

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Barbora Jirečková

PŘÍPRAVA A VYUŽITÍ PROTEAS VHODNÝCH KE STUDIU
STRUKTURY PROTEINŮ.

Preparation of proteases for protein structure studies.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Petr Man, Ph.D.

Praha 2022

Poděkování

Ráda bych srdečně poděkovala svému vedoucímu diplomové práce, RNDr. Petru Manovi, PhD. za jeho ochotu vysvětlit danou problematiku, trpělivost, důslednost a také empatii, kterou projevil po rozvoji mých zdravotních obtíží během magisterského studia. Moje poděkování patří také Mgr. Marku Polákovi za cenné rady a instrukce při imobilizaci proteas. Děkuji Mgr. Dmitry Loginovi, PhD. za napsání skriptu v Pythonu a RNDr. Danielu Kavanovi, PhD. za vytvoření programu Heisslogo. V neposlední radě bych ráda poděkovala celému týmu Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace za vytvoření příjemné atmosféry během práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu a vytvoření prostoru pro odreagování se.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

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

V Praze dne

Abstrakt

Vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS) je metoda, která umožňuje studium struktury a dynamiky proteinů. Pro lokalizaci této výměny je do HDX-MS zařazena proteolýza analyzovaného proteinu, která určuje prostorové rozlišení. Standardně se používá pepsin, který má ale své limitace, a také štěpení pouze jednou proteasou často neposkytuje optimální prostorové rozlišení. V několika publikacích byl akcentován význam alternativních proteas nepenthesinu-2 (Nep-2) a aspergillopepsinu (XIII), které oproti pepsinu štěpí za bazickými aminokyselinami. Při studiu na prolin bohatých proteinů získává význam prolyl endoproteasa z *Aspergillus niger* (*AnPEP*).

Tato práce se zabývá charakterizací imobilizovaného *AnPEP*u v kombinaci s proteasami pepsinem, aspergillopepsinem nebo Nep-2 za účelem jejich aplikace v HDX-MS. Nejprve byly na sadě modelových proteinů otestovány kolony s pouze jednou proteasou. Bylo zjištěno, že imobilizovaný *AnPEP* oproti ostatním proteasám nemá optimální štěpné charakteristiky. Za účelem spojení výhod výše uvedených proteas byly modelové proteiny štěpeny pomocí kolon s *AnPEP* koimobilizovaným s pepsinem, Nep-2 nebo XIII a také pomocí dvou proteasových kolon v sériovém zapojení (vždy *AnPEP* kolona s pepsinovou, Nep-2 nebo XIII kolonou v obou směrech). V rámci štěpení modelových proteinů se ukázala jako nejvhodnější koimobilizovaná kolona *AnPEP*u s Nep-2 při průtoku 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Vytvořené kolony byly aplikovány na štěpení protilátky trastuzumab (Herceptin), která má terapeutický význam. V tomto případě se jako optimální jevila koimobilizovaná kolona XIII a *AnPEP* při 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Dále byla na modelových proteinech testována opakovatelnost peptidů generovaných vybranými proteolytickými nosiči. Tento parametr byl nejvíce vyhovující pro pepsinovou kolonu a naopak nejhorší opakovatelnost měla *AnPEP*ová kolona. Pro dosažení optimální opakovatelnosti je proto vhodné použít *AnPEP* v kombinaci s jinými proteasami, nikoliv však v tandemovém zapojení, kdy je *AnPEP*ová kolona zařazena jako první.

Abstract

Hydrogen/deuterium exchange coupled with mass spectrometry (HDX-MS) is a method allowing the study of protein structure and dynamics. Its spatial resolution is given by the proteolysis step that is included in the HDX-MS workflow. Most widely used pepsin has however some limitations and use of a single protease often does not provide optimal spatial resolution. Several publications have emphasized the importance of the alternative proteases nepenthesin-2 (Nep-2) and aspergillopepsin (XIII) cleaving, in contrast to pepsin, after basic amino acids. In studies targeting proline-rich proteins, another enzyme, prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* (*AnPEP*), is gaining importance.

This work focuses on the characterization of immobilized *AnPEP* in combination with pepsin, aspergillopepsin or Nep-2 for their application in HDX-MS. First, columns with only one protease were tested on a set of model proteins. It was found that immobilized *AnPEP* did not have optimal cleavage characteristics compared to the other proteases. In order to combine the advantages of the proteases mentioned above, the model proteins were digested using columns with *AnPEP* coimmobilized with pepsin, Nep-2 or XIII and also using two protease columns in series (always *AnPEP* column with pepsin, Nep-2 or XIII column in both orientations). Here, the *AnPEP* column coimmobilized with Nep-2 at a flow rate of 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ proved to be the most suitable. In the next step, detailed digestion analysis was performed on a therapeutically important antibody trastuzumab (Herceptin). In this case, the coimmobilized XIII and *AnPEP* column at 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ appeared to be optimal. Furthermore, the repeatability of peptides generated by the selected protease columns was tested on the model proteins. This parameter was most satisfactory for the pepsin column and, in contrast, the *AnPEP* column had the worst repeatability. Therefore, to achieve optimal repeatability, it is advisable to use *AnPEP* in combination with other proteases, but not in a tandem setup where the *AnPEP* column is included first.

Obsah

Seznam zkratk.....	8
1 Úvod.....	10
1.1 Proteasy.....	10
1.2 Využití proteas v průmyslu.....	11
1.3 Využití proteas pro výzkumné účely	12
1.3.1 Klasická proteomika.....	12
1.4 Vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií.....	16
1.4.1 Využití HDX-MS	17
1.4.2 Princip HDX-MS.....	17
1.4.3 Praktické aspekty HDX-MS.....	19
1.4.4 Proteasy používané v HDX-MS	21
1.4.5 Optimalizace proteolytického kroku v HDX-MS.....	22
1.4.6 Zpracování dat v HDX-MS	23
1.5 Možnosti experimentálního provedení proteolýzy	24
1.6 Aspergillopepsin (proteasa XIII)	26
1.7 Rhizopuspepsin (proteasa XVIII)	28
1.8 Nepenthesiny	29
1.9 Prolyl endoproteasa z <i>Aspergillus niger</i>	31
2 Cíle práce	36
3 Experimentální část.....	37
3.1 Materiál.....	37
3.1.1 Přístroje a pomůcky	37
3.1.2 Chemikálie.....	38
3.1.3 Pufry a roztoky	39
3.1.4 Proteiny.....	40
3.2 Metody.....	41
3.2.1 Příprava roztoku <i>AnPEP</i> proteasy z kapsle Tolerase G.....	41
3.2.2 Převedení <i>AnPEP</i> proteasy z Tolerase G a Brewers Clarex do citrátového pufry o pH 5,0	41
3.2.3 Stanovení koncentrace celkového proteinu	41

3.2.4	Deglykosylace <i>AnPEP</i> proteasy.....	43
3.2.5	Proteinový profil Brewers Clarex a Tolerase G	44
3.2.6	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE).....	45
3.2.7	Imobilizace proteas.....	47
3.2.8	Plnění kolon.....	49
3.2.9	Štěpení vybraných proteinů pomocí proteasových kolon.....	50
3.2.10	Ultraúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS).....	55
3.2.11	MALDI-TOF-MS.....	61
4	Výsledky	62
4.1	Koncentrace celkového proteinu.....	62
4.1.1	Stanovení koncentrace celkového proteinu pomocí BCA.....	62
4.1.2	Stanovení celkového proteinu při 280 nm.....	62
4.2	Deglykosylace <i>AnPEP</i> proteasy.....	62
4.3	SDS-PAGE zdrojů <i>AnPEP</i>	63
4.4	Proteinový profil Brewers Clarex a Tolerase G.....	64
4.5	Štěpení proteinového mixu pomocí imobilizovaných proteas.....	65
4.5.1	Kolony obsahující pouze jednu proteasu.....	65
4.5.2	Kombinace pepsinu a <i>AnPEP</i> proteasy.....	73
4.5.3	Kombinace Nep-2 a <i>AnPEP</i> proteasy	77
4.5.4	Kombinace proteasy typu XIII a <i>AnPEP</i>	79
4.5.5	Výběr nejvhodnější kombinace imobilizovaných proteas pro HDX-MS.....	82
4.6	Štěpení protilátky trastuzumab (Herceptin) pomocí imobilizovaných proteas.....	84
4.7	Opakovatelnost LC-MS/MS analýz.....	88
5	Diskuze.....	96
6	Závěr	104
7	Literatura	105
	Přílohy	111

Seznam zkratek

AnPEP	prolyl endoproteasa z <i>Aspergillus niger</i> (<i>Aspergillus niger</i> prolyl endoprotease)
APS	peroxodisíran amonný (z angl. amonium persulfate)
BCA	bicinchoninová kyselina (z angl. bicinchoninic acid)
bCA2	bovinní karbonická anhydrasa 2 (z angl. bovine carbonic anhydrase 2)
BSA	bovinní sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
CCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (z angl. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)
DPP7	dipeptidyl peptidasa 2
FA	kyselina mravenčí (z angl. formic acid)
FDR	míra falešně pozitivních výsledků (z angl. False Discovery Rate)
HDX	vodík/deuteriová výměna (z angl. hydrogen/deuterium exchange)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
kDa	kilodalton
LC	kapalinová chromatografie (z angl. liquid chromatography)
MALDI	ionizace/desorpce laserem v přítomnosti matrice (z angl. matrix assisted laser desorption ionization)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (z angl. tandem mass spectrometry)
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
PASEF	paralelní akumulace a sériová fragmentace (z angl. parallel accumulation serial fragmentation)

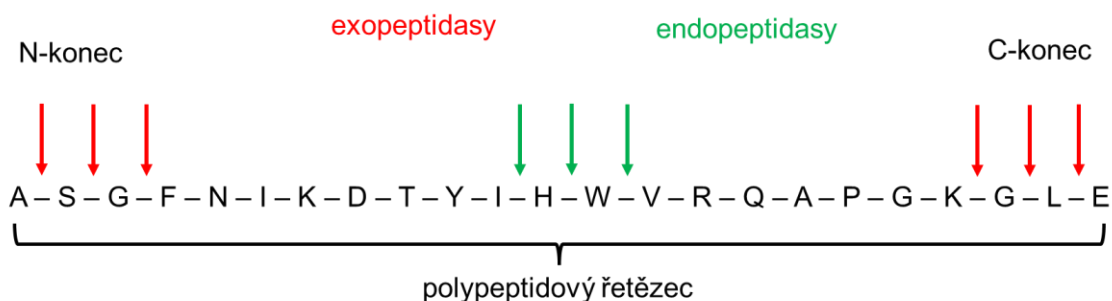
PBP	penicilin-vázací protein
PRCP	Pro-X karboxypeptidasa
Rhizopuspepsin, proteasa XVIII	Rpn
rNep-1	rekombinantní nepenthesin-1
Nep-2	nepenthesin-2
SA	kyselina sinapová (z angl. sinapinic acid)
SDS	dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecyl sulphate)
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)-ethan (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin)
TIMS	iontová mobilitní spektrometrie se záchytem iontů (z angl. trapped ion mobility spectrometry)
TOF	analyzátor doby letu (z angl. time of flight)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (z angl. ultra-performance liquid chromatography)
w/w	hmotnostní poměr (z angl. weight for weight)
XIC	extrahovaný chromatogram iontu (z angl. Extracted ion chromatogram)
XIII	Proteasa XIII, aspergillopepsin

1 Úvod

1.1 Proteasy

Proteasy mají nezastupitelnou roli v lidském těle, kde regulují např. buněčný cyklus, imunitní odpověď a degradaci bílkovin potravy skrze katalýzu hydrolytického štěpení peptidových vazeb proteinů. Vzhledem k tomu, že ovlivňují fyziologické pochody na několika úrovních, mohou být využity jako biomarkery při diagnostice onemocnění způsobených dysregulací proteolýzy jako jsou např. nádorová onemocnění.¹

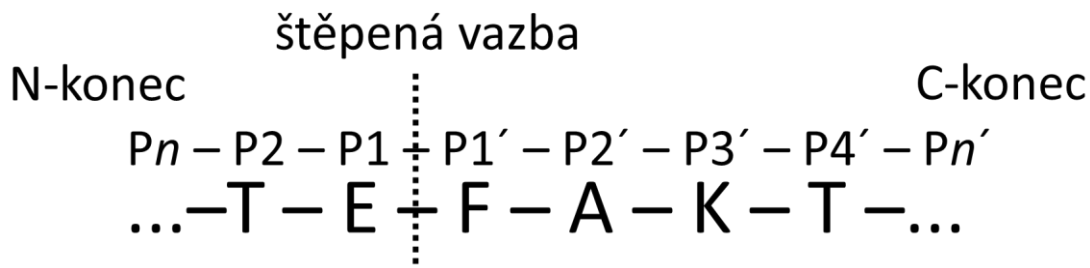
Podle toho, jestli proteasy štěpí peptidové vazby uvnitř polypeptidového řetězce nebo v blízkosti jeho N- či C-konce, je dělíme na endopeptidasy a exopeptidasy (Obr. 1).



Obr. 1 – Rozdělení proteas podle umístění štěpené peptidové vazby. Endopeptidasy štěpí uvnitř polypeptidového řetězce a exopeptidasy štěpí v blízkosti jeho N- či C- konce.

Na základě mechanismu účinku, který souvisí se složením aktivního místa, rozlišujeme serinové, aspartátové, cysteinové a metalloproteasy.²

Aktivní centrum proteasy se skládá z podmíst, která vážou substrát a mají katalytickou funkci. Na substrátu jsou označovány jako P_n , kde n je vzdálenost dané aminokyseliny od štěpené peptidové vazby. Aminokyseliny P_1 až P_n se nachází vlevo od štěpené vazby směrem k N-konci sekvence proteinového substrátu, zatímco aminokyseliny P_1' až P_n' vpravo směrem k C-konci (Obr. 2, str. 11).³



Obr. 2 – Nomenklatura štěpení. Aminokyseliny na proteinovém substrátu jsou číslovány směrem od štěpené peptidové vazby. Ty, které se nachází vlevo od štěpené vazby se označují jako P1-Pn a vpravo jako P1'-Pn'. V tomto případě došlo ke štěpení za glutamátem (E), který se stal C-koncovou aminokyselinou jednoho z nově vzniklých peptidů. Zatímco fenylalanin (F) se stal N-koncovou aminokyselinou druhého peptidu.

1.2 Využití proteas v průmyslu

Proteasy nachází uplatnění v potravinářském průmyslu, protože hydrolyzou specifických proteinů ovlivní vlastnosti jídla jako je chuť, konzistence, stravitelnost a alergenita.⁴

Protelolytické enzymy jsou také běžnou přísadou pracích prostředků. Zde je žádoucí, aby měla proteasa používaná pro tento účel širokou substrátovou specifitu, která zprostředkuje odstranění skvrn od jídla, krve a jiných tělních tekutin. Další důležitou vlastností je aktivita a stabilita v širokém rozsahu teplot a pH a v prostředí chelatačních a oxidačních činidel.^{4,5} Je také vhodné, aby se izoelektrický bod proteasy shodoval s pH detergentu. Nejčastěji se v tomto odvětví používají serinové proteasy produkované bakterií z rodu *Bacillus*.⁵

Proteasy najdou své uplatnění i ve farmaceutickém průmyslu. V 80. letech 20. století byl na trh uveden rekombinantní tkáňový aktivátor plasminogenu (alteplasa), který funguje jako fibrinolytikum. Extrakt z vepřové pankreatické tkáně obsahující definovanou směs proteas, amylas a lipas se používá v rámci substituční terapie při exokrinní nedostatečnosti pankreatu, se kterou se často potýkají pacienti s cystickou fibrózou.⁶

Po cíleném proteolytickém štěpení mohou vzniknout bioaktivní peptidy, které se dále využijí pro svůj antimikrobiální, antioxidační či antihypertenzní efekt.⁴ Celiakie je příkladem, kdy bioaktivní peptidy nejsou žádoucí a je potřeba je degradovat. Ve chvíli, kdy pacient s touto nemocí pozře potravinu obsahující gliadin, vznikají v jeho těle imunogenní

peptidy. Protože jsou gliadiny velmi bohaté na prolin, je možné tyto peptidy cíleně degradovat pomocí enzymů štěpících za touto aminokyselinou. Za tímto účelem se využívá prolyl endopeptidasa z *Aspergillus niger* a podobný efekt byl prokázán i u extraktu z rostliny *Nepenthes gracilis*. Při podání 5 mg tohoto extraktu na 50 g denního příjmu proteinů by nemuselo být nutné dodržovat bezlepkovou dietu. Nicméně pro potvrzení je potřeba provést klinické studie.⁷

1.3 Využití proteas pro výzkumné účely

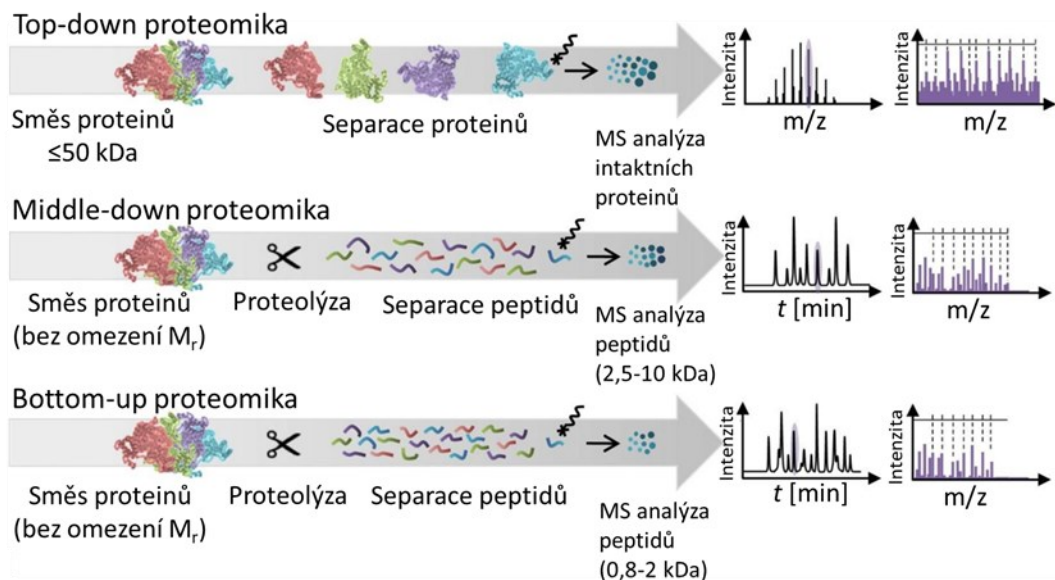
Proteiny jsou významnou součástí každé lidské buňky. Změna jejich struktury úzce souvisí s jejich funkcí. Např. ve změně jejich exprese, modifikaci a ztrátě biologické aktivity leží podstata nejrůznějších chorob.

Metody spojené s hmotnostní spektrometrií v dnešní době umožňují věrohodnou identifikaci proteinů a detailní strukturní analýzu. Klasická proteomika se zabývá především identifikací proteinů a jejich posttranslačními modifikacemi. Strukturní proteomika (např. vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS)) klade důraz na studium dynamiky, konformace a interakcí proteinu v roztoku a jak jsou tyto vlastnosti spojeny s jeho funkcí.

1.3.1 Klasická proteomika

Výchozím materiálem pro proteomický experiment je nejčastěji buněčný lyzát, ze kterého jsou izolovány proteiny. Ty mohou být dále purifikovány např. pomocí vylučovací, iontové výměnné či afinitní chromatografie. Afinitní chromatografie je vhodným nástrojem pro nabohacení posttranslačně modifikovaných proteinů, které mají regulační roli, a vyskytují se tak ve velmi nízkých koncentracích nedetegovatelných pomocí MS.⁸

Proteomický přístup odlišujeme na základě přípravy vzorku, přesněji využití proteas, na tzv. top-down, middle-down a bottom-up. Middle-down a bottom-up experimenty zahrnují, na rozdíl od top-down, proteolytický krok před MS analýzou (Obr. 3, str. 13).

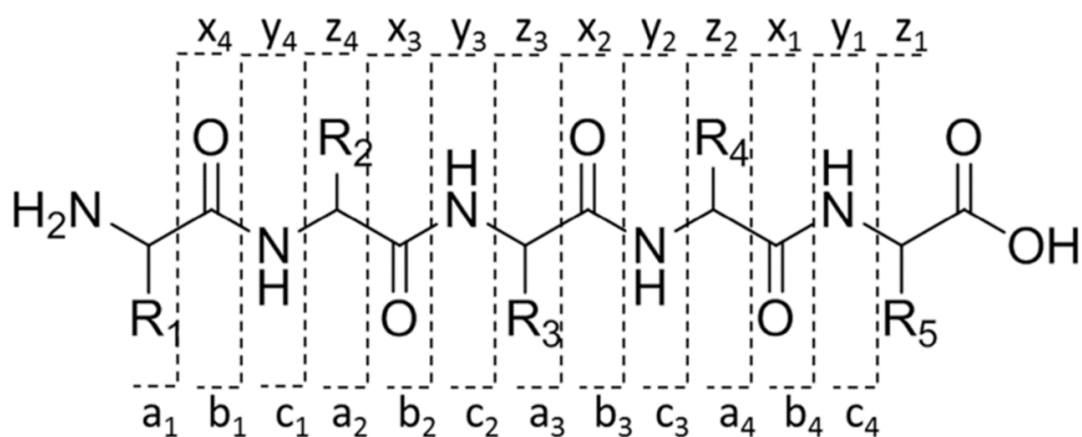


Obr. 3 – Typy proteomických přístupů. V bottom-up a middle-down proteomice je směs proteinů štěpena specifickou proteasou na peptidy, které jsou separovány (nejčastěji pomocí UPLC). Následuje MS/MS analýza, na základě které jsme schopni pomocí počítačových algoritmů identifikovat sekvence peptidů. U middle-down vznikají delší peptidy než u bottom-up přístupu. V top-down proteomice se analyzují intaktní proteiny bez předchozího proteolytického štěpení. Po jejich separaci (často 2D) jsou generována data pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie umožňující identifikaci konkrétních proteoforem a analýzu posttranslačních modifikací. Převzato a upraveno z [61].

Top-down proteomika se zabývá analýzou intaktních proteinů a jejich fragmentů pomocí hmotnostní spektrometrie. Na základě určení hmotnosti několikanásobně nabitých produktových iontů, jsme schopni identifikovat daný protein. Pro dosažení věrohodné identifikace proteinu je v případě top-down nutné analyzovat protein pomocí hmotnostních spektrometrů s vysokým rozlišením a přesností měření.⁹ Často volbou je Orbitrap nebo iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR). Další možností je využití hybridních analyzátorů jako je např. analyzátor doby letu s kvadrupólem. Vzhledem ke komplexnosti proteinových spekter je top-down přístup vhodný spíše pro analýzu izolovaných proteinů nebo jednoduchých proteinových směsí.^{8,9} Nicméně Bunger M. K. et al publikovali protokol, na základě kterého identifikovali 174 proteinů v komplexním vzorku lyzátu *E. coli*.¹⁰ Fragmentace intaktního proteinu v hmotnostním

spektrometru umožňuje potvrzení jeho identifikace, získání informací o posttranslačních modifikacích a odlišení proteoformem.¹¹ Z fragmentačních metod se upřednostňují disociace záchytem elektronu (ECD) a disociace přenosem elektronu (ETD) před kolizně indukovanou disociací (CID). Tyto metody jsou sice málo efektivní, ale mají výhodu v tom, že při jejich použití nedochází ke ztrátě labilní posttranslační modifikace. Dochází k fragmentaci vazby mezi alfa uhlíkem a amidovým dusíkem a vznikají charakteristické c a z ionty (Obr. 4).¹² Informace o aminokyselinové sekvenci z ETD/ECD a CID jsou vůči sobě komplementární. Výhodou top-down přístupu je, že dochází k téměř kompletnímu pokrytí sekvence a poskytuje věrohodnou kvantifikaci.⁹ Nejnovějším přístupem je využití fragmentace pomocí UV laserů (UVPD), která vede ke komplexnější disociaci avšak se zachováním posttranslačních modifikací.¹³

V bottom-up proteomice jsou proteiny enzymaticky štěpeny proteasami nebo chemickými činidly jako je např. CNBr.^{8,14} Vznikají peptidy o délce 0,8-2 kDa (<20–25 aminokyselin), které jsou následně fragmentovány pomocí CID.^{9,15} Dochází přednostně ke štěpení mezi karbonylovou a amidovou skupinou peptidové vazby, což dá vznik b a y iontům (Obr. 4) dominujícím MS/MS spektru. Experimentálně změřená MS/MS data jsou následně pomocí počítačového algoritmu (např. MASCOT, Sequest¹⁶) prohledána proti proteinové databázi. Tímto způsobem jsme schopni skrze jednotlivé peptidy identifikovat proteiny, ze kterých pochází.⁹



Obr. 4 – Modelový peptid, na kterém jsou znázorněny série iontů vznikající po fragmentaci v hmotnostním spektrometru. B a y ionty dominují spektru po fragmentaci pomocí CID. C a z ionty po fragmentaci pomocí ETD a ECD. Převzato z [12].

Proteolýza významně ovlivňuje úspěšnost a spolehlivost identifikace proteinové sekvence a posttranslačních modifikací. V bottom-up a middle-down proteomice by bylo ideální dosáhnout u co nejvyššího počtu proteinů ve vzorku takového pokrytí sekvence, které zajistí jejich spolehlivou identifikaci. Standardně se používají specifické proteasy, u nichž je možné predikovat charakter peptidů na základě aminokyselinové sekvence substrátu. Dominantní postavení má trypsin, který štěpí preferenčně za bazickými aminokyselinami Lys a Arg.¹⁷ Tato vlastnost mu dává předpoklad pro úspěšnou sekvenaci pomocí CID. Nicméně vzhledem k přirozené distribuci těchto aminokyselin obsahují vzniklé peptidy až z 56 % méně než 6 reziduí, což je již hraniční pro jejich úspěšnou identifikaci pomocí MS.¹⁸ Pro analýzu jsou problematické také peptidy, kde bylo zásahové místo opomenuto (tzv. missed cleavage site). Jejich redukci (alespoň za Lys) lze zajistit pomocí štěpení kombinací proteas trypsinu a LysC. Další nevýhodou trypsinu je, že neštěpí za Lys/Arg, pokud se v jejich blízkosti vyskytuje Asp, Glu nebo fosforylovaný Ser/Thr. Sporné je štěpení trypsinu za Lys/Arg, pokud je v pozici P1' prolin. V některých publikacích je prolinu přisuzována inhibice štěpení¹⁹, v jiných je toto tvrzení vyvráceno.²⁰ Proteasy jako je např. LysC, GluC, LysargiNasa, generující delší peptidy, mohou být vhodnou alternativou trypsinu v proteomických experimentech.²¹ Nicméně žádná z nich neštěpí za prolinem. Tuto výhodnou vlastnost má proteasa Neprosin, která byla aplikována při analýze posttranslačních modifikací histonů.²²

V middle-down protokolech je protein podroben limitované proteolýze za vzniku peptidů o velikosti 2,5–10 kDa (25–100 aminokyselin). Vzniká méně peptidů, které jsou unikátnější, delší a poskytují méně komplexní směs. Tyto jsou sekvenovány fragmentací v MS, jako u top-down proteomiky. Dosahuje se vysokého sekvenčního pokrytí a snazšího označení místa posttranslačních modifikací.¹⁵ Využívá se především u analýzy histonů a jejich postranslačních modifikací, které významně ovlivňují epigenetickou regulaci genové exprese. Vlastnosti této metody dávají předpoklad pro rozlišení histonových variant, které jsou sekvenčně velmi podobné.²³ Limitovaná proteolýza může být provedena pomocí konvenčních proteas (trypsin, chymotrypsin, pepsin). V tomto případě se optimalizují podmínky štěpení (inkubační doba, teplota, pH a poměr enzym:substrát) tak, aby vznikaly delší peptidy.¹⁵

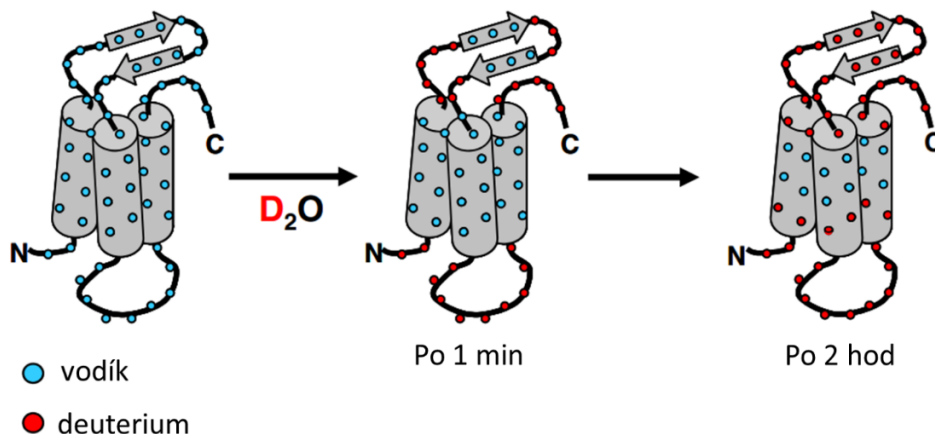
Druhou možností je použití proteas, které generují delší peptidy už při standardních podmínkách proteomického protokolu (37°C, poměr proteasa:substrát 1:50, pH 8,0), jako je např. AspN a LysC.²⁴

Proteinová/peptidová směs je separována pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC). UPLC separace významně ovlivňuje přesnost a citlivost následné hmotnostní detekce. S ohledem na to, že jsou proteiny polární, netěkavé a tepelně nestabilní, se v proteomice využívá elektrosprejová ionizace (ESI) a ionizace/desorpce laserem v přítomnosti matrice (MALDI). Vznikají ionty v plynné fázi, které jsou v hmotnostním analyzátoru rozděleny na základě poměru m/z.⁸

Dělení na top-down, middle down a bottom-up je používáno i u strukturní proteomiky (např. HDX-MS). Zařazení/absence proteolytického kroku se u výše uvedených přístupů shoduje s obecnou proteomikou. Nicméně požadavky na štěpné charakteristiky jsou u těchto metod odlišné.

1.4 Vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií

Vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS) je oblast strukturní proteomiky, která umožňuje studium proteinu v roztoku. V roce 1991 tuto metodu ve spojení s elektrosprejovou ionizací poprvé představil Katta V. et al.²⁵ Je komplementární s konvenčními metodami strukturní analýzy jako je např. rentgenová krystalografie a nukleární magnetická rezonance.²⁶ HDX-MS sice neposkytuje vysoce rozlišené struktury, vhodně však doplňuje výše zmíněné techniky. Dokáže pracovat prakticky s jakýmkoliv proteinovým konstruktem, v libovolném pufru, pH nebo teplotě, s nízkou koncentrací proteinu a díky své rychlosti je vhodnou technikou i pro analýzu velkého počtu experimentálních podmínek.²⁷ Na Obr. 5, str. 17 je schematicky znázorněn časový průběh H/D výměny. Zpočátku budou deuterium vyměňovat amidové vodíky peptidové páteře přístupné rozpouštědлу, které nejsou zapojeny do vodíkových vazeb. Po uplynutí delší doby podléhají výměně už i amidové vodíky, které tvoří vodíkové vazby v alfa-helixech a beta-skládaných listech a také ty, které jsou sbaleny uvnitř globule. H/D výměnu lze monitorovat nejrůznějšími instrumentálními metodami jako je např. NMR



Obr. 5 – Schématické znázornění H/D výměny. Jakmile začne proces značení (protein je v nadbytku deuterovaného pufru), dochází k výměně amidových vodíků peptidové páteře. Krátce po začátku značení budou deuterium vyměňovat pouze amidové vodíky, které jsou přístupné rozpouštědлу (např. smyčky spojující alfa helixy). Po delší inkubaci začnou procesu vodík/deuteriové výměny podléhat i rozpouštědлу méně přístupné oblasti (např. alfa helix a beta skládaný list). Převzato a upraveno z [27].

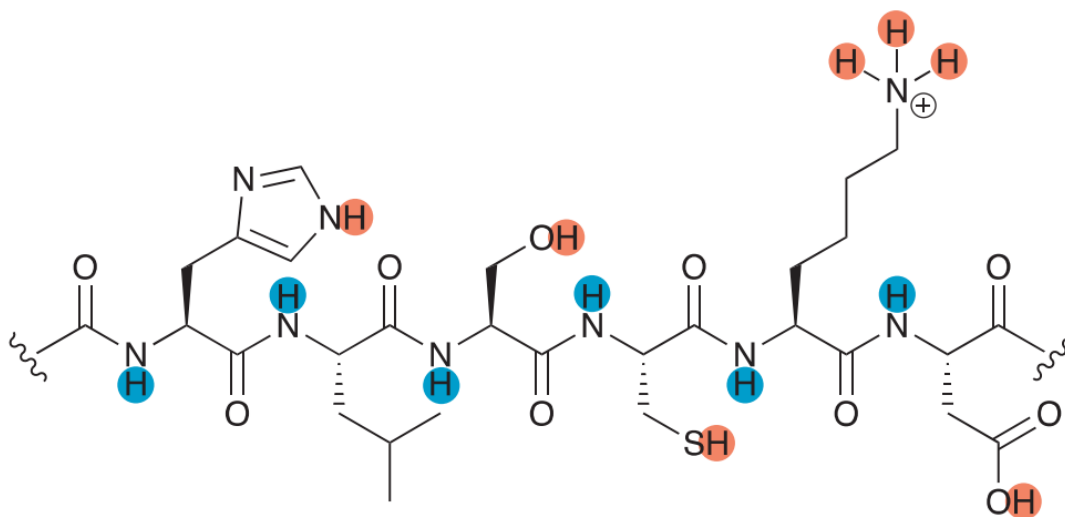
1.4.1 Využití HDX-MS

HDX-MS lze aplikovat v několika oblastech. První z nich je studium konformačních změn proteinů. U nemocí jako je srpkovitá anémie dochází k bodové mutaci genu pro hemoglobin, která způsobí výskyt valinu místo glutamové kyseliny v jeho aminokyselinové sekvenci. Záměna této aminokyseliny je doprovázena změnou struktury proteinu. V HDX-MS studiích se poté srovnává nativní a mutantní forma proteinu. Dalším využitím této metody je studium konformačních a dynamických změn proteinu vlivem vazby ligandu (např. léčiva), interakcí protilátka-antigen nebo interakcí mezi proteiny, multi-proteinových komplexů a procesu sbalování proteinů.^{26,27,29,30}

1.4.2 Princip HDX-MS

Základní princip HDX-MS využívá skutečnosti, že protein neustále vyměňuje své vodíky s těmi v roztoku. Pokud vodný pufr nahradíme deuterovaným, můžeme tuto výměnu sledovat. Měřitelná je ale pouze deuteriová výměna amidových vodíků peptidové páteře

(Obr. 6), která je ovlivněna strukturou proteinu. Vzhledem k tomu, že téměř všechny aminokyseliny (kromě prolinu) obsahují amidový vodík, můžeme výměnu při dostatečném sekvenčním pokrytí monitorovat v rámci celé sekvence proteinu.^{27,29,30} Oproti tomu vodíky funkčních skupin postranních řetězců aminokyselin vyměňují deuterium rychlostí neměřitelnou pomocí MS (Obr. 6).³¹



Obr. 6 – Skupiny vodíků ve struktuře proteinu. Peptid His-Leu-Ser-Cys-Lys-Asp, na kterém jsou modře označeny vodíky peptidové páteře, které vyměňují deuterium rychlostí měřitelnou pomocí hmotnostního spektrometru. Červeně jsou označeny vodíky funkčních skupin postranních řetězců aminokyselin, které deuterium vyměňují neměřitelnou rychlostí a nemají analytický význam. Převzato z [31].

Rychlost deuteriové výměny je dána pH, teplotou, přístupností daných částí proteinu rozpouštědлу, vodíkovými vazbami a aminokyselinovou sekvencí. Teplota a pH jsou dány experimentálně a udržujeme je konstantní. Za těchto podmínek deuteriová výměna závisí pouze na přístupnosti rozpouštědлу, přítomnosti vodíkových vazeb v proteinu a proteinové sekvenci. Pokud jsou amidové vodíky peptidu/proteinu plně přístupné rozpouštědлу, vyměňují deuterium rychlostí 10–1000 s⁻¹. Oblasti smyček spojujících alfa helixy budou deuterium vyměňovat rychle, zatímco regiony s alfa helixy a beta-skládanými listy budou vyměňovat pomaleji, protože amidové vodíky jsou v těchto strukturách zapojeny do vodíkové vazby.^{27,32}

Sousedící aminokyseliny mohou vytvořit aditivní indukční a sterický efekt. Indukční efekt se vyskytuje u polárních aminokyselin jako je např. serin a zvyšuje rychlost

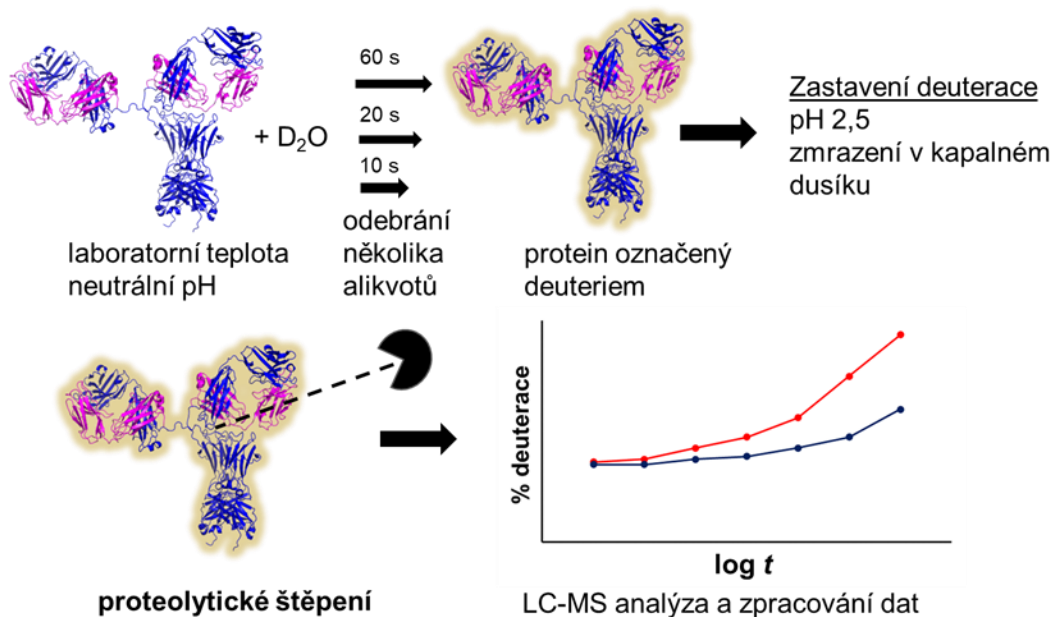
deuteriové výměny. Sterický efekt pozorujeme v přítomnosti leucinu v aminokyselinové sekvenci. Jeho výsledkem je menší přístupnost amidových vodíků peptidové páteře rozpouštědлу, jejíž důsledkem je snížená míra vodík/deuteriové výměny v této oblasti.³³

1.4.3 Praktické aspekty HDX-MS

Nejčastější provedení deuteriového značení je kontinuální. Roztok proteinu ve vodném pufru (standardně o pH 7, ale je možné zvolit i jiné pH) je ekvilibrován na pokojovou teplotu. Ředěním roztoku proteinu deuterovaným pufrům začíná proces značení. Ten je vždy zastaven po určitých časových úsecích. Pro analýzu je vhodné mít minimálně 4 body s takovým rozmezím, aby se první a poslední bod lišil o 4 řády (např. 0,1 min, 1 min, 10 min, 100 min a 1000 min).^{26,34} Značení je rychle ukončeno snížením pH na 2,5, kdy je výměna nejpomalejší, a zmrazením vzorku pomocí kapalného dusíku nebo minimálně ochlazením na 0 °C. Prakticky je to provedeno tak, že je protein v deuterovaném pufru ředěn do pufru zastavovacího (tzv. quench buffer). Do zastavovacího pufru je v případě analýzy stabilních proteinů možné přidat denaturant (např. močovina, thiomočovina) a redukční činidlo (např. TCEP), které zajistí lepší přístupnost proteinu pro proteasu.³⁵ Alternativou redukce disulfidových můstků pomocí chemického činidla je elektrochemická redukce v průtokové cele, která vykazuje výrazně vyšší efektivitu.³⁶ Výše uvedené podmínky zajistí zachování deuteriové značky pro MS analýzu.^{26,27}

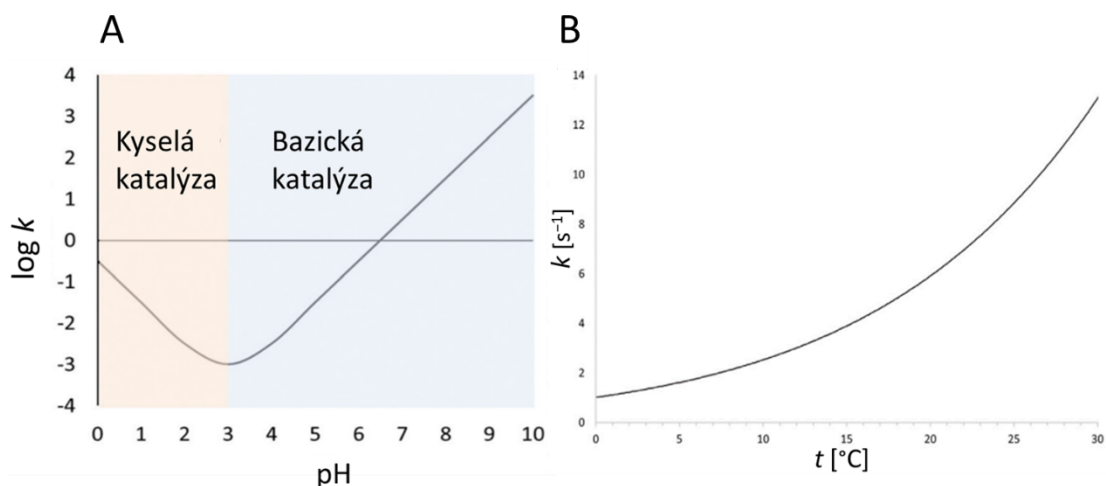
Takto připravený vzorek intaktního proteinu je možné analyzovat pomocí MS (top-down). Tímto způsobem lze získat pouze jeho molekulovou hmotnost a informaci o celkové deuteraci. Přesnější lokalizace deuteria dosáhneme fragmentací proteinu v hmotnostním spektrometru, nebo štěpením pomocí proteasy. Fragmentační techniky jako je CID nejsou pro HDX-MS vhodné. Při zahřátí iontu vlivem kolize s neutrálním plynem (CID) může dojít k tzv. scrambling procesu, neboli migraci vodíků a deuterií podél peptidové páteře a z toho vyplývající ztrátě informace o pozici deuteria. Proto je nutné pro tuto aplikaci použít méně energetické typy fragmentace (ETD, ECD).^{27,30}

Průběh HDX-MS experimentu při kontinuálním značení je na Obr. 7, str. 20.



Obr. 7– Průběh bottom-up HDX-MS experimentu při kontinuálním značení. Protein ve vodném pufru (pH 7) je při laboratorní teplotě ředěn do deuterovaného o jinak identickém složení. Značení je prováděno v několika (minimálně 4) časových úsecích. Deuterace je zastavena rapidním snížením teploty a pH. Za těchto podmínek je provedena proteolýza (např. pepsinem, nepenthesinem-2, aspergillopepsinem nebo jejich kombinací) v roztoku nebo na proteasové koloně zapojené do HDX-MS systému. Následuje LC-MS analýza a zpracování surových dat. Primárním výstupem je graf závislosti míry deuterace na čase značení. Srovnává se analyzovaný protein vystavený různým podmínkám, např. v přítomnosti inhibitoru a bez něj.

Aby získaná data vypovídala o skutečné, nativní, konformaci proteinu a jeho dynamice, je klíčové zachovat v co nejvyšší míře deuteriovou značku. Toho je možné dosáhnout za podmínek minimální výměny, tzn. pH 2,5 (Obr. 8A, str. 21) a teploty 0 °C (Obr. 8B, str. 21). Retence deuteriové značky může být zvýšena také zkrácením času separace (UPLC) na cca 10–15 min, provedením proteolýzy do 2 min a okamžitým nástřikem vzorku po jeho rozmrazení.^{26,37} Pro dosažení spolehlivých výsledků se také doporučuje připravit si triplikát vzorku proteinu pro alespoň jeden časový bod značení.³⁴



Obr. 8 – Experimentálně zjištěné podmínky minimální vodík/deuteriové výměny. A: Závislost logaritmu rychlostní konstanty vodík/deuteriové výměny ($\log k$) na pH. Oblast minimální výměny je mezi pH 2,5 a 3. Při typických HDX-MS experimentech je výměna prováděna při pH 7, to znamená, že je katalyzovaná bazicky. B: Závislost rychlostní konstanty vodík/deuteriové výměny (k) na teplotě. Minimální výměny je dosaženo při teplotě $0^{\circ}C$. Převzato a upraveno z [31] a [26].

S vývojem této metody přišla i robotická automatizace celého procesu přípravy vzorku od značení přes zastavení značení (quench) až k nástřiku vzorku do hmotnostního spektrometru. S tímto systémem byli schopni Espada A. et al analyzovat 24 vzorků s devíti časovými body během 3 hodin.³⁸

1.4.4 Proteasy používané v HDX-MS

Proteolytický krok ve vodík/deuteriové výměně určuje prostorové rozlišení metody. Je proto klíčové zvolit pro experimenty proteasu, která poskytne dostatečné (ideálně 100%) pokrytí sekvence proteinového substrátu a redundanci (počet překrývajících se peptidů). Vysoká redundance příznivě ovlivňuje prostorové rozlišení, protože je možné míru deuterace analyzovat několika nezávislými způsoby, jejichž množství je dáno počtem překrývajících se peptidů. Redundance ale nesmí být příliš vysoká, protože rozdělení proteinu na nadměrné množství peptidů sníží intenzitu signálu. Pro dosažení optimálního prostorového rozlišení je žádoucí redundance 4–8 a aby vzniklé peptidy obsahovaly 8–12 aminokyselin.^{39,40}

Vzhledem k tomu, že je proteolytický krok prováděn za podmínek minimální výměny (pH 2,3), používají se při HDX-MS experimentech převážně aspartátové (kyselé) proteasy.³⁰

Zlatým standardem je pepsin, který je běžně komerčně dostupný a byl již aplikován v mnoha studiích struktury proteinů.^{41–44} Štěpí nespécificky s převahou peptidů obsahujících na C-konci hydrofobní aminokyseliny F, W, L, M, ale i za řadou dalších aminokyselin.⁴⁵ Nespécifické štěpení pepsinem zvyšuje komplexitu dat, protože vzniká řada překrývajících se peptidů. Aby bylo možné k HDX-MS analýze vybrat pouze relevantní peptidy, je potřeba provést replikační měření za striktního dodržení stejných experimentálních podmínek. Po 5–10 opakování MS analýzy by mělo být dosaženo téměř konstantního počtu reprodukovatelných peptidů.⁴⁶ Pepsin má pH optimum v rozmezí pH 1,5–2,0, okolo pH 4 začne jeho aktivita klesat a když je pH vyšší než 6, dochází k jeho ireverzibilní inaktivaci.⁴⁷

Při studiu na prolin bohatých proteinů vznikají často po štěpení pepsinem příliš dlouhé peptidy. Důsledkem je obtížnější a méně přesná lokalizace vodík/deuteriové výměny. Proto je výhodné při těchto experimentech použít pepsin v kombinaci s proteasami, které mají schopnost za prolinem štěpit. Takovými proteasami jsou *AnPEP*⁴⁸ a *Neprosin*²², který štěpí převážně za prolinem a alaninem.

Použití více proteas s různými štěpnými charakteristikami je jednou z možností, jak zvýšit prostorové rozlišení metody HDX-MS. V několika publikacích bylo navrženo kombinovat pepsin s proteasami jako je např. *aspergillopepsin* (proteasa XIII)^{39,49,50}, *rhizopuspepsin* (proteasa XVIII)^{39,50,51}, *nepenthesin-2*⁵² a pepsin z *Monopterus albus*⁴⁶.

1.4.5 Optimalizace proteolytického kroku v HDX-MS

Vzhledem k tomu, že se v HDX-MS používá nejčastěji bottom-up přístup⁵³, bude zde referováno o zpracování surových dat u tohoto způsobu provedení.

Před provedením HDX-MS experimentu je nutné kontrolní štěpení neznačeného analyzovaného proteinu při pH 2,5 a 0 °C. Proteolýza probíhá za podmínek identických těm, které se využívají při vlastním HDX-MS experimentu (Obr. 9, str. 25). Tímto krokem se ověřuje, jestli vybraná proteasa poskytuje dostatečné sekvenční pokrytí, redundanci a vhodnou délku peptidů. Vzniklé peptidy jsou sekvenovány pomocí LC-MS/MS analýzy a identifikovány pomocí prohledávacích algoritmů.^{32,54}

Sady identifikovaných peptidů mohou být dále zpracovány pomocí webové aplikace *MSTools*⁵⁵, která umožňuje jejich pokročilejší vizualizaci. Po vložení vstupních souborů

umožňuje např. vykreslení peptidové mapy. Ta může při importu limitů *od-do* vzniklých peptidů zobrazit sekvenční pokrytí proteinu (P 23, str. 113) a překrývající se peptidy. Další možností je vykreslit v ní pouze zásahová místa proteasy bez ukázání redundance a sekvenčního pokrytí. V mapě je možné pro lepší orientaci označit vybrané aminokyseliny a strukturní motivy. Peptidová mapa je vhodná pro srovnání různých proteas nebo podmínek štěpení.

Další informace o provedené proteolýze lze získat např. pomocí makra v MS Excel⁴⁰ volně dostupného na internetu jako součást publikace v *Analytical Chemistry*. Tento nástroj umožňuje výpočet štěpných preferencí a parametrů štěpení (počet unikátních peptidů, průměrná délka peptidu, sekvenční pokrytí, efektivita štěpení a průměrná redundance). Informace o výpočtech v tomto makru jsou uvedeny v kap. 3.2.10.1, str. 56. Díky datům získaným pomocí tohoto nástroje můžeme vytvořit grafy zobrazující distribuci redundance (Obr. 26, str. 70) a délky peptidů (Obr. 32, str. 75) napříč proteinovou sekvencí. Distribuce redundance ukáže, kolikrát je každá aminokyselina pokryta, a vypovídá více o charakteru štěpení. Oproti tomu průměrná redundance může mít sice vyhovující hodnotu, ale ve skutečnosti je například jedna oblast sekvence pokryta minimálně a druhá naopak příliš mnoho. Graf distribuce redundance je tak vhodnější pro srovnání podmínek štěpení a posouzení komplementarity proteas. Graf distribuce délky peptidů zobrazí počty peptidů v daném rozmezí. V HDX-MS je vhodné, aby byla nejpočetnější skupina peptidů o délce 8–12 aminokyselin.⁴⁰

Optimalizace proteolýzy sestává z testování různých parametrů. Nejprve je protein štěpen na pepsinové koloně při 0 °C. Na základě sady identifikovaných peptidů je provedena analýza parametrů digesce – pokrytí sekvence, redundance a její distribuce, průměrná délka peptidu. Následně je testováno, jaký vliv má zvýšení teploty (kratší délka peptidů, menší redundance, efektivnější digesce), změna průtoku, použití redukčních a denaturačních činidel a různých proteasových kolon.^{39,40}

1.4.6 Zpracování dat v HDX-MS

Po optimalizaci proteolytického kroku následuje měření deuterovaných vzorků, lokalizace píků deuterovaných peptidů, analýza izotopové obálky a výpočet míry deuterace, statistická

analýza replikátů a nakonec vizualizace dat.⁵⁶

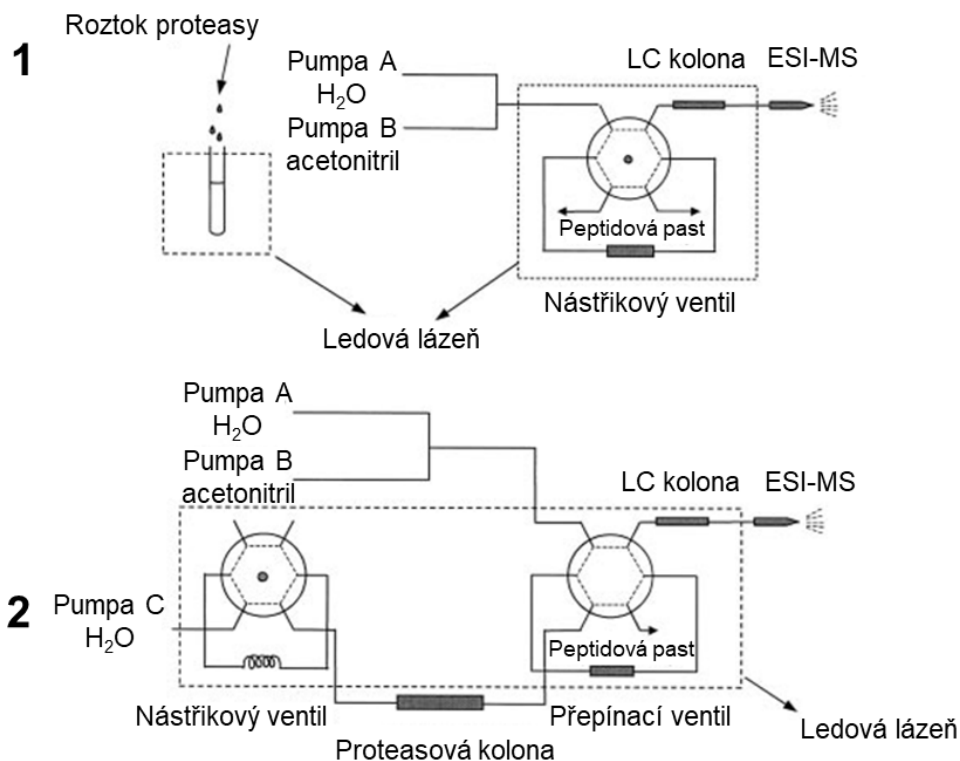
Míra deuterace je důležitým parametrem, který se spočítá na základě hmotnostních spekter nedeuterovaného a částečně deuterového (analyzovaného) peptidu. Při dostupnosti plně deuterované kontroly, je možné také provést výpočet korigovaný na ztrátu deuteria během analýzy. V současné době je její výpočet součástí komplexních softwarů, které mají řadu dalších funkcí. HXPIPE a HX-DEAL⁵⁷, které jsou součástí platformy Mass Spec Studio, zahrnují řešení aspektů napříč celým HDX-MS experimentem. Dalším příkladem je DeutEx, do kterého je možné importovat data z prakticky kteréhokoliv hmotnostního spektrometru, protože se do něj vkládají soubory ve formátu *.txt nebo *.csv.^{58,59} Tento software je kompatibilní s výše zmíněnou webovou aplikací MSTools.

1.5 Možnosti experimentálního provedení proteolýzy

V tom bottom-up a middle-down protokolech určuje proteolytický krok sekvenční pokrytí a redundanci peptidů, které mají vliv na úspěšnost vyhodnocení získaných dat a následné zkoumání např. změny struktury proteinu. Existuje několik možností, jak proteolýzu experimentálně provést. Nejčastějšími provedeními jsou štěpení proteinu v roztoku nebo imobilizace proteasy na pevný nosič.

V případě klasické proteomiky se štěpení proteinu v roztoku provádí typicky po dobu více než 5 h, ale relevantní data lze získat už po 2h štěpení. Také je potřeba zachovat nízký poměr enzym:substrát (1:20-1:100, w/w (hmotnostní poměr)⁶⁰), aby se zabránilo výskytu interferujících peptidů z autolýzy proteasy.^{61,62} Dále je důležité, aby byl charakter vzniklých peptidů predikovatelný.⁶³ V případě HDX-MS je proteolýza prováděna po dobu 1–2 min, protože při delším štěpení by došlo ke ztrátě deuteriové značky. Aby došlo za tak krátkou dobu k požadovanému rozsahu štěpení, volí se poměr proteasa:substrát 1:1 (w/w).⁶⁴ Autolýza enzymu je minimalizována krátkým časem štěpení a proteasy používané pro tyto aplikace jsou vůči ní obecně odolné.

Kromě štěpení proteinu v roztoku lze provést imobilizaci enzymu na pevný nosič. Tím mohou být povrchy různých polymerů jako je například CNBr aktivovaná Sepharosa (zesíťovaná agarosa)⁶⁵ nebo aldehydem aktivovaný polystyrendivinybenzen (POROS™ AL)⁶⁶. Příklad experimentálního uspořádání u HDX-MS se zapojením kolony s imobilizovanou proteasou je uveden na Obr. 9 (str. 25).



Obr. 9 – Ukázka způsobů provedení proteolýzy v HDX-MS experimentech. 1: štěpení v roztoku (offline), 2: štěpení pomocí proteasy imobilizované na nosič (online). Při obou provedeních dochází po proteolýze k odsolení a zakoncentrování vzniklých peptidů na předkoloně. Následuje eluce peptidů do iontového zdroje hmotnostního spektrometru pomocí acetonitrilového gradientu. Převzato z [104].

Výhodu systémů s imobilizovaným enzymem představuje možnost regenerace a opakovaného použití bez ztráty katalytické aktivity.⁶³ Při imobilizaci proteolytických enzymů na pevné nosiče se zvýší rychlost a robustnost analýz. Snížení potřebného času štěpení je dáno vyšší lokální koncentrací proteasy na nosiči.⁶⁶ Krátký čas štěpení zároveň snižuje pravděpodobnost vzniku produktů autolýzy. Snadná regulace parametrů jako je velikost kolony, teplota, tlak v koloně a průtoková rychlost v koloně umožňuje variabilitu podmínek štěpení.

Efektivitu štěpení proteolyticky rezistentních proteinů je možné zvýšit použitím denaturačních a redukčních látek. Při štěpení v roztoku může dojít k významné denaturaci proteasy demonstrovanou snížením její aktivity. Nicméně při její imobilizaci je tento efekt minimalizován. Jedním z možných vysvětlení je krátký kontakt (desítky sekund) proteasy

s denaturantem. Zvýšení odolnosti proteasy vůči denurantům po immobilizaci na pevný nosič bylo prokázáno například na rekombinantním nepenthesinu-1 (rNep-1).⁴⁰ Kolonu s immobilizovaným enzymem je možné spojit s multi-dimenzionálními separačními systémy a analýza proteinů se tak dá plně automatizovat.⁶²

Další možností, jak zvýšit efektivitu štěpení, je současné použití dvou a více proteasových kolon. Ty mohou být zapojeny paralelně, kdy se tok před vstupem do LC systému spojí, nebo sériově (za sebou, tandemově). Různé proteasy je také možné immobilizovat společně a vznikne tak směsná kolona.⁶⁷ Jednotlivé HDX-MS aplikace výše uvedených experimentálních uspořádání jsou uvedeny v kapitolách u příslušných proteas (1.6, 1.7, 1.8 a 1.9, str. 26–31).

Enzym je možné immobilizovat také na polymerní vlákna nebo magnetické nanočástice, které zajistí rychlý čas štěpení (30 s). Výhodou je možnost odstranění proteasy využitím centrifugace nebo magnetismu. Zamezí se tak interferenci proteasy v MS analýze.⁶³

1.6 Aspergillopepsin (proteasa XIII)

Aspergillopepsin I (EC 3.4.23.18) neboli proteasa XIII (XIII) pochází z houby *Aspergillus saitoi*.^{39,68}

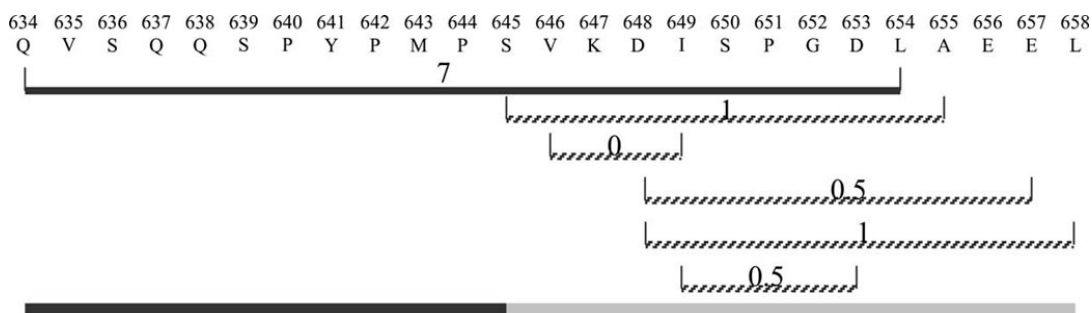
Je to monomerní protein, který má 32% sekvenční shodu s pepsinem a 39% s rhizopuspepsinem. Obsahuje 325 aminokyselinových reziduí, z nichž 76. je Asp, na který se váže substrát. Řadí se tak do skupiny aspartátových proteas, se kterými sdílí mnoho strukturních znaků.⁶⁸ Je to nespecifická proteasa, která štěpí za hydrofobními aminokyselinami (Y, L, F), ale také za K, R, N a H.^{46,50,68} Štěpení za K (Lys) lze využít pro aktivaci trypsinogenu při pH 3–4,5. Aktivní trypsin se využije při srážení mléka.⁶⁸

V roce 2003 byla XIII v kombinaci s pepsinem a rhizopuspepsinem (Rpn) testována v roztoku pro možnou aplikaci v experimentech vodík/deuteriové výměny. Na penicilin-vázajícím proteinu (PBP) byly provedeny tři separátní proteolýzy, nichž každá byla měřena v triplikátu. Kombinací dat ze štěpení PCB pomocí XIII, rhizopuspepsinu a pepsinu se zvýšilo pokrytí sekvence substrátu (99,7 %) a prostorové rozlišení (přesnější lokalizace deuterovaných oblastí). Pepsinem generovaný peptid 634–654 byl identifikován jako vysoce deuterovaný (Obr. 10, str. 27).

Nicméně rhizopuspepsin byl schopen tuto oblast sekvence PBP štěpit na menší

fragmenty (645–655, 646–649, 648–657, 648–658 a 649–653). Na základě kratších peptidů pocházejících z rhizopuspepsinu bylo zjištěno, že vysoce deuterovaná je pouze oblast 634–645 (Obr. 10).³⁹ Pepsin a proteasa XVIII měly na základě výše zmíněné studie vhodnější štěpné charakteristiky než proteasa XIII. Použití aspergillopepsinu při štěpení PBP bylo ale výhodné v tom, že zvětšilo soubor dat a umožnilo tak potvrzení stanovených výsledků míry deuterace.³⁹

Nicméně vhodnost proteasy pro daný účel je silně závislá na charakteru substrátu. Například při štěpení myoglobinu a čtyř rekombinantních proteinů v rozmezí 12–70 kDa generovala XIII více kratších peptidů než pepsin.⁵⁰ Další demonstrativním příkladem je



Obr. 10 – Část sekvence penicilin vázajícího proteinu. Jeho štěpení bylo provedeno pomocí rhizopuspepsinu a pepsinu. Plnou úsečkou je označen peptid [634–354] vzniklý štěpením pepsinem a přerušovanou peptidy generované rhizopuspepsinem (645–655, 646–649, 648–657, 648–658 a 649–653). Čísla nad peptidy odpovídají počtu inkorporovaných deuterií po 30 s značení. Úsečka v dolní části obrázku ukazuje míru deuterace. Černá – více než 50 % amidových vodíků bylo deuterováno, šedá – méně než 10 % bylo deuterováno. Převzato z [39].

proteolýza modelového proteinu fosforylasy b, po které bylo zjištěno, že XIII v porovnání s pepsinem a XVIII preferuje ve větší míře štěpení za R, N a H.⁴⁶

Vzhledem k rozdílným štěpným charakteristikám pepsinu a XIII je výhodné data z těchto dvou nezávislých proteolýz spojit. Paralelní štěpení pepsinem a proteasou XIII v roztoku bylo úspěšně aplikováno při HDX-MS studiu dynamiky dimerní kreatinkinasy, která má poměrně kompaktní strukturu.⁶⁹ Při zkoumání vzájemného působení myoglobinu a lipidových vesikulů bylo opět provedeno paralelní štěpení pepsinem a XIII. Díky této kombinaci bylo možné získat vyšší rozlišení v interagujících oblastech myoglobinu.⁴⁹

Dvě, případně více, proteolýz je možné provést i v kolonovém uspořádání. Tandemové

zapojení imobilizované proteasy XIII a pepsinu bylo otestováno na čtyřech proteinech o délce 140-908 aminokyselin. Toto uspořádání ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokou rozlišovací schopností se ukázalo jako vhodný způsob, jak zlepšit kvalitu a spolehlivost HDX-MS dat.⁷⁰ V několika HDX-MS analýzách se také osvědčilo použití směsných kolon obsahujících dvě proteasy. Pepsin koimobilizovaný s proteasou XIII byl použit při analýze monoklonálních protilátek. Pomocí této kolony bylo, oproti aplikaci samotných proteas, možné pokrýt oblast závěsu (hinge) na jejich těžkém řetězci.⁶⁷ Směsná kolona pepsinu s XIII byla také úspěšně aplikována při analýze vlivu typu glykanu na flexibilitu C γ 2 domény těžkého řetězce trastuzumabu.⁷¹ Tato kolona našla své další uplatnění při studiu dynamiky histonovým monomerů a celých nukleosomů.⁷² Zvýšení rozlišení díky směsné koloně bylo dále demonstrováno na štěpení cytochromu c. Na základě peptidů generovaných pepsinem koimobilizovaným s XIII bylo možné v 50 % sekvence substrátu lokalizovat míru deuterace s přesností na 1-2 aminokyseliny. Zatímco při štěpení pepsinovou kolonou bylo tohoto rozlišení dosaženo pouze ve 20 % sekvence.⁷³

1.7 Rhizopuspepsin (proteasa XVIII)

Rhizopuspepsin (EC 3.4.23.21), známý také jako proteasa XVIII, patří mezi aspartátové proteasy, se kterými má, stejně jako aspergillopepsin, velmi podobné strukturní vlastnosti.^{74,75} Sekvenční podobnost rhizopuspepsinu a pepsinu se pohybuje okolo 40 %.⁷⁶ V 50. letech 20. století byl rhizopuspepsin poprvé krystalizován.⁷⁷ V nadcházejících letech byl postupně zvyšován výtěžek krystalů a rozlišení získaných dat, které v roce 1999 dosáhlo až 1,5 Å.⁷⁸ Na základě aktivitních spektrofotometrických testů, bylo zjištěno, že má proteasa XVIII teplotní optimum při 60 °C, pH optimum v rozmezí 2,9-3,3 a je podobně jako pepsin stabilní až do pH 6.⁷⁷

Tuto proteasu lze získat buď z kultury mikrohouby *Rhizopus chinensis* nebo rekombinantní expresí v *E. coli*.^{51,78} Komerční zdroj rhizopuspepsinu v podobě izolátu z *R. chinensis* má řadu nevýhod jako je nedostatečné množství proteasy, nevyhovující čistota a často nekompletní štěpení substrátu.⁵¹ Z tohoto důvodu bylo snahou vyvinout metodu pro rekombinantní produkci této proteasy. Výtěžek produkce byl roce 1999 12 mg/l bakteriální kultury⁷⁸ a v roce 2009 byl zvýšen až 100 mg/l⁵¹. Rekombinantní Rpn byl charakterizován v imobilizované formě a srovnán s imobilizovaným pepsinem a proteasou XIII. Proteasa XIII

a Rpn produkovaly kratší peptidy než pepsin a kromě hydrofobních aminokyselin preferovaly ještě štěpení za těmi bazickými. Kombinací HDX-MS dat ze štěpení těmito proteasami bylo zvýšeno rozlišení na 1-3 aminokyseliny. Vzhledem k tomu, že je možné rekombinantní Rpn imobilizovat bez výrazné ztráty aktivity, je vhodnější alternativou pepsinu než proteasa XIII.⁵¹

1.8 Nepenthesiny

Nepenthesiny (EC 3.4.23.12) patří do podrodiny A1B aspartátových proteas a vyskytují se v rostlinách rodu *Nepenthes* (láčkovky). Tyto rostliny (Obr. 11) jsou masožravé a svou kořist rozkládají pomocí enzymatického aparátu v tekutině láčky.⁷⁹

Procentuální většinu tekutiny láčky tvoří nepenthesiny 1 a 2. Sekvence nepenthesinu-1 (Nep-1) a nepenthesinu-2 (Nep-2) vykazuje vysokou míru shody (~67%).⁵² Nep-1 je ale narozdíl od Nep-2 N-glykosylovaný a má vyšší pI. Tyto vlastnosti jsou pravděpodobně zodpovědné za vyšší stabilitu Nep-1.⁷⁹

Na rozdíl od ostatních rostlinných (vakuolárních) aspartátových proteas se nepenthesiny vyskytují extracelulárně. Odlišují se také specifickým insertem obsahujícím další čtyři cysteiny.⁷⁹ Mají výjimečně vysokou teplotní a pH stabilitu, která je pravděpodobně způsobena přítomností šesti disulfidových vazeb. Nicméně disulfidové vazby jsou také možným



Obr. 11 – Rostlina rodu *Nepenthes*.

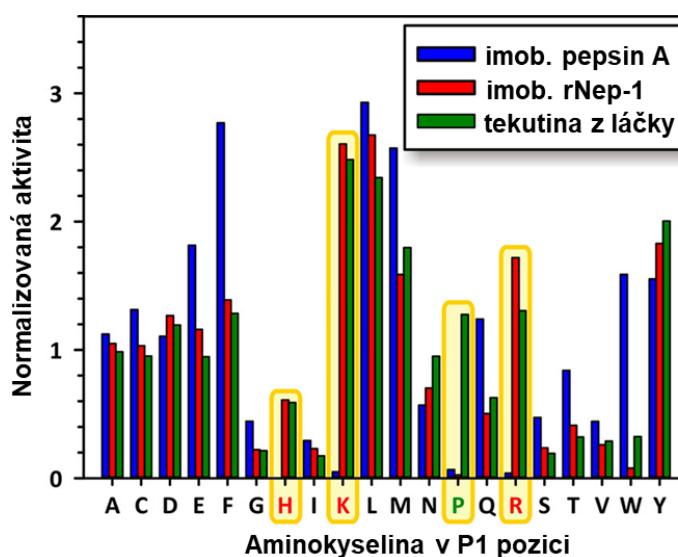
důvodem výrazně nižší odolnosti těchto proteas vůči denaturačním a redukčním činidlům v porovnání s pepsinem.^{79,80,81}

Nepenthesiny obsažené v extraktu z láčky byly pro své kyselé pH optimum a velký rozsah teplotní stability otestovány za účelem jejich využití v HDX-MS. Vykazovaly více než 1000× větší efektivitu štěpení než pepsin. Přírodní nepenthesiny neprojevují v roztoku známky autolýzy a dokázaly na rozdíl od pepsinu pokrýt oblasti proteinů s nepravidelnými strukturami. Tato schopnost souvisí se širší specifitou štěpení. Sekret z láčky měl některé ze

štěpných preferencí společné s pepsinem (A, F, L, M, Y, C), ale byly pozorovány i peptidy, na jejichž C-konci se vyskytovaly aminokyseliny, které u pepsinového štěpení nenajdeme (K, H, R a P).

Nepenthesiny se ale získávají z láčky obtížně a výtěžek je minimální. Další nevýhodou představuje náročnost rostliny *Nepenthes* na pěstování.⁵³ Z tohoto důvodu byly Nep-1 a Nep-2 exprimovány v *E. coli* ve velkém množství^{52,80}, což umožňuje strukturní charakterizaci (krystalizaci) a imobilizaci. Pomocí protokolu provedeného při kyselém pH se podařilo krystalizovat rNep-1. Nicméně pro aplikaci molekulového nahrazení a úplnou dedukci struktury bude potřeba najít vhodný homologní model.⁸²

Rekombinantní Nep-1 (rNep-1), exprimovaný v *E. coli*, oproti své přírodní variantě neobsahuje N-glykosylaci. Z důvodu potenciální aplikace v HDX-MS byl rNep-1 charakterizován a srovnán s pepsinem a extraktem z láčky. Imobilizovaný rNep-1 tvořil v porovnání s extraktem z láčky a pepsinem kratší peptidy. Při testování štěpných preferencí rNep-1 bylo zjištěno, že oproti pepsinu a tekutině z láčky téměř neštěpí za W (Obr. 12). Spolu s extraktem z láčky ale sdílí vysokou preferenci štěpení



Obr. 12 – Graf štěpných preferencí v P1 pozici. Modře jsou značeny štěpné preference imobilizovaného pepsinu A, červeně imobilizovaného rekombinantního nepenthesinu-1 a zeleně tekutiny z láčky. Významné rozdíly (K, H, R, P) jsou zvýrazněny žlutě. Data byla normalizována na počet aminokyselin ve štěpných modelových proteinech. Převzato a upraveno z [40].

za bazickými aminokyselinami (K, R, H). Za prolinem štěpila pouze tekutina z láčky.^{40,80} Z důvodu výše uvedených výhodných vlastností byl imobilizovaný rNep-1 použit v kombinaci s rekombinantním rhizopuspepsinem (rRpn) v sériovém zapojení při studiu mechanismu přenosu elektronů mezi doménami dehydrogenasy cellobiosy.⁸³

Rekombinantní Nep-2 se od rNep-1 liší výrazně vyšší odolností vůči denaturantům

a redukčním činidlům (např. TCEP, DTT) a navíc štěpí za W.

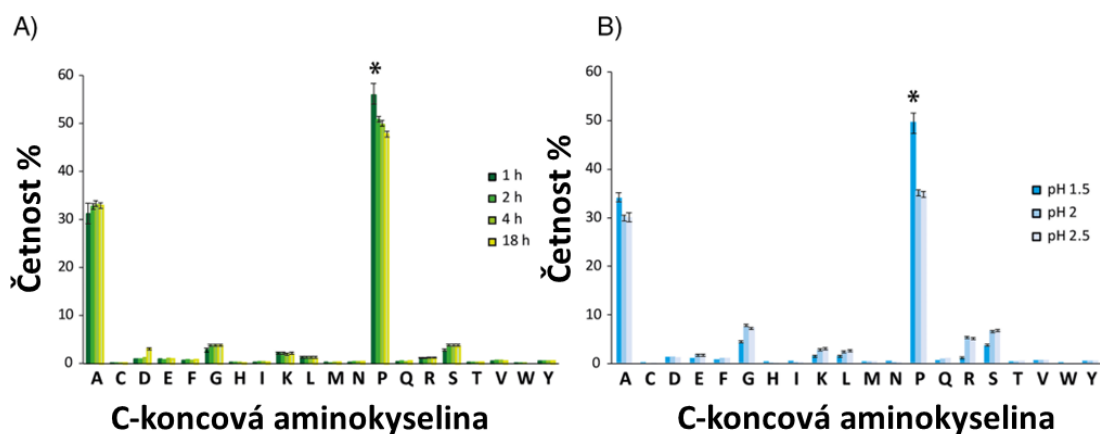
Rekombinantní Nep-1 a Nep-2 téměř kopírují vlastnosti tekutiny láčky rostliny *Nepenthes* kromě štěpení za prolinem a stabilitní křivky rNep-2 jsou velmi podobné pepsinu. Z výše uvedených důvodů je rNep-2 v současné době považován za nejadekvátnější alternativu pepsinu. Pro dosažení vysokého prostorového rozlišení HDX-MS analýz se doporučuje kombinace právě těchto dvou proteas.⁵² Například imobilizovaný rNep-2 a pepsin v tandemovém zapojení byly již úspěšně aplikovány při HDX-MS studiu strukturní dynamiky FAD dependentní NAD(P)H:chinon oxidoreduktasy 1, jejíž změna struktury je úzce spjata s rakovinou, Parkinsonovou a Alzheimerovou chorobou.^{84,85} Imobilizovaný r-Nep-2 byl dále v kombinaci s rRpn a pepsinem využit při HDX-MS čtyř strukturně blízkých integrálních membránových proteinů.⁴¹

1.9 Prolyl endoproteasa z *Aspergillus niger*

Prolyl endoproteasa, pocházející z vláknité houby *Aspergillus niger* (AnPEP), patří mezi serinové proteasy rodiny S28.^{86,87} Aktivita této proteasy se pohybuje v širokém rozsahu teplot a již v několika studiích bylo prezentováno její atypické dvojité pH optimum (2 a 4).^{48,87,88}

Je rutinně aplikována v pivovarském průmyslu pro její schopnost zabránit tvorbě koloidních částic během fermentace.^{89,90} Dále byl v několika publikacích akcentován její potenciál hydrolyzovat imunogenní peptidy v tenkém střevě osob trpících celiakií a je takto dostupná jako vhodný potravinový doplněk (Gluten Rid with Tolerase G, aj.).⁹¹⁻⁹⁴ V neposlední řadě našla tato proteasa uplatnění v protokolech klasické a strukturní proteomiky jako alternativa trypsinu^{88,95,96}, resp. pepsinu⁴⁸. Všechny výše uvedené aplikace jsou úzce spjaty s její schopností štěpit preferenčně za prolinem. Kromě prolinu štěpí ještě za A a v menší míře za G, L, R, S a Y.^{87,88,96} Bylo prokázáno i štěpení za hydroxyprolinem.⁸⁷ Je komerčně dostupná pod názvy Brewers Clarex⁹⁷, Gluten Rid with Tolerase G⁹⁸ a ProAlanase⁹⁹.

Produkt ProAlanase má vyšší pořizovací cenu oproti výše uvedeným variantám není však jasné, zda je to kvůli složitější purifikaci. Jeho štěpné preference a efektivita štěpení v roztoku byly otestovány na HeLa lyzátu. Výsledky naznačují, že nejvyšší specifity štěpení za P a A bylo dosaženo po 1hod při pH 1,5 a poměru proteasa:substrát, 1:50, (Obr. 13) a nejvyšší počet unikátních peptidů byl identifikován za stejných podmínek po 2 hod. Tato skutečnost je výhodná při studiu disulfidových vazeb, protože při nízkém pH je možnost rozpojení a náhodného zapojení disulfidu minimalizovaná. Konvenčně používaný trypsin je při tomto pH neaktivní.⁹⁵ Trypsinové štěpení je nedostatečné také v případě analýzy



Obr. 13 – Stanovení optimálních podmínek štěpení ProAlanasy (testováno na buněčném lyzátu HeLa). Poměr proteasa:substrát, 1:50. Optimální podmínky jsou označeny hvězdičkou. Grafy znázorňují četnost dané aminokyseliny na C-konci vzniklých peptidů. Byly analyzovány duplikáty při různých časech štěpení (A) a pH (B). Převzato a upraveno z [95].

fosforylací řízených prolinem, které se u savců vyskytují až ze 40 %. To znamená, že kinasa fosforyluje S/T pouze ve chvíli, kdy sousedí s prolinem.⁸⁸ Trypsin ale štěpí pouze za K a R a přítomnost fosforylace je důvodem pro jeho opomenuté štěpení (missed cleavage). Vhodným řešením je kombinace peptidů pocházejících z ProAlanasy a trypsinu. Tímto způsobem bylo dosaženo téměř kompletního pokrytí sekvence intracelulární domény Notch3 bohaté na prolin a spolehlivé identifikace fosforylace. Další proteomickou aplikací ProAlanasy je analýza histonů a jejich posttranslačních modifikací, kde je opět trypsin nevhodný kvůli štěpení za K a R, které jsou u histonů příliš časté a digesce tak vede k mnoha krátkým, nedetekovatelným peptidům.⁹⁵

Brewers Clarex je levnější alternativou ProAlanasy. V roce 2017 bylo demonstrováno použití tohoto preparátu pro experimenty vodík/deuteriové výměny. Substráty hemoglobin a imunoglobulin byly štěpeny v roztoku za podmínek minimální výměny (pH 2,5 a 0 °C) a poměru proteasa substrát 1:1 (w:w). V porovnání s pepsinem generoval *AnPEP* kratší peptidy s odlišnou sekvencí související s různými štěpnými preferencemi těchto proteas. Z tohoto důvodu poskytuje proteolýza *AnPEP*em větší prostorové rozlišení a náhled do prolin-bohatých oblastí struktury proteinu obtížně dostupných pomocí pepsinu. Tímto byla prokázána vysoká komplementarita těchto dvou enzymů. Tento preparát byl testován i pro proteomické aplikace. Proteom *E. coli* byl štěpen 4 h při 37 °C a pH 2,5 (poměr proteasa: substrát, 1:300). V případě použití *AnPEP*u (Brewers Clarex) za HDX-MS i proteomických podmínek převažovalo štěpení za P a A.⁴⁸

Kromě komerčních zdrojů je možné *AnPEP* získat pomocí rekombinantní exprese a následné purifikace pomocí niklové afinitní chromatografie. Plasmid pPIC-9K byl klonován v *E. coli* (JM 109). Poté byla provedena transformace plasmidu na His-deficientní kmen kvasinky *Pichia pastoris*, která byla použita pro expresi proteasy *AnPEP*. Aminokyseliny v nativním *AnPEP*u jsou kódovány tripletly, které jsou v *P. pastoris* zastoupené jen vzácně. Proto byl kromě nativního *AnPEP* exprimován ještě mutant, který měl stejnou aminokyselinou sekvenci, ale lišil se v množství a charakteru kódujících tripletů. Tato optimalizace zajistila vyšší výtěžek mutantní formy oproti nativní. Mutant měl aktivitu 620 ± 25 U/l, zatímco nativní forma 500 ± 18 U/l. Teplotní a pH optimum pro nativní a mutantní formu odpovídalo 40 °C a pH 4–5.¹⁰⁰

AnPEP má stovky proteoforem a nejméně 3 sekvenční varianty. Tento fakt je dáván do souvislosti s jeho glykoproteinovým charakterem, konkrétně glykosylací na asparaginu. N-glykosylace je klíčová posttranslační modifikace, protože významně ovlivňuje sekreci, aktivitu, stabilitu a substrátovou specifitu proteasy.⁸⁷ *AnPEP* obsahuje 7 N-glykosylačních míst manosového typu (N60, N122, N186, N204, N288, N315, a N406), která mohou být modifikována. Manosový typ N-glykanu obsahuje dva na sebe navazující N-acetylglukosaminy, z nichž jeden je vázán na asparagin v aminokyselinové sekvenci *AnPEP* a na druhý je připojen sled mnoha větvených manos. Existence N-glykosylace je podmíněna výskytem tripletu N-X-T/S v sekvenci, kdy X není P a T je častější než S.^{87,96} Na

Obr. 14 je jedna z variant sekvence *AnPEP*, kde jsou vyznačena N-glykosylační místa, disulfidové vazby a signální peptid na N-konci. Sekvenční varianty se liší především aminokyselinovým složením signálního peptidu. Proteoformy *AnPEP* proteasy se liší v počtu a uspořádání manos a přítomnosti fosforylace.

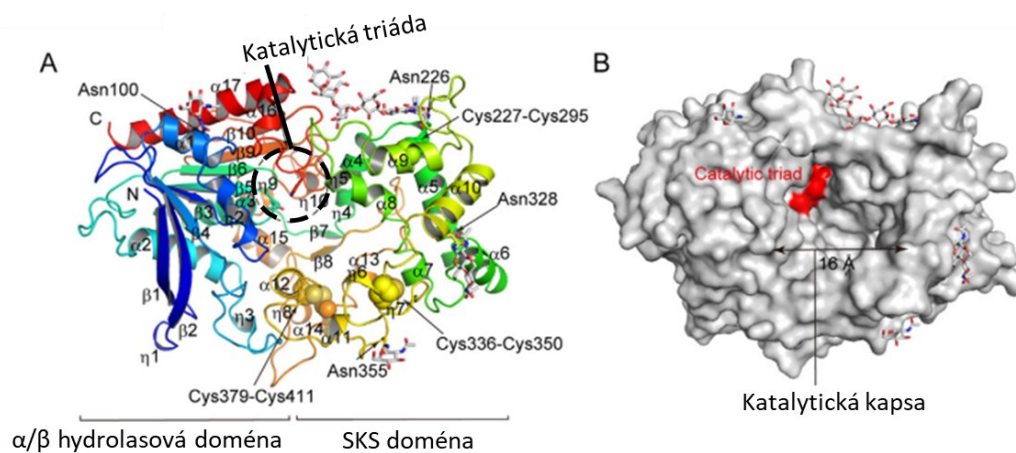
```

M R A F S A V A A A A L A L S W A S L A Q A A R P R L V P K P V S R P A S S K S
A A T T G E A Y F E Q L L D H H N P E K G T F S Q R Y W W S T E Y W G G P G S P
V V L F T P G E V S A D G Y E G Y L T N E T L T G V Y A Q E I Q G A V I L I E H
R Y W G D S S P Y E V L N A E T L Q Y L T L D Q A I L D M T Y F A E T V K L Q F
D N S T R S N A Q N A P W V M V G G S Y S G A L T A W T E S V A P G T F W A Y H
A T S A P V E A I Y D Y W Q Y F Y P I Q Q G M A Q N C S K D V S L V A E Y V D K
I G K N G T A K E Q Q A L K E L F G L G A V E H F D D F A A V L P N G P Y L W Q
D N D F A T G Y S S F F Q F C D A V E G V E A G A A V T P G P E G V G L E K A L
A N Y A N W F N S T I L P D Y C A S Y G Y W T D E W S V A C F D S Y N A S S P I
Y T D T S V G N A V D R Q W E W F L C N E P F F Y W Q D G A P E G T S T I V P R
L V S A S Y W Q R Q C P L Y F P E T N G Y T Y G S A K G K N A A T V N S W T G G
W D M T R N T T R L I W T N G Q Y D P W R D S G V S S T F R P G G P L A S T A N
E P V Q I I P G G F H C S D L Y M A D Y Y A N E G V K K V V D N E V K Q I K E W
V E E Y Y A

```

Obr. 14 – Sekvence varianty *AnPEP* proteasy. Fialově je označen signální peptid, zeleně místo N-koncového štěpení za vzniku aktivní formy enzymu, červeně N-glykosylační místa a modře cysteiny podílející se na disulfidových vazbách. Převzato z [87].

Na počátku roku 2022 byla publikována krystalová struktura *AnPEP*. Obsahuje 17 α -helixů, 10 3_{10} helixů, které jsou oproti α -helixům více stočené, užší a delší, a 10 β -skládaných listů (Obr. 15A, str. 35). Na N- a C-konci jsou α/β hydrolasové domény obsahující katalytickou triádu Ser179-His491-Asp458 typickou pro serinové proteasy. Prostřední část sekvence zaujímá tzv. SKS doména, která je bohatá na α -helixy. Na povrchovém modelu *AnPEP* (Obr. 15B, str. 35) je vidět rozměrná kapsa nacházející se na pomezí SKS a α/β domény. Po porovnání struktury *AnPEP* a jeho sekvenčních homologů lysosomální Pro-X karboxypeptidasy (PRCP) a dipeptidyl peptidasy 2 (DPP7) bylo zjištěno, že má největší kapsu *AnPEP*. Výsledky tohoto pozorování osvětlují princip rozpoznávání substrátů výše uvedenými proteasami. Protože má *AnPEP* objemnou kapsu, dokáže štěpit velké proteinové substráty, zatímco PRCP a DPP7 s menší kapsou štěpí pouze N- a C-koncové oblasti peptidů.⁸⁶



Obr. 15 – Struktura AnPEP. (A) Strojní model AnPEP. N-konec je označen modře a C-konec červeně. N-glykany jsou znázorněny v podobě tyčkových modelů a disulfidové vazby v podobě kuličkových. Jsou zde označeny i pozice sekundárních struktur (např. $\alpha 1$, $\beta 8$). Pozice katalytické triády je ukázána v podobě přerušované kružnice. (B) Povrchový model AnPEP. Povrch katalytické triády, situovaný v katalytické kapse, je obarven červeně. Katalytická kapsa je široká 16 Å. Převzato a upraveno z [86].

2 Cíle práce

- výběr vhodného komerčního zdroje *AnPEP* proteasy (prolyl endoproteasa z *Aspergillus niger*)
- charakterizace tohoto zdroje
- charakterizace imobilizovaného *AnPEP*u v kombinaci s jinými proteasami (pepsin, aspergillopepsin (XIII), Nepenthesin-2 (Nep-2))
- optimalizace bioinformatického zpracování dat
- zhodnocení možné aplikace vybraných proteasových kolon v HDX-MS analýze

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy ML104/01	Mettler Toledo, Švýcarsko
Automatické pipety	Mettler Toledo, Švýcarsko
Centrifuga 5415 R	Eppendorf, Německo
Filtr Ultrafree-MC GV 0,22 μm	Merck, Německo
Fotodokumentační systém ChemiDoc MP	Bio-Rad, USA
UPLC kolona, Luna Omega Polar C18 (1,6 μm , 100 Å, 100 \times 1,0 mm)	Phenomenex, USA
UPLC předkolona, Luna Omega Polar C18 (5 μm , 100 Å, 20 \times 0,3 mm)	Phenomenex, USA
HPLC systém LC-20AD	Shimadzu, Japonsko
Hmotnostní spektrometr MALDI TOF AutoFlex	Bruker Daltonics, Německo
Hmotnostní spektrometr timsTOF Pro	Bruker Daltonics, Německo
Kolona PD-10 (Sephadex™ G-25)	GE Healthcare, USA
Kolona z nerezové oceli (2 \times 20 mm)	IDEX Health & Science, USA
Kolonka OPTI-TRAP™ (Makro, 50 μl : 3 \times 8 mm)	Optimize Technologies, USA
pH elektroda	Hamilton, USA
pH metr Orion 2 Star	Thermo, USA

Předvážky EMB 1000-2	Kern, Německo
Sonikační lázeň Elmasonic S 30 H	Elma, Německo
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, USA
Spektrofotometr DeNovix DS-11	Denovix, USA
Stolní centrifuga MiniSpin	Eppendorf, Německo
Termostat CH-100	Biosan, Lotyšsko
Termostat s třepačkou Thermomixer comfort	Eppendorf, Německo
UPLC systém 1290	Agilent, USA
Vakuový koncentrátor Speedvac	Jouan, Francie
Vortex	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj napětí PowerPac Universal	Bio-Rad, USA

3.1.2 Chemikálie

2-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Acetonitril (LC/MS čistota)	Merck, Německo
Citrát sodný (tribasický dihydrát)	Fluka, Švýcarsko
Coomassie Brilliant Blue R-250	VWR Chemicals, UK
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
Isopropanol	Merck, Německo
Jodacetamid	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CCA)	Bruker Daltonics, Německo
Kyselina citronová	Roth, Německo
Kyselina chlorovodíková (LC/MS čistota)	Merck, Německo

Kyselina mravenčí (LC/MS čistota)	Merck, Německo
Kyselina sinapová (SA)	Bruker Daltonics, Německo
Kyselina octová	VWR Chemicals, UK
Methanol (LC/MS čistota)	Merck, Německo
Močovina	VWR Chemicals, UK
Peptidový kalibrační standard 206195 (MALDI)	Bruker Daltonics, Německo
POROS AL (20 µm)	Thermo, USA
Thiomočovina	Sigma-Aldrich, USA
Tris	VWR Chemicals, UK
Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP)	Sigma-Aldrich, USA

3.1.3 Pufry a roztoky

30% (v/v) akrylamid:N,N'-methylen-bis-akrylamid mix (Bio-Rad, USA)

95% acetonitril, 0,1% kyselina mravenčí, 4,9% voda (mobilní fáze B)

Barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue pro SDS-PAGE gely: 45% (v/v) methanol; 10% (v/v) kys. octová; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

10% dodecylsírán sodný (Bio-Rad, USA)

50mM citrátový pufr pH 5,0

500mM glycin-HCl pH 2,3

4× koncentrovaný vzorkový pufr Laemmli (Bio-Rad, USA): 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glycerol, 1% SDS, 0,005% bromfenolová modř

10× koncentrovaný TGS elektrodový pufr (Bio-Rad, USA): 25mM Tris, 192mM glycin, 0,1% SDS, pH 8,3

0,1% kyselina mravenčí ve vodě (mobilní fáze A)

0,4% kyselina mravenčí ve vodě (mobilní fáze pro proteolýzu a odsolení)

MALDI matrice CCA: kyselina 4-hydroxy-3,5-kyanoskořicová, nasycený roztok v methanolu

MALDI matrice SA: kyselina sinapová, nasycený roztok v 50% acetonitrilu

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE gely: 35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová

Roztok kyseliny bicinchoninové (Thermo, USA): výrobce neuvádí koncentraci, pro provedení stanovení je důležitý poměr této kyseliny a síranu měďnatého

Roztok síranu měďnatého (Thermo, USA): výrobce neuvádí koncentraci

Roztok TEMED (Bio-Rad, USA)

Slepý vzorek – hmotnostní spektrometrie (4M močovina, 125mM glycin-HCl pH 2,3)

Standard pro SDS-PAGE Precision Plus Protein Dual Color (Bio-Rad, USA)

1,5M Tris-HCl pH 8,8 (Bio-Rad, USA)

1,0M Tris-HCl pH 6,8 (Bio-Rad, USA)

Zastavovací pufr pro HDX-MS (3M thiomočovina, 6M močovina, 0,5M TCEP, 0,5M glycin-HCl, pH 2,3).

Zastavovací pufr – imobilizace (2M ethanolamin, 100mM kyanoborohydrid sodný a 50mM citrát sodný pH 5,0)

3.1.4 Proteiny

14-3-3 gamma	exprimováno v laboratoři
Aspergillopepsin (proteasa XIII)	Sigma-Aldrich, USA
Bovinní karbonická anhydrasa (bCA2)	Sigma-Aldrich, USA
Bovinní sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Brewers Clarex (zdroj AnPEPu)	DSM, Nizozemí
Endoglykosidáza H ($5 \cdot 10^5$ U/ml)	Biolabs, USA
Gluten Rid with Tolerase G (zdroj AnPEPu)	Swanson, USA
Myoglobin	Merck, Německo

Nepenthesin-2	exprimováno v laboratoři
Pepsin	Sigma-Aldrich, USA
Trastuzumab (21 mg/ml)	Evidentic, Německo

3.2 Metody

3.2.1 Příprava roztoku *AnPEP* proteasy z kapsle Tolerase G

K obsahu tobolky v mikrozkušavce byl přidán 1 ml H₂O (LC-MS čistota). Vzniklá suspenze byla intenzivně míchána a sonikována 5 min. Poté byla centrifugována 5 min při 13 200×g. Z mikrozkušavky byl odebrán supernatant, který byl přenesen do mikrozkušavek s filtrem (Ultrafree-MC-GV 0,22 μm). Následně byl tento čirý roztok centrifugován 5 min při 13 200×g.

3.2.2 Převedení *AnPEP* proteasy z Tolerase G a Brewers Clarex do citrátového pufru o pH 5,0

AnPEP používaný při analýzách pochází z komerčních zdrojů, u kterých není zřejmý obsah rozpouštědel, pufrů či pojiv. Z tohoto důvodu byla použita kolona PD-10, která roztoky *AnPEP*u zbavila nízkomolekulárních látek a zároveň ho převedla do definovaného prostředí citrátového pufru. Z důvodu deklarované vyšší výtěžnosti a kapacity kolony byl zvolen gravitační protokol.

Kolona byla postupně ekvilibrována 25 ml 50mM citrátového pufru pH 5,0. Po odkapání veškerého citrátového pufru z kolony na ní bylo nanášeno 2,5 ml roztoku Tolerase G, respektive Brewers Clarex. Po odkapání vzorku bylo na kolonu nanášeno 3,5 ml 50mM citrátového pufru pH 5,0 a byla tak provedena eluce roztoku *AnPEP* proteasy do čisté zkumavky. Pro eluát byla stanovena koncentrace celkového proteinu pomocí kyseliny bicinchoninové.

3.2.3 Stanovení koncentrace celkového proteinu

3.2.3.1 Stanovení koncentrace celkového proteinu pomocí kyseliny bicinchoninové

Stanovení celkového proteinu zdrojů *AnPEP* proteasy (Clarex a Tolerase G) bylo provedeno spektrofotometricky pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA). Využívá se redukce Cu²⁺ na

Cu⁺ proteinem v bazickém prostředí. Cu⁺ tvoří v daném prostředí fialový komplex s kyselinou bicinchoninovou s absorpčním maximem při 562 nm. Tvorba komplexu reflektuje množství peptidových vazeb a přítomnost aminokyselin cysteinu, tryptofanu a tyrosinu ve vzorku.¹⁰¹ Z tohoto důvodu je BCA metoda oproti stanovení koncentrace celkového proteinu při 280 nm selektivnější.

Kalibrační řada BSA byla připravena v koncentračním rozmezí 2,0–0,125 mg/ml. Vycházelo se z roztoku o koncentraci 2 mg/ml, který byl dále ředěn dle Tab. 1. Pracovní roztok vznikl smísením roztoku BCA s roztokem síranu měďnatého v poměru 50:1. Roztok proteinu (BSA nebo AnPEP) byl smísen s pracovním roztokem v poměru 1:20. Slepý vzorek byl připraven smísením 50mM citrátového pufru pH 5,0 s pracovním roztokem v poměru 1:20. Takto připravené vzorky byly inkubovány 30 min při 37 °C. Po 30 min byla změřena v triplicátech absorbance vzorků AnPEPu a standardních roztoků bovinního sérového albuminu. Koncentrace celkového proteinu byla stanovena odečtením absorbance z kalibrační závislosti standardního proteinu BSA.

Tab. 1 – Kalibrační řada BSA pro stanovení celkového proteinu pomocí BCA: použité objemy citrátového pufru a BSA. Roztok n byl připraven ředěním roztoku n–1.

<i>n</i>	<i>c</i> (BSA) [mg/ml]	<i>V</i> (50mM citrátového pufru pH 5,0) [μl]	<i>V</i> (BSA, (<i>n</i>)) [μl]
(1)	2,00	–	–
(2)	1,50	20	60 (1)
(3)	1,00	20	40 (2)
(4)	0,75	10	30 (3)
(5)	0,50	10	20 (4)
(6)	0,25	10	10 (5)
(7)	0,13	10	10 (6)

3.2.3.2 Stanovení celkového proteinu při 280 nm

Koncentrace celkového proteinu u vzorků proteas (*AnPEP*, pepsin, aspergillopepsin a nepenthesin-2) před imobilizací byla stanovena spektrofotometricky při 280 nm. Při této vlnové délce mají aromatické aminokyseliny tryptofan a tyrosin, které jsou obsaženy ve většině proteinů, absorpční maximum. Toto stanovení je pouze orientační, protože proteiny, které obsahují více aromatických aminokyselin tryptofan a tyrosin, budou mít vyšší absorpční hodnoty než ty o stejné koncentraci s nižším počtem těchto aminokyselin v sekvenci. K celkové absorpční hodnotě mohou přispět i neproteinové komponenty vzorku.¹⁰²

Proteasy uvedené v Tab. 2 byly pomocí PD-10 (viz 3.2.2, str. 41) převedeny do prostředí 50mM citrátového pufru pH 5,0. Poté byla změřena absorpce jednotlivých proteas v triplicátech při 280 nm proti slepému vzorku (50mM citrátový pufr pH 5,0). Koncentrace byla vypočítána na základě jejich extinkčních koeficientů uvedených v Tab. 2 a naměřených absorpčních hodnot, ze kterých byl stanoven medián. Stanovení koncentrace proteas při 280 nm bylo provedeno Mgr. Markem Polákem.

Tab. 2 – Molární extinkční koeficienty proteas zjištěné pomocí programu GP MAW 8.00 na základě jejich vložených sekvencí.

Proteasa	ϵ_{280} [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
<i>AnPEP</i>	168700
Pepsin	55900
Nepenthesin-2	33140
Aspergillopepsin (XIII)	43950

3.2.4 Deglykosylace *AnPEP* proteasy

AnPEP proteasa byla deglykosylována pomocí endoglykosidasy H, která štěpí mezi dvěma N- acetylglukosaminovými zbytky s tím, že výsledný produkt obsahuje pouze jeden z těchto zbytků navázaný na asparagin v aminokyselinové sekvenci substrátu.

K 82 μl *AnPEP* proteasy o koncentraci 6 mg/ml v 50mM citrátovém pufru pH 5,0 bylo přidáno 18 μl Endo H ($5 \cdot 10^5$ U/ml). Vzniklá reakční směs byla inkubována 24 hod při 30 °C. Úspěšnost deglykosylace byla ověřena pomocí metody ionizace/desorpce laserem za

přítomnosti matrice spojené s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF-MS), viz kap. 3.2.11, str. 61.

3.2.5 Proteinový profil Brewers Clarex a Tolerase G

Brewers Clarex a Tolerase G kromě *An*PEP proteasy, která zaujímá většinu preparátu, obsahují i další proteiny, které mohou ovlivnit jeho výslednou aktivitu. Pro srovnání proteinového profilu zdrojů *An*PEP byla provedena LC-MS analýza glykosylovaných a deglykosylovaných vzorků.

Zásobní roztoky Clarex ($c=2$ mg/ml) a Tolerase G ($c=2$ mg/ml) byly ředěny 100mM Tris-HCl pH 8,5 na koncentraci 1 mg/ml. Trypsin byl inkubován s roztoky Clarex a Tolerase G v poměru 1:50 po dobu 18 hod při 37 °C. Bylo také provedeno štěpení bovinního sérového albuminu, které sloužilo jako kontrola. Úspěšnost proteolytického štěpení byla ověřena pomocí MALDI-TOF-MS (3.2.11, str. 61).

Roztoky *An*PEP a BSA byly poté redukovány 20mM tris(2-karboxyethyl)fosfinem (TCEP). Reakce probíhala 5 min při 65 °C. Po vychladnutí reakčních směsí byl přidán jodacetamid tak, aby jeho finální koncentrace byla 30mM. Reakce byla inkubována v temnu po dobu 1 hod.

Vzorky byly před LC-MS analýzou manuálně odsoleny na kolonce s obrácenou fází. Na kolonku bylo nejprve dávkováno 300 μ l promývacího roztoku (H₂O, acetonitril, methanol, isopropanol, kyselina mravenčí), kde všechny složky byly ve stejném poměru. Poté byla kolonka promyta 500 μ l 1% kyseliny mravenčí, bylo dávkováno 300 μ l vzorku *An*PEPu ředěného do 1% kyseliny mravenčí v poměru 1:1. Kolonka byla opět promyta

500 μ l kyseliny mravenčí o stejné koncentraci. Následovala eluce odsolených vzorků do mikrozkumavek pomocí 150 μ l 95% acetonitrilu s 1% kyselinou mravenčí. Vzorky byly rozděleny na polovinu a koncentrovány na vakuové odparce. Poté byla vždy jedna polovina resuspendována 20 μ l 0,1% trifluoroctové kyseliny, která je pro MS analýzu výhodná tím, že proteiny nemodifikuje. Druhá polovina byla zmrazena a uchována pro další analýzy.

Analýza vzorků byla provedena Dr. Petrem Pompachem na přístroji timsTOF Pro. Data byla prohledána pomocí nástroje MASCOT proti celé databázi SwissProt. Bylo zvoleno

kritérium „No enzyme“, což znamená, že MASCOT prohledává každou proteinovou sekvenci pro každou podsekvenci (peptid), která splňuje ostatní kritéria vyhledávání. To ve výsledku znamená testování řádově většího počtu peptidů, než kdyby bylo zadáno štěpení za lysinem a argininem odpovídající trypsinu.¹⁰³ Vzhledem k tomu, že je *AnPEP* glykoprotein, a že byly analyzovány i vzorky po deglykosylaci pomocí Endo H, byla při prohledání zadána glykosylace na asparaginu (N-acetylglukosamin) jako variabilní modifikace. Kvůli alkylaci vzorků byla zadána alkylace na cysteinu jako fixní modifikace. Zvolená hranice MASCOT skóre byla 15.

3.2.6 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného je levná metoda umožňující získat orientační informaci o kvantitě a molekulové hmotnosti proteinů ve vzorku. V tomto případě byla využita ke kontrole úspěšnosti deglykosylace *AnPEP* proteasy a ke srovnání proteinového obsahu *AnPEP*ových preparátů Brewers Clarex a Tolerase G.

Podle Tab. 3 byl připraven 10% separační a 5% zaostřovací gel s deseti jamkami.

Tab. 3 – Objemy jednotlivých složek separačního a zaostřovacího gelu na SDS-PAGE.

Složka	V [ml]	
	10% separační gel	5% zaostřovací gel
H ₂ O	1,9	1,4
30% akrylamid mix	1,7	0,33
1,5M Tris pH 8,8	1,3	–
1,0M Tris pH 6,8	–	0,25
10% SDS	0,05	0,02
10% APS	0,05	0,02
TEMED	0,002	0,002

Vzorky *AnPEP* byly podle Tab. 4 (str. 47) připraveny tak, že byl vždy smísen příslušný objem daného zásobního roztoku *AnPEP* s 0,5M Tris-HCl pH 6,8 a SDS vzorkovým puřrem.

Vzorkový pufr byl připraven tak, že bylo smíseno 50 μ l 2-merkптоethanolu s 950 μ l 4 \times koncentrovaného pufru Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glycerol, 1% SDS, 0,005% bromfenolová modř). Vzorky *AnPEP* byly sonikovány 3 min a následně centrifugovány na stolní centrifuze 5 min při 6000 \times g. Poté byly 5min inkubovány při 95 $^{\circ}$ C a nakonec byly opět centrifugovány za stejných podmínek.

Připravený gel byl umístěn do elektroforetické aparatury s Tris-glycin-SDS (TGS) elektrodovým pufrem. Na gel bylo nanášeno 20 μ l glykosylovaného a deglykosylovaného *AnPEP*u (Brewers Clarex a Tolerance G) o koncentraci (*c*) 0,10 a 0,5 μ g/ μ l a 5 μ l proteinového standardu molekulových hmotností. Jako kontrola sloužil roztok endoglykosidasy H (Endo H) nanášený ve 20 μ l. Byl připraven smísením 9 μ l výchozího roztoku endoglykosidasy H s 41 μ l 50mM citrátového pufru pH 5,0.

Následně byla elektroforetická aparatura připojena na zdroj napětí. Napětí bylo nejprve nastaveno na 120 V (na jeden gel). Ve chvíli, kdy bromfenolová modř byla na rozhraní zaostřovacího a separačního gelu, bylo zvýšeno na 200 V. Elektroforetická aparatura byla odpojena od zdroje, když bromfenolová modř doputovala ke spodnímu okraji skel. Gel byl po vyjmutí ze skel po dobu 10 min barven pomocí barvicího roztoku Coomasie Brilliant Blue R-250, poté promýván v odbarvovacím roztoku do odbarvení pozadí a nakonec skladován v 1% kyselině octové. Gel byl fotografován pomocí systému ChemiDoc MP.

Tab. 4 – Objemy zásobních roztoků AnPEP, 0,5M Tris-HCl pH 6,8 a SDS vzorkového pufru pro přípravu vzorků AnPEP. *U objemů zásobních roztoků AnPEP jsou v závorce uvedeny jejich výchozí koncentrace. Dg=deglykosylovaný.

Vzorek AnPEP	c [μg/μl]	Zásobní roztok Cl/Tg [μl] (c _z [μg/μl])	0,5 M Tris- HCl pH 6,8 [μl]	SDS vzorkový pufr [μl]
Tolerase G		1,0 (4)	29,0	10,0
Dg Tolerase G		2,0 (2)	28,0	10,0
Clarex	0,10	2,0 (2)	28,0	10,0
Dg Clarex		2,0 (2)	28,0	10,0
Tolerase G		1,1 (18)	28,9	10,0
Dg Tolerase G		10,0 (2)	10,0	10,0
Clarex	0,50	3,3 (6)	26,7	10,0
Dg Clarex		10,0 (2)	10,0	10,0

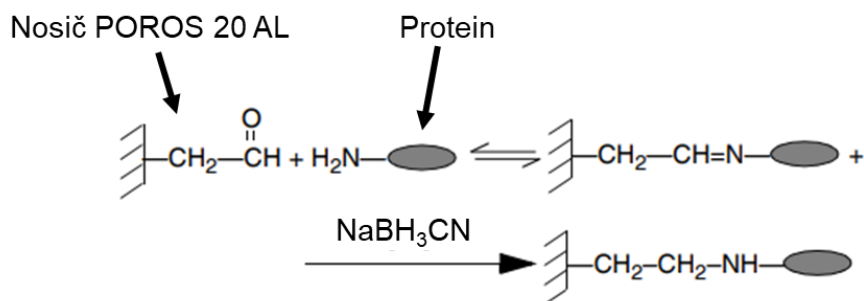
3.2.7 Imobilizace proteas

Imobilizace proteas byla provedena dle dříve publikovaného¹⁰⁴ a v laboratoři optimalizovaného protokolu. V Tab. 5 (str. 48) jsou uvedeny proteasy a jejich kombinace, které byly imobilizovány na nosič POROS 20 AL. Tento nosič je tvořen částicemi polystyren-divinylbenzenu o velikosti 20 μm. Mechanismus imobilizace je znázorněn na (Obr. 16, str. 48)¹⁰⁵.

Tab. 5 – Proteasy a jejich kombinace imobilizované na nosič POROS 20 AL.

Imobilizované proteasy	Koimobilizace
AnPEP (Clarex)	–
Pepsin	AnPEP-Pepsin
Nepenthesin-2	AnPEP-Nepenthesin-2
Proteasa XIII	AnPEP-XIII

Za účelem převedení kyselých proteas do 50mM citrátu sodného pH 5,0 byly použity minikolony GE Healthcare PD-10. Bylo postupováno totožným způsobem jako v kap. 3.2.2 (str. 41). Následně byla stanovena koncentrace jednotlivých proteas pomocí spektrofotometru DeNovix při vlnové délce 280 nm (viz 3.2.3.2. str. 43). Při stanovení byly využity jejich extinkční koeficienty.



Obr. 16 – Princip imobilizace proteasy na nosič POROS 20 AL. Karbonylová skupina nosiče selektivně reaguje s aminoskupinou proteasy za vzniku Schiffovy báze. Následně dojde pomocí kyanoborohydridu sodného k redukci a tím ke vzniku stabilní kovalentní vazby. Převzato a upraveno z [105].

Proteasy byly smíchány s nosičem POROS 20 AL v poměru 1:5 (proteasa:nosič). Na 4 mg proteasy bylo naváženo 100 mg nosiče. V případě koimobilizace byly smíchány 2 mg každé z proteas a následně přidáno 100 mg nosiče.

Vzniklé suspenze byly 30 min jemně míchány převrácením a během toho bylo každé 2 min postupně přidáváno 100 μ l 2M Na₂SO₄ tak, aby jeho výsledná koncentrace v reakční směsi byla 1M. Poté bylo na každý 1 ml celkového objemu reakce přidáno 46 μ l 2M

NaBH₃CN v 50mM citrátu pH 5,0. Zavřené mikrozkušavky byly utěsněny folií typu PARAFILM. Reakční směs byla přes noc míchána převrácením při zapnuté digestoři a laboratorní teplotě.

Další den byl připraven zastavovací pufr obsahující 2M ethanolamin, 100mM kyanoborohydrid sodný a 50mM citrát sodný pH 5,0. Na 1 ml reakce bylo přidáno 320 µl zastavovacího pufru. Reakční směs byla poté opět za stejných podmínek míchána převrácením po dobu 2 hod.

Suspenze byla následně podle Tab. 6 promyta ve 4 krocích a poté ve 2 krocích převedena do 50mM glycinu-HCl pH 2,3. Po přidání příslušného roztoku byla suspenze centrifugována při 1000×g a teplotě 20 °C po dobu 10 min, byl odebrán supernatant, směs proteasy s nosičem byla resuspendována příslušným roztokem uvedeným v následném kroku a opět za stejných podmínek centrifugována. Po poslední centrifugaci a odebrání supernatantu byl přidán 50mM glycin pH 2,3 tak, aby byl jeho poměr k nosiči s proteasou 2:1. Vzniklá suspenze byla skladována při 4 °C.

Tab. 6 – Postup při promývání suspenze POROS AL s příslušnou proteasou/proteasami a jejím převedením do glycinového pufru

Krok	Roztok	pH	Objem [ml]
1,2	50mM octan sodný	5,0	
3	50mM octan sodný, 1M NaCl	5,0	10
4	50mM octan sodný	5,0	
5,6	50mM glycin-HCl	2,3	

3.2.8 Plnění kolon

Pro plnění byly použity kolony z nerezové oceli o rozměrech 2×20 mm s fritami o porositě 2 µm. Před plněním kolon nosičem byly všechny jejich součásti sonikovány 5 min v denaturovaném ethanolu. Po vysušení byl na kolonu umístěn z každého konce uzávěr. Na jednom z nich byla fritka a skrz druhý konec, který fritu neobsahoval, byla kolona připojena na kapiláru z polyetherketonu (PEEK) o průměru 0,75 mm a délce 30cm. Ta byla zakončena

spojkou a nástřikovým portem pro mikrostříkačku. Kolona a kapilára byly promyty 500 μ l 200mM glycin-HCl pH 2,3 pomocí mikrostříkačky (Hamilton). Stříkačkou byla následně nanášena suspenze nosiče POROS 20 AL s imobilizovanou proteasou (*AnPEP*, pepsin, aspergillopepsin a nepenthesin-2) nebo směsí proteas (koimobilizace).

Následně byla kolona připojena na HPLC pumpu s 0,4% kyselinou mravenčí jako mobilní fází. Byl postupně zvyšován průtok z 0,1 ml/min na 3 ml/min. Před odpojením kolony z HPLC systému byl průtok stejným způsobem snížen.

Poté byla kolona z obou stran uzavřena fritou a záslepkami a skladována při 4 °C. Kapilára a ostatní příslušenství používané k plnění kolony byly promyty destilovanou vodou a nakonec denaturovaným ethanolem.

3.2.9 Štěpení vybraných proteinů pomocí proteasových kolon

Pro testování kolon s imobilizovanými proteasami byly jako substráty zvoleny myoglobin, boviní karbonická anhydrasa (bCA2), boviní sérový albumin (BSA) a 14-3-3 gamma (proteinový mix) a protilátka trastuzumab (v podobě komerčně dostupného léčiva Herceptin).

Substráty byly vybrány tak, aby obsahovaly různý počet prolinů a cysteinů a měly různou délku sekvence. Disulfidické můstky má z vybraných proteinů pouze BSA a trastuzumab. Další podmínkou bylo, aby poměrné zastoupení aminokyselin v jejich sekvenci přibližně odpovídalo jejich přirozenému procentuálnímu výskytu v lidském proteomu. Trastuzumab byl vybrán pro svou významnou terapeutickou indikaci a z toho vyplývající potřebu znát jeho strukturní vlastnosti. Ty se ve farmaceutickém odvětví často zkoumají pomocí HDX-MS, kde je krok proteolýzy nezbytný pro určení strukturních změn na daných místech proteinu. Proto je míra pokrytí sekvence a charakter vzniklých peptidů měřítkem určujícím aplikovatelnost dané proteasy či kombinace proteas pro strukturní výzkum pomocí HDX-MS.

Proteinový mix byl připraven podle Tab. 7 (str. 51) tak, aby výsledná koncentrace každého z proteinů v 1ml roztoku byla 10 μ M. Po přidání všech čtyřech proteinů byl vzniklý roztok doplněn 50mM Tris-HCl pH 8,8 do výsledného objemu 1 ml a poté intenzivně míchán. Za účelem redukce disulfidických můstků v BSA byl do vzniklého roztoku přidán TCEP tak,

aby jeho výsledná koncentrace byla 10mM. Reakční směs byla inkubována při 65 °C po dobu 10 min. Po vychladnutí byl proteinový mix ředěn 10× pomocí 0,5M glycin-HCl pH 2,3. Výsledný roztok byl rozdělen do mikrozkušavek po 100 µl a zmražen na -80 °C.

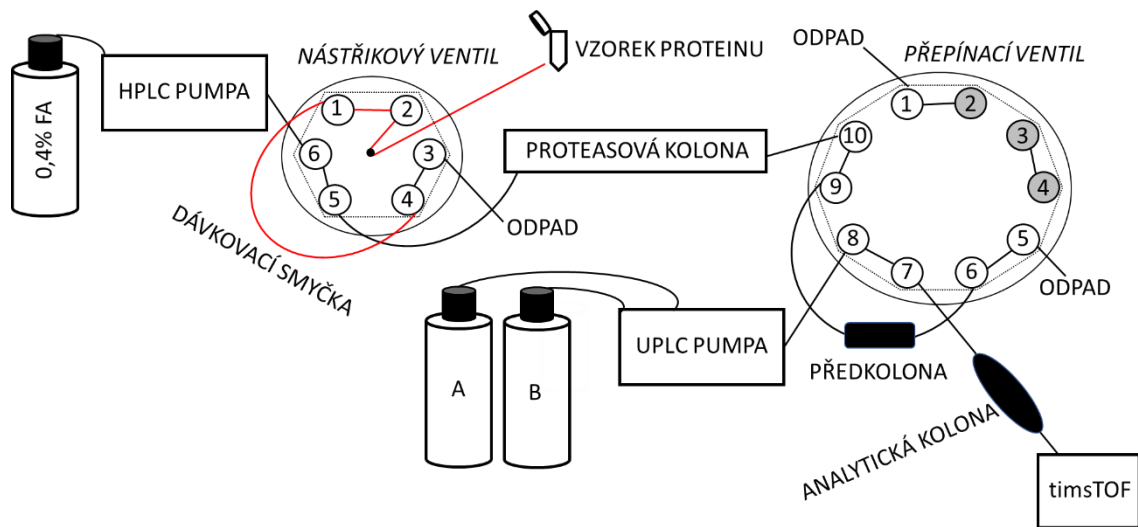
Tab. 7 – Způsob přípravy proteinového mixu, sady proteinů, která sloužila k otestování imobilizovaných proteas.

Protein	c (zásobní roztok) [µg/µl]	c_M(zásobní roztok) [µmol/l]	Faktor ředění	V [µl]
Myoglobin	10	588	58	17
bCA2	10	345	35	28
BSA	10	151	15	66
14-3-3 γ	3,5	118	12	83

Ke 14 µl trastuzumabu o koncentraci 21 mg/ml bylo před štěpením a hmotnostně spektrometrickou analýzou přidáno 1986 µl 2× ředěného zastavovacího pufru pro HDX-MS (3M thiomočovina, 6M močovina, 0,5M TCEP, 0,5M glycin-HCl, pH 2,3). Roztok byl 5 min inkubován na ledu a následně stejným způsobem jako u proteinového mixu rozdělen do mikrozkušavek a zmražen.

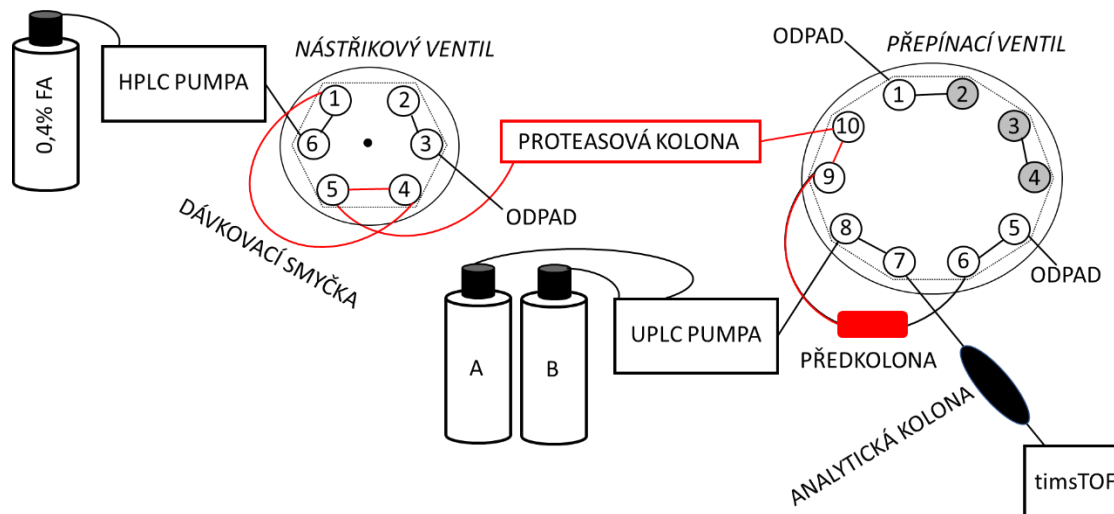
Aby bylo možné posoudit aplikovatelnost jednotlivých proteasových kolon ve vodík/deuteriové výměně spojené s hmotnostní spektrometrií, je potřeba, aby byly dodrženy experimentální podmínky, které se v této metodě používají. To znamená pH proteolýzy 2,3 a teplota 0 °C (zajištěno umístěním kolon do boxu s ledem).

Byl sestaven HDX-MS systém znázorněný na Obr. 17 (str. 52). Do nástřikového ventilu bylo při poloze 1–2 dávkováno 100 µl vzorku proteinového substrátu (proteinový mix nebo trastuzumab).



Obr. 17 – HDX-MS systém umístěný v boxu s ledem. Vzorek je při poloze 1–2 dávkován do 100 μ l smyčky. Případný přebytek vzorku jde do odpadu. Skrz proteasovou kolonu a předkolonu protéká isokraticky kyselina mravenčí. Analytickou separační kolonou protéká gradient acetonitrilu (mobilní fáze A – 0,1% kyselina mravenčí ve vodě a mobilní fáze B – 95% acetonitril, 0,1% kyselina mravenčí, 4,9% voda).

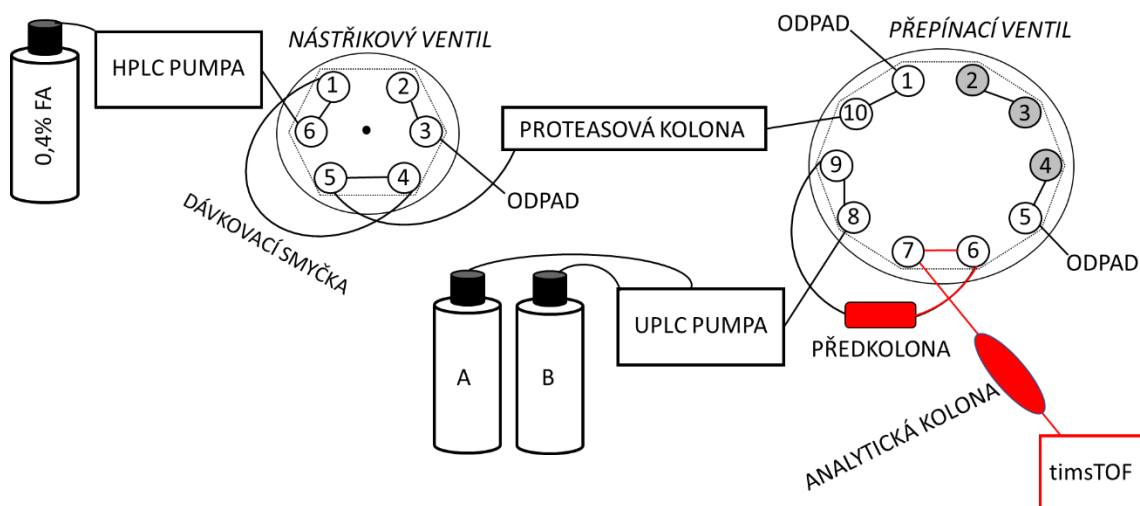
Po přepnutí tohoto ventilu do polohy 1–6 (Obr. 18, str. 53) byl vzorek z dávkovací smyčky unášen isokraticky pomocí 0,4% kyseliny mravenčí na proteasovou kolonu, kde byl štěpen. Proteasová kolona byla propojená s přepínacím ventilem. Vzorek se dostal na předkolonu (Luna Omega Polar C18: 5 μ m, 100 Å, 20 \times 0,3 mm), kde byly zachyceny peptidy a nízkomolekulární složky byly odmyty, čímž došlo k odsolení vzorku.



Obr. 18 – HDX-MS systém umístěný v boxu s ledem. Nástřikový ventil se dostal z polohy 1–2 do polohy 1–6. Vzorek je unášen isokraticky 0,4% kyselinou mravenčí do proteasové kolony, kde je štěpen na peptidy. Kolona je propojena s přepínacím ventilem v poloze 1–2. Vzniklé peptidy jsou zachyceny na předkoloně

a nízkomolekulární složky vzorku jdou do odpadu. Mobilní fáze A – 0,1% kyselina mravenčí ve vodě a mobilní fáze B – 95% acetonitril, 0,1% kyselina mravenčí, 4,9% voda).

Ve chvíli, kdy byla změněna poloha přepínacího ventilu na 1-10, (Obr. 19, str. 54) byly peptidy eluovány z předkolony pomocí acetonitrilového gradientu do analytické separační kolony (Luna Omega Polar C18: 1,6 μm , 100 \AA , 100 \times 1,0 mm) a z ní pak do iontového zdroje (ESI) hmotnostního spektrometru (timsTOF).

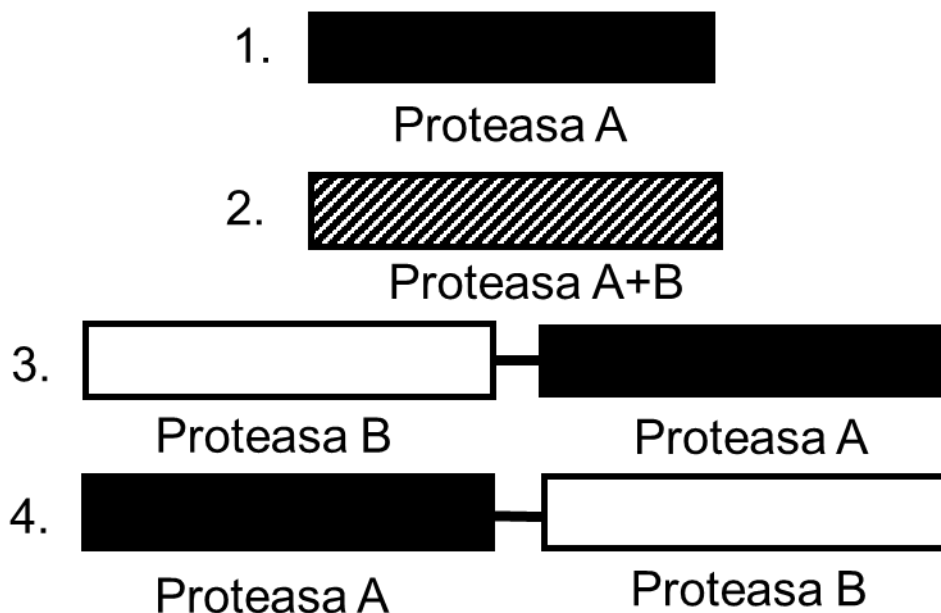


Obr. 19 – HDX-MS systém umístěný v boxu s ledem. Přepínací ventil se dostal z polohy 1-2 do polohy 1-10. Z předkolony jsou pomocí acetonitrilového gradientu (mobilní fáze A – 0,1% kyselina mravenčí ve vodě a mobilní fáze B – 95% acetonitril, 0,1% kyselina mravenčí, 4,9% voda) eluovány vzniklé peptidy, které se dostávají do analytické separační kolony a poté do iontového zdroje hmotnostního spektrometru.

Každá analýza trvala 20 min. Mezi jednotlivými analýzami byl vždy ve 4. minutě přepnut nástříkový ventil z polohy 1–6 (Obr. 18, str. 53) do polohy 1–2 (Obr. 17, str. 52), byl dávkován slepý vzorek (4M močovina, 125mM glycin-HCl pH 2,3) a ventil byl opět přepnut do polohy 1–6. Promývání slepým vzorkem bylo provedeno z důvodu zamezení kontaminace nového vzorku peptidy z předchozí analýzy.

3.2.9.1 Experimentální uspořádání proteasových kolon

Proteolytický krok byl při těchto experimentech proměnlivý, zatímco ostatní podmínky analýzy jako je teplota, mobilní fáze, použité pufrы a průtoková rychlost zůstaly konstantní. Obr. 20 graficky znázorňuje čtyři různá uspořádání proteas. Prvním způsobem bylo štěpení proteinového mixu či trastuzumabu (viz 3.2.9, str. 50) pouze jednou proteasou (*AnPEP*, aspergillopepsin (XIII), pepsin, nepenthesin-2), druhým štěpení kombinací dvou koimobilizovaných proteas (*AnPEP*-pepsin, *AnPEP*-nepenthesin-2, *AnPEP*-aspergillopepsin) a nakonec různé kombinace výše uvedených proteas zapojením kolon za sebou v různých pořadích.



Obr. 20 – Experimentální uspořádání proteasových kolon při jejich testování na proteinovém mixtu a protilátce trastuzumab. 1.: štěpení pouze jednou proteasovou kolonou (*AnPEP*, *aspergillopepsin* (XIII), *pepsin*, *nepenthesin-2*), 2.: koimobilizace dvou proteas (*AnPEP-pepsin*, *AnPEP-nepenthesin-2*, *AnPEP-aspergillopepsin*), 3. a 4.: tandemové zapojení dvou proteasových kolon v jednom (*AnPEP-pepsin*, *AnPEP-nepenthesin-2*, *AnPEP-aspergillopepsin*) a druhém směru (*pepsin-AnPEP*, *nepenthesin-2-AnPEP*, *aspergillopepsi-AnPEP*).

3.2.10 Ultraúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS)

Kapalinový chromatograf a hmotnostní spektrometr byly propojeny s HDX systémem popsaným v kap. 3.2.9, str. 50. Průtok na proteasové koloně byl nastaven na 100 nebo 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ v závislosti na použité protease. V případě koimobilizace *AnPEP* a proteasy XIII byl použit i průtok 400 $\mu\text{l}/\text{min}$. Peptidy vzniklé po štěpení na proteasové koloně byly odsoleny na HPLC předkoloně s oktadecylovými skupinami (Luna Omega Polar C18: 5 μm , 100 \AA , 20 \times 0,3 mm). Pro jejich separaci byla použita HPLC kolona s oktadecylovými skupinami (Luna Omega Polar C18: 1,6 μm , 100 \AA , 100 \times 1,0 mm), na kterou byly peptidy eluovány pomocí acetonitrilového gradientu s průtokovou rychlostí 40 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Analýza separovaných peptidů byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru

timsTOF Pro, který rozděluje ionty vzniklé v elektrospreji podle iontové mobility a dále analyzuje kombinací kvadrupólu a analyzátoru doby letu. Mobilitní cela má dvě části. V první části jsou ionty akumulovány, v druhé separovány podle iontové mobility a poté následuje fragmentace vybraného iontu v kvadrupólu. Výše uvedené procesy probíhají synchronně, v každé z částí mobilitní cely jsou však ionty z jiné části chromatogramu. Nazývají se paralelní akumulace, sériová fragmentace – PASEF (z angl. parallel accumulation serial fragmentation).¹⁰⁶ Hmotnostní spektrometr pracoval v data-dependentním módu, což znamená, že fragmentaci podroboval pouze předem vybrané nejintenzivnější prekurzorové ionty.

3.2.10.1 Zpracování surových dat

Surová data z hmotnostního spektrometru byla otevřena v programu Data Analysis (Bruker). Píky v jednotlivých analýzách byly anotovány pomocí algoritmu SumPeak a MS/MS spektra byla exportována do textového formátu „*.mgf“. Tento export dat byl proveden na intenzitní hladině 50 tisíc a bez intenzitního omezení.

Pro identifikaci vzniklých peptidů byla použita databáze obsahující sekvence proteinových substrátů myoglobinu, bovinní karbonické anhydrasy 2, bovinního sérového albuminu a 14-3-3 gamma (proteinový mix) a protilátky trastuzumab. Obsahovala také používané proteasy (*AnPEP*, *Nep-2*, *XIII* a *pepsin*) a její důležitou součástí byly sekvence častých proteinových kontaminantů z takzvané *cRAP* databáze¹⁰⁷. Pomocí programu *ProteinScape* bylo spuštěno prohledávání databáze pomocí nástroje *MASCOT*. Kritéria prohledávání jsou uvedena v Tab. 8 (str. 57).

Tab. 8 – Kritéria zvolená při prohledání databáze pomocí nástroje MASCOT.

Kritérium	
Min. iontové skóre	20
Min. délka peptidu	5 aminokyselin
Taxonomie	Všechny druhy
Enzym	Nedefinováno
Max. chyba na prekurzoru	10 ppm
Max. chyba na produktovém iontu	0,05 Da
Max. FDR	1 %
Variabilní modifikace	Acetylace na N-konci

Iontové skóre je míra shody mezi experimentálním a teoretickým MS/MS spektrem. Čím vyšší je iontové skóre, tím vyšší je věrohodnost přiřazení daných iontů k peptidové sekvenci a pravděpodobnost náhodného přiřazení je tak nižší. Při skóre 20 je pravděpodobnost výskytu falešně pozitivních identifikací výrazně snížena.

Peptidy, které obsahují méně než 5 aminokyselin, neposkytují většinou dostatečně informativní MS/MS spektra a tak mohou zvyšovat počet falešných identifikací.

Vzhledem k tomu, že nebylo pracováno s komplexními vzorky proteinových substrátů, nebylo potřeba vybrat pro prohledání konkrétní taxonomii (klasifikaci) organismů.

Štěpení za konkrétními aminokyselinami nebylo definováno, protože byly použity nespecifické proteasy. Toto kritérium se nastavuje u specifických proteas jako je např. trypsin.

Určení maximální přípustné chyby prekurzoru a produktového iontu se odvíjí od přesnosti a citlivosti použitého hmotnostního spektrometru. Maximální chyba 10 ppm na prekurzoru znamená, že se m/z experimentálně detekovaného iontu může od *in silico* generovaného iontu lišit o maximálně 10^{-5} %. Maximální chyba na produktovém iontu byla určena na 0,05 Da. To znamená, že se při tomto kritériu mohou experimentální data vůči fragmentu o molekulové hmotnosti 500,0000 Da pohybovat při této toleranci v rozmezí 499,9500–500,0500.

V rámci ověření spolehlivosti identifikace peptidů v MS/MS datech je vytvořena

tzv. decoy databáze. V této databázi jsou převráceny sekvence jednotlivých peptidů nebo je náhodně pomícháno pořadí aminokyselin. Parametry prohledání jsou identické s původní databází. Při prohledání dat decoy databázi by v ideálním případě nemělo dojít k žádnému přiřazení. Pokud k tomu dojde, indikuje to falešně pozitivní identifikace (FP). Pozitivní identifikace (P) jsou přiřazení, která vznikla při prohledání dat cílovou databází obsahující správné, nepřeházené pořadí aminokyselin v peptidech. Míra falešně pozitivních nálezů (z angl. False Discovery Rate, FDR) je definována jako

$$FDR = \frac{FP}{FP+P}$$

FDR muselo být v experimentálních datech dle nastavených kritérií menší než 1 %. Přístup validace identifikací peptidů, kdy využíváme decoy databáze a FDR, je vhodný pouze v případě velkých souborů dat. V případě data setů s malým množstvím spekter (např. při použití databáze pouze o 4 proteinech) by byl počet identifikací příliš nízký na to, aby umožnil přesný výpočet FDR.¹⁰⁸

Abychom identifikovali i peptidy obsahující modifikované aminokyseliny, je nutné tyto modifikace zadefinovat do MASCOTu před prohledáním. Protein bCA2 je na svém N-konci acetylován. Vzhledem k tomu, že ostatní proteiny v proteinovém mixu (myoglobin, 14-3-3 a BSA) tyto modifikaci neobsahují, byla zadána jako variabilní. To znamená, že MASCOT identifikuje v rámci daného souboru dat asparaginy na N-konci s acetylací i bez ní. Pokud by byla zadána N-acetylace zadána jako fixní, budou identifikovány pouze N-koncové peptidy obsahující tuto modifikaci.

Po prohledání surových dat pomocí MASCOT byl výsledný seznam peptidů exportován do formátu *.csv. Ten byl v podobě jejich pozice v aminokyselinové sekvenci spolu se sekvencemi analyzovaných proteinů vložen do makra v MS Excel⁴⁰. Makro umožňuje výpočet štěpných preferencí proteasy vztažený na počet aminokyselin v substrátu podle následujícího vzorce^{40,109},

$$A_{\text{norm}} = \frac{\frac{\sum P1_{\text{AMK}}}{\sum P1_{\text{total}}}}{\frac{\sum S_{\text{AMK}}}{S_{\text{total}}}}$$

kde A_{norm} je normalizovaná aktivita, $P1_{\text{AMK}}$ počet štěpení za danou aminokyselinou (v pozici P1), $P1_{\text{total}}$ celkový počet štěpení v pozici P1, S_{AMK} celkový počet daných

aminokyselin v analyzovaném proteinu a S_{total} celkový počet všech aminokyselin v analyzovaném proteinu. Tímto způsobem je pro konkrétní analýzu spočítáno 20 hodnot A_{norm} (tzn. pro každou proteinogenní aminokyselinu). Pokud je cílem spočítat štěpné preference pro více proteinů najednou, vytvořil RNDr. Daniel Kavan, PhD. software Heisslogo, který na umí na základě *.csv souboru generovat dvojici aminokyselin v pozici P1 a P1'. RNDr. Petr Man, PhD. vytvořil nástroj v MS Excel, do kterého se vloží získaná dvojice aminokyselin, s pomocí které jsou dále spočítány štěpné preference.

Makro v MS Excel umí spočítat také parametry štěpení (počet unikátních peptidů, průměrná délka peptidu, průměrná redundance, sekvenční pokrytí a efektivita štěpení). Průměrná redundance (R) se spočítá jako

$$R = \frac{\sum AMK_x}{S_{\text{total}}},$$

kde AMK_x je kolikrát daná aminokyselina pokrytá v sekvenci a S_{total} celkový počet všech aminokyselin v analyzovaném proteinu.

Redundance vztažená na pokrytá rezidua (R_{cover}) se spočítá jako

$$R_{\text{cover}} = \frac{\sum AMK_x}{AMK_{\text{cover}}},$$

kde AMK_x je kolikrát je daná aminokyselina pokrytá v sekvenci a AMK_{cover} počet pokrytých aminokyselin.

Sekvenční pokrytí (S_c) je spočítáno jako

$$S_c = \frac{\sum AMK}{S_{\text{total}}},$$

kde AMK je pokrytí dané aminokyseliny a S_{total} celkový počet všech aminokyselin v analyzovaném proteinu. AMK nabývá hodnot 0 nebo 1. Jedné nabývá, když je aminokyselina pokrytá a 0 když není.

Efektivita štěpení se spočítá jako

$$E = \frac{PB_{\text{cleaved}}}{PB_{\text{total}}},$$

kde PB_{cleaved} je počet štěpených peptidových vazeb a PB_{total} celkový počet peptidových vazeb spočítaný jako $S_{\text{total}} - 1$.

3.2.10.2 Opakovatelnost měření

Opakovatelnost měření byla stanovována pouze u některých kombinací proteasa-substrát. Byly vybrány vzorky uvedené v Tab. 9. Vzorky byly připravovány a analyzovány postupem, který je popsán v kap. 3.2.9 (str. 50) – 3.2.10 (str. 55). Replikáty všech vzorků uvedených v Tab. 9 byly analyzovány ve stejný den, na stejném přístroji a za stejných podmínek.

Tab. 9 – Vybrané vzorky, u kterých byla sledována opakovatelnost identifikovaných peptidů.

Vzorek	Imobilizované proteasy	Substrát	Průtoková rychlost [μl/min]	Teplota štěpení [°C]
1	AnPEP		100	
2	AnPEP		200	
3	Pepsin		100	
4	Co-Pepsin-AnPEP		100	
5	AnPEP-Pepsin		100	0
6	Pepsin-AnPEP	Proteinový mix	100	
7	Nep-2		200	
8	Co-Nep-2-AnPEP		200	
9	AnPEP-Nep-2		200	
10	Nep-2-AnPEP		200	

Cílem těchto experimentů bylo zjistit, jaká je opakovatelnost analýzy s ohledem na proteasu a na použitý instrument (tims-TOF). Nicméně výsledky měření triplikátů vzorku je nutné považovat pouze za orientační. Pro úplnost by bylo nutné provést minimálně 10 opakování.⁴⁶

Vyhodnocení replikačních analýz bylo provedeno tak, že peptidy, které se vyskytovaly ve 2 nebo 3 z 3 analýz byly považovány za reprodukovatelné a ty, které se vyskytovaly pouze jednou za nereprodukovatelné. Dr. Dmitry Loginov napsal script v Pythonu, který snížil časovou náročnost vyhodnocování. U analýzy vzorku č. 1 (Tab. 9, str. 60) bylo vybráno několik peptidů vzniklých štěpením za prolinem nebo alaninem a zároveň identifikovaných

nástrojem MASCOT pouze jednou. Ty byly dále zkoumány na úrovni surových dat. V programu Data Analysis byl vytvořen extrahovaný chromatogram iontu (XIC) odpovídající, s tolerancí $\pm 0,01$ Da, danému peptidu (iontu). XIC z analýzy, ve které byl peptid identifikován, byl srovnán s XIC z analýzy, ve kterém identifikován nebyl. Dále byla také u těchto analýz srovnávána MS a MS/MS spektra. Na základě informace získané z výše uvedených kroků bylo zhodnoceno, jestli peptid nebyl identifikován kvůli nepřítomnosti v surových datech nebo nedostatečné fragmentaci (nekvalitní MS/MS spektra, nízké skóre fragmentového iontu).

Dále bylo sledováno, jakou měrou ovlivní změna MASCOT iontového skóre z 20 na 12 nebo 1 (méně striktní prohledání) reprodukovatelnost jednotlivých analýz. Při nastavení skóre na 12 nebo 1 byla data prohledána databází obsahující pouze sekvence proteinů BSA, bCA2, myoglobin a 14-3-3.

3.2.11 MALDI-TOF-MS

Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF byl použit k orientační analýze proteinů a vzniklých peptidů. Přístroj má malé rozlišení, nicméně výhodou jsou rychlé analýzy s nízkými finančními náklady v porovnání s LC-MS/MS analýzou na timsTOF. Metoda poskytuje při konstantních experimentálních podmínkách (např. koncentrace proteinu, energie laseru, počet skenů) semikvantitativní informaci.

Využívá se zde skutečnosti, že matrice na terčíku, kterou je převrstven vzorek, absorbuje energii laseru a zprostředkuje tak ionizaci vzorku. Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CCA) je matrice, která se používá při analýze peptidových vzorků. Zatímco kyselina sinapová (SA) se používá při analýze proteinů. CCA matrice byla připravena jako nasycený roztok kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicové v methanolu MS čistoty. SA matrice byla připravena z nasyceného roztoku kyseliny sinapové v 50% acetonitrilu. Vzniklé roztoky byly intenzivně míchány a poté centrifugovány 2 min na stolní centrifuze při $6000\times g$.

Z CCA matrice byl odebrán čirý roztok a byl ředěn vodou a acetonitrilem v poměru 1:1:1. Při měření peptidů bylo nejdříve na MALDI terčík nanášeno 1,5 μ l vzorku a po zaschnutí převrstveno 1,5 μ l ředěného roztoku CCA. Při měření proteinů bylo na MALDI

terčik nanese 1,5 μ l vzorku, který byl hned převrstven 1,5 μ l čirého roztoku SA matrice.

Po zaschnutí vzorků s matricemi byl MALDI terčik vložen do hmotnostního spektrometru, ve kterém všechna měření probíhala v pozitivním módu.

Intaktní proteiny byly měřeny v lineárním módu detektoru a rozsahu 15–80 kilodaltonů (kDa). Peptidy vzniklé štěpením byly měřeny v reflexním módu a rozsahu 0,5–5 kDa. Peptidová spektra byla kalibrována pomocí peptidového kalibračního standardu (Bruker).

4 Výsledky

4.1 Koncentrace celkového proteinu

4.1.1 Stanovení koncentrace celkového proteinu pomocí BCA

U roztoků *AnPEP* (Clarex, Tolerase G), které byly dále použity pro SDS-PAGE (str. 45), proteinové profily (str. 44) a deglykosylaci (str. 43), byla stanovena koncentrace celkového proteinu při 562 nm. Měření bylo provedeno v triplicátech. Koncentrace, vypočítané z rovnice kalibrační závislosti, včetně mediánu a relativní směrodatné odchylky jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10 – Získané koncentrace zdrojů *AnPEP* (Clarex, Tolerase G) po stanovení celkového proteinu při 562 nm. Zleva koncentrace jednotlivých replikátů, medián a relativní směrodatná odchylka.

Zdroj	c_1 [mg/ml]	c_2 [mg/ml]	c_3 [mg/ml]	\bar{x} [mg/ml]	s_r [%]
<i>AnPEP</i>					
Tolerase G	17,5	17,6	17,9	17,6	0,9
Clarex	6,3	6,4	6,3	6,3	1

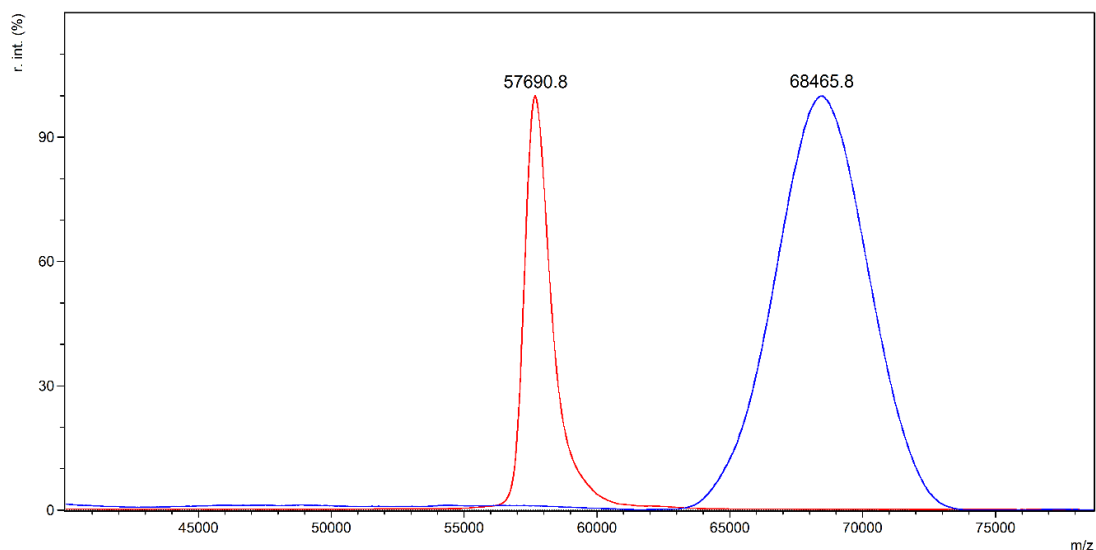
4.1.2 Stanovení celkového proteinu při 280 nm

Koncentrace vzorků proteas po PD-10 (3.2.2, str. 41) určených k imobilizaci byla stanovena Mgr. Markem Polákem. Výsledné hodnoty odpovídaly 11,5 mg/ml pro *AnPEP*, 10,0 mg/ml pro pepsin, 19,3 mg/ml pro XIII a 2,5 mg/ml pro Nep-2.

4.2 Deglykosylace *AnPEP* proteasy

Za účelem ověření úspěšnosti deglykosylace *AnPEP*u pomocí endoglykosidasy H (Endo H) byla provedena hmotnostně spektrometrická analýza (MALDI-TOF). V hmotnostním

spektru (Obr. 21) je zahrnut N-glykosylovaný (modře) a deglykosylovaný vzorek (červeně). Z červeného spektra vyplývá, že došlo ke kompletní deglykosylaci *AnPEPu*, protože zde není přítomen pík odpovídající N-glykosylované formě (cca 69 kDa). Pík deglykosylovaného *AnPEPu* odpovídá přibližně 58 kDa. Modrý pík reprezentující N-glykosylovaný *AnPEP* je široký, protože má tato proteasa stovky proteoformem, je značně heterogenní a rozlišení hmotnostního spektrometru (MALDI-TOF) tak nestačí na jejich zobrazení ve formě jednotlivých píků.



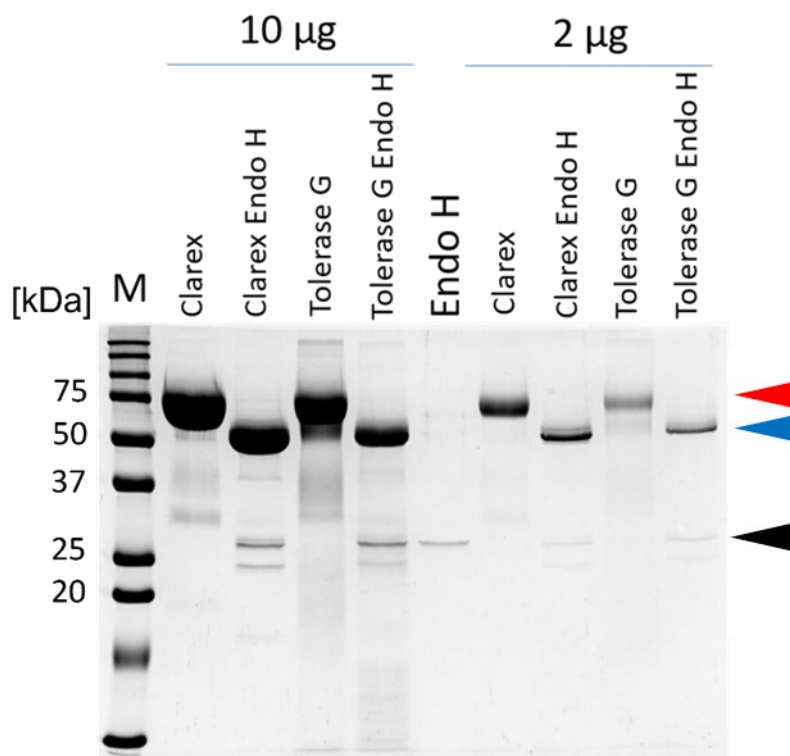
Obr. 21 – MS spektrum N-glykosylovaného (modře) a deglykosylovaného (červeně) *AnPEPu* (Clarex) pomocí *Endo H*.

4.3 SDS-PAGE zdrojů *AnPEP*

Za účelem výběru vhodného zdroje *AnPEP* proteasy byla provedena elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného. Produkt ProAlanase (Promega) nebyl vzhledem k vysoké ceně použit. Z elektroforézy (Obr. 22, str. 64) je zřejmé, že oba zdroje *AnPEP* proteasy, Clarex a Tolerase G, obsahují kromě *AnPEPu*, který kvantitativně zaujímá většinu, i další proteiny. Nicméně Clarex jich dle gelu obsahuje méně. Červená šipka odpovídá pozici pruhu reprezentujícího N-glykosylovanou (původní) formu *AnPEPu*, modrá deglykosylovanou a černá endoglykosidasu H (*Endo H*). Tato glykosidasa štěpí mezi dvěma N-acetylglukosaminovými zbytky s tím, že výsledný produkt obsahuje pouze jeden z těchto zbytků navázaný na asparagin v aminokyselinové sekvenci substrátu,

v tomto případě *AnPEP*u. Tento gel dokazuje, že deglykosylace proběhla úspěšně u Tolerasy G i Clarexu.

V dalších experimentech už byl použit pouze Clarex, protože obsahuje méně kontaminujících proteinů než Tolerance G a je k dispozici ve formě roztoku.



Obr. 22 – 10% SDS-PAGE gel. Zleva M – proteinový standard molekulových hmotností; 10µg vzorku *AnPEP* proteasy: Clarex, deglykosylovaný Clarex, Tolerance G a deglykosylovaná Tolerance G; Endo H; 2µg vzorku *AnPEP* proteasy: Clarex, deglykosylovaný Clarex, Tolerance G a deglykosylovaná Tolerance G.

4.4 Proteinový profil Brewers Clarex a Tolerance G

Abychom zjistili, jestli je proteinové složení Clarexu a Tolerance G srovnatelné, byla provedena LC-MS/MS analýza.

U Clarex pocházelo 95 % identifikovaných peptidů z *AnPEP* a u Tolerasy G 98 %. Minoritními složkami byly glukosidasy, galaktosidasy, amylasy a carboxypeptidasa z rodiny S10. Proteiny identifikované v obou preparátech byly shodné. Deglykosylace preparátů

nevnesla nové proteinové identifikace.

V rámci mé bakalářské práce byla v preparátu Tolerase G identifikována ještě proteasa typu XIII (aspergillopepsin).

4.5 Štěpení proteinového mixu pomocí imobilizovaných proteas

V následujících kapitolách budou prezentovány štěpné charakteristiky různých proteasových kolon s ohledem na jejich použití HDX-MS protokolech. Podrobnosti o jejich experimentálním uspořádání jsou uvedeny v kap. 3.2.9.1, str. 54. V Tab. 11 jsou srovnány obecné charakteristiky modelových proteinů (proteinový mix) štěpených pomocí těchto proteasových kolon. Na základě uvedených vlastností modelových substrátů bude možné dedukovat, jestli má velikost proteinu či zastoupení určitých aminokyselin signifikantní vliv na charakter štěpení. Do tabulky byly vybrány aminokyseliny prolin, alanin a cystein, protože jsou hlavními zásahovými místy pro proteasu *AnPEP*, na jejíž srovnání s ostatními proteasami se zaměřuje tato práce. Sekvence všech testovaných proteinů jsou uvedeny v příloze (P 1, str. 112).

Tab. 11 – Obecné charakteristiky štěpených modelových proteinů. BSA – bovinní sérový albumin, 14-3-3 gamma, bCA2 – bovinní karbonická anhydrasa 2 a Mb – myoglobin. Zleva relativní molekulová hmotnost daného proteinu, zastoupení prolinu, alaninu a cysteinu, které jsou hlavními zásahovými místy AnPEP proteasy.

Protein	M_r	Počet aminokyselin	Zastoupení prolinu [%]	Zastoupení alaninu [%]	Zastoupení cysteinu [%]
BSA	66433,2	583	4,8	8,1	6,0
14-3-3	28496,8	249	1,6	9,2	1,2
bCA2	28982,6	259	7,3	6,6	0,0
Mb	16951,5	153	2,6	9,8	0,0

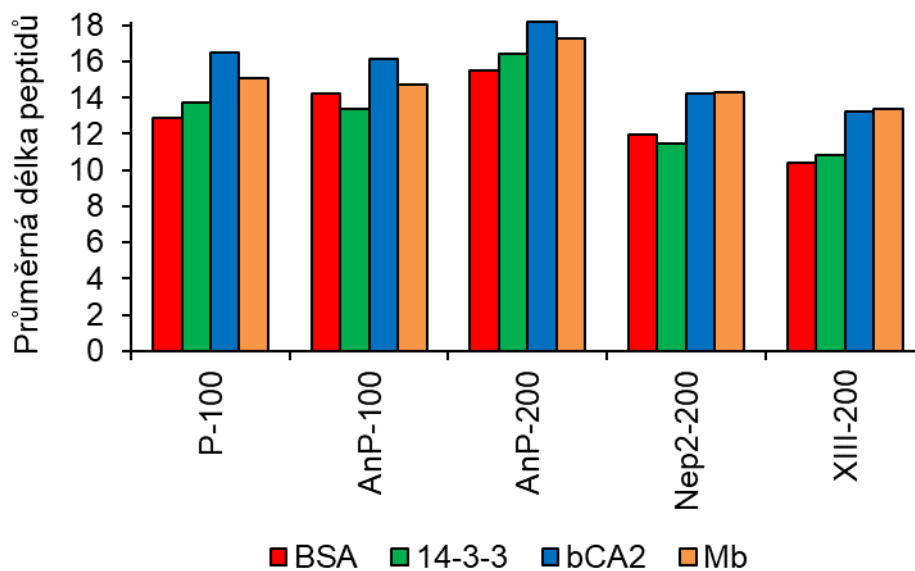
4.5.1 Kolony obsahující pouze jednu proteasu

Nejprve byly otestovány proteolytické nosiče obsahující pouze jeden enzym, jmenovitě imobilizovaný *AnPEP*, nepenthesin-2, proteasu XIII nebo pepsin. Po štěpení substrátů jednotlivými imobilizovanými proteasami a následné LC-MS/MS analýze byly srovnávány jejich klíčové charakteristiky. Těmi jsou především sekvenční pokrytí, distribuce redundance

(překrývající se peptidy) a délky peptidů jednotlivých štěpených modelových proteinů a nakonec štěpné preference.

Sekvenční pokrytí testovaných proteinů se pohybovalo v rozmezí 88-100 %, což je pro HDX-MS aplikace vyhovující. Výjimku tvořil protein 14-3-3 gamma, který měl po štěpení imobilizovaným *AnPEP*em při průtoku 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ pouze 63 % a při 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ 67 %.

V HDX-MS protokolech se standardně používají pepsinové kolony při průtoku 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Optimálního prostorového rozlišení v HDX-MS dosáhneme v případě, kdy se průměrná délka peptidů pohybuje v rozmezí 8–12 aminokyselin. Na Obr. 23 (str. 67) je srovnána u jednotlivých modelových proteinů po štěpení pepsinem, *AnPEP*em, XIII a Nep-2. Průměrná délka peptidů generovaných *AnPEP*em (100 $\mu\text{l}/\text{min}$) byla srovnatelná s těmi pocházejícími z pepsinu. Kratší peptidy než pepsin tvořily imobilizovaný Nep-2 a XIII. Naopak delší peptidy ve srovnání s pepsinem tvořil *AnPEP* při průtoku 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Drobné rozdíly v tomto parametru byly vidět i při srovnání jednotlivých substrátů s tím, že kratší peptidy byly pozorovány u BSA a 14-3-3. Délky peptidů se pohybovaly v rozmezí 10–18 aminokyselin.

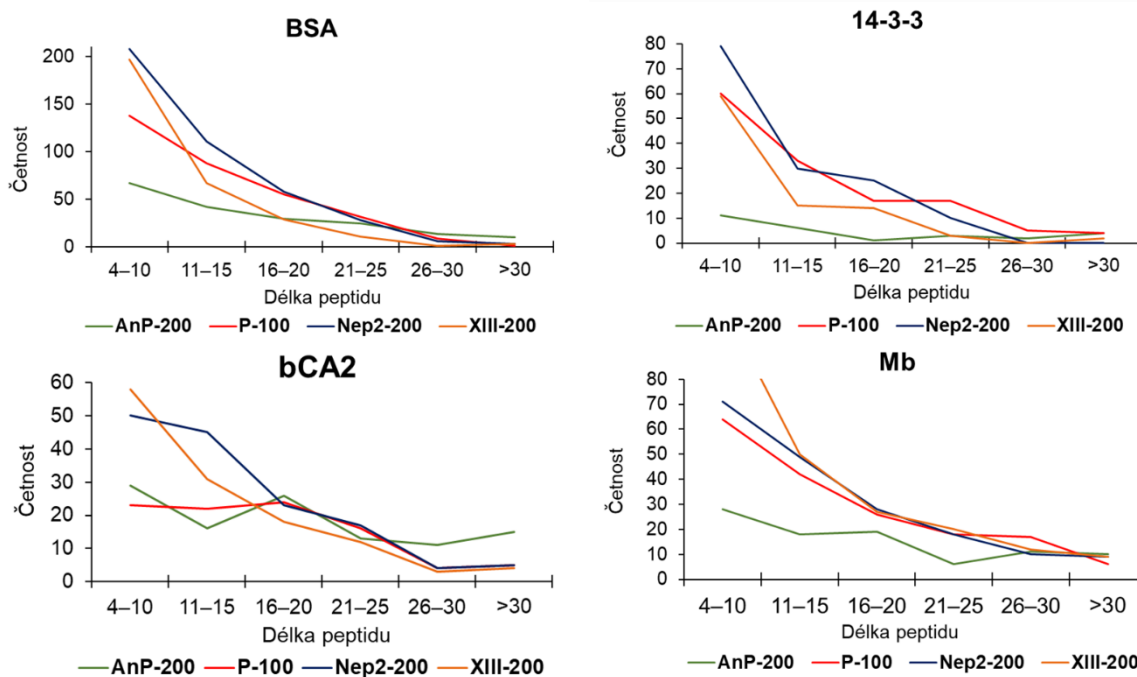


Obr. 23 – Průměrná délka peptidů modelových proteinů generovaných imobilizovanými proteasami. Tento parametr je barevně odlišen pro jednotlivé proteinové substráty: BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C. Čísla za jednotlivými proteasami odpovídají průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. P: pepsin, AnP: AnPEP, Nep-2: nepenthesin-2, XIII: proteasa XIII.

Pouze z této charakteristiky není možné udělat jednoznačný závěr o tom, kterou proteasu kromě pepsinu by bylo vhodné pro HDX-MS experimenty zvolit. Sledování průměrné délky peptidu může být do jisté míry zkreslující. Příliš dlouhé peptidy v určité oblasti proteinu mohou být kompenzovány příliš krátkými v jiné, což ve výsledku může dát falešně vyhovující průměrnou délku peptidů. Proto je vhodnější sledovat distribuci délky peptidu společně s průměrnou hodnotou.

Na Obr. 24 je zobrazena distribuce délek peptidů modelových proteinů po štěpení pomocí jednotlivých proteas. Je možné konstatovat, že peptidy o délce 4–10 aminokyselin jsou u všech analyzovaných vzorků nejpočetnější. Nejvíce peptidů o této délce bylo identifikováno u Nep-2 a XIII. AnPEP má na rozdíl od ostatních sledovaných proteas rovnoměrnou distribuci délek peptidů. Na příkladu štěpení bCA2 (Obr. 24, str. 68) je výrazně vidět, že je tento parametr ve velké míře závislý na použité proteasové koloně.

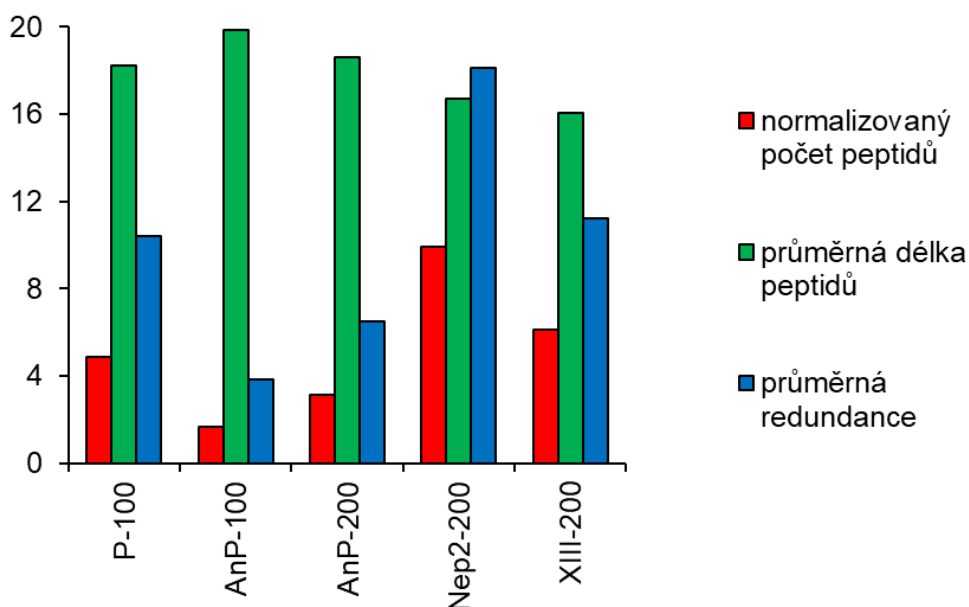
Distribuce délek peptidů pro *AnPEP* při průtoku 100 a 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ se nelišila (P 2, str. 113).



Obr. 24 – Distribuce délek peptidů modelových proteinů (*BSA*, *14-3-3*, *bCA2* a myoglobin). Barevně jsou odlišeny jednotlivé imobilizované proteasy. *AnP*: *AnPEP*, *P*: pepsin, *Nep2*: nepenthesin-2 a *XIII*: proteasa typu *XIII*. Štěpení probíhalo při $\text{pH } 2,5$ a 0°C . Čísla za jednotlivými proteasami odpovídají průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$.

Dalším parametrem, který je možné sledovat, je počet identifikovaných unikátních peptidů vztažený na molekulové hmotnosti jednotlivých modelových proteinů (v kDa). Normalizaci je potřeba provést proto, že by jinak nebylo možné srovnávat počet identifikovaných peptidů napříč proteiny s různou molekulovou hmotností a hodnoty následně zprůměrovat pro celou sady substrátů. To znamená, že protein o vyšší molekulové hmotnosti by měl vždy vyšší počet identifikací. Pro HDX-MS analýzu s vyhovujícím rozlišením je výhodné, aby bylo toto číslo co nejvyšší. Obr. 25 (str. 69) ukazuje srovnání tohoto parametru spolu s průměrnou délkou peptidů a redundancí napříč jednotlivými proteasovými kolonami. Nejvyšší počet unikátních peptidů zprůměrovaný přes jednotlivé substráty poskytl *Nep-2* při průtoku $200 \mu\text{l}/\text{min}$, zatímco nejnižší *AnPEP* při $100 \mu\text{l}/\text{min}$. Průměrná délka peptidů po zprůměrování přes jednotlivé substráty vykazovala obdobný trend jako na Obr. 23 (str. 67). Průměrná redundance (vztažená na pokryté aminokyseliny)

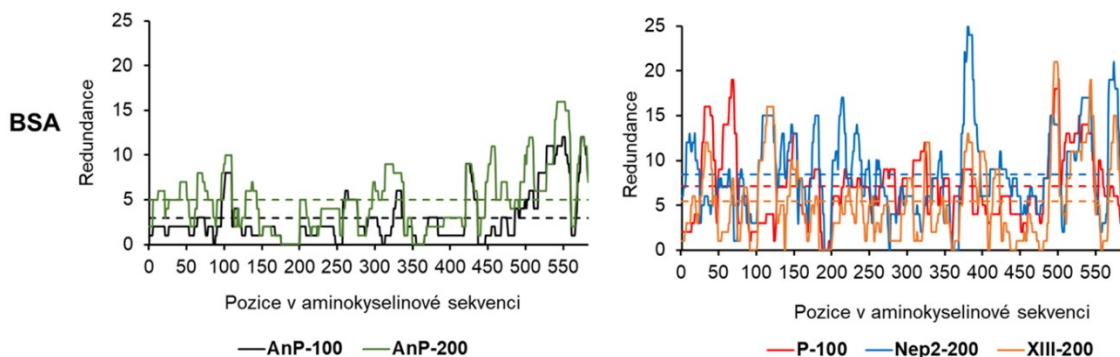
byla u *AnPEP* ve srovnání s *Nep-2*, *XIII* a pepsinem nižší.



Obr. 25 – Srovnání štěpných charakteristik (normalizovaný počet peptidů, průměrná délka peptidů a průměrná redundance) pro jednotlivé proteasové kolony. Uvedené parametry jsou průměrem přes použité modelové proteiny (*BSA*, *Mb*, *14-3-3* a *bCA2*). Počet unikátních peptidů byl normalizován na molekulové hmotnosti modelových substrátů (v *kDa*). Uvedená redundance je vztažena pouze na pokrytá aminokyselinová rezidua. Štěpení probíhalo při *pH* 2,5 a 0 °C. *AnP*: *AnPEP*, *P*: pepsin, *Nep-2*: *nepenthesin-2*, *XIII*: proteasa typu *XIII*. Čísla za jednotlivými proteasami odpovídají průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$.

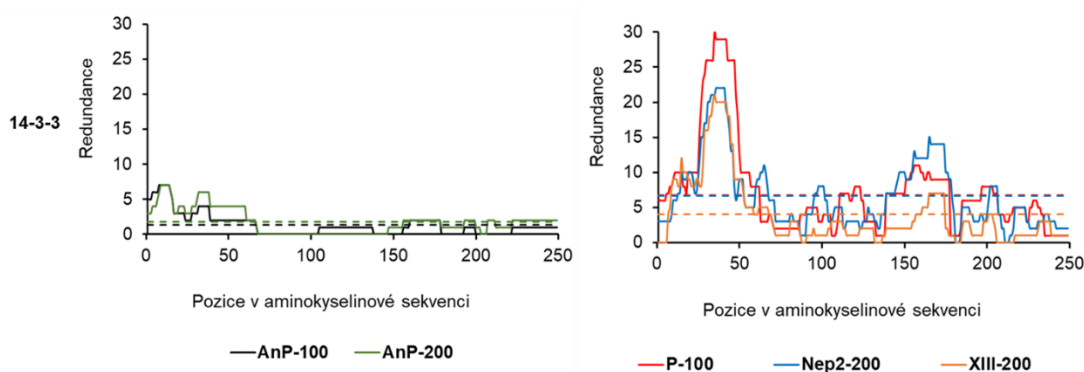
Kromě průměrné redundance je možné sledovat ještě redundanci pro jednotlivé aminokyseliny v modelovém proteinu. Distribuce redundance (Obr. 26, str. 70) byla u *BSA* po štěpení jednotlivými proteasovými kolonami srovnatelná. Na Obr. 26 jsou vidět oblasti v sekvenci *BSA*, které nebyly pokryty vůbec, a jsou identifikovatelná jako místa, kde hodnota $y=0$. Například u *AnPEP* nebyl mezi 176. a 200. aminokyselinou identifikován žádný peptid. Část tohoto regionu může být pokryta pepsinem, *XIII* nebo *Nep-2*, ale oblast 190–198 nepokryla ani jedna ze čtyř použitých proteas. Ostatní aminokyseliny *BSA* byly vždy pokryty peptidy alespoň jedné z proteasových kolon. Naopak v oblasti mezi 376. a 386. aminokyselinou byla redundance peptidů z *Nep-2* štěpení příliš vysoká (přesahovala hodnotu 20).

Z Obr. 26 je zřejmé, že při použití *AnPEP* při dvojnásobném průtoku se zvýší redundance.



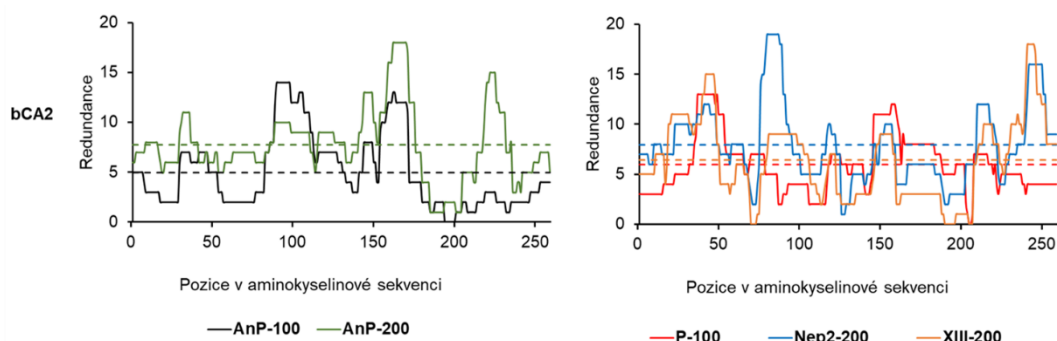
Obr. 26– Distribuce redundance u modelového proteinu BSA. Byl štěpen těmito proteasami – *AnP*: *AnPEP*, *P*: pepsin, *Nep-2*: *nepenthesin-2*, *XIII*: proteasa typu *XIII*. Barevně odlišené čárkované přímky odpovídají průměrné redundanci pro danou kolonu. Čísla za jednotlivými proteasami označují průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Štěpení probíhalo při $\text{pH } 2,5$ a 0°C .

Z Obr. 27 je vidět, že je distribuce redundance proteinu 14-3-3 nezávislá na typu proteasy. U tohoto proteinu také nebyl zásadní rozdíl mezi distribucí redundance po štěpení *AnPEP* při průtoku 100 a 200 $\mu\text{l}/\text{min}$.



Obr. 27 – Distribuce redundance u modelového proteinu 14-3-3. Byl štěpen těmito proteasami – *AnP*: *AnPEP*, *P*: pepsin, *Nep-2*: *nepenthesin-2*, *XIII*: proteasa typu *XIII*. Barevně odlišené čárkované přímky odpovídají průměrné redundanci pro danou kolonu. Čísla za jednotlivými proteasami označují průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Štěpení probíhalo při $\text{pH } 2,5$ a 0°C .

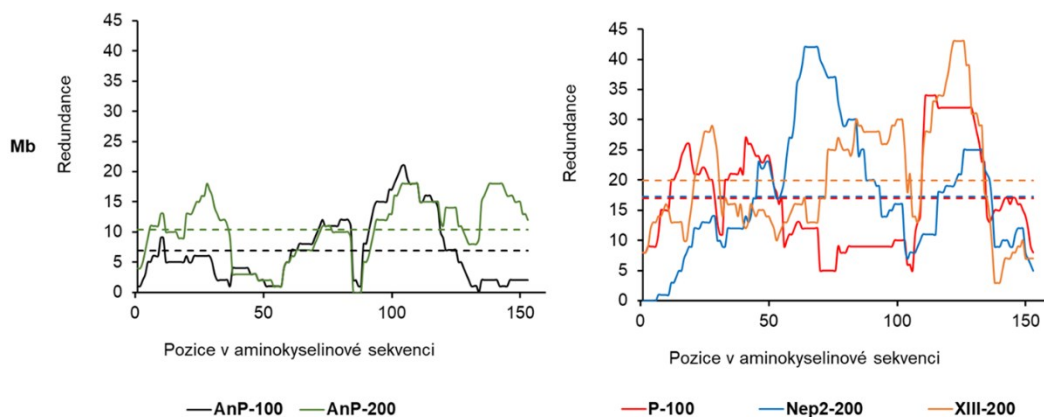
Obr. 28 opět demonstruje, že je distribuce redundance závislá na proteinovém substrátu. Mezi proteasami XIII, Nep-2 a pepsin jsou pouze drobné rozdíly. Oproti tomu *AnPEP* se v tomto parametru od ostatních proteas odlišuje. U štěpení touto proteasou je také vidět odlišnost



Obr. 28 – Distribuce redundance u modelového proteinu *bCA2*. Byl štěpen těmito proteasami – *AnP*: *AnPEP*, *P*: pepsin, *Nep-2*: *nepenthesin-2*, *XIII*: proteasa typu *XIII*. Barevně odlišené čárkované přímky odpovídají průměrné redundanci pro danou kolonu. Čísla za jednotlivými proteasami označují průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Štěpení probíhalo při $\text{pH } 2,5$ a 0°C .

mezi průtoky 100 a 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Okolo 100. aminokyseliny má *AnPEP* vyšší redundanci při nižším průtoku, což poukazuje na skutečnost, že vyšší průtok nemusí vždy poskytnout vyšší počet identifikovaných peptidů, a tím i vyšší redundanci.

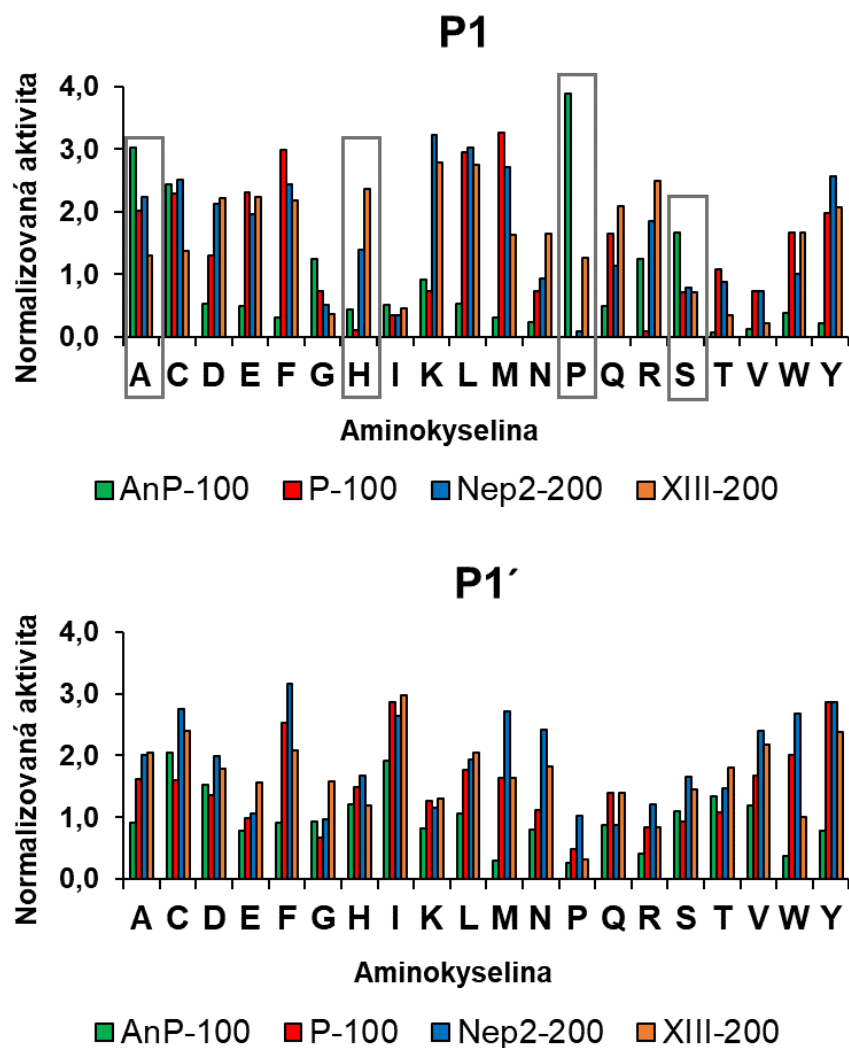
Štěpení myoglobinu je názorným příkladem, kdy je distribuce redundance pro jednotlivé proteasy odlišná a poukazuje na jejich komplementaritu (Obr. 29, str. 72). Tento parametr se lišil dokonce dokonce i v rámci použití různých průtoků u *AnPEP*. Oblast, která byla hůře pokryta při použití průtoku 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ byla kompenzována při průtoku 200 $\mu\text{l}/\text{min}$.



Obr. 29 – Distribuce redundance u modelového proteinu myoglobinu. Byl štěpen těmito proteasami – AnP: AnPEP, P: pepsin, Nep-2: nepenthesin-2, XIII: proteasa typu XIII. Barevně odlišené čárkované přímkové odpovídají průměrné redundanci pro danou kolonu. Čísla za jednotlivými proteasami označují průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C.

Dalším parametrem štěpení, který je možné sledovat, jsou štěpné preference jednotlivých proteasových kolon. Aby měly větší vypovídající hodnotu, byly normalizovány na výskyt daných aminokyselin v testovaných proteinech. Normalizované aktivity jednotlivých aminokyselin byly sečteny přes všechny analyzované modelové substráty. Testované proteasové kolony vykazovaly odlišné štěpné preference (Obr. 30, str. 73). AnPEP štěpil oproti ostatním proteasám výrazně více za prolinem, alaninem a serinem (pozice P1). XIII štěpila za histidinem (P1 pozice) výrazně častěji než ostatní proteasy. Vysokou preferenci pro histidin ukázal také Nep-2. Obecně méně zastoupenými aminokyselinami v P1 pozici byly valin, izoleucin a threonin. V P1' pozici bylo rozložení jednotlivých aminokyselin více rovnoměrné. Nep-2 pro aminokyseliny v této pozici nejširší specifitu. Štěpné preference AnPEP nebyly ovlivněny změnou průtoku ze 100 na 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ (P 3, str. 113).

Zhodnocení štěpných charakteristik v této kapitole poukazuje na komplementaritu testovaných proteasových kolon. Nejen z tohoto důvodu je výhodné tyto proteasové kolony v LC-systému sériově spojit nebo použít směsné kolony obsahující dvě proteasy. Peptidová mapa BSA (P 21, str. 113) na oblastech vyznačených šedými obdélníky ukazuje, že při použití alternativních proteas jsme byli schopni, díky dalším zásahovým místům, identifikovat kratší peptidy než u pepsinu.



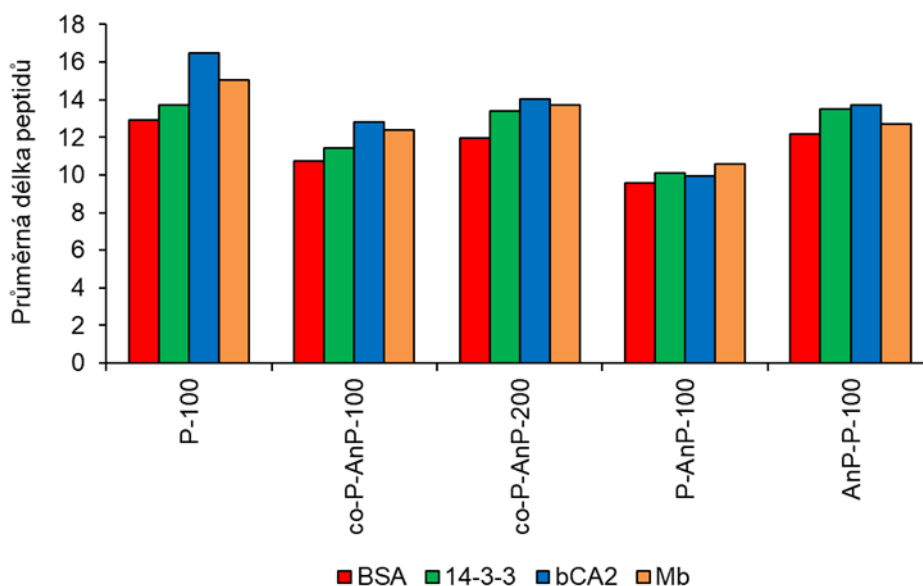
Obr. 30 – Štěpné preference imobilizovaných proteas. AnP: AnPEP, P: pepsin, Nep-2: nepenthesin-2, XIII: proteasa typu XIII. Číslo za jednotlivými proteasami označují průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Proteolýza probíhala při pH 2,5 a 0 °C. Štěpné preference jsou normalizovány na výskyt jednotlivých aminokyselin v modelových proteinech (BSA, Mb, 14-3-3, bCA2). V tomto grafu jsou sečteny normalizované aktivity pro jednotlivé modelové proteiny. Významné rozdíly jsou označeny žlutými obdélníky. P1 aminokyselina je vlevo od štěpné peptidové vazby a P1' vpravo od štěpné peptidové vazby.

4.5.2 Kombinace pepsinu a AnPEP proteasy

Pepsin je standardně používanou proteasou v HDX-MS. V experimentech na proteinovém mixu s kolonami obsahujícími jednu proteasu (str. 65) vykazoval širokou specifitu spojenou

s vysokou redundancí a neštěpil za prolinem. Tuto schopnost měla naopak proteasa *AnPEP*. Za účelem spojení výhod těchto proteas byly jejich kolony zapojeny za sebou (tandemově, sériově) a také byla provedena koimobilizace (jeden nosič a kolona).

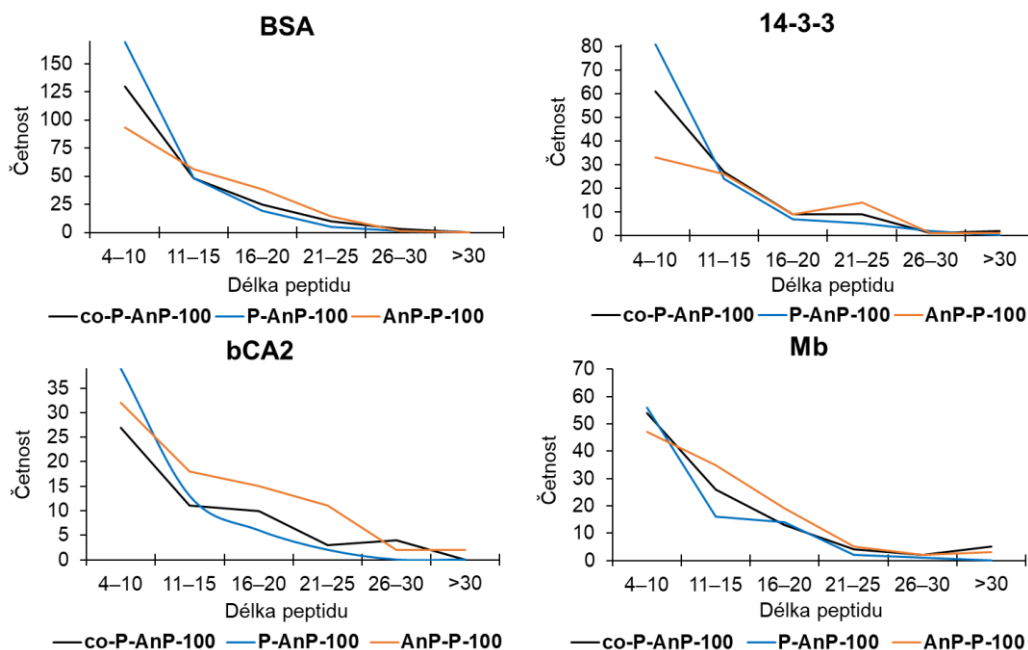
Sekvenční pokrytí kombinací pepsinu a *AnPEP*u se pohybovalo v rozmezí 82–100 %. Nejvyšší pokrytí (93–100 %) poskytla kolona s koimobilizovaným *AnPEP*em a pepsinem při průtoku 200 $\mu\text{l}/\text{min}$.



Obr. 31 – Průměrná délka peptidů modelových proteinů generovaných kombinacemi imobilizovaných proteas. Tento parametr je barevně odlišen pro jednotlivé proteinové substráty: BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C. P: pepsin, co-P-AnP: koimobilizovaný pepsin a *AnPEP*, P-AnP, AnP-P: sériově zapojené kolony s pepsinem a *AnPEP*em v příslušném pořadí. Čísla za jednotlivými proteasovými kolonami odpovídají průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$.

Průměrná délka peptidů při štěpení pomocí kombinace pepsinu a *AnPEP*u byla kratší než u samotného pepsinu (Obr. 31). Pohybovala se v rozmezí 10–14 aminokyselin. Nejkratší peptidy byly generovány zapojením imobilizovaného pepsinu následovaného *AnPEP*em.

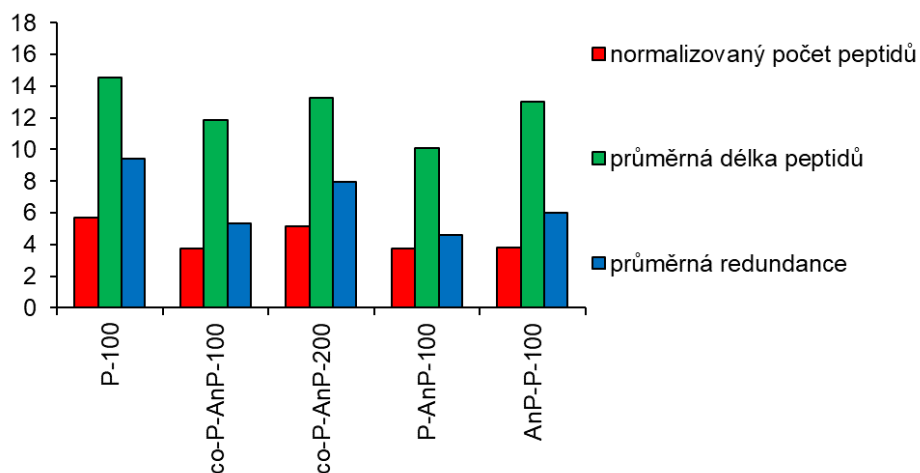
U kombinací těchto proteas byla sledována také distribuce délek vzniklých peptidů. Nejvíce peptidů o délce 4–10 bylo generováno kombinací pepsin-*AnPEP* v sériovém zapojení. Distribuce délek peptidů u tandemového zapojení *AnPEP*-pepsin se odlišovala od zbývajících dvou kombinací (Obr. 32). U zapojení *AnPEP*-pepsin byla závislost distribuce délky peptidů méně strmá.



Obr. 32 – Distribuce délek peptidů modelových proteinů (BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin). Barevně jsou odlišeny kombinace imobilizovaných proteas. P: pepsin, co-P-AnP: koimobilizovaný pepsin a *AnPEP*, P-AnP, AnP-P: sériově zapojené kolony s pepsinem a *AnPEP*em v příslušném pořadí. Čísla za jednotlivými proteasami odpovídají průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C.

Distribuce délky peptidů při štěpení *AnPEP*em koimobilizovaným s pepsinem při průtoku 100 a 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ se zásadně nelišila (P 4, str. 113).

Zprůměrováním průměrné délky peptidu přes všechny čtyři modelové proteiny (Obr. 33, str. 76) byl opakovaně pozorován trend jako u Obr. 31, str. 74. Všechny kombinace *AnPEP* a pepsinu tvořily kratší peptidy než samotný pepsin s tím, že nejvíce vyhovující délku představovaly kombinace koimobilizovaných proteas a tandemového zapojení pepsin-*AnPEP* (Obr. 33, str. 76). Průměrná redundance kombinovaných kolon byla nižší než u samotného pepsinu, ale stále vyhovující (Obr. 33, str. 76).



Obr. 33 – Srovnání štěpných charakteristik (normalizovaný počet peptidů, průměrná délka peptidů a průměrná redundance) pro jednotlivé kombinace imobilizovaných proteas.. Uvedené parametry jsou průměrem přes použité modelové proteiny (BSA, Mb, 14-3-3 a bCA2). Počet unikátních peptidů byl normalizován na molekulové hmotnosti modelových substrátů (v kDa). Uvedená redundance je vztažena pouze na pokrytá aminokyselinová rezidua. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C. P: pepsin, co-P-AnP: koimobilizovaný pepsin a AnPEP, P-AnP, AnP-P: sériově zapojené kolony s pepsinem a AnPEPem v příslušném pořadí. Čísla za jednotlivými proteasami odpovídají průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$.

Každopádně vyšší váhu má její distribuce (viz dále). Počet identifikovaných peptidů byl nejvyšší u koimobilizovaného AnPEPu s pepsinem (200 $\mu\text{l}/\text{min}$) a pepsinové kolony.

Při mapování pokrytí všech čtyř modelových proteinů bylo zjištěno, že kolona s koimobilizovaným pepsinem a AnPEPem (200 $\mu\text{l}/\text{min}$) štěpila s nejmenším počtem nepokrytých aminokyselin (47). Naopak nejvyšší počet nepokrytých aminokyselin mělo tandemové zapojení AnPEP-pepsin (130). Distribuce redundance byla v rámci jednoho proteinu pro všechny tři kombinace pepsinu s AnPEPem shodná (P 5, str 113). Dvojnásobné zvýšení průtoku u pepsinu koimobilizovaného s AnPEPem bylo demonstrováno vyšší redundancí, ale distribuce se zásadně nelišila (P 6, str. 113).

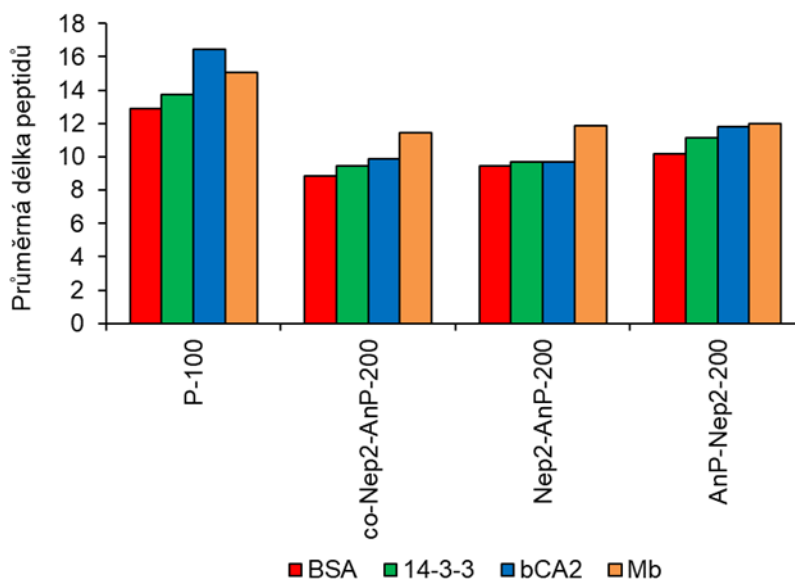
Štěpné preference byly v celkovém měřítku pro všechny tři kombinace kolon velmi podobné. Koimobilizová kolona (100 $\mu\text{l}/\text{min}$) generovala oproti ostatním kombinacím

(včetně její 200 μ l/min varianty) výrazně více peptidů majících na C-konci (P1 pozice) methionin a prolin (P 7 a P 8, str. 113–113) a oproti tandemovým kombinacím více peptidů s isoleucinem na N-konci (P1' pozice).

4.5.3 Kombinace Nep-2 a AnPEP proteasy

Další testovanou kombinací byl AnPEP s Nep-2. Spojení těchto dvou proteas poskytlo pokrytí sekvence v rozsahu 85–100 %. Toto pokrytí je srovnatelné se spojením AnPEP a pepsin. Nejhůře pokrytá byla při štěpení pomocí této kombinace proteas sekvence u modelového proteinu bCA2, který obsahuje nejvíce prolinů ze všech testovaných proteinových substrátů.

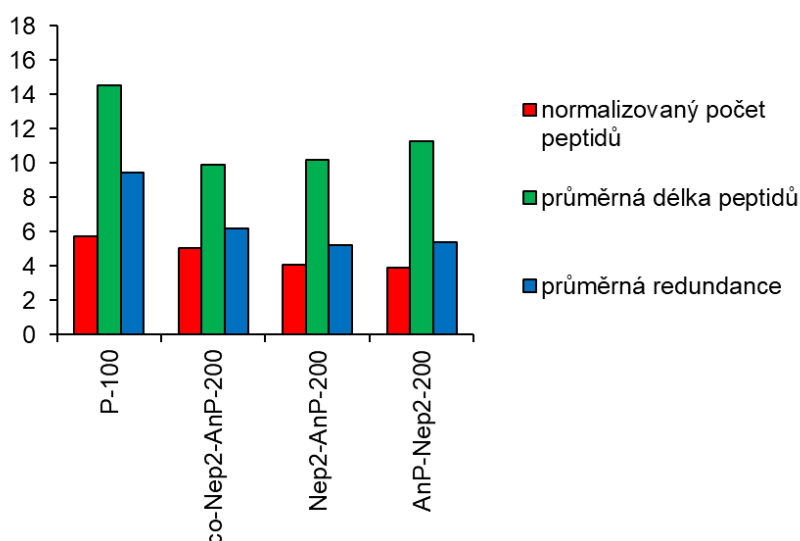
Proteasové kolony s Nep-2 a AnPEP měly nižší průměrnou délku peptidů než pepsinová kolona (Obr. 34). Trend tohoto parametru napříč testovanými proteasami byl shodný u koimobilizované kolony a tandemového zapojení Nep2-AnPEP.



Obr. 34 – Průměrná délka peptidů modelových proteinů generovaných kombinacemi imobilizovaných proteas. Tento parametr je barevně odlišen pro jednotlivé proteinové substráty: BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C. P: pepsin, co-Nep2-AnP: koimobilizovaný nepenthesin-2 a AnPEP, Nep2-AnP, AnP-Nep2: sériově zapojené kolony s Nep-2 a AnPEPem v příslušném pořadí. Čísla za jednotlivými proteasovými kolonami odpovídají průtokové rychlosti proteasovou kolonou v μ l/min.

Distribuce délky peptidů se v rámci testované sady proteinů pro všechny tři kombinace Nep-2-*AnPEP* zásadně nelišila (P 9, str. 113). Nejvyšší počet peptidů o délce 4–10 aminokyselin byl identifikován u koimobilizované kolony.

Na Obr. 35 je srovnána průměrná délka peptidů pro testované proteasové kolony a pozorovaný trend je totožný s tím na Obr. 34. Průměrná redundance byla sice nejvyšší pro pepsinovou kolonu (9), ale kombinace *AnPEP*-Nep-2 měly vyhovující hodnotu pohybující se v rozmezí 5–6 (Obr. 35). Nejvyšší normalizovaný počet unikátních peptidů byl identifikován u pepsinové kolony (6), nicméně hodnoty ostatních proteolytických nosičů byly srovnatelné (4–5).



Obr. 35 – Srovnání štěpných charakteristik (normalizovaný počet peptidů, průměrná délka peptidů a průměrná redundance) pro jednotlivé proteasové kolony. Uvedené parametry jsou průměrem přes použité modelové proteiny (*BSA*, *Mb*, *14-3-3* a *bCA2*). Počet unikátních peptidů byl normalizován na molekulové hmotnosti modelových substrátů (v *kDa*). Uvedená redundance je vztažena pouze na pokrytá aminokyselinová rezidua. Štěpení probíhalo při *pH* 2,5 a 0 °C. *P*: pepsin, *co-Nep2-AnP*: koimobilizovaný nepenthesin-2 a *AnPEP*, *Nep2-AnP*, *AnP-Nep2*: sériově zapojené kolony s *Nep-2* a *AnPEP*em v příslušném pořadí. Čísla za kolonami odpovídají průtokové rychlosti v $\mu\text{l}/\text{min}$.

Při analýze výsledků štěpení pomocí kombinace *AnPEP*u a *Nep-2* byla opět viditelná závislost distribuce redundance na modelovém proteinu (P 10, str. 113). Naopak distribuce redundance po štěpení různými kombinacemi kolon v rámci jednoho testovaného proteinu byla srovnatelná. Dále byl mapován počet aminokyselin, který neměl po štěpení modelových

proteinů imobilizovanými proteasami žádné pokrytí. Nejnižší počet takových reziduí byl nalezen u koimobilizované kolony (40) a o něco vyšší u tandemového zapojení *AnPEP-Nep-2* (71) a *Nep2-AnPEP* (63).

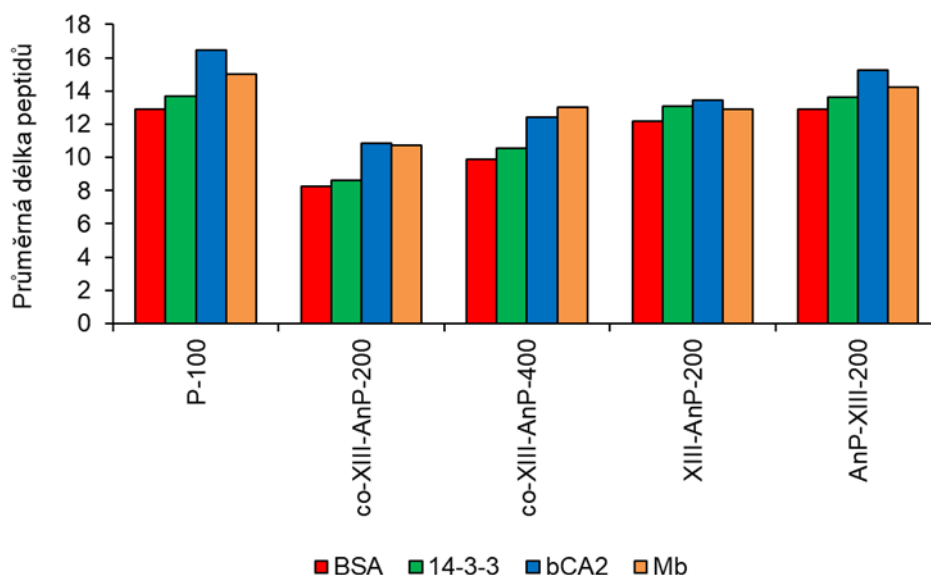
Štěpné preference se napříč různými kombinacemi proteasových kolon zásadně nelišily (P 11, str. 113).

4.5.4 Kombinace proteasy typu XIII a *AnPEP*

Poslední kombinací proteas testovaných na proteinovém mixu byly kolony s *AnPEP* a proteasou XIII. Při vyhodnocování sekvenčního pokrytí modelových proteinů po štěpení pomocí koimobilizované kolony a dvou tandemových zapojení byla zjištěno velmi široké rozmezí sekvenčního pokrytí (37–100 %) poukazující na vysokou závislost úspěšnosti digesce jak na vlastnostech proteinového substrátu, tak kolonovém uspořádání. V průměru nejnižší pokrytí poskytla kolona s koimobilizovaným *AnPEP*em a XIII při průtoku 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Naopak v průměru nejvyšší pokrytí bylo dosaženo sériovým zapojením XIII a *AnPEP*.

Z pohledu proteinových substrátů měly nižší pokrytí (v průměru 50–70 %) rozměrnější proteiny BSA a 14-3-3. Horší pokrytí u BSA je této kombinace proteas překvapivé, protože samotné proteasové kolony byly schopny tento protein pokrýt z 89–93 %. Zatímco nevyhovující pokrytí u 14-3-3 bude pravděpodobně ovlivněno *AnPEP*em (viz kap. 4.5.1, str. 65), který pro tento protein poskytl velmi nízké pokrytí.

Průměrná délka peptidů vzniklých štěpením pomocí kolon *AnPEP*u s XIII byla opět obecně kratší než při použití samotného pepsinu (Obr. 36, str. 80). Nejkratší peptidy vznikaly při zapojení koimobilizované XIII a *AnPEP*u při průtoku 200 $\mu\text{l}/\text{min}$.

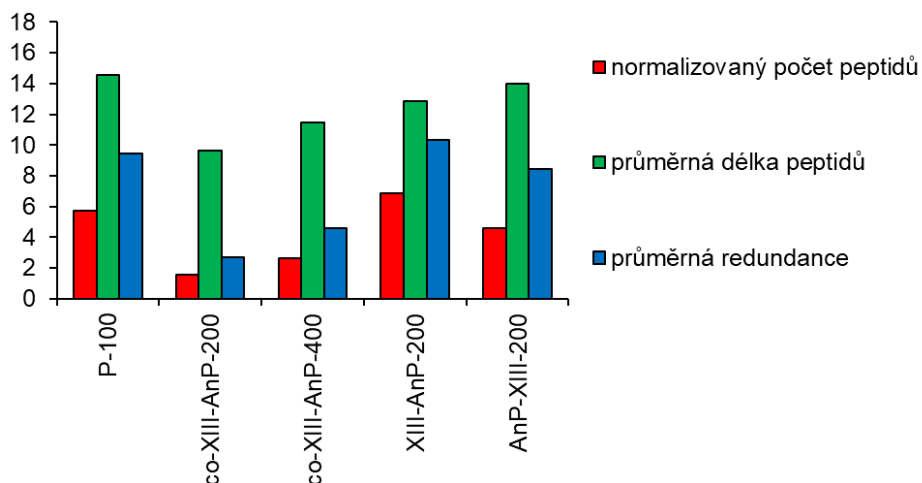


Obr. 36 – Průměrná délka peptidů modelových proteinů generovaných kombinacemi imobilizovaných proteas. Tento parametr je barevně odlišen pro jednotlivé proteinové substráty: BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C. P: pepsin, co-XIII-AnP: koimobilizovaná proteasa XIII a AnPEP, XIII-AnP, AnP-XIII: sériově zapojené kolony s XIII a AnPEPem v příslušném pořadí. Čísla za jednotlivými proteasovými kolonami odpovídají průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$.

Distribuce délky peptidů se u těchto kolon lišila ve strmosti závislosti (P 12, str. 113). Křivka pro tandemové zapojení XIII-AnPEP byla výrazně strmější než zbylá dvě uspořádání. Při spojení kolon XIII a AnPEP (v tomto pořadí) bylo identifikováno nejvíce peptidů v rozmezí 4–10 aminokyselin. Rozdíl mezi těmito třemi kombinacemi byl nejvíce patrný v grafu distribuce délky peptidů BSA. Distribuce délky peptidu byla ještě srovnána pro průtok 200 a 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ u koimobilizované kolony (P 13, str. 113). Závislost byla u průtoku 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ strmější a kromě proteinu bCA2 byl u ostatních proteinů nalezen nejvyšší počet peptidů v rozmezí 4–10 aminokyselin právě u tohoto průtoku.

Průměrná délka peptidů zprůměrovaná přes jednotlivé substráty (Obr. 37, str. 81) vykazovala stejný trend jako na Obr. 36, str. 80. Pro koimobilizovanou kolonu při průtoku 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ byl sice tento parametr nejvíce vyhovující ve srovnání s ostatními imobilizovanými kombinacemi na (Obr. 37, str. 81), ale všechny ostatní parametry jako je sekvenční pokrytí, průměrná redundance, počet identifikovaných peptidů a distribuce

redundance a délky peptidů byly neuspokojivé. Z Obr. 37 by jako nejvíce vyhovující vyplynula XIII s AnPEP v tandemovém zapojení, protože má nižší průměrnou délku peptidů a vyšší počet identifikovaných unikátních peptidů než pepsin, jednotkovou redundanci (>4) a zároveň měla z testovaných kombinací XIII-AnPEP nejvyšší sekvenční pokrytí.



Obr. 37 – Srovnání štěpných charakteristik (normalizovaný počet peptidů, průměrná délka peptidů a průměrná redundance) pro jednotlivé proteasové kolony. Uvedené parametry jsou průměrem přes použité modelové proteiny (BSA, Mb, 14-3-3 a bCA2). Počet unikátních peptidů byl normalizován na molekulové hmotnosti modelových substrátů (v kDa). Uvedená redundance je vztažena pouze na pokrytá aminokyselinová rezidua. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C. P: pepsin, co-XIII-AnP: koimobilizovaná XIII a AnPEP, XIII-AnP, XIII-Nep2: sériově zapojené kolony se XIII a AnPEPem v příslušném pořadí. Čísla za kolonami odpovídají průtokové rychlosti v $\mu\text{l}/\text{min}$.

Z grafu distribuce redundance (P 14, str. 113) je vidět poměrně hodně propadů pokrytí na nulu, především u koimobilizované kolony (200 $\mu\text{l}/\text{min}$). Jak už bylo zmíněno výše, opět se zde potvrzuje, že distribuce redundance závisí spíše na proteinovém substrátu než na proteasové koloně. Distribuce redundance byla srovnána také pro koimobilizovanou kolonu při průtoku 200 a 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ (P 15, str. 113). Vidíme, že ani dvojnásobný průtok výrazně neeliminuje výskyt aminokyselin s nulovým pokrytím.

Všechny testované kombinace AnPEP a XIII měly velmi širokou specifitu štěpení v P1 i P1' pozici (P 16, str. 113). Téměř všechny aminokyseliny se vícekrát staly zásahovým místem pro tyto imobilizované proteasy, jak P1, tak v P1' pozici.

Pouze threonin (v P1 pozici) a prolin (v P1' pozici) byly méně časté. Nejvyšší normalizovanou aktivitu napříč aminokyselinovým spektrem mělo sériové zapojení XIII-*An*PEP. Dále byly srovnány štěpné preference koimobilizované kolony při průtoku 200 a 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ (P 17, str. 113). Kolona s dvojnásobným průtokem ve větší míře štěpila v P1 pozici za alaninem a generovala více peptidů s aspartátem na N-konci.

Koimobilizovaná kolona XIII s *An*PEP měla z doposud testovaných kolon nejméně vhodné štěpné charakteristiky. Bylo zjištěno, že až 44 % identifikovaných peptidů pochází právě z *An*PEP. Tento fakt naznačuje významnou degradaci (autolýzu) *An*PEP v této směsné koloně. Pro srovnání, v případě směsné kolony *An*PEPu s pepsinem pocházelo pouze 1 % identifikovaných peptidů z *An*PEP.

4.5.5 Výběr nejvhodnější kombinace imobilizovaných proteas pro HDX-MS

Z předešlých kapitol vyplynuly jako nejvhodnější kombinace imobilizovaných proteas koimobilizovaný pepsin-*An*PEP (200 $\mu\text{l}/\text{min}$) a nepenthesin-2-*An*PEP, a také XIII-*An*PEP v tandemovém zapojení. V této kapitole budou srovnána tato tři uspořádání.

Tab. 12 – Srovnání proteolyticky aktivních nosičů. Co-P-AnP: AnPEP koimobilizovaný s pepsinem, co-Nep2-AnP: AnPEP koimobilizovaný s nepenthesinem-2, XIII-AnP: proteasa typu XIII a AnPEP v tandemovém zapojení. Sekvenční pokrytí, průměrná délka peptidu, zastoupení peptidů o dané délce i normalizovaný počet peptidů jsou průměrem přes testované modelové proteiny (bCA2, Mb, 14-3-3 a BSA). Počet unikátních peptidů je vztažen na molekulové hmotnosti testovaných proteinů (v kDa). Počet nepokrytých aminokyselin je sečten pro všechny čtyři testované proteiny.

Proteolytický nosič	Průměrné sekvenční pokrytí [%]	Průměrná délka peptidu	Zastoupení peptidů o délce 4–10 [%]	Normalizovaný počet peptidů	Počet nepokrytých aminokyselin
Co-P-AnP-200	93,4	13,3	46,7	5,1	47
Co-Nep2-AnP-200	92,7	9,9	68,9	5,1	40
XIII-AnP-200	91,6	12,9	49,7	6,9	100

Nejvyšší normalizovaný počet unikátních peptidů (Tab. 12) byl nalezen u XIII-AnPEP v tandemovém zapojení, nicméně v ostatních parametrech uvedených v Tab. 12 nejlépe obstála koimobilizovaná kolona AnPEP a Nep-2 při průtoku 200 µl/min. Měla vyhovující sekvenční pokrytí, tvořila peptidy o vhodné délce a nejkratší z těchto tří kombinací a také generovala peptidové mapy s nejnižším počtem nepokrytých aminokyselin.

Tento závěr nelze považovat za univerzální. Proteiny jsou velmi komplexní skupinou, a je tak vhodné každý případ posuzovat individuálně. Nicméně tyto tři kombinace se ze všech testovaných kolon na proteinovém mixu jeví jako nejrelevantnější pro HDX-MS analýzu.

Štěpné preference se u těchto kolon mírně lišily (P 18, str. 113). Koimobilizovaná kolona pepsin-AnPEP v porovnání s ostatními štěpila více za F a P (P1 pozice), koimobilizovaný Nep2-AnPEP za K a R (P1 pozice) a sériové zapojení XIII-AnPEP za H (P1 pozice). Pokud by testovaný protein obsahoval hodně K, H, a R bylo by vhodné použít kombinaci s XIII nebo Nep-2, a pokud prolinu a alaninu, tak AnPEP.

Na komplementaritu vybraných kombinací proteasových kolon poukazuje peptidová mapa myoglobinu (P 22, str. 113). Některé oblasti mají podobný charakter peptidů. Nicméně vyskytují se zde v nezanedbatelné míře i oblasti, které jsou pomocí jedné kombinace kolon pokryty méně, a jinou naopak ve větší míře.

4.6 Štěpení protilátky trastuzumab (Herceptin) pomocí imobilizovaných proteas

Různá uspořádání imobilizovaných proteas (3.2.9.1, str. 54) byla otestována také na protilátce Herceptin, která má terapeutické využití, a sledování jejích strukturních změn je nezbytné pro stabilitní studie, schvalovací procesy atd.

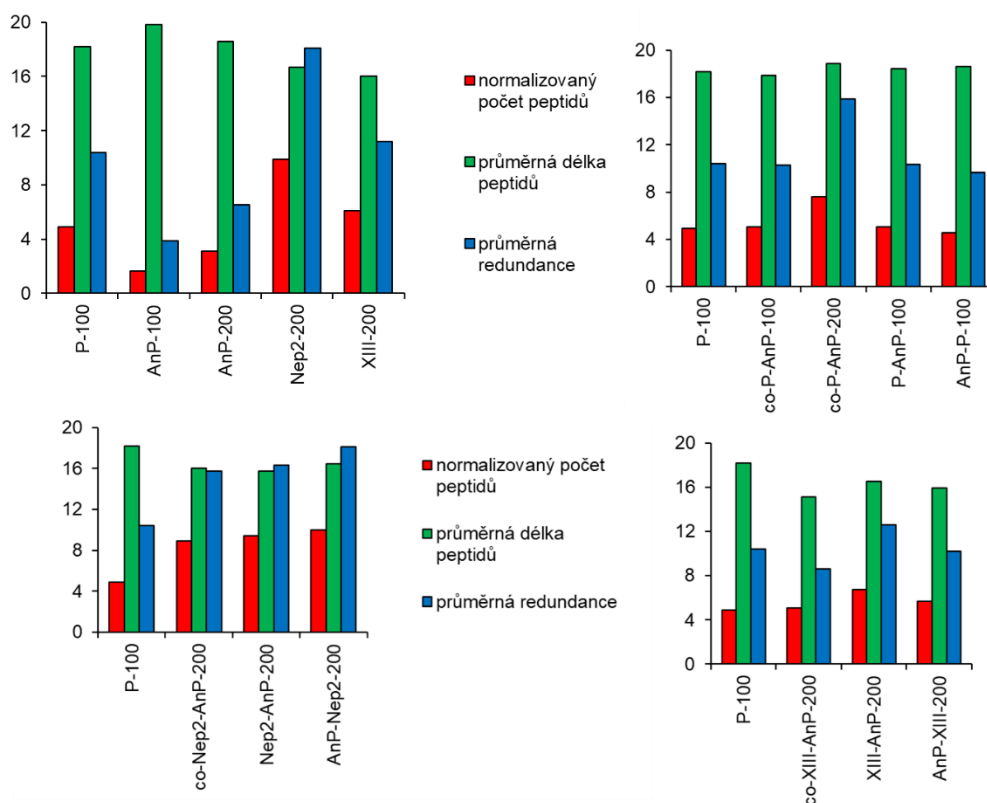
V Tab. 13 jsou popsány obecné charakteristiky lehkého a těžkého řetězce této protilátky, které byly vyhodnocovány zvlášť. Molekulová hmotnost celé molekuly této protilátky (150 kDa) je vyšší než u zástupců proteinového mixu (Tab. 11, str. 65). Těžký řetězec má vyšší zastoupení prolinu než lehký a naopak lehký má vyšší zastoupení alaninu. Obsah cysteinů je u obou řetězců téměř shodný. Zastoupení těchto aminokyselin je zmíněno, protože jsou zásahovými místy *AnPEP* proteasy.

Tab. 13 – Obecné charakteristiky štěpené protilátky trastuzumab (*Herceptin*). Zleva relativní molekulová hmotnost lehkého/těžkého řetězce *Herceptinu*, zastoupení prolinu, alaninu a cysteinu, které jsou hlavními zásahovými místy *AnPEP* proteasy.

Trastuzumab	M_r	Počet aminokyselin	Zastoupení prolinu [%]	Zastoupení alaninu [%]	Zastoupení cysteinu [%]
Lehký řetězec	23443,1	214	5,6	6,5	2,3
Těžký řetězec	49284,7	450	7,6	5,1	2,4

Jednotlivé proteasové kolony, jmenovitě imobilizovaný *AnPEP*, XIII, pepsin a Nep-2 poskytly 100 % sekvenční pokrytí lehkého řetězce protilátky *Herceptin*. Zatímco těžký řetězec měl pokrytí v rozmezí 86–98 %, dané přítomností N-glykosylace. V průměru nejvyšší sekvenční pokrytí (96–98 %) z kombinace proteas poskytly koimobilizované kolony XIII-*AnPEP* a pepsin-*AnPEP* (200 μ l/min) a také imobilizované proteasy v sériovém zapojení (*AnPEP*-Nep-2 a *AnPEP*-XIII).

Všechny proteasové kolony a jejich kombinace kromě *AnPEP* při 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ a spojení



Obr. 38 – Srovnání štěpných charakteristik (normalizovaný počet peptidů, průměrná délka peptidů a průměrná redundance) prokombinace imobilizovaných proteas. Uvedené parametry jsou průměrem pro lehký a těžký řetězec Herceptinu. Počet unikátních peptidů byl normalizován na molekulové hmotnosti těchto dvou řetězců (v kDa). Uvedená redundance je vztažena pouze na pokrytá aminokyselinová rezidua. P: pepsin, AnP: AnPEP, Nep2: nepenthesin-2, XIII: proteasa typu XIII, co: koimobilizované kolony, dvě proteasy s pomlčkou (např. P-AnP): tandemové zapojení kolon v příslušném pořadí. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C. P: pepsin, Čísla za kolonami odpovídají průtokové rychlosti v $\mu\text{l}/\text{min}$.

AnPEP a pepsinu generovaly peptidy s nižší průměrnou délkou než pepsin (P 19, str. 113). Nejnížší průměrnou délkou peptidů měly z dané skupiny (kolona s jednou proteasou, *AnPEP*-pepsin, *AnPEP*-Nep2, *AnPEP*-XIII) proteasa XIII (16,4), Nep2-*AnPEP* v tandemovém zapojení (15,8), koimobilizovaná kolona pepsin-*AnPEP* při 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ (17,9) a XIII-*AnPEP* (15,1). Uvedené hodnoty jsou průměrem přes oba řetězce Herceptinu.

Nejvyšší normalizovaný počet unikátních peptidů (10) byl identifikován u Nep-2 kolony a *AnPEP*-Nep-2 v tandemovém zapojení při 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Obr. 38). Optimální

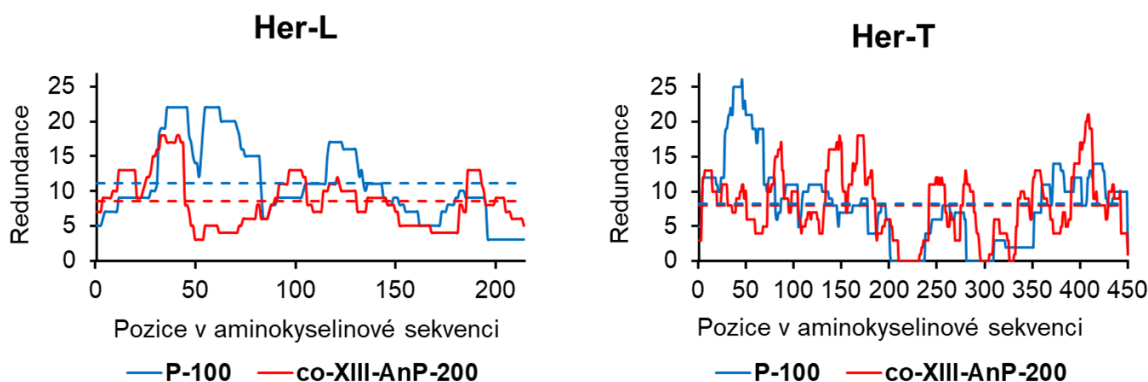
průměrnou redundanci (8,6) měl *AnPEP* koimobilizovaný s XIII. Po štěpení pomocí této kombinace proteas nebylo z obou řetězců Herceptinu pokryto 36 aminokyselin, což je přibližně 5 %.

Z testovaných kombinací imobilizovaných proteas vyplynula jako nejvhodnější varianta koimobilizovaný *AnPEP* s proteasou XIII. V Tab. 14 jsou srovnány jeho štěpné charakteristiky se standardně používaným pepsinem.

Tab. 14– Srovnání proteolyticky aktivních nosičů. P: pepsin, co-XIII-AnP: AnPEP koimobilizovaný s XIII. Čísla za pomlčkou udávají průtok proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Sekvenční pokrytí, průměrná délka peptidu, počet nepokrytých aminokyselin a normalizovaný počet peptidů jsou uvedeny zvlášť pro lehký a těžký řetězec štěpeného Herceptinu. Počet unikátních peptidů je vztažen na molekulové hmotnosti testovaných proteinů (v kDa).

Proteolytický nosič	Řetězec Herceptinu	Sekvenční pokrytí [%]	Průměrná délka peptidů	Normalizovaný počet peptidů	Průměrná redundance	Počet nepokrytých aminokyselin
P-100	lehký	100	19	5	11	0
	těžký	86	17	4	10	65
Co-XIII-AnP-200	lehký	100	16	5	8	0
	těžký	92	14	5	9	36

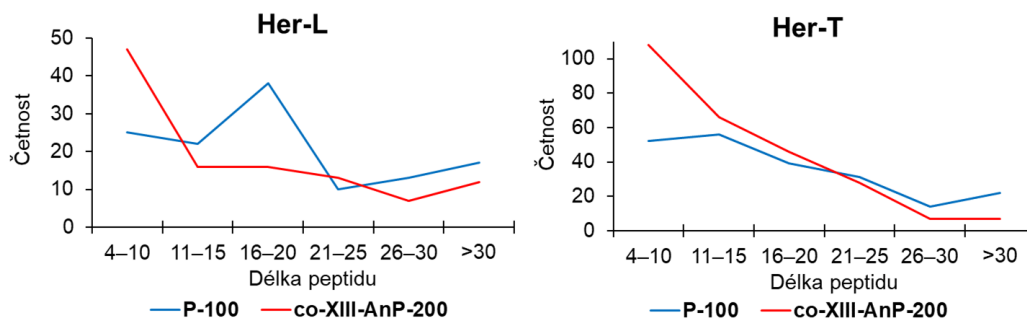
Distribuce redundance na lehkém a těžkém řetězci Herceptinu byla po štěpení pomocí koimobilizované kolony XIII-AnPEP a imobilizovaného pepsinu odlišná a v některých částech sekvence komplementární (Obr. 39). Komplementaritu těchto kombinací



Obr. 39 – Distribuce redundance protilátky Herceptin. Her-L: lehký řetězec, Her-T: těžký řetězec. Byl štěpen XIII koimobilizovanou s AnPEP (co-XIII-AnP) a pepsinem (P). Číslo za pomlčkou označují průtokové rychlosti v $\mu\text{l}/\text{min}$. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C. Barevně odlišené čárkované přímký odpovídají průměrné redundanci pro danou kolonu.

proteasových kolon ukazuje i peptidová mapa lehkého řetězce Herceptinu (P 23, str. 113). Distribuce délek peptidu byla také pro tyto kolony odlišná. Koimobilizovaná kolona tvořila více peptidů o délce 4–10 aminokyselin než pepsinová (Obr. 40).

Obě kolony měly širokou specifitu a vhodně se doplňovaly (P 20, str. 113). Pokud koimobilizovaná kolona štěpila za danou aminokyselinou méně, pepsinová za ní štěpila více a naopak.



Obr. 40 – Distribuce délek peptidů protilátky Herceptin. Her-L: lehký řetězec, Her-T: těžký řetězec. Byl štěpen XIII koimobilizovanou s AnPEP (co-XIII-AnP) a pepsinem (P). Číslo za pomlčkou označují průtokové rychlosti v $\mu\text{l}/\text{min}$. Proteolýza probíhala při pH 2,5 a 0 °C.

4.7 Opakovatelnost LC-MS/MS analýz

Pro vybrané analýzy na proteinovém mixu byla testována opakovatelnost identifikovaných peptidů. Měření byla provedena v triplikátech. Opakovatelnost byla vyhodnocována pro kombinace pepsin-*AnPEP* a *Nep-2-AnPEP* včetně samotného *AnPEP*, pepsinu a *Nep-2*.

V Tab. 15 (str. 89) je srovnána reprodukovatelnost u kombinací imobilizovaného *AnPEP* a pepsinu. Pepsin měl ve srovnání s ostatními kolonami v této tabulce nejvyšší reprodukovatelnost. Jako plně reprodukovatelné byly považovány peptidy, které se vyskytovaly ve 3/3 analýz a zastoupení částečně reprodukovatelných peptidů bylo spočítáno jako součet peptidů, které byly ve 3/3 a ve 2/3 analýz. Částečně reprodukovatelných peptidů bylo obecně vyšší procento než plně reprodukovatelných. Nejnižší procento reprodukovatelných peptidů bylo identifikováno u *AnPEP* při 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ a u tandemového zapojení *AnPEP*-pepsin. Při exportu dat s intenzitní hranicí 50 000 bylo identifikováno ještě méně reprodukovatelných peptidů. Toto zjištění vypovídá o tom, že nereprodukovatelné peptidy mohou být i ty s vysokou intenzitou a nejedná se pouze o málo intenzivní a méně významné signály.

Tab. 15 – Opakovatelnost peptidů pro kombinace kolon pepsin-AnPEP. P: pepsin, AnP: AnPEP, co-P-AnP: koimobilizovaný AnPEP s pepsinem, P-AnP, AnP-P: tandemové zapojení pepsinu a AnPEP v příslušném pořadí. Čísla za kolonami označují průtokovou rychlost v $\mu\text{l}/\text{min}$. Za reprodukovatelné peptidy byly považovány ty, které se vyskytovaly ve 3/3 analýz a jako částečně reprodukovatelné ty, které se vyskytovaly ve 2/3 analýz a byly k nim přičteny ještě ty u 3/3 analýz. Data byla prohledána proti databázi cRAP, FDR bylo 1 % a minimální skóre bylo nastaveno na 20.

Proteasové kolony	P-100	AnP-100	AnP-200	Co-P-AnP-100	P-AnP-100	AnP-P-100
Export dat bez intenzitního omezení						
Reprodukovatelné peptidy [%]	60	29	49	51	50	24
Částečně reprodukovatelné peptidy [%]	82	44	74	76	72	47
Export dat s intenzitním omezením 50 000						
Reprodukovatelné peptidy [%]	56	24	40	43	43	15
Částečně reprodukovatelné peptidy [%]	79	37	68	69	67	29

V Tab. 16 (str. 90) je srovnána opakovatelnost identifikovaných peptidů u kombinací AnPEP-Nep-2 a pepsinu, který se používá standardně v HDX-MS. Je zde opět trend vyššího množství částečně reprodukovatelných peptidů než reprodukovatelných. Pepsin měl oproti kombinaci Nep2-AnPEP lepší reprodukovatelnost. Stejný trend je vidět i při exportu dat s intenzitní hranicí 50 000. Nastavení intenzitní hranice opět zhoršilo reprodukovatelnost peptidů. Z Tab. 16 můžeme opět vypořadovat trend snížené reprodukovatelnosti, pokud se

zapojí tandemově AnPEP-Nep-2, to znamená, že do AnPEPové kolony putuje substrát jako první. Při výměně pořadí kolon se reprodukovatelnost zvýší. Nicméně rozdíl mezi těmito kombinacemi není tak výrazný jako u tandemového zapojení AnPEP-pepsin.

Tab. 16 – Opakovatelnost peptidů pro kombinace kolon Nep-2-AnPEP. P: pepsin, AnP: AnPEP, co-Nep2-AnP: koimobilizovaný AnPEP s Nep-2, Nep2-AnP, AnP-Nep2: tandemové zapojení Nep-2 a AnPEP v příslušném pořadí. Čísla za kolonami označují průtokovou rychlost v $\mu\text{l}/\text{min}$. Za reprodukovatelné peptidy byly považovány ty, které se vyskytovaly ve 3/3 analýz a jako částečně reprodukovatelné ty, které se vyskytovaly ve 2/3 analýz a byly k nim přičteny ještě ty u 3/3 analýz. Data byla prohledána proti databázi cRAP, FDR bylo 1 % a minimální skóre bylo nastaveno na 20.

Proteasové kolony	P-100	AnP-200	Nep2-200	Co-Nep2-AnP-200	Nep2-AnP-200	AnP-Nep2-200
<i>Export dat bez intenzitního omezení</i>						
Reprodukovatelné						
peptidy [%]	60	49	58	54	56	53
Částečně						
reprodukovatelné	82	74	79	77	77	76
peptidy [%]						
<i>Export dat s intenzitním omezením 50 000</i>						
Reprodukovatelné						
peptidy [%]	56	40	46	41	39	33
Částečně						
reprodukovatelné	79	68	72	67	70	62
peptidy [%]						

Vzhledem k tomu, že reprodukovatelnost peptidů generovaných AnPEP kolonou byla nejnižší, byla u této analýzy testována při různých kritériích prohledání proteinových databází (Tab. 17, str. 91). Reprodukovatelnost se zvyšovala při snižování striktnosti

prohledání (v tabulce zprava doleva). Opět vidíme, že zastoupení reprodukovatelných peptidů bylo nižší než částečně reprodukovatelných. Ani prohledání prakticky bez omezení zásadně nezvýšilo reprodukovatelnost identifikovaných peptidů.

Tab. 17 – Opakovatelnost identifikovaných peptidů u AnPEP kolony při 100 µl/min. Za reprodukovatelné peptidy byly považovány ty, které se vyskytovaly ve 3/3 analýz a jako částečně reprodukovatelné ty, které se vyskytovaly ve 2/3 analýz a byly k nim přičteny ještě ty u 3/3 analýz. Zleva doprava se zvyšuje striktnost při prohledání proteinovou databází. Databáze byly použity dvě: 1) proteinový mix (BSA, bCA2, 14-3-3 a Mb), 2) cRAP (proteinový mix + časté proteinové kontaminanty). Limitní skóre bylo buď 1, 12, 20 nebo 35. A míra falešně pozitivních nálezů 1 % nebo 0,1 %. Dtb: databáze, Pmix: proteinový mix, sc.: skóre, FDR: míra falešně pozitivních nálezů.

Podmínka reprodukovatelnosti	Kritéria prohledání			
	dtb Pmix Score > 1 FDR 1 %	dtb Pmix Score > 12 FDR 1 %	dtb cRAP Score > 20 FDR 1 %	dtb cRAP Score > 35 FDR 0,1 %
Zastoupení reprodukovatelných peptidů [%]				
3/3	33	33	29	22
2/3 a 3/3	45	46	44	36

Pro srovnání bylo totéž provedeno pro pepsinovou kolonu. Tab. 18, str. 92 ukazuje, že má reprodukovatelnost peptidů opět souvislost se striktností kritérií prohledání databází.

Tab. 18 – Opakovatelnost identifikovaných peptidů u pepsinové kolony při 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Za reprodukovatelné peptidy byly považovány ty, které se vyskytovaly ve 3/3 analýz a jako částečně reprodukovatelné ty, které se vyskytovaly ve 2/3 analýz a byly k nim přičteny ještě ty u 3/3 analýz. Zleva doprava se zvyšuje striktnost při prohledání proteinovou databází. Databáze byly použity dvě: 1) proteinový mix (BSA, bCA2, 14-3-3 a Mb), 2) cRAP (proteinový mix + časté proteinové kontaminanty). Limitní skóre bylo buď 1, 12, 20 nebo 35. A míra falešně pozitivních nálezů 1 % nebo 0,1 %. Dtb: databáze, Pmix: proteinový mix, sc.: skóre, FDR: míra falešně pozitivních nálezů.

Podmínka reprodukovatelnosti	Kritéria prohledání			
	dtb Pmix	dtb Pmix	dtb cRAP	dtb cRAP
	Score > 1	Score > 12	Score > 20	Score > 35
	FDR 1 %	FDR 1 %	FDR 1 %	FDR 0,1 %
Zastoupení reprodukovatelných peptidů [%]				
3/3	64	63	60	48
2/3 a 3/3	83	84	82	72

Vliv striktnosti prohledání byla otestována ještě na analýze štěpení pomocí AnPEP kolony exportované s intenzitním omezením 50 000 (Tab. 19, str. 93). Z hlediska vlivu striktnosti prohledání na reprodukovatelnost je zde stejný trend jako v Tab. 17 na str. 91. Intenzitní omezení při exportu ještě dále snížilo reprodukovatelnost.

Tab. 19 – Opakovatelnost identifikovaných peptidů u AnPEP kolony při 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Export byl proveden s intenzitním omezením na 50 000. Za reprodukovatelné peptidy byly považovány ty, které se vyskytovaly ve 3/3 analýz a jako částečně reprodukovatelné ty, které se vyskytovaly ve 2/3 analýz a byly k nim přičteny ještě ty u 3/3 analýz. Zleva doprava se zvyšuje striktnost při prohledání proteinovou databází. Databáze byly použity dvě: 1) proteinový mix (BSA, bCA2, 14-3-3 a Mb), 2) cRAP (proteinový mix + časté proteinové kontaminanty). Limitní skóre bylo buď 1, 12, 20 nebo 35. A míra falešně pozitivních nálezů 1 % nebo 0,1 %. Dtb: databáze, Pmix: proteinový mix, sc.: skóre, FDR: míra falešně pozitivních nálezů.

Podmínka	Kritéria prohledání			
	dtb Ptmix	dtb Pmix	dtb cRAP	dtb cRAP
reprodukovatelnosti	Score > 1	Score > 12	Score > 20	Score > 35
	FDR 1 %	FDR 1 %	FDR 1 %	FDR 0,1 %
	Zastoupení reprodukovatelných peptidů [%]			
3/3	26	28	24	21
2/3 a 3/3	40	41	37	31

Výsledky pro pepsinovou kolonu uvedené v Tab. 20 (str. 94) kopírovaly trendy pozorované ve výše uvedených tabulkách (Tab. 17–Tab. 19, str. 91–93).

Tab. 20 – Opakovatelnost identifikovaných peptidů u pepsinové kolony při 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Export byl proveden s intenzitním omezením na 50 000. Za reprodukovatelné peptidy byly považovány ty, které se vyskytovaly ve 3/3 analýz a jako částečně reprodukovatelné ty, které se vyskytovaly ve 2/3 analýz a byly k nim přičteny ještě ty u 3/3 analýz. Zleva doprava se zvyšuje striktnost při prohledání proteinovou databází. Databáze byly použity dvě: 1) proteinový mix (BSA, bCA2, 14-3-3 a Mb), 2) cRAP (proteinový mix + časté proteinové kontaminanty). Limitní skóre bylo buď 1, 12, 20 nebo 35. A míra falešně pozitivních nálezů 1 % nebo 0,1 %. Dtb: databáze, Pmix: proteinový mix, sc.: skóre, FDR: míra falešně pozitivních nálezů.

Podmínka reprodukovatelnosti	Kritéria prohledání			
	dtb Pmix	dtb Pmix	dtb cRAP	dtb cRAP
	Score > 1	Score > 12	Score > 20	Score > 35
	FDR 1 %	FDR 1 %	FDR 1 %	FDR 0,1 %
Zastoupení reprodukovatelných peptidů [%]				
3/3	59	58	56	49
2/3 a 3/3	82	82	79	73

Vzhledem k tomu, že reprodukovatelnost identifikovaných peptidů po štěpení pomocí AnPEP kolony nezvýšila změna parametrů při prohledání ani exportu dat, bylo nutné se podívat na původní MS data. Ta byla zkoumána na úrovni LC chromatogramů, MS a MS/MS spekter. Zkoumala jsem několik peptidů, které vznikly štěpením za P a A a vyskytovaly se pouze v jedné analýze z triplicátu. Peptid [42–82] z bCA2 byl při nastavení limitu iontového skóre na 20 identifikován pouze jednou, ale po snížení limitu na 1 už byl nalezen ve všech třech analýzách. V analýze, ve které byl identifikován před snížením limitu, měl totiž skóre 20,9, což znamená těsně nad hranicí. Dále byl zkoumán peptid [121–125] z myoglobinu, který byl po snížení limitu skóre nalezen pouze ve 2/3 analýz. Tento peptid sice nebyl identifikován, ale v raw datech se vyskytoval. V analýze, ve které byl nalezen před snižováním limitu, měl skóre pouze 20,7, což poukazuje nekvalitní MS/MS spektrum. U minima peptidů došlo k situaci, že nebyly nalezeny ani v původních MS datech.

Z této kapitoly plyne, že pokud chceme mít vysoké procento peptidů, které jsou reprodukovatelné, je vhodné použít AnPEP spíše v kombinaci s jinou proteasou než samotný.

A zároveň pokud používáme $AnPEP$ v tandemovém zapojení, je vhodné ho zařadit až jako druhý, protože se tím zvýší reprodukovatelnost.

5 Diskuze

Proteiny ovlivňují celou řadu procesů důležitých pro správnou funkci buněk. Z tohoto důvodu je klíčové zabývat se vývojem metod, které umožňují studium jejich struktury a dynamiky. Jednou z nich je vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií. Proteolýza proteinového substrátu určuje v této metodě prostorové rozlišení. U řady proteinů může být toto rozlišení omezené, pokud je používán pouze tradičně využívaný pepsin. Podmínky nutné pro úspěšné provedení HDX-MS experimentu (pH 2,5 a 0 °C) však významně zužují výběr proteas.

Tato práce se zabývá charakterizací imobilizované prolyl endoproteasy z *Aspergillus niger* (*AnPEP*) v kombinaci s proteasou typu XIII, pepsinem a nepenthesinem-2 (*Nep-2*) za účelem jejich aplikace v HDX-MS protokolech. Dle dostupných publikací má *AnPEP* v porovnání s proteasami běžně používanými v HDX-MS poměrně úzkou specifitu štěpení při striktním dodržení optimalizovaných podmínek štěpení - pH 1,5, času digesce 2 hodiny a poměru proteasa:substrát 1:50. Tato hodnota pH a poměr nejsou pro HDX-MS aplikovatelné, ale i přes zvýšení pH na 2,5 a poměru na 1:1, není specifita štěpení této proteasy příliš široká a stále generuje především štěpy na C-konci prolinu, alaninu a cysteinu. Proto je vhodná spíše jako doplněk klasických proteas.

Aktuálně je komerčně dostupnou variantou preparát ProAlanase, který se prodává za cenu tisíce korun za jeden mikrogram. Proteasu *AnPEP* je však možné získat komerčně za nízkou cenu v podobě preparátů Brewers Clarex a Tolerance G. Za účelem výběru vhodného zdroje této proteasy byla provedena hmotnostně spektrometrická analýza a SDS-PAGE.

Na základě SDS-PAGE bylo zjištěno, že kvantitativní většinu obou preparátů zaujímá *AnPEP*. Oba zdroje *AnPEP* sice obsahují ještě jiné proteiny, ale ty jsou z hlediska množství minoritní. Pro imobilizaci a následné testování na proteinových substrátech byl zvolen Clarex, protože obsahoval méně kontaminujících proteinů. Další výhodou tohoto preparátu je, že je dostupný v podobě roztoku, na rozdíl od Tolerance G, která se prodává jako tobolka.

Pro srovnání proteinového složení Tolerance G a Clarex byla provedena LC-MS/MS analýza. V obou preparátech byly identifikovány totožné proteiny (glukosidasy, galaktosidasy, amylasy a karboxypeptidasa z rodiny S10). Nicméně většina

identifikovaných peptidů pocházela z *AnPEP* (u Clarex 95 %, u Tolerasy G 98 %). *AnPEP* proteasa byla ještě deglykosylována, abychom zjistili, jestli odstranění N-glykanů nevnese nové identifikace proteinů. Tato úvaha vznikla proto, že N-glykany jsou velmi heterogenní struktury, zvýší komplexitu dat a mohou tak ztížit i následnou identifikaci peptidů. Avšak i po deglykosylaci obou preparátů nebyly identifikovány žádné další proteiny. V rámci bakalářské práce byla v preparátu Tolerase G identifikována ještě proteasa typu XIII (aspergillopepsin).

Dále byla provedena MALDI-TOF-MS analýza Clarex a Tolerase G pro glykosylované i deglykosylované formy. Deglykosylovaná forma měla v MS spektru užší pík a nižší molekulovou hmotnost (58 kDa). N-glykosylovaná varianta měla naopak velmi široký pík způsobený tím, že N-glykany *AnPEP* jsou velmi heterogenní a MALDI-TOF, který patří mezi hmotnostní spektrometry s nižším rozlišením, nebyl schopen zobrazit jednotlivé proteoformy. Na základě MALDI-TOF byla určena přibližná molekulová hmotnost N-glykosylovaného *AnPEP* na 69 kDa. Na základě tohoto hmotnostního spektra bylo dále potvrzeno, že většinu obou komerčních preparátů zaujímá skutečně *AnPEP*, protože kromě výše uvedených píků nebyly pozorovány žádné další. Nicméně jako vhodnější metoda pro základní charakterizaci preparátů se jevila SDS-PAGE. Při analýze pomocí MALDI-TOF hraje důležitou roli i ionizovatelnost proteinu, zatímco při SDS-PAGE mají všechny analyzované proteiny uniformní záporný náboj, a tak jedinou proměnou je jejich molekulová hmotnost.

Jak bylo zmíněno výše, díky své užší specifitě, je v HDX-MS experimentu *AnPEP* vhodnější jako doplněk proteas se širší specifitou. Zde byly vybrány pepsin, nepenthesin-2 a aspergillopepsin (XIII). Všechny studované proteasy (*AnPEP*, pepsin, Nep-2 a XIII) a jejich kombinace byly imobilizovány na aldehydový nosič, kterým byly následně naplněny kolony. Imobilizace umožňuje automatizaci a zvýšení rychlosti analýz. Další nespornou výhodou je možnost snadné změny podmínek proteolýzy (teplota, průtok, tlak) a také použití vyšších koncentrací denaturantů, protože jejich nepříznivý efekt je u imobilizované proteasy významně nižší než u proteasy v roztoku.

Mezi studované charakteristiky patřilo sekvenční pokrytí, které je vhodné mít co nejvyšší, abychom získali informace o celé struktuře proteinu. Neméně důležitým

parametrem je distribuce redundance (překrývající se peptidy) a délky peptidů jednotlivých štěpených modelových proteinů, protože určují prostorové rozlišení analýzy míry deuterace. Zajímavým parametrem jsou i štěpné preference, které v závislosti na aminokyselinovém složení substrátu mohou ovlivnit délku vzniklých peptidů. Může ale nastat situace, kdy štěpné preference, typické pro proteasu, neodráží délku peptidů z důvodu vynechání zásahového místa proteasou, např. vlivem příliš vysoké průtokové rychlosti. Vzhledem k tomu, že se v této práci štěpí pomocí nespecifických proteas, je potřeba mít na paměti, že není možné predikovat charakter vzniklých peptidů na základě aminokyselinové sekvence substrátu. Je ale možné mezi sebou srovnávat dvojice podmínky např. průtok 100 a 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ a sledovat, jestli na daném místě došlo k opomenutí štěpení.

V rámci testování imobilizovaných proteas a jejich kombinací byly pozorovány obecné trendy. Ve většině případů byla distribuce redundance závislá na proteinovém substrátu, nikoliv na proteasovém uspořádání. Monitorování distribuce redundance je užitečnější než pouze výpočet průměrné redundance, protože tato hodnota nevypovídá o skutečném průběhu štěpení. Jedné části proteinu může být redundance příliš nízká, v jiné příliš vysoká a výsledkem to pak může být falešně vyhovující hodnota průměrné redundance. V rámci grafů distribuce redundance je užitečné sledovat oblasti, kde nejsou aminokyseliny pokryty žádným peptidem a odvíjet od toho pak výběr alternativní proteasy/proteas. Dále byl pozorován trend zvýšení délky peptidů při zvýšení průtoku proteasovou kolonou, který je způsobem tím, že protein stráví na koloně kratší čas a štěpení je tak méně kompletní. Při zvýšení průtoku vznikalo většině případů více peptidů a tím je pak byla vyšší i redundance. Nicméně zvýšení redundance při zvýšení průtoku neplatí absolutně. Dalším zajímavým pozorováním bylo, že distribuce délky peptidů naopak závisela na použité protease či kombinaci a vždy bylo u dané proteasy identifikováno nejvíce peptidů v rozmezí délek 4–10 (nejkratší).

Nejprve byly otestovány kolony s jednou proteasou na souboru modelových proteinů (BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin). Testované proteiny se lišily molekulovou hmotností, aminokyselinovou sekvencí a zastoupením pro *AnPEP* důležitých aminokyselin – prolinu, alaninu a cysteinu. Testované kolony byly vždy porovnávány se standardně používaným pepsinem.

Sekvenční pokrytí kolon s jednou proteasou se pohybovalo v rámci testování

proteinového mixu v rozmezí 88–100 %, což je pro HDX-MS velmi vyhovující. Nicméně výjimku tvořila *AnPEP*ová kolona, která byla schopna pokrýt protein 14-3-3 pouze z přibližně 60 %. Po analýze dat bylo zjištěno, že je N-koncová část tohoto proteinu pokrytá dostatečným počtem překrývajících se peptidů, ale že zbytek sekvence je pokryt buď pouze jedním nebo žádným peptidem. Protein 14-3-3 je poměrně sbalený, v sekvenci je hodně K a E, za kterými *AnPEP* příliš často neštěpí, a naopak málo prolinu, který je hlavním zásahovým místem *AnPEP*. Sekvenční pokrytí by mohla zvýšit denaturace substrátového proteinu 14-3-3. *AnPEP* měl z testovaných proteas také nejméně vyhovující redundanci, v daných oblastech příliš vysokou nebo příliš nízkou. Příliš vysoká redundance zvyšuje komplexitu dat a komplikuje analýzu, ale nízká zase neposkytuje dostatečné prostorové rozlišení. Dále tvořil v porovnání s ostatními testovanými proteasami, kromě pepsinu, delší peptidy. Z výše uvedených důvodů je vhodné použít *AnPEP* spíše v kombinaci s jinými proteasami než samotný. Výhodu, kterou může vnést při štěpení, je jeho vysoká preference tvořit peptidy s prolinem a alaninem na C-konci, čímž se odlišuje od ostatních testovaných proteas. Dále například proteasa XIII generuje více peptidů s H na C-konci a spolu s Nep-2 peptidy s K a R na C-konci. Z provedených experimentů můžeme dojít k závěru, že jsou tyto proteasy vůči sobě komplementární.

Použití více proteas zvyšovalo prostorové rozlišení. Jedním z důvodů může být širší specifita. Nejprve byl na proteinovém mixu otestován pepsin v kombinaci s *AnPEP* – koimobilizovaný pepsin a *AnPEP* a *AnPEP*-pepsin a pepsin-*AnPEP* v tandemovém zapojení. Sekvenční pokrytí se pohybovalo u všech kombinací v přijatém rozmezí 82–100 %. Jako nejvhodnější varianta z kombinace *AnPEP*-pepsin byla vybrána koimobilizovaná kolona (při průtoku 200 $\mu\text{l}/\text{min}$), protože poskytla nejvyšší sekvenční pokrytí, měla vyhovující redundanci, která způsobila existenci minima aminokyselin s nulovým pokrytím a nakonec měla nejvyšší zastoupení peptidů o délce 4–10 aminokyselin z této kombinace kolon. Tato koimobilizovaná kolona také měla vyšší preference pro prolin a methionin než ostatní v rámci této kombinace. Naopak nejhorší parametry vykazovalo tandemové zapojení *AnPEP*-pepsin.

Stejným způsobem byl otestován *AnPEP* v kombinaci s Nep-2. Rozsah sekvenčního pokrytí proteinového mixu byl u této kombinace o něco vyšší než u *AnPEP*-pepsin,

85-100 %. Na základě obdobného srovnání parametrů jako výše byla vybrána kombinace koimobilizovaného *AnPEP* s *Nep-2*. Jako nejméně vhodná se opět ukázalo tandemové zapojení, kde byl *AnPEP* jako první v pořadí.

Poslední kombinací testovanou na proteinovém mixu byla *AnPEP-XIII*. V tomto případě by ale byla koimobilizovaná kolona nejméně vhodnou volbou. Zároveň bylo zjištěno, že po tomto štěpení pocházelo více než 40 % identifikovaných peptidů z *AnPEP* jako takového, což naznačuje jeho částečnou autolýzu při použití obou proteas v jedné koloně. Takovýto jev je nežádoucí, protože zvyšuje nespecifické pozadí experimentu a komplexitu vzorku. Jako nejvíce vhodná kombinace zde bylo zvoleno tandemové zapojení *XIII-AnPEP*.

Užitečným zjištěním je, že ani v jedné z výše uvedených kombinací *AnPEP* a pepsinu/*Nep-2/XIII*, nebylo ani jednou vybráno jako optimální řešení tandemové zapojení, kde byla *AnPEP*ová kolona zařazena jako první. Při štěpení proteinového mixu měly kombinace *AnPEP*u s jednou z výše uvedených proteas obecně vhodnější charakteristiky než samotný imobilizovaný pepsin.

Shrnutí základních charakteristik tří vybraných proteasových kombinací (*co-AnPEP-Nep-2*, *XIII-AnPEP* a *co-AnPEP-pepsin*) je uvedeno v Tab. 12, str. 83. Průměrné sekvenční pokrytí bylo pro všechny uvedené kombinace srovnatelné. Nejvyšší normalizovaný počet identifikovaných peptidů byl nalezen u tandemového zapojení imobilizované *XIII a AnPEP*u a nejnižší počet nepokrytých aminokyselin byl nalezen u koimobilizované kolony *AnPEP-Nep-2*. Tato kolona také generovala nejvíce peptidů o délce 4–10 aminokyselin. Přestože měl tento nosič obecně nejvhodnější charakteristiky pro HDX-MS, je potřeba mít na paměti, že finální výběr je silně protein specifický. Pokud budeme studovat protein, který má vyšší počet F a P, bude optimální zvolit koimobilizovanou kolonu *pepsin-AnPEP*, protože tvoří více peptidů s F a P na C-konci než ostatní kolony. Pokud bude cílový protein obsahovat vysoké procento K a R, bude vhodné zvolit koimobilizovaný *Nep2-AnPEP* a pokud H, tak sériové zapojení *XIII-AnPEP*.

Dále byly vytvořené kolony otestovány na protilátce Herceptin, která má terapeutické využití při karcinomu prsu, a je proto důležité studovat její strukturu a dynamiku. Tato protilátka má vyšší molekulovou hmotnost (150 kDa) než substráty v proteinovém mixu a také na rozdíl od nich obsahuje N-glykosylaci. Spolu s BSA sdílí přítomnost disulfidových

můstků. Vzhledem k tomu, že je tato protilátka kompaktnější, bylo potřeba ji před štěpením vystavit denaturujícím podmínkám. Lehký a těžký řetězec této protilátky byly v rámci vyhodnocování dat posuzovány zvlášť.

Lehký řetězec Herceptinu měl po štěpení všemi testovanými proteasovými kolonami a jejich kombinacemi 100 % sekvenční pokrytí. Těžký řetězec měl pokrytí v rozmezí 86-98 %, což může být způsobeno přítomností N-glykosylace. Řešením by mohla být deglykosylace Herceptinu, což v HDX-MS uspořádání není zatím rutinní záležitost a nejsou komerčně dostupné kyselé endoglykosidasy.

Jako optimální řešení pro Herceptin se z testovaných kombinací jevil *AnPEP* koimobilizovaný s XIII, který byl naopak při štěpení proteinového nejméně vhodným řešením. Důvodem může být fakt, že na rozdíl od proteinového mixu byla protilátka vystavena denaturujícím podmínkám a i samotné štěpení probíhalo za silně denaturujících podmínek. Další možným důvodem může být vhodnější aminokyselinové složení a jejich pořadí pro proteasu XIII a *AnPEP*. Obecné charakteristiky této koimobilizované kolony byly srovnány se standardně používaným pepsinem (Tab. 14, str. 86). Na základě získaných výsledků by sice tato kolona vhodnější než pepsin, ale pro lepší prostorové rozlišení by bylo vhodné Herceptin ještě separátně štěpit pepsinem a data následně zkombinovat, protože pepsin ještě dle grafů štěpných preferencí (P 20, str. 113) vnese další zásahová místa. Alternativou by mohla být tandemová zapojení pepsin-XIII nebo pepsin-Nep-2, jejichž použití již bylo publikováno.

Tyto charakterizace kolon není možné považovat za univerzální pro kterýkoliv protein. Cílem bylo spíše poukázat na to, které kombinace má vůbec smysl při optimalizaci proteolytického kroku zkoušet. Úspěšnost proteolýzy se bude velmi odvíjet od aminokyselinového složení cílového proteinu. Pokud bude protein obsahovat hodně K, H nebo R, je vhodné ho štěpit kombinací, která bude obsahovat Nep-2 nebo XIII. Pokud bude obsahovat hodně P, A a C je zase optimální použít kombinaci obsahující *AnPEP*.

Důležitým aspektem zvyšujícím věrohodnost analýz je jejich opakovatelnost. Ta byla testována na triplikátech vybraných kolon, kterými byly kombinace Nep-2-*AnPEP* a pepsin-*AnPEP*. Nejvyšší reprodukovatelnost měla obecně při pepsinová kolona. Při prohledání, kdy byl zvolen limit MASCOT skóre na 20 (standardní nastavení),

se více než 80 % peptidů generovaných touto kolonou vyskytovalo ve všech třech replikátních analýzách. Naopak nejhorší reprodukovatelnost 29 % měla *AnPEP*ová kolona při 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Důvodem horší reprodukovatelnosti *AnPEP* může být skutečnost, že v porovnání s pepsinem generuje podstatně méně peptidů, a tak nepřítomnost i menšího počtu peptidů v jedné, nebo dvou analýzách se projeví o mnoho více.

Reprodukovatelnost peptidů *AnPEP*ové a pepsinové kolony byla zkoumána ještě v závislosti na změně parametrů exportu dat a parametrů identifikace na základě MS/MS spekter. Byl zde pozorován obecný trend, že když zvýšíme striktnost prohledání, sníží se reprodukovatelnost, protože máme menší sadu peptidů, se kterou vyhodnocujeme. Tento trend fungoval i opačně. Pokud byla data prohledávána méně striktně (bez limitu iontového skóre), reprodukovatelnost peptidů se mírně zvýšila (z 29 % na 33 %).

Reprodukovatelnost se také snížila ve chvíli, kdy byly exportovány pouze peptidy mající signál s vyšší intenzitou než 50 000. Toto nastavení mělo otestovat hypotézu, zda méně reprodukovatelné nejsou peptidy s nižší intenzitou a tedy vznikající s menší četností (méně preferované zásahové místo). Tato hypotéza však byla vyvrácena.

Vzhledem k tomu, že opakovatelnost peptidů pocházejících z *AnPEP*ové kolony nezlepšilo ani méně striktní skórování, bylo v datech (MS a MS/MS spektrech) ověřováno, jestli se tam daný peptid, který byl identifikován pouze v jedné z analýz, vyskytuje. Tento způsob ověření byl proveden pouze na malém vzorku peptidů. Pro rozsáhlejší analýzu dat by bylo nutné mít k dispozici sofistikovaný software, protože by se tímto způsobem muselo zkontrolovat tisíce peptidů a jim odpovídajících MS signálů. Pro orientační ověření tedy bylo vybráno několik peptidů z různých proteinů proteinového mixu majících na C-konci P nebo A. U některých z vybraných peptidů, které byly identifikovány pouze v jedné ze tří analýz, se jejich signál v MS spektru vyskytoval, ale měl nižší intenzitu, to znamená, že nebyl vybrán k fragmentaci. Zároveň nastaly situace, kdy bylo MS/MS spektrum nekvalitní, takže získalo nízké skóre a nebylo ve výsledku zobrazeno.

Z provedených experimentů vyplývá, že je pro dosažení optimální reprodukovatelnosti vhodné použít *AnPEP* v kombinaci s jinou proteasou než samotný. A pokud ho zapojíme tandemově s další proteasovou kolonou, je vhodné zařadit *AnPEP* až jako druhý.

Reprodukovatelnost peptidů generovaných pomocí *AnPEP* by se mohla zvýšit, pokud

bychom provedli mnohem vyšší počet replikací. A také by mohlo být přínosné otestovat, jak bude ovlivněna reprodukovatelnost proteasových kolon, pokud budeme štěpit komplexní směsi.

6 Závěr

Z provedené SDS-PAGE plyne, že je Clarex vhodnějším komerčním zdrojem *AnPEP* z důvodu jeho vyšší čistoty.

Dále byl úspěšně imobilizován *AnPEP* v kombinaci s proteasou XIII, pepsinem nebo Nep-2. Na základě provedených LC-MS/MS analýz lze konstatovat, že samotný imobilizovaný *AnPEP* nemá optimální štěpné charakteristiky pro aplikaci v HDX-MS. Naopak koimobilizovaná kolona *AnPEP*u s Nep-2 při průtoku 200 μ l/min byla vhodným řešením při testování modelových proteinů (BSA, bCA2, 14-3-3 a Mb). Nejvíce vyhovující charakteristiky pro štěpení protilátky Herceptin měla koimobilizovaná kolona XIII a *AnPEP* při 200 μ l/min. Z LC-MS/MS analýz vyplývá, že výběr vhodného proteolytického nosiče je silně závislý na cílovém proteinu.

Při testování opakovatelnosti generovaných peptidů bylo zjištěno, že ji má pepsinová kolona velmi vysokou a naopak *AnPEP*ová nízkou. Pokud chceme dosáhnout dostatečné opakovatelnosti je vhodné zvolit spíše kombinace imobilizovaného *AnPEP* s Nep-2 nebo pepsinem (kromě tandemového zapojení *AnPEP*-Nep-2/pepsin).

7 Literatura

- (1) Kučerová Z. Úloha Proteolýzy v Lidském Těle. *Klinická biochemie a metabolismus* **2017**, *4*, 182–185.
- (2) McDonald, J. K. An Overview of Protease Specificity and Catalytic Mechanisms: Aspects Related to Nomenclature and Classification. *The Histochemical Journal* **1985**, *17* (7), 773–785.
- (3) Schechter, I.; Berger, A. On the Size of the Active Site in Proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1967**, *27* (2), 157–162.
- (4) Tavano, O. L.; Berenguer-Murcia, A.; Secundo, F.; Fernandez-Lafuente, R. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology: Proteases in Food Technology.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2018**, *17* (2), 412–436.
- (5) Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **1998**, *62* (3), 597–635.
- (6) Craik, C. S.; Page, M. J.; Madison, E. L. Proteases as Therapeutics. *The Biochemical journal* **2011**, *435* (1), 1–16.
- (7) Rey, M.; Yang, M.; Lee, L.; Zhang, Y.; Sheff, J. G.; Sensen, C. W.; Mrazek, H.; Halada, P.; Man, P.; McCarville, J. L.; Verdu, E. F.; Schriemer, D. C. Addressing Proteolytic Efficiency in Enzymatic Degradation Therapy for Celiac Disease. *Scientific Reports* **2016**, *6* (1), 30980.
- (8) Yates, J. R.; Ruse, C. I.; Nakorchevsky, A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2009**, *11* (1), 49–79.
- (9) *Top-Down versus Bottom-Up Approaches in Proteomics*. <http://www.chromatographyonline.com/top-down-versus-bottom-approaches-proteomics-0?id=&pageID=1&sk=&date=>, [cit. 2022-07-07].
- (10) Bungler, M. K.; Cargile, B. J.; Ngunjiri, A.; Bundy, J. L.; Stephenson, J. L. Automated Proteomics of *E. Coli* via Top-Down Electron-Transfer Dissociation Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (5), 1459–1467.
- (11) Gregorich, Z. R.; Chang, Y.-H.; Ge, Y. Proteomics in Heart Failure: Top-down or Bottom-Up? *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **2014**, *466* (6), 1199–1209.
- (12) Zhang, Y.; Fonslow, B. R.; Shan, B.; Baek, M.-C.; Yates, J. R. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews* **2013**, *113* (4), 2343–2394.
- (13) R. Julian, R. The Mechanism Behind Top-Down UVPD Experiments: Making Sense of Apparent Contradictions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2017**, *28* (9), 1823–1826.
- (14) El Kennani, S.; Crespo, M.; Govin, J.; Pflieger, D. Proteomic Analysis of Histone Variants and Their PTMs: Strategies and Pitfalls. *Proteomes* **2018**, *6* (3), 29.
- (15) Pandeswari, P. B.; Sabareesh, V. Middle-down Approach: A Choice to Sequence and Characterize Proteins/Proteomes by Mass Spectrometry. *RSC Advances* **2019**, *9* (1), 313–344.
- (16) Balgley, B. M.; Laudeman, T.; Yang, L.; Song, T.; Lee, C. S. Comparative Evaluation of Tandem MS Search Algorithms Using a Target-Decoy Search Strategy. *Molecular & Cellular Proteomics* **2007**, *6* (9), 1599–1608.
- (17) Olsen, J. V.; Ong, S.-E.; Mann, M. Trypsin Cleaves Exclusively C-Terminal to Arginine and Lysine Residues. *Molecular & Cellular Proteomics* **2004**, *3* (6), 608–614.
- (18) Swaney, D. L.; Wenger, C. D.; Coon, J. J. Value of Using Multiple Proteases for Large-Scale Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Journal of Proteome Research* **2010**, *9* (3), 1323–1329.
- (19) Gershon, P. D. Cleaved and Missed Sites for Trypsin, Lys-C, and Lys-N Can Be Predicted with High Confidence on the Basis of Sequence Context. *Journal of Proteome Research* **2014**, *13* (2), 702–709.
- (20) Rodriguez, J.; Gupta, N.; Smith, R. D.; Pevzner, P. A. Does Trypsin Cut Before Proline? *Journal of Proteome Research* **2008**, *7* (1), 300–305.
- (21) Giansanti, P.; Tsiatsiani, L.; Low, T. Y.; Heck, A. J. R. Six Alternative Proteases for Mass Spectrometry-Based Proteomics beyond Trypsin. *Nature Protocols* **2016**, *11* (5), 993–1006.
- (22) Schröder, C. U.; Lee, L.; Rey, M.; Sarpe, V.; Man, P.; Sharma, S.; Zabrouskov, V.; Larsen, B.; Schriemer, D. C. Neprosin, a Selective Prolyl Endoprotease for Bottom-up Proteomics and Histone Mapping. *Molecular & Cellular Proteomics* **2017**, *16* (6), 1162–1171.
- (23) Sidoli, S.; Garcia, B. A. Middle-down Proteomics: A Still Unexploited Resource for Chromatin Biology. *Expert Review of Proteomics* **2017**, *14* (7), 617–626.
- (24) Tsiatsiani, L.; Heck, A. J. R. Proteomics beyond Trypsin. *FEBS Journal* **2015**, *282* (14), 2612–2626.

- (25) Katta, V.; Chait, B. T.; Carr, S. Conformational Changes in Proteins Probed by Hydrogen-Exchange Electrospray-Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1991**, *5* (4), 214–217.
- (26) Narang, D.; Lento, C.; J. Wilson, D. HDX-MS: An Analytical Tool to Capture Protein Motion in Action. *Biomedicines* **2020**, *8* (7), 224.
- (27) Marcsisin, S. R.; Engen, J. R. Hydrogen Exchange Mass Spectrometry: What Is It and What Can It Tell Us? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397* (3), 967–972.
- (28) Zhang, Z.; Smith, D. L. Determination of Amide Hydrogen Exchange by Mass Spectrometry: A New Tool for Protein Structure Elucidation. *Protein Science* **1993**, *2* (4), 522–531.
- (29) Engen, J. R. Analysis of Protein Conformation and Dynamics by Hydrogen/Deuterium Exchange MS. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (19), 7870–7875.
- (30) Wales, T. E.; Engen, J. R. Hydrogen Exchange Mass Spectrometry for the Analysis of Protein Dynamics. *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, *25* (1), 158–170.
- (31) Oganessian, I.; Lento, C.; Wilson, D. J. Contemporary Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Methods* **2018**, *144*, 27–42.
- (32) Brown, K. A.; Wilson, D. J. Bottom-up Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry: Data Analysis and Interpretation. *Analyst* **2017**, *142* (16), 2874–2886.
- (33) Bai, Y.; Milne, J. S.; Mayne, L.; Englander, S. W. Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen Exchange. *Proteins* **1993**, *17* (1), 75–86.
- (34) Masson, G. R.; Burke, J. E.; Ahn, N. G.; Anand, G. S.; Borchers, C.; Brier, S.; Bou-Assaf, G. M.; Engen, J. R.; Englander, S. W.; Faber, J.; Garlish, R.; Griffin, P. R.; Gross, M. L.; Guttman, M.; Hamuro, Y.; Heck, A. J. R.; Houde, D.; Jacob, R. E.; Jørgensen, T. J. D.; Kaltashov, I. A.; Klinman, J. P.; Konermann, L.; Man, P.; Mayne, L.; Pascal, B. D.; Reichmann, D.; Skehel, M.; Snijder, J.; Strutzenberg, T. S.; Underbakke, E. S.; Wagner, C.; Wales, T. E.; Walters, B. T.; Weis, D. D.; Wilson, D. J.; Wintrode, P. L.; Zhang, Z.; Zheng, J.; Schriemer, D. C.; Rand, K. D. Recommendations for Performing, Interpreting and Reporting Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry (HDX-MS) Experiments. *Nature Methods* **2019**, *16* (7), 595–602.
- (35) Zhang, H.-M.; McLoughlin, S. M.; Frausto, S. D.; Tang, H.; Emmett, M. R.; Marshall, A. G. Simultaneous Reduction and Digestion of Proteins with Disulfide Bonds for Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (4), 1450–1454.
- (36) Comamala, G.; Krogh, C. C.; Nielsen, V. S.; Kutter, J. P.; Voglmeir, J.; Rand, K. D. Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry with Integrated Electrochemical Reduction and Microchip-Enabled Deglycosylation for Epitope Mapping of Heavily Glycosylated and Disulfide-Bonded Proteins. *Analytical Chemistry* **2021**, *93* (49), 16330–16340.
- (37) Walters, B. T.; Ricciuti, A.; Mayne, L.; Englander, S. W. Minimizing Back Exchange in the Hydrogen Exchange-Mass Spectrometry Experiment. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2012**, *23* (12), 2132–2139.
- (38) Espada, A.; Haro, R.; Castañon, J.; Sayago, C.; Perez-Cozar, F.; Cano, L.; Redero, P.; Molina-Martin, M.; Broughton, H.; Stites, R. E.; Pascal, B. D.; Griffin, P. R.; Dodge, J. A.; Chalmers, M. J. A Decoupled Automation Platform for Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Experiments. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2019**, *30* (12), 2580–2583.
- (39) Cravello, L.; Lascoux, D.; Forest, E. Use of Different Proteases Working in Acidic Conditions to Improve Sequence Coverage and Resolution in Hydrogen/Deuterium Exchange of Large Proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17* (21), 2387–2393.
- (40) Kádek, A.; Mrázek, H.; Halada, P.; Rey, M.; Schriemer, D. C.; Man, P. Aspartic Protease Nepenthesin-1 as a Tool for Digestion in Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2014**, *86* (9), 4287–4294.
- (41) Möller, I. R.; Slivacka, M.; Hausner, J.; Nielsen, A. K.; Pospíšilová, E.; Merkle, P. S.; Lišková, R.; Polák, M.; Loland, C. J.; Kádek, A.; Man, P.; Rand, K. D. Improving the Sequence Coverage of Integral Membrane Proteins during Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Experiments. *Analytical Chemistry* **2019**, *91* (17), 10970–10978.
- (42) Houde, D.; Arndt, J.; Domeier, W.; Berkowitz, S.; Engen, J. R. Characterization of IgG1 Conformation and Conformational Dynamics by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (7), 2644–2651.

- (43) Hamuro, Y.; Zawadzki, K. M.; Kim, J. S.; Stranz, D. D.; Taylor, S. S.; Woods, V. L. Dynamics of CAPK Type II β Activation Revealed by Enhanced Amide H/2H Exchange Mass Spectrometry (DXMS). *Journal of Molecular Biology* **2003**, *327* (5), 1065–1076.
- (44) Wang, L.; Smith, D. L. Capsid Structure and Dynamics of a Human Rhinovirus Probed by Hydrogen Exchange Mass Spectrometry. *Protein Science* **2009**, *14* (6), 1661–1672.
- (45) Powers, J. C.; Harley, A. D.; Myers, D. V. Subsite Specificity of Porcine Pepsin. In *Acid Proteases: Structure, Function, and Biology*; Tang, J., Ed.; Springer US: New York, NY, 1977; Vol. 95, pp 141–157.
- (46) Ahn, J.; Cao, M.-J.; Yu, Y. Q.; Engen, J. R. Accessing the Reproducibility and Specificity of Pepsin and Other Aspartic Proteases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2013**, *1834* (6), 1222–1229.
- (47) Jin, K. S.; Rho, Y.; Kim, J.; Kim, H.; Kim, I. J.; Ree, M. Synchrotron Small-Angle X-Ray Scattering Studies of the Structure of Porcine Pepsin under Various PH Conditions. *The Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112* (49), 15821–15827.
- (48) Tsiatsiani, L.; Akeroyd, M.; Olsthoorn, M.; Heck, A. J. R. Aspergillus Niger Prolyl Endoprotease for Hydrogen–Deuterium Exchange Mass Spectrometry and Protein Structural Studies. *Analytical Chemistry* **2017**, *89* (15), 7966–7973.
- (49) Man, P.; Montagner, C.; Vernier, G.; Dublet, B.; Chenal, A.; Forest, E.; Forge, V. Defining the Interacting Regions between Apomyoglobin and Lipid Membrane by Hydrogen/Deuterium Exchange Coupled to Mass Spectrometry. *Journal of Molecular Biology* **2007**, *368* (2), 464–472.
- (50) Zhang, H.-M.; Kazazic, S.; Schaub, T. M.; Tipton, J. D.; Emmett, M. R.; Marshall, A. G. Enhanced Digestion Efficiency, Peptide Ionization Efficiency, and Sequence Resolution for Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (23), 9034–9041.
- (51) Rey, M.; Man, P.; Brandolin, G.; Forest, E.; Pelosi, L. Recombinant Immobilized Rhizopuspepsin as a New Tool for Protein Digestion in Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, *23* (21), 3431–3438.
- (52) Yang, M.; Hoepfner, M.; Rey, M.; Kadek, A.; Man, P.; Schriemer, D. C. Recombinant Nepenthesin II for Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2015**, *87* (13), 6681–6687.
- (53) Rey, M.; Yang, M.; Burns, K. M.; Yu, Y.; Lees-Miller, S. P.; Schriemer, D. C. Nepenthesin from Monkey Cups for Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* **2013**, *12* (2), 464–472.
- (54) Kavan, D.; Man, P. MStools—Web Based Application for Visualization and Presentation of HXMS Data. *International Journal of Mass Spectrometry* **2011**, *302* (1–3), 53–58.
- (55) MStools. <http://peterslab.org/MStools/> [cit. 2022-07-19].
- (56) Wales, T. E.; Eggertson, M. J.; Engen, J. R. Considerations in the Analysis of Hydrogen Exchange Mass Spectrometry Data. In *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*; Matthiesen, R., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; Vol. 1007.
- (57) Raval, S.; Sarpe, V.; Hepburn, M.; Crowder, D. A.; Zhang, T.; Viner, R.; Schriemer, D. C. Improving Spectral Validation Rates in Hydrogen–Deuterium Exchange Data Analysis. *Analytical Chemistry* **2021**, *93* (9), 4246–4254.
- (58) DeutEx. <http://www.deutex.org/> [cit. 2022-07-19].
- (59) Repozitář AV ČR - DeutEx. http://asep.lib.cas.cz/arl-cav/cs/detail/?zf=TF_UN_RIV&idx=cav_un_epca-3*0550855 [cit. 2022-07-19].
- (60) Proteomics Grade Trypsin Protocol. <https://www.chem-agilent.com/pdf/strata/204310.pdf> [cit. 2022-07-09].
- (61) Slys, G. W.; Schriemer, D. C. On-Column Digestion of Proteins in Aqueous-Organic Solvents. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17* (10), 1044–1050.
- (62) Freije, J. R.; Mulder, P. P. M. F. A.; Werkman, W.; Rieux, L.; Niederlander, H. A. G.; Verpoorte, E.; Bischoff, R. Chemically Modified, Immobilized Trypsin Reactor with Improved Digestion Efficiency. *Journal of Proteome Research* **2005**, *4* (5), 1805–1813.
- (63) Switzar, L.; Giera, M.; Niessen, W. M. A. Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments. *Journal of Proteome Research* **2013**, *12* (3), 1067–1077.

- (64) O'Brien, D. P.; Hourdel, V.; Chenal, A.; Brier, S. Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry for the Structural Analysis of Detergent-Solubilized Membrane Proteins. In *Expression, Purification, and Structural Biology of Membrane Proteins*; Perez, C., Maier, T., Eds.; Springer US: New York, NY, 2020; Vol. 2127.
- (65) Dodds, E. D.; Seipert, R. R.; Clowers, B. H.; German, J. B.; Lebrilla, C. B. Analytical Performance of Immobilized Pronase for Glycopeptide Footprinting and Implications for Surpassing Reductionist Glycoproteomics. *Journal of Proteome Research* **2009**, *8* (2), 502–512.
- (66) López-Ferrer, D.; Hixson, K. K.; Smallwood, H.; Squier, T. C.; Petritis, K.; Smith, R. D. Evaluation of a High-Intensity Focused Ultrasound-Immobilized Trypsin Digestion and ¹⁸O-Labeling Method for Quantitative Proteomics. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (15), 6272–6277.
- (67) Nirudodhi, S. N.; Sperry, J. B.; Rouse, J. C.; Carroll, J. A. Application of Dual Protease Column for HDX-MS Analysis of Monoclonal Antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2017**, *106* (2), 530–536.
- (68) Shintani, T.; Ichishima, E. Primary Structure of Aspergillopepsin I Deduced from Nucleotide Sequence of the Gene and Aspartic Acid-76 Is an Essential Active Site of the Enzyme for Trypsinogen Activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1994**, *1204* (2), 257–264.
- (69) Mazon, H.; Marcillat, O.; Forest, E.; Vial, C. Local Dynamics Measured by Hydrogen/Deuterium Exchange and Mass Spectrometry of Creatine Kinase Digested by Two Proteases. *Biochimie* **2005**, *87* (12), 1101–1110.
- (70) Mayne, L.; Kan, Z.-Y.; Sevugan Chetty, P.; Ricciuti, A.; Walters, B. T.; Englander, S. W. Many Overlapping Peptides for Protein Hydrogen Exchange Experiments by the Fragment Separation-Mass Spectrometry Method. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2011**, *22* (11), 1898–1905.
- (71) Kuhne; Bonnington; Malik; Thomann; Avenal; Wegele; Reusch; Mormann; Bulau; Cymer. The Impact of Immunoglobulin G1 Fc Sialylation on Backbone Amide H/D Exchange. *Antibodies* **2019**, *8* (4), 49.
- (72) Mullahoo, J.; Zhang, T.; Clauser, K.; Carr, S. A.; Jaffe, J. D.; Papanastasiou, M. Dual Protease Type XIII/Pepsin Digestion Offers Superior Resolution and Overlap for the Analysis of Histone Tails by HX-MS. *Methods* **2020**, *184*, 135–140.
- (73) Hamuro, Y.; Zhang, T. High-Resolution HDX-MS of Cytochrome c Using Pepsin/Fungal Protease Type XIII Mixed Bed Column. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2019**, *30* (2), 227–234.
- (74) Subramanian, E.; Swan, I. D.; Liu, M.; Davies, D. R.; Jenkins, J. A.; Tickle, I. J.; Blundell, T. L. Homology among Acid Proteases: Comparison of Crystal Structures at 3Å Resolution of Acid Proteases from *Rhizopus Chinensis* and *Endothia Parasitica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1977**, *74* (2), 556–559.
- (75) Suguna, K.; Bott, R. R.; Padlan, E. A.; Subramanian, E.; Sheriff, S.; Cohen, G. H.; David, D. Structure and Refinement at 1.8 Å Resolution of the Aspartic Proteinase from *Rhizopus Chinensis*. *Journal of Molecular Biology* **1987**, *196* (4), 877–900.
- (76) Takahashi, K. The Amino Acid Sequence of *Rhizopuspepsin*, an Aspartic Proteinase from *Rhizopus Chinensis*. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262* (4), 1468–1478.
- (77) Fukumoto, J.; Tsuru, D.; Yamamoto, T. Studies on Mold Protease: Part I. Purification, Crystallization and Some Enzymatic Properties of Acid Protease of *Rhizopus Chinensis*. *Agricultural and Biological Chemistry* **1967**, *31* (6), 710–717.
- (78) Flentke, G. R.; Gliniski, J.; Satyshur, K.; Rich, D. H. Purification and Crystallization of *Rhizopuspepsin*: The Use of Nickel Chelation Chromatography to Select for Catalytically Active Species. *Protein Expression and Purification* **1999**, *16* (2), 213–220.
- (79) Athauda, S. B. P.; Matsumoto, K.; Rajapakshe, S.; Kuribayashi, M.; Kojima, M.; Kubomura-Yoshida, N.; Iwamatsu, A.; Shibata, C.; Inoue, H.; Takahashi, K. Enzymic and Structural Characterization of Nepenthesin, a Unique Member of a Novel Subfamily of Aspartic Proteinases. *Biochemical Journal* **2004**, *381* (1), 295–306.
- (80) Kádek, A.; Tretyachenko, V.; Mrázek, H.; Ivanová, L.; Halada, P.; Rey, M.; Schriemer, D. C.; Man, P. Expression and Characterization of Plant Aspartic Protease Nepenthesin-I from *Nepenthes Gracilis*. *Protein Expression and Purification* **2014**, *95*, 121–128.

- (81) Kubota, K.; Metoki, Y.; Athauda, S. B. P.; Shibata, C.; Takahashi, K. Stability Profiles of Nepenthesin in Urea and Guanidine Hydrochloride: Comparison with Porcine Pepsin A. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2010**, *74* (11), 2323–2326.
- (82) Fejfarová, K.; Kádek, A.; Mrázek, H.; Hausner, J.; Tretyachenko, V.; Koval', T.; Man, P.; Hašek, J.; Dohnálek, J. Crystallization of Nepenthesin I Using a Low-PH Crystallization Screen. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* **2016**, *72* (1), 24–28.
- (83) Kádek, A.; Kavan, D.; Marcoux, J.; Stojko, J.; Felice, A. K. G.; Cianférani, S.; Ludwig, R.; Halada, P.; Man, P. Interdomain Electron Transfer in Cellobiose Dehydrogenase Is Governed by Surface Electrostatics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2017**, *1861* (2), 157–167.
- (84) Vankova; Salido; Timson; Man; Pey. A Dynamic Core in Human NQO1 Controls the Functional and Stability Effects of Ligand Binding and Their Communication across the Enzyme Dimer. *Biomolecules* **2019**, *9* (11), 728.
- (85) Pacheco-Garcia, J. L.; Loginov, D.; Rizzuti, B.; Vankova, P.; Neira, J. L.; Kavan, D.; Mesa-Torres, N.; Guzzi, R.; Man, P.; Pey, A. L. A Single Evolutionarily Divergent Mutation Determines the Different FAD-binding Affinities of Human and Rat NQO1 Due to Site-specific Phosphorylation. *FEBS Letters* **2022**, *596* (1), 29–41.
- (86) Miyazono, K.-I.; Kubota, K.; Takahashi, K.; Tanokura, M. Crystal Structure and Substrate Recognition Mechanism of the Prolyl Endoprotease PEP from *Aspergillus Niger*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2022**, *591*, 76–81.
- (87) van Schaick, G.; Domínguez-Vega, E.; Gstöttner, C.; van den Berg-Verleg, J. H.; Schouten, O.; Akeroyd, M.; Olsthoorn, M. M. A.; Wuhler, M.; Heck, A. J. R.; Abello, N.; Franc, V. Native Structural and Functional Proteoform Characterization of the Prolyl-Alanyl-Specific Endoprotease EndoPro from *Aspergillus Niger*. *Journal of Proteome Research* **2021**, *20* (10), 4875–4885.
- (88) Laarse, S. A. M.; Gelder, C. A. G. H.; Bern, M.; Akeroyd, M.; Olsthoorn, M. M. A.; Heck, A. J. R. Targeting Proline in (Phospho)Proteomics. *The FEBS Journal* **2020**, febs.15190.
- (89) Lopez, M.; Edens, L. Effective Prevention of Chill-Haze in Beer Using an Acid Proline-Specific Endoprotease from *Aspergillus Niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53* (20), 7944–7949.
- (90) Akeroyd, M.; van Zandycke, S.; den Hartog, J.; Mutsaers, J.; Edens, L.; van den Berg, M.; Christis, C. AN-PEP, Proline-Specific Endopeptidase, Degrades All Known Immunostimulatory Gluten Peptides in Beer Made from Barley Malt. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2016**, *74* (2), 91–99.
- (91) Mohan Kumar, B. V.; Vijaykrishnaraj, M.; Kurrey, N. K.; Shinde, V. S.; Prabhasankar, P. Prolyl Endopeptidase-Degraded Low Immunoreactive Wheat Flour Attenuates Immune Responses in Caco-2 Intestinal Cells and Gluten-Sensitized BALB/c Mice. *Food and Chemical Toxicology* **2019**, *129*, 466–475.
- (92) Stepniak, D.; Spaenij-Dekking, L.; Mitea, C.; Moester, M.; de Ru, A.; Baak-Pablo, R.; van Veelen, P.; Edens, L.; Koning, F. Highly Efficient Gluten Degradation with a Newly Identified Prolyl Endoprotease: Implications for Celiac Disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **2006**, *291* (4), G621–G629.
- (93) Mitea, C.; Havenaar, R.; Drijfhout, J. W.; Edens, L.; Dekking, L.; Koning, F. Efficient Degradation of Gluten by a Prolyl Endoprotease in a Gastrointestinal Model: Implications for Coeliac Disease. *Gut* **2007**, *57* (1), 25–32.
- (94) Salden, B. N.; Monserrat, V.; Troost, F. J.; Bruins, M. J.; Edens, L.; Bartholomé, R.; Haenen, G. R.; Winkens, B.; Koning, F.; Masclee, A. A. Randomised Clinical Study: *Aspergillus Niger* -Derived Enzyme Digests Gluten in the Stomach of Healthy Volunteers. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **2015**, *42* (3), 273–285.
- (95) Samodova, D.; Hosfield, C. M.; Cramer, C. N.; Giuli, M. V.; Cappellini, E.; Franciosa, G.; Rosenblatt, M. M.; Kelstrup, C. D.; Olsen, J. V. ProAlanase Is an Effective Alternative to Trypsin for Proteomics Applications and Disulfide Bond Mapping. *Molecular & cellular proteomics* **2020**, *19* (12), 2139–2157.
- (96) Šebela, M.; Řehulka, P.; Kábrt, J.; Řehulková, H.; Ožďian, T.; Raus, M.; Franc, V.; Chmelík, J. Identification of N-Glycosylation in Prolyl Endoprotease from *Aspergillus Niger* and Evaluation of the Enzyme for Its Possible Application in Proteomics: Prolyl Endoprotease from *Aspergillus Niger*. *Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *44* (11), 1587–1595.

- (97) *Brewers Clarex*. https://www.dsm.com/food-beverage/en_US/ingredients/beverages-and-brewing/brewing/brewers-clarex.html [cit. 2022-07-22].
- (98) *Swanson Ultra - Gluten Rid with Tolerase G*. <https://www.swansonvitamins.com/p/swanson-ultra-gluten-rid-tolerase-g-100-mg-90-veg-caps> [cit. 2022-07-22].
- (99) *ProAlanase (Mass Spec Grade)*. <https://worldwide.promega.com/products/mass-spectrometry/peptidases-and-surfactants/proalanase-mass-spec-grade/?catNum=VA2161> [cit. 2022-07-22].
- (100) Kang, C.; Yu, X.-W.; Xu, Y. A Codon-Optimized Endoprotease Endo-Pro-Aspergillus Niger: Over Expression and High-Density Fermentation in Pichia Pastoris. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, *104*, 64–69.
- (101) Pierce BCA Protein Assay Kit User Guide. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf [cit. 2022-04-22].
- (102) Simonian, M. H.; Smith, J. A. Spectrophotometric and Colorimetric Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Molecular Biology* **2006**, *76* (1).
- (103) Mascot database search: Enzymes. https://www.matrixscience.com/help/enzyme_help.html [cit. 2022-04-22].
- (104) Wang, L.; Pan, H.; Smith, D. L. Hydrogen Exchange-Mass Spectrometry: Optimization of Digestion Conditions. *Molecular & Cellular Proteomics* **2002**, *1* (2), 132–138.
- (105) ThermoFisher. *POROS™ 20 AL, EP and OH Perfusion Chromatography Bulk Media for Activated Affinity Chromatography*. PRODUCT INFORMATION SHEET. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/80031400993_20AL_EPBulkMedia_PI.pdf, [cit. 2022-07-08].
- (106) Meier, F.; Brunner, A.-D.; Koch, S.; Koch, H.; Lubeck, M.; Krause, M.; Goedecke, N.; Decker, J.; Kosinski, T.; Park, M. A.; Bache, N.; Hoerning, O.; Cox, J.; Räther, O.; Mann, M. Online Parallel Accumulation–Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics* **2018**, *17* (12), 2534–2545.
- (107) *cRAP database*. <https://www.thegpm.org/crap/> [cit. 2022-06-06].
- (108) *Decoy databases*. https://www.matrixscience.com/help/decoy_help.html#PEPTIDE [cit. 2022-06-07].
- (109) Keil, B. *Specificity of Proteolysis*; Berlin, Springer, 1992.

Přílohy

Myoglobin (koňský)

GLSDGEWQQVLNVWGKVEADIAGHGQEVLIIRLFTGHPETLEKFDKFKHLKTEAEMKASEDLKKHGT
VVLTA LGGILKKKGHHEAELKPLAQSHATKHKIPIKYLEFISDAIIHVLHSHKHPGDFGADAQGAMT
KALELFRNDIAAKYKELGFQG

14-3-3 gamma

GHMVDREQLVQKARLAEQAERYDDMAAAMKNVTELNPLSNEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRVIS
SIEQKTSADGNEKKIEMVRAYREKIEKELEAVCQDVLSLLDNYLIKNCSETQYESKVFYLLKMKGDY
YRYLAEVATGEKRATVVESEKAYSEAHEISKEHMQPTHPIRLGLALNYSVFYIEIQNAPEQACHL
AKTAFDDAIAELDTLNEDSYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDDQDDGGEGNN

Bovinní karbonická anhydrase 2 (bCA2)

SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIANGERQSPVDIDTKAVVQDPALKPLALVYGEATSRRMVNNGHSFN
VEYDDSQDKAVLKDGPLTGTYRLVQFHFHWGSSDDQGEHTVDRKKYAAELHLVHWNTKYGDFGTA
AQQPDGLAVVGVFLKVG DANPALQKVLDA LDSIKTKGKSTDFPNFDPGSLLPNVLDYWTYPGSLTT
PPLLESVTWIVLKEPISVSSQMLKFRTLNFNAEGEPELLMLANWRPAQPLKNRQVRGFPK

Bovinní sérový albumin (BSA)

DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLI AFSQYLQQCPFDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSL
HTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCQEPERNECF LSHKDDSPDLPKLPDPNTLCDEFKADEKK
FWGKYLYEIIARRHPYFYAPELLYANKYNGVFQECCQAEDKGACLLPKIETMREKVLASSARQRLR
CASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDILLECADDRADLAKYIC
DNQDTISSKLECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVKKNYQEAKDAFLGSFL
YEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLECCA KDDPHACYSTVFDKLLKHLVDEPQNLIKQNCDFEK
LGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVL
HEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLTFHADICTLPDTEKQIKKQTAL
VELLKHKPKATEEQKVTMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA

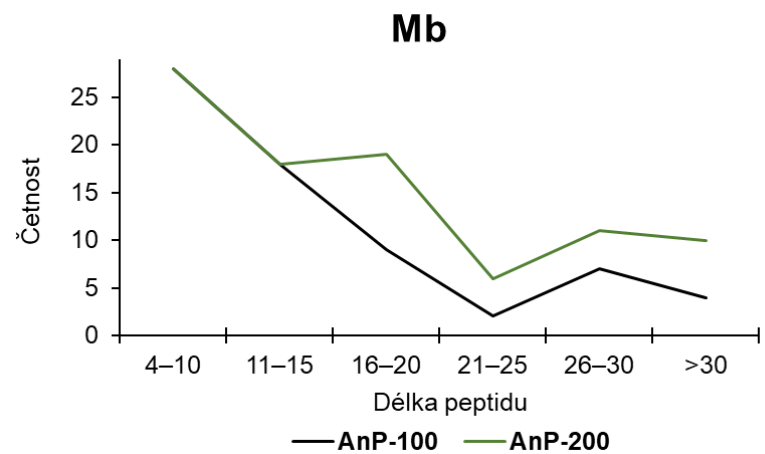
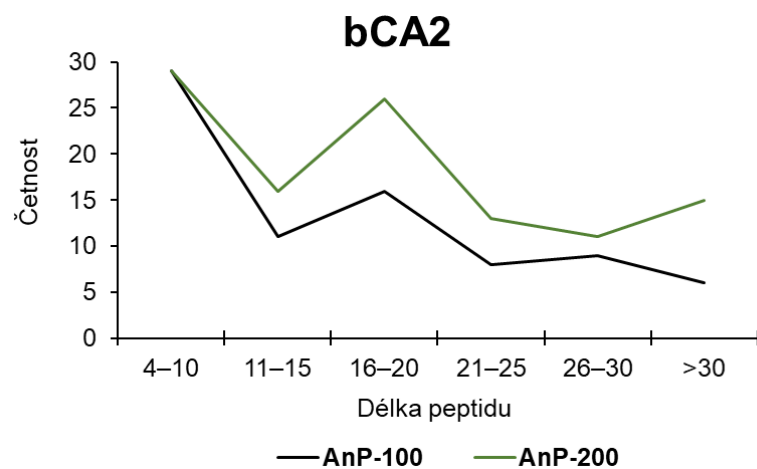
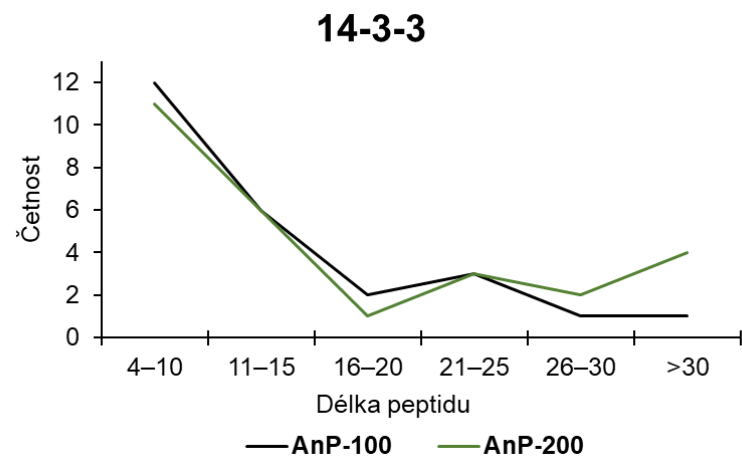
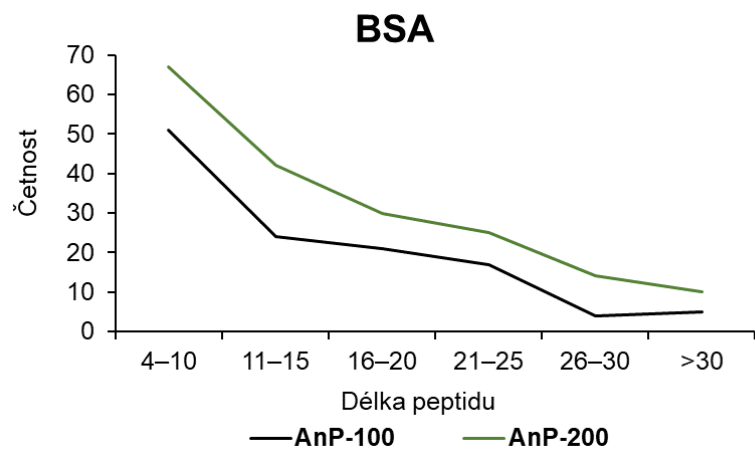
Trastuzumab (Herceptin) – lehký řetězec

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSR
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

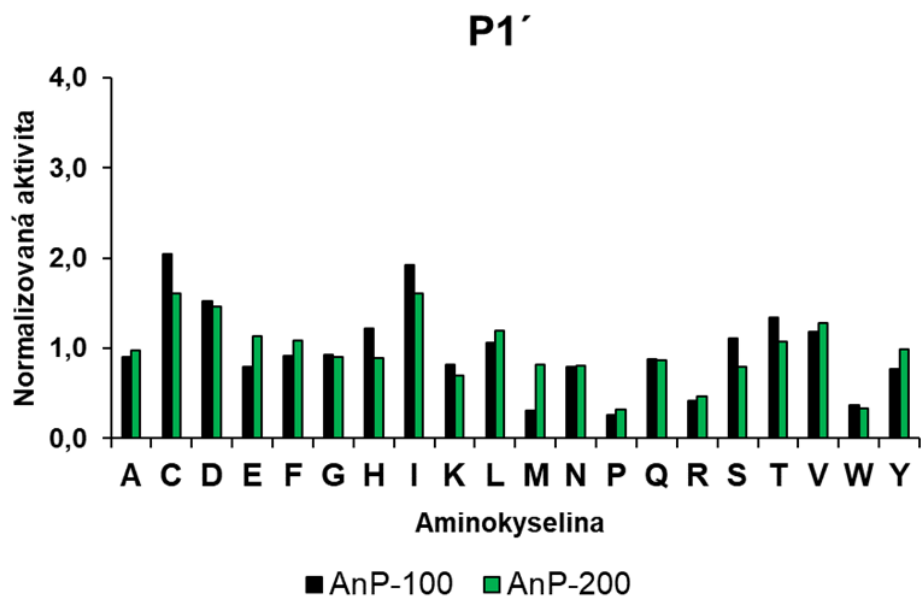
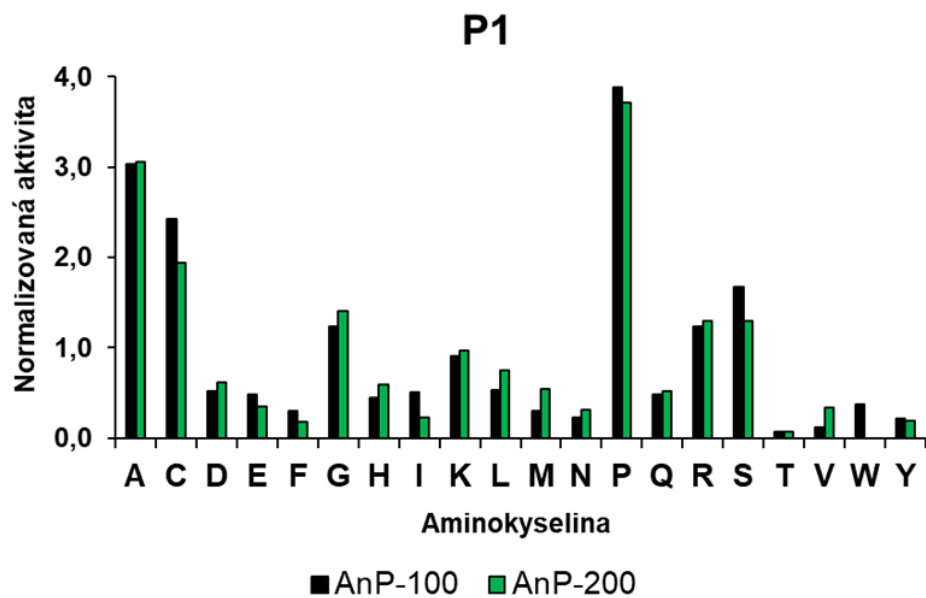
Trastuzumab (Herceptin) – těžký řetězec

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKG
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

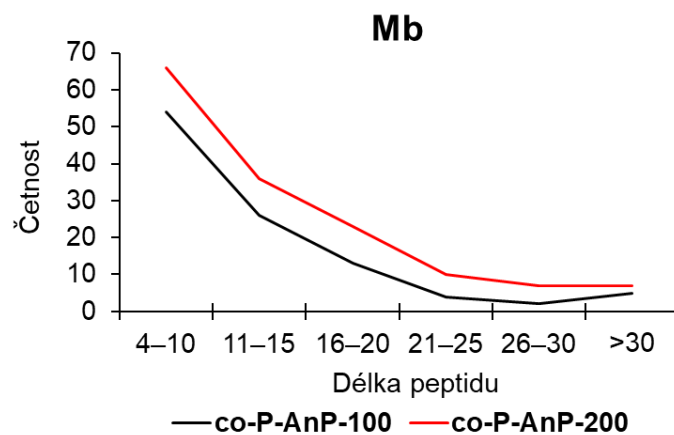
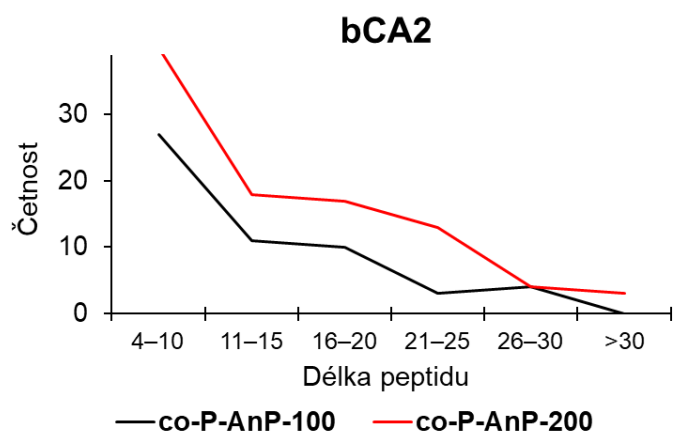
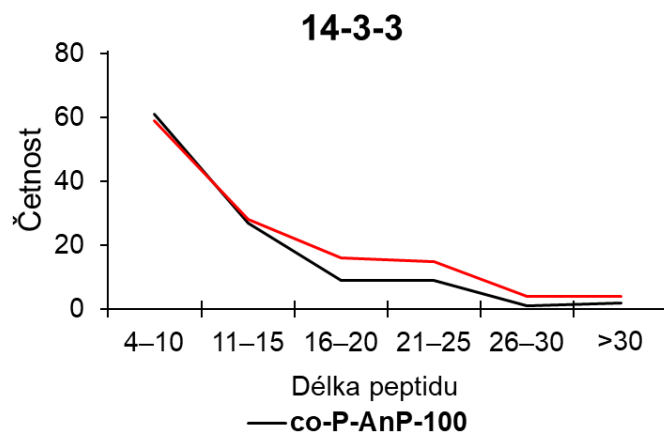
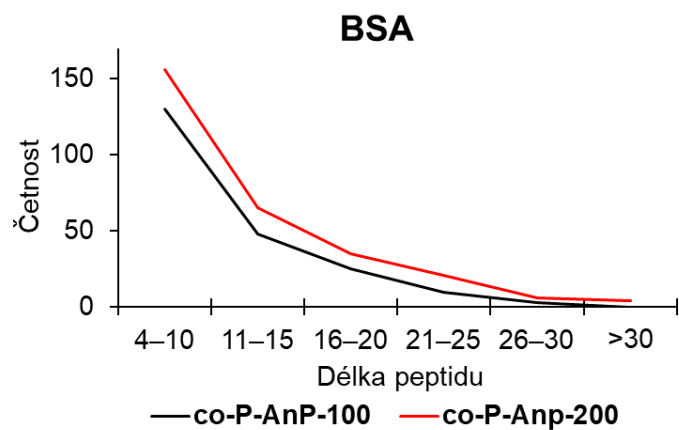
P 1 – Sekvence proteinových substrátů pro proteasové kolony. Tučně jsou vyznačena hlavní zásahová místa AnPEP proteasy – P, A, C.



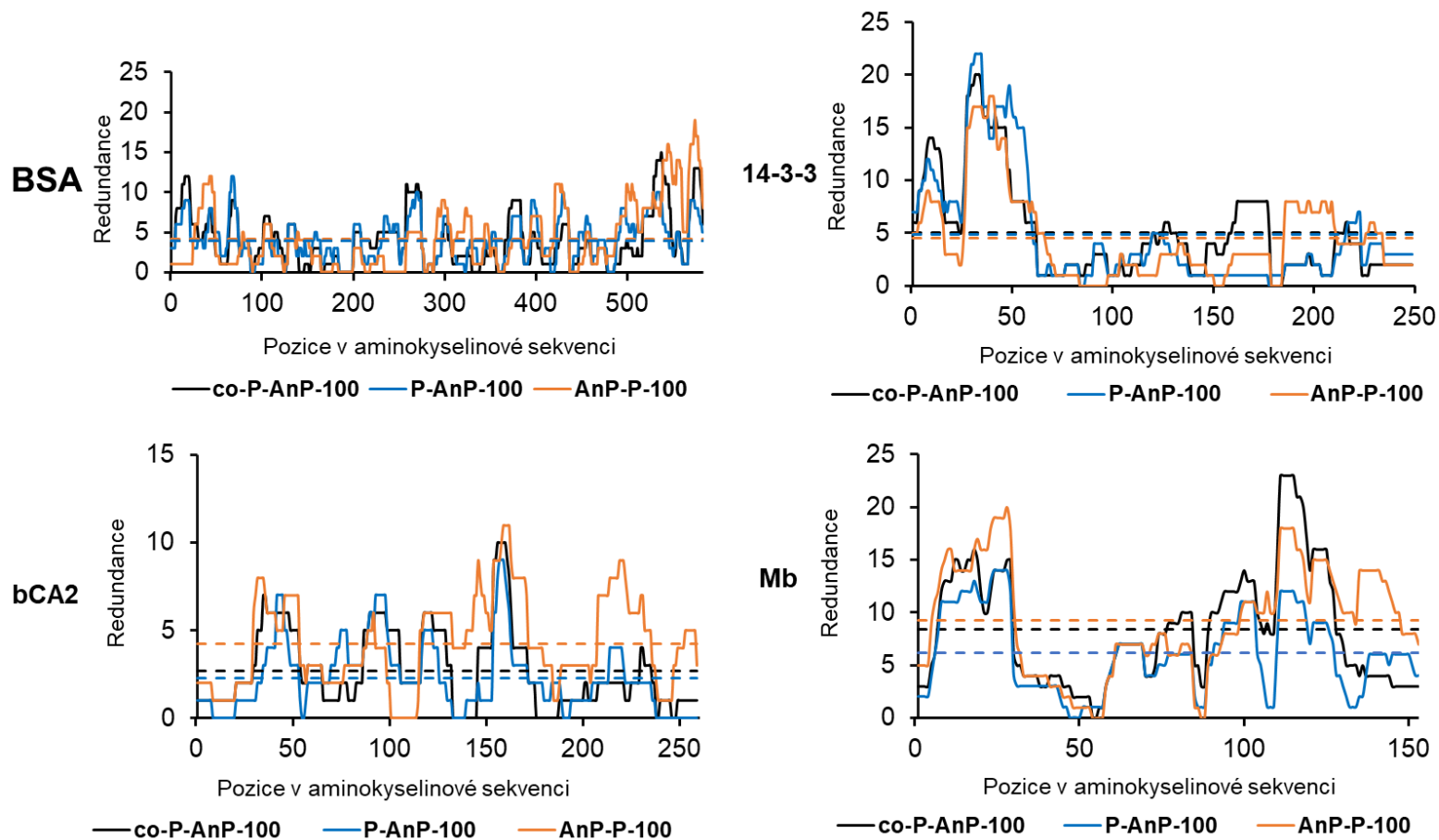
P 2 – Distribuce délek peptidů modelových proteinů (BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin). Srovnání štěpení pomocí AnPEP při průtoku 100 a 200 μ l/min. Proteolýza probíhala při pH 2,5 a 0 $^{\circ}$ C.



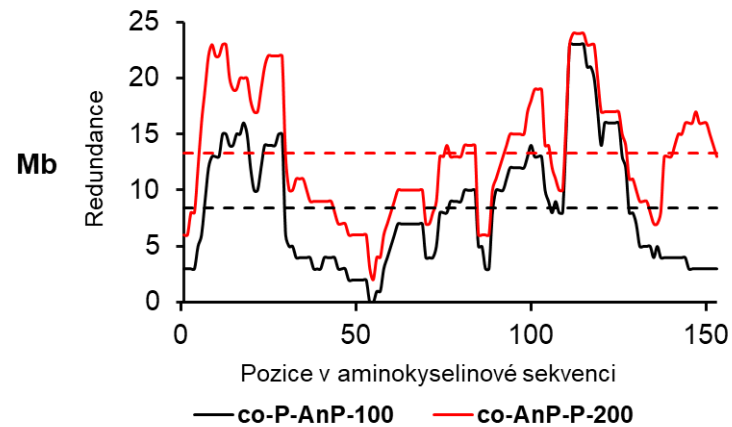
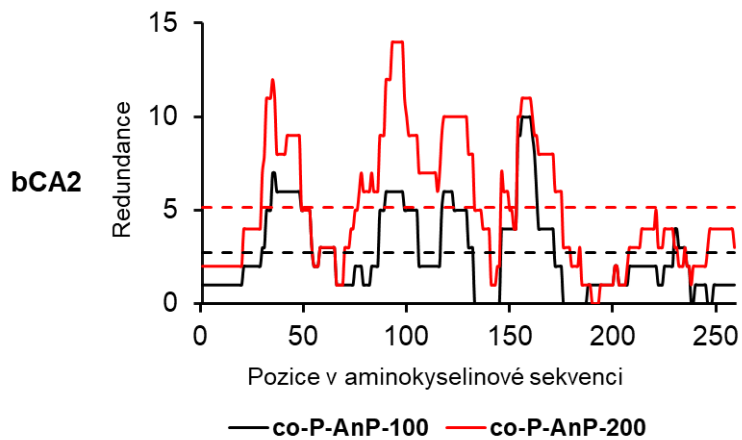
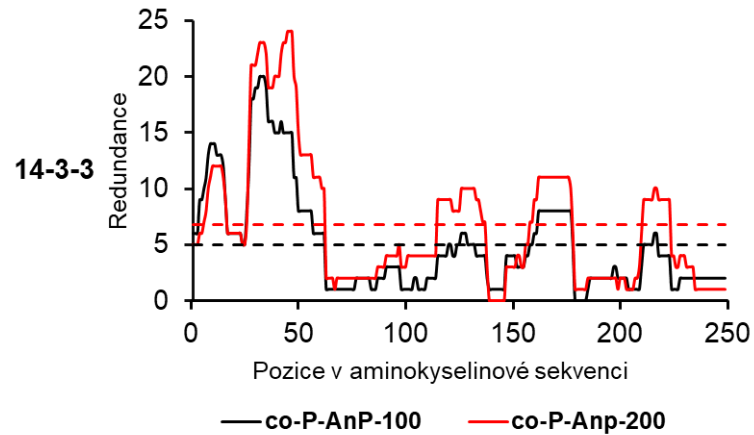
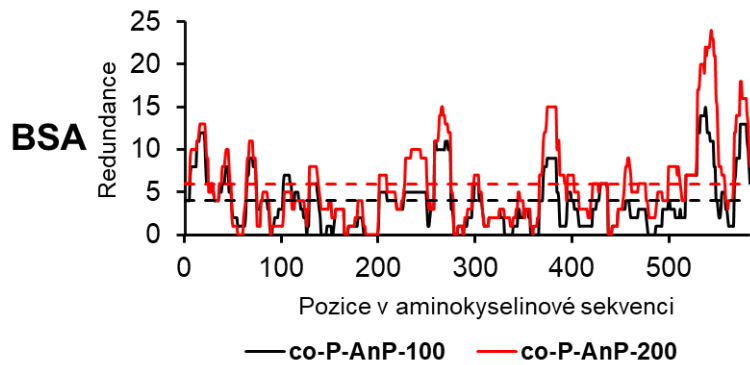
P 3 – Štěpné preference imobilizované proteasy AnPEP (AnP). Čísla za pomlčkou označují průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Proteolýza probíhala při pH 2,5 a 0 °C. Štěpné preference jsou normalizovány na výskyt jednotlivých aminokyselin v modelových proteinech (BSA, Mb, 14-3-3, bCA2). V tomto grafu jsou sečteny normalizované aktivity pro jednotlivé modelové proteiny. P1 aminokyselina je vlevo od štěpené peptidové vazby a P1' vpravo od štěpené peptidové vazby.



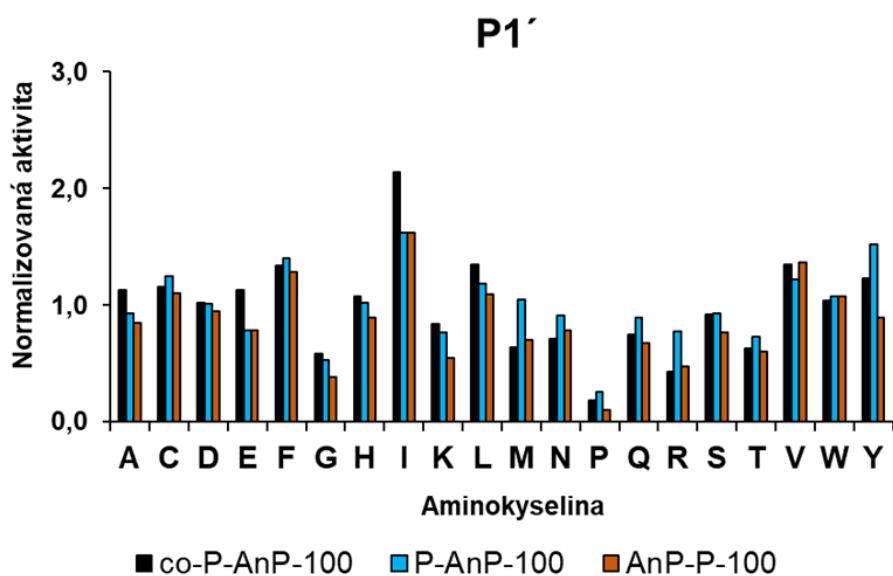
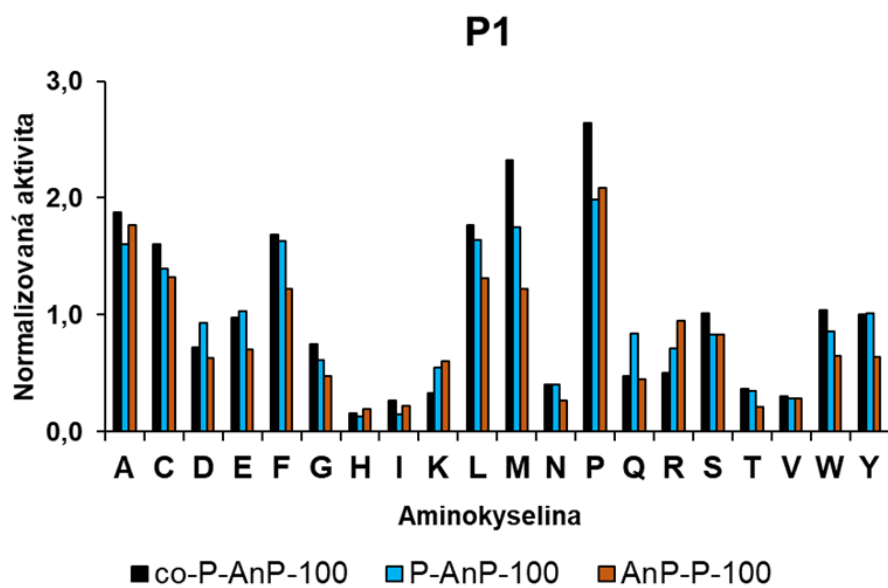
P 4 – Distribuce délek peptidů modelových proteinů (BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin). Srovnání štěpení pomocí AnPEPu koimobilizovaného s pepsinem při průtoku 100 a 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Proteolýza probíhala při pH 2,5 a 0 °C.



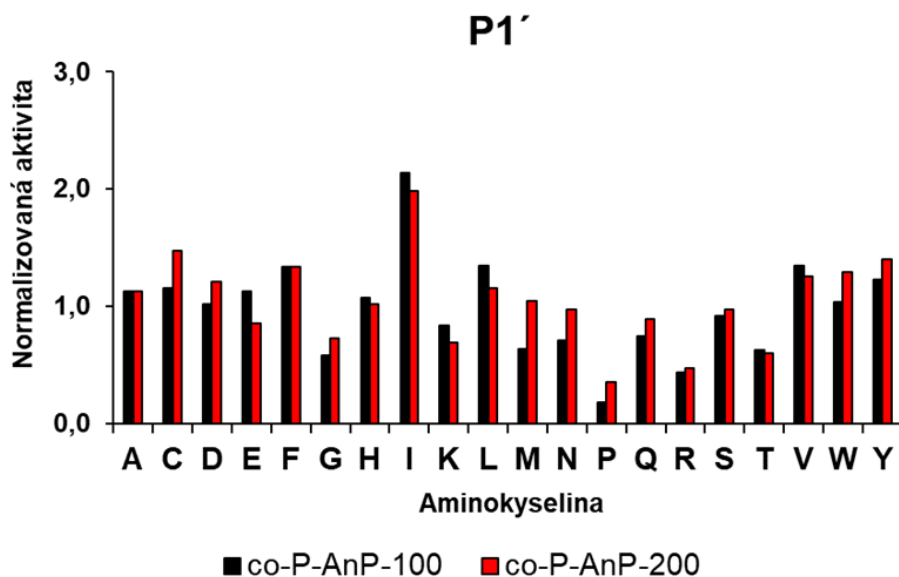
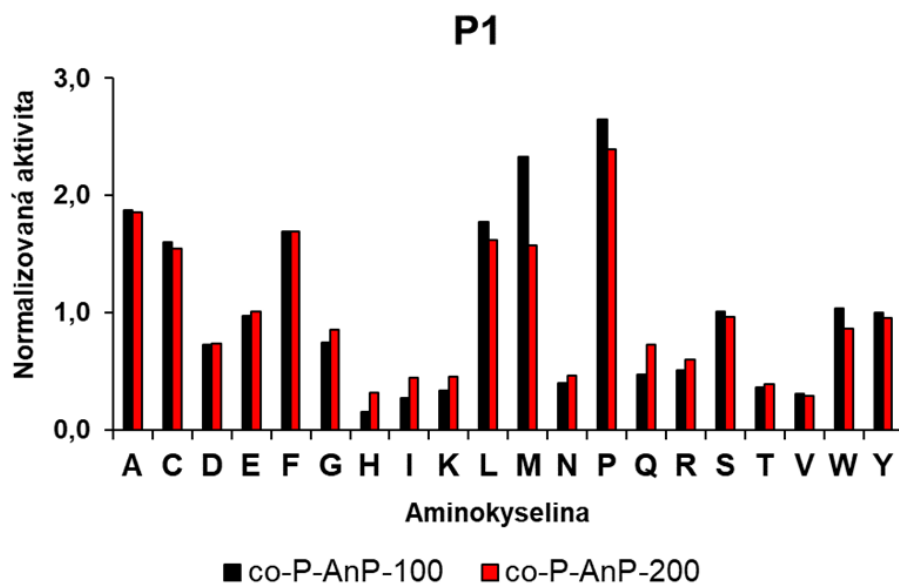
P 5 – Distribuce redundance u modelových proteinů (BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin). Byly štěpeny těmito kombinacemi proteasových kolon – co-P-AnP: koimobilizovaný pepsin a AnPEP, P-AnP, AnP-P: sériově zapojené kolony s pepsinem a AnPEPem v příslušném pořadí. Barevně odlišené čárkované přímkové odpovídají průměrné redundanci pro danou kolonu. Čísla za jednotlivými kolonami označují průtokové rychlosti v $\mu\text{l}/\text{min}$. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C.



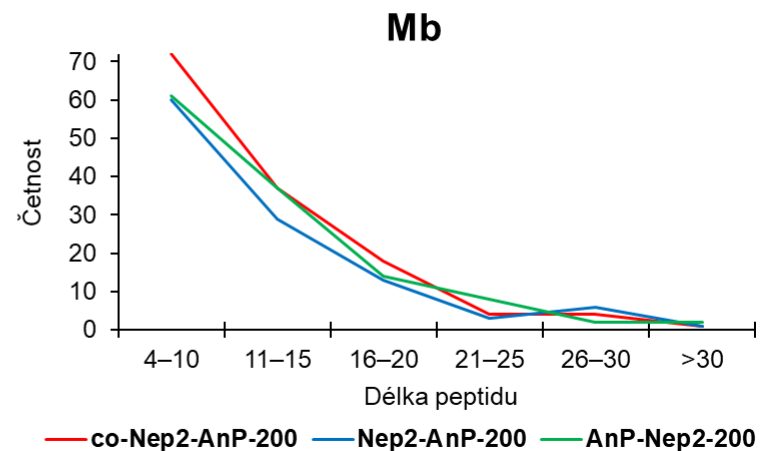
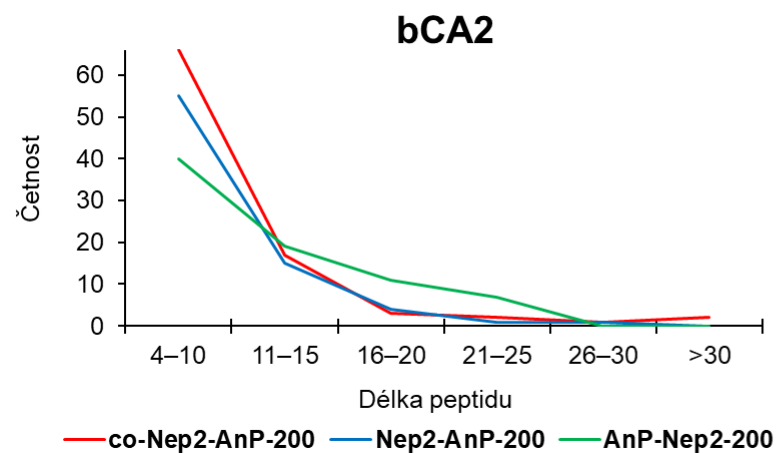
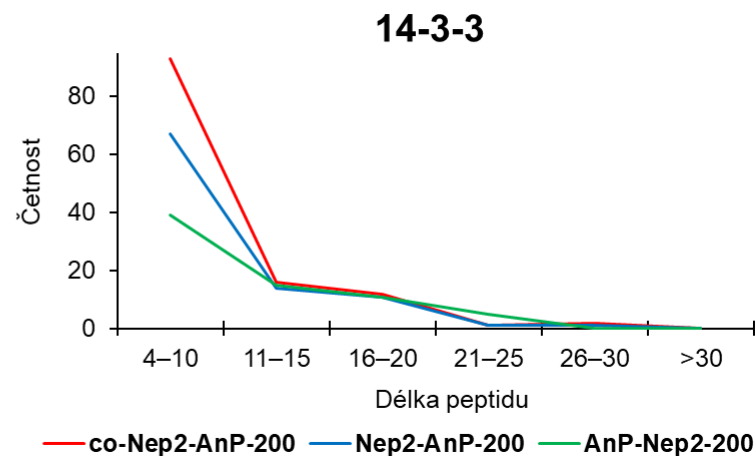
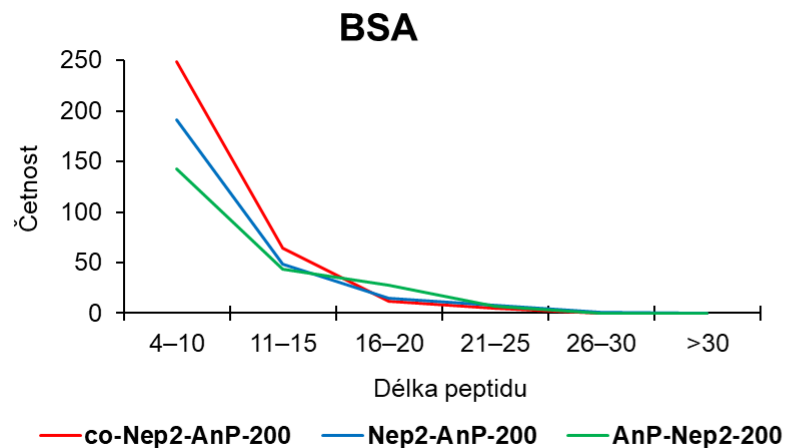
P 6 – Distribuce redundance u modelových proteinů (BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin). Byly štěpeny pepsinem koimobilizovaným s AnPEP. Čísla za pomlčkou v legendě označují průtokové rychlosti v $\mu\text{l}/\text{min}$. Barevně odlišené čárkované přímky odpovídají průměrné redundanci pro daný průtok. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C.



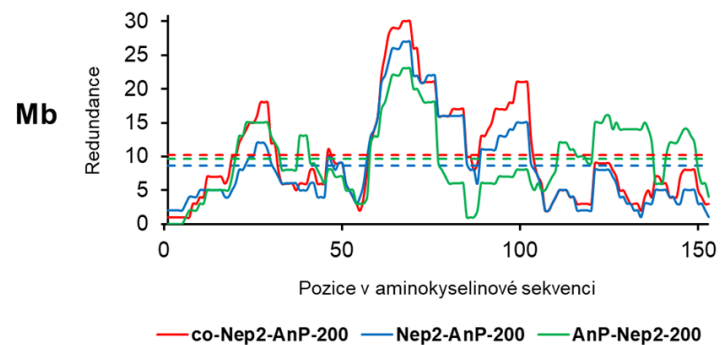
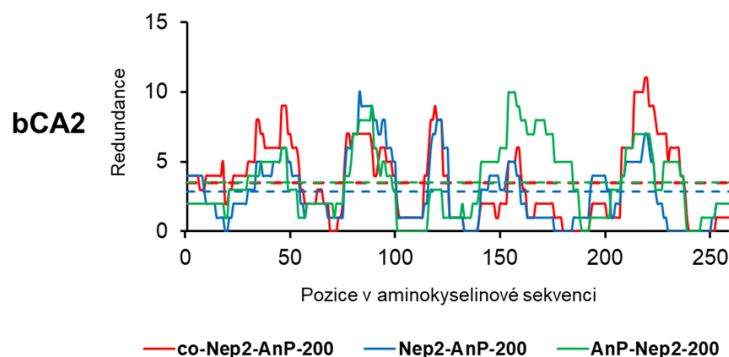
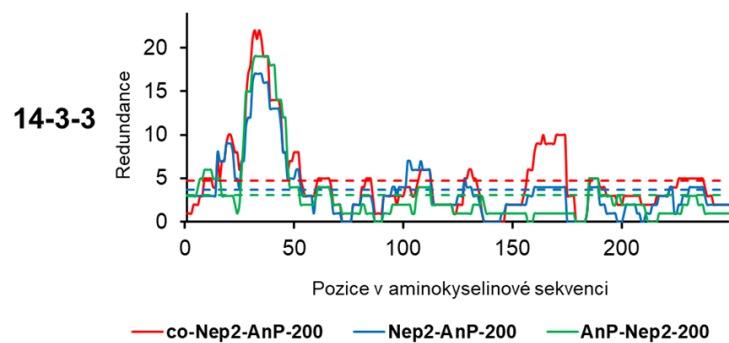
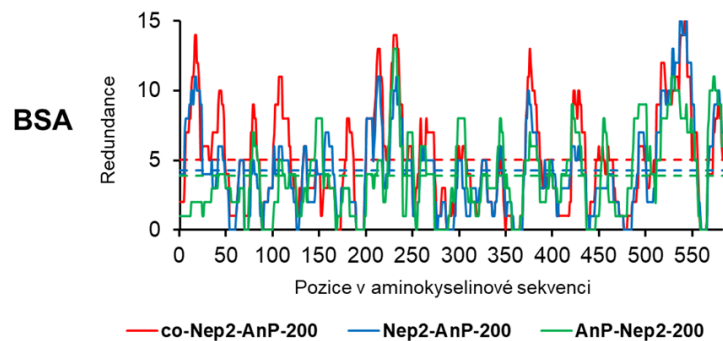
P 7 – Štěpné preference kombinací imobilizovaného pepsinu a AnPEPu. co-P-AnP: koimobilizovaný pepsin a AnPEP, P-AnP, AnP-P: sériově zapojené kolony s pepsinem a AnPEPem v příslušném pořadí. Čísla za pomlčkou označují průtokové rychlosti kolonami v $\mu\text{l}/\text{min}$. Proteolýza probíhala při pH 2,5 a 0 °C. Štěpné preference jsou normalizovány na výskyt jednotlivých aminokyselin v modelových proteinech (BSA, Mb, 14-3-3, bCA2). V tomto grafu jsou sečteny normalizované aktivity pro jednotlivé



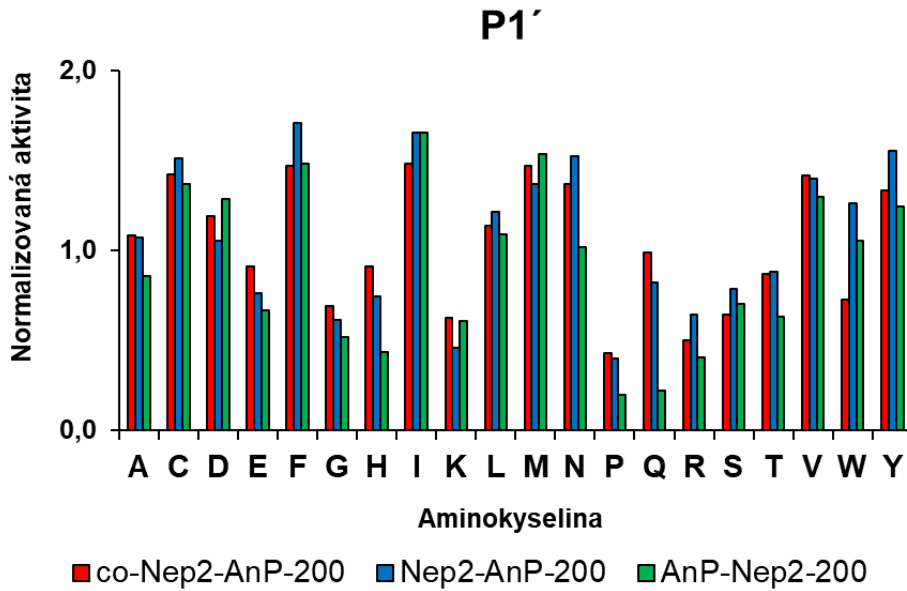
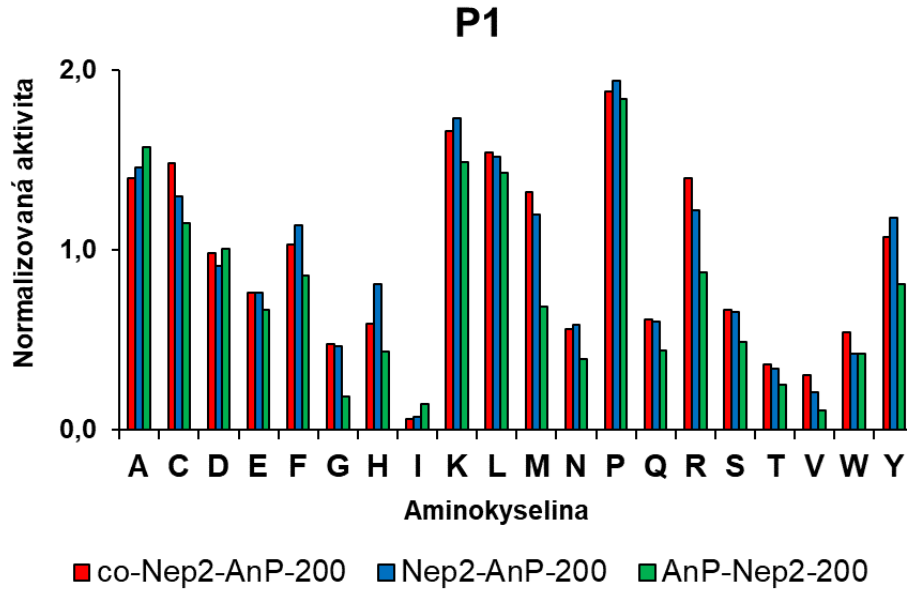
P 8 – Štěpné preference AnPEPu koimobilizovaného s pepsinem. Čísla za pomlčkou označují průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Proteolýza probíhala při pH 2,5 a 0 °C. Štěpné preference jsou normalizovány na výskyt jednotlivých aminokyselin v modelových proteinech (BSA, Mb, 14-3-3, bCA2). V tomto grafu jsou sečteny normalizované aktivity pro jednotlivé modelové proteiny. P1 aminokyselina je vlevo od štěpené peptidové vazby a P1' vpravo od štěpené peptidové vazby.



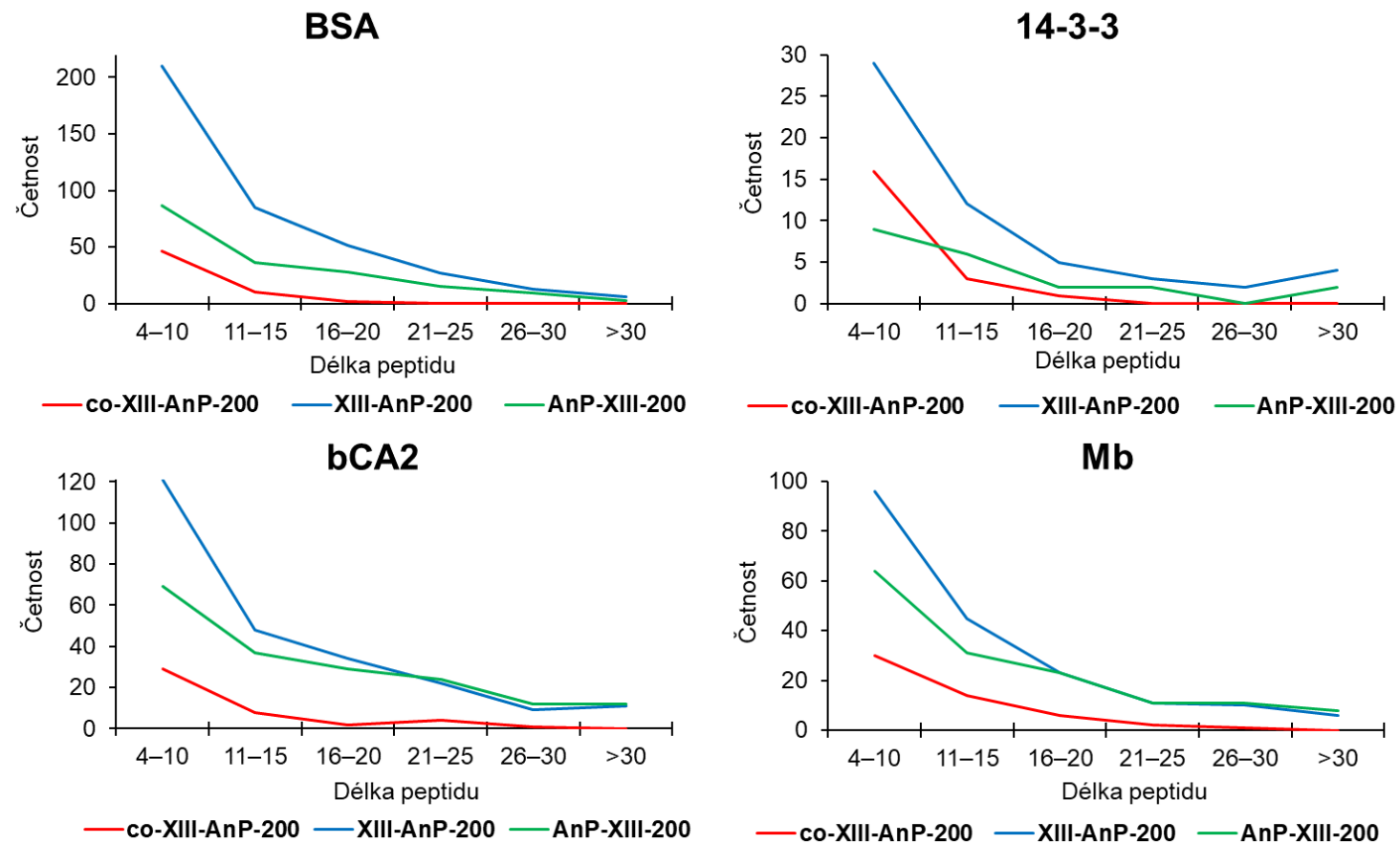
P 9 – Distribuce délek peptidů modelových proteinů (BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin). Barevně jsou odlišeny kombinace imobilizovaných proteas. P: pepsin, co-Nep2-AnP: koimobilizovaný nepenthesin-2 a AnPEP, Nep2-AnP, AnP-Nep2: sériově zapojené kolony s Nep-2 a AnPEPem v příslušném pořadí. Čísla za jednotlivými proteasami odpovídají průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C.



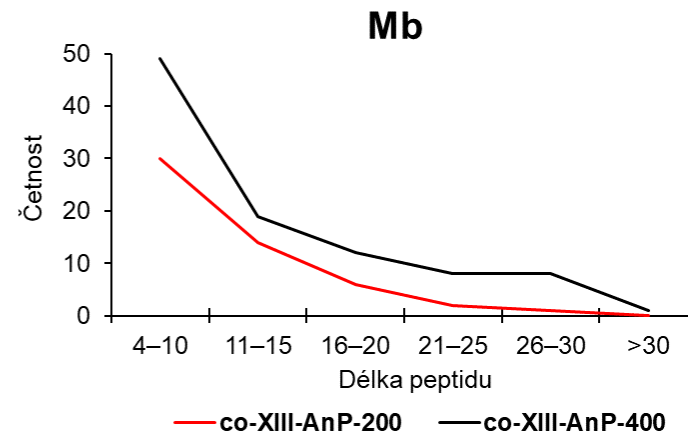
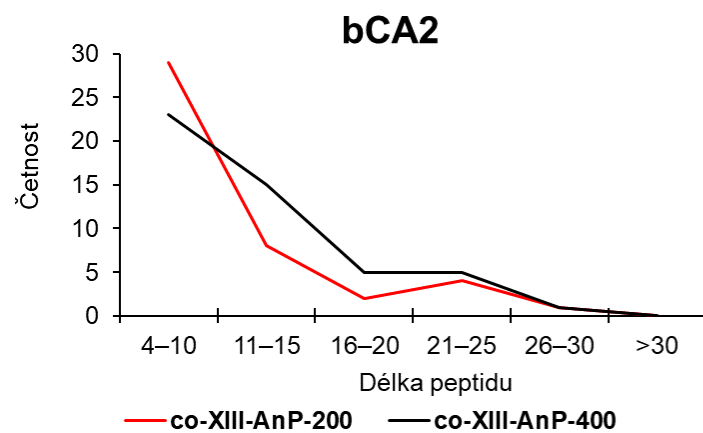
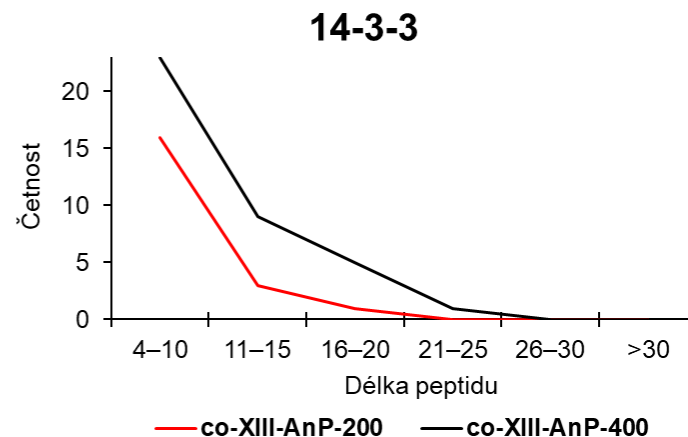
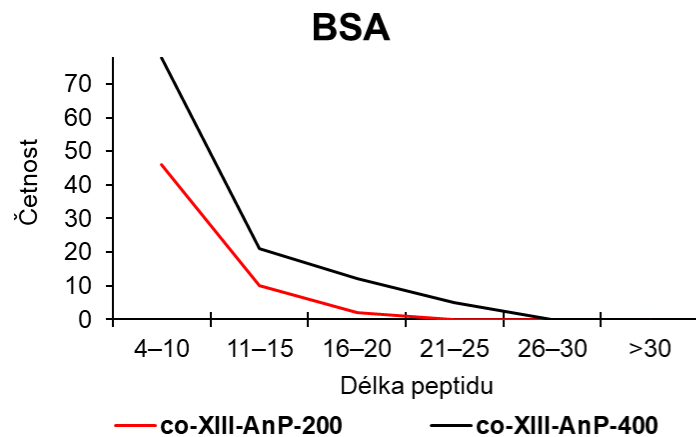
P 10 – Distribuce redundance u modelových proteinů (BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin). Byly štěpeny těmito kombinacemi proteasových kolon – co-Nep2-AnP: koimobilizovaný nepenthesin-2 a AnPEP, Nep2-AnP, AnP-Nep2: sériově zapojené kolony s Nep-2 a AnPEPem v příslušném pořadí Číslo za jednotlivými kolonami označují průtokové rychlosti v $\mu\text{l}/\text{min}$. Štěpení probíhalo při $\text{pH } 2,5$ a 0°C . Barevně odlišené čárkované přímkové odpovídají průměrné redundanci pro danou kolonu.



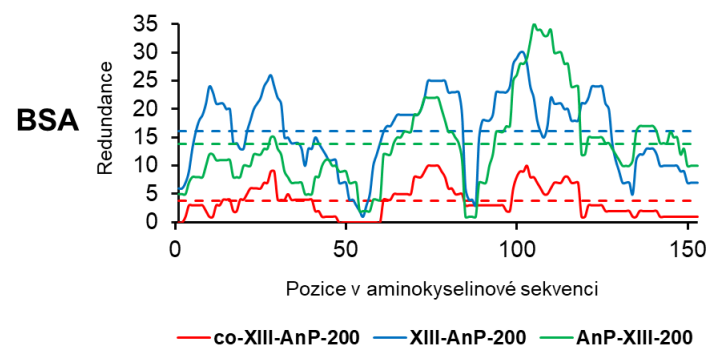
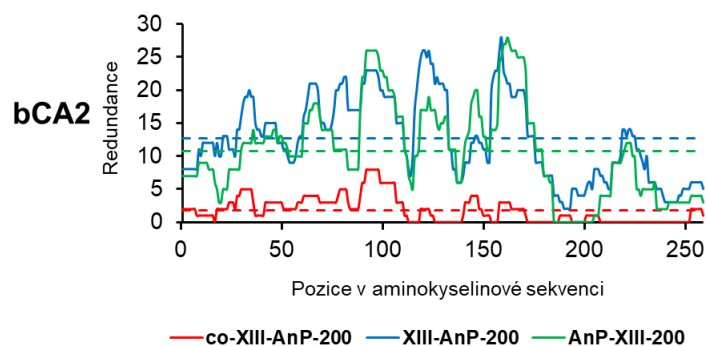
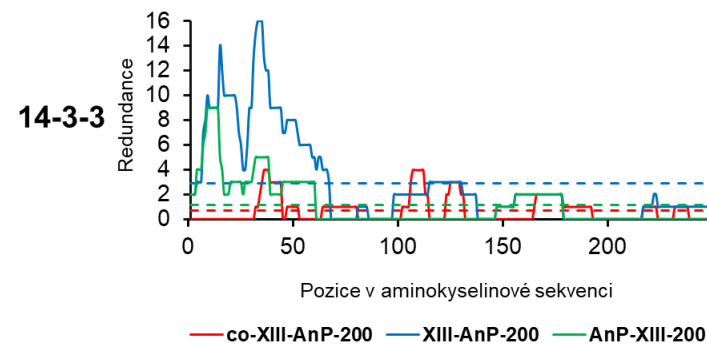
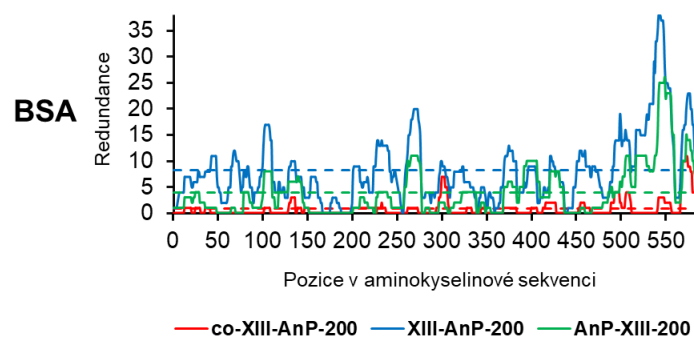
P 11 – Štěpné preference kombinací imobilizovaného nepenthesinu-2 a AnPEPu. co-Nep2-AnP: koimobilizovaný nepenthesin-2 a AnPEP, Nep2-AnP, AnP-Nep2: sériově zapojené kolony s Nep-2 a AnPEPem v příslušném pořadí Čísla za pomlčkou označují průtokové rychlosti kolonami v $\mu\text{l}/\text{min}$. Proteolýza probíhala při pH 2,5 a 0 °C. Štěpné preference jsou normalizovány na výskyt jednotlivých aminokyselin v modelových proteinech (BSA, Mb, 14-3-3, bCA2). V tomto grafu jsou sečteny normalizované aktivity pro jednotlivé modelové proteiny. P1 aminokyselina je vlevo od štěpené peptidové vazby a P1' vpravo od štěpené peptidové vazby.



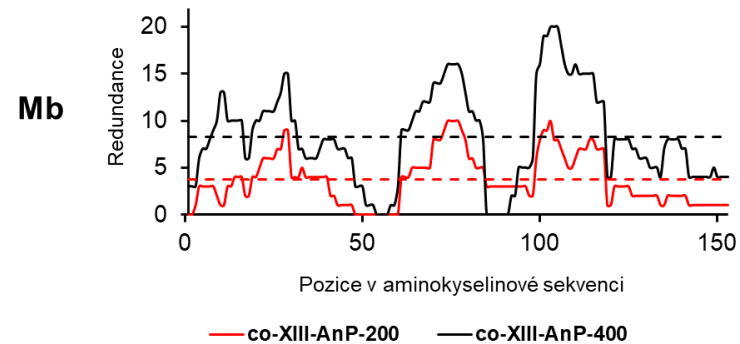
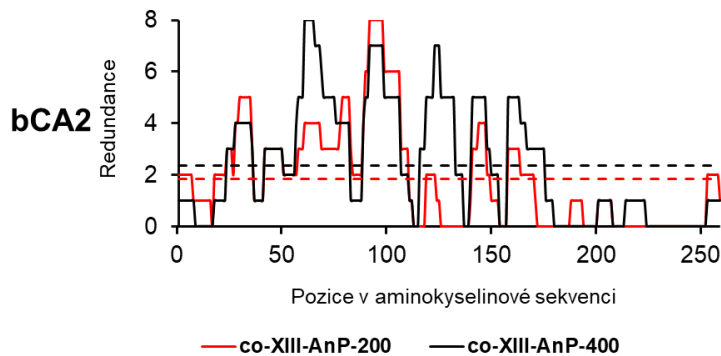
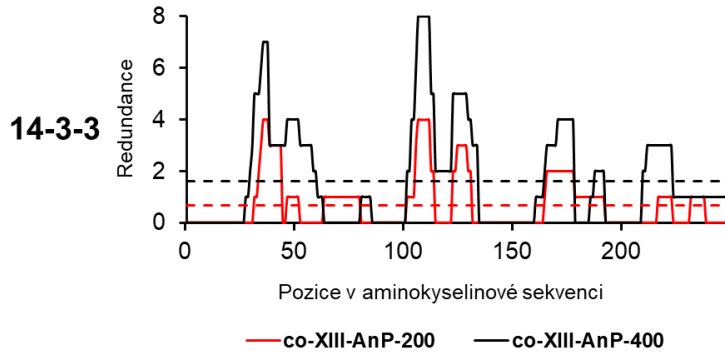
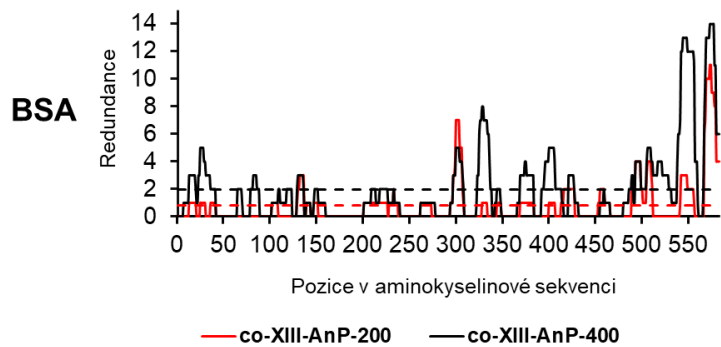
P 12 – Distribuce délek peptidů modelových proteinů (BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin). Barevně jsou odlišeny kombinace imobilizovaných proteas. P: pepsin, co-XIII-AnP: koimobilizovaná proteasa XIII a AnPEP, XIII-AnP, AnP-XIII: sériově zapojené kolony s XIII a AnPEPem v příslušném pořadí. Čísla za jednotlivými proteasami odpovídají průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C.



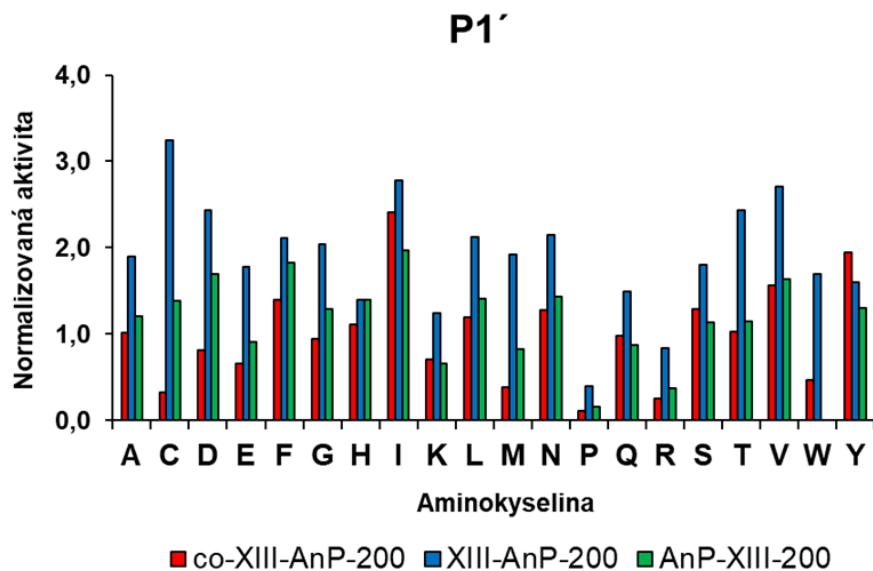
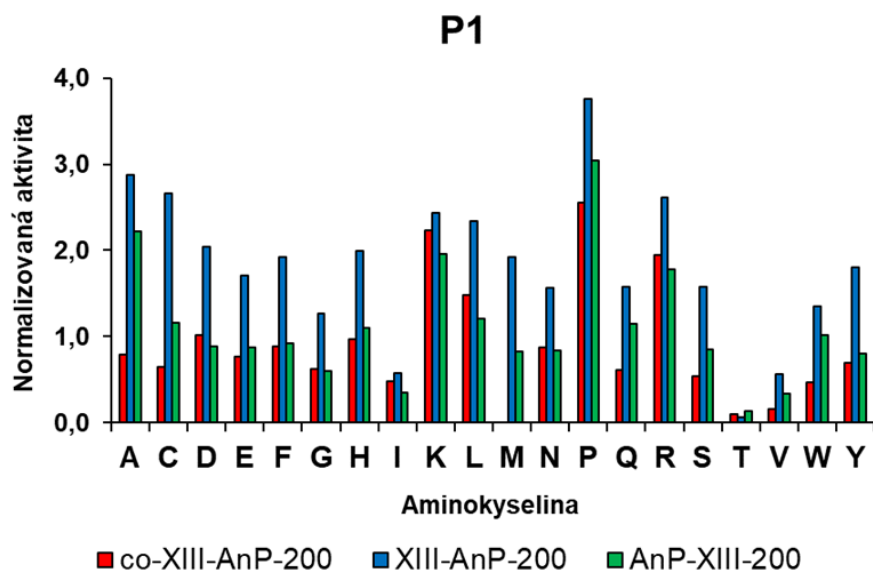
P 13 – Distribuce délek peptidů modelových proteinů (BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin). Srovnání štěpení pomocí AnPEPu koimobilizovaného s XIII při průtoku 200 a 400 $\mu\text{l}/\text{min}$. Proteolýza probíhala při pH 2,5 a 0 $^{\circ}\text{C}$.



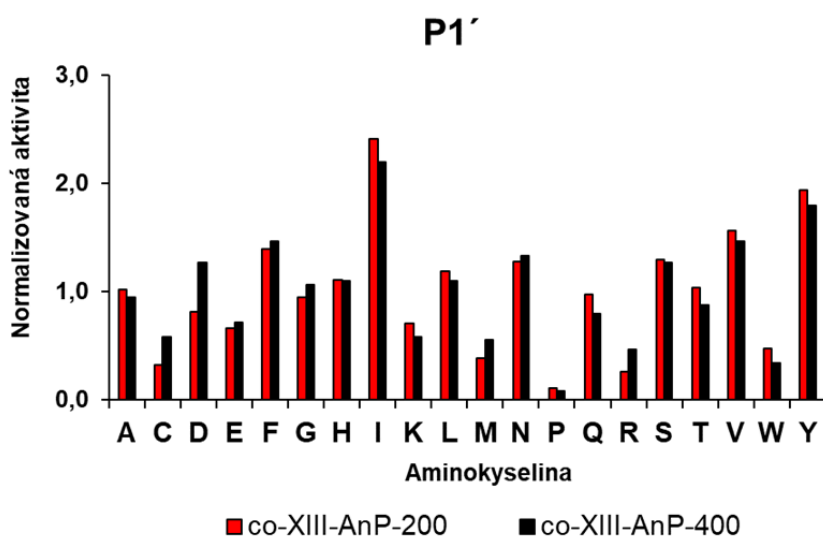
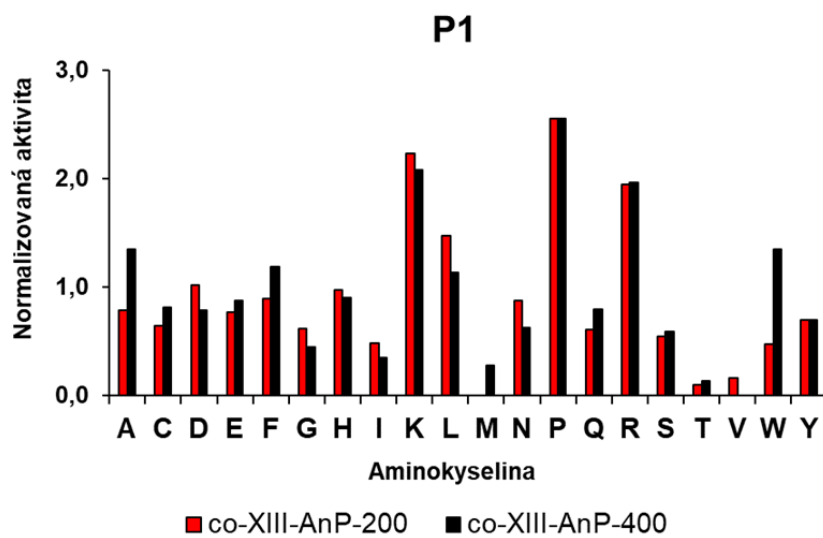
P 14 – Distribuce redundance u modelových proteinů (BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin). Byly štěpeny těmito kombinacemi proteasových kolon – co-XIII-AnP: koimobilizovaná XIII a AnPEP, XIII-AnP, AnP-XIII: sériově zapojené kolony s proteasou XIII a AnPEPem v příslušném pořadí Číslo za jednotlivými kolonami označují průtokové rychlosti v $\mu\text{l}/\text{min}$. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C. Barevně odlišené čárkované přímky odpovídají průměrné redundanci pro danou kolonu.



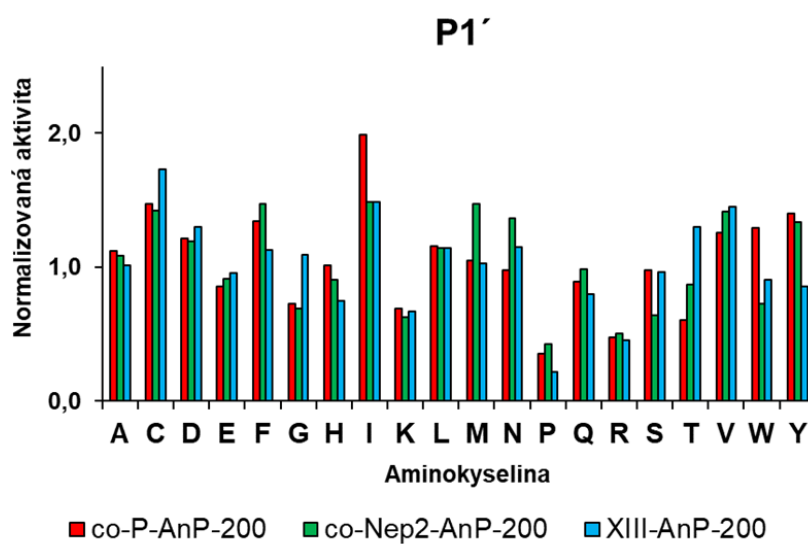
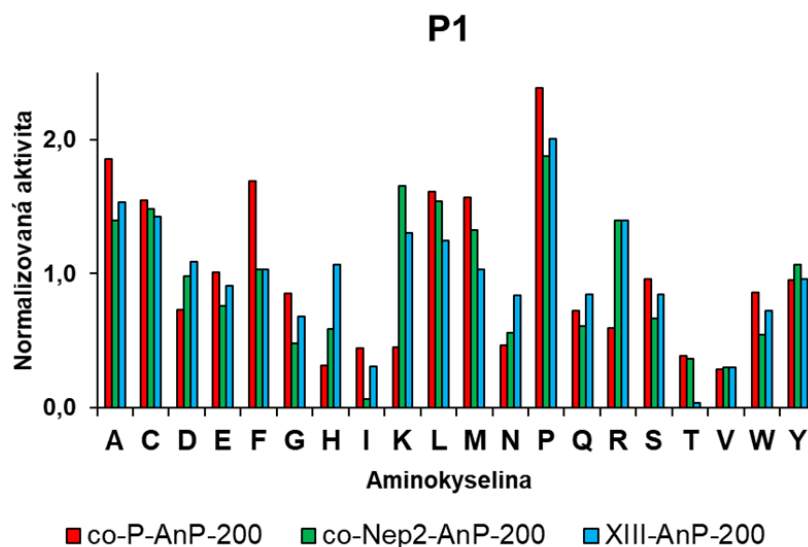
P 15 – Distribuce redundance u modelových proteinů (BSA, 14-3-3, bCA2 a myoglobin). Byly štěpeny XIII koimobilizovanou s AnPEP. Čísla za pomlčkou označují průtokové rychlosti v $\mu\text{l}/\text{min}$. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C. Barevně odlišené čárkované přímky odpovídají průměrné redundanci pro danou kolonu.



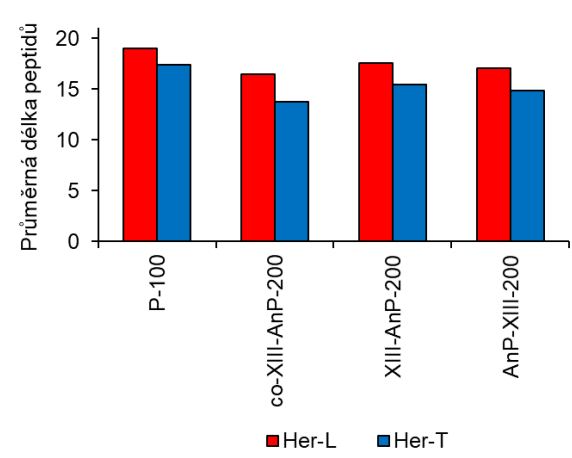
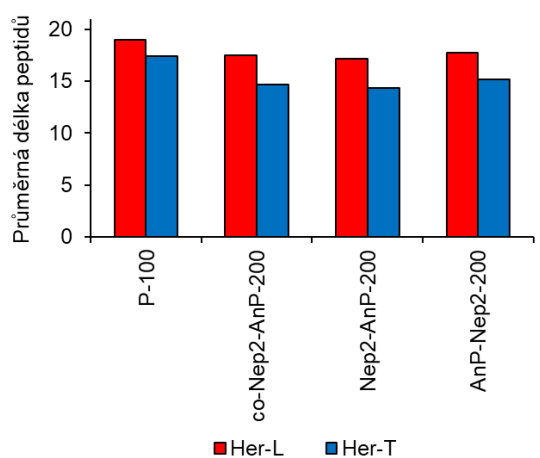
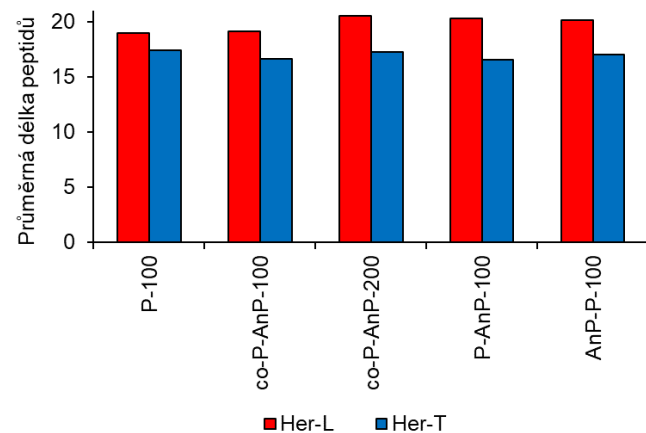
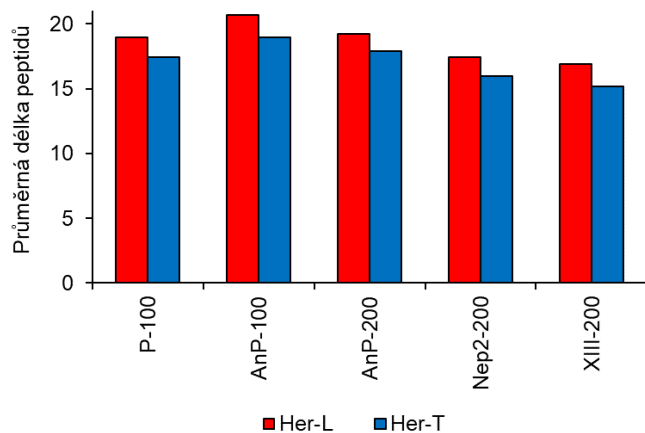
P 16 – Štěpné preference kombinací imobilizované proteasy XIII a AnPEPu. co-XIII-AnP: koimobilizovaná proteasa typu XIII a AnPEP, XIII-AnP, AnP-XIII: sériově zapojené kolony s XIII a AnPEPem v příslušném pořadí Číslo za pomlčkou označuje průtokové rychlosti kolonami v $\mu\text{l}/\text{min}$. Proteolýza probíhala při pH 2,5 a 0 °C. Štěpné preference jsou normalizovány na výskyt jednotlivých aminokyselin v modelových proteinech (BSA, Mb, 14-3-3, bCA2). V tomto grafu jsou sečteny normalizované aktivity pro jednotlivé modelové proteiny. P1 aminokyselina je vlevo od štěpené peptidové vazby a P1' vpravo od štěpené peptidové vazby.



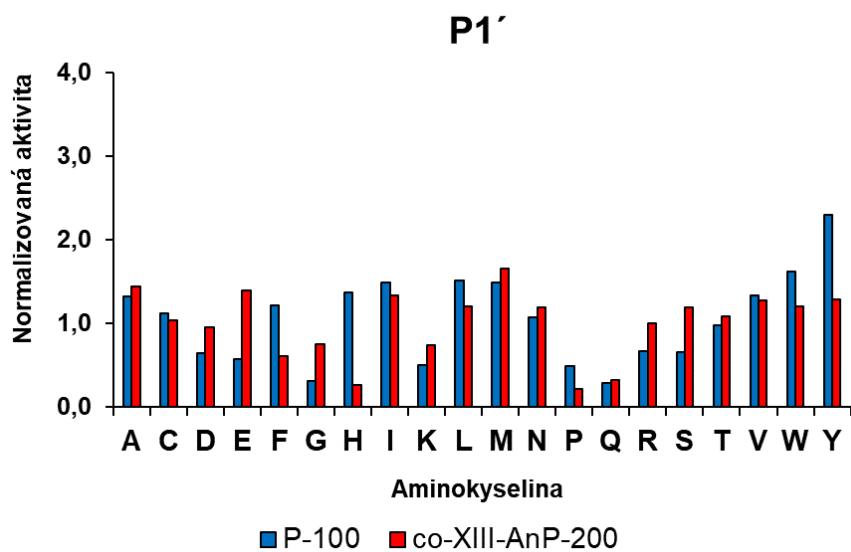
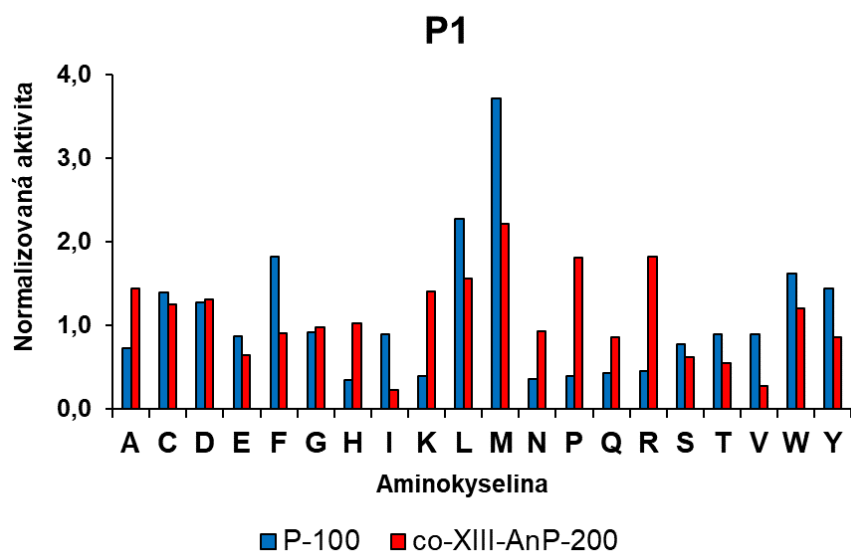
P 17 – Štěpné preference AnPEPu koimobilizovaného s proteasou typu XIII. Čísla za pomlčkou označují průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Proteolýza probíhala při pH 2,5 a 0 °C. Štěpné preference jsou normalizovány na výskyt jednotlivých aminokyselin v modelových proteinech (BSA, Mb, 14-3-3, bCA2). V tomto grafu jsou sečteny normalizované aktivity pro jednotlivé modelové proteiny. P1 aminokyselina je vlevo od štěpné peptidové vazby a P1' vpravo od štěpné peptidové vazby.



P 18 – Štěpné preference kombinací imobilizovaných proteas. co-P-AnP: AnPEP koimobilizovaný s pepsinem, co-Nep2-AnP: nepenthesin-2 koimobilizovaný s AnPEPem, XIII-AnP, sériově zapojené kolony s XIII a AnPEPem v příslušném pořadí. Čísla za pomlčkou označují průtokové rychlosti kolonami v $\mu\text{l}/\text{min}$. Proteolýza probíhala při pH 2,5 a 0 °C. Štěpné preference jsou normalizovány na výskyt jednotlivých aminokyselin v modelových proteinech (BSA, Mb, 14-3-3, bCA2). V tomto grafu jsou sečteny normalizované aktivity pro jednotlivé modelové proteiny. P1 aminokyselina je vlevo od štěpené peptidové vazby a P1' vpravo od štěpené peptidové vazby.



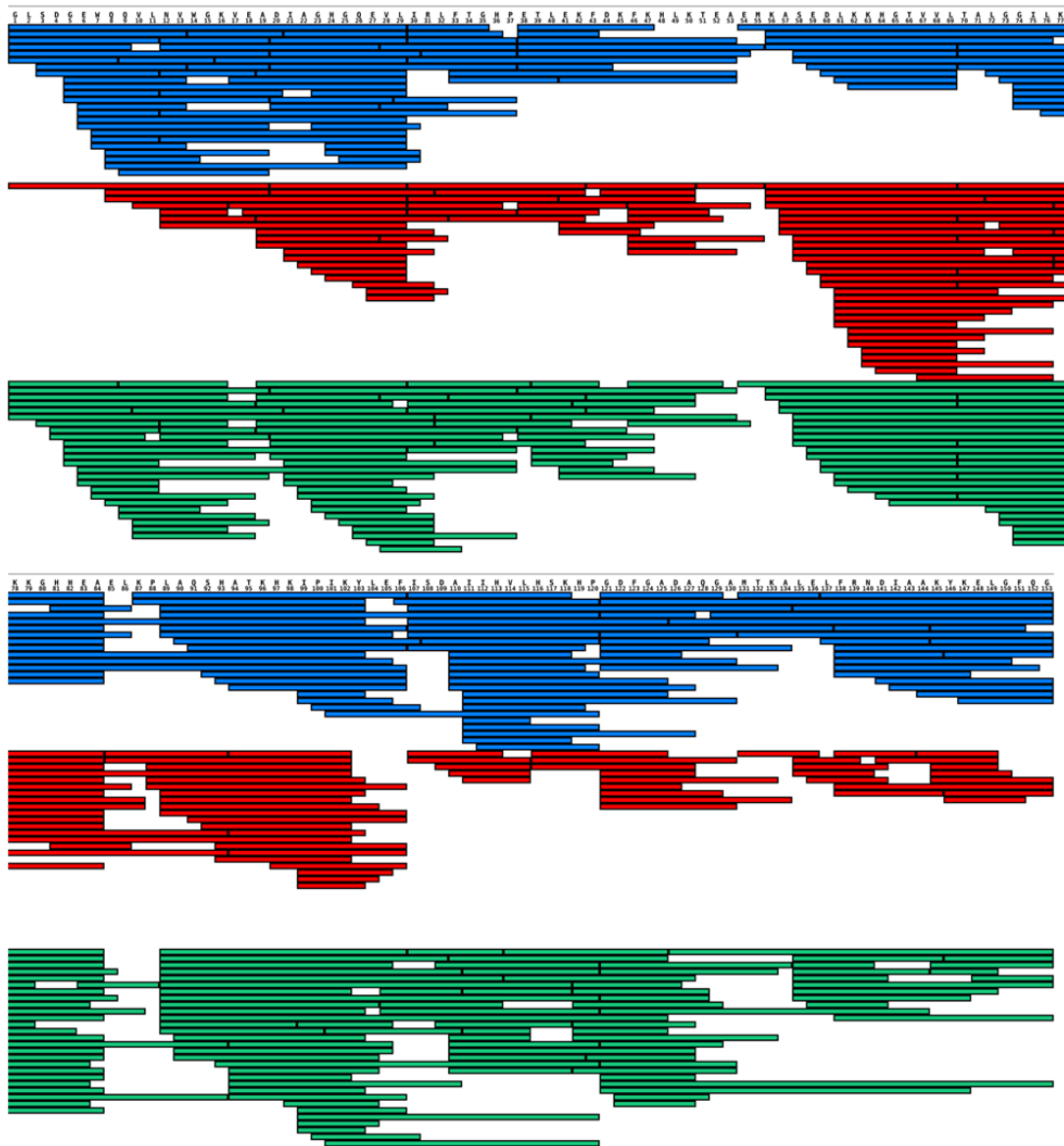
P 19 – Průměrná délka peptidů protilátky Herceptin generovaných pomocí kombinací imobilizovaných proteas. Tento parametr je barevně odlišen pro lehký (Her-L) a těžký (Her-T) řetězec.: P: pepsin, AnP: AnPEP, Nep2: nepenthesin-2, XIII: proteasa typu XIII, co: koimobilizované kolony, dvě proteasy s pomlčkou (např. P-AnP): tandemové zapojení kolon v příslušném pořadí. Čísla za jednotlivými proteasovými kolonami odpovídají průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Štěpení probíhalo při pH 2,5 a 0 °C.



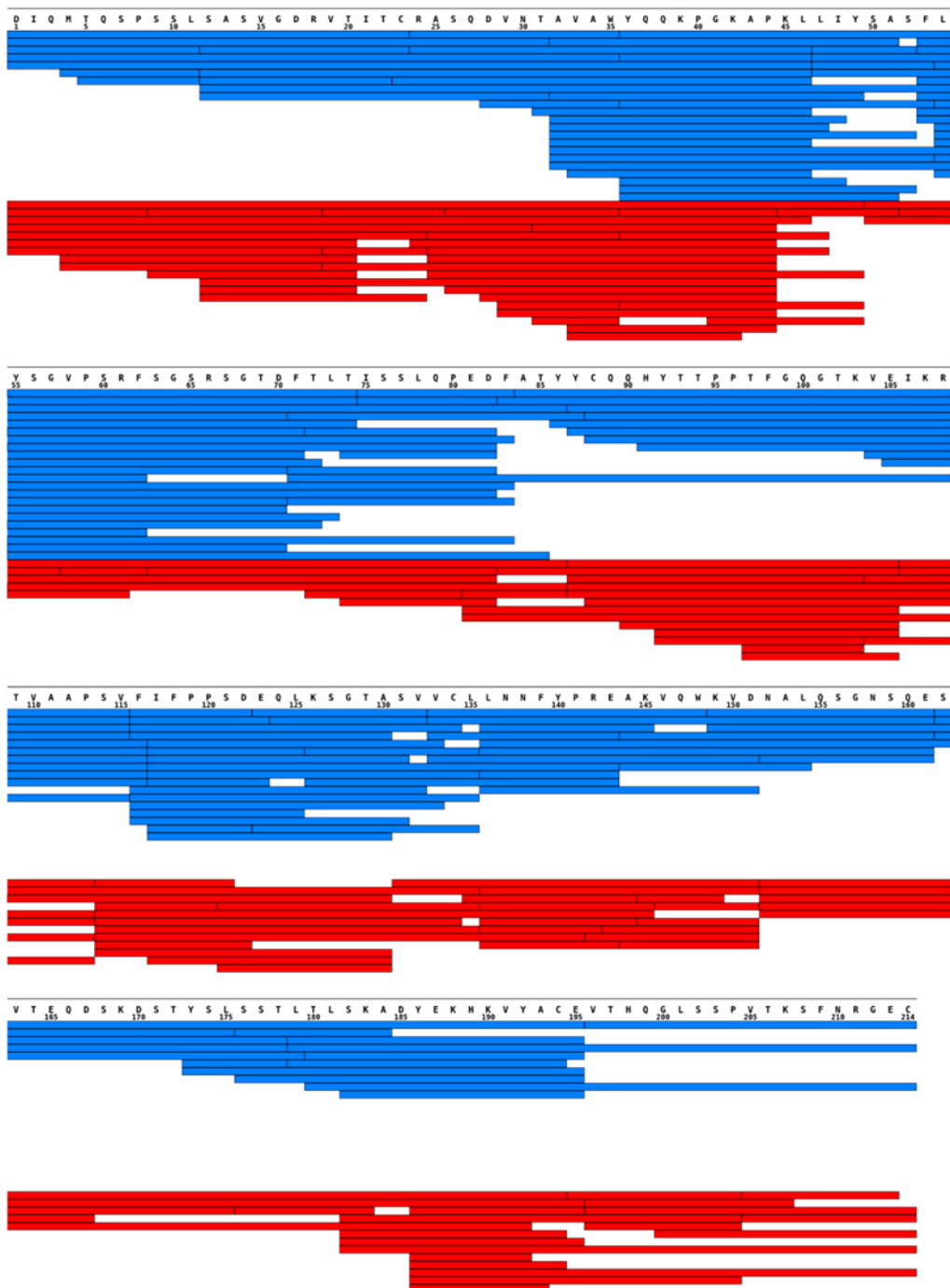
P 20 – Štěpné preference AnPEPu koimobilizovaného s proteasou typu XIII a pepsinové kolony. Čísla za pomlčkou označují průtokové rychlosti proteasovou kolonou v $\mu\text{l}/\text{min}$. Proteolýza probíhala při pH 2,5 a 0 °C. Štěpné preference jsou normalizovány na výskyt jednotlivých aminokyselin v obou řetězcích Herceptinu. V tomto grafu jsou sečteny normalizované aktivity pro oba řetězce. P1 aminokyselina je vlevo od štěpené peptidové vazby a P1' vpravo od štěpené peptidové vazby.



P 21 – Peptidová mapa BSA. Tento protein byl štěpen pomocí imobilizovaných proteas AnPEP, Nep-2, XIII a pepsin. Modrými obdélníky jsou označeny peptidy generované imobilizovaným pepsinem, červenými AnPEPem, zelenými Nep-2 a oranžovými XIII. Svislé čáry mezi obdélníky ukazují zásahová místa proteas. Šedivými obdélníky jsou označena místa, kde použité alternativní proteasy generovaly kratší peptidy než standardně používaný pepsin.



P 22 – Peptidová mapa myoglobinu. Modrými obdélníky jsou zobrazeny peptidy generované pomocí AnPEPu koimobilizovaného s pepsinem při průtoku 200 μ l/min, červeně AnPEPu koimobilizovaného s Nep-2 a zeleně pomocí tandemového zapojení XIII a AnPEPu.



P 23 – Peptidová mapa lehkého řetězce Herceptinu. Modré obdélníky reprezentují peptidy generované pomocí pepsinové kolony při průtoku 100 μl/min a červeně pomocí AnPEPu koimobilizovaného s XIII při průtoku 200 μl/min.