

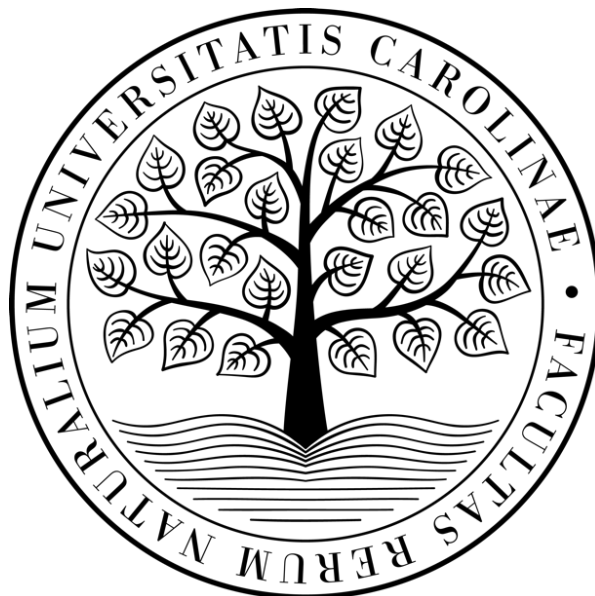
UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Lada Dlabolová

**Využití chemického sítění pro studium organizace
intermediálních filament**

Utilization of chemical cross-linking for studying intermediate
filaments organization

Bakalářská práce

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

Konzultant: Mgr. Jan Fiala

Praha 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis

Abstrakt

Intermediální filamenta jsou složky cytoskeletu tvořené velkou rodinou vláknitých proteinů specificky exprimovaných prakticky ve všech diferenciováných buňkách. Za fyziologických podmínek se samovolně skládají do vláken v procesu, který zahrnuje několik fází organizace podjednotek. Tato vlákna poskytují buňkám elastické vlastnosti, čímž umožňují udržovat jejich strukturní a mechanickou integritu. Zatímco struktura ostatních cytoskeletálních složek je v dnešní době již dobře prozkoumána, podrobné informace o struktuře intermediálních filament v různých fázích skládání stále nejsou k dispozici. Nové poznatky o struktuře těchto proteinů by přitom mohly mít velký přínos pro pochopení mnoha patologických mechanismů souvisejících se změnami jejich exprese v buňkách.

Tato práce se zabývá studiem interakcí dimerních podjednotek v tetramerním vimentinu, proteinu III. třídy intermediálních filament. Chemickým sítěním směsi izotopově značeného a neznačeného tetramerního vimentinu, následným proteolytickým štěpením a analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie byly identifikovány produkty interdimerního, intradimerního a intrapeptidového sítění. Kvantifikací byly získány informace o interdimerních a intradimerních vzdálenostních omezeních, které umožňují charakterizaci detailnější tetramerní struktury vimentinu.

Klíčová slova: intermediální filamenta, cytoskelet, chemické sítění, hmotnostní spektrometrie

Abstract

Intermediate filaments are cytoskeleton components formed by a large family of fibrous proteins specifically expressed in nearly all differentiated cells. Under physiological conditions, they spontaneously assemble into fibers in a process that involves several stages in the organization of subunits. These fibers provide elastic properties to the cells, allowing them to maintain their structural and mechanical integrity. While the structure of other cytoskeletal components is now well researched, detailed information on the structure of intermediate filaments at various stages of assembly is still not available. Thus, new insights into the structure of these proteins could be of great benefit in understanding of various pathological mechanisms associated with changes in their expression in cells.

This thesis studies interactions of dimeric subunits in the tetrameric assembly of vimentin, class III protein of intermediate filaments. By chemical cross-linking of isotopically labeled and unlabeled tetrameric vimentin mixture, followed by proteolytic cleavage and mass spectrometry analysis, interdimeric, intradimeric and intrapeptide cross-linking products were identified. Quantification yielded information on interdimeric and intradimeric distance constraints, which allow the characterization of a more detailed tetrameric vimentin structure.

Key words: intermediate filaments, cytoskeleton, chemical cross-linking, mass spectrometry

[IN CZECH]

Poděkování

Na tomto místě bych ráda upřímně poděkovala mému školiteli RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. za vedení této práce, za jeho ochotu, vstřícnost a všechnu čas, který mi věnoval. Také bych chtěla velmi poděkovat Mgr. Janu Fialovi, mému konzultantovi, za jeho trpělivost a milý přístup, všechnu pomoc, rady a veškerý věnovaný čas. Velký dík patří i celému kolektivu Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace za přátelské přijetí a příjemnou atmosféru.

V neposlední řadě bych chtěla věnovat poděkování mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 TEORETICKÝ ÚVOD.....	10
1.1 Cytoskelet	10
1.1.1 Složky cytoskeletu	10
1.1.2 Intermediální filamenta	11
1.1.2.1 Rozdělení a výskyt	11
1.1.2.2 Struktura a funkce	14
1.1.2.3 Patologie související s intermediálními filamenti	19
1.1.3 Vimentin.....	20
1.2 Strukturní charakterizace intermediálních filament.....	23
1.2.1 Vodík-deuteriová výměna.....	24
1.2.2 Chemické síťení.....	24
2 CÍLE PRÁCE.....	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Použité chemikálie	27
3.2 Biologický materiál.....	27
3.3 Roztoky	28
3.4 Použité přístroje a materiál	29
3.5 Software	29
3.6 Metody	30
3.6.1 Exprese a purifikace vimentinu.....	30
3.6.2 Dialýza a sestavení tetramerního vimentinu	30
3.6.2.1 Příprava dimerního vimentinu.....	30
3.6.2.2 Stanovení koncentrace proteinu	30
3.6.2.3 Analýza vzorků pro přípravu směsi vimentinu $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$	30
3.6.2.4 Příprava izotopově značeného tetramerního vimentinu	31
3.6.3 Chemické síťení tetramerů vimentinu	32
3.6.5 Příprava vzorku pro LC-MS analýzu	32
3.6.6 LC-MS analýza produktů síťovací reakce	33
3.6.7 Vyhodnocení dat	33
4 VÝSLEDKY	35
4.1 Příprava tetramerního vimentinu $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ pro chemické síťení.....	35

4.2 Elektroforetická separace produktů chemického síťení	36
4.3 Identifikované produkty chemického síťení a příslušná hmotnostní spektra	37
4.4 Kvantifikace interdimerního a intradimerního síťení	40
5 DISKUZE	42
6 ZÁVĚR	44
Literatura.....	45

Seznam zkratek

AIDS	syndrom získané imunodeficiencie (z angl. Acquired Immunodeficiency Syndrome)
ALS	amyotrofická laterální skleróza
ATP	adenosintrifosfát
CAA	chloracetamid
DMSO	dimethyl sulfoxid
DSS	disukcinimidyl suberát
DTT	1,4-dithiothreitol
EBS	forma kožního onemocnění (z angl. Epidermolysis Bullosa Simplex)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EMT	epiteliální mezenchymální přechod (z angl. Epithelial-Mesenchymal Transition)
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (z angl. Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance)
GFAP	gliální fibrilární protein (z angl. Glial Fibrillary Acidic Protein)
GTP	guanosintrifosfát
HDX	vodík-deuteriová výměna (z angl. Hydrogen-Deuterium Exchange)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High Performance Liquid Chromatography)
IFAP	proteiny asociované s intermediálními filamenty (z angl. Intermediate Filament-Associated Proteins)
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (z angl. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LDS	dodecylsíran lithný
LINC	linker nukleoskeletu a cytoskeletu (z angl. Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton)
MAC	methylamin hydrochlorid
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (z angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
MOPS	3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfonová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry)

MWCO	mezní molekulová hmotnost (z angl. Molecular Weight Cut-off)
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti ku náboji
SAXS	metoda maloúhlového rozptylu rentgenového záření (z angl. Small-Angle X-ray Scattering)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (z angl. Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electroforesis)
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ULFs	podjednotky tvořící filamentum (z angl. Unit-Lenght Filaments)

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Cytoskelet

Cytoskelet tvoří integrovanou síť polymerních proteinů, nacházející se v cytosolu eukaryotických buněk. Hraje významnou roli v mnoha buněčných funkcích. Poskytuje buňce vnitřní oporu a pomáhá udržovat její tvar. Zajišťuje pohyb celé buňky, transport organel a molekul uvnitř buňky, komunikaci s jádrem. Podílí se na signalizaci, udržování homeostázy či dělení buněk. Je to vysoce strukturovaný dynamický systém, který je neustále reorganizován v reakcích na vnější a vnitřní podněty v procesech buněčného dělení, migrace, specifických uspořádáních organel a intracelulárního transportu [1,2].

1.1.1 Složky cytoskeletu

Cytoskeletální síť se skládá ze tří typů filament, a to z mikrofilament, intermediálních filament a mikrotubulů, které se navzájem liší svými charakteristickými vlastnostmi a dynamikou. Vzájemné interakce těchto jednotlivých komponent poskytují cytoskeletu jako celku flexibilitu a umožňují jeho neustálé přeskupování, aby bylo vyhověno potřebám buňky za různých podmínek. Mikrofilamenta jsou tenká vlákna tvořená z aktinu, mikrotubuly jsou silnější dutá vlákna skládající se z heterodimerů α,β -tubulinu. Intermediální filamenta, jejichž název byl odvozen od skutečnosti, že průměr těchto filament (~ 10 nm) se rozměrově nachází mezi aktinovými mikrofilamenty (~ 6 nm) a mikrotubuly (~ 23 nm), jsou tvořena různými vláknitými proteiny [3]. Svými vlastnostmi se v mnoha aspektech významně liší od mikrofilament a mikrotubulů, které mají naopak mnoho společného.

Základními stavebními prvky mikrofilament i mikrotubulů jsou globulární proteiny, monomerní aktin a dimer α,β -tubulinu, zatímco základní stavební složkou intermediálních filament je fibrilární dimer. Způsob, jakým intermediální filamenta tvoří vlákna, je také podstatně odlišný od ostatních cytoskeletálních komponent. Mikrotubuly a mikrofilamenta sestavují polární vlákna za dodání energie ve formě ATP či GTP, přičemž polymerace přednostně probíhá na jednom konci, zatímco na druhém konci dochází k depolymeraci [4]. Intermediální filamenta vykazují za fyziologických podmínek jedinečnou schopnost samovolného sestavení bez zapojení nukleotidových trifosfátů [5]. Intermediální filamenta se prodlužují připojováním podjednotek na oba konce. Podjednotky se však také mohou začleňovat po celé délce vláken, což vede ke značné nehomogenitě v jejich šířce [6]. Aktinová mikrofilamenta společně s mikrotubuly udávají morfologii buňky. Poskytují dráhy pro molekulární motory, které zajišťují

transport molekul a organel buňkou, napomáhají při buněčném dělení a buněčné lokomoci. Polarita těchto filament udává směr pohybu molekulárních motorů kinesinu, dyneinu a myosinu podél vláken. Naproti tomu intermediální filamenta tvoří nepolární struktury a nemohou sloužit pro transport pomocí molekulárních motorů. Mohou však s molekulárními motory interagovat jako náklad [7]. Dalším rozdílem ve srovnání s ostatními složkami cytoskeletu je specifita exprese proteinů intermediálních filament v konkrétních buňkách. Intermediální filamenta jsou nejdynamičtějšími prvky cytoskeletu a od ostatních cytoskeletálních vláken se liší svými elastickými vlastnostmi [8].

Zatímco struktury mikrotubulů a mikrofilament jsou dnes již dobře prozkoumané, organizace intermediálních filament je v současné době mnohem méně známa. Strukturní informace jsou přitom nezbytné pro úplné pochopení funkcí těchto filament v buňkách.

1.1.2 Intermediální filamenta

Intermediální filamenta jsou dynamické prvky cytoskeletu, které tvoří síť mezi povrchem buňky a jádrem. V jádře se podílí na organizaci nukleoskeletu, v cytoplazmě propojují jadernou membránu s plazmatickou a zprostředkovávají vzájemnou komunikaci cytoskeletálních komponent. Vytváří vlákna o průměru přibližně 10 nm poskytující buňkám elastické vlastnosti, čímž zabraňují mechanickému stresu buněk, které jsou vystaveny vnějšímu či vnitřnímu fyzickému namáhání [9]. Jsou složeny z jednoho nebo více členů velké rodiny vysoce nerozpustných proteinů, jejichž exprese je specifická pro daný buněčný a tkáňový typ. Za fyziologických podmínek jsou sítě intermediálních filament velmi stabilní, odolné proti solubilizaci vysokými teplotami, vysokými koncentracemi solí i detergentů [10].

1.1.2.1 Rozdělení a výskyt

V lidském genomu bylo nalezeno asi 70 genů kódujících různé proteiny intermediálních filament, které tvoří jednu z nejpočetnějších proteinových rodin [11]. Proteiny intermediálních filament se nachází prakticky ve všech diferenciovaných buňkách a jsou přítomny jak v cytoplazmě, tak v jádře. V různých buňkách a tkáních jsou specificky exprimovány různé typy proteinů intermediálních filament, viz Obrázek 1 (str. 13). Existuje více než 50 proteinů intermediálních filament, které jsou rozděleny do pěti hlavních kategorií na základě jejich strukturní a sekvenční podobnosti [6], viz Tabulka 1 (str. 12). V závislosti na jejich typu tvoří homopolymery či heteropolymery. Mezi nejvýznamnější proteiny intermediálních filament patří především keratiny, laminy,

desmin, vimentin, gliální fibrilární protein (GFAP, z angl. Glial Fibrillary Acidic Protein), neurofilamenta, periferin či syncoilin. První čtyři typy (I – IV) se nachází v cytoplasmě, zatímco typ V je přítomný v jádře a tvoří vláknitou síť na vnitřním povrchu jaderné membrány. Daná buňka může exprimovat více proteinů intermediálních filament, avšak většina buněk exprimuje převážně jeden cytoplazmatický typ [9].

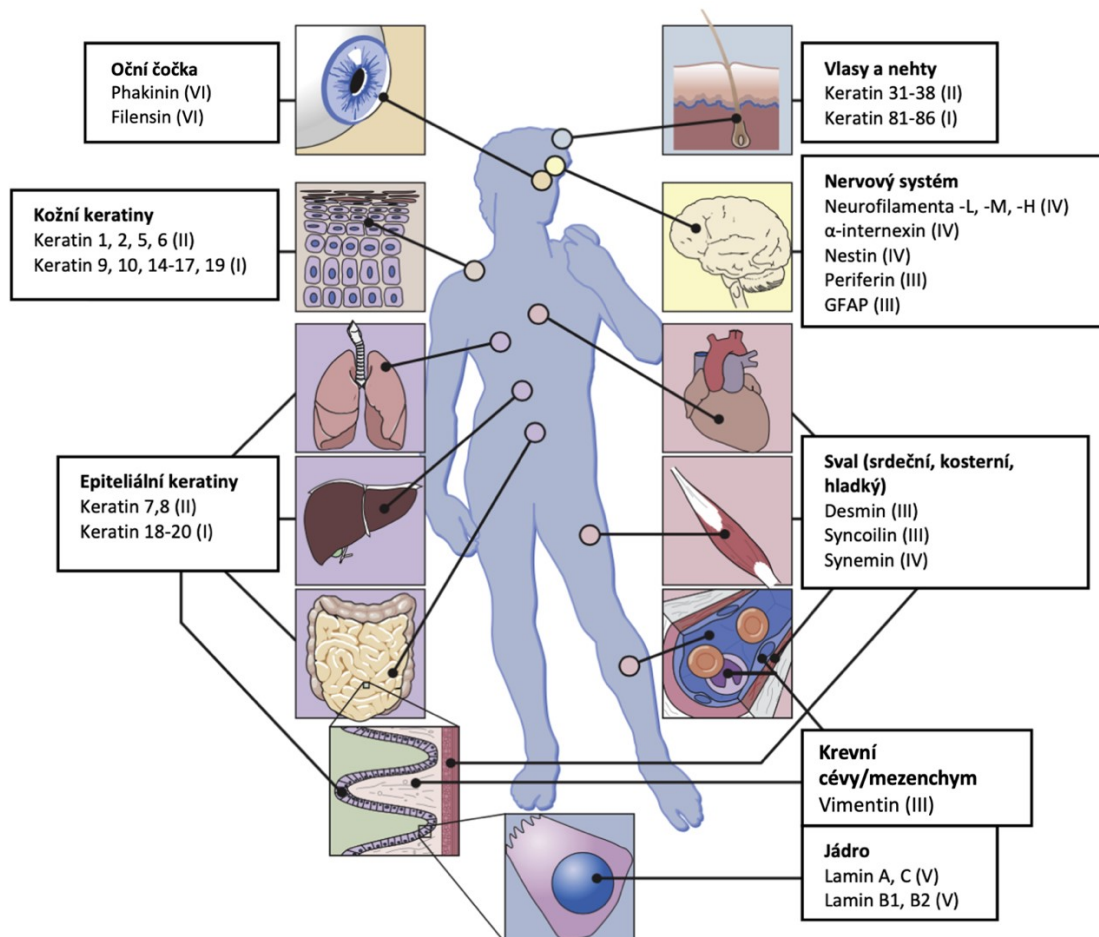
Tabulka 1. Klasifikace proteinů intermediálních filament na základě jejich strukturální a sekvenční podobnosti

Typ I	Kyselé keratiny
Typ II	Bazické keratiny
Typ III	Desmin, Vimentin, GFAP, Periferin, Syncoilin
Typ IV	Neurofilamenta (NF-L, NF-M, NF-H), α -internexin, Nestin, Synemin
Typ V	Laminy A, B, C
Typ VI	Filensin, Phakinin

Typ I a II tvoří největší skupina cytoplazmatických intermediálních filament, mezi které patří kyselé a bazické keratiny. Keratiny se vyskytují pouze jako heteropolymery. Jejich vlákna se skládají z heterodimerních podjednotek tvořených specifickými kombinacemi keratinů typu I a typu II. Nejsou však schopny tvořit polymery s intermediálními filamenti jiných typů. Keratiny jsou produkovány hlavně epiteliálními buňkami, jsou přítomny v kůži, vlasech, nehtech. V lidském těle je exprimováno 54 různých keratinů v závislosti na buněčném typu a stupni diferenciaci [12].

Mezi intermediální filamenti typu III patří proteiny desmin, vimentin, periferin, GFAP a syncoilin tvořící homopolymery. Jsou však také schopny tvořit heteropolymery s jinými proteiny typu III nebo IV. Desmin je exprimován ve všech typech svalových buněk, tedy v buňkách hladkého, příčně pruhovaného i srdečního svalstva [13]. Desminová vlákna jsou odpovědná za stabilizaci sarkomer ve stahujícím se svalu. Vimentin se nachází v buňkách mezenchymálního původu, jako jsou pojivové a endoteliální buňky či leukocyty. Periferin je přítomen především v neuronech periferního nervového systému, zatímco GFAP je exprimován v astrocytech a gliových buňkách obklopujících neurony [9].

K intermediálním filamentům typu IV řadíme neurofilamentové proteiny, které byly pojmenovány na základě svých odlišných molekulových hmotností jako NF-L (light), NF-M (medium), NF-H (heavy), dále α -internexin, nestin a synemin. Tyto proteiny tvoří heteropolymery spojením s dalšími proteiny typu III nebo IV, α -internexin však dokáže vytvářet také homopolymery. Proteiny intermediálních filament typu IV jsou exprimovány v neuronech, kde se podílejí na radiálním růstu axonů. Synemin se zároveň nachází ve všech typech svalových buněk. Intermediální filamenta typu V, laminy, se vyskytují výhradně v buněčném jádře, kde tvoří síť podporující jadernou membránu. Mezi proteiny typu VI patří další členové rodiny intermediálních filament, které nevykazují sekvenční a strukturní rysy charakteristické pro předchozích pět hlavních typů a nelze je tedy zařadit do žádné z hlavních kategorií. Patří sem například filensin a phakinin, heteropolymerní proteiny nacházející se v oční čočce [14].



Obrázek 1. Distribuce proteinů intermediálních filament v buňkách a tkáních lidského těla. Převzato a upraveno z [9].

1.1.2.2 Struktura a funkce

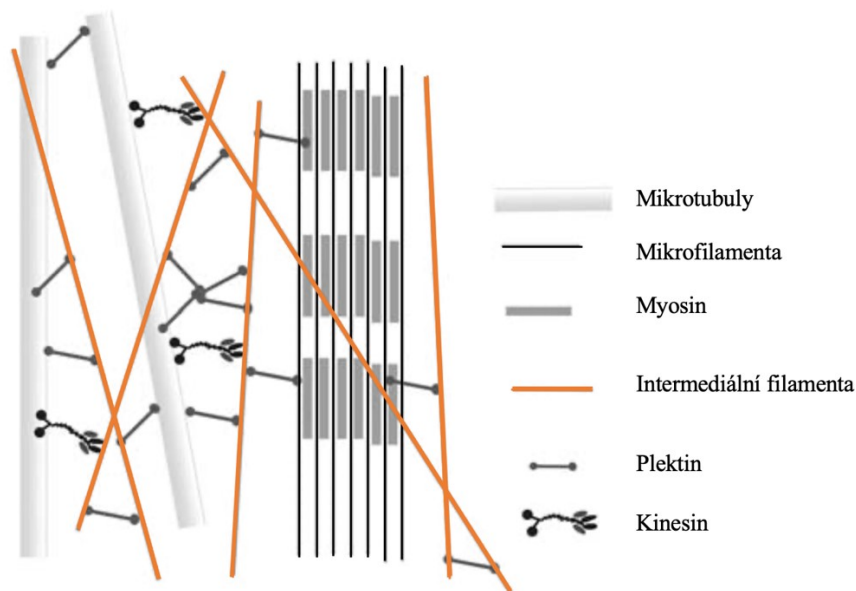
Intermediální filamenta jsou zapojena do mnoha buněčných fyziologických aktivit, včetně buněčné motility, morfologie, mechaniky, adheze, distribuce organel a buněčné signalizace. Hlavní intracelulární funkcí intermediálních filament je udržování strukturní a mechanické integrity buněk a tkání [2,15]. Tato funkce je zajištěna vazbou intermediálních filament na mikrotubuly, aktinová filamenta, plazmatickou a jadernou membránu. Přenášení kontraktálních sil je zprostředkováno mezibuněčnými spoji, jako jsou desmozomy a adhezní spoje, dále pomocí hemidesmosomů epitelových buněk a fokální adheze fibroblastů. Desmozomy ukotvují intermediální filamenta k plazmatické membráně a přenášejí mechanické síly mezi sousedními buňkami. Hemidesmosomy propojují intermediální filamenta přes plazmatickou membránu s extracelulární matrix. Kontinuita intermediálních filament brání nadměrnému roztahování buněk a dodává tkáním jako jsou epitely jejich mechanickou integritu. Interakce intermediálních filament s ostatními cytoskeletálními složkami a organelami, včetně spojení s plazmatickou a jadernou membránou koordinuje velká rodina proteinů asociovaných s intermediálními filamenty (IFAP, z angl. Intermediate Filament-Associated Proteins) [13], viz Obrázek 2 (str. 15). Zatím nejlépe prostudovaným proteinem schopným zajistit interakce mezi cytoskeletálními systémy a dalšími proteiny je plectin. Dalším proteinem rodiny IFAP je například desmoplakin, který zprostředkovává připojení intermediálních filament k desmozomům.

Kromě této významné mechanické funkce mají intermediální filamenta celou řadu specializovaných intracelulárních funkcí. Bylo zjištěno, že se podílí na transportu membránových organel i jejich fungování, dále také na transportu proteinů a lipidů [3]. Svým ukotvením k jaderné a plazmatické membráně vytváří v buňce konstrukce, které ovlivňují polohu organel. Pro interakci s organelami, jako jsou mitochondrie, Golgiho aparát, lysosomy či endosomy, vážou intermediální filamenta různé membránové komponenty těchto organel [4]. Toto navázání zpravidla zajišťují IFAP. Dále přispívají k signalizačním procesům v reakci na stres buněk prostřednictvím signální transdukce i k dynamickým buněčným funkcím jako je mitóza, apoptóza či buněčná migrace [6].

Intermediální filamenta propojují buněčný povrch s jádrem interakcemi s komplexem Linkeru nukleoskeletu a cytoskeletu (LINC, z angl. Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton). Tyto interakce jsou zprostředkovány plectinem a umožňují přenos mechanických sil z plazmatické membrány až do jádra, což vede k mechanotransdukci. Komplex LINC je spojený s vnější i vnitřní jadernou membránou a na vnitřní straně

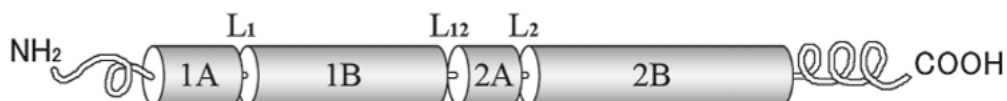
interaguje s jadernými laminy. Vazba intermediálních filament na komplex LINC má význam pro ovlivňování polohy jádra i pro průběh mitózy [16].

Jedním z hlavních způsobů, kterými jsou intermediální filamenta distribuována v buňce, je jejich asociace s mikrotubuly a mikrofilamenty, které poskytují dráhy pro intracelulární transport pomocí molekulárních motorů kinesinu, dyneinu na mikrotubulech a myosinu na mikrofilamentech [7]. Pomocí molekulárních motorů mohou být v buňce transportovány podjednotky i celá zralá vlákna. Intermediální filamenta mohou být přepravována spojením s jiným nákladem molekulárních motorů, například prostřednictvím interakce s mitochondriemi při jejich intracelulárním transportu. Zároveň je možné, že některé organely jsou transportovány spojením s intermediálními filamenty, které putují podél mikrotubulů [12].



Obrázek 2. Schéma znázorňující interakce intermediálních filament s dalšími cytoskeletálními složkami se zapojením IFAP (plektin) a molekulárních motorů (kinesin, myosin). Převzato a upraveno z [4].

Všechny proteiny intermediálních filament sdílejí společné strukturální znaky. Skládají se z konzervované centrální domény ohraničené variabilní N-terminální a C-terminální doménou, tzv. hlavou a ocasem. Centrální doména je rozdělena třemi oblastmi, tzv. linkery L₁, L₁₂ a L₂, na čtyři α -helikální segmenty 1A, 1B, 2A a 2B [3], viz Obrázek 3.



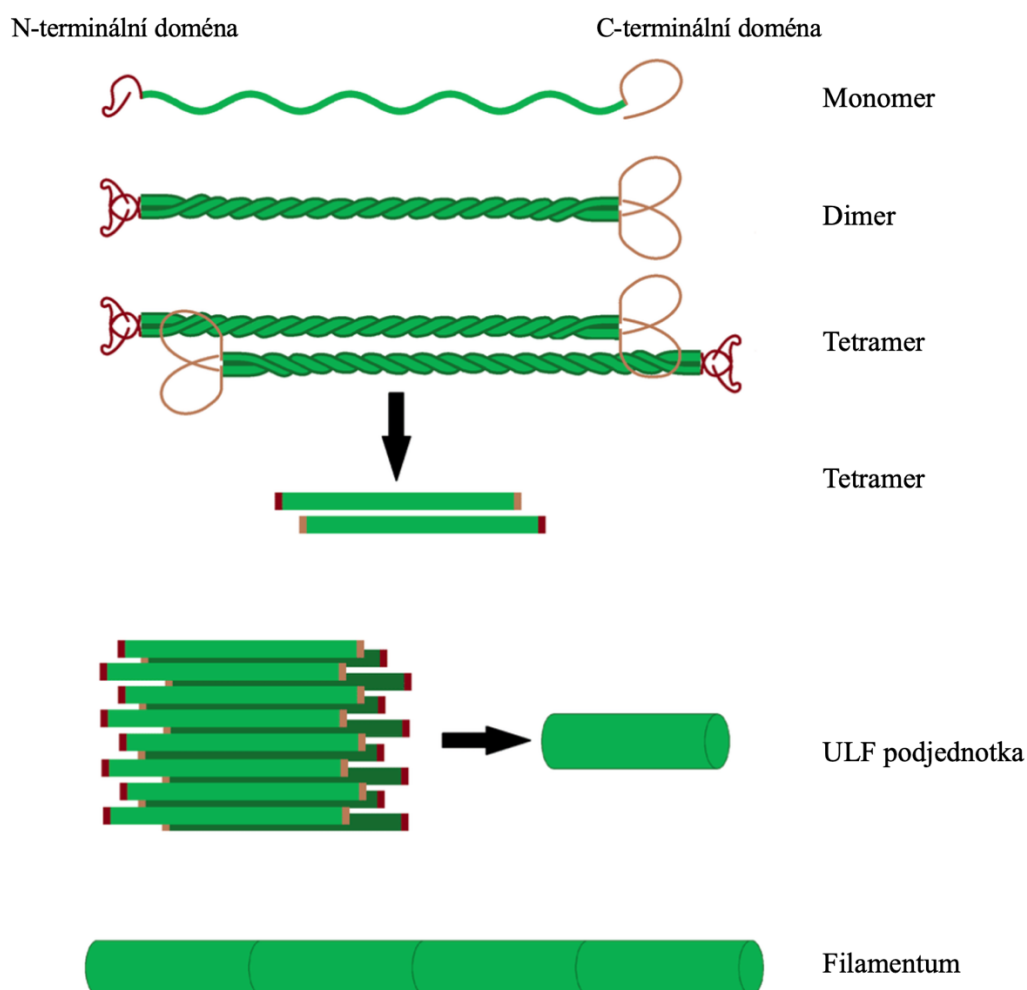
Obrázek 3. Strukturální model proteinů intermediálních filament složený z centrální domény, N-terminální a C-terminální domény. Centrální doména je rozdělena do čtyř α -helikálních segmentů 1A, 1B, 2A a 2B pomocí linkerů L₁, L₁₂ a L₂. Převzato z [2].

Proteiny intermediálních filament, nehledě na jejich tkáňovou specifitu, vykazují značnou strukturální homologii v centrální doméně v podobě vysoce konzervovaných sekvencí. Centrální doménu cytoplazmatických filament tvoří přibližně 310 aminokyselin, avšak jaderné laminy mají tuto doménu o něco delší [17]. Aminokyselinová sekvence α -helikálních oblastí centrální domény je tvořena heptadovými repeticemi, přičemž v pozicích 1 a 4 se nachází aminokyseliny hydrofobního charakteru jako je valin, leucin, isoleucin či methionin [18]. Tento motiv napomáhá tvorbě dimerů při paralelní asociaci monomerů do levotočivé dvoušroubovice. V polovině segmentu 2B se vyskytuje diskontinuita v heptadové repetici, tzv. *stutter*, tvořený z jedenácti opakujících se aminokyselin hydrofobního charakteru v pozicích 1, 4 a 8 [19,20].

Na opačných koncích centrální domény, v segmentech 1A a 2B se nachází dvě absolutně konzervované sekvence napříč proteiny intermediálních filament. V segmentu 1A se vyskytuje konzervovaná oblast 26 aminokyselinových zbytků, na C-konci segmentu 2B se nachází konzervovaná oblast 32 zbytků s tzv. konsensuálním aminokyselinovým motivem YRKLLEGEE [21]. Tyto konzervované oblasti mají velký význam v procesu skládání vláken. Naopak terminální domény jsou variabilní a liší se délkou i složením primární aminokyselinové sekvence. Terminální domény interagují s různými cytoplazmatickými složkami včetně ostatních cytoskeletálních komponent a mají důležitou roli při sestavování vláken [22].

Povrch centrální domény obsahuje přebytek kyselých aminokyselin nesoucích záporný náboj, zatímco N-terminální doména mnoha proteinů intermediálních filament je kladně nabitá kvůli přebytku bazických aminokyselin. Interakce bazické N-terminální domény s kyselou centrální doménou je pravděpodobně stěžejní při první fázi sestavování vlákna [4,23].

Intermediální filamenta se za fyziologických podmínek skládají samovolně, přičemž proces skládání zahrnuje několik fází, jak je znázorněno na Obrázku 4 (str. 18). Základní stavební jednotkou intermediálních filament je dimer, který vzniká navinutím centrálních domén dvou monomerů do paralelní levotočivé dvoušroubovice. Sestava začíná postupnou asociací dimerů za vzniku tetrameru, což je nejmenší podjednotka pozorovatelná v buňkách. Princip sestavy cytoplazmatických a jaderných intermediálních filament je však odlišný. U jaderných laminů dochází k laterální asociaci dimerů. C-terminální doména předešlého dimeru se napojí na N-terminální doménu následujícího dimeru, dochází ke spojení tzv. ve směru hlava k ocasu, čímž vznikají lineární polymery. Dimery cytoplazmatických intermediálních filament asociují antiparalelně a tvoří nepolární tetramer. Hnací silou při vzniku tetramerů je elektrostatická přitažlivost kladně nabitě N-terminální domény a záporně nabitě centrální domény [23]. Následně obvykle osm tetramerů asociuje laterálně za vzniku tzv. ULF podjednotek (ULFs, z angl. Unit-Lenght Filaments) o průměru přibližně 16 nm a délce 58 nm. Počet tetramerů tvořících ULF se však může lišit, jedna ULF podjednotka může sestávat z 24 až 40 polypeptidů. V další fázi se ULFs podélně spojují a vlákna rostou až do délky stovek nm. Během poslední fáze tvorby zralých intermediálních filament dochází ke vnitřnímu přeskupení podjednotek, což se projevuje radiálním zhutněním rostoucího vlákna na průměr 10 nm [24,25].



Obrázek 4. Schématické znázornění jednotlivých fází skládání intermediálních filament. Navinutím dvou monomerů do paralelní levotočivé dvoušroubovice vznikají dimery, které následně asociují antiparalelně za vzniku tetramerů. Zpravidla osm tetramerů se spojuje laterálně a vytváří tzv. ULFs, jejichž postupným podélným napojováním vzniká prodlužující se vlákno. Převzato a upraveno z [1].

Organizace i funkce intermediálních filament jsou regulovány posttranslačními modifikacemi. Mezi nejčastější modifikace ovlivňující intermediální filamenta patří fosforylace, glykosylace, acetylace, sumoylace či ubikvitinace [26]. Zejména fosforylace a defosforylace serinových a threoninových zbytků v N-terminálních doménách má významný vliv na proces skládání intermediálních filament. Bylo zjištěno, že fosforylace podporuje depolymeraci filament, tedy rozklad vláken na ULF podjednotky. Defosforylace naopak zvyšuje stabilitu vlákna. Mimo to má fosforylace vliv na asociaci intermediálních filament s IFAP a další specifické interakce [27].

1.1.2.3 Patologie související s intermediálními filamenty

Mutace v genech kódujících proteiny intermediálních filament je spojena s širokou škálou v současnosti neléčitelných lidských chorob. Dodnes bylo objeveno více než 80 dědičných onemocnění, včetně progresivní rakoviny, jež korelují se změnami exprese intermediálních filament [5]. Molekulární mechanismy těchto onemocnění odpovídají poruchám ve funkcích typicky přiřazovaných intermediálním filamentům, tedy udržování strukturní a mechanické integrity buněk a tkání. V několika posledních letech však bylo definováno mnoho patologických stavů souvisejících s nemechanickými funkcemi intermediálních filament. Například byla objevena vážná neurodegenerativní onemocnění spojená s narušením funkce intermediálních filament v nervovém systému. Mezi tyto onemocnění patří Alexandrova choroba způsobená mutací proteinu GFAP, či amyotrofická laterální skleróza (ALS) spojená s defekty neurofilament [12].

Mechanické vlastnosti intermediálních filament jsou nezbytné pro normální funkci mnoha tkání jako je kůže, svalová či nervová tkáň. Narušení struktury intermediálních filament vede k onemocněním, která jsou charakterizována nedostatečnou schopností těchto tkání odolávat mechanickému namáhání. Příkladem jsou kožní choroby způsobené mutacemi keratinů, kardiomyopatie nebo svalová dystrofie související s mutacemi desminu [28].

Jednou z prvních nemocí objevených v souvislosti s poruchou funkce intermediálních filament je obzvláště závažná forma kožního onemocnění Epidermolysis bullosa simplex (EBS), jedna z forem tzv. nemoci motýlích křídel [17]. EBS je způsobena mutacemi v genech pro keratin 5 (KRT5) a keratin 14 (KRT14). Exprese mutantních keratinů způsobuje, že se keratinová vlákna nemohou správně sestavit, což vede k narušení bazálních keratinocytů. V důsledku poškození keratinových vláken je pokožka velice křehká a citlivá na mechanický stres, jehož působením dochází k cytolýze v základní vrstvě epidermis a na kůži se objevují puchýře [29].

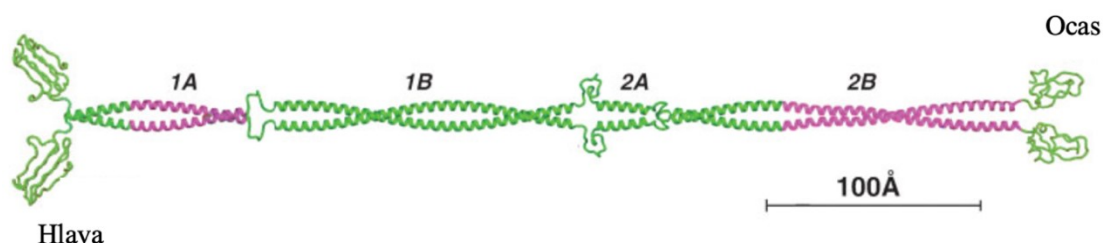
1.1.3 Vimentin

Vimentin je protein třetí třídy intermediálních filament s molekulovou hmotností 53,7 kDa, tvořený 466 aminokyselinami [30]. Tvoří síť mezi buněčnou membránou a jádrem v buňkách mezenchymálního původu. Typicky je exprimován v endoteliálních buňkách, fibroblastech, lymfocytech či v buňkách hladkého svalstva cév. Hlavní rolí vimentinu je zajištění mechanické stability a opory buněk. Vimentinová síť umožňuje regulovat intracelulární mechanické změny doprovázející fyziologické aktivity, jako je buněčná kontrakce, pohyblivost, proliferace anebo umístění organel. Je zapojena do procesů migrace buněk během hojení ran a opravy tkání [12].

Vimentin se účastní buněčného přechodu z epitelu do mezenchymu. Epiteliální-mezenchymální přechod (EMT, z angl. Epithelial-Mesenchymal Transition) je proces, při kterém epitheliální buňky procházejí funkčními a morfologickými změnami a diferencují se na buňky mezenchymální. Epiteliální buňky zaujímají typický mezenchymální či fibroblastický tvar. Dochází ke ztrátě desmozomálních kontaktů a modifikaci buněčné adheze. Zároveň dochází ke změně ukotvení k extracelulární matrix, což se projevuje zvýšením dynamiky fokální adheze a buňky se stávají pohyblivými [31]. Charakteristickým znakem EMT je snížení exprese keratinu a zvýšení exprese vimentinu [12]. K tomuto procesu dochází během embryogeneze, při regeneraci tkání v procesech hojení ran či fibróze vyvolané zánětem, anebo při maligních transformacích buněk. Vimentin se také účastní prodlužování invadopodií, což jsou výčnělky plazmatické membrány obsahující proteázy, které způsobují degradaci bazální membrány a extracelulární matrix. To umožňuje migraci rakovinných buněk přes extracelulární prostředí a metastázi do vzdálených míst [32]. Vimentin je exprimován v několika typech nádorů a jeho exprese koreluje s jejich agresivitou. Nadměrná exprese vimentinu se již řadu let využívá jako klinický marker pro EMT, kritický proces při šíření nádorových buněk [33].

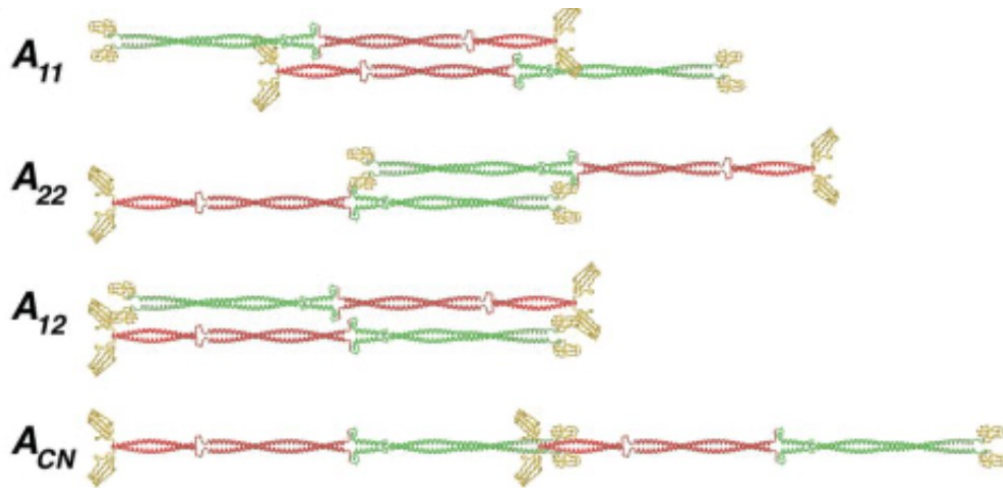
Cílení na regulaci klíčových složek procesu EMT by mohlo mít velký potenciál v léčbě rakoviny a vývoji léků [34]. Kromě toho exprese a mutace vimentinu provázejí celou řadu patologických stavů, mezi něž patří onemocnění jako je šedý zákal, revmatoidní artritida, Crohnova choroba či AIDS (syndrom získané imunodeficiency, z angl. Acquired Immunodeficiency Syndrome) [33,35]. Tyto skutečnosti dělají z vimentinu atraktivní potenciální cíl pro diagnostiku a léčbu široké škály chorob od rakoviny po zánětlivá a infekční onemocnění.

Molekula vimentinu se skládá ze tří domén, N-terminální tzv. hlavové domény, centrální domény, a C-terminální tzv. ocasní domény. Periodicita heptadové repetice v centrální doméně je v několika místech přerušena krátkými linkery L₁, L₁₂, L₂, čímž vznikají α -helikální segmenty 1A a 1B, které společně tvoří α -helikální strukturu 1, a segmenty 2A a 2B tvořící α -helikální strukturu 2. Centrální doménu vimentinu tvoří 310 aminokyselinových zbytků, z nichž 70 je kyselých a 46 bazických, což uděluje centrální doméně záporný náboj [25,30]. N-terminální doména nese kladný náboj, který je dán 11 bazickými argininovými zbytky, jedinými nabitými aminokyselinami v sekvenci hlavové domény. Asociací centrálních domén dvou molekul vznikají dimery uspořádané do levotočivé dvoušroubovice, viz Obrázek 5.



Obrázek 5. Model vimentinu v dimerní formě. Hlavová doména, centrální doména a její α -helikální segmenty 1A, 1B, 2A a 2B, ocasní doména. Fialově jsou vyznačené konzervované oblasti nacházející se v segmentech 1A a 2B. Převzato a upraveno z [3].

Následně dochází k antiparalelní asociaci dimerů za vzniku tetramerů. Asociace osmi tetramerů tvoří ULF, jejichž podélným napojováním postupně vznikají vlákna, která nakonec prochází radiálním zhutněním. Jakým způsobem vzájemně interagují jednotlivé oligomery v různých fázích skládání však stále není detailně prozkoumáno. Na základě studií prováděných na vimentinu technikou chemického sítění bylo vytvořeno několik modelů představujících možné způsoby asociace dimer-dimer v procesu skládání do zralých vláken [36], viz Obrázek 6 (str. 22). Tyto modely reprezentují tři odlišné způsoby laterální asociace dimerů A₁₁, A₁₂, A₂₂. Dále model A_{CN} představuje způsob podélné asociace dimerů. Zároveň bylo zjištěno, že dimerní interakce typu A₁₁ a A₂₂ se vyskytují především v počátečních fázích tvorby filament a další způsoby těchto interakcí se uplatňují v pozdějších fázích postupného skládání [37].

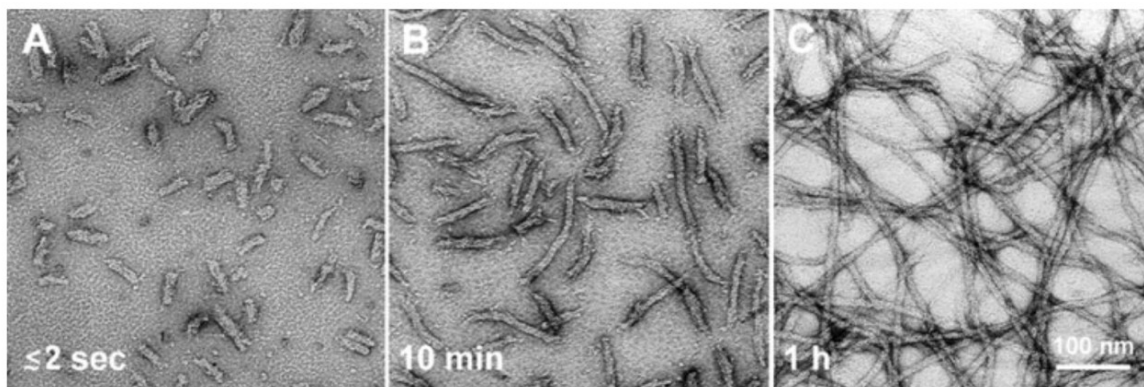


Obrázek 6. Modely laterální asociace dimer-dimer A_{11} , A_{22} , A_{12} a podélné asociace dimer-dimer A_{CN} . Červeně vyznačená α -helikální struktura 1 a zeleně α -helikální struktura 2. Převzato z [3].

Interakce dimer-dimer jsou založeny na elektrostatické přitažlivosti mezi bazickými argininy N-terminální domény a přebytkem kyselých aminokyselin centrální domény [23]. Zdá se, že N-terminální doména má pro sestavu filament zásadní význam, přestože se její sekvence i délka v rámci různých proteinů intermediálních filament liší. Pokusy prováděné na vimentinu postrádajícím hlavovou doménu ukázaly, že takové molekuly nejsou schopné vytvářet tetramery [38]. Další studie na vimentinu s různými delekcemi v N-terminální doméně odhalily sekvence, které jsou nezbytné pro sestavu filament. Bylo zjištěno, že prvních 24 aminokyselinových zbytků na N-konci hlavové domény a posledních 6 zbytků na jejím C-konci jsou pro polymeraci nejdůležitější. Jejich odstranění vimentin není schopen tvořit tetramerní formy [39]. Odstranění C-terminální, tzv. ocasní domény nemá vliv na schopnost tvorby filament, avšak ovlivňuje výslednou tloušťku zralých vláken, což naznačuje, že hraje roli v poslední fázi složení, kdy dochází k radiálnímu uspořádání filament. Významnou roli v sestavě vláken mají segmenty 1A a 2B centrální domény. Bodové mutace v jejich konzervovaných oblastech způsobují, že skládání probíhá jen do fáze ULF [40].

Podjednotky ULFs za fyziologických podmínek spontánně polymerují do vláken během několika minut [4], jak je vidět na Obrázku 7 (str. 23). Zralá filamenta a ULFs jsou v cytoplasmě v rovnováze a k zabudování podjednotek může docházet v jakémkoliv místě vlákna. Vytváření vimentinové sítě začíná v blízkosti jádra. Disociované podjednotky se pohybují pomocí molekulárních motorů směrem k periférii buňky, kde polymerují do vláken a začleňují se do sítě. V buňce takto mohou být transportovány

jednotlivé podjednotky, ale i zralá vlákna. U vimentinu bylo zjištěno, že transport může probíhat jak směrem k buněčnému povrchu, tak k buněčnému jádru.



Obrázek 7. *In vitro* polymerace rekombinantního lidského vimentinu pozorovaná elektronovým mikroskopem po A) 2 sekundách, B) 10 minutách, C) 1 hodině. Měřítka 100 nm. Převzato z [3].

1.2 Strukturní charakterizace intermediálních filament

Stanovení struktury intermediálních filament je nezbytné pro úplné pochopení jejich funkce. Může přinést důležité poznatky o mechanismech mnoha v současnosti neléčitelných lidských onemocnění, které souvisí s expresí proteinů intermediálních filament a jejich mutacemi. Podrobné informace o jejich struktuře v různých fázích skládání však stále nejsou k dispozici, což nám brání pochopit správné i patogenní chování těchto proteinů.

Pro strukturní charakterizaci proteinů se běžně využívají techniky rentgenové krystalografie, nukleární magnetické rezonance nebo kryo-elektronové mikroskopie, které umožňují získat strukturní informace s rozlišením na úrovni jednotlivých atomů. Tyto metody však neposkytují informace o dynamickém charakteru proteinových struktur, jako jsou například jednotlivé fáze skládání proteinů intermediálních filament do zralých vláken. Avšak rentgenovou krystalografií byly získány detailní strukturní informace o jednotlivých fragmentech, monomerních i dimerních podjednotkách různých proteinů intermediálních filament [3,41]. Z výsledků získaných pro jednotlivé fragmenty však nelze přímo vyvodit závěry vysvětlující uspořádání nativních oligomerních molekul. Pro ověření a rozšíření těchto poznatků jsou nezbytné studie proteinů za nativních podmínek.

Pro doplnění statických dat informacemi o dynamických vlastnostech intermediálních filament během jejich skládání, jsou využívány metody hmotnostní spektrometrie v kombinaci s chemickým sítěním či vodík-deuteriovou výměnou (HDX, z angl. Hydrogen-Deuterium Exchange). Tyto techniky nám umožňují získat informace

o vzájemných interakcích podjednotek a dynamické povaze proteinů, nezbytné pro pochopení procesu uspořádání intermediálních filament [23,36,37,40].

Dále bylo pro pozorování skládání filament a jejich vyšších struktur využito metody elektronové mikroskopie fixovaných preparátů v různých časových intervalech. V současné době se kromě elektronové mikroskopie využívá také metoda malouhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS, z angl. Small-Angle X-ray Scattering) umožňující zkoumání makromolekul v roztoku. Na základě dat získaných při experimentech s vimentinem metodou SAXS byly vytvořeny trojrozměrné modely tetramerní formy, oktameru i ULF vimentinu [42].

1.2.1 Vodík-deuteriová výměna

Vodík-deuteriová výměna v kombinaci s hmotnostní spektrometrií poskytuje informace o dynamických strukturních změnách jednotlivých oligomerních forem v procesu skládání filament za nativních podmínek. Při studiích vimentinu pomocí HDX byla prokázána významná role konsenzuálních motivů v centrální doméně na tvorbu filament. V publikaci Premchandrar *et al.* [40] byly prováděny experimenty na vimentinu s různými bodovými mutacemi v konzervovaných sekvencích centrální domény. Jediná změna aminokyseliny v těchto oblastech vedla k zastavení procesu skládání ve fázi ULF. Na základě těchto experimentů byly identifikovány tři oblasti: N-terminální sekvence v segmentu 1A, N-terminální sekvence v segmentu 2A, a C-terminální sekvence v segmentu 2B, zodpovědné za stabilizaci tetramerů, ULF a zralých vláken během skládání filament. Tyto oblasti jsou tedy považovány za kontaktní místa, která udržují vlákna pohromadě.

1.2.2 Chemické sítě

Metoda chemického sítě v kombinaci s hmotnostní spektrometrií umožňuje získat důležité informace o protein-proteinových interakcích podjednotek během organizace proteinů do vyšších struktur. V minulosti bylo provedeno několik studií založených na chemickém sítě vimentinu [23,36,37]. Byly jimi získány modely čtyř způsobů interakcí dimer-dimer, které byly pozorovány v procesu skládání vláken [36], viz Obrázek 6 (str. 22). Tyto modely představují tři způsoby laterální asociace označené jako A_{11} , A_{22} a A_{12} . Model A_{11} znázorňuje antiparalelní uspořádání dimerů, ve kterém dimery vzájemně interagují prostřednictvím α -helikální struktury 1. V modelu A_{22} antiparalelní dimery interagují pomocí α -helikální struktury 2 a v modelu A_{12} dochází k interakcím v celé délce dimerů. Poslední model A_{CN} představuje způsob podélné interakce překrytím

N-terminální a C-terminální domény dvou dimerů. V další studii bylo zjištěno, že na tvorbě ULF se podílí převážně interakce typu A_{11} . Existence dalších uvedených asociačních forem pozorovaná ve zralých vláknech naznačuje, že v poslední fázi sestavy během radiálního zhutnění dochází k přeskupování podjednotek [37]. Následně byla chemickým sítěním potvrzena hypotéza týkající se významu elektrostatických interakcí na sestavu vláken. Bylo zjištěno, že interakce mezi opačnými náboji v centrální a N-terminální doméně je hnací silou pro uspořádání filament [23].

2 CÍLE PRÁCE

- Příprava tetramerní směsi dusíkem ^{15}N izotopově značeného a neznačeného vimentinu pro chemické síťení.
- Chemické síťení tetramerního vimentinu a zpracování síťeného produktu pro LC-MS analýzu.
- Analýza síťených peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie a následná kvantifikace interdimerních a intradimerních vzdálenostních omezení.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

1,4-dithiothreitol (99%)	Sigma Aldrich, USA
3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfonová kyselina (99,5%)	Sigma Aldrich, USA
4-ethylmorfolin (99,5%)	Sigma Aldrich, USA
Acetonitril (LC-MS kvalita)	Merck, Německo
Coomassie Brilliant Blue R 250	VWR International, USA
Dimethyl sulfoxid	Merck, Německo
Disukcinimidyl suberát	Creative Molecules, Kanada
Disukcinimidyl suberát, směs H12/D12 (50:50)	Creative Molecules, Kanada
Dodecylsírán sodný	VWR International, USA
Ethanol (HPLC kvalita)	Lach-ner, ČR
HEPES (99,5 %)	Sigma Aldrich, USA
Hydroxid draselný (85%)	Sigma Aldrich, USA
Chloracetamid (98%)	Sigma Aldrich, USA
Chlorid sodný (p.a. kvalita)	Lach-ner, ČR
Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová	Bruker Daltonics, USA
Kyselina octová (99,5%)	Sigma Aldrich, USA
Kyselina mravenčí (98%)	Merck, Německo
Kyselina trifluoroctová (99%)	Sigma Aldrich
Methanol(LC-MS kvalita)	Merck, Německo
Močovina (99,9%)	VWR International, USA
Methylamin hydrochlorid (98%)	Sigma Aldrich, USA
NuPAGE [®] LDS vzorkový pufr	Invitrogen, USA
Proteasa Trypsin gold	Promega, USA
Proteinový standard SeeBlue [™] Plus2 Pre-stained	Invitrogen, USA
Tris (2-karboxyethyl) fosfin hydrochlorid	Sigma Aldrich, USA
Voda (LC-MS kvalita)	Merck, Německo

3.2 Biologický materiál

Vimentin Wild Type ¹⁵ N izotopově značený	Laboratoř biokystalografie KU Leuven, Belgie
Vimentin Wild Type ¹⁴ N neznačený	Laboratoř biokystalografie KU Leuven, Belgie

3.3 Roztoky

Barvicí roztok pro SDS-PAGE

45 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant blue R 250

Dialyzační pufr A

6,2mol/l močovina, 5mmol/l MAC, 2mmol/l HEPES, pH 8,2

Dialyzační pufr B

2mmol/l HEPES, 0,3mmol/l DTT, pH 8,2

Elektrodový pufr

5 % (v/v) MOPS SDS pufr

Ethylmorfolinový pufr

150mmol/l 4-ethylmorfolin, 15 % (v/v) acetonitril, pH 8,3

Monomerní pufr

8,8mol/l močovina, 5mmol/l Tris, 2mmol/l DTT, 5mmol/l MAC, 2mmol/l EDTA, 1mol/l chlorid sodný

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE

35 % (v/v) ethanol, 10 % (v/v) kyselina octová

Odsolovací roztok A

2 % (v/v) acetonitril, 0,1 % (v/v) kyselina trifluoroctová

Odsolovací roztok B

90 % (v/v) acetonitril, 0,1 % (v/v) kyselina trifluoroctová

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE

100mmol/l DTT v 4x koncentrovaném NuPAGE® LDS vzorkovém pufru

3.4 Použité přístroje a materiál

Analytické váhy NewClassic MF	Mettler Toledo, Švýcarsko
Automatické pipety	Mettler Toledo, Švýcarsko
Centrifuga stolní MiniSpin	Eppendorf, Německo
Dialyzační kazety, Slide-A-Lyzer™ MWCO 10kDa	Thermo Fischer Scientific, USA
Elektroforetická souprava pro SDS-PAGE (Novex®)	Invitrogen, USA
Hmotnostní spektrometr Bruker solariX XR 15T	Bruker Daltonics, USA
HPLC systém Agilent 1290	Agilent Technologies, USA
Chladnička s mrazničkou	Siemens, Německo
Chromatografická kolona Luna Omega Polar C18 1.6 µm, 1.0 × 100 mm	Phenomenex, USA
Injekční stříkačka	B. Braun, Německo
Magnetická míchačka	VELP Scientifica, Itálie
Mikrostříkačka	Hamilton, USA
MALDI terčik s 384 pozicemi	Bruker Daltonics, USA
NuPAGE® 4–12% Bis-Tris gel	Invitrogen, USA
Odsolovací kolona kolona OPTI-TRAP™ pro peptidy	Optimize Technologies, USA
pH metr Orion 2 Star	Thermo Fisher Scientific,
Předvážky EMB 1000-2	Kern, Německo
Ultrazvuková čistička Elmasonic S 30 H	Biosan, Lotyšsko
Spektrofotometr DeNovix DS-11 FX +	DeNovix, USA
Termostat stolní CH-100	Biosan, Lotyšsko
Vakuová odparka Speed Vac	Eppendorf, Německo
Vialky se septem	Thermo Fisher Scientific, USA
Vortex	VELP Scientifica, Itálie

3.5 Software

Data Analysis 5.0	Bruker Daltonics, USA
LinX 1.13	MBÚ AVČR, ČR [43]

3.6 Metody

3.6.1 Exprese a purifikace vimentinu

Exprese a purifikace vimentinu nebyla součástí této práce. Výchozím materiálem byl již připravený vimentin a dusíkem ^{15}N izotopově značený vimentin, které byly pro tyto experimenty poskytnuty Laboratoří biokrystalografie KU Leuven, Belgie. Proteiny byly dodány v monomerní formě v pufru o složení: 8,8 mol/l močovina, 5 mmol/l Tris, 2 mmol/l DTT, 5 mmol/l MAC, 2 mmol/l EDTA a 1 mol/l chlorid sodný.

3.6.2 Dialýza a sestavení tetramerního vimentinu

Jednotlivé fáze skládání vimentinu probíhají za různých koncentrací močoviny. Abychom z monomerní formy získali tetramery, byla využita postupná dialýza za snižování koncentrace močoviny pomocí dvou dialyzačních pufrů A a B. Vimentin v monomerní formě se nacházel v pufru obsahujícím 8,8 mol/l močovinu. Ke vzniku dimerů dochází po dosažení koncentrace 6 mol/l močoviny a následným snižováním koncentrace močoviny dochází k asociaci dimerů na tetramery [19,38].

3.6.2.1 Příprava dimerního vimentinu

Zmražené vzorky vimentinu ^{14}N (koncentrace 0,895 mg/ml) a vimentinu ^{15}N (koncentrace 0,180 mg/ml) byly rozmrazeny a odděleně přesunuty do kazety s dialyzační membránou zadržující molekuly o relativní molekulové hmotnosti vyšší než 10 kDa. Dialýza probíhala v chladové místnosti (4 °C) za stálého míchání na magnetické míchačce. První krok dialýzy, za účelem vzniku dimerů, probíhal přes noc v 1 litru dialyzačního pufru A.

3.6.2.2 Stanovení koncentrace proteinu

Po prvním dialyzačním kroku byla spektrofotometricky stanovena koncentrace vimentinu ^{14}N a vimentinu ^{15}N v dimerní formě. Na spektrofotometru DeNovix byla změřena absorbance vzorků při 280 nm, z čehož byla vypočtena hmotnostní koncentrace proteinu v jednotlivých vzorcích. Teoretická hodnota molárního absorpčního koeficientu vimentinu při 280 nm je $22\,330\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

3.6.2.3 Analýza vzorků pro přípravu směsi vimentinu $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$

Vhodný poměr pro smíchání dimerního vimentinu ^{14}N a ^{15}N byl stanoven pomocí MALDI/FT-ICR MS (MALDI, z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, FT-ICR, z angl. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance). Na základě změřených koncentrací jednotlivých dimerů byly připraveny tři vzorky, ve kterých byl smíchán

vimentin $^{14}\text{N}:$ ^{15}N v poměrech 1:1, 1:3 a 1:6. Takto připravené vzorky byly nejprve třikrát naředěny ethylmorfolinovým pufrům, a poté byl ke vzorkům pipetován trypsin v hmotnostním poměru 1:10 (trypsin : vimentin). Vzorky byly umístěny na 1,5 h do termostatu na 37 °C. Následně bylo provedeno odsolení vzniklých peptidů na odsolovací koloně pomocí odsolovacích roztoků 1 a 2, dle výrobcem dodaného protokolu [44]. Na MALDI terčík byl postupně nanesen 1 μl každého odsoleného vzorku a po zaschnutí byl převrstven 1 μl matrice (kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová). Měření na hmotnostním spektrometru bylo provedeno Mgr. Janem Fialou. Na základě hmotnostních spekter získaných pro jednotlivé vzorky byl zvolen nejvhodnější poměr pro smíchání ^{14}N a ^{15}N dimerů vimentinu.

3.6.2.4 Příprava izotopově značeného tetramerního vimentinu

Pro přípravu směsi obsahující stejné množství ^{14}N a ^{15}N vimentinu byly vzorky obsahující dimerní formy vimentinu smíchány v hmotnostním poměru 1:1,5 pro ^{14}N ku ^{15}N . Takto připravený vzorek byl opět převeden do dialyzační kazety. Současně byl do druhé dialyzační kazety převeden zbytek vzorku obsahujícího neznačený dimerní vimentin ^{14}N . Následovaly další kroky postupné dialýzy, za účelem snížení koncentrace močoviny a asociace dimerů na tetramery.

Nejprve byly vzorky dialyzovány ve 300 ml dialyzačního pufru A po dobu 20 minut. Poté bylo z kádinky odebráno 100 ml pufru A, a přidáno 100 ml dialyzačního pufru B s nulovou koncentrací močoviny a dialýza probíhala 20 minut. Následně bylo odebráno 150 ml pufru A, přidáno 150 ml pufru B a vzorek byl opět dialyzován 20 minut. V dalším kroku bylo z kádinky znovu odebráno 150 ml pufru A a přidáno 150 ml pufru B. Po 20 minutách byly dialyzační kazety se vzorky přesunuty do 1 litru pufru B, ve kterém dialýza probíhala 2 hodiny. Nakonec byly vzorky umístěny do čisté kádinky s 2 litry pufru B, kde dialýza probíhala přes noc. Další den byl proveden poslední krok postupné dialýzy, přičemž byly vzorky přesunuty do 1,5 litru pufru B a dialyzovány po dobu 3 hodin. Po ukončení dialýzy byl obsah dialyzačních kazet převeden do mikrozku mávek.

Po dialýze byla opět změřena absorbance vzorků při 280 nm na spektrofotometru DeNovix, ze které byla stanovena koncentrace tetramerního vimentinu $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ a tetramerního vimentinu ^{14}N . Tyto vzorky byly dále použity pro chemické sítění.

3.6.3 Chemické sítění tetramerů vimentinu

Pro chemické sítění vimentinu byl použit disukcinimidyl suberát (DSS) a směs nedeuterovaného/deuterovaného DSS H12/D12 v poměru 50:50.

Pro síťovací reakce byl zvolen padesátinásobný molární nadbytek síťovacího činidla ku proteinu. Byly připraveny zásobní roztoky DSS a DSS H12/D12 o koncentraci 2 mg/ml rozpuštěním síťovacího činidla v dimethyl sulfoxidu (DMSO). Ke vzorkům tetramerů vimentinu $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ bylo přidáno činidlo DSS, ke vzorkům tetramerního vimentinu ^{14}N bylo přidáno DSS a také směs DSS H12/D12, přičemž konečný obsah DMSO ve vzorcích činil 1,29 %. Vzorky byly připraveny v triplicátech a současně byl vytvořen kontrolní vzorek bez přídavku síťovacího činidla. Reakční směs byla zamíchána a ponechána reagovat jednu hodinu při laboratorní teplotě. Množství proteinu použitého na reakci bylo stanoveno na 20 μg .

Reakční směs byla poté rozdělena na dvě poloviny. Jedna polovina každého vzorku byla použita pro kontrolu síťovací reakce pomocí elektroforesy, druhá polovina byla následně zpracovávána pro LC-MS analýzu (LC-MS, z angl. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry).

3.6.4 Elektroforetická separace produktů chemického sítění

Kontrola síťovací reakce byla provedena pomocí SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného, z angl. Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Ke směsi vzorku se síťovacím činidlem, obsahující přibližně 10 μg proteinu ve 33 μl , byl přidán čtyřikrát koncentrovaný vzorkový LDS pufr v poměru 3:1 (v/v). Vzorky byly zamíchány a inkubovány v termostatu při 95 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut. Následně byla provedena centrifugace a do jamek polyakrylamidového NuPage 4-12% Bis-Tris gelu bylo pipetováno 20 μl vzorků. Do první a poslední jamky gelu bylo nanášeno 5 μl proteinového standardu SeeBlue™ Plus2 Pre-stained. Separace probíhala ve 20x ředěném MOPS elektrodovém pufru po dobu 40 minut při 200 V. Po separaci byly proteiny v gelu vizualizovány barvicím roztokem obsahujícím Coomassie brilliant Blue R 250. Následně bylo barvivo vymýváno odbarvovacím roztokem tvořeným ethanolem, vodou a kyselinou octovou v poměru 35:55:10 (v/v).

3.6.5 Příprava vzorku pro LC-MS analýzu

Příprava vzorků pro LC-MS analýzu zahrnovala redukci, alkylation a štěpení proteinu proteasou. Vzorky byly nejprve třikrát naředěny ethylmorfolinovým pufrem. Poté byly

připraveny zásobní roztoky 0,5mol/l Tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochloridu (TCEP) a 1mol/l chloracetamidu (CAA). Pro provedení redukce byl ke vzorkům přidán zásobní roztok TCEP v takovém množství, aby výsledná koncentrace TCEP ve směsi činila 5 mmol/l. Současně pro alkylaci byl přidán zásobní roztok CAA, aby konečná koncentrace CAA v reakční směsi byla 20mmol/l. Vzorky byly poté zamíchány a ponechány inkubovat v termostatu při 70 °C po dobu 5 minut. Nakonec bylo provedeno štěpení proteinu, ke kterému byla použita proteasa Trypsin gold. K reakční směsi byl přidán trypsin v hmotnostním poměru proteasa ku proteinu 1:20 a štěpení probíhalo přes noc v termostatu při teplotě 37 °C. Další den byl přídavek trypsinu opakován, aby konečný hmotnostní poměr proteasa ku proteinu činil 1:10. Štěpící reakce byla dále inkubována v termostatu při 37 °C po dobu 4 hodin. Štěpení bylo ukončeno přidáním trifluoroctové kyseliny v takovém množství, aby v reakční směsi byla 0,1%.

Před LC-MS analýzou byly vzorky sesušeny pomocí vakuové odparky. Následně byly peptidy resuspendovány ve 25 µl 0,1% kyseliny mravenčí v LC-MS čistotě a převedeny do vialek se septem.

3.6.6 LC-MS analýza produktů síťovací reakce

Měření na hmotnostním spektrometru byla provedena Mgr. Janem Fialou. Vzorky byly analyzovány metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Na kolonu bylo nanášeno 5 µl peptidové směsi (2 µg peptidů). Separované peptidy eluované z chromatografické kolony byly v hmotnostním spektrometru ionizovány technikou elektrospreje a analyzovány pomocí iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací.

3.6.7 Vyhodnocení dat

Data získaná z LC-MS analýzy byla zpracována pomocí programu Data Analysis 5.0 vybaveného SNAP algoritmem, zajišťující správné přiřazení nábojových stavů peptidů a jejich převedení na monoizotopické hmoty. Takto zpracovaná data byla vyexportována a dále zpracována pomocí programu LinX 1.13., umožňující přiřazení a kvantifikaci zesíťovaných peptidů značených pomocí dusíku ^{14}N a ^{15}N .

Pro vytvoření teoretické knihovny možných peptidových spojení a prohledávání dat z tohoto experimentu byly v programu LinX nastaveny příslušné parametry. Nejprve byla vložena aminokyselinová sekvence vimentinu ve formátu fasta (uvedena v Příloze 1), dále byla zvolena použitá proteasa, tedy trypsin specificky štěpící peptidovou vazbu za aminokyselinami argininem a lysinem, pokud po nich nenásleduje prolin. Maximální

počet vynechaných štěpících míst byl nastaven na tři. Poté byla nastavena variabilní modifikace: oxidace methioninu a pevná modifikace: karbamidomethylace cysteinu. Dále bylo definováno použité síťovací činidlo DSS a jeho specifita vůči lysinu a N-konci. Chyba měření byla nastavena na maximálně 2 ppm. Nakonec byla do programu exportována získaná data, tedy experimentální hodnoty m/z detekovaných peptidů. Programem LinX byly porovnány experimentálně zjištěné hodnoty m/z s teoretickými hodnotami hmotností síťných peptidů, které mohou vzniknout štěpením vimentinu trypsinem po síťení činidlem DSS. V případě, že relativní odchylka experimentální a teoretické hodnoty nepřesahovala 2 ppm, byly experimentální hodnoty přiřazeny konkrétním zesíťným peptidům. Síťené či modifikované peptidy identifikované programem LinX, byly manuálně dohledány v hmotnostních spektrech pomocí programu Data Analysis 5.0

Na základě informací získaných pomocí programu LinX bylo následně možné provést kvantifikaci interdimerních a intradimerních síťení, přičemž u většiny většiny směsných produktů bylo nutné tuto kvantifikaci dopočítat manuálně [45]. Procentuální zastoupení interdimerních síťení ve směsných produktech bylo vypočítáno podle vzorce:

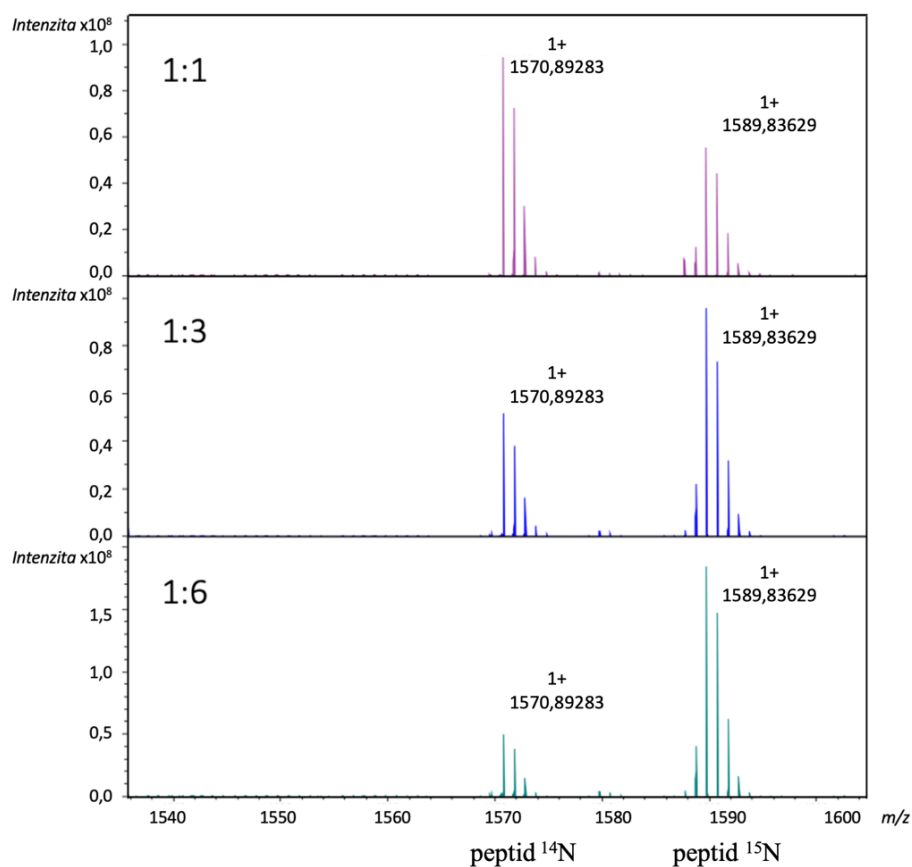
$$\frac{\sum I_{^{14}\text{N}/^{15}\text{N}} + I_{^{15}\text{N}/^{14}\text{N}}}{\sum I_{^{14}\text{N}/^{14}\text{N}} + I_{^{15}\text{N}/^{15}\text{N}}} \times 100, \quad (1)$$

ve kterém I vyjadřuje intenzitu čtyř peptidových forem $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$, které vznikly síťením tetramerní směsi vimentinu a následným proteolytickým štěpením, lišících se svou hmotností na základě různého počtu dusíků v aminokyselinové sekvenci jednotlivých zesíťných peptidů. Do součtu byly zahrnuty všechny příspěvky intenzit izotopické obálky dané peptidové formy.

4 VÝSLEDKY

4.1 Příprava tetramerního vimentinu $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ pro chemické sítění

Po prvním kroku dialýzy byla spektrofotometricky (A_{280}) stanovena koncentrace dimerního ^{14}N vimentinu, která činila 0,726 mg/ml, koncentrace dimerního ^{15}N vimentinu činila 0,234 mg/ml. Na základě zjištěných koncentrací byly připraveny tři vzorky, ve kterých byl ^{14}N a ^{15}N vimentin smíchán v poměrech 1:1, 1:3 a 1:6. Analýzou těchto vzorků po štěpení trypsinem pomocí MALDI/FT-ICR MS byla získána hmotnostní spektra vzniklých peptidů, jejichž část (oblast m/z 1530-1600) je na Obrázku 8.



Obrázek 8. Porovnání MS spekter pro peptid ISLPLPNFSSLNLR a jeho formu ^{15}N v míchacích poměrech 1:1, 1:3 a 1:6.

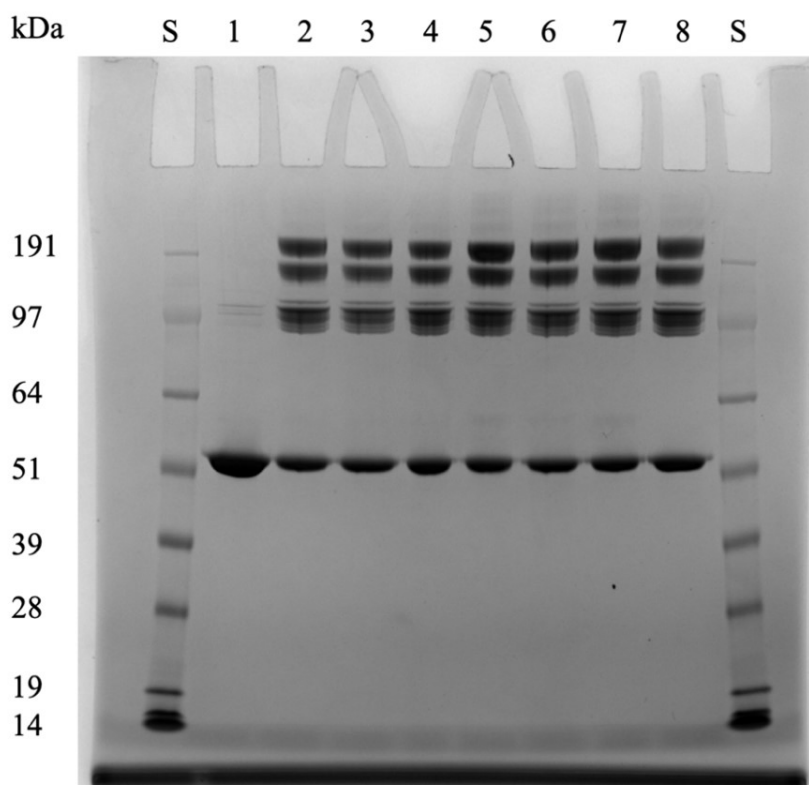
Jelikož ani jeden z těchto poměrů není ideální, byl na základě porovnání poměru intenzit ve vzorcích 1:1 a 1:3 zvolen poměr 1:1,5 pro smíchání dimerního vimentinu ^{14}N ku ^{15}N jako nejvhodnější. Takto připravená směs obsahující stejné množství dimerního vimentinu ^{14}N a ^{15}N byla dále postupně dialyzována za vzniku směsi tetramerů složených z kombinací dimerů $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$.

Celková koncentrace tetramerní směsi vimentinu ($^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$) po dialýze činila 0,300 mg/ml. Pro vzorek tetramerního vimentinu obsahujícího pouze dusík ^{14}N byla

zjištěna koncentrace 0,554 mg/ml. Tento vzorek byl naředěn dialyzačním pufrům A na koncentraci 0,300 mg/ml. Tetramerní vzorky byly dále využity pro chemické sítění.

4.2 Elektroforetická separace produktů chemického sítění

Výsledek chemického sítění byl ověřen pomocí SDS-PAGE. Na Obrázku 9 můžeme porovnat vzorky zesítěného tetramerního vimentinu s kontrolním vzorkem bez přídavku síťovacího činidla v dráze 1. V drahách 2, 3 a 4 se nachází triplikát tetrameru vimentinu $^{14}\text{N}/^{15}\text{N} + 50\times\text{DSS}$, v drahách 5, 6, 7 triplikát tetrameru vimentinu $^{14}\text{N} + 50\times\text{DSS}$ H12/D12 a v dráze 8 tetramer vimentinu $^{14}\text{N} + 50\times\text{DSS}$. Při porovnání s kontrolním vzorkem můžeme pozorovat, že v sítěných vzorcích se kromě monomerní formy vimentinu (~ 53 kDa) nachází i dimerní formy, jimž odpovídají zóny v oblasti okolo 100 kDa a tetramerní formy, jimž odpovídají zóny v oblasti okolo 200 kDa. Mezi nimi v zónách v oblasti okolo 150 kDa se nachází vimentin v trimerní formě. Z uvedených výsledků lze vyvodit závěr, že síťovací reakce proběhla ve všech vzorcích. Zároveň je možné potvrdit, že nedošlo ke vzniku žádné vyšší než tetramerní formy vimentinu.



Obrázek 9. Polyakrylamidový gel s produkty síťovací reakce činidlem DSS. V drahách S – proteinový standard SeeBlue™ Plus2 Pre-stained, dráha 1 – kontrolní vzorek (tetramer vimentinu $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ bez přídavku síťovacího činidla), dráhy 2, 3, 4 – triplikát tetrameru vimentinu $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ 50xDSS, dráhy 5, 6, 7 – triplikát tetrameru vimentinu ^{14}N 50xDSS H12/D12, v dráze 8 – tetramer vimentinu ^{14}N 50xDSS.

Pomocí SDS-PAGE bylo potvrzeno, že síťovací reakce proběhla úspěšně. Všechny vzorky byly následně připraveny pro LC-MS analýzu a změřeny. Pro vyhodnocení byly dále použity pouze data pro triplikát zesíťovaného tetramerního vimentinu $^{14}\text{N}/^{15}\text{N} + 50\times\text{DSS}$ (dráhy 2-5).

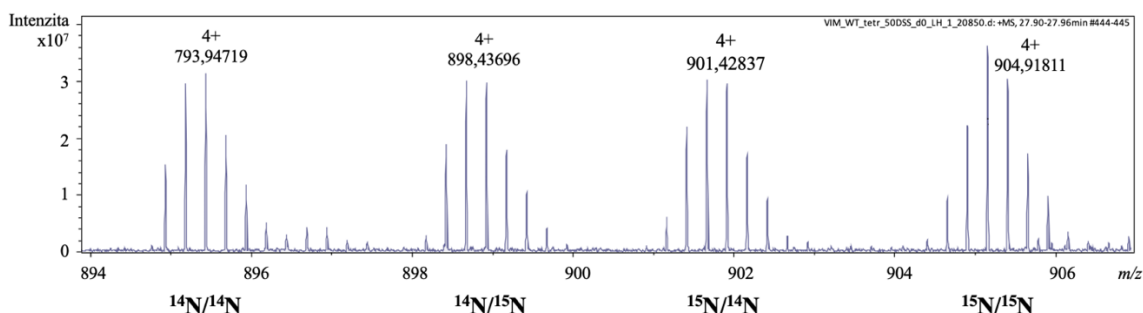
4.3 Identifikované produkty chemického síťení a příslušná hmotnostní spektra
Z LC-MS analýzy byl získán soubor iontů obsahující informaci o intenzitě pro jednotlivé m/z detekovaných peptidů. Získaná data byla zpracována pomocí programu LinX 1.13, který slouží pro interpretaci dat z hmotnostní spektrometrie získaných chemickým síťením proteinů. Celkem bylo identifikováno 92 produktů chemického síťení, z čehož 58 bylo interdimerních (48 z nich směsných), 23 intradimerních a 11 intrapeptidových. Výčet identifikovaných produktů chemického síťení je uveden v Příloze 2 a 3.

Aby bylo možné studovat interakce mezi dimerními podjednotkami v tetrameru, je nezbytné rozlišit síťení, které vzniklo v rámci jednoho dimeru (tedy intradimerní) a síťení, které vzniklo mezi dimery v rámci tetrameru (tedy interdimerní). Proto byla využita metoda, při které byl ve stejném množství smíchán ^{15}N značený a ^{14}N neznačený vimentin v dimerní formě, jejichž asociace při postupné dialýze dala vzniku čtyř tetramerních forem, a to $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$. Přítomnost těchto čtyř tetramerních forem ve vzorku poskytuje po síťení a proteolytickém štěpení charakteristická hmotnostní spektra, což nám umožňuje odlišit a posléze kvantifikovat zastoupení intradimerních a interdimerních síťení. Získaná hmotnostní spektra reprezentující zmíněné typy síťení jsme rozdělili na tři typy. Prvním typem (A) jsou spektra interdimerních produktů, druhým typem (B) jsou spektra intradimerních produktů a třetím typem (C) jsou spektra intrapeptidových produktů síťení:

A) Hmotnostní spektra interdimerních produktů síťení obsahují izotopické obálky pro každou z peptidových forem $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$, jejichž vzdálenost ve spektru závisí na počtu dusíků zesíťených peptidů. Poměr intenzit izotopických obálek těchto peptidových forem je dán zastoupením interdimerního a intradimerního síťení, a na základě tohoto poměru lze spektra interdimerních produktů dále rozdělit dvě skupiny.

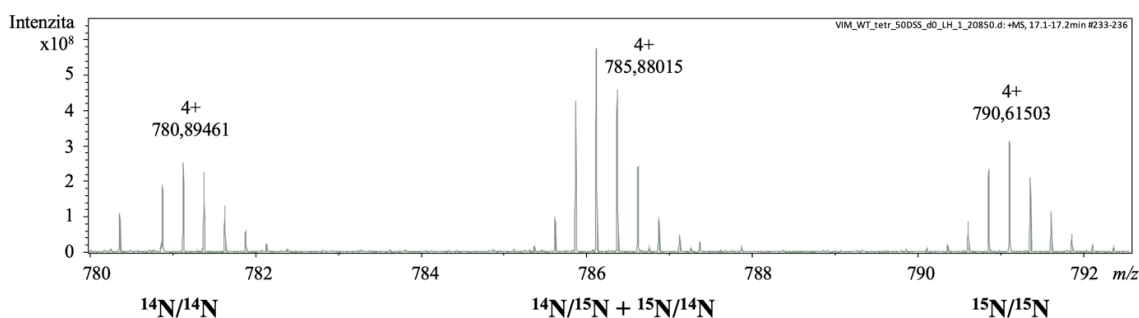
První skupinu tvoří spektra, ve kterých vychází poměr kvantifikace ve prospěch interdimerního síťení. Tento poměr jsme stanovili na 90:10 a vyšší pro interdimerní síťení. Spektra interdimerních produktů síťení obsahují přibližně stejný poměr intenzit izotopických obálek pro všechny čtyři peptidové formy. Příkladem je hmotnostní

spektrum uvedené na Obrázku 10 pro sítěné peptidy FANYIDKVR – QQYESVAAKNLQEAEWYK. Poměr interdimerního ku intradimernímu sítění tohoto produktu byl kvantifikací stanoven na 91:9.



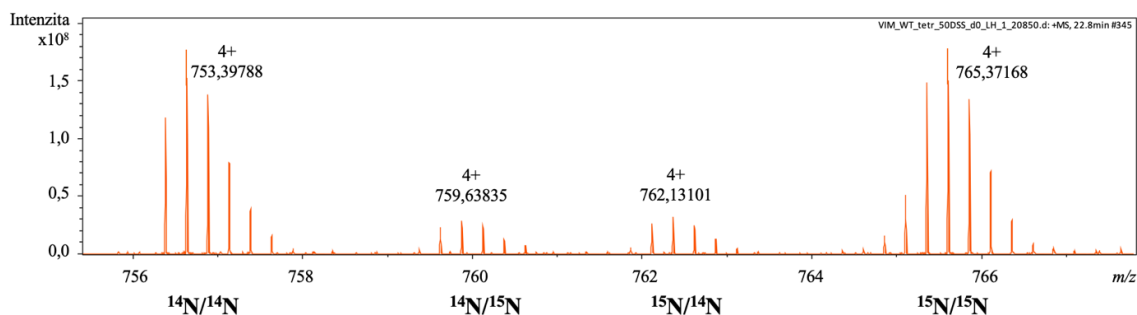
Obrázek 10. Hmotnostní spektrum interdimerního sítění. Sítěné peptidy FANYIDKVR – QQYESVAAKNLQEAEWYK, jejichž spektrum obsahuje izotopické obálky o stejném poměru intenzit pro všechny čtyři peptidové formy $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$.

Dalším příkladem je spektrum sítěných peptidů TNEKVELQELNDR – QAKQESTEYRR na Obrázku 11. Hmotnostní spektra obsahující pouze tři izotopické obálky získáváme v případě, že sítěné peptidy obsahují ve své aminokyselinové sekvenci stejný počet dusíků anebo v případě, že došlo k zesítění dvou peptidů se stejnou aminokyselinovou sekvencí. Peptidové formy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ mají tedy stejnou hmotnost, a jejich izotopické obálky se ve spektru překrývají. Pokud došlo k interdimernímu sítění vzniká jejich překrytím jedna izotopická obálka, která má oproti formám $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ dvojnásobnou intenzitu, viz Obrázek 11. V tomto případě byl pomocí kvantifikace stanoven poměr 102:0 interdimerního ku intradimernímu sítění.



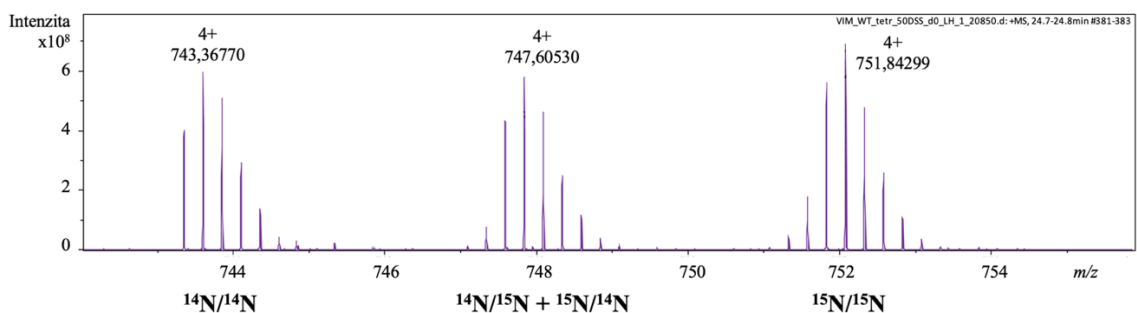
Obrázek 11. Hmotnostní spektrum interdimerního sítění. Sítěné peptidy TNEKVELQELNDR – QAKQESTEYRR obsahují stejný počet dusíků, peptidové formy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ mají tedy stejnou hmotnost, a proto se jejich izotopické obálky ve spektru překrývají za vzniku jedné obálky o dvojnásobné intenzitě oproti peptidovým formám $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$.

Druhou skupinu tvoří spektra směsného sítění, v nichž mají izotopické obálky peptidových forem rozdílný poměr intenzit. Příkladem je spektrum na Obrázku 12 pro sítěné peptidy KLLGEEER – ETNLDSLPLVDTHSKR, ze kterého byl kvantifikací stanoven poměr 17:83 interdimerního ku intradimernímu sítění.



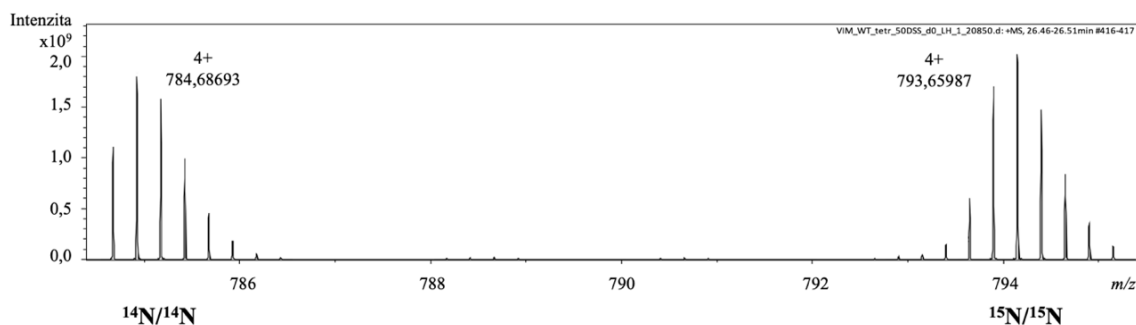
Obrázek 12. Hmotnostní spektrum směsného sítění. Spektrum sítěných peptidů KLLGEEER – ETNLDSLPLVDTHSKR obsahující izotopické obálky pro peptidové formy $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ o různém poměru intenzit, který je dán zastoupením interdimerního a intradimerního sítění.

Patří sem i hmotnostní spektra obsahující tři izotopické obálky, podobně jako je tomu u interdimerního sítění (viz Obrázek 11, str.38). V případě směsného sítění však intenzita izotopické obálky peptidových forem $^{14}\text{N}/^{15}\text{N} + ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ nabývá nižší hodnoty. Na Obrázku 13 je uvedeno hmotnostní spektrum směsného sítění peptidů NLQEAEWYKSK – SKFADLSEAANR se stejným počtem dusíků, u kterého byl kvantifikací stanoven poměr 50:50 interdimerního ku intradimernímu sítění.



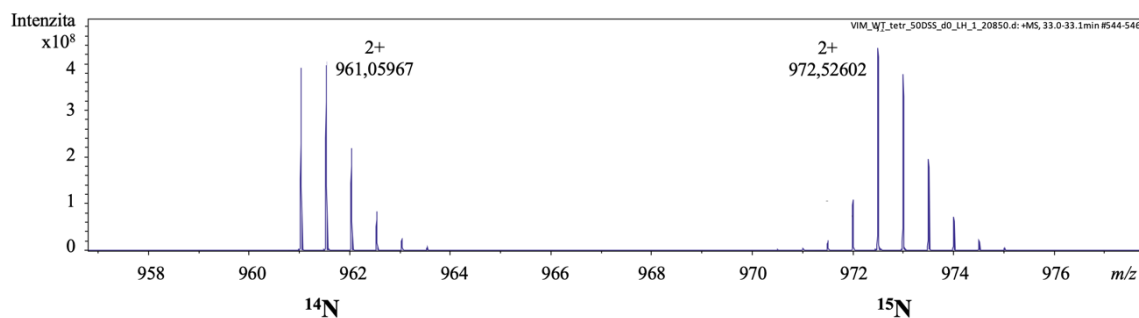
Obrázek 13. Hmotnostní spektrum směsného sítění. Sítěné peptidy NLQEAEWYKSK – SKFADLSEAANR obsahují stejný počet dusíků, peptidové formy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ mají tedy stejnou hmotnost, a proto se jejich izotopické obálky ve spektru překrývají.

B) Hmotnostní spektra intradimerních produktů obsahují pouze dvě izotopické obálky pro peptidové formy $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$. Tato hmotnostní spektra byla vznikají v případě, že došlo k sítění mezi monomery v rámci jednoho dimeru, nebo v rámci monomeru. Na Obrázku 14 (str. 39) je uvedeno hmotnostní spektrum intradimerně nebo intramolekulárně sítěných peptidů ETNLDSLPLVDTHSKR – TLLIKTVETR.



Obrázek 14. Hmotnostní spektrum intradimerního nebo intramolekulárního sítění peptidů ETNLDSLPLVDTHSKR – TLLIKTVETR obsahující dvě izotopické obálky pro peptidové formy $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$.

C) Hmotnostní spektra intrapeptidově zesítěných peptidů vznikají v případě, že došlo k sítění pouze v rámci jednoho monomeru. Tyto spektra opět obsahují pouze dvě izotopické obálky pro peptidové formy $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$. Příkladem je hmotnostní spektrum na Obrázku 15 pro peptid ILLAELEQLKGQKSR.



Obrázek 15. Hmotnostní spektrum intrapeptidového sítění pro peptid ILLAELEQLKGQKSR obsahující dvě izotopické obálky pro peptidovou formu ^{14}N a peptidovou formu ^{15}N .

4.4 Kvantifikace interdimerního a intradimerního sítění

Na základě dat vyhodnocených v programu LinX 1.13 bylo možné z hmotnostních spekter identifikovaných sítění vypočítat procentuální zastoupení interdimerních a intradimerních forem sítění [45]. Data získaná kvantifikací jsou důležitá data pro následnou tvorbu strukturního modelu tetramerního vimentinu, kde je díky nim možné odlišit sítění na rozhraní dimer-dimer či monomer-monomer.

Pokud došlo k intradimernímu sítění, byly ve spektru nalezeny pouze peptidové formy $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ (Obrázek 14). Při interdimerním sítění se v hmotnostním spektru nachází všechny čtyři formy sítěných peptidů (Obrázky 10-13, str. 38-39). Z toho vyplývá, že k intenzitám izotopických obálek pro formy $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ přispívají intradimerní i interdimerní sítění, zatímco intenzita forem $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ je dána pouze interdimerními sítěními. Na základě této skutečnosti byla u směsných produktů

dopočítána kvantifikace interdimerních a intradimerních sítěn podle vzorce (1) na str. 34. V Příloze 2 je uveden výčet interdimerních produktů chemického sítěn s vypočtenou kvantifikací.

5 DISKUZE

Intermediální filamenta mají výjimečnou schopnost skládat se za fyziologických podmínek samovolně do vláken, přičemž prochází několika fázemi organizace podjednotek [6]. Jejich struktura v různých fázích organizace dodnes není dostatečně prozkoumána. Nové poznatky o jejich struktuře přitom mohou mít velký přínos pro úplné pochopení funkcí těchto proteinů a mnoha patologických mechanismů souvisejících se změnami jejich exprese v buňkách.

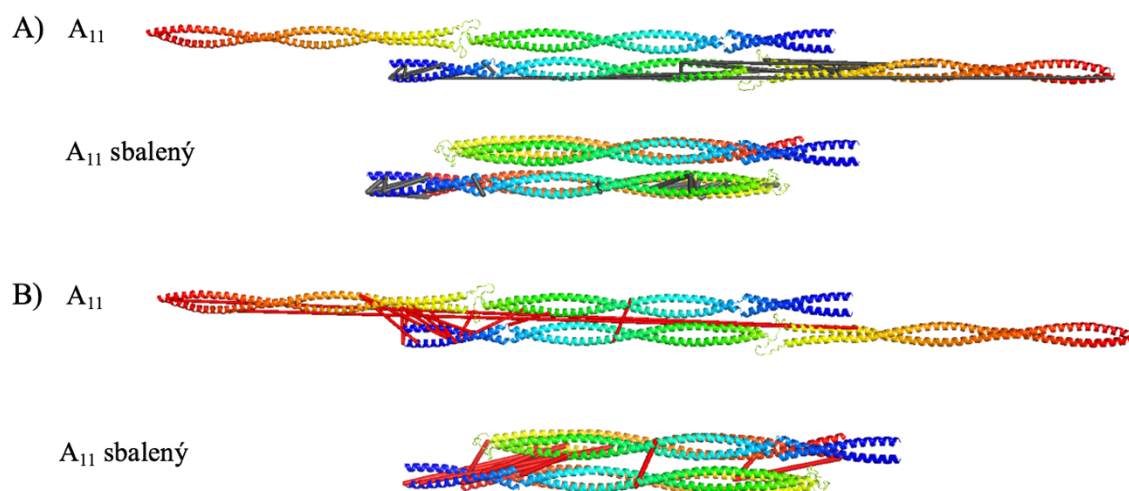
Jeden z důvodů, proč je strukturní charakterizace intermediálních filament obtížná, spočívá ve způsobu jejich skládání do vláken. Jednotlivé fáze skládání filament totiž vyžadují různé iontové podmínky, což omezuje využití některých strukturních metod a pro kompletní informace o jejich struktuře je nezbytné využít metody, kterými lze studovat proteiny v nativních podmínkách. V této práci jsme se zabývali studiem interakcí dimerních podjednotek v tetramerní fázi skládání filament využitím metody chemického sítění v kombinaci s hmotnostní spektrometrií, která umožňuje studium nativních proteinů. Informace o vzdálenostních omezeních dimerních podjednotek získané touto metodou mohou být následně využity pro modelování tetramerní struktury. Pracovali jsme s vimentinem, což je protein III. třídy intermediálních filament, tvořící homopolymery [2].

Abychom mohli studovat interakce dimerních podjednotek v tetrameru, je nezbytné rozlišit sítění, které vzniklo v rámci jednoho dimeru (intradimerní) a sítění, které vzniklo mezi dimery v rámci tetrameru (interdimerní). Běžnými metodami chemického sítění by nebylo možné je rozlišit, a proto jsme využili metodu, při které byla připravena dimerní směs izotopově značeného ^{15}N vimentinu a neznačeného vimentinu. Pro tuto metodu bylo stěžejní připravit směs značeného a neznačeného proteinu o stejném poměru. Důležitým krokem byla proto optimalizace poměru pro jejich smíchání. Asociace dimerů v této směsi umožnila vznik čtyř tetramerních forem $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$, jejichž chemickým sítěním a následnou analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie byla získána charakteristická hmotnostní spektra. Ze získaných hmotnostních spekter bylo poté možné rozlišit intradimerní a interdimerní produkty sítění.

Chemickým sítěním směsi tetramerů však nevznikají pouze intradimerní produkty (Obrázek 14, str. 40) a interdimerní produkty (Obrázky 10, 11, str. 38), ale také směsné produkty s různým zastoupením intradimerního a interdimerního sítění (viz Obrázky 12, 13, str. 39). Využitím softwaru LinX pro interpretaci dat z chemického sítění směsi

izotopově značeného a neznačeného proteinu, bylo možné rozpoznat intradimerní a interdimerní sítě a zároveň provést kvantifikaci jejich zastoupení ve směsných produktech [45]. Dále je nutné zmínit, že u produktů, které jsou označeny jako intradimerní, získaných tímto experimentem není možné rozlišit, zda sítě vzniklo mezi monomery v rámci jednoho dimeru, nebo v rámci monomeru. Sítím směsi tetramerních forem $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ totiž nelze odlišit peptidy pocházející z monomeru a z dimeru pokud se vyloženě nejedná o intrapeptidové produkty chemického sítě. Aby bylo možné rozlišit intradimerní a intramolekulární sítě, bylo by nutné připravit dimer vimentinu složený ze značeného a neznačeného proteinu.

S využitím získaných dat byly v Laboratoři biokystalografie KU Leuven vytvořeny modely tetramerní struktury vimentinu, které jsou uvedené na Obrázku 16. Model A) byl vytvořen na základě dat pro intradimerní sítě, model B) na základě dat pro interdimerní sítě.



Obrázek 16. Modely tetramerní struktury vimentinu vytvořené s pomocí dat získaných chemickým sítím v Laboratoři biokystalografie KU Leuven, Belgie. Model A) byl vytvořen na základě dat pro intradimerní sítě, model B) na základě dat pro interdimerní sítě.

Již téměř před třiceti lety bylo v publikaci Steinert *et al.* [36] chemickým sítím oligomerů, polymerů a zralých vláken vimentinu identifikováno 11 produktů odpovídající intermolekulárnímu sítím. Tyto produkty sítě byly přiřazeny třem modelům A_{11} , A_{22} , a A_{12} , které představují možné způsoby laterální asociace dimerních podjednotek, ke kterým dochází během procesu skládání do zralých vláken (znázorněny na Obrázku 6, str. 22). Z uvedených modelů vytvořených na základě našich dat vyplývá, že identifikovaná sítě převážně odpovídají asociačnímu modelu A_{11} . Vimentin tedy

nejpravděpodobněji tvoří tetramery za asociace dimerů podle modelu A₁₁. Z našeho experimentu bylo oproti předchozí práci získáno 58 interdimerních a 23 intradimerních produktů chemického sítění, přičemž informace o vzdálenostních omezeních dimerních podjednotek získané z kvantifikace přináší nová data umožňující charakterizaci detailnější tetramerní struktury vimentinu.

Zároveň bylo tímto experimentem ověřeno, že metodou chemického sítění směsi izotopově značeného a neznačeného proteinu lze získat cenné informace pro studium struktury intermediálních filament a její využití má velký potenciál pro studium struktury homo-oligomerních proteinových komplexů.

6 ZÁVĚR

- Jednotlivými dialyzačními kroky byla z monomerních forem vimentinu připravena tetramerní směs izotopově značeného a neznačeného vimentinu.
- Byl vyvinut a optimalizován protokol pro přípravu ekvimolární směsi izotopově značeného a značeného proteinu.
- Chemickým sítěním tetramerního vimentinu a následným proteolytickým štěpením byly získány sítěné peptidy, které byly analyzovány pomocí LC-MS.
- Využitím softwaru LinX byla identifikována interdimerní, intradimerní a intra-peptidová sítění.
- Kvantifikací byly získány informace o interdimerních a intradimerních vzdálenostních omezeních v tetramerní struktuře vimentinu.
- Získaná data byla použita k vytvoření strukturního modelu tetramerního vimentinu.

Literatura

1. Hohmann, T., Dehghani, F.: The Cytoskeleton – A Complex Interacting Meshwork. *Cells*. **8**, 362 (2019).
2. Iwatsuki, H., Masumi, S.: Seven Kinds of Intermediate Filament Networks in the Cytoplasm of Polarized Cells: Structure and Function. *Acta Histochemia et Cytochemia*. **43**, 19–31 (2010).
3. Strelkov, S.V., Herrmann, H., Aebi, U.: Molecular architecture of intermediate filaments. *BioEssays*. **25**, 243–251 (2003).
4. Minin, A.A., Moldaver, M.V.: Intermediate Vimentin Filaments and Their Role in Intracellular Organelle Distribution. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*. **48**, 221–252 (2008).
5. Omary, M.B.: “IF-pathies”: A broad spectrum of intermediate filament–associated diseases. *The Journal of Clinical Investigation*. **119**, 1756–1762 (2009).
6. Leube, R.E., Schwarz, N.: Intermediate filaments. *Encyclopedia of Cell Biology*. **2**, 569–578 (2016).
7. Robert, A., Hookway, C., Gelfand, V.I.: Intermediate filament dynamics: What we can see now and why it matters. *BioEssays*. **38**, 232–243 (2016).
8. Charrier, E., Janmey, P., Omary, M., Liem R.: Mechanical Properties of Intermediate Filament Proteins. *Methods in Enzymology*. **568**, 35–57 (2016).
9. Kornreich, M., Avinery, R., Malka-Gibor, E., Laser-Azogui, A., Beck, R.: Order and disorder in intermediate filament proteins. *FEBS Letters*. **589**, 2464–2476 (2015).
10. Kreplak, L., Bär, H., Leterrier, J.F., Herrmann, H., Aebi, U.: Exploring the mechanical behavior of single intermediate filaments. *Journal of Molecular Biology*. **354**, 569–577 (2005).
11. Block, J., Schroeder, V., Pawelzyk, P., Willenbacher, N., Köster, S.: Physical properties of cytoplasmic intermediate filaments. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*. **1853**, 3053–3064 (2015).
12. Lowery, J., Kuczmarski, E.R., Herrmann, H., Goldman, R.D.: Intermediate Filaments Play a Pivotal Role in Regulating Cell Architecture and Function. *Journal of Biological Chemistry*. **290**, 17145–17153 (2015).
13. Houseweart, M.K., Cleveland, D.W.: Intermediate filaments and their associated proteins: multiple dynamic personalities. *Current Opinion in Cell Biology*. **10**:93, 93–101 (1998).
14. Herrmann, H., Strelkov, S.V., Burkhard, P., Aebi, U.: Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *The Journal of Clinical Investigation*. **119**, 1772–1783 (2009).
15. Patteson, A.E., Vahabikashi, A., Goldman, R.D., Janmey, P.A.: Mechanical and Non-Mechanical Functions of Filamentous and Non-Filamentous Vimentin. *BioEssays*. **42**, 2000078 (2020).

16. Bouzid, T., Kim, E., Riehl, B.D., Esfahani, A.M., Rosenbohm, J., Yang, R., Duan, B., Lim, J.Y.: The LINC complex, mechanotransduction, and mesenchymal stem cell function and fate. *Journal of Biological Engineering*. **13**, 68 (2019).
17. Fuchs, E.: Intermediate filaments and disease: mutations that cripple cell strength. *Journal of Cell Biology*. **125**, 511–516 (1994).
18. Herrmann, H., Bär, H., Kreplak, L., Strelkov, S., Aebi, U.: Intermediate filaments: From cell architecture to nanomechanics. *Nature reviews. Molecular cell biology*. **8**, 562–573 (2007).
19. Chernyatina, A.A., Nicolet, S., Aebi, U., Herrmann, H., Strelkov, S.V. Atomic structure of the vimentin central α -helical domain and its implications for intermediate filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **109**, 13620–13625 (2012).
20. Parry, D.: Hendecad repeat in segment 2A and linker L2 of intermediate filament chains implies the possibility of a right-handed coiled-coil structure. *Journal of Structural Biology*. **155**, 370–374 (2006).
21. Herrmann, H., Strelkov, S.V., Feja, B., Rogers, K.R., Brettel, M., Lustig, A., Häner, M., Parry, D.A., Steinert, P.M., Burkhard, P., Aebi, U.: The intermediate filament protein consensus motif of helix 2B: its atomic structure and contribution to assembly. *Journal of Molecular Biology*. **298**, 817–832 (2000).
22. Herrmann, H., Aebi, U.: Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biology*. **8**, a018242 (2016).
23. Meng, J.J., Khan, S., Ip, W.: Charge interactions in the rod domain drive formation of tetramers during intermediate filament assembly. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**, 18679–18685 (1994).
24. Herrmann, H., Häner, M., Brettel, M., Ku, N.-O., Aebi, U.: Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins | Edited by W. Baumeister. *Journal of Molecular Biology*. **286**, 1403–1420 (1999).
25. Herrmann, H., Aebi, U.: Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annual Review of Biochemistry*. **73**, 749–789 (2004).
26. Snider, N.T., Omary, M.B.: Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*. **15**, 163–177 (2014).
27. Sihag, R.K., Inagaki, M., Yamaguchi, T., Shea, T.B., Pant, H.C.: Role of Phosphorylation on the Structural Dynamics and Function of Types III and IV Intermediate Filaments. *Experimental cell research*. **313**, 2098–2109 (2007).
28. Szeverenyi, I., Cassidy, A.J., Chung, C.W., Lee, B.T.K., Common, J.E.A., Ogg, S.C., Chen, H., Sim, S.Y., Goh, W.L.P., Ng, K.W., Simpson, J.A., Chee, L.L., Eng, G.H., Li, B., Lunny, D.P., Chuon, D., Venkatesh, A., Khoo, K.H., McLean, W.H.I., Lim, Y.P., Lane, E.B.: The Human Intermediate Filament Database:

- comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Human Mutation*. **29**, 351–360 (2008).
29. Jeřábková, B., Marek, J., Bučková, H., Kopečková, L., Veselý, K., Valíčková, J., Fajkus, J., Fajkusová, L.: Keratin mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex: correlations between phenotype severity and disturbance of intermediate filament molecular structure. *The British Journal of Dermatology*. **162**, 1004–1013(2010).
 30. Perreau, J., Lilienbaum, A., Vasseur, M., Paulin, D.: Nucleotide sequence of the human vimentin gene and regulation of its transcription in tissues and cultured cells. *Gene*. **62**, 7–16 (1988).
 31. Mendez, M.G., Kojima, S.-I., Goldman, R.D.: Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *The FASEB Journal*. **24**, 1838–1851 (2010).
 32. Schoumacher, M., Goldman, R.D., Louvard, D., Vignjevic, D.M.: Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *Journal of Cell Biology*. **189**, 541–556 (2010).
 33. Danielsson, F., Peterson, M., Caldeira Araújo, H., Lautenschläger, F., Gad, A.: Vimentin Diversity in Health and Disease. *Cells*. **7**, 147 (2018).
 34. Strouhalova, K., Prechova, M., Gandalovicova, A., Brabek, J., Gregor, M., Rosel, D.: Vimentin Intermediate Filaments as Potential Target for Cancer Treatment. *Cancers*. **12**, 184 (2020).
 35. Fernández-Ortega, C., Ramírez, A., Casillas, D., Paneque, T., Ubieta, R., Dubed, M., Navea, L., Castellanos-Serra, L., Duarte, C., Falcon, V., Reyes, O., Garay, H., Silva, E., Noa, E., Ramos, Y., Besada, V., Betancourt, L.: Identification of Vimentin as a Potential Therapeutic Target against HIV Infection. *Viruses*. **8**, 98 (2016).
 36. Steinert, P.M., Marekov, L.N., Parry, D.: Diversity of intermediate filament structure. Evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that in keratin intermediate filaments. *Journal of Biological Chemistry*. **268**, 24916–24925 (1993).
 37. Mücke, N., Wedig, T., Bürer, A., Marekov, L.N., Steinert, P.M., Langowski, J., Aebi, U., Herrmann, H.: Molecular and biophysical characterization of assembly-starter units of human vimentin. *Journal of Molecular Biology*. **340**, 97–114 (2004).
 38. Herrmann, H., Häner, M., Brettel, M., Müller, S.A., Goldie, K.N., Fedtke, B., Lustig, A., Franke, W.W., Aebi, U.: Structure and Assembly Properties of the Intermediate Filament Protein Vimentin: The Role of its Head, Rod and Tail Domains. *Journal of Molecular Biology*. **264**, 933–953 (1996).
 39. Shoeman, R.L., Hartig, R., Berthel, M., Traub, P.: Deletion mutagenesis of the amino-terminal head domain of vimentin reveals dispensability of large internal

- regions for intermediate filament assembly and stability. *Experimental Cell Research*. **279**, 344–353 (2002).
40. Premchandrar, A., Mücke, N., Poznanski, J., Wedig, T., Kaus-Drobek, M., Herrmann, H., Dadlez, M.: Structural Dynamics of the Vimentin Coiled-coil Contact Regions Involved in Filament Assembly as Revealed by Hydrogen-Deuterium Exchange. *Journal of Biological Chemistry*. **291**, 24931–24950 (2016).
 41. Chernyatina, A.A., Strelkov, S.V.: Stabilization of vimentin coil2 fragment via an engineered disulfide. *Journal of Structural Biology*. **177**, 46–53 (2012).
 42. Sokolova, A.V., Kreplak, L., Wedig, T., Mücke, N., Svergun, D.I., Herrmann, H., Aebi, U., Strelkov, S.V.: Monitoring intermediate filament assembly by small-angle x-ray scattering reveals the molecular architecture of assembly intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**, 16206–16211 (2006).
 43. Laboratory of Structural Biology and Cell Signaling. URL: <<https://peterslab.org/downloads/LinX>> [cit. 13.8. 2021].
 44. Brožura Optimize Technologies. Dostupné z URL: <https://www.bgb-info.com/files/master/Optimize/Optimize_Trapping_Brochure.pdf> [cit. 13.8. 2021].
 45. Kukačka, Z., Rosůlek, M., Jelínek, J., Slavata, L., Kavan, D., Novák, P.: LinX: A Software Tool for Uncommon Cross-Linking Chemistry. *Journal of Proteome Research*. **20**, 2021–2027 (2021).
 46. Databáze proteinových sekvencí, UniProt. Dostupné z URL: <<https://www.uniprot.org/uniprot/P08670.fasta>> [cit. 30. 7. 2021].

Příloha 1. Aminokyselinová sekvence vimentinu ve formátu fasta [46]

```
> sp | P08670 | VIME_HUMAN Vimentin OS = Homo sapiens OX =  
9606 GN = VIM PE = 1 SV = 4  
MATRSVSSSSYRRMFGGPGTASRPSSRSYVTTSTRTYSLGSALRPSTSRSLYASSPGG  
VYATRSSAVRLRSSVPGVRLQLQDSVDFSLADAINTEFKNTRTNEKVELQELNDRFANYI  
DKVRFLEQQNKILLAELEQLKGQKSRLGDLYEEEMRELRRQVDQLTNDKARVEVERDN  
LAEDIMRLREKLQEEMLQREEAENTLQSFQDQVDNASLARLDLERKVESLQEEIAFLKK  
LHEEEIQELQAQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALRDVRRQYESVAAKNLQEAEEWYKSKF  
ADLSEAANRNNDALRQAKQESTEYRRQVQSLTCEVDALKGTNESLERQMREMEENFAVE  
AANYQDTIGRLQDEIQNMKEEMARHLREYQDLLNVKMALDIEIATYRKLLEGEESRISL  
PLPNFSSSLNLRITNLDLPLVDTHSKRTLLIKTVETRDGQVINETSQHHDDLE
```

Příloha 2. Identifikované interdimerní produkty chemického sítěni s vypočtenou kvantifikací interdimerního a intradimerního sítěni. Směsné produkty jsou označeny oranžovou barvou. Šedou barvou jsou označeny produkty s převažující kvantifikací pro interdimerní sítěni. Modifikované aminokyseliny činidlem DSS jsou vyznačeny červeně.

	Sítěné peptidy (A - B)	Modifikované aminokyseliny	Interdimerní sítěni (%)	Intradimerní sítěni (%)
1	TNEKVELQELNDR - QQYESVAAK NLQEAEEWYK	DSSd0 (A.104; B.282)	149	0
2	EKLQEEMLQR - EKLQEEMLQR	DSSd0 (A.188; B.188)	121	0
3	FANYIDKVR - QVQSLTCEVDALKGTNESLER	DSSd0 (A.120; B.334)	112	0
4	TNEKVELQELNDR - QAKQESTEYRR	DSSd0 (A.104; B.313)	102	0
5	LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - SKFADLSEAA NR	DSSd0 (A.97; B.294)	100	0
6	GQGKSR - KVESLQEEIAFLK	DSSd0 (A.143; B.223)	95	5
7	FANYIDKVR - QAKQESTEYRR	DSSd0 (A.120; B.313)	93	7
8	GQGKSR - QQYESVAAK NLQEAEEWYK	DSSd0 (A.143; B.282)	93	7
9	FANYIDKVR - QQYESVAAK NLQEAEEWYK	DSSd0 (A.120; B.282)	91	9
10	GQGKSR - SKFADLSEAA NR	DSSd0 (A.143; B.294)	90	10
11	ILLAELEQLKGQGK - QQYESVAAK NLQEAEEWYK	DSSd0 (A.139; B.282)	89	11
12	FANYIDKVR - NLQEAEEWYK SK	DSSd0 (A.120; B.292)	88	12
13	TNEKVELQELNDR - SKFADLSEAA NR	DSSd0 (A.104; B.294)	87	13
14	FANYIDKVR - SKFADLSEAA NR	DSSd0 (A.120; B.294)	86	14
15	FANYIDKVR - FANYIDK VR	DSSd0 (A.120; B.120)	84	16
16	FLEQQNKILLAELEQLK - SKFADLSEAA NR	DSSd0 (A.129; B.294)	84	16
17	TNEKVELQELNDR - NLQEAEEWYK SK	DSSd0 (A.104; B.292)	79	21
18	FANYIDKVR - QAKQESTEYR	DSSd0 (A.120; B.313)	77	23
19	VELQELNDRFANYIDKVR - FLEQQNKILLAELEQLK	DSSd0 (A.120; B.129)	68	32
20	SKFADLSEAA NR - ETNLDLPLVDTHS KR	DSSd0 (A.294; B.439)	52	48
21	QQYESVAAK NLQEAEEWYK - QQYESVAAK NLQEAEEWYK	DSSd0 (A.282; B.282)	51	49
22	KVESLQEEIAFLK - KVESLQEEIAFLK	DSSd0 (A.223; B.223)	51	49
23	NLQEAEEWYK SK - SKFADLSEAA NR	DSSd0 (A.292; B.294)	50	50
24	ETNLDLPLVDTHS KR - ETNLDLPLVDTHS KR	DSSd0 (A.439; B.439)	50	50
25	ILLAELEQLKGQGK - ILLAELEQLKGQGK	DSSd0 (A.139; B.139)	50	50
26	TNEKVELQELNDR - TNEKVELQELNDR	DSSd0 (A.104; B.104)	47	53
27	QQYESVAAK NLQEAEEWYK - QAKQESTEYR	DSSd0 (A.282; B.313)	47	53
28	ILLAELEQLKGQGK - GQGKSR	DSSd0 (A.139; B.143)	47	53
29	FANYIDKVR - FLEQQNKILLAELEQLK	DSSd0 (A.120; B.129)	46	54
30	QQYESVAAK NLQEAEEWYK - NLQEAEEWYK SK	DSSd0 (A.282; B.292)	46	54
31	SKFADLSEAA NR - SKFADLSEAA NR	DSSd0 (A.294; B.294)	45	55
32	KVESLQEEIAFLK - KVESLQEEIAFLK	DSSd0 (A.223; B.223)	45	55
33	ILLAELEQLKGQGK - GQGKSR	DSSd0 (A.139; B.143)	45	55
34	GQGKSR - GQGKSR	DSSd0 (A.143; B.143)	42	58
35	FANYIDKVR - VRFLEQQNKILLAELEQLK	DSSd0 (A.120; B.129)	42	58
36	FANYIDKVR - QVDQLTNDKAR	DSSd0 (A.120; B.168)	42	58
37	LHEEEIQELQAIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALR - QAKQESTEYRR	DSSd0 (A.262; B.313)	40	60
38	NLQEAEEWYK SK - SKFADLSEAA NR NDALR	DSSd0 (A.292; B.294)	39	61
39	FANYIDKVR - FLEQQNKILLAELEQLKGQGKSR	DSSd0 (A.120; B.129); DSSd0 (B.139; B.143)	39	61
40	LHEEEIQELQAIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALR - QAKQESTEYR	DSSd0 (A.262; B.313)	37	63
41	FLEQQNKILLAELEQLK - ETNLDLPLVDTHS KR	DSSd0 (A.129; B.439)	33	67
42	FANYIDKVR - TLLIKTVETR	DSSd0 (A.120; B.445)	32	68
43	KVESLQEEIAFLK - SKFADLSEAA NR	DSSd0 (A.223; B.294)	30	70
44	FANYIDKVR - ETNLDLPLVDTHS KR	DSSd0 (A.120; B.439)	25	75
45	FANYIDKVR - ILLAELEQLKGQGK	DSSd0 (A.120; B.139)	24	76
46	SKFADLSEAA NR - QAKQESTEYR	DSSd0 (A.294; B.313)	22	78
47	KLLEGEESR - TLLIKTVETR	DSSd0 (A.402; B.445)	22	78
48	SKFADLSEAA NR - QAKQESTEYRR	DSSd0 (A.294; B.313)	22	78
49	LQDEIQNMKEEMAR - ETNLDLPLVDTHS KR	DSSd0 (A.373; B.439)	18	82
50	KLLEGEESR - ETNLDLPLVDTHS KR	DSSd0 (A.402; B.439)	17	83
51	LQDEIQNMKEEMAR - TLLIKTVETR	DSSd0 (A.373; B.445)	16	84
52	KLLEGEESR - RTLLIKTVETR	DSSd0 (A.402; B.445)	16	84
53	NLQEAEEWYK SK - QAKQESTEYR	DSSd0 (A.292; B.313)	15	85
54	NLQEAEEWYK SK - QAKQESTEYRR	DSSd0 (A.292; B.313)	14	86
55	LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - TNEKVELQELNDR	DSSd0 (A.97; B.104)	14	86
56	QQYESVAAK NLQEAEEWYK - SKFADLSEAA NR	DSSd0 (A.282; B.294)	5	95
57	TNEKVELQELNDR - FANYIDKVR	DSSd0 (A.104; B.120)	5	95
58	LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - FANYIDKVR	DSSd0 (A.97; B.120)	4	96

Příloha 3. Identifikované intradimerní nebo intramolekulární (označeny žlutě) a intrapeptidové (označeny zeleně) produkty chemického sítění. Modifikované aminokyseliny činidlem DSS jsou vyznačeny červeně.

	Sítěné peptidy (A - B)	Modifikované aminokyseliny	Interdimerní sítění (%)	Intradimerní sítění (%)
59	TNEKVELQELNDR - FLEQQNKILLAELEQLK	DSSd0 (A.104; B.129)	0	100
60	TNEKVELQELNDR - ILLAELEQLKGQGK	DSSd0 (A.104; B.139)	0	100
61	NTRTNEKVELQELNDRFANYIDK - MALDIEIATYRKLEGEESR	DSSd0 (A.104; B.402)	0	100
62	FANYIDKVR - GQGKSR	DSSd0 (A.120; B.143)	0	100
63	FANYIDKVR - KVESLQEEIAFLK	DSSd0 (A.120; B.223)	0	100
64	FANYIDKVR - KLHEEEIQELQAQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALR	DSSd0 (A.120; B.236)	0	100
65	FANYIDKVR - LQDEIQNMKEEMAR	DSSd0 (A.120; B.373)	0	100
66	FLEQQNKILLAELEQLK - GQGKSR	DSSd0 (A.129; B.143)	0	100
67	ILLAELEQLKGQGK - QVDQLTNDKAR	DSSd0 (A.139; B.168)	0	100
68	ILLAELEQLKGQGK - LQDEIQNMKEEMAR	DSSd0 (A.139; B.373)	0	100
69	GQGKSR - KLHEEEIQELQAQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALR	DSSd0 (A.143; B.236)	0	100
70	GQGKSR - QAKQESTEYRR	DSSd0 (A.143; B.313)	0	100
71	LREKIQEEMLQR - MALDIEIATYRKLEGEESR	DSSd0 (A.188; B.402)	0	100
72	KVESLQEEIAFLK - QQYESVAAKNLQEAEEWYK	DSSd0 (A.223; B.282)	0	100
73	KVESLQEEIAFLK - QAKQESTEYRR	DSSd0 (A.223; B.313)	0	100
74	KLHEEEIQELQAQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALR - QAKQESTEYRR	DSSd0 (A.236; B.313)	0	100
75	QAKQESTEYR - ETNLDLPLVDTHSKR	DSSd0 (A.313; B.439)	0	100
76	RQVQSLTCEVDALKGTNESLER - HLERYQDLLNVKMALDIEIATYRK	DSSd0 (A.334; B.390)	0	100
77	ETNLDLPLVDTHSKR - TLLIKTVETR	DSSd0 (A.439; B.445)	0	100
78	TLLIKTVETR - TLLIKTVETR	DSSd0 (A.445; B.445)	0	100
79	LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - TNEKVELQELNDRFANYIDK	DSSd0 (A.97; B.104)	0	100
80	MATRSVSSSSYRR - QVDQLTNDKAR	DSSd0 (A.N-terminus; B.168)	0	100
81	MATR - LRSSVPGVRLQDSVDFSLADAINTEFKNTR	DSSd0 (A.N-terminus; B.97)	0	100
82	TNEKVELQELNDRFANYIDKVR	DSSd0 (104; 120)	0	100
83	FANYIDKVRFLQEQNKILLAELEQLK	DSSd0 (120; 129)	0	100
84	FLEQQNKILLAELEQLKGQGK	DSSd0 (129; 139)	0	100
85	ILLAELEQLKGQGKSR	DSSd0 (139; 143)	0	100
86	ILLAELEQLKGQGKSRGLDLYEEEMR	DSSd0 (139; 143)	0	100
87	KVESLQEEIAFLK	DSSd0 (223; 235)	0	100
88	QQYESVAAKNLQEAEEWYKSK	DSSd0 (282; 292)	0	100
89	QQYESVAAKNLQEAEEWYKSKFADLSEAAANR	DSSd0 (282; 292)	0	100
90	NLQEAEEWYKSKFADLSEAAANR	DSSd0 (292; 294)	0	100
91	NLQEAEEWYKSKFADLSEAAANRNNDALR	DSSd0 (292; 294)	0	100
92	ETNLDLPLVDTHSKRLLIKTVETR	DSSd0 (439; 445)	0	100