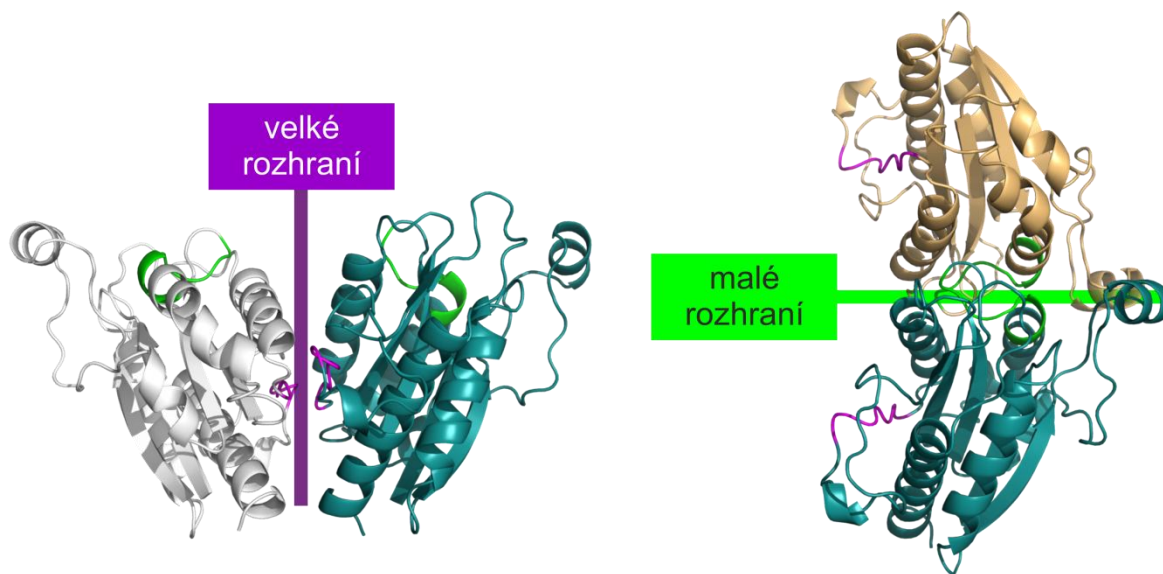
Dalším odvětvím strukturní biologie je homologní modelování. Předpokladem pro sestavení homologního modelu proteinu, jehož struktura není objasněna, je existence sekvenčně podobné trojrozměrné struktury<sup>62,63</sup>. V případech, kdy neexistuje vyřešená struktura identická minimálně z 30 %, lze modelování provádět pomocí systémů, využívajících současně strukturní databáze k výpočtům možné konformace proteinu pouze na základě znalosti aminokyselinové sekvence (angl. knowledge-based)<sup>64-65</sup>. Prvním celosvětově dostupným softwarem, umožňujícím takovéto výpočty i na běžných počítačích se stal program A. Šaliho Modeller<sup>66-67</sup>.

Data získaná síťovacími reakcemi, tj. maximální vzdálenosti dvou atomů v prostoru, informace o povrchovém uspořádání aminokyselin nebo různé vzájemné orientaci proteinových podjednotek, lze díky těmto modelovacím výpočetním algoritmům snadno vizualizovat. Správně interpretovaná hmotnostně spektrometrická data lze využít k upřesnění již známé krystalové strukturu proteinu<sup>23</sup>, sledovat místa protein-proteinové interakce<sup>68-69</sup>, či rozdílné produkty chemického síťování v závislosti na sekundární struktuře<sup>70</sup>. Distanční omezení, plynoucí z identifikovaných aminokyselinových spojení, lze využít při popisu či modelování proteinové struktury *de novo*<sup>71-72</sup>.



### 3. Cíle práce

- studovat vliv kofaktoru FMN, teploty a koncentrace na strukturu proteinu WrbA
- popsat technikami H-D výměny a chemického síťování dynamiku proteinu v roztoku
- určit rozhraní vzniku dimeru molekuly a následně tetrameru (Obr. 13)



Obr. 13 – Dvě potenciální dimerizační rozhraní proteinu WrbA

## 4. Materiál

### 4.1 Biologický materiál

protein WrbA

připraven Mgr. Olgou Ettrichovou z Oddělení struktury a funkce proteinů Ústavu nanobiologie a strukturní biologie Akademie věd České republiky, v. v. i

proteasy

pepsin, rhizopuspepsin	Sigma-Aldrich, USA; imobilizován v naší laboratoři
nepenthesin	připraven a imobilizován v naší laboratoři
trypsin	Promega, USA

### 4.2 Seznam chemikálií

1,4-dithiothreitol	Fluka, Švýcarsko
4-ethylmorfolin	Sigma-Aldrich, USA
Arginin	Sigma-Aldrich, USA
APCI-L Low Concentration Tuning Mix	Agilent Technologies, USA
Acetonitril (LC-MS čistota)	Merck, Německo
Coomassie Brilliant Blue R 250	Sigma-Aldrich, USA
Deuterium oxid	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid	Merck, Německo
Disukcinimidyl glutarát	Thermo Scientific, USA
Disukcinimidyl glutarát 4x deuterovaný	Thermo Scientific, USA
Disukcinimidyl suberát	Thermo Scientific, USA
Disukcinimidyl suberát 4x deuterovaný	Thermo Scientific, USA
Dodecylsulfát lithný	Thermo Scientific, USA
Ethanol	Merck, Německo
Ethanolamin	Sigma-Aldrich, USA
Ethylacetát	Merck, Německo
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
Hydroxid sodný	Lachema, ČR
Hydrogenfosforečnan sodný	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid vápenatý	Sigma-Aldrich, USA
Isopropylalkohol (LC-MS čistota)	Merck, Německo
Kyselina mravenčí (LC-MS čistota)	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina octová (LC-MS čistota)	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina trifluoroctová (LC-MS čistota)	Sigma-Aldrich, USA
Methanol (LC-MS čistota)	Merck, Německo
NuPAGE® LDS vzorkový pufr	Invitrogen, USA
NuPAGE® MES SDS 20x koncentrovaný pufr	Invitrogen, USA
Voda (LC-MS čistota)	Merck, Německo

### 4.3 Seznam přístrojů a materiálu

Analytické váhy	Mettler Toledo, Švýcarsko
Automatické pipety	Eppendorf, Německo
	Gilson, USA
	Eppendorf, Německo
Centrifuga stolní, Minispin	Fluka, Švýcarsko
Digitální multimetr	Hamilton, Švýcarsko
Elektroda pH metro Biotrode	BioRad, USA
Elektroforetická souprava	Bruker Daltonics, Německo
Hmotnostní spektrometr Apex-Ultra 9,4T	Bruker Daltonics, Německo
Hmotnostní spektrometr solariX XR 12T	Agilent Technologies, USA
HPLC systém Agilent 1200	Thermo Scientific, USA
HPLC systém UltiMate <sup>®</sup> 3000	Shimadzu, Japonsko
HPLC pumpa Prominence LC-20AD	Pharmacia Biotech, Švédsko
Chladicí lázeň	Zanussi, Itálie
Chladnička	
Chromatografické kolony:	
Acclaim C18 PepMap <sup>™</sup> 100 (0,1x150 mm)	
částice o průměru 3 μm, velikosti pórů 100 Å	Thermo Scientific, USA
Acclaim C18 PepMap <sup>™</sup> 100 (0,1x20 mm)	
částice o průměru 5 μm, velikosti pórů 100 Å	Thermo Scientific, USA
Jupiter C18 (0,5x50 mm)	
částice o průměru 5 μm, velikosti pórů 300 Å	Phenomenex, USA
MicroTrap <sup>™</sup> - peptidová	Michrom Bioresources, USA
MacroTrap <sup>™</sup> - proteinová	Michrom Bioresources, USA
Mikrostříkačka 250 μl	Hamilton, USA
NuPAGE <sup>®</sup> Novex <sup>®</sup> 4–12% Bis-Tris gel	Invitrogen, USA
pH metr Orion 2D star	Thermo Scientific, USA
pH metr Φ200	Beckman, USA
Předvážky HF1200G	AND, USA
Sonikační lázeň	Bandellin, Německo
Termostat stolní	Grant, Velká Británie
Termostat Thermomixer Comfort	Eppendorf, Německo
UV-VIS spektrometr DeNovix DS-11	DeNovix, USA
Vakuová odparka Savant SPD 121P	Thermo Scientific, USA
Vakuová odparka Speedvac	Jouan, Francie
Vialky se septem	Agilent Technologies, USA
Vodní lázeň	Memert, Německo
Vortex VELP	Scientifica, Itálie
Zdroj napětí PowerPac	BioRad, USA

## 4.4 Seznam roztoků

### Barvicí roztok

0,25% (m/v) Coomassie Brilliant blue R250; 45% methanol v 10% kyselině octové

### Elektrodový pufr

5% NuPAGE® MES SDS elektrodový pufr (50mM MES, 50mM Tris Base, 0.1% SDS, 1mM EDTA, pH 7,3)

### Mobilní fáze pro LC-MS analýzu

**Fáze A** – 0,1 % kyselina mravenčí v 2% ACN

**Fáze B** – 0,1% kyselina mravenčí v 98% ACN

### Mobilní fáze pro H-D LC-MS analýzu

**Fáze A** – 2% acetonitril a 0,4% kyselina mravenčí ve vodě

**Fáze B** – 0,4% kyselina mravenčí v 95% acetonitrilu

### Odbarvovací roztok

35% ethanol a 10 % kyselina octová ve vodě

### Štěpící pufr

10mM ethylmorfolinový pufr ve vodě, 10% ACN, pH 8,4

### Vzorkový pufr

100mM dithiothreitol v NuPAGE® LDS vzorkovém pufru

### Značící H<sub>2</sub>O pufr H-D výměny

20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100mM NaCl, pH 7,2

### Značící D<sub>2</sub>O pufr H-D výměny

20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100mM NaCl, pH 6,8 (pD 7,2)

### Zhášecí pufr H-D výměny A

1M glycin ve vodě, pH 2,3

### Zhášecí pufr H-D výměny B

1M glycin, 65mM NaCl, 13,05mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve vodě, pH 2,4

## 4.5 Softwarové vybavení

Data Analysis 4.1

DeutEx

Links (dříve ASAP)

MASCOT

mMass 5.4.1

MS Tools

PyMol 1.7.2.1

Bruker Daltonics, Německo

ms.biomed.cas.cz, ČR

Algoritmus pro vyhodnocení MS dat  
síťovacích reakcí skupiny M. Young<sup>44</sup>

Matrix Science, Velká Británie

mMass.org, ČR<sup>73</sup>

ms.biomed.cas.cz, ČR<sup>74</sup>

Schrödinger, USA

## 5. Metody

### 5.1 MS charakterizace proteinu

Dvacet  $\mu\text{g}$  proteinu WrbA bylo odsoleno 0,5% kyselinou mravenčí na proteinové koloně MacroTrap. Protein byl eluován 50  $\mu\text{l}$  80% ACN s 0,5% kyselinou mravenčí. Protein byl následně čtyřikrát zředěn 50% methanolem ve vodě na výslednou koncentraci 0,1 mg/ml.

Měření vlastností intaktního proteinu probíhalo na hmotnostním spektrometru solariX XR (Bruker Daltonics) s iontově cyklotronovou rezonanční celou s Fourierovou transformací (FT-ICR). Ionizace probíhala v elektrospreji při průtoku analytu 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Měření probíhalo v pozitivním modu s akvizicí dat 2 miliony databodů. Hmotnostní rozsah byl nastaven na hodnoty 150-2500 m/z. Výsledné spektrum vzniklo průměrováním osmi po sobě následujících spekter.

### 5.2 Vodík-deuteriová výměna

#### 5.2.1 Příprava reakčních směsí

Protein WrbA se nacházel v roztoku o složení 20mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 100mM NaCl, pH 7,2. Koncentrace proteinu byla 125 $\mu\text{M}$  (2,58 mg/ml). Vodík-deuteriová výměna byla sledována celkem pro osm podmínek, lišících se koncentrací proteinu (1,5 a 20 $\mu\text{M}$ ) a teplotou (4 a 20  $^\circ\text{C}$ ), při které výměna probíhala. Vliv teploty a koncentrace byl sledován jak pro apoprotein, tak i holoprotein (koncentrace FMN 50 $\mu\text{M}$ ). Množství proteinu ve výchozích směsích bylo pro všechny podmínky 23  $\mu\text{g}$ . Složení směsí na počátku výměny je pro jednotlivé podmínky popsáno v Tab. 2 str. 38.

Reakční směsi byly pro ustavení rovnováhy ponechány 1 hodinu při příslušných teplotách. Vzorky, jejichž experimentální teplota byla 4  $^\circ\text{C}$ , byly temperovány v chladicí lázni Pharmacia Biotech. Teplota chladicí lázně byla v průběhu experimentu kontrolována digitálním multimetrem. Vzorky s teplotou reakce 20  $^\circ\text{C}$  byly temperovány termostatem Thermomixer Comfort.

**Tab. 2 – Složení vzorků pro vodík-deuteriovou výměnu**

Značení podmínek	Koncentrace proteinu [ $\mu\text{M}$ ]	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Koncentrace FMN [ $\mu\text{M}$ ]	Poměr $\text{H}_2\text{O}$ a $\text{D}_2\text{O}$ pufru
<b>1,5W4</b>	1,5	4	0	1:4
<b>1,5W20</b>	1,5	20	0	1:4
<b>1,5W4F</b>	1,5	4	50	1:4
<b>1,5W20F</b>	1,5	20	50	1:4
<b>20W4</b>	20	4	0	1:4
<b>20W20</b>	20	20	0	1:4
<b>20W4F</b>	20	4	50	1:4
<b>20W20F</b>	20	20	50	1:4

### 5.2.2 Provedení vodík-deuteriové výměny

Temperované vzorky byly v čase 0 s pětkrát zředěny deuterovaným značícím pufrům o složení 20mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 100mM NaCl, v  $\text{D}_2\text{O}$ , pD 6,8, temperovaného na příslušné teploty. V přesně definovaných časových intervalech, byly z reakčních směsí odebrány frakce, které obsahovaly shodně 100 pmol proteinu. Frakce ze vzorků s 1,5 $\mu\text{M}$  proteinem byly přeneseny do 1M glycinového zhášecího pufru A o pH 2,3, Frakce s 20 $\mu\text{M}$  proteinem do zhášecího pufru B o složení 1M glycin, 65 mM NaCl, 13,05mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 2,4. Ihned po přenesení frakce do zhášecího pufru byla směs rychle a prudce zamíchána a okamžitě zamrzána v tekutém dusíku. Zmražené vzorky byly skladovány v hlubokomrazicím boxu při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ . Rozdílné složení zhášecích pufrů bylo zvoleno s ohledem na vyrovnaní obsahu soli ve všech vzorcích, což bylo důležité pro následnou digesci a chromatografickou separaci na kolonách s obrácenou fází.

Časové intervaly sběru frakcí byly určeny s ohledem na rozdíl teplot, při kterých výměna probíhala. Dle obecné rovnice (2) str. 22 byla pro korekční teplotní faktor vypočítána hodnota 5,6. Výměna při  $4^{\circ}\text{C}$  probíhá zhruba 5,6krát pomaleji než při  $20^{\circ}\text{C}$ . Výměna při  $4^{\circ}\text{C}$  byla proto zastavována v časových intervalech 5,6krát delších, než v případě  $20^{\circ}\text{C}$  sady vzorků. Všechny časy odběru frakcí shrnuje Tab. 3.

**Tab. 3 - Časy odběru frakcí v jednotlivých teplotních podmínkách (v sekundách)**

Frakce	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Čas odběru <math>20^{\circ}\text{C}</math></b>	10	30	56	168	313	600	939	1753	3360
<b>Čas odběru <math>4^{\circ}\text{C}</math></b>	56	168	313	939	1753	3360	5257	9811	18816

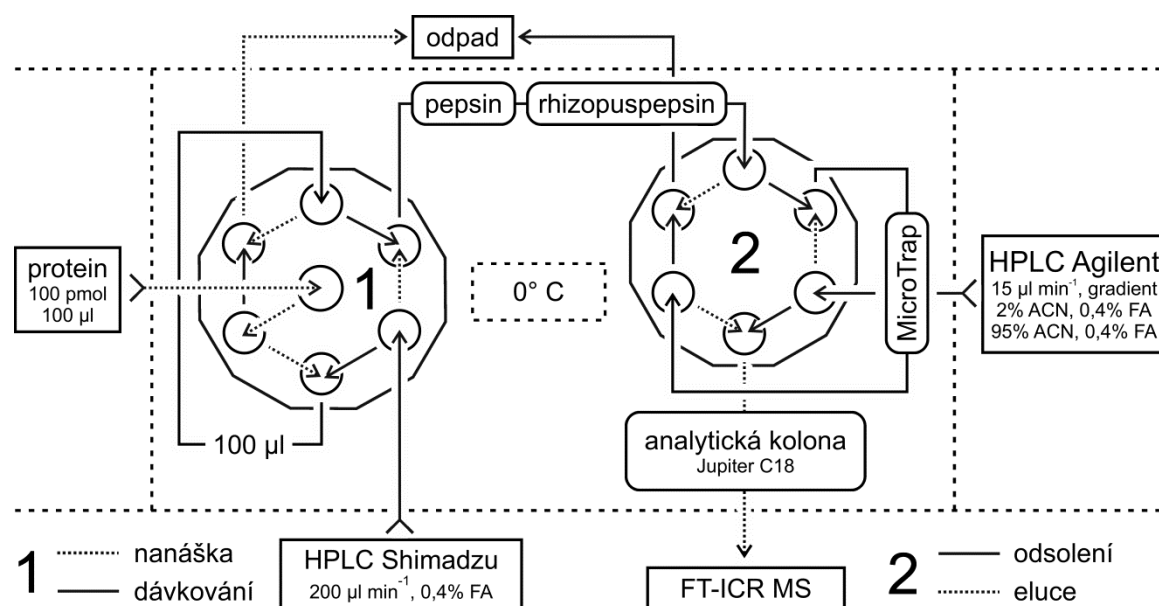
Nedeuterované kontrolní vzorky byly připraveny odděleně. Složení nedeuterovaných vzorků (ND) je shrnuto v Tab. 4. Tyto vzorky byly taktéž zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -80 °C. Nedeuterované vzorky byly připraveny při teplotě 20 °C.

**Tab. 4 – Složení nedeuterovaných vzorků**

Značení podmínek	Množství proteinu [pmol]	Koncentrace FMN [μM]	Poměr objemu reakčního roztoku a zhášecího pufru		Výsledný objem [μl]
			A	B	
<b>1,5WND</b>	100	0	3:1	-	100
<b>1,5WFND</b>	100	50	3:1	-	100
<b>20WND</b>	100	0	-	1:19	100
<b>20WFND</b>	100	50	-	1:19	100

### 5.2.3 Optimalizace proteolýzy proteinu WrbA

Optimalizace štěpení proteinu WrbA byla provedena přístupem peptidového mapování za využití LC-MS/MS analýzy. Schéma použitého LC systému popisuje Obr. 14. Průtok mobilních fází systémem, sestaveného z proteasové, odsolovací peptidové a analytické kolony, byl zajištěn HPLC systémy Shimadzu LC-20AD a Agilent 1200 a ovládán pomocí dvou vícecestných ventilů.

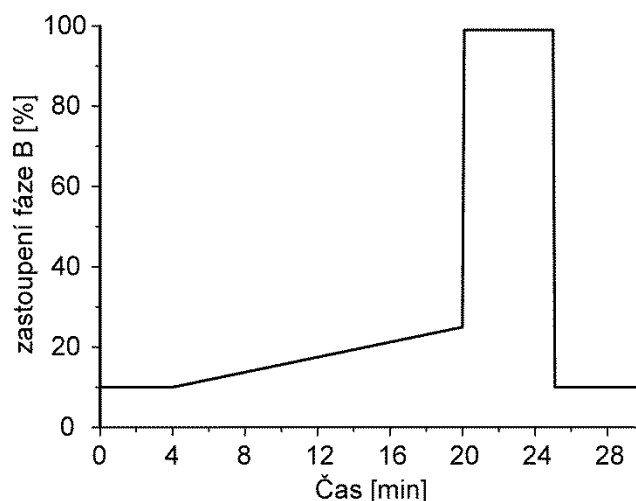


**Obr. 14 – Zapojení chromatografického systému pro štěpení a separaci vzorků vodík-deuteriové výměny před MS analýzou**

Zásobní roztok proteinu byl naředěn zhášecím pufrem na koncentraci 3 pmol/μl. V každé analýze bylo do systému nanášeno 100 μl zředěného proteinu (300 pmol). Protein byl štěpen pomocí různých imobilizovaných proteas (pepsin, rhizopuspepsin a nepenthesin a kombinacemi pepsin-nepenthesin a pepsin-rhizopuspepsin) při průtocích 0,4% kyseliny mravenčí (mobilní fáze HPLC Shimadzu) 100 nebo 200 μl/min. Produkty štěpení byly koncentrovány na peptidové koloně MicroTrap, kde byly současně odsoleny. Eluce z peptidové kolony a separace na analytické koloně Jupiter C18 (0,5×50 mm, 5 μm průměr částic, velikosti pórů 300 Å) byla zajištěna gradientem mobilních fází HPLC systému Agilent, průtok 15 μl/min. Složení mobilních fází – A: 0,4% v 2% acetonitrilu; B: 0,4% kyselina mravenčí v 95% acetonitrilu. Hodnoty procentuálního zastoupení fáze B v čase jsou popsány v Tab. 5. Čas 0 min odpovídal okamžiku přepnutí ventilu 1 do pozice dávkování analytu na proteasovou kolonu. V čase 4 minuty byl ventil 2 přepnut do pozice eluce vzorku a zároveň bylo zahájeno sbírání hmotnostních spekter.

**Tab. 5 – Zastoupení mobilní fáze B v gradientu LC-MS/MS analýzy peptidového mapování**

Čas [min]	zastoupení mobilní fáze B [%]
0–4	10
4→20	10→25
20→20,1	25→99
20,1–25	99
25→25,1	99→10
25,1→	10



Analýza produktů štěpení byla provedena pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) instrumentem Apex Ultra Qe (Bruker Daltonics) vybaveným iontově cyklotronovou rezonanční celou s Fourierovou transformací (FT-ICR) v magnetickém poli o indukci 9,4 T. Ionizace iontů probíhala v elektrospreji (ESI). Měření probíhala v pozitivním modu s akvizicí dat 512 tisíc databodů. Hmotnostní spektrometr byl externě kalibrován pomocí argininových klastrů. Hmotnostní rozsah byl nastaven na hodnoty 150–1800 m/z. MS/MS spektra byla sbírána v data-dependentním modu s dynamickým



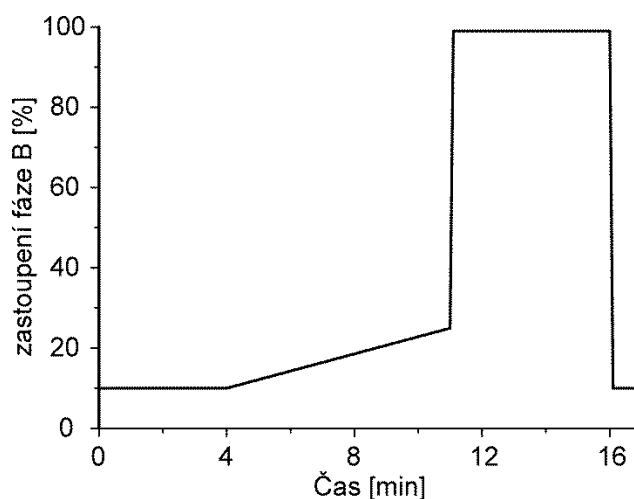
výběrem prekurzorového iontu. Z každého MS skenu bylo automaticky vybráno šest nejintenzivnějších signálů iontů, které byly následně podrobeny fragmentaci technikou CID v hexapolu. Produkty štěpení byly na základě kolizních spekter identifikovány pomocí algoritmu MASCOT. Mapa peptidového pokrytí sekvence byla následně sestavena pomocí webové služby DrawMap.

#### 5.2.4 Hmotnostně spektrometrická analýza produktů H-D výměny

Štěpení a chromatografická separace nedeuterovaných vzorků a produktů H-D výměny probíhala ve stejném uspořádání jako peptidové mapování. Vzorky byly po vyjmutí z mrazicího boxu rychle rozmrazeny pomocí vortexu a okamžitě přeneseny do chromatografického systému (Obr. 14 str. 39). Protein byl štěpen kombinací dvou imobilizovaných proteas v pořadí pepsin-rhizopuspepsin. Průtok HPLC systému Shimadzu byl stanoven na 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Po 4 minutovém odsolení peptidů na koloně MicroTrap byl přepnutím ventilu 2 na kolonu přiveden eluční gradient mobilních fází A a B pumpovaný HPLC systémem Agilent 1200 (Tab. 6). MS analýza probíhala v pozitivním modu s akvizicí dat 1 milion databodů. Hmotnostní rozsah byl nastaven na hodnoty 300-1800 m/z. Hmotnostní spektra vznikla průměrováním čtyř cyklů měření.

**Tab. 6 - Zastoupení mobilní fáze B v gradientu LC-MS analýzy produktů H-D výměny**

Čas [min]	zastoupení mobilní fáze B [%]
0-4	10
4-11	10-25
11-11,1	25-99
11,1-16	99
16-16,1	99-10
16,1-	10



## 5.3 Síťovací reakce

### 5.3.1 Příprava proteinu pro síťovací reakce

Protein WrbA byl skladován v roztoku sodnofosfátového pufru o pH 7,2 při -80 °C. Do pufru pro síťovací reakce (10mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7,0) byl protein převeden gelovou filtrací pomocí kolony Micro BioSpin<sup>TM</sup> P-6. Kolona s nosičem byla před použitím připravena podle protokolu výrobce. Následně byla kolona čtyřikrát promyta 0,5 ml pufru pro síťovací reakce. Centrifugace při promývání probíhala zrychlením 1000 × g po dobu 1 minuty. Vzorek byl na kolonu nanesen v objemu 70 μl. Eluce vzorku z kolony probíhala při zrychlení 1000 × g po dobu 3,5 minuty.

### 5.3.2 Stanovení koncentrace metodou BCA

Celková koncentrace proteinu po gelové chromatografii byla stanovena spektrofotometricky pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA). Kalibrační přímka byla sestrojena dle návodu dodavatele z vodných roztoků hovězího sérového albuminu o koncentracích 0, 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 a 2 mg/ml. Referenční pozadí bylo stanoveno vzorkem s nulovou koncentrací proteinu. Vzorek proteinu byl před přípravou BCA roztoku dvakrát zředěn vodou, roztok vzorku byl připraven v duplikátu. Měření bylo provedeno na UV-VIS spektrometru DeNovix DS-11 v objemu 2 μl. Kalibrační roztoky i roztoky vzorků byly měřeny třikrát. Výslednou hodnotou koncentrace byl průměr měření.

### 5.3.3 Reakce s činidly chemického síťování

Deuterovaná i nedeuterovaná činidla disukcinimidyl glutarát a disukcinimidyl suberát byla rozpuštěna na koncentraci 3 mg/ml v bezvodém ethylacetátu. Roztoky deuterovaných a nedeuterovaných forem činidla byly smíchány v poměru 1:1. Směsi činidel byly rozděleny na dvě poloviny, kdy jedna část byla 30 minut temperována při 4°C, druhá při 20°C.

Chemické síťování bylo provedeno s 15 μg proteinu o koncentracích 1,5μM a 20μM při teplotách 4° a 20°C, jak v přítomnosti FMN tak v jeho nepřítomnosti. Použitý materiál (špičky, stojánky) a všechny složky síťovacích reakcí (roztoky proteinu a činidel, zhašecí roztok) byly temperovány 1 hodinu při příslušných teplotách. Experimenty při 4°C probíhaly v klimatizované chladové místnosti. Experimenty při 20°C byly prováděny

v laboratoři, teplota roztoků byly udržována termostatem Thermomixer Comfort. Pro každou koncentraci proteinu byly připraveny kontrolní vzorky bez chemického činidla.

Sítovací činidla byla do roztoku proteinu přidávána v 20 násobném molárním nadbytku nad proteinem. Po přidání činidla byla směs krátce zamíchána. Sítovací reakce probíhala 1 hodinu. Reakce byla zastavena přidáním ethanolaminu do reakční směsi. Molární koncentrace ethanolaminu byla dvojnásobná oproti koncentraci sítovacího činidla. Ethanolamin byl přidáván 1000krát zředěný v 10mM ethylmorfolinovém pufru, pH 8,4. Po zamíchání byly vzorky ponechány reagovat 1 hodinu při příslušné teplotě.

#### **5.3.4 Elektroforetická separace produktů sítovací reakce**

Čistota proteinu a charakterizace vzniklých produktů byla zjištěna elektroforetickou separací v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu lithného (LDS). Ze všech vzorků byla odebrána jedna třetina objemu (5  $\mu$ g proteinu). Frakce, obsahující 1,5 $\mu$ M protein byly sesušeny na vakuové odparce Speedvac na objem 20 $\mu$ M frakce, tj. asi 12  $\mu$ l. Všechny frakce byly následně dvakrát zředěny dvakrát koncentrovaným vzorkovým pufrům. (100mM DTT v komerčním LDS vzorkovém pufru). Vzorky byly zamíchány a inkubovány v termostatu při teplotě 90°C po dobu 5 minut. Po centrifugaci (12 000  $\times$  g, 15 s) bylo do jamek komerčně dodávaného polyakrylamidového gelu NuPAGE s gradientem zesílení 4-12 % pipetováno 24  $\mu$ l vzorků.

Jako elektroodový pufr byl použit vodou 20x zředěný komerční MES SDS elektroodový pufr. Separace proteinů probíhala za konstantního napětí 200 V a horní limitní hodnota proudu byla nastavena na hodnotu 250 mA. Proteiny v gelu byly vizualizovány barvicím roztokem, přebytečné barvivo bylo následně několik hodin odmyváno odbarvovacím roztokem. Po odbarvení byly gely skladovány v 1% roztoku kyseliny octové.

#### **5.3.5 Proteolýza produktů sítovací reakce**

##### **5.3.5.1 Enzymová proteolýza v gelu**

Po úplném vymytí přebytečného barviva z polyakrylamidového gelu odbarvovacím roztokem byly části gelu obsahující zesílený monomer proteinu vyjmuty skalpelem, rozkrájeny na části o velikosti cca 1 $\times$ 1 mm a přeneseny do mikrozkušavek. Pro úplné odbarvení proteinu byl gel v mikrozkušavkách převrstven 100  $\mu$ l 100mM ethylmorfolinového pufru a po zamíchání bylo přidáno dalších 100  $\mu$ l ACN.

Po 10 minutové sonikaci byl roztok odebrán a proces odbarvení byl ještě jednou opakován. Poté byl gel převrstven 100  $\mu$ l ACN, po 5 minutové sonikaci byl roztok vyměněn za 50% acetonitril. Po opětovné 5 minutové sonikaci byl gel zcela vysušen na vakuové odparce Speedvac. Vysušený gel byl převrstven roztokem trypsinu ve 10mM ethylmorfolinovém pufru s 10% ACN o koncentraci proteasy 10  $\mu$ g/ml. Štěpení probíhalo přes noc při 37 °C.

Po štěpení byl roztok odebrán do nových mikrozkušavek a peptidy z gelu byly postupně vymývány 30  $\mu$ l 0,1% TFA, 80% ACN s 0,1% TFA a 50% ACN. Po přidání roztoku byl obsah zkumavek vždy zamíchán a vystaven 5 minutové sonikaci. Po sonikaci byl aktuální roztok od gelu odebrán a smísen s roztokem po štěpení. Obsah nových mikrozkušavek byl na vakuové odparce Speedvac zakoncentrován na objem cca 50  $\mu$ l. Následovalo odsolení na peptidové koloně MicroTrap 0,1% TFA. Peptidy byly z kolony eluovány 50  $\mu$ l 80% ACN s 0,1% TFA.

#### 5.3.5.2 Enzymová proteolýza v roztoku

Druhá třetina vzorků byla připravena pro štěpení proteasou trypsin. Vzorky obsahující 1,5 $\mu$ M protein byly sesušeny na vakuové odparce Speedvac na výsledný objem asi 12  $\mu$ l. Zásobní vodný roztok trypsinu o koncentraci 1  $\mu$ g/ $\mu$ l byl zředěn štěpicím pufru (10mM ethylmorfolinový pufr s 10% ACN, pH 8,4) na koncentraci proteasy 2,75 ng/ $\mu$ l. Roztok proteinu byl roztokem proteasy doplněn na 50  $\mu$ l. Množství přidané proteasy odpovídalo molárnímu poměru proteasa:protein 1:50. Štěpení probíhalo přes noc v termostatu při teplotě 37 °C

#### 5.3.5.3 Chemická proteolýza

Zbývající třetina vzorků byla vystavena chemické proteolýze v přítomnosti CNBr. Bromkyan byl rozpuštěn na koncentraci 20 mg/ml v 70% vodném roztoku TFA. Vzorky proteinu byly vysušeny na vakuové odparce a opět rozpuštěny v 50  $\mu$ l roztoku bromkyanu. Zkušavky byly kvůli zamezení přístupu světla ke vzorku obaleny alobalem a umístěny přes noc do digestoře. Následně byly vzorky opět vysušeny na vakuové odparce a poté rozpuštěny ve 100  $\mu$ l 50% methanolu.

### 5.3.6 LC-MS analýza produktů síťovací reakce

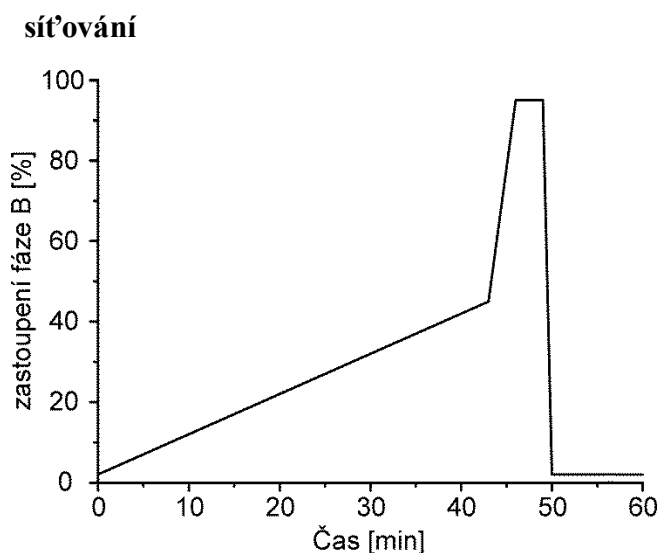
Vzorky proteinu po chemické nebo enzymové proteolýze v roztoku i v gelu byly zcela vysušeny na vakuové odparce Speedvac. K lyofilizátu byly přidány 2  $\mu$ l 80% ACN v 0,1% TFA. Po 5 minutové sonikaci bylo k roztoku přidáno 50  $\mu$ l 0,1% TFA. Vzorky byly zamíchány na vortexu a poté opět 5 minut sonikovány. Část vzorků byla dvakrát zředěna 0,1% TFA a přenesena do LC-MS vialek se septem.

Odsolení a separace peptidů probíhala v HPLC systému UltiMate® 3000. Na kolonu Acclaim C18 PepMap™ 100 (0,1 $\times$ 20 mm, 5  $\mu$ M průměr částic, velikost pórů 100 Å) byly nanесeny 2  $\mu$ l vzorku o koncentraci proteinu 0,05 mg/ml. Odsolení probíhalo 3 minuty průtokem mobilní fáze 10 ml/min. V čase 3 minuty byl na odsolovací kolonu vpuštěn gradient mobilních fází (fáze A: 0,1 % kyselina mravenčí v 2% ACN; fáze B: 0,1% kyselina mravenčí v 98% ACN) o průtoku 0,5  $\mu$ l/min. Vyplavené peptidy byly separovány na analytické koloně s obrácenou fází Acclaim C18 PepMap™ 100 (0,1 $\times$ 150 mm, 3  $\mu$ m průměr částic, velikosti pórů 100 Å) vyhřívané na 60 °C. Procentuelní zastoupení mobilní fáze B v čase popisuje Tab. 7.

HPLC systém byl spojen s hmotnostním spektrometrem solariX XR (Bruker Daltonics) s nano-elektrosprejem jako iontovým zdrojem a FT-ICR analyzátozem v magnetickém poli o indukci 12 T. Sběr dat byl započat v čase 6 minut od nanесení vzorku na kolonu a probíhal po dobu 54 minut. Měření probíhala v pozitivním módu s akvizicí 1 milion databodů. Hmotnostní rozsah byl zvolen mezi hodnotami m/z 250 a 2000 m/z. Akumulace iontů v ICR cele byla nastavena na 0,4 s. Výsledná spektra vznikla průměrováním čtyř po sobě následujících měření.

**Tab. 7 - Zastoupení mobilní fáze B gradientu LC-MS analýzy produktů chemického síťování**

Čas [min]	zastoupení mobilní fáze B [%]
0	2
0→43	2→45
43→46	45→95
46→49	95
49→50	92→2
50→	2



## 5.4 Vyhodnocení LC-MS dat

Naměřená LC-MS data byla zpracována v programu DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics). Dekonvoluce dat byla provedena algoritmy SNAP nebo FTMS. Dekonvolovaná data byla z důvodu snazší manipulace exportována do formátů podporovaných dalšími programovými nástroji, vytvořenými pro efektivní práci s hmotnostně spektrometrickými daty.

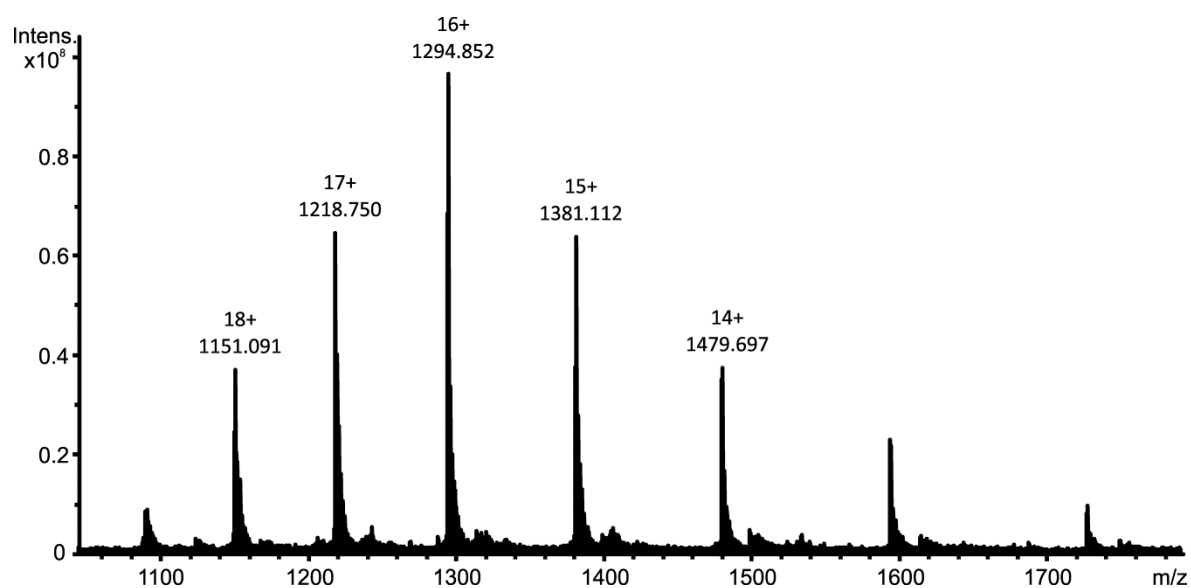
Data získaná z H-D výměny byla vyhodnocena pomocí programu DeutEx. Tento program vyhledává na základě vstupních parametrů změny v intenzitě jednotlivých izotopů příslušného peptidu v závislosti na zvyšujícím se počtu vyměněných deuterií. Vstupními parametry byly retenční časy peptidů nalezených při peptidovém mapování algoritmem MASCOT. Výstupem z programu DeutEx jsou grafy závislosti procenta deuterace jednotlivých peptidů na délce izotopového značení.

Snazší interpretaci dat získaných z experimentů chemického síťování umožňuje program založený na algoritmu Links. Ten vytváří virtuální knihovnu hmotností peptidů, včetně modifikovaných, které je možné teoreticky získat z proteinu štěpením určitou specifickou proteasou. Teoretické hmotnosti z takto vytvořené knihovny jsou porovnávány s experimentálně naměřenými dekonvolovanými hodnotami. Pokud směrodatná odchylka experimentální hmotnosti od hmotnosti teoretické nepřesahuje hodnotu 3 ppm, je k experimentálním signálům přiřazena teoretická sekvence. Takto přiřazené signály jsou poté zpětně fyzicky dohledány v hmotnostních spektrech a ručně validovány.

## 6. Výsledky

### 6.1 MS charakterizace proteinu WrbA

Ověření molekulové hmotnosti monomeru proteinu WrbA a jeho správné sbalení bylo provedeno pomocí hmotnostně spektrometrické charakterizace intaktního proteinu. Molekulová hmotnost monomerní jednotky byla stanovena z nábojového stavu  $[M+15H^+]^{15+}$  (Obr. 15) na hodnotu 20 714,68 Da. Tato hodnota odpovídá teoretické molekulové hmotnosti monomerní jednotky proteinu WrbA dlouhé 197 aminokyselin, tedy bez iniciační aminokyseliny methioninu. Tímto ověřena čistota proteinu a zároveň byla vyloučena jeho případná degradace.

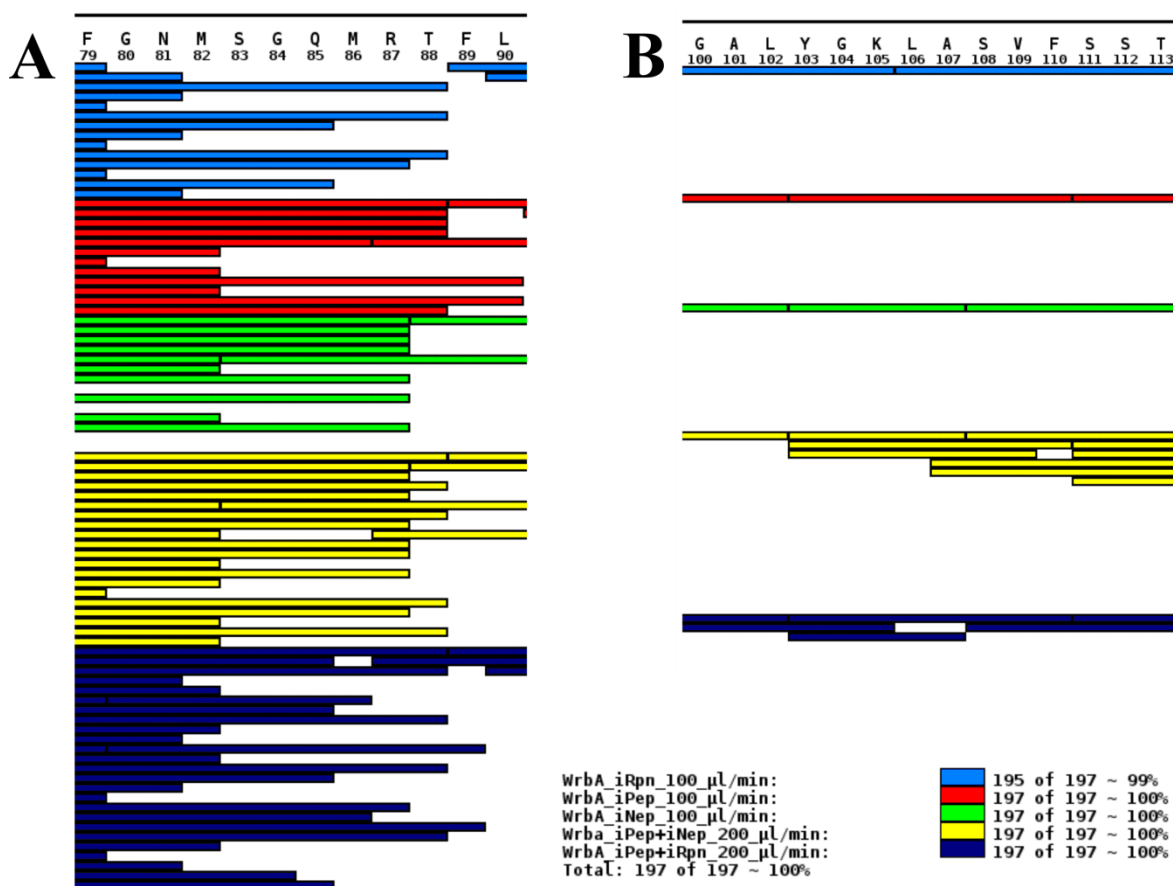


Obr. 15 – Hmotnostní spektrum intaktního proteinu WrbA

## 6.2 Vodík-deuteriová výměna

### 6.2.1 Optimalizace digesce proteinu WrbA

Neznačený protein WrbA byl vystaven štěpení různými imobilizovanými proteasami i jejich kombinacemi při průtoku kolonou 100 nebo 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Produkty štěpení byly po separaci podrobeny kolizi indukované disociací a na základě těchto kolizních spekter byly identifikovány pomocí algoritmu MASCOT. Z identifikovaných peptidů byla pomocí webové aplikace MSTools sestavena celková mapa sekvenčního pokrytí (viz. Obr. P1, Příloha 1). Produkty štěpení se odlišovaly zejména ve dvou oblastech sekvence znázorněných na Obr. 16. Pro další analýzy byla jako nejúčinnější vybrána kombinace imobilizovaných proteas v pořadí pepsin-rhizopuspepsin při průtoku mobilní fáze 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ .



**Obr. 16 – Pokrytí sekvence peptidy získané štěpením různými proteasami**

**A** – oblast sekvence mezi aminokyselinami 79 a 90, štěpení kombinací pepsinu a rhizopuspepsinu (tmavě modrá) poskytuje v této oblasti v porovnání s ostatními proteasami nejvyšší variabilitu peptidů, což je pro metodu H-D výměny velmi výhodné

**B** – štěpení pepsinem a rhizopuspepsinem poskytuje v porovnání s ostatními proteasami v oblasti aminokyselin 100 až 113 více kratších a překrývajících se peptidů; vytvořeno pomocí webové služby MSTools<sup>74</sup>



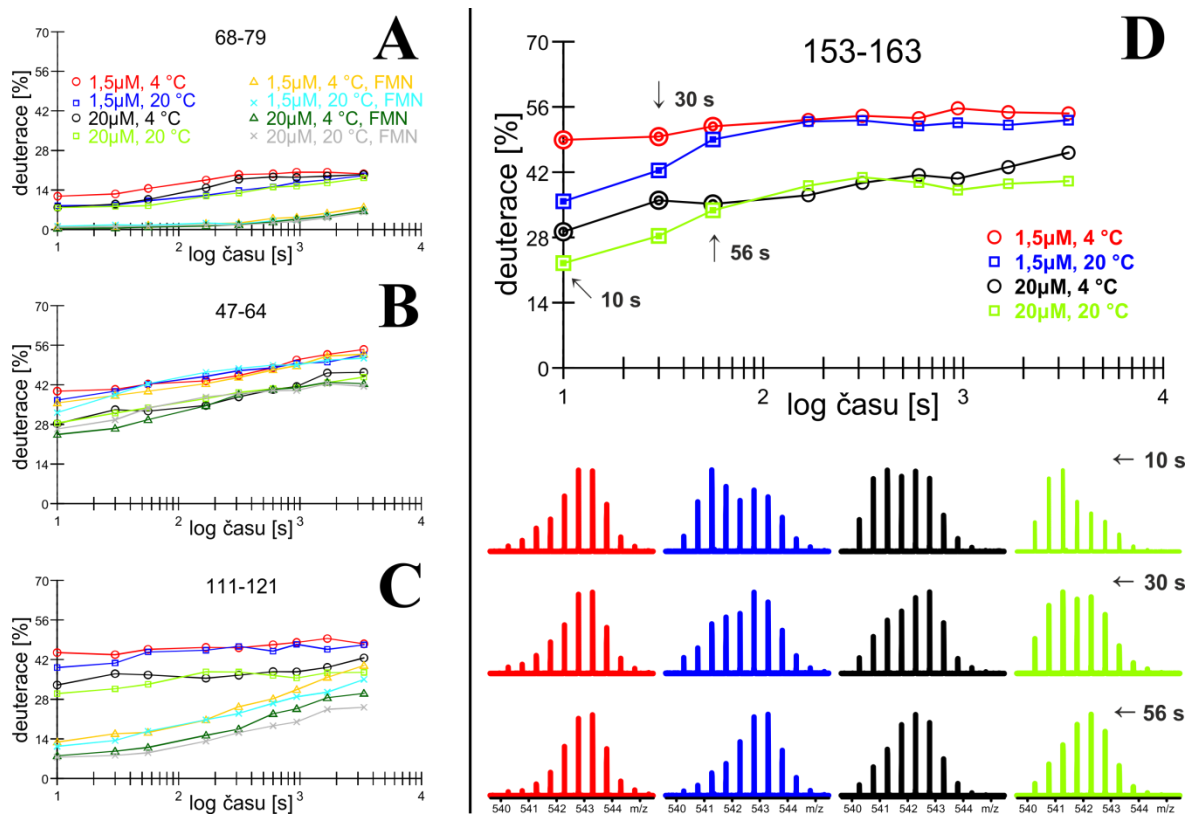
## 6.2.2 Interpretace LC-MS dat vodík-deuteriové výměny

Vodík-deuteriová výměna proteinu WrbA byla sledována v devíti časových bodech při osmi reakčních podmínkách. Reakční podmínky byly stanoveny na základě výsledků ultracentrifugačních experimentů proteinu popsanych v kapitole 2.1.3 str. 13. Sledován byl vliv teploty 4 a 20 °C a koncentrace (1,5μM nebo 20μM) proteinu. V každé podmínce byl navíc sledován vliv kofaktoru FMN. Hmotnostní spektra byla zpracována programem DeutEx, jehož výstupem jsou grafy závislosti procenta vyměněných vodíků z celkového počtu vyměnitelných na čase značení. Pro snadnější interpretaci byla doba značení vzorků při 4 °C korigována na hodnotu 20 °C.

### 6.2.2.1 Celková charakterizace

Vodík-deuteriová výměna proteinu WrbA byla sledována celkem na 90 peptidech, vzniklých štěpením imobilizovanými proteasami pepsinem a rhizopuspepsinem při průtoku mobilní fáze 200 μl/min. Na 15 peptidech nebyla pozorována žádná výměna amidických vodíků. Změna všech podmínek se projevila na deuteraci 21 peptidů. Snížení počtu vyměněných deuterií vlivem pouze přítomnosti kofaktoru FMN bylo pozorováno na devíti peptidech (příklad uveden na Obr. 17 A, str. 50). Změnu deuterace v závislosti pouze na rozdílné koncentraci proteinu WrbA vykazovalo pět peptidů (Obr. 17 B). Jako nezávislá na teplotě, avšak závislá na zbylých experimentálních podmínkách, se projevila míra deuterace 15 sledovaných peptidů (Obr. 17 C). Na vodík-deuteriovou výměnu zbývajících 25 nalezených peptidů nemají změny experimentálních podmínek výrazný vliv. Část D Obr. 17 na straně 50 popisuje peptid 153-163, jehož chování se od ostatních peptidů liší. Dané chování lze pozorovat pouze v časech 10 a 30 s vodík-deuteriové výměny. Tento jev poukazuje na výskyt dvou oligomerních stavů molekuly proteinu nebo dvou konformačních stavů příslušného regionu.

Grafy procenta deuterovaných aminokyselin z celkového počtu vyměnitelných v závislosti na čase odběru vzorku jsou pro všechny nalezené peptidy uvedeny jako Obr. P2, příloha 2. Významné peptidy z hlediska vlivu přítomnosti kofaktoru a peptidy, reprezentující možná dimerizační rozhraní, jsou detailněji popsány dále.

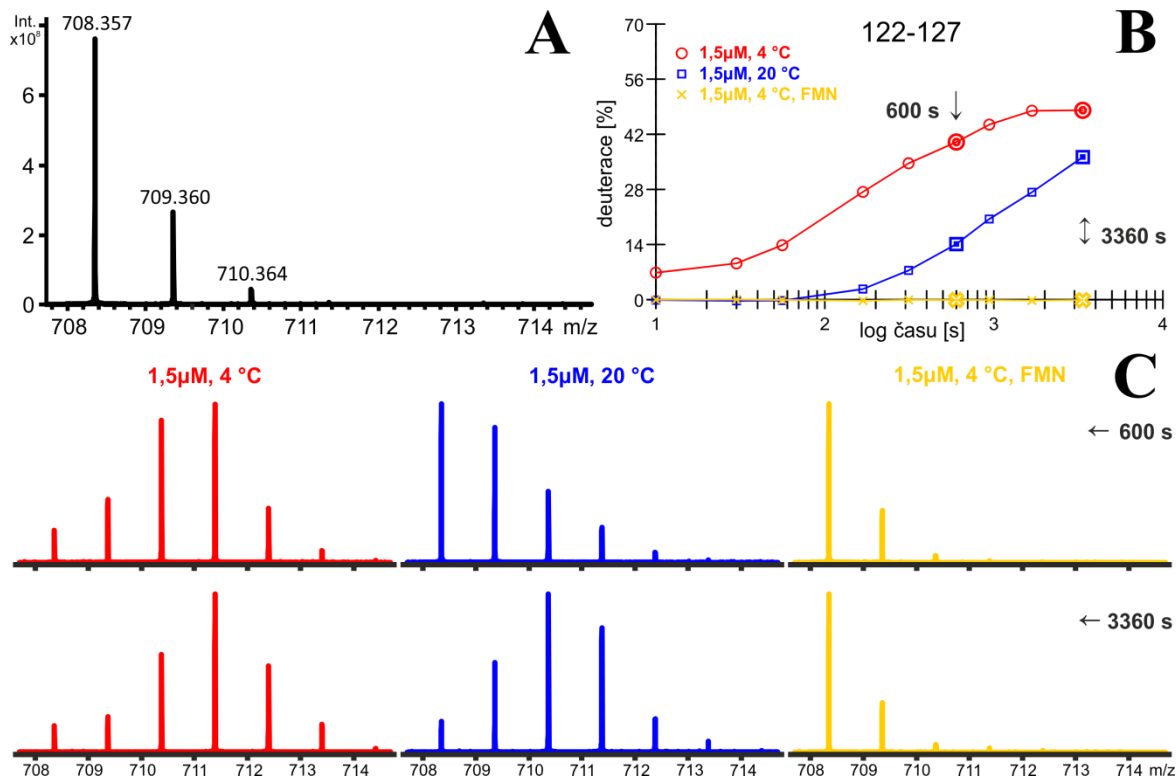


**Obr. 17 – Grafy závislosti procenta deuterace na čase pro vybrané peptidy**

**A** – vliv FMN na deuteraci peptidu 68-79; **B** – vliv rozdílné koncentrace na procentuální deuteraci peptidu 47-64; **C** – vliv všech experimentálních podmínek vyjma teploty na deuteraci peptidu 111-121; **D** – detail peptidu 153-163 včetně hmotnostních spekter

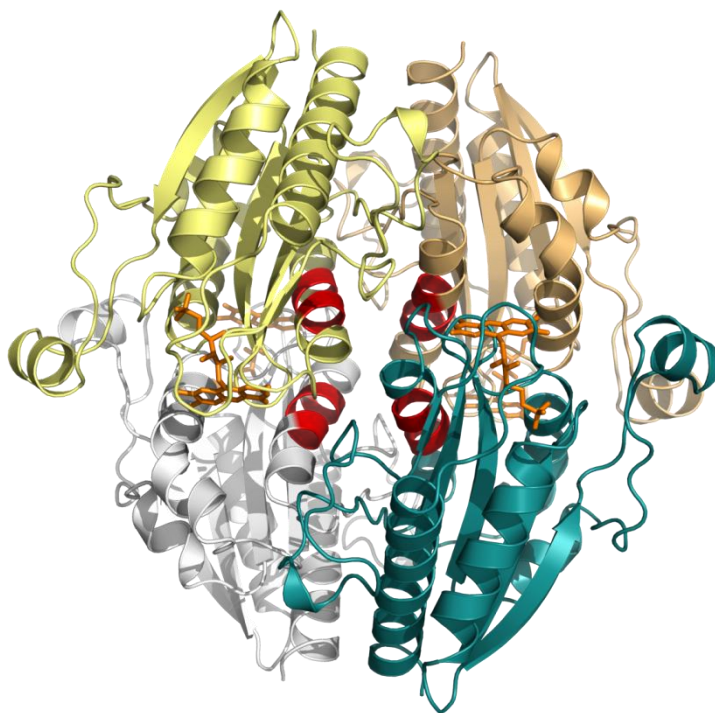
### 6.2.2.2 Vliv kofaktoru FMN

V přítomnosti FMN je multimerizační rovnováha posunuta ve prospěch tetrameru, což je dobře patrné na výměně peptidu 122-127 (Obr. 18 str. 51). Červené křivky a spektra v částech B a C reprezentují data získaná v podmínkách 1,5 $\mu$ M protein při 4 $^{\circ}$ C bez kofaktoru (v rovnováze dimer), modrá barva reprezentuje podmínky 1,5 $\mu$ M protein při 20 $^{\circ}$ C bez FMN (tetramer) a žlutá barva reprezentuje přítomnost FMN, kdy je protein vždy v tetramerní formě. Zatímco v podmínkách bez kofaktoru je peptid vystaven rozpouštědлу a vodíky vyměňuje, v přítomnosti kofaktoru k výměně téměř nedochází. FMN tedy tetramer silně stabilizuje a v přítomnosti kofaktoru se protein ve formě dimeru vůbec nevyskytuje. V podmínkách bez kofaktoru a vyšší teploty (modrá barva) se protein v roztoku taktéž vyskytuje ve formě tetrameru. V tomto případě se však jedná o rychlou dynamickou rovnováhu a tím je umožněna částečná deuterace peptidu 122-127. Pozice peptidu 122-127 v trojrozměrné struktuře tetrameru proteinu WrbA je zvýrazněna červenou barvou v krystalové struktuře na Obr. 19 str. 51



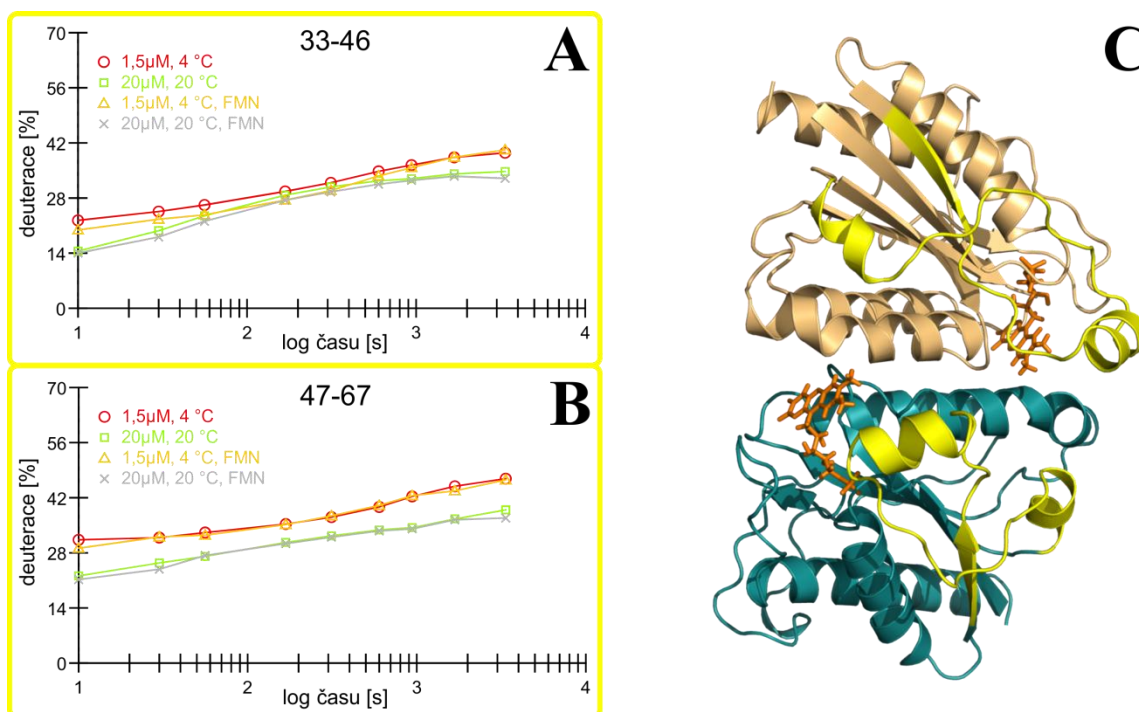
**Obr. 18 – Hmotnostní spektra a závislost procenta deuterace na čase peptidu 122-127**

**A** – MS spektrum nedeuterovaného peptidu; **B** – graf závislosti procenta deuterace na čase výměny vybraných podmínek; **C** – MS spektra peptidu odpovídající zvýrazněným bodům v grafu B ve vybraných časech 600 a 3600 s; časové údaje jsou přepočítány na teplotu reakce 20 °C.



**Obr. 19 – Lokalizace peptidu 122-127 (červeně) v rámci tetrameru struktury 3ZHO**

Z dosažených výsledků lze usuzovat, že vazba FMN má významný stabilizační efekt z hlediska celkové tetramerní struktury, avšak existují i regiony sekvence na jejichž dynamiku nemá přítomnost FMN vliv. Toto je patrné zejména v oblasti helixu  $\alpha_6$  a nestruturované části v jeho blízkém okolí, oblasti unikátní pro proteiny rodiny WrbA. Konkrétně je tato oblast pokryta peptidy 34-46 a 47-67, jejichž deuteraci znázorňují grafy A a B na Obr. 20. Vzhledem k totožné hodnotě deuterace holoproteinu i apoproteinu v příslušných podmínkách je zřejmé, že tato oblast sekvence s kofaktorem FMN neinteraguje a tím pádem nesnižuje přístupnost rozpouštědla. Zejména z grafu B deuterace peptidu 47-67 je patrné, že přístupnost rozpouštědla se liší pouze v závislosti na teplotě reakce. Vliv koncentrace se na této oblasti sekvence taktéž neprojevuje. Se snižující se teplotou se region sekvence 33-67 stává více flexibilním a umožňuje výměnu více amidických vodíků.

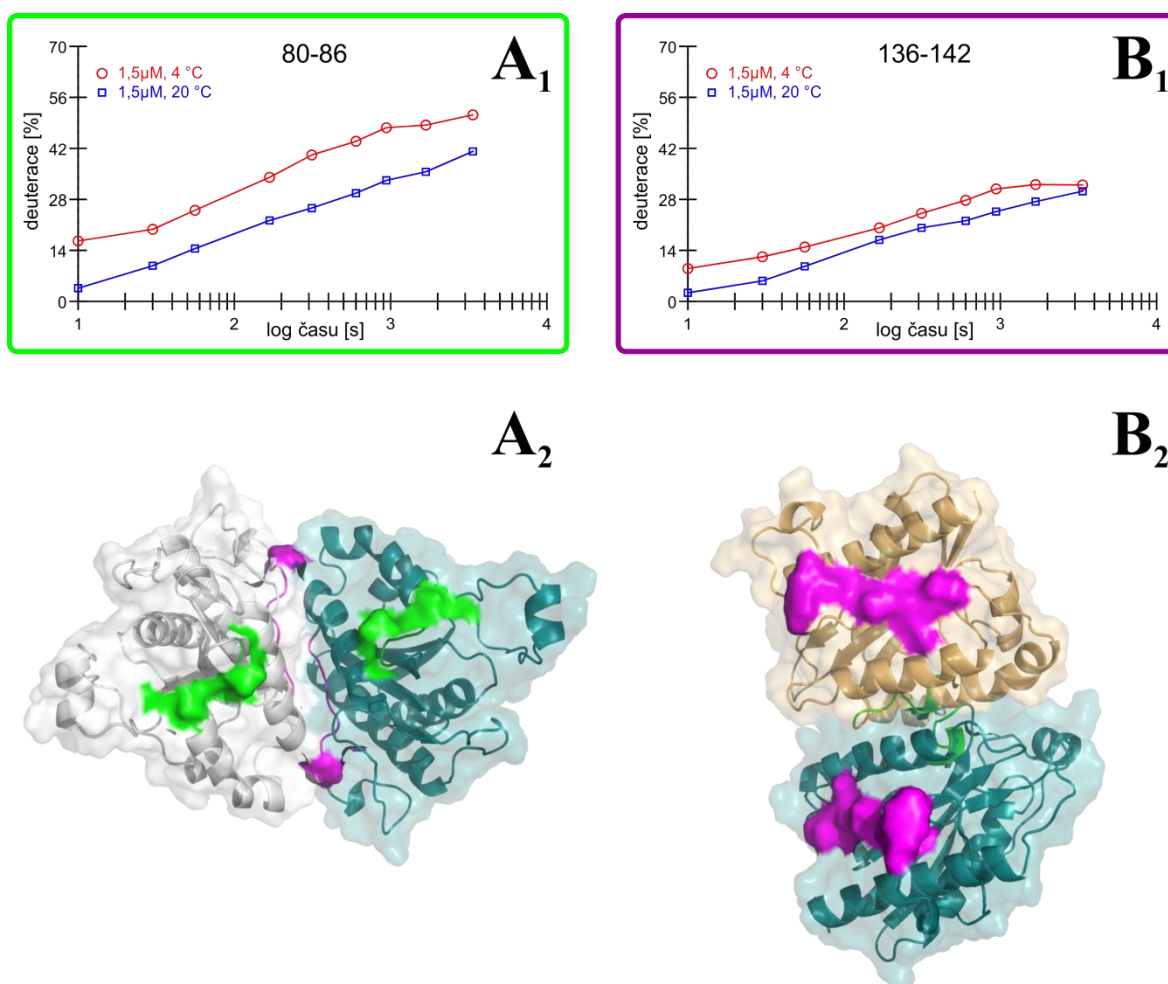


**Obr. 20 – Vliv kofaktoru FMN na oblast helixu  $\alpha_6$  a jeho okolí**

**A, B** – grafy závislosti procenta deuterace na čase peptidů 33-46 a 47-67. Zobrazeny jsou vybrané podmínky zachycující jak apoprotein v dimeru (červená křivka) i tetrameru (zelená křivka), tak holoprotein (vždy tetramer) ve stejných koncentračních a teplotních podmínkách. **C** – žlutě zvýrazněná oblast sekvence 33-67 v krystalové struktuře 3ZHO

### 6.2.2.3 Určení multimerizačních rozhraní

Díky existenci trojrozměrné krystalové struktury proteinu WrbA byly vybrány oblasti sekvence, nacházející se výlučně na jednom z možných dimerizačních rozhraní. Tyto oblasti byly porovnány s mapou peptidů identifikovaných MS/MS analýzou. Jako vhodné pro určení dimerizačního rozhraní byly shledány peptidy 80-86 a 136-142. Grafy závislosti procenta deuterace na čase obou těchto peptidů a jejich pozice v rámci trojrozměrné krystalové struktury jsou na Obr. 21. Peptid 80-86, jehož deuteraci v čase popisuje graf  $A_1$ , je zeleně vyznačen v části  $A_2$ . Peptid 80-86 je vystaven rozpouštědлу v případě dimerizace přes velké (fialové) rozhraní. Druhým, stejně dlouhým nalezeným peptidem je sekvence 136-142, jehož graf a pozice ve struktuře je v části B. Tento peptid je přístupný rozpouštědлу v případě dimerizace přes malé (zelené) rozhraní.



Obr. 21 - Dvě možná dimerizační rozhraní proteinu WrbA

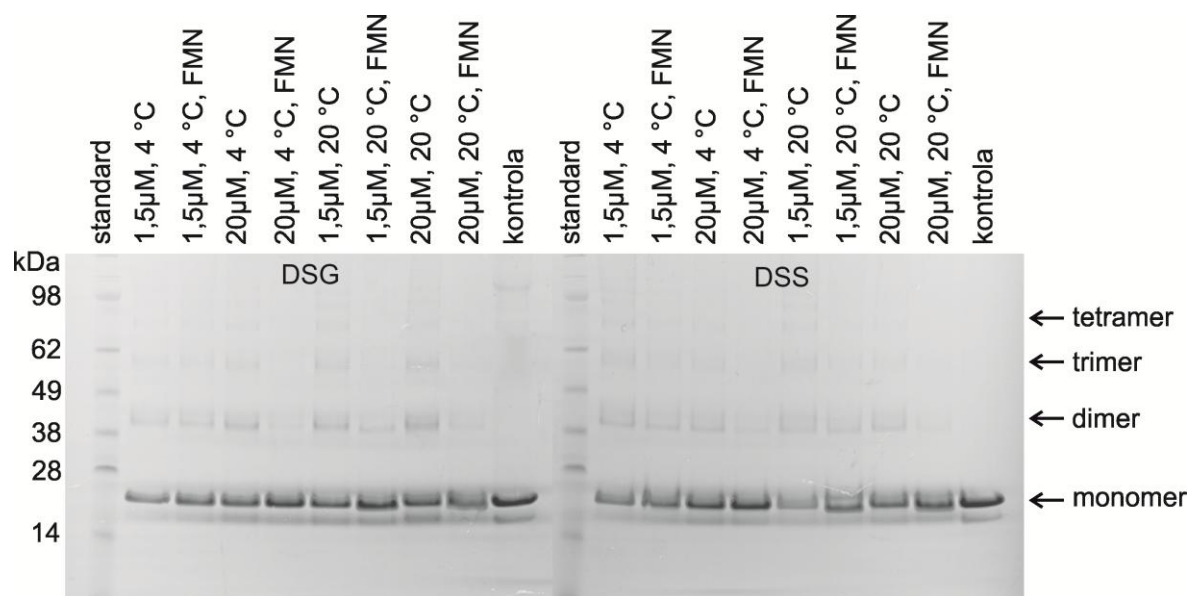
**A** – dimer vznikající přes velké (fialové rozhraní); **B** – dimer přes malé (zelené) rozhraní;  
**A<sub>1</sub>**, **B<sub>1</sub>** – závislost deuterace na čase dimeru (červená křivka) a tetrameru (modrá);  
**A<sub>2</sub>**, **B<sub>2</sub>** – peptidy 80-86 a 136-142 zvýrazněné v krystalové struktuře 3ZHO.

Křivky grafů A<sub>1</sub> a B<sub>1</sub> na Obr. 21 str. 53 reprezentují podmínky 1,5μM proteinu při různých teplotách. Červená křivka odpovídá teplotě 4°C (při nízké koncentraci dimer) a modrá 20 °C (tetramer). Míra deuterace peptidu 136-142 v podmínkách dimeru je téměř totožná s deuterací v podmínkách tetrameru. Naproti tomu deuterace peptidu 80-86 v podmínkách dimeru se oproti tetramerním podmínkám razantně zvyšuje. Z porovnání obou grafů je tedy zřejmé, že v podmínkách výskytu dimeru je peptid 80-86 více přístupný rozpouštědлу než peptid 136-142, a tedy že dimer v roztoku vzniká přes velké (fialové) rozhraní, zatímco malé (zelené) je vystaveno rozpouštědлу.

## 6.3 Chemické síťování

### 6.3.1 Elektroforetická separace produktů síťovací reakce

Čistota proteinu a charakterizace produktů síťovacích reakcí byla ověřena elektroforetickou separací v polyakrylamidovém gelu (Obr. 22). Chemicky zesítěný monomer proteinu disponuje zvýšenou elektroforetickou mobilitou v gelu, což dokládají proužky ve větších vzdálenostech od startu elektroforézy v porovnání s kontrolními vzorky. Současně jsou patrné i pruhy v oblastech dimeru a vyšších multimerů, zejména v podmínkách vysoké teploty a vysoké koncentrace, kdy je protein v roztoku ve formě tetrameru. V kontrolních vzorcích bez chemického činidla nebyly viditelné žádné multimerní stavy. V přítomnosti kofaktoru FMN je zřejmý pokles intenzity pruhů multimerních stavů u obou činidel a při všech koncentracích i teplotách.



**Obr. 22 – Produkty síťovací reakce vizualizované v polyakrylamidovém gelu**  
**kontrola** – protein (množství shodné s ostatními drahami) bez chemického činidla

### 6.3.2 Produkty síťovací reakce identifikované programem Links

Produkty síťovacích reakcí štěpené v roztoku byly separovány pomocí kapalinové chromatografie a analyzovány hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením analyzátoru. Hmotnostní spektra byla editována programem Data Analysis 4.1. Naměřené experimentální hodnoty byly porovnávány s knihovnou teoretických zesíťení, generovanou na základě sekvence proteinu a použité proteasy programem Links. Pokud odchylka teoretické a experimentální hmoty byla nižší než 3 ppm, došlo k pozitivnímu přiřazení sekvence k experimentálním signálům. Všechna teoreticky přiřazená zesíťení byla následně vyhledána v hmotnostních spektrech a ručně validována. Nalezená zesíťení v jednotlivých podmínkách jsou shrnuta v Tab. 8.

**Tab. 8 - Identifikovaná spojení činnidly DSG a DSS v jednotlivých podmínkách**

Spojené aminokyseliny	1,5 $\mu$ M, 4 $^{\circ}$ C		1,5 $\mu$ M, 20 $^{\circ}$ C		20 $\mu$ M, 4 $^{\circ}$ C		20 $\mu$ M, 20 $^{\circ}$ C	
	DSG	DSS	DSG	DSS	DSG	DSS	DSG	DSS
N-terminus – K 2	x	x	x	x	x	x	x	x
N-terminus – K 27	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>N-terminus – K 49</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>
<b>N-terminus – K 53</b>						<b>x</b>		<b>x</b>
K 27 – K 36	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>K 49 – K 49</b>					<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>	<b>x</b>
K 49 – K 53			x		x		x	

Pozn.: pozitivní výskyt je vyznačen křížkem

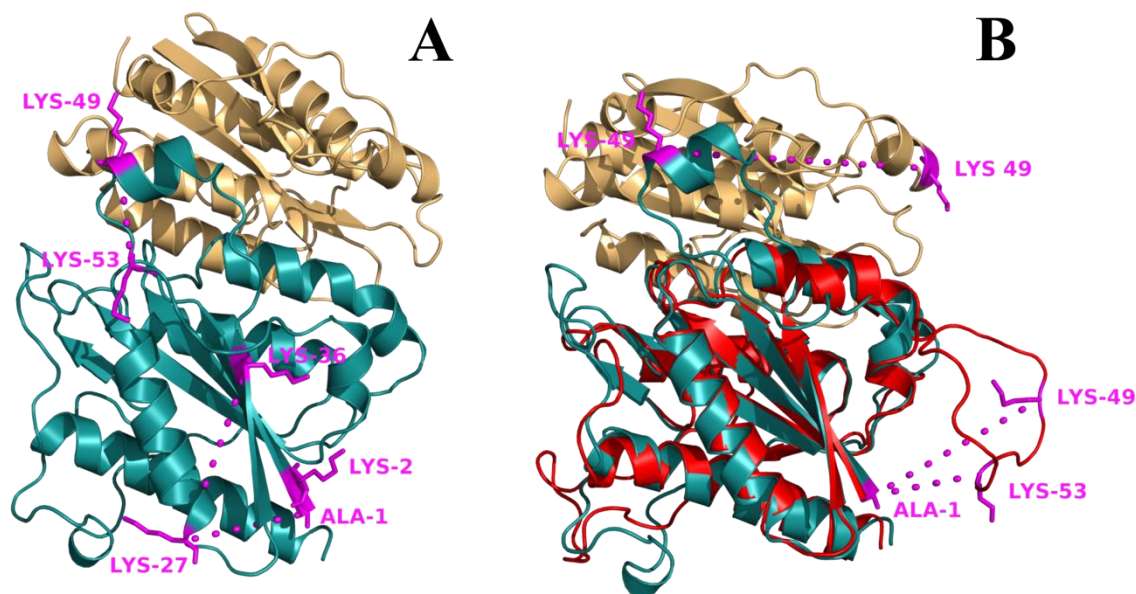
Nezvýrazněná zesíťení jsou dobře interpretovatelná v modelu krystalové struktury proteinu WrbA. Jedná se o zesíťení lysinů ve vzdálenostech odpovídajícím použitým činnidly v oblastech proteinu s definovanou sekundární strukturou (Obr. 23 A str. 57).

Tučně zvýrazněná zesíťení se týkají lysinů 49, respektive 53. Tyto lysiny se nachází v oblasti sekvence unikátní pro proteiny rodiny WrbA, která není z velké části nijak strukturovaná. V případě zesíťení lysin 49 – lysin 49 se jedná o jediné identifikované intermolekulární spojení dvou monomerních jednotek (Obr. 23 B str. 57). Flexibilita této oblasti byla popsána výše v souvislosti s vodík-deuteriovou výměnou (Obr. 20 str. 52).

Flexibilitu tohoto regionu potvrzuje i zesíťení N-terminálního aminu a lysinu 49 nebo lysinu 53 v rámci jedné podjednotky. Vznik těchto spojení v rámci jedné podjednotky byl ověřen extrakcí peptidů z monomerního pruhu z polyakrylamidového gelu, kde bylo toto



zesíťení taktěž nalezeno. V krystalové struktuře není možné spojení N-konce s lysinem 49 nebo lysinem 53 vizualizovat. V databázi ModBase byl nalezen homologní model proteinu WrbA<sup>75</sup>, na kterém je možné tato zesíťení interpretovat (Obr. 23).



**Obr. 23 – Vizualizace zesíťení čínidly DSG a DSS v trojrozměrné struktuře**

**A** – zesíťení v rámci jedné (modré) monomerní jednotky; lysiny a zesíťení vyznačeny fialově struktura 3ZHO; **B** – Zesíťení dvou monomerních (modré a oranžové) jednotek mezi identickými lysiny 49 a zesíťení N-konce a lysiny 49 a 53 v rámci jedné monomerní jednotky dokazuje výraznou flexibilitu této oblasti sekvence. Modrá a oranžová monomerní jednotka pochází z krystalové struktury 3ZHO, červená z homologního modelu v databázi ModBase.

## 7. Diskuze

Proteiny rodiny WrbA se zdají být funkčním<sup>16</sup> i strukturním<sup>19</sup> evolučním mezistupněm mezi krátkými flavodoxiny z nižších organismů a NADH:chinon oxidoreduktasami z organismů vyšších. Protein WrbA z *E. coli* je nejvíce prozkoumaným zástupcem této rodiny. Protože dochází při vystavení produkčních buněk stresovým faktorům k nadprodukci proteinu WrbA, uvažuje se, že tyto proteiny mají svou fyziologickou funkci spojenou s obranou buněk před oxidačním stresem<sup>14</sup>. Mechanismus takovéto obrany však dosud nebyl objasněn.

Protein WrbA z *E. coli* se ve vodných roztocích při  $\mu\text{M}$  koncentracích nevyskytuje jako monomerní jednotka, nýbrž v rovnovážném stavu rychle přechází mezi dimerní a tetramerní formou<sup>3</sup>. Přestože pro protein WrbA existují trojrozměrné strukturní modely získané rentgenovou krystalografií, z principu těchto metod nebylo možné získat strukturní data při takto nízkých koncentracích. Na základě analytické ultracentrifugace provedené Dr. Vaňkem (kapitola 2.1.3.1, str. 13) byly určeny podmínky pro charakterizaci dynamického chování a konformačních změn proteinu s využitím technik hmotnostní spektrometrie. Protein WrbA byl naší laboratoří poskytnut Mgr. Olgou Ettrichovou. Identita a homogenita vzorku byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie měřením intaktního proteinu v denaturujících podmínkách v přítomnosti kyseliny mravenčí a methanolu. Z měření denaturovaného proteinu byla určena monoizotopická hmota, která odpovídala 197 aminokyselinové sekvenci bez iniciačního methioninu. Tato informace byla následně důležitá především pro vyhodnocení hmotnostně spektrometrických dat. (Obr. 15, str. 47).

Dynamika proteinu a s ní související konformační změny byly sledovány pomocí dvou technik kombinovaných s analýzou hmotnostním spektrometrem. První metodou byla vodík-deuteriová výměna. Samotné analýze produktů vodík-deuteriové výměny předcházela optimalizace štěpení proteinu WrbA. Štěpení bylo provedeno na kolonách s imobilizovanými proteasami pepsinem, rhizopuspepsinem a nepenthesinem. Využito bylo i sériového zapojení dvou kolon s různými proteasami, konkrétně pepsinové kolony následované kolonou s rhizopuspepsinem nebo nepenthesinem. Postupné štěpení dvěma proteasami se ukázalo jako nejvíce výhodné. Přestože všechny proteasy (vyjma samotného pepsinu) pokrývají svými štěpy kompletní aminokyselinovou sekvenci, pro zlepšení aminokyselinového rozlišení H-D výměny je požadována co nejvyšší variabilita

vznikajících peptidů. Z tohoto pohledu bylo nejlepších výsledků dosaženo pomocí kombinace proteas pepsin a rhizopuspepsin.

Vzhledem k rozdílným koncentracím proteinu (1,5 $\mu$ M a 20 $\mu$ M) ve výchozích experimentálních podmínkách a k nutnosti analyzovat vždy shodné množství proteinu bylo nutné zastavovat výměnu různými zhášecími pufrů. Pro vyrovnání množství solí v zastavených reakcích byly vzorky s 20 $\mu$ M proteinem zhášeny 1M glycinovým pufrům s přidávkem solí a s vyšším pH. Rozdíl pH zhášecích pufrů byl určen experimentálně. Shodné pH ve všech zastavených vzorcích je důležité kvůli eventuální zpětné výměně deuteria za vodík v průběhu štěpení a chromatografie. Obsah FMN vyrovnáván nebyl.

Výsledky H-D výměny ve vzorcích obsahujících FMN se velmi dobře shodují s krystalovou strukturou holoproteinu WrbA<sup>17</sup>. Potvrzen byl již dříve popsán silný stabilizační vliv na celkovou tetramerní strukturu<sup>3</sup>. Rovněž byly nalezeny lokální oblasti sekvence, pro které je z hlediska H-D výměny přítomnost FMN irelevantní. Zejména oblast helixu  $\alpha 6$  se vyznačuje i v přítomnosti FMN zvýšenou flexibilitou. S tímto tvrzením korespondují i teplotní B-faktory atomů této oblasti, zanesené v trojrozměrné krystalové struktuře. Další takovou oblastí jsou smyčky, pro které kvůli jejich vysoké flexibilitě nebylo v krystalu možné přesně určit distribuci elektronových hustot.

Jednou z takto flexibilních oblastí je i okolí peptidu 153-163, jehož chování v průběhu vodík-deuteriové výměny je popsáno částí D na Obr. 17, str. 50. V hmotnostních spektrech jsou dobře patrné dvě překrývající se izotopové obálky jednoho peptidu. Výskyt tohoto jevu dokládá, že se protein WrbA vyskytuje za určitých podmínek současně v různých konformačních stavech. V podmínkách výskytu pouze dimerní formy (1,5 $\mu$ M protein, 4°C) je tento peptid výrazně deuterován již v první frakci. Ve stejné frakci odebrané z reakce probíhající při vyšší teplotě jsou již patrné dva oddělené stavy peptidu, jak nedeuterovaný, tak deuterovaný. Je velmi pravděpodobné, že přítomnost dvou odlišných konformací je způsobena dynamickou rovnováhou vzniku a rozpadu tetrameru. V reakcích obsahující vyšší koncentraci proteinu lze pozorovat stejný efekt, avšak výsledná procentuální deuterace je v porovnání s frakcemi 1,5 $\mu$ M proteinu nižší. Z tohoto lze usuzovat, že rozdíl koncentrací v námi provedených experimentech má vyšší stabilizační efekt na tetramerní formu proteinu, než jaký způsobuje rozdíl sledovaných teplot.

Výskyt dvou různě deuterovaných populací proteinu v roztoku obsahujícího tetramerní formu proteinu může být ovšem způsoben pouze lokálními změnami konformace zmíněné části řetězce. V *in silico* simulaci využívající molekulární dynamiku byly nalezeny regiony (částečně se překrývající s peptidem 153-163), jejichž aminokyselinové sekvence

umožňují zvýšenou fluktuaci kolem rovnovážné polohy<sup>18</sup>. Ve zbývajících oblastech sekvence je simulovaná fluktuace aminokyselinových zbytků pro všechny podjednotky téměř totožná, ovšem v regionech se zvýšenou flexibilitou jsou vypočítané hodnoty fluktuací pro jednotlivé podjednotky rozdílné. Rozdílné dynamické chování částí monomerních jednotek, vázaných v jednom tetrameru, by taktéž mohlo vysvětlovat výskyt různě deuterovaných stavů jednoho peptidu. Tato výpočetní studie ovšem nebyla dosud experimentálně ověřena.

Dále byly nalezeny úseky, ve kterých se míra deuterace lišila pouze vlivem koncentrace proteinu, nebo rozdílné teploty. Jedním z peptidů, jehož deuterace v apoproteinu byla silně ovlivněna změnou teploty, byl peptid 80-86. Tento peptid se nachází na malém dimerizačním rozhraní<sup>18</sup>. Na druhém, velkém dimerizačním rozhraní byl nalezen stejně dlouhý peptid, ovšem jeho deuterace nebyla změnou teploty téměř ovlivněna. Porovnání procent deuterace těchto dvou peptidů (Obr. 21, str. 53) a dat získaných analytickou ultracentrifugací (Obr. 3, str. 13) umožnilo určit rozhraní vzniku dimeru. Dimerní forma vzniká v apoproteinu interakcí dvou monomerních jednotek přes velké rozhraní, tetramer následně vzniká jako dimer dimerů přes rozhraní malé.

Druhou metodou studia struktury proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie využitou v této práci bylo chemické síťování. K síťovacím reakcím byla použita standardně používaná NHS činidla DSG a DSS s délkou spojovacích ramének vhodnou k síťování primárních aminů ve vzdálenosti kolem 10 Å. Použitý dvacetinásobný molární nadbytek byl použit vzhledem velikosti proteinu a počtu lysinů v aminokyselinové sekvenci, které jsou hlavními cílovými postraními řetězci při síťování NHS činidly. Vyšší nadbytky činidel není výhodné používat především kvůli vzniku nadměrného množství produktů reakce. Vícenásobně modifikovaný protein činidly síťujícími lysinová residua není možné účinně štěpit pomocí trypsinu, který specificky hydrolyzuje peptidovou vazbu za bazickými aminokyselinami arginin a lysin. Specifické chemické štěpení peptidové vazby pomocí bromkyanu je v takovém případě taktéž téměř nevyužitelné, neboť vznikající vícenásobně modifikované peptidy lze jen obtížně správně identifikovat, a to ani s využitím fragmentačních hmotnostně spektrometrických analýz. Alternativou by mohlo být síťování karboxylových kyselin pomocí dihydrazidů, této možnosti však nebylo kvůli nucenému snížení pH pro správný průběh reakce využito. Výhodou NHS činidel je jejich vysoká reaktivita při pH okolo hodnoty 7.

Dílčím cílem těchto experimentů bylo nalézt zesíťení dvou monomerních podjednotek na obou multimerizačních rozhraních. Tento dílčí cíl však nebyl zcela splněn, jelikož spojení dvou podjednotek bylo nalezeno pouze na malém rozhraní mezi dvěma lysiny 49. V souladu s výše popsány závěry z vodík-deuteriové výměny bylo toto zesíťení nalezeno pouze v takových vzorcích apoproteinu, které obsahují protein WrbA ve formě tetrameru (Tab. 8, str. 56). Přestože protein tvoří tetramer i v podmínkách nízké koncentrace a teplotě 20 °C, v této skupině vzorků spojení dvou lysinů 49 nalezeno nebylo. Tento fakt může být zapříčiněn příliš nízkou koncentrací činidla ve výchozí reakční směsi, neboť činidlo bylo přidáváno v dvacetinásobném molárním nadbytku nad látkovým množstvím proteinu. Ve vzorcích s 1,5 $\mu$ M proteinem tak výsledná molární koncentrace činidel byla několiknásobně nižší než v případě vzorků s 20 $\mu$ M proteinem, ačkoli látkové množství činidla bylo ve všech vzorcích totožné.

Primární amin na N-konci alaninu v pozici jedna aminokyselinové sekvence je v proteinu WrbA mimořádně reaktivní. Byla nalezena celkem čtyři spojení, na kterých se N-konec podílí. Nejvíce zásadní z hlediska dynamiky molekuly proteinu jsou zesíťení N-konce s lysiny 49 a 53 v rámci jedné podjednotky. Lysiny 49 a 53 se nacházejí v oblasti okolí helixu  $\alpha 6$ . Vysoká flexibilita této oblasti byla diskutována výše. Tato oblast není nijak významně strukturována ani v krystalografickém modelu a z výsledků H-D výměny je patrné, že její flexibilita se s klesající teplotou a snižující se koncentrací zvyšuje. K vizualizaci lysinů 49 a 53 spojených s N-koncovou aminokyselinou nebylo možné použít krystalovou strukturu a proto byl vyhledán homologní model (Obr. 23, str. 57) s totožnou sekvencí, na němž je možné tato spojení demonstrovat.

Z výsledků elektroforetické separace produktů zesíťení v polyakrylamidovém gelu (kapitola 6.3.1 str. 55) je patrné, že při stejných teplotních i koncentračních podmínkách vzniká v porovnání s apoproteinem v přítomnosti kofaktoru FMN méně zesíťených multimerních stavů. To však kontrastuje s výsledky vodík-deuteriové výměny, kdy v přítomnosti FMN přechází protein vždy do formy tetrameru. Důvody snížení množství produktů zesíťení, vznikajících v přítomnosti FMN, mohou být dva. Prvním může být stabilizační efekt FMN na lokální stabilitu proteinového řetězce. Ovšem výsledky vodík-deuteriové výměny tuto možnost v oblastech sekvence s vyskytujícími se lysiny vyvracejí. Druhým a více pravděpodobným důvodem poklesu výtěžku chemické síťovací reakce v přítomnosti FMN se zdá být ovlivnění kinetiky síťovacích činidel molekulami samotného FMN. Tuto domněnku částečně obhajuje i větší počet nalezených částečně zreagovaných činidel, spojených s proteinem pouze jednou reaktivní skupinou.

Zdánlivě ideálním řešením pro popis změny mezi dvěma konformačními stavy proteinu, lišících se přítomností nebo nepřítomností induktoru této změny, je chemické síťování s využitím různě izotopově značených činidel v jednotlivých stavech. (Obr. 9, str. 28). Tento přístup má však jistá striktní omezení. V první řadě je nutné zajistit maximální možnou účinnost proteolytického nebo chemického štěpení, neboť je pro správnou interpretaci získaných dat nutné porovnávat nejkratší možné zesíťené peptidy. Druhým předpokladem je, že přítomnost síťovací reakce probíhá v obou porovnávaných podmínkách se stejnou kinetikou, tj. poskytuje stejné výtěžky. Kvantitativní vyjádření konformačních změn tudíž nemohlo být z výše popsaných důvodů provedeno, ať již pro sledování vlivu FMN, koncentrace nebo teploty.

Ačkoli jsou proteiny rodiny WrbA známy již více než čtvrt století, zůstávají stále objektem zájmu vědců po celém světě. V současnosti jsou proteiny WrbA dobře charakterizovány z hlediska strukturního a biochemického, jejich přesná úloha v organismech však zůstává stále neobjasněna. Další experimenty využívající techniky hmotnostní spektrometrie ke sledování chování proteinu WrbA mohou vést k určení disociační konstanty protein-FMN a dále pak ke sledování stability tetramerní struktury v průběhu oxidoredukčních reakcí katalyzovaných proteinem WrbA.

## 8. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat konformační změny proteinu WrbA pomocí technik spojených s hmotnostní spektrometrií. Dosažené výsledky jsou shrnuty v následujících bodech.

- Experimenty vodík-deuteriové výměny byl popsán vliv FMN, teploty a koncentrace proteinu na formování a stabilitu tetrameru.
- Chemické zesíťení odhalilo změnu konformace helixu  $\alpha_6$ , oblasti typické pro proteiny rodiny WrbA, která se vyznačuje vysokou flexibilitou.
- Výsledky vodík-deuteriové výměny i chemického síťování umožnily určit dimerizační a tetramerizační rozhraní apoproteinu WrbA.

## 9. Reference

1. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, dostupné z <http://www.rcsb.org> (cit. 10.12.2014)
2. Yang, W., Ni, L., Somerville, R. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 5796-800 (1993)
3. Grandori, R., Khalifah, P., Boice, J. A., Fairman, R., Giovanielli, K., Carey, J.: *J. Biol. Chem.* **273**, 20960-6 (1998)
4. Grandori, R., Carey, J.: *Trends Biochem. Sci.* **19**, 72 (1994)
5. Koonin, E. V., Bork, P.: *Trends Biochem. Sci.* **19**, 234-5 (1994)
6. Koonin, E. V., Bork, P., Sander, C.: *EMBO J.* **13**, 493-503 (1994)
7. Grandori, R., Carey, J.: *Protein Sci.* **3**, 2185-93 (1994)
8. Branden, C., Tooze, J.: *Introduction to protein structure*, edice 2. Garland Publishing, New York, (1998)
9. Ludwig, M. L., Patridge, K. A., Metzger, A. L., Dixon, M. M., Eren, M., Feng, Y., Swenson, R. P.: *Biochemistry* **36**, 1259-80 (1997)
10. Gorman, J., Shapiro, L.: *Protein Sci.* **14**, 3004-12 (2005)
11. Andrade, S. L., Patridge, E. V., Ferry, J. G., Einsle, O.: *J. Bacteriol.* **189**, 9101-7 (2007)
12. Benedict, R. C., Fall, L., Gill, S. J., Hedlund, B.: *Biophys. Chem.* **13**, 245-52 (1981)
13. Lacour, S., Landini, P.: *J. Bacteriol.* **186**, 7186-95 (2004)
14. Patridge, E. V., Ferry, J. G.: *J. Bacteriol.* **188**, 3498-506 (2006)
15. Wolfova, J., Grandori, R., Kozma, E., Chatterjee, N., Carey, J., Kuta Smatanova, I.: *J. Cryst. Growth* **284**, 502-505 (2005)
16. Noll, G., Kozma, E., Grandori, R., Carey, J., Schodl, T., Hauska, G., Daub, J.: *Langmuir* **22**, 2378-83 (2006)
17. Kishko, I., Carey, J., Reha, D., Brynda, J., Winkler, R., Harish, B., Guerra, R., Ettrichova, O., Kukacka, Z., Sheryemyetyeva, O., Novak, P., Kutý, M., Kuta Smatanova, I., Ettrich, R., Lapkouski, M.: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**, 1748-57 (2013)
18. Reha, D., Harish, B., Sinha, D., Kukacka, Z., McSally, J., Ettrichova, O., Novak, P., Carey, J., Ettrich, R.: *J Mol Model* **20**, 2400 (2014)
19. Carey, J., Brynda, J., Wolfova, J., Grandori, R., Gustavsson, T., Ettrich, R., Smatanova, I. K.: *Protein Sci.* **16**, 2301-5 (2007)
20. Kosek, D., Rezaczkova, L., Petrvalska, O., Obsilova, V., Obsil, T.: *European Biophysics Journal* **42**, S177-S177 (2013)
21. Heck, A. J.: *Nat. Methods* **5**, 927-33 (2008)
22. Engen, J. R., Smith, D. L.: *Anal. Chem.* **73**, 256A-265A (2001)
23. Rozbesky, D., Man, P., Kavan, D., Chmelik, J., Cerny, J., Bezouska, K., Novak, P.: *Anal. Chem.* **84**, 867-70 (2012)
24. Tanaka, K., Waki, Y., Ido, Y., Yoshida, Y., Akita, S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1988)
25. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **78**, 53-68 (1987)
26. Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., Fenn, J. B.: *Anal. Chem.* **57**, 675-9 (1985)
27. Pauling, L., Corey, R. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **37**, 729-40 (1951)
28. Hvidt, A., Lindestrøm-Lang, K.: *Biochim. Biophys. Acta* **14**, 574-5 (1954)



29. Hvidt, A., Lindestrøm-Lang, K.: *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 168-9 (1955)
30. Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L., Englander, S. W.: *Proteins* **17**, 75-86 (1993)
31. Glasoe, P. K., Long, F. A.: *The Journal of Physical Chemistry* **64**, 188-190 (1960)
32. The Engen Laboratory, dostupné z <http://www.hxms.neu.edu> (cit. 21.2.2014)
33. Katta, V., Chait, B. T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5**, 214-7 (1991)
34. Zhang, Z., Smith, D. L.: *Protein Sci.* **2**, 522-31 (1993)
35. Cravello, L., Lascoux, D., Forest, E.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2387-93 (2003)
36. Brier, S., Maria, G., Carginale, V., Capasso, A., Wu, Y., Taylor, R. M., Borotto, N. B., Capasso, C., Engen, J. R.: *FEBS J.* **274**, 6152-66 (2007)
37. Marcoux, J., Thierry, E., Vives, C., Signor, L., Fieschi, F., Forest, E.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 76-9 (2010)
38. Kadek, A., Mrazek, H., Halada, P., Rey, M., Schriemer, D. C., Man, P.: *Anal. Chem.* **86**, 4287-94 (2014)
39. Wang, L., Pan, H., Smith, D. L.: *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 132-8 (2002)
40. Deng, Y., Zhang, Z., Smith, D. L.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 675-84 (1999)
41. Wales, T. E., Engen, J. R.: *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 158-70 (2006)
42. Davies, G. E., Stark, G. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **66**, 651-6 (1970)
43. Hill, M., Bechet, J.-J., d'Albis, A.: *FEBS Lett.* **102**, 282-286 (1979)
44. Young, M. M., Tang, N., Hempel, J. C., Oshiro, C. M., Taylor, E. W., Kuntz, I. D., Gibson, B. W., Dollinger, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5802-5806 (2000)
45. Muller, D. R., Schindler, P., Towbin, H., Wirth, U., Voshol, H., Hoving, S., Steinmetz, M. O.: *Anal. Chem.* **73**, 1927-34 (2001)
46. Seebacher, J., Mallick, P., Zhang, N., Eddes, J. S., Aebersold, R., Gelb, M. H.: *J. Proteome Res.* **5**, 2270-82 (2006)
47. Kelleher, N. L., Lin, H. Y., Valaskovic, G. A., Aaserud, D. J., Fridriksson, E. K., McLafferty, F. W.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 806-812 (1999)
48. Loo, J. A., Edmonds, C. G., Smith, R. D.: *Science* **248**, 201-4 (1990)
49. Syka, J. E., Coon, J. J., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9528-33 (2004)
50. Novak, P., Young, M. M., Schoeniger, J. S., Kruppa, G. H.: *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* **9**, 623-31 (2003)
51. Novak, P., Haskins, W. E., Ayson, M. J., Jacobsen, R. B., Schoeniger, J. S., Leavell, M. D., Young, M. M., Kruppa, G. H.: *Anal. Chem.* **77**, 5101-6 (2005)
52. Suchanek, M., Radzikowska, A., Thiele, C.: *Nat. Methods* **2**, 261-7 (2005)
53. Hermanson, G. T.: *Bioconjugate Techniques*, edice Elsevier Science, (2013)
54. Leavell, M. D., Novak, P., Behrens, C. R., Schoeniger, J. S., Kruppa, G. H.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 1604-11 (2004)
55. Green, N. S., Reisler, E., Houk, K. N.: *Protein Sci.* **10**, 1293-1304 (2001)
56. Novak, P., Kruppa, G. H.: *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* **14**, 355-65 (2008)
57. Lossel, P., Kolbel, K., Tanzler, D., Nannemann, D., Ihling, C. H., Keller, M. V., Schneider, M., Zaucke, F., Meiler, J., Sinz, A.: *PLoS One* **9**, e112886 (2014)
58. Leitner, A., Joachimiak, L. A., Unverdorben, P., Walzthoeni, T., Frydman, J., Forster, F., Aebersold, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9455-60 (2014)
59. Crippen, G. M.: *J. Comput. Phys.* **24**, 96-107 (1977)
60. Havel, T. F., Kuntz, I. D., Crippen, G. M.: *J. Theor. Biol.* **104**, 359-81 (1983)
61. Kuntz, I. D., Thomason, J. F., Oshiro, C. M.: *Methods Enzymol.* **177**, 159-204 (1989)
62. Sali, A., Blundell, T. L.: *J. Mol. Biol.* **234**, 779-815 (1993)
63. Aszodi, A., Taylor, W. R.: *Fold Des* **1**, 325-34 (1996)

64. Sali, A., Shakhnovich, E., Karplus, M.: *Nature* 369, 248-251 (1994)
65. Aszodi, A., Munro, R. E., Taylor, W. R.: *Proteins Suppl* 1, 38-42 (1997)
66. Fiser, A., Sali, A.: MODELLER: Generation and refinement of homology-based protein structure models, v knize *Macromolecular Crystallography*, (Carter, C. W., Sweet, R. M. ed.) Academic Press, San Diego, Vol. 374, str. 461-491 (2003)
67. Sali, A., Potterton, L., Yuan, F., van Vlijmen, H., Karplus, M.: *Proteins* 23, 318-26 (1995)
68. Sinz, A.: *J. Mass Spectrom.* 38, 1225-1237 (2003)
69. Rappsilber, J., Siniosoglou, S., Hurt, E. C., Mann, M.: *Anal. Chem.* 72, 267-75 (2000)
70. Fioramonte, M., dos Santos, A. M., McIlwain, S., Noble, W. S., Franchini, K. G., Gozzo, F. C.: *Proteomics* 12, 2746-2752 (2012)
71. Back, J. W., de Jong, L., Muijsers, A. O., de Koster, C. G.: *J. Mol. Biol.* 331, 303-13 (2003)
72. Dihazi, G. H., Sinz, A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 2005-14 (2003)
73. Strohm, M., Hassman, M., Kosata, B., Kodicek, M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 905-908 (2008)
74. Kavan, D., Man, P.: *Int. J. Mass Spectrom.* 302, 53-58 (2011)
75. University of California: ModBase-Database of Comparative Protein Structure Models, dostupné z <http://modbase.compbio.ucsf.edu>, [goo.gl/FYtv1R](http://goo.gl/FYtv1R)

