

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vývoj nových tyrosin vázajících sond pro strukturní charakterizaci proteinů

The development of new tyrosin binding cross-linkers for structural  
characterization of proteins

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Michael Karpíšek

Vedoucí práce: Mgr. Zdeněk Kukačka, Ph.D.

Praha 2022

## **Prohlášení**

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

V Praze dne 26.8.2022

Podpis:

## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu práce Mgr. Zdeňku Kukačkovi Ph.D. za jeho milé přijetí, cenné rady, ochotu a trpělivost. Také bych chtěl poděkovat kolektivu laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace za přátelskou atmosféru a v neposlední řadě děkuji své úžasné ženě, psovi a rodině za podporu a pomoc v těžkých až krizových chvílích, které jsem zažil nejen během psaní této práce, ale během bakalářského studia vůbec.

## **Abstrakt**

Proteiny jsou základními stavebními kameny živých organismů. Jejich funkce je determinována jejich strukturou, a proto jejímu studiu je věnováno mnoho energie a pozornosti. Jednou z technik, která se při studiu struktury proteinů a biomolekul obecně používá, je technika chemického zesílení ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Ačkoli bylo již vyvinuto mnoho činidel, většina z nich selektivně váže jen několik aminokyselin, jako jsou lysin, cystein, či kyseliny asparagová a glutamová. V naší práci jsme se zaměřili na vývoj činidel kovalentního značení, které by mohly vázat na tyrosin. Na modelových proteinech byl studován vliv činidel obsahující ve své struktuře ester *N*-hydroxysukcinimidu či imidazol a to při různých pH přístupy shora dolů (top down) a zdola nahoru (bottom up). Získaná data naznačují, že studovaná činidla mají různou reaktivitu i specifitu. Činidla obsahující imidazolovou skupinu tyrosin modifikovala více, nicméně rozdíly byly malé a vazba na tyrosin nebyla selektivní.

## **Klíčová slova**

proteiny, kovalentní značení, síťovací činidla, hmotnostní spektrometrie

## **Abstract**

Proteins are cornerstones of all living organisms. A lot of energy is invested in studying structures of proteins, because their function is determined by their structure. One of the techniques used to access the structure of proteins is chemical cross-linking in combination with mass spectrometry. In spite of their number, most of the cross-linkers bind few aminoacids such as lysine, cysteine or glutamic and aspartic acid. In our work we tried to develop tyrosin-binding cross-linkers. Using top down and bottom up approaches we studied the influence of *N*-hydroxysuccinimide esters and imidazole on the reactivity of the cross-linker in different pH on model proteins. According to the acquired data there is a difference in overall reactivity and specificity between the used cross-linkers. The cross-linkers containing imidazole modified tyrosine more although the difference was small and binding of tyrosine was not selective.

[IN CZECH]

## **Keywords**

proteins, covalent labeling, cross-linking reagents, mass spectrometry

## Obsah

1	Teoretický úvod.....	9
1.1	Strukturní biologie.....	9
1.2	Síťovací činidla.....	9
1.2.1	Činidla reagující s primárními aminoskupinami.....	10
1.2.2	Činidla reagující s thiolovými skupinami.....	13
1.2.3	Fotoreaktivní síťovací činidla.....	14
1.2.4	Ostatní.....	15
1.3	Hmotnostní spektrometrie.....	16
1.3.1	Ionizace biomolekul.....	17
1.3.2	Hmotnostní analyzátor.....	20
1.3.3	Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	25
1.3.4	Přístupy k analýze produktů síťovací reakce.....	28
2	Materiál.....	30
2.1	Chemikálie.....	30
2.2	Biologický materiál.....	31
2.3	Seznam přístrojů.....	32
2.4	Seznam roztoků.....	33
3	Metody.....	34
3.1	Přístup shora dolů.....	34
3.2	Přístup zdola nahoru.....	35
3.3	Export dat.....	36
3.4	Výpočet povrchu dostupného rozpouštědla.....	37
4	Výsledky.....	38
4.1.1	NHS-Ac.....	39

4.1.2	IA .....	43
4.1.3	DSBU .....	48
4.1.4	DIBU .....	54
4.2	Přístup zdola nahoru .....	60
4.2.1	Monolinky .....	60
4.2.2	Intra- a interpeptidová spojení .....	64
5	Diskuze .....	67
6	Závěr .....	76
7	Seznam použitých informačních zdrojů .....	77

## Seznam zkratek

ACN	acetonitril
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
CID	kolizně indukovaná disociace (z angl. collision-induced dissociation)
CXMS	chemické zesílení v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (z angl. desorption/ionization)
DIBU	dimyldibutyryát močovina (z angl. diimidyl dibutyric urea)
DMSO	dimethyl sulfoxid
DSBU	disukcinimidyl-dibutyryát močovina (z angl. disuccinimidyl dibutyric urea)
ECD	disociace záchytem elektronu (z angl. electron capture dissociation)
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (z angl. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)
ESI	Ionizace elektrosprejem (z ang. electrospray ionization)
ETD	disociace přenosem elektronu (z angl. electron transfer dissociation)
FTICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (z angl. Fourier transform-ion cyclotron resonance)
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonová kyselina chemical cross-linking mass spectrometry)
βInsulin	beta oxidovaný řetězec insulinu
IA	1-acetyl imidazol
IR	infračervené (záření) (z angl. infrared)
IRMPD	infračervená multifotonová disociace (z angl. infrared multiphoton dissociation)
LC-MS	hmotnostní spektrometrie spojená s kapalinovou chromatografií (z angl. liquid chromatography-mass spectrometry)

m/z	poměr hmotnosti ku náboji
MALDI	ionizace za přítomnosti matrice (z angl. matrix-assisted laser
mgf	formát výstupního souboru z programu MASCOT (z angl. mascot generic file)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NHS-Ac	<i>N</i> -sukcinimidyl acetát
NMR	nukleární magnetická rezonance
SASA	povrch přístupný rozpouštědlu (z angl. solvent accessible surface area)
TFA	trifluoroctová kyselina
TOF	analyzátor doby letu (z angl. time of flight)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialové záření (z angl. ultraviolet)
UVPD	ultrafialová fotodisociace (z angl. ultraviolet photodissociation)

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Strukturní biologie

Strukturní biologie je dynamicky se rozvíjející obor, který se zabývá studiem molekulárních struktur biomolekul a jejich komplexů. Vzhledem k tomu, že se tato práce zabývá proteiny, bude i následující část textu pojednávat o strukturní biologii proteinů.

Ke zjištění trojrozměrné struktury proteinů existuje několik tzv. technik s vysokým rozlišením, které jsou schopny určit pozici jednotlivých atomů v molekule. Mezi tyto techniky se řadí například nukleární magnetická rezonance (NMR), rentgenová krystalografie<sup>1,2</sup> či kryoelektronová mikroskopie.<sup>3</sup> Tyto techniky mají ale svá úskalí, mezi které patří velká spotřeba vzorku o vysoké koncentraci, hmotnostní limit či nutnost krystalizace proteinu a řešení fázového problému.<sup>2,4</sup> Interpretace výsledků těchto metod je navíc časově náročná. Vedle těchto náročných technik stojí několik dalších alternativních metod, které sice nejsou schopny určit přesnou polohu atomů, ale mohou přinést informace o dynamice proteinů, o jejich interakcích či o tvaru jejich molekuly.<sup>5-7</sup> Chemické zesílení v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (CXMS) je jednou z nich. Z dat získaných pomocí CXMS lze určit vzdálenosti mezi atomy postranních řetězců aminokyselin modifikovaných síťovacím činidlem.<sup>6,7</sup> Přednostmi CXMS jsou například nízká spotřeba vzorku, možnost pracování za nativních podmínek, žádný hmotnostní limit a rychlost interpretace dat.<sup>4,8-10</sup>

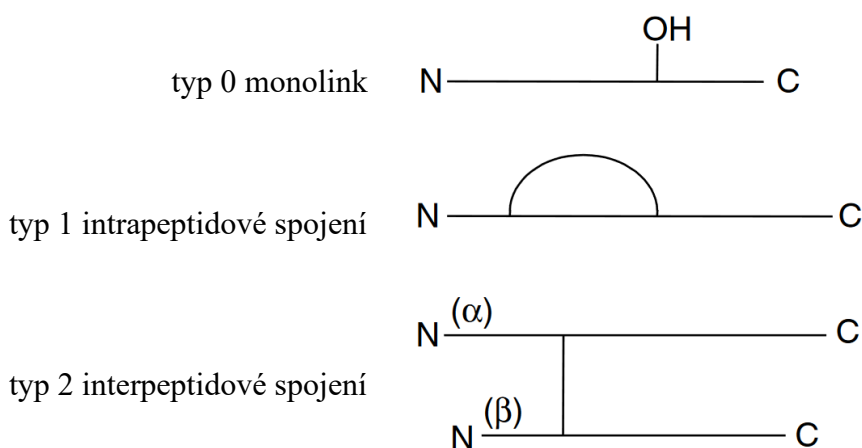
## 1.2 Síťovací činidla

Jako síťovací činidla jsou označovány sloučeniny obsahující dvě (a více) reaktivních skupin, které mohou reagovat s funkčními skupinami aminokyselin za vzniku kovalentních vazeb. Dochází tedy k zesílení (spojení) aminokyselin. Síťovací činidla je možné dělit dle jejich reaktivních skupin, mechanismu reakce nebo podle cílových aminokyselin. Dále mohou být rozlišovány podle toho, zda obsahují stejné reaktivní skupiny – homobifunkční, nebo různé reaktivní skupiny – heterobifunkční.<sup>5,8</sup>

Každé síťovací činidlo tedy obsahuje reaktivní skupiny (dvě a více) a raménko, které tyto skupiny spojuje a určuje délku činidla. Speciální kategorií jsou tzv. činidla na nulovou vzdálenost (z anglického zero length), která toto raménko neobsahují.<sup>9</sup> Činidla využívána ve

strukturní hmotnostní spektrometrii často obsahují uprostřed raménka zvláštní strukturu, která je příčinou tvorby charakteristických fragmentů při analýze pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie, a tak usnadňuje interpretaci dat.<sup>6</sup> Mezi takováto činidla patří například disukcinimidylidibutyrate močovina (DSBU, z anglického disuccinimidyl dibutyric urea) dříve označované jako BuUrBu.<sup>8,11</sup>

Síťovací činidla v principu mohou vytvořit tři typy produktů.<sup>9</sup> Podle ustanovené nomenklatury se jedná o produkt typu 0 také označovaný jako monolink či dead-end cross-link, kdy se síťovací činidlo naváže na postranní řetězec aminokyseliny proteinu jen jednou reaktivní skupinou. Produkt typu 1 známý též jako intrapeptidový cross-link, tedy spojení dvou aminokyselin v rámci jednoho peptidu a produkt typu 2, kdy jsou raménkem činidla spojeny aminokyseliny ze dvou peptidů (obr. 1).



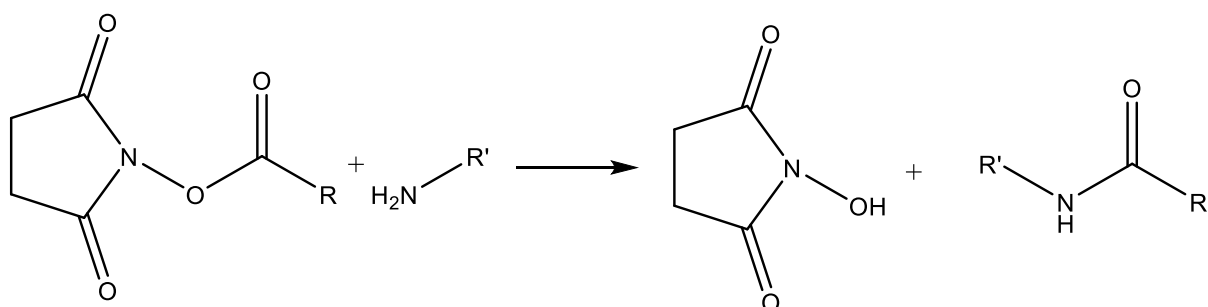
Obr. 1 Typy produktů reakce s bifunkčním činidlem.<sup>9</sup>

### 1.2.1 Činidla reagující s primárními aminoskupinami

Nejčastěji využívanými síťovacími činidly jsou činidla reagující s primárními aminoskupinami, tedy N-terminální aminoskupinou anebo s aminoskupinami v postranním řetězci lysinu.<sup>4,5,8</sup> To lze připsat jednak k faktu, že lysiny se většinou nalézají na povrchu molekuly a pak jejich četnosti výskytu v přírodě (kolem 6 %<sup>6,12</sup>). Dle struktury lze tato síťovací činidla dále dělit.

## Estery *N*-hydroxysukcinimidu

Jako estery *N*-hydroxysukcinimidu (NHS estery) se označují síťovací činidla obsahující jako reaktivní (odstupující) skupinu *N*-hydroxysukcinimid, který je ke zbytku činidla vázaný esterovou vazbou. NHS estery jsou často nerozpustné ve vodě – jako rozpouštědlo se používá dimethyl sulfoxid (DMSO). Navázáním sulfoskupiny na *N*-hydroxysukcinimid lze ale jejich rozpustnost ve vodě zvýšit, aniž by to ovlivnilo reaktivitu činidla.<sup>9</sup> NHS estery reagují s *N*-koncem peptidu a  $\epsilon$ -aminoskupinou lysinu, se kterými tvoří stabilní produkty (obr. 2). Nicméně změnou pH lze měnit složení produktů. Při vyšším pH (8,0) je  $\epsilon$ -aminoskupina lysinu reaktivnější než při pH nižším (7,0) – reakcí NHS esteru s aminoskupinou tedy dojde k acylaci této aminoskupiny.<sup>13</sup> Jako vedlejší produkt mohou proběhnout reakce s dalšími nukleofilními skupinami<sup>10</sup> (jako thiolová skupina cysteinu, nebo hydroxyskupina serinu a threoninu). Nicméně produkty těchto reakcí podléhají rychlé hydrolyze.<sup>9</sup> Při nižším pH jsou také pozorovány produkty reakce s tyrosiny.<sup>10,13,14</sup>



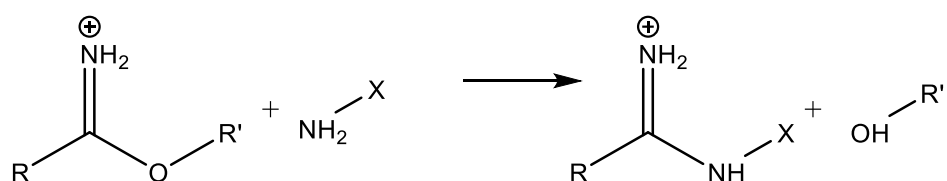
Obr. 2 Reakce primární aminoskupiny s činidlem obsahujícím NHS ester jako reaktivní skupinu.

Pokud je pH neutrální, jsou NHS estery stabilní několik hodin – se zvyšujícím se pH roste i rychlost jejich hydrolyzy.<sup>9</sup> Podmínkou práce s těmito činidly je absence jiné primární aminoskupiny, která by mohla pocházet například z pufru například tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris).

## Imidoestery

Síťovací činidla obsahující karboximidátovou skupinu jsou velmi specifické k primárním aminoskupinám, s jinými nukleofilními skupinami reagují minimálně. Tato činidla jsou

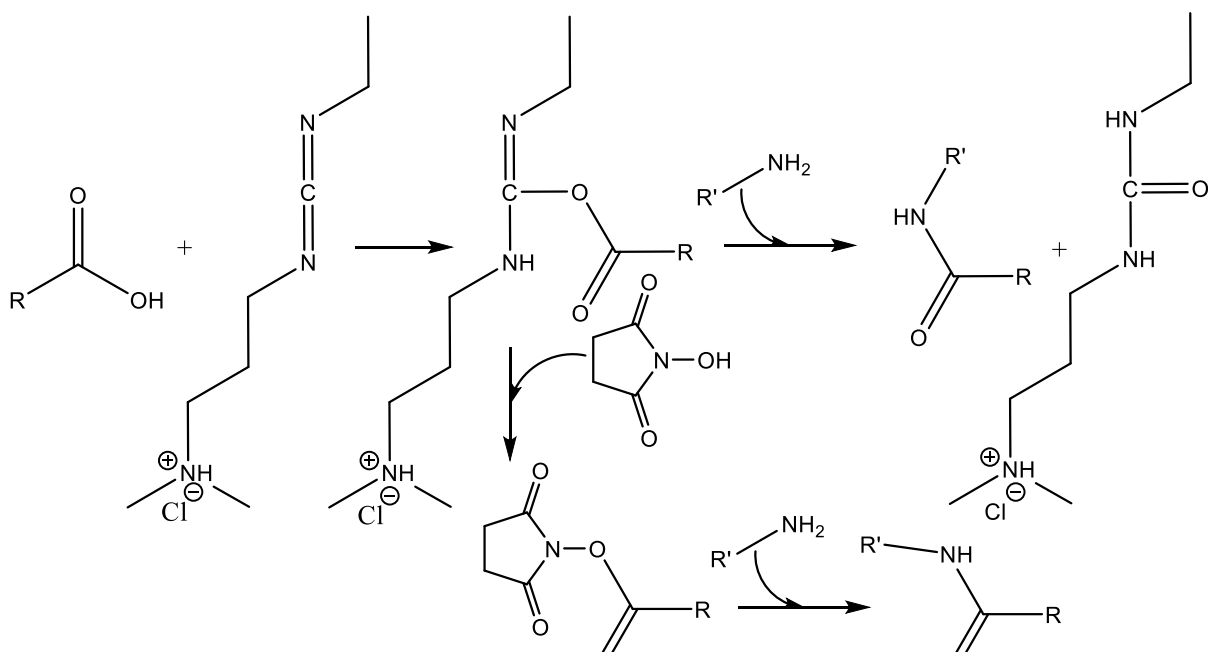
ve vodě rozpustná, pH optimum reakce imidoesterů je mezi 8,0 – 9,0. Při takto vysokých hodnotách pH nicméně také dochází k hydrolyze činidla (činidlo vydrží v roztoku kolem 30 minut). Produkt reakce obsahuje nabitou imidátovou skupinu (obr. 3), která si udržuje (kladný) náboj i při fyziologickém pH – tato vlastnost imidoesterů je pokládána za jejich velkou výhodu, protože postranní řetězec lysinu po reakci se síťovacím činidlem o pozitivní náboj přichází, což může způsobit problémy při modelaci trojrozměrné struktury proteinu.<sup>9</sup>



Obr. 3 Reakce primární aminoskupiny s imidoesterem.

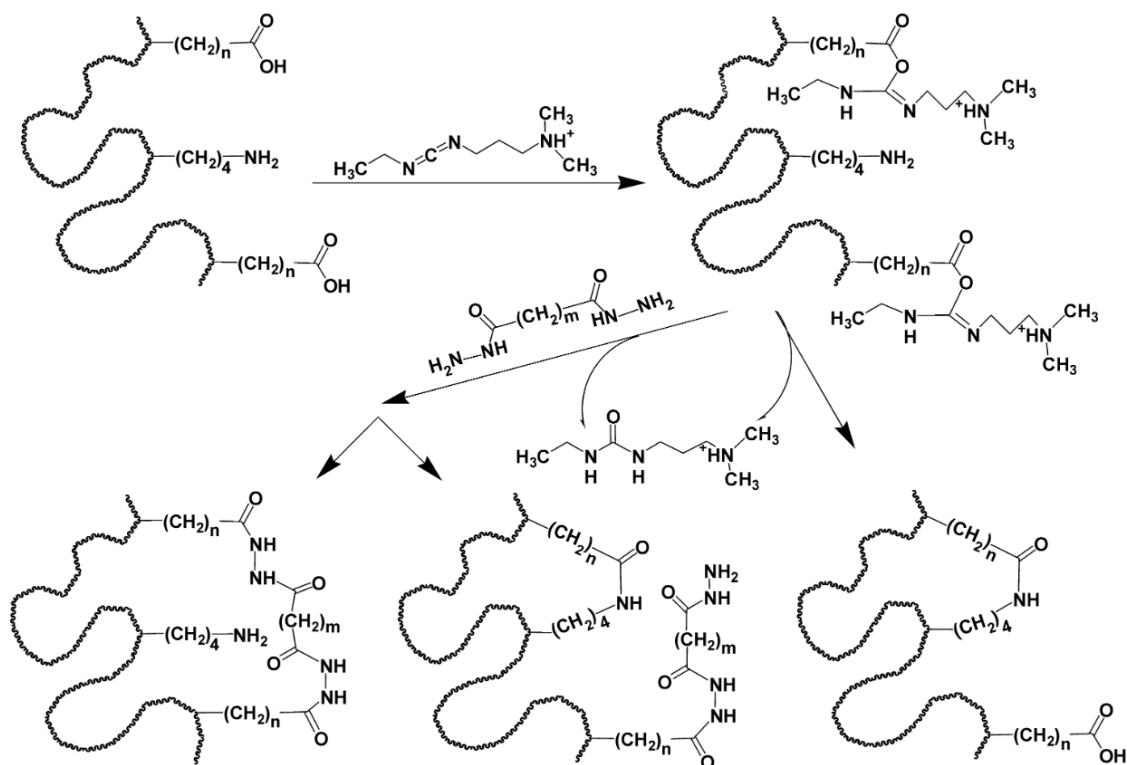
### Karbodiimidy

Tato činidla se používají k zesítní karboxyskupiny s aminoskupinou. pH optimum této reakce je mezi 4,5 – 7,5. Produktem reakce je amid karboxylové kyseliny (obr. 4 a 5). V tomto specifickém případě síťovací činidlo není součástí vzniklého produktu a jedná se



Obr. 4 Mechanismus reakce karboxyskupiny s EDC.

tedy o činidlo nulové vzdálenosti. Při provádění této reakce se může do reakční směsi přidat i NHS ester, který reakci usnadňuje. Karbodiimidy se rovněž používají k aktivaci karboxylových kyselin, které následně mohou reagovat s dihydrazidy.<sup>9,15,16</sup>

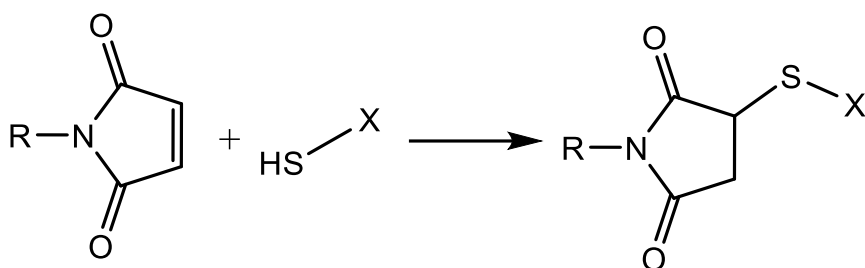


Obr. 5 Schéma vzniku možných produktů při sítěni kyselých residuí pomocí EDC.<sup>15</sup>

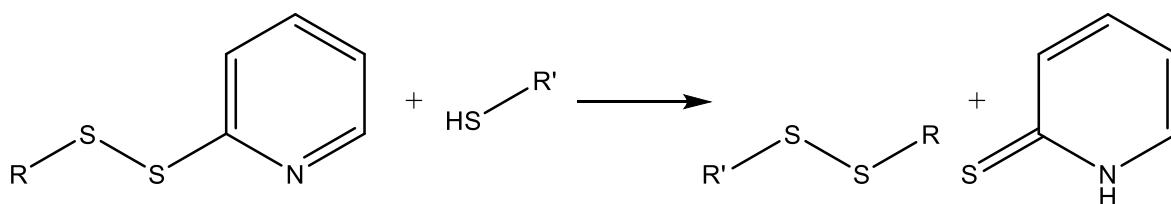
## 1.2.2 Činidla reagující s thiolovými skupinami

### Maleimidy a disulfidy pyridinu

Maleimidy obsahují dvojnou vazbu, na kterou se aduje thiolová skupina cysteinu (obr. 6). Tato reakce je ireverzibilní. Reakce se provádí v rozmezí pH hodnot od 6,5 do 7,5 – při vyšších pH (8,5 a více) může docházet k reakci s primárními aminy, nebo k hydrolyze maleimidu na amid kyseliny maleinové, který není reaktivní. Naproti tomu disulfidy pyridinu obsahují disulfidickou vazbu. Při reakci s thiolovou skupinou cysteinu dojde k výměně atomu síry z molekuly činidla za atom síry pocházející z cysteinu (obr. 7). Tuto reakci lze provádět při fyziologickém pH, nicméně rychleji probíhá v pH v kyselé oblasti.<sup>9</sup>



Obr. 6 Adice thiolové skupiny na maleimid.



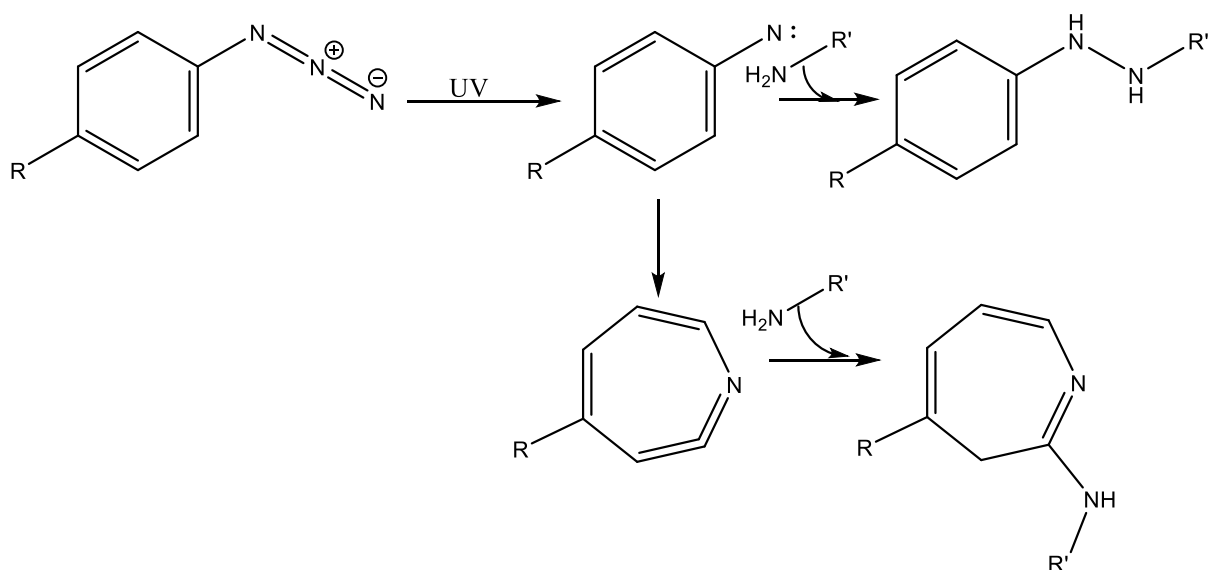
Obr. 7 Reakce thiolové skupiny s disulfidem pyridinu

### 1.2.3 Fotoreaktivní síťovací činidla

Fotoreaktivní síťovací činidla jsou nespecifická činidla, která se aktivují, pokud na ně dopadá světlo vhodné vlnové délky (většinou v UV oblasti). Po ozáření těchto činidel dochází k fotolýze skupiny citlivé na použitou vlnovou délku za vzniku reaktivního intermediátu, který dále reaguje s funkčními skupinami přítomných proteinů.<sup>9</sup> Tato činidla se mohou používat *in vivo* i *in vitro*.<sup>17</sup>

#### Aryl azidy

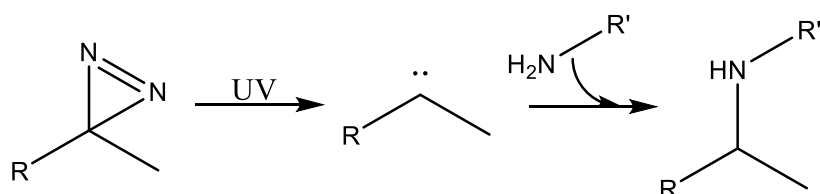
Aryl azidy jsou činidla citlivá na UV záření v oblasti kolem 250 nm. Po jejich ozáření dochází k fotolýze azidové skupiny za vzniku nitrenové skupiny, která se dále může adovat na dvojnou vazbu v molekulách, nebo může dojít k inzerci do vazby C-H a N-H.<sup>18</sup> Také může dojít k přeskupení reaktivního intermediátu na větší zacyklenou sloučeninu, která dále reaguje s nukleofily přítomnými v roztoku, jakými mohou být např. primární aminy (obr. 8).<sup>9,17,19,20</sup>



Obr. 8 Možné reakce reaktivního intermediátu aryl azidu.

### Diaziriny

Při ozáření těchto molekul zářením o vlnové délce kolem 350 nm dochází k fotolýze za vzniku molekuly dusíku a karbenové funkční skupiny. Tato skupina je velmi reaktivní a reaguje s okolními molekulami za vzniku kovalentních vazeb (obr. 9).<sup>17-20</sup>



Obr. 9 Reakční schéma diaziru.

### 1.2.4 Ostatní

Kromě výše popsaných síťovacích činidel existuje celá řada činidel dalších, které mohou reagovat například s karboxylovými kyselinami či argininy.<sup>21,22</sup> Je třeba také zmínit, že existuje celá řada izotopově značených činidel<sup>23,24</sup> či sond s dalšími reaktivními skupinami, které lze využít pro purifikaci produktů reakce či k tvorbě specifických fragmentů (tzv. PIR cross-linkery).<sup>25,26</sup> Jejich úplný soupis ovšem nebyl cílem této práce.

### 1.3 Hmotnostní spektrometrie

Síťovací činidla, respektive chemické zesílení jako takové, je známo již od 60. let minulého století, nicméně až v kombinaci s hmotnostní spektrometrií se stalo metodou, díky které lze získat relevantní informace o vzdálenostech aminokyselin, které chemicky reagovaly se síťovacím činidlem, potažmo tedy o struktuře, dynamice a interakčních sítích proteinů či jejich komplexů.

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, při které se využívá působení elektrické a v některých případech i magnetické síly na pohybující se nabitě částice. Účinek těchto sil obecně závisí na náboji a hmotnosti iontu – výsledná dráha různých částic v elektrickém a magnetickém poli se tedy bude lišit. Působení síly na pohybující se iont v magnetickém a elektrickém poli popisuje Lorentzova rovnice:<sup>27</sup>

$$F = Q(E + v \times B) \quad (1),$$

kde  $Q$  označuje náboj iontu,  $\vec{E}$  potenciál elektrického pole,  $\vec{v}$  rychlost iontu a  $\vec{B}$  magnetickou indukci.

Hmotnostní spektrometr obecně obsahuje několik základních komponent, které jsou společné všem dalším přístrojům bez ohledu na jejich možné modifikace.<sup>28</sup> První z těchto komponent je iontový zdroj, tedy část hmotnostního spektrometru, kde dochází k ionizaci vzorku. Iontový zdroj se může nacházet v prostředí o atmosférickém, nebo sníženém tlaku,<sup>28,29</sup> v závislosti na využívané ionizační technice (např. elektrosprej<sup>30</sup> vs. ionizace nárazem elektronu<sup>31</sup>). Další částí hmotnostního spektrometru je hmotnostní analyzátor, ve kterém dochází k rozdělení iontů dle poměru hmoty ku náboji ( $m/z$ ). Hmotnostní analyzátoři se nacházejí v prostředí o velmi nízkém tlaku, aby nedocházelo ke srážkám ionizovaného analytu s molekulami plynu, a tím ke snížení rozlišení analyzátoru.<sup>28,29</sup> Protože v hmotnostní spektrometrii jsou analyzované látky převedeny na ionty, využívají hmotnostní analyzátoři dle rovnice 1 buďto pouze elektrické síly (kvadrupól,<sup>28,29,32–34</sup> orbitrap<sup>29,35–37</sup>) nebo síly magnetické (magnetický sektorový analyzátor<sup>28,29</sup>) k rozdělení iontů dle  $m/z$ , popřípadě kombinaci obou (ICR<sup>28,29</sup>). Poslední komponentou je detektor iontů, tedy zařízení schopné detekovat poměr  $m/z$  a převést ho na elektrický signál. Často používané detektory jsou násobiče elektronů, které fungují na podobném principu jako

fotonásobiče – detektor je zařízen jako soustava kovových desek, na které je postupně přiváděno vyšší napětí. Dopadem iontu na detektor dojde k uvolnění elektronu z kovové desky a jeho urychlení směrem k další desce. Protože tento elektron byl urychlen rozdílem napětí, z další desky se uvolní více elektronů a tak dále.<sup>28,29</sup> Tyto elektrony jsou přivedeny k zesilovači a dále na převodník, který signál zpracuje. Tento způsob detekce iontů je destruktivní – dochází ke srážce iontu s detektorem a tím k zániku iontu. Nicméně některé druhy hmotnostních analyzátorů (iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR), Orbitrap<sup>29</sup>) využívají nedestruktivní způsob detekce, během kterého pohyb iontů poblíž detektoru indukuje elektrický proud – ten je dále zesílen a převeden na elektrický signál.

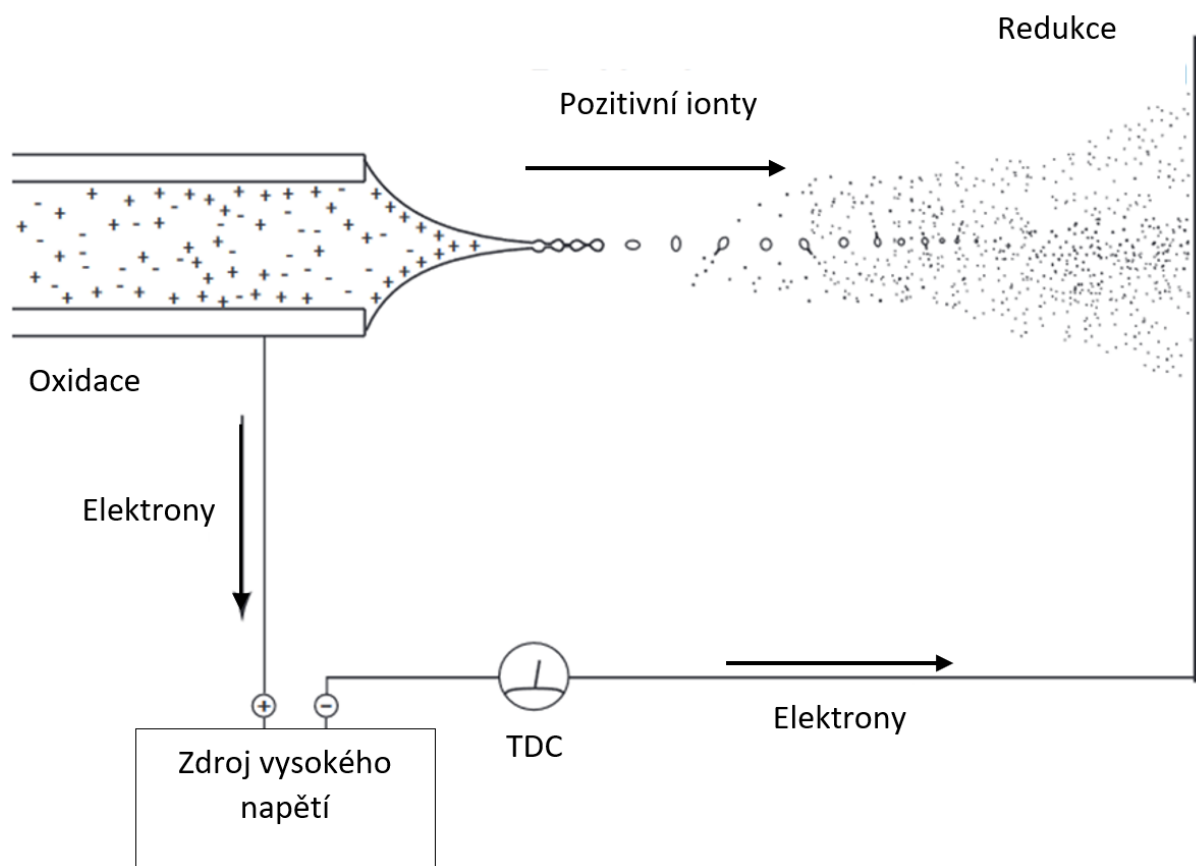
### 1.3.1 Ionizace biomolekul

Aby mohl být vzorek analyzován, je třeba jej ionizovat. Ionizačních technik je nepřeberné množství. Jedna z prvních byla ionizace nárazem elektronu. Při této metodě dochází ke srážkám urychlených elektronů z katody se vzorkem.<sup>28</sup> Pokud elektron nesl energii vyšší než ionizační energie molekuly vzorku, došlo po srážce k odtržení elektronu z molekuly vzorku za vzniku iontu radikálu.<sup>29</sup> Často používaná energie elektronů je asi 70 eV.<sup>29</sup> Tato ionizační metoda je vhodná pro menší organické molekuly, ovšem pro biomolekuly je nevhodná – vystavením vzorku biomolekuly elektronům s takovou energií vede k poškození vzorku a přílišné fragmentaci. Překonání problému ionizace biomolekul, aniž by docházelo k fragmentaci nebo poškození vzorku, přinesly až metody ionizace za přítomnosti matrice (MALDI) a ionizace elektrosprejem (ESI)<sup>30</sup> a jejich následné inovace.<sup>38</sup>

Princip ionizace elektrosprejem spočívá v převedení iontů z roztoku do plynné fáze.<sup>29</sup> Vzorek rozpuštěný v polárním rozpouštědle (např. 50% methanol, 50% acetonitril) je za nízkého toku,  $1 - 20 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ , dávkován do kapiláry, která je udržována na vysokém potenciálu vůči blízké elektrodě.<sup>29,39,40</sup> Působením silného elektrického pole dochází k nabití roztoku vzorku a jeho rozprašování, jehož následkem se vzorek pohybuje dále ve formě nabitého aerosolu (obr. 10).<sup>29,41,42</sup> Aby došlo k efektivnějšímu odpaření rozpouštědla, je proti tomuto aerosolu veden ohřátý inertní plyn<sup>39,40</sup> (sušící plyn, př. N<sub>2</sub>) – případně kapilára, kterou se vzorek pohybuje dále, je vyhřívána (popřípadě kombinace obojího).<sup>29</sup>

Dále jsou ionty zaostřovány pomocí elektrického pole směrem do analyzátoru.<sup>40</sup> Pokud kolem vstupní kapiláry proudí inertní plyn, který napomáhá vzniku aerosolu, je možné nastavit vyšší tok vzorku.<sup>41</sup> V tomto případě tedy elektrické pole zajišťuje nabití rozpuštěného vzorku a plyn proudící kolem plní úlohu rozprašovače.<sup>29</sup> Převedení vzorku do formy nabitého aerosolu se děje za atmosférického tlaku, v ostatních částech spektrometru se tlak postupně snižuje pomocí pump.<sup>41</sup>

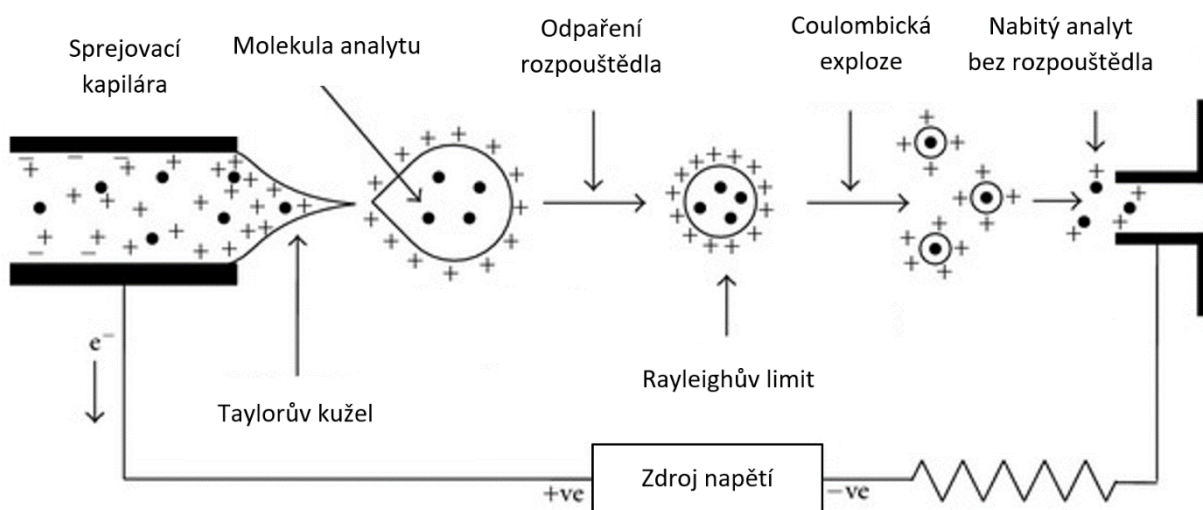
Vzdálenost mezi vstupní kapilárou a okolní elektrodou je v řádu desítek milimetrů a rozdíl potenciálů mezi nimi v řádu jednotek kV.<sup>29</sup> V závislosti na polaritě elektrod lze analyzovat pozitivně nebo negativně nabitě ionty (pozitivní nebo negativní mód). Pokud tedy



Obr. 10 Schéma ionizace elektrosprejem.<sup>42</sup>

kapilára má kladný potenciál, dochází k oxidaci rozpouštědla a aniontů, při záporném potenciálu je tomu naopak.<sup>29,40,43</sup> Na výstupu z kapiláry se kvůli silnému elektrickému poli

vytvoří kapka kuželovitého tvaru (tzv. Taylorův kužel), ve které jsou koncentrovány kladně nebo záporně nabitě molekuly. Vlivem silného elektrického pole dochází k tomu, že z vrcholu tohoto kužele proudí (velmi úzký) roztok s ionty směrem k opačně nabitě elektrodě. Tento proud je dlouhodobě nestabilní a na jeho konci dochází k rozpadu na malé nabitě kapky. Tyto kapky obsahují mnoho stejně nabitých částic, které se vzájemně elektrostatickými silami odpuzují.<sup>29</sup> Odpařováním rozpouštědla se objem kapek zmenšuje, až elektrostatické síly překonají limitní hodnotu povrchového napětí (Rayleighův limit) a část kapky se odštěpí (Coulombická exploze). Tato odštěpená část je jen zlomkem původní hmotnosti kapky, ovšem obsahuje asi 15 % původního náboje – náboj se tedy více koncentruje a po dalším odpaření rozpouštědla se znovu odštěpí část menší kapky.<sup>29</sup> Tento proces se mnohokrát opakuje (obr. 11). Ionty v plynné fázi, které jsou analyzovány, vznikají z těchto malých nabitých kapek. Vznik iontů v plynné fázi popisují dva (hlavní) modely – model odpaření iontu (ion evaporation model, IEM) a model zbytkového náboje (charge residue model, CRM).<sup>29,40–42,44,45</sup>



Obr. 11 Schéma vzniku iontů v plynné fázi pomocí ionizace elektrosprejem.<sup>40</sup>

### 1.3.2 Hmotnostní analyzátor

Po převedení iontů z roztoku do plynné fáze jsou tyto nabitě částice směrovány směrem do hmotnostního analyzátoru, kde dojde k jejich rozdělení dle poměru  $m/z$  fyzikálními metodami. Jak již bylo řečeno výše, různé analyzátory využívají různých vlastností pohybujících se nabitých částic – v rozdílných analyzátorech tedy dochází k jiným rozdělením (s různou přesností).<sup>40</sup>

#### Kvadrupól

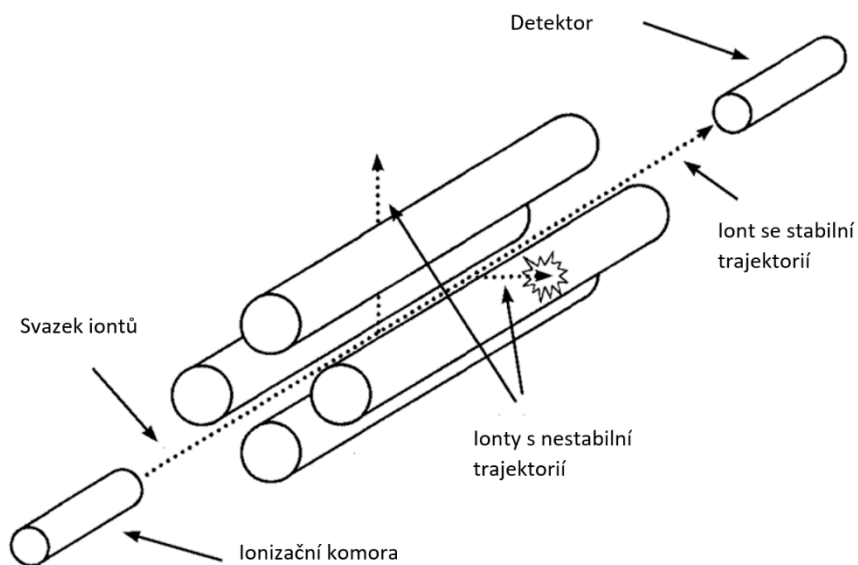
Kvadrupólový analyzátor se skládá ze čtyř tyčí, na které je přivedeno zároveň střídavé ( $V$ ) a stejnosměrné ( $U$ ) napětí tak, že na protilehlé páry je přivedeno vždy stejné napětí.<sup>29</sup>

Celkové napětí na jedné tyči je tedy dáno rovnicí:

$$\varphi = U + V_0 \cos \omega t \quad (2),$$

kde  $U$  je stejnosměrné napětí (kladné nebo záporné),  $V_0$  amplituda střídavého napětí,  $\omega$  úhlová rychlost a  $t$  čas.<sup>32</sup>

Mezi těmito tyčemi vzniká elektrické pole, které na ionty působí – ionty jsou přitahovány k tyčím, na kterých je napětí opačného znaménka, než mají samy. Protože je zapojeno i střídavé napětí, tyče v průběhu času mění znaménko napětí a ionty oscilují mezi nimi. Změnou přivedeného napětí a amplitudy se mění i elektrické pole a tím se mění i trajektorie iontů v tomto poli (ionty o různém poměru  $m/z$  mají různou trajektorii a různě oscilují) – nastavením vhodného napětí lze docílit toho, že jen ionty o vybraném poměru  $m/z$  kvadrupólem projdou na detektor, kdežto jiné ne (obr. 12). Kvadrupólový analyzátor slouží jako „hmotnostní filtr“ a postupným „skenováním“ vzorku lze postupně detekovat všechny  $m/z$  obsažené ve vzorku.<sup>28,29,32,47</sup>



Obr. 12 Schéma kvadrupólového hmotnostního analyzátoru<sup>46</sup>

Možnosti kvadrupólu rychle měnit hodnotu napětí  $U$  a amplitudy  $V_0$  a tím i určit, které poměry  $m/z$  budou mít stabilní trajektorii, se využívá v dalších aplikacích tohoto hmotnostního analyzátoru. Pokud snížíme hodnotu napětí  $U$  na nulu, bude na tyče přivedeno jen střídavé napětí s amplitudou  $V_0$  (radiofrekvenční mód). V tomto uspořádání již kvadrupól není schopen filtrovat jen úzké hodnoty poměru  $m/z$ , ale funguje spíše jako „vodič“ iontů.<sup>29,32</sup> Tato vlastnost je využívána při ionizaci za atmosférického tlaku – po ionizaci jsou ionty převedeny pomocí kvadrupólu do dalších částí hmotnostního spektrometru, kde je tlak snížený.<sup>29</sup> Protože na neutrální molekuly elektrické pole tvořené kvadrupólem nefunguje, mohou být odčerpávány pomocí pump pryč. Vzniklé ionty jsou drženy v elektrickém poli a vedeny dále. Ionty v této situaci ztrácejí kinetickou energii srážkami s neutrálními molekulami a postupně se dostávají směrem ke středu kvadrupólu (collisional cooling, collisional focusing) – svazek iontů je při výstupu více zaostřen. Tento efekt nastává, pokud vstupující ionty nemají příliš vysokou kinetickou energii. Při vysokých kinetických energiích dochází k fragmentaci a ztrátám iontů.<sup>29,47</sup>

Modifikacemi kvadrupólu lze dospět k lineární iontové pasti (z angl. linear ion trap, LIT),<sup>29,48</sup> iontové pasti s třídímenzionálním elektrickým polem (QIT z anglického quadrupole ion trap),<sup>29,34,49,50</sup> hexapólu a oktapólu. Sériové zapojení kvadrupólu (a oktapólu

nebo hexapólu) v různých režimech vede k QqQ (tedy zapojení tří kvadrupólů za sebou) kombinaci atd.<sup>29,32</sup>

### **Magnetický sektorový analyzátor**

Magnetický sektorový analyzátor využívá působení magnetické síly na pohybující se ionty, což zakřivuje jejich dráhu. Pokud ionty vletí do magnetického pole, jehož vektor magnetické indukce je kolmý na směr pohybu iontů, poloměr zakřivené dráhy bude roven:

$$r = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{2m \cdot U}{ez}} \quad (2).$$

$r$  značí poloměr dráhy iontu,  $B$  magnetickou indukci,  $m$  hmotnost iontu,  $U$  použité napětí,  $e$  elementární náboj a  $z$  náboj iontu.

Pokud tedy ionty vletí do analyzátoru, který má zakřivený tvar, lze změnou velikosti magnetické indukce ovlivnit poloměr dráhy iontů a tím i určit, které poměry  $m/z$  proletí analyzátozem na detektor.<sup>29</sup> Z rovnice 2 vyplývá, že ionty o stejném poměru  $\frac{m}{z} \cdot U$  mají stejný poloměr dráhy, což omezuje rozlišení tohoto analyzátoru.<sup>29</sup> Ke zlepšení rozlišení se využívá elektrického pole, které rozdělí ionty dle kinetické energie. Ionty tedy před vstupem do magnetického sektorového analyzátoru projdou částí hmotnostního spektrometru, kde na ně působí elektrická síla zakřivující dráhu jejich letu, takže jen ionty o stejné kinetické energii projdou dále do analyzátoru, ve kterém mají ionty různé dráhy podle různých poměrů  $m/z$ .<sup>28,29</sup>

### **Ionizace za přítomnosti matrice a analyzátor doby letu**

Laserová desorpce a ionizace za přítomnosti matrice (MALDI, z angl. **matrix assisted laser desorption/ionization**) je často používaná měkká ionizační technika, která umožňuje ionizaci biomolekul, aniž by při ní docházelo k fragmentaci vzorku.<sup>28,29</sup> Analyzovaná látka je v roztoku smíchána s vhodnou organickou sloučeninou – matricí – absorbující UV (nebo infračervené) záření. Matrice je mnohonásobný nadbytek.<sup>29</sup> Následně dochází ke kokrytalizaci směsi a poté je malá plocha po krátkou dobu ozářena laserem (do 10 ns UV laserem, za použití infračerveného (IR) laseru až 200 ns).<sup>29</sup> Po tomto ozáření následuje odpaření směsi a ionizace vzorku.<sup>30</sup> MALDI se nejčastěji využívá v kombinaci s analyzátozem doby letu<sup>51</sup> (TOF, z angl. time of flight) – po ionizaci jsou ionty,

pomocí přivedeného napětí, urychlené směrem k detektoru.<sup>29</sup> Délka letu k detektoru je přímo úměrná poměru  $m/z$ :

$$t = \frac{s}{\sqrt{2Ue}} \sqrt{\frac{m}{z}} (x),$$

kde  $t$  je doba letu,  $s$  délka analyzátoru,  $U$  urychlovací napětí,  $m$  hmotnost iontu,  $e$  elementární náboj a  $z$  náboj iontu.

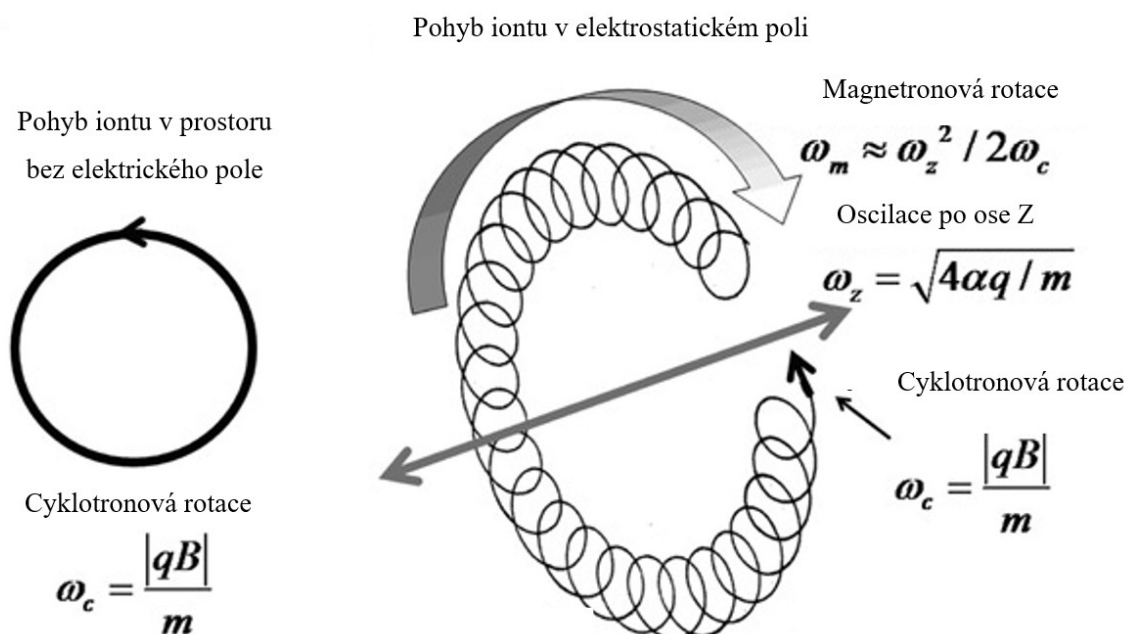
Vzhledem ke způsobu ionizace mají vzniklé ionty různé počáteční kinetické energie, pohybují se různými směry a jsou od elektrody, na kterou je přivedeno urychlovací napětí, různě vzdáleny – všechny tyto faktory přispívají k tomu, že stejné ionty nemusí dorazit na detektor ve stejný čas, a tedy analyzátor pracující pouze s vložením urychlovacího napětí po ionizaci nedosáhne dobrého rozlišení v porovnání s ostatními analyzátorů. Ke snížení vlivu výše zmíněných skutečností se užívají dvě modifikace: reflektron a časově opožděná extrakce.<sup>29,52,53</sup>

Reflektron je zařízen jako soustava za sebou umístěných kruhových elektrod – na ty je přivedeno postupně se zvyšující napětí (stejněho znaménka jako analyzované ionty), aby došlo k odpuzování iontů od elektrody. Ionty s vyšší kinetickou energií proniknou hlouběji do reflektronu, než ionty o nižší kinetické energii. Ovšem po výstupu jsou kinetické energie téměř shodné a na detektor tedy narazí v téměř stejný čas.<sup>29,52–54</sup>

Časově opožděná extrakce naopak funguje tak, že ionty jsou bezprostředně po ionizaci ponechány na malou chvíli bez urychlovacího napětí. V tomto krátkém časovém intervalu dojde k tomu, že mezi ionty dojde ke srážkám a tím k relativnímu vyrovnání jejich kinetických energií. Ionty s vyšší kinetickou energií se dostanou dále od elektrody, na kterou bude přivedeno urychlovací napětí, a tedy elektrická síla na ně působící bude nižší než ta, která působí na ionty blíže k elektrodě. Zrychlení, kterého dosáhnou, bude nižší než u iontů nacházejících se blíže k elektrodě. Často se též používá kombinace reflektronu a časově zpožděné extrakce, která ještě zvýší rozlišení TOF analyzátoru.<sup>29,52,53</sup>

## Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

Při iontové cyklotronové rezonanci (FT-ICR) se iontům chyceným v magnetickém poli přiřazuje poměr  $m/z$  na základě frekvence jejich pohybu, která je nepřímo úměrná poměru  $m/z$ .<sup>29</sup> Ionty se nedostávají do styku s detektorem. Tato metoda je nedestruktivní, ale pohybem poblíž detekčních plátů indukují proud, který je dále zesílen a zaznamenán.<sup>29</sup> Vzhledem k tomu, že frekvence jejich pohybu nezávisí na rychlosti, konají všechny ionty daného poměru  $m/z$  stejný pohyb po kružnici se stejnou frekvencí (bez ohledu na počáteční kinetickou energii) a není třeba je nějak zaostřovat.<sup>29</sup> Z rovnice 1 je vidět, že magnetická síla nepůsobí na ionty, které se pohybují ve směru (a protisměru) magnetické indukce – je tedy třeba zajistit, aby ionty nemohly tímto směrem z cely uniknout. V tomto směru jsou umístěny pláty (záchytné desky) – na ty je přivedeno stejnosměrné napětí, které ionty udrží uvnitř cely. Tyto záchytné desky nutí ionty oscilovat mezi nimi, celkový pohyb iontu je tedy poměrně komplikovaný (obr. 13).<sup>29,55–57</sup>



Obr. 13 Schématické znázornění pohybu iontu v cele FT-ICR.<sup>57</sup>

Pohyb, který ionty konají po vstupu do cely, není fázově koherentní a ani poloměr jejich dráhy není dostatečně velký k tomu, aby detekční pláty byly schopny zaznamenat signál.

Ionty je třeba excitovat, tj. dodat jim energii k zvětšení poloměru jejich dráhy. Excitační energie se jim dodá tak, že vedle detekčních plátů jsou umístěny ještě excitační pláty, na které je přivedeno radiofrekvenční napětí, které osciluje s frekvencí rovnou frekvenci kružnicového pohybu iontů (cyclotron frequency). Po dodání energie je poloměr dráhy iontů dostatečně velký k tomu, aby frekvenci jejich pohybu zaznamenaly detekční pláty.<sup>29,55,56,56</sup>

### **Orbitrap**

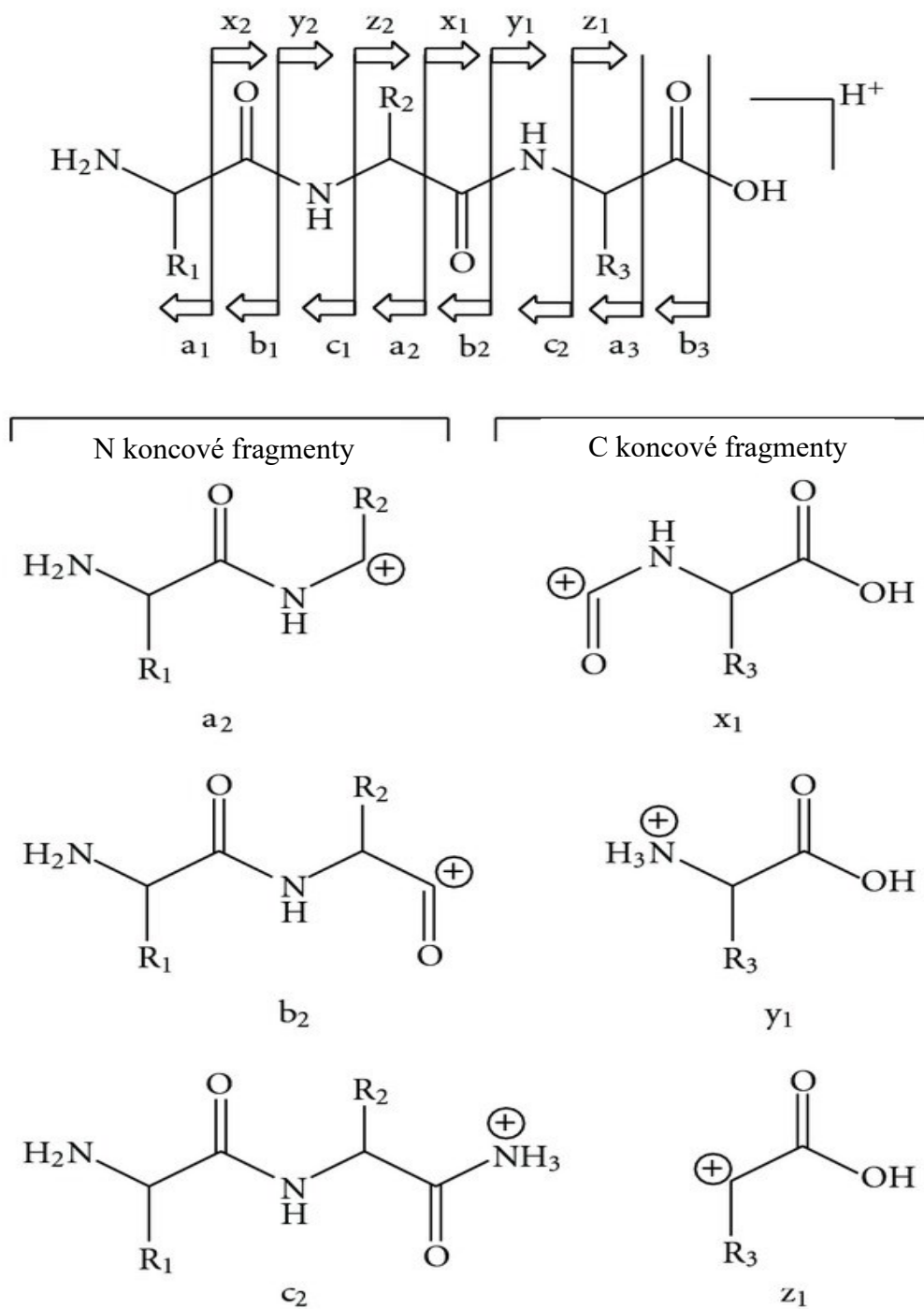
Tento hmotnostní analyzátor využívá pouze síly elektrického pole k zachycení iontů<sup>29</sup> a podobně jako FT-ICR detekuje frekvenci jejich pohybu. Tu převádí na poměr  $m/z$ . Ionty lapené v elektrickém poli se pohybují po kružnici (odpovídající ploše  $xy$  v kartézských souřadnicích) a navíc se pohybují podél osy  $z$  s frekvencí  $\omega_z$ . Ta je nezávislá na počáteční rychlosti iontu a nepřímo úměrná druhé odmocnině z poměru  $m/z$  – tuto frekvenci snímá detektor a přiřazuje ji poměr  $m/z$ .<sup>29,35</sup> Orbitrap vyžaduje, aby ionty vstupovaly dovnitř pod správným úhlem, a aby jejich počáteční rychlosti byly podobné. Důležitou úlohu také hraje načasování vstupu iontů. Z těchto důvodů je před Orbitrap často umístěna zahnutá kvadrupolová past, ve které dojde k zastavení a akumulaci iontů pomocí zvednutého tlaku (collisional cooling).<sup>29</sup> Poté dojde ke vstřelení iontů do analyzátorů. Orbitrap poskytuje analýzu s velmi vysokým rozlišením (vyšší rozlišení umožňuje jen FT-ICR, ačkoliv pro velmi vysoké poměry  $m/z$  poskytuje Orbitrap lepší rozlišení než FT-ICR)<sup>29</sup> a využívá též Fourierovu transformaci k převedení signálu z časové domény do domény frekvenční.<sup>29,36,37</sup>

### **1.3.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie**

Při elektronové ionizaci organických molekul dochází ke vzniku molekulárních iontů (tedy iontu  $M^+$  vzniklého z původní molekuly  $M$  odtržením elektronu) – a charakteristické fragmentaci, ze které lze usuzovat strukturu molekuly. Jemné ionizační techniky, při kterých dochází jen k nabití analytu, tuto vlastnost ztrácejí – lze pozorovat hmotnost molekuly, popřípadě změny v hmotnosti (pokud sledujeme reakci), už ale nejsme schopni určit, ve které části molekuly ke změnám hmotnosti dochází. Tuto obtíž řeší tandemová hmotnostní spektrometrie. Při této metodě se v analyzátoru izoluje hledaný poměr  $m/z$ , který se fyzikálními metodami rozštěpí na fragmenty, jež se dále analyzují (obr. 14, str. 27).<sup>58</sup> Tímto způsobem lze dle fragmentace odhadovat strukturu analyzovaného iontu. Při tandemové hmotnostní spektrometrii se provádí následná měření, kterých lze dosáhnout buď zapojením

dvou hmotnostních analyzátorů po sobě, nebo vhodnou konstrukcí hmotnostního analyzátoru jež umožňuje analýzu vzorku, následnou ztrátu nechtěných iontů a poté analýzu uchovaného vybraného iontu.<sup>29,59,60</sup>

Fragmentace vybraného iontu lze dosáhnout například srážkami s molekulami neutrálního plynu. Pokud molekuly plynu mají dostatečnou kinetickou energii, dojde po srážce s vybraným iontem k jeho fragmentaci na menší ionty, které lze dále analyzovat. Při fragmentaci peptidů pomocí této metody dochází k charakteristickému štěpení peptidové vazby<sup>29,59,60</sup> – štěpné produkty lze tedy poměrně dobře odhadovat a výsledné hmotnostní spektrum analyzovat pomocí softwaru, který fragmenty najde podle vypočtených teoretických poměrů  $m/z$ .



Obr. 14 Znárodnění fragmentace peptidové vazby při tandemové hmotnostní spektrometrii.<sup>40</sup>

### 1.3.4 Přístupy k analýze produktů síťovací reakce

Při přípravě produktů síťovací reakce k hmotnostnímu měření se nejčastěji uplatňují přístupy „shora dolů“ (z anglického top down) a „zdola nahoru“ (z anglického bottom up), které se liší způsobem purifikace i samotnou hmotnostně spetrometrickou analýzou vzorku.<sup>61,62</sup>

#### Přístup „shora dolů“

Přístup „shora dolů“ se nejčastěji využívá ke studiu peptidů a malých proteinů. Po proběhnutí síťovací reakce se vzorky odsolí a následně analyzují tandemovou hmotnostní spektrometrií. Vzniklá směs nemodifikovaného a modifikovaného proteinu je sprejována intaktně, a z té je studovaný protein následně v plynné fázi izolován a disociován na kratší úseky tzv. fragmenty (viz obrázek 14, str. 27).<sup>63</sup> K disociaci molekuly lze použít různých technik a přístupů např. kolizně indukovaná disociace (CID, z angl. collision induced dissociation), disociace záchytem elektronu (ECD, z angl. electron capture dissociation), disociace přenosem elektronu (ETD, z angl. electron transfer dissociation), infračervená multifotonová disociace (IRMPD, z angl. infrared multiphoton dissociation), ultrafialová fotodisociace (UVPD, z anglického ultraviolet photodissociation). Výsledná data nesou informaci o jednotlivých fragmentech a jejich modifikacích. Výhodou tohoto přístupu je, že umožňuje studovat výlučně jednu populaci (např. jen jednou modifikovaný protein) z komplexní směsi produktů síťovací reakce.<sup>64</sup>

#### Přístup „zdola nahoru“

Na rozdíl od předchozího přístupu je v tomto zařazen krok v podobě štěpení proteinu proteasou. Po proběhnutí síťovací reakce je k reakční směsi přidána proteasa umožňující rozštěpit analyzovaný protein na peptidy. Směs peptidů je po enzymatické digesci analyzována pomocí kapalinové chromatografie online spojené s hmotnostním spektrometrem. Výsledná data pak udávají informaci o peptidech a jejich modifikacích. Přístupem „zdola nahoru“ lze studovat i velké proteinové komplexy a interaktomy.<sup>65</sup>

## **CÍL PRÁCE**

- Kovalentní značení modelových proteinů vybranými činidly
- Analýza modifikovaného proteinu přístupem shora dolů (top down)
- Analýza modifikovaného proteinu přístupem zdola nahoru (bottom up)

## 2 Materiál

### 2.1 Chemikálie

4-ethylmorfolin	Merck, Německo
Acetonitril (LC-MS čistota)	Merck, Německo
Dimethylsulfoxid	Merck, Německo
Ethanolamin	Merck, Německo
N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina	Merck, Německo
Hydroxid sodný	Merck, Německo
Chlorid sodný	Merck, Německo
Kyselina chlorovodíková	Roth, Německo
1-acetyl imidazol	TCI, Japonsko
Methanol (LC-MS čistota)	Merck, Německo
Mravenčí kyselina (LC-MS čistota)	Fluka, Švýcarsko
N-sukcinimidyl acetát	Merck, Německo
Pyridin	Merck, Německo
Triethylamin	Merck, Německo
Trifluoroctová kyselina	Fluka, Švýcarsko
Trypsin	Promega, USA
Voda (LC-MS čistota)	Merck, Německo
DIBU	CF Plus Chemicals, ČR
DSBU	CF Plus Chemicals, ČR
Iodacetamid	Merck, Německo
Tris(2-karboxyethyl)fosphin hydrochloride	Merck, Německo

## 2.2 Biologický materiál

Hovězí sérový albumin

Merck, Německo

DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPFDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAG  
CEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCCKQEPPERNECFLSHKDDSPDLPKLPDPNTL  
CDEFKADEKKFWGKYLEIARRHPYFYAPELLYYANKYNGVVFQECCQAEDKGACLLPKIET  
MREKVLASSARQRLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKEC  
CHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPILLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLT  
ADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECAKDDPH  
ACYSTVFDKCLKHLVDEPQNLIKQNCDOFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSR  
SLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFS  
ALTPDETYVPKAFDEKLFTHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLKHKPKATEEQKKTVMEN  
FVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA

Insulin beta řetězec oxidovaný ( $\beta$ Insulin)

Merck, Německo

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA

## 2.3 Seznam přístrojů

Analytické váhy	Mettler Toledo, Švýcarsko
Automatické pipety	Eppendorf, Německo
Centrifuga stolní	Minispin Eppendorf, Německo
Elektroda pH metr	Biotrode Hamilton, Švýcarsko
Hmotnostní spektrometr solariX XR	Bruker Daltonics, USA
Chladnička	Zanussi, Itálie
Chromatografická kolona	Phenomenex, Německo
pH metr	ThermoScientific, USA
termostat	Grant, Velká Británie
μHPLC systém Agilent 1200	Agilent, USA
odsolovací kolona - peptidový microtrap	Michrom BioResources, Kanada

## 2.4 Seznam roztoků

### *Pyridin/HCl pufr*

50 mM pyridin; HCl aby pH = 6,0; voda

### *HEPES pufr*

10 mM HEPES; 50 mM NaCl; voda

### *Triethylamin/karbonát pufr*

50 mM triethylamin; oxid uhličitý; voda

### *Mobilní fáze při odsolování*

0,1% TFA; voda

### *Eluční činidlo při odsolování*

0,1% TFA; 80% ACN; voda

### *ESI sprejovací pufr*

0,1% TFA v 50% methanolu ve vodě

## SOFTWARE

Data Analysis 4.4

Bruker Daltonics, USA

LinX 1.13<sup>66</sup>

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., ČR

Microsoft Office 365

Windows, USA

Ms2links<sup>67</sup>

Algoritmus pro vyhodnocení MS dat  
kovalentního značení

PyMOL

Schrödinger, USA

### 3 Metody

#### 3.1 Přístup shora dolů

Ke studiu vlivu modifikace tyrosinu na pH byla použita 4 činidla: *N*-sukcinimidyl acetát (NHS-Ac), 1-acetyl imidazol (IA), DSBU a DIBU. Byly připraveny tři zásobní roztoky oxidovaného beta řetězce insulínu o koncentraci  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  rozpuštěného ve třech pufrách o přesně definovaných pH dle tabulky. Na reakci s každým činidlem bylo použito 10  $\mu\text{g}$   $\beta$ Insulínu. Zásobní roztok  $\beta$ Insulínu byl pro reakci 1,5krát vyředěn odpovídajícím pufrém. Reakce s každým činidlem byla provedena v duplikátu. Následně byl do každé zkumavky přidán objem sítovacího činidla a to tak, aby molární množství činidla obsahujícího dvě reaktivní skupiny (DSBU a DIBU) bylo pětinasobné oproti molárnímu

<i>pH</i>	<i>pufr</i>
6,0	50 mM Pyridin/HCl
7,0	10 mM Hepes, 50mM NaCl
8,0	50 mM Triethylamin/karbonát

Tab. 1 Seznam použitých pufrů při studovaných pH

množství peptidu, v případě činidel obsahujících jednu reaktivní skupinu (NHS-Ac a IA) bylo přidáno jejich desetinásobné molární množství oproti peptidu. Pro každé pH byl připraven jeden kontrolní vzorek, ke kterému nebylo přidáno sítovací činidlo. Jednotlivá činidla byla vždy připravena čerstvě rozpuštěním v DMSO. Množství pipetovaného činidla nepřekročil 5 % výsledného objemu reakční směsi.

<i>činidlo</i>	<i>Molární nadbytek</i>	<i>Koncentrace [<math>\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}</math>]</i>
DSBU	5x	5
DIBU	5x	5
NHS-Ac	10x	1
IA	10x	1

Tab. 2 Molární nadbytky použitých činidel v reakci a koncentrace jejich zásobních roztoků.

Reakce probíhala jednu hodinu při laboratorní teplotě, poté byly vzorky odsoleny na koloně následujícím způsobem. Vzorky byly devětkrátkrát zředěny 0,1% TFA, poté byly nanесeny na kolonu, promyty dvakrát 50 násobkem mrtvého objemu kolony 0,1% roztokem TFA a vymyty 50  $\mu\text{l}$  (10 násobkem mrtvého objemu) roztoku 80% ACN a 0,1% TFA. Z odsolených vzorků byl odpipetován 1  $\mu\text{l}$  a přidán k 50  $\mu\text{l}$  sprejovacího pufru (roztok 50% methanolu a 0,1% kyseliny mravenčí) a byly analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru.

Hmotnostní spektra byla získána pomocí hmotnostního spektrometru solariX XR 15T za pomoci ionizace elektrosprejem. Postupně byly měřeny, izolovány a fragmentovány (CID) izotopové obálky odpovídající nemodifikovanému (nábojový stav 3+) a jednou modifikovanému proteinu. U vzorků modifikovaných činidly DSBU a DIBU byly izolovány také ionty odpovídající produktu typu 1,2 (intra- a intermolekulární spojení). Měření bylo prováděno v tzv. broadband modu a to za následujících parametrů: rozsah 200-2500 m/z, izolační okno bylo o velikosti 2,5 ppm; akumulací čas 1s; počet skenů 128, kolizní energie 19,5 eV. Samotné měření vzorků na hmotnostním spektrometru prováděl Mgr. Zdeněk Kukačka, Ph.D.

### 3.2 Přístup zdola nahoru

Byly připraveny tři zásobní roztoky BSA o koncentraci  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  rozpuštěného ve třech pufrech dle tabulky 1. Z každého zásobního roztoku (dle pH příslušných pufrů) byly připraveny triplikáty obsahující 20  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku. Ke každé zkumavce bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  pufru o odpovídajícím pH daného roztoku.

Ke třem replikátům každého vzorku o třech daných pH (6,0; 7,0 a 8,0) byl vždy přidán stejný objem příslušného činidla. Tento postup byl použit pro všechna čtyři činidla. Činidla byla přidána tak, aby ta obsahující jednu reaktivní skupinu (NHS-Ac a IA) byla v osmdesátinásobném nadbytku a ta obsahující dvě reaktivní skupiny (DSBU a DIBU) v čtyřicetinásobném nadbytku. Vzorky byly ponechány hodinu za laboratorní teploty.

Poté byly vzorkům redukovány a alkylovány disulfidické můstky za použití redukčního činidla tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (TCEP) a alkylačního činidla iodacetamidu (IAA). Ke všem reakčním směsím byl přidán TCEP rozpuštěný

ve 100mM 4-ethylmorfolínovém pufru o pH 8,4 tak, aby jeho finální koncentrace v reakční směsi byla 10 mM. Reakce probíhala 10 minut, teplota. Poté byl do každé zkumavky přidán IAA (rozpuštěný v 4-ethylmorfolínovém pufru o pH 8,4) tak, aby jeho finální koncentrace v reakční směsi byla 20 mM. Reakce probíhala za tmy 20 minut. Před štěpením bylo ke vzorkům o pH 6,0 a 7,0 přidáno 20  $\mu$ l 4-ethylmorfolínového pufru ke zvýšení pH roztoku na hodnotu 8,0, jež je pro štěpení trypsinem vhodná.

Samotný přidavek proteázy byl proveden dvakrát. Druhý přidavek byl aplikován po třech hodinách štěpení a dále byl vzorek ponechán do druhého dne (cca 16 hodin). Konečný hmotnostní poměr trypsinu a BSA byl 1:10 (každý přidavek trypsinu obsahoval 0,5  $\mu$ g proteázy). Zkumavky byly během štěpení v termostatu o teplotě 37 °C.

Druhý den bylo zastaveno štěpení trypsinem okyselením, a to přidavkem TFA a do finální koncentrace 0,1%. Takto připravené vzorky byly přeneseny do vialek a podrobeny LCMS.

5  $\mu$ L každého vzorku bylo nastříknuto na autosampler Agilent 1290 series UPLC system na odsolovací předkolonu Luna Omega Polar C18 (5  $\mu$ m, 100 Å, 0.3  $\times$  30 mm). Po pěti minutách odsolování při průtoku 20  $\mu$ L/min byly peptidy separovány pomocí kolony Luna Omega Polar C18 (3  $\mu$ m, 100 Å, 0.3  $\times$  150 mm) zahřáté na 50 °C při průtoku 10  $\mu$ L/min s rostoucím gradientem acetonitrilu od 5 % do 35 % během 40 minut. Chromatografický systém byl spojen s hmotnostním spektrometrem solariX XR FT-ICR. Ionizace probíhala pomocí ionizace elektrosprejem. Eluované peptidy byly analyzovány v pozitivním modu s následujícími parametry: rozsah 250 – 2500 m/z s jedním milionem data bodů, akumulací čas 0,2 s. Samotné LC-MS měření prováděl Mgr. Zdeněk Kukačka, Ph.D.

### 3.3 Export dat

Naměřená MS, MS/MS a LC-MS data byla zpracována v programu DataAnalysis 4.4 (Bruker Daltonics). Dekonvoluce dat byla provedena algoritmy SNAP. Dekonvolovaná data byla z důvodu snazší manipulace exportována do formátu .mgf (mascot generic file) a .txt.

Data z přístupu zdola nahoru byla vyhodnocena pomocí programu Ms2links. Použité nastavení: modifikace monolink, intra- a interpeptidová spojení – lysin, tyrosin, N-konec; chyba měření 2,5 ppm.

Data z přístupu shora dolů byla vyhodnocena pomocí programu LinX 1.13. Použité nastavení: Proteasa – trypsin (štěpení za lysinema argininem); 3 možné chyby štěpení; variabilní oxidace methioninu; fixní karbamidace cysteinu; monolink, intra- a interpeptidová spojení – lysin, tyrosin, N-konec; chyba měření 1ppm.

Míra modifikace jednotlivých fragmentů byla vypočtena dle vztahu:

$$\frac{I_{mod}}{I_{mod} + I_{nmod}} \cdot 100$$

kde  $I_{mod}$  značí intenzitu modifikovaného fragmentu,  $I_{nmod}$  intenzitu nemodifikovaného fragmentu.

### **3.4 Výpočet povrchu dostupného rozpouštědla**

Výpočet povrchu dostupného rozpouštědla byl pro BSA vypočítán pomocí programu NACCESS 2.1.1. Jako model byl vybrán krystal s nejvyšším rozlišením, PDB 4f5s.<sup>68</sup> Samotný výpočet provedl Mgr. Josef Chmelík, Ph.D.

## 4 Výsledky

Ke zkoumání vlivu pH na modifikaci tyrosinu byla vybrána čtyři činidla: NHS-Ac, DSBU, IA a DIBU (viz obrázky příloha 3). První dvě jmenovaná obsahují jako reaktivní skupinu NHS ester, druhá dvě molekulu imidazolu. NHS-Ac a IA jsou činidla tzv. monofunkční, obsahují jen jednu reaktivní skupinu, a jejich reakcí s peptidem dochází k acetylaci peptidu. DSBU a DIBU jsou činidla síťovací a homobifunkční, obsahují dvě stejné reaktivní skupiny a produktem reakce s peptidem může dojít buď k zesílení dvou postranních řetězců aminokyselin, nebo k modifikaci jednoho postranního řetězce aminokyseliny. Obě tato činidla obsahují strukturu štěpitelnou při CID za vzniku charakteristických produktů.<sup>69</sup>

K nalezení modifikovaných postranních řetězců aminokyselin byla použito CID, tedy fragmentace (vybraného) izolovaného prekurzorového iontu srážkami s inertním plynem. Fragmentací peptidového řetězce lze lokalizovat místo modifikace.

### 4.1 Přístup shora dolů

K fragmentaci po reakci  $\beta$ Insulinu s NHS-Ac a IA byly vybrány jedenkrát modifikované ionty v nábojovém stavu 3+, který byl ve spektrech nejintenzivnější. U činidel DSBU a DIBU byl podroben další analýze ještě ion odpovídající zesílenému  $\beta$ Insulinu (hmotnostní posun o 196,084 Da).

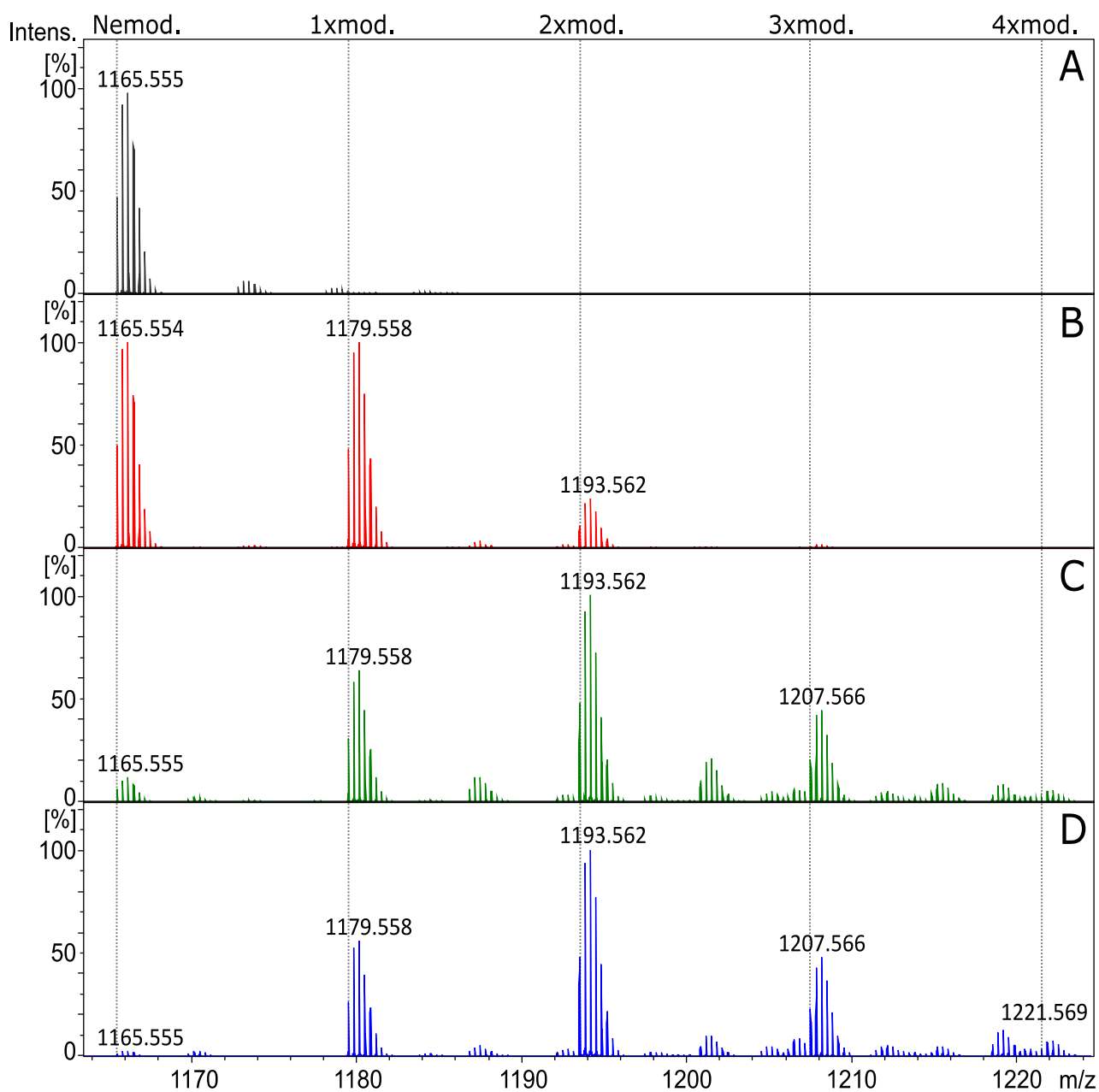
#### 4.1.1 NHS-Ac

##### **Srovnání hmotnostních spekter pro různá pH**

Hmotnostní spektrum (přibližné na nábojový stav 3+) acetylace  $\beta$ Insulinu pomocí NHS-Ac při pH 6,0 (obrázek 15B, str. 40) ukazuje intenzivní signál odpovídající nemodifikovanému  $\beta$ Insulinu a monoacetylovanému  $\beta$ Insulinu, které mají podobnou intenzitu (neacetylovaný ion je nejintenzivnějším iontem) a ion odpovídající dvakrát modifikovanému  $\beta$ Insulinu, jenž má intenzitu nejnižší – dosahuje asi čtvrtiny intenzity nemodifikovaného  $\beta$ Insulinu.

Při zvýšení pH reakce na 7,0 (obr. 15C, str. 40) se snižuje intenzita nemodifikovaného  $\beta$ Insulinu a naopak narůstá intenzita jedenkrát a vícekrát acetylovaného  $\beta$ Insulinu. Ve spektru lze rovněž pozorovat ionty třikrát a čtyřikrát acetylovaného  $\beta$ Insulinu. Nejvyšší intenzitu má dvakrát modifikovaný  $\beta$ Insulin, monoacetylovaný  $\beta$ Insulin dosahuje asi dvou třetin intenzity dvakrát modifikovaného iontu a nemodifikovaný ion desetiny základního píku („base peak“).

Dalším zvýšení pH reakce na 8,0 (obr. 15D, str. 40) se intenzita nemodifikovaného  $\beta$ Insulinu dále snižuje. Ve spektru se vyskytují ionty jedenkrát až čtyřikrát acetylovaného  $\beta$ Insulinu. Majoritním iontem acetylace při pH 8,0 je dvakrát modifikovaný  $\beta$ Insulin, dále lze ve spektru pozorovat ještě jedenkrát a třikrát modifikovanou formu s poloviční intenzitou.



Obr. 15. Hmotnostní spektra  $\beta$ Insulinu nemodifikovaného (A) modifikovaného pomocí NHS-Ac při pH 6,0 (B), při pH 7,0 (C) při pH 8,0 (D). Všechna spektra jsou přibližena na nábojový stav 3+.

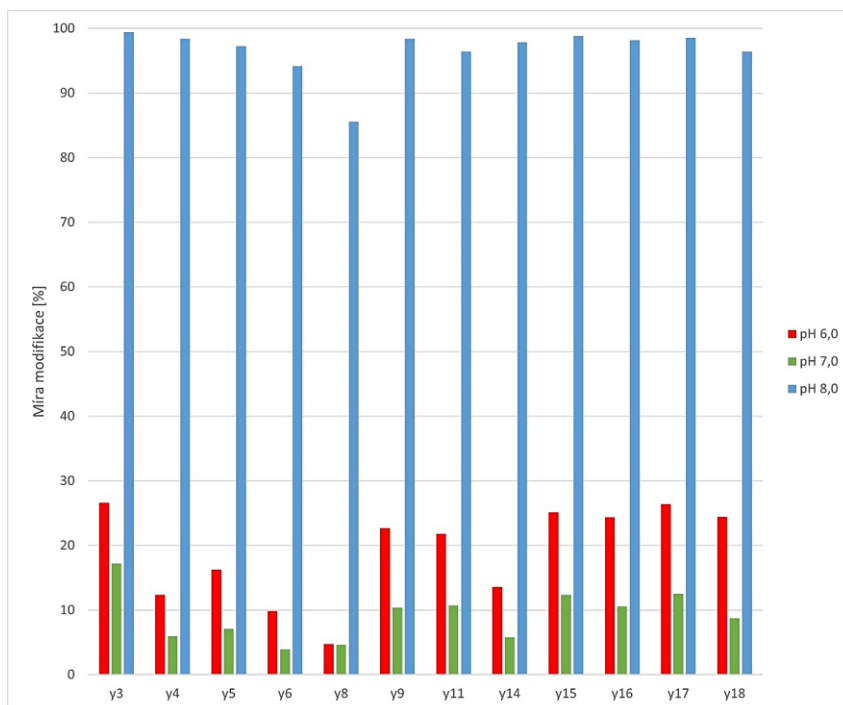
## MS/MS analýza

V obrázku 16 (str. 42) lze pozorovat, že při pH 6,0 je míra modifikace *y* fragmentů ve všech případech nižší než padesát procent. Pro *y*3 vychází míra modifikace téměř třicet procent, zatímco pro *y*4 je toto číslo o více než polovinu menší. *y*5, první fragment obsahující postranní řetězec tyrosinu (Y26), má míru modifikace vyšší než *y*4, nicméně hodnoty fragmentu *y*3 nedosahuje. Míra modifikace uvedených fragmentů se více či méně od sebe liší, ačkoliv některé fragmenty obsahují stejné nukleofilní skupiny (*y*5, *y*6 a *y*8), až na fragmenty *y*15 – první fragment obsahující druhý postranní řetězec tyrosinu (Y16 a Y26) - a vyšší (tedy fragmenty obsahující všechny modifikovatelné skupiny βInsulinu až na N-konec), jejichž míra modifikace se pohybuje kolem 25 procent. Uvedené *b* fragmenty (obrázek 17, str. 42) mají všechny míru modifikace vyšší než padesát procent. Toto platí jak pro fragmenty obsahující jen N-konec (*b*14 a *b*15), tak i pro ty obsahující další nukleofilní skupiny bez větších rozdílů: výjimkou je fragment *b*23, jehož míra intenzity je nižší než všech ostatních *b* fragmentů. *b*16, obsahující postranní řetězec tyrosinu (Y16), dosahuje nejvyššího poměru intenzit z uvedených *b* iontů, naopak *b*26 a *b*27, obsahující dva postranní řetězce tyrosinu, nedosahují vysokých poměrů intenzit (ve srovnání s ostatními *b* fragmenty).

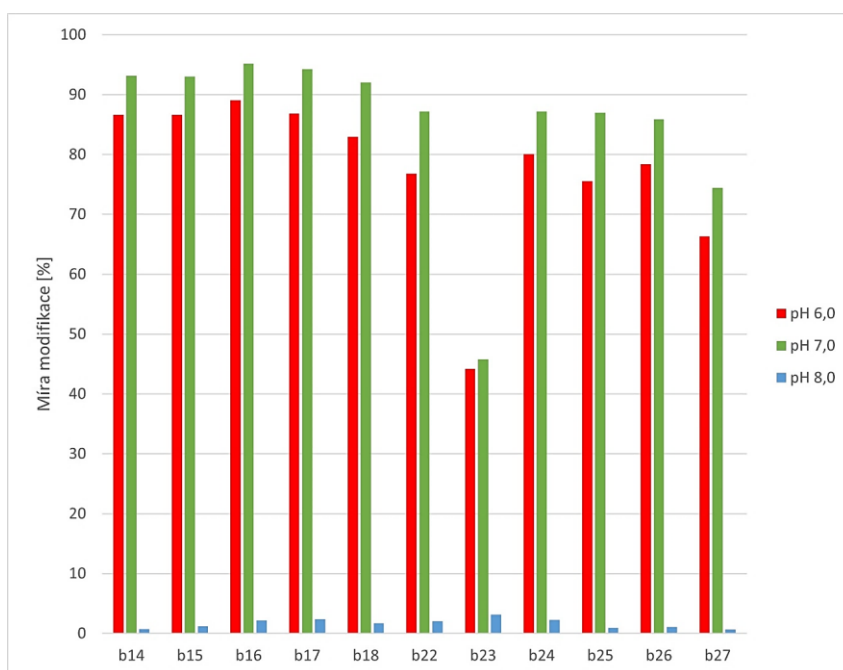
Hodnoty míry modifikace jednotlivých fragmentů při pH 7,0 (obr. 16, str. 42) jsou obdobné jako při pH 6,0. *y* fragmenty mají míru modifikace menší než 20 % bez ohledu na aminokyselinové složení daného fragmentu. Fragment *y*3 znovu dosahuje poměrně vysoké míry modifikace a tato hodnota je nižší pro fragment *y*4. Opět si jsou hodnoty míry modifikace od fragmentu *y*15 výše blízké. Oproti pH 6,0 nicméně došlo k poklesu míry modifikace všech *y* fragmentů, u *b* fragmentů naopak k jejich nárůstu (bez ohledu na aminokyselinové složení daného *b* fragmentu). *b* fragmentem (obr. 17, str. 42) s nejnižším poměrem intenzit je opět *b*27. Stejně jako při pH 6,0 dosahuje fragment *b*16 (N-konec a Y16) nejvyššího poměru intenzit.

Při pH 8,0 jsou hodnoty modifikace všech *y* fragmentů (obr. 16, str. 42) mnohem vyšší než při pH 6,0 a 7,0. Nejnižší úroveň modifikace mezi uvedenými *y* fragmenty je u fragmentu *y*8, jehož míra modifikace je 85,6 %, zatímco všechny ostatní *y* fragmenty mají míru modifikace vyšší než 90 %. Nejvyšší hodnoty dosahuje *y*3 fragment s lysinem v postranním řetězci. U *b* fragmentů došlo změnou pH k významnému snížení úrovně modifikace.

Všechny *b* fragmenty (obr. 17) mají míru modifikace nižší než 5 %, nicméně tyto hodnoty do značné míry kolísají.



Obr. 16 Graf závislosti míry modifikace vybraných *y* fragmentů na pH pro NHS-Ac.



Obr. 17 Graf závislosti míry modifikace vybraných *b* fragmentů na pH pro NHS-Ac

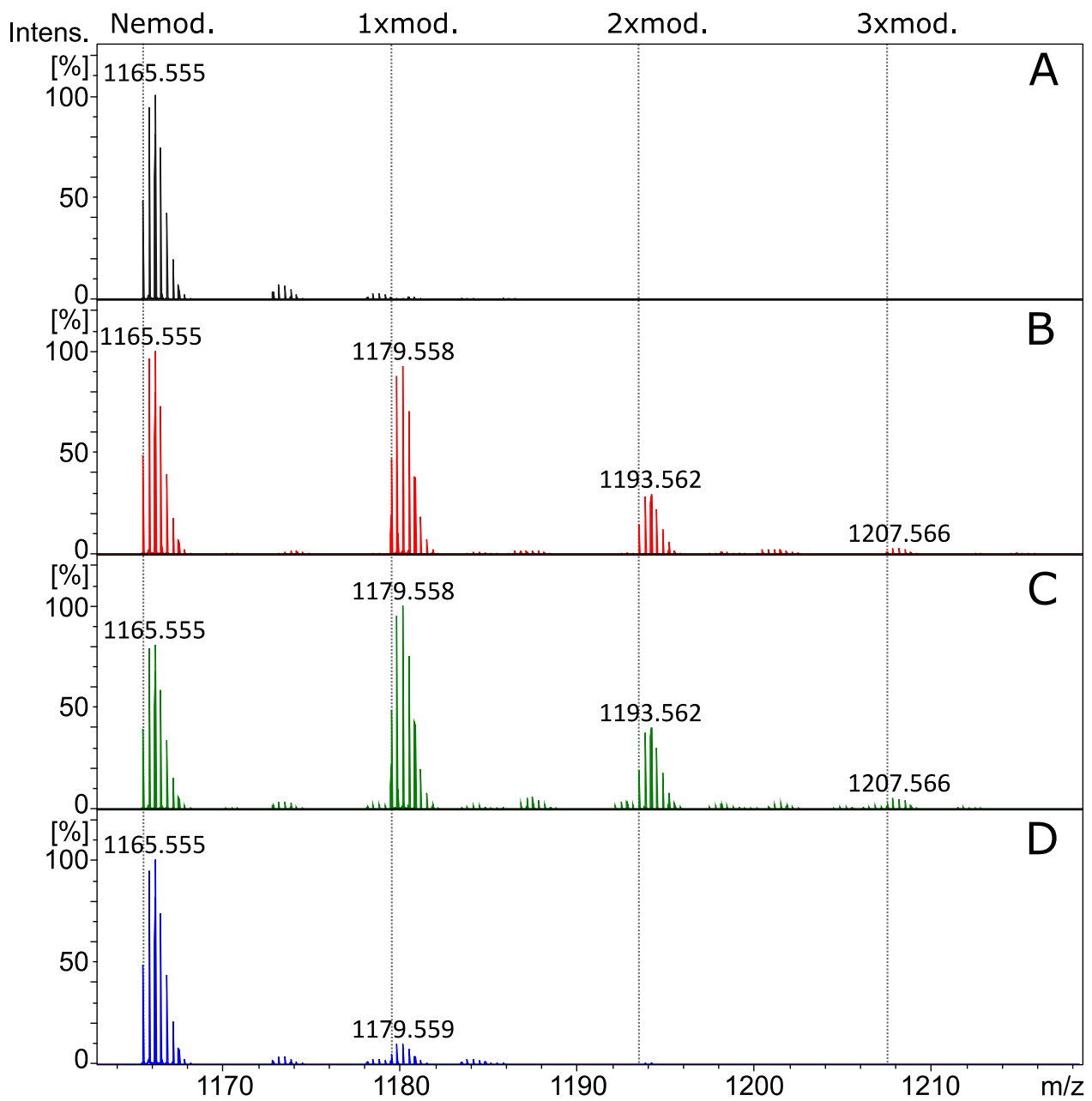
#### 4.1.2 IA

##### **Srovnání hmotnostních spekter pro různá pH**

Hmotnostní spektrum acetylace  $\beta$ Insulinu pomocí IA při pH 6,0 (obr. 18B, str. 44) ukazuje podobně intenzivní signály nemodifikovaného  $\beta$ Insulinu a jedenkrát acetylovaného peptidu. Ve spektru lze pozorovat i dvakrát a třikrát modifikované formy  $\beta$ Insulinu, nicméně jejich intenzita je výrazně nižší než zbylých dvou signálů  $\beta$ Insulinu – dvojnásobně acetylovaný  $\beta$ Insulin dosahuje třetiny intenzity nemodifikovaného  $\beta$ Insulinu a třikrát modifikovaný ion sotva desetiny.

Zvýšením pH reakce na 7,0 (obr. 18C, str. 44) došlo k poklesu intenzity nemodifikovaného peptidu a nárůstu signálu monoacetylovaného  $\beta$ Insulinu, který je základním píkem spektra. Intenzita dvakrát i třikrát modifikovaného peptidu je vyšší než při pH 6,0. Dvojnásobně acetylovaný  $\beta$ Insulin má poloviční intenzitu oproti neacetylovanému, intenzita trojnásobně modifikovaného peptidu je stále zanedbatelná.

Spektru acetylace při pH 8,0 (obr. 18D, str. 44) dominuje nemodifikovaný  $\beta$ Insulin o vysoké intenzitě a monoacetylovaný peptid, jehož intenzita je podstatně nižší než nemodifikovaného. Signál dvakrát a třikrát modifikovaného  $\beta$ Insulinu je zanedbatelný.



Obr. 18 Hmotnostní spektra  $\beta$ Insulinu nemodifikovaného (A) modifikovaného pomocí IA při pH 6,0 (B), při pH 7,0 (C) při pH 8,0 (D). Všechna spektra jsou přibližena na nábojový stav 3+.

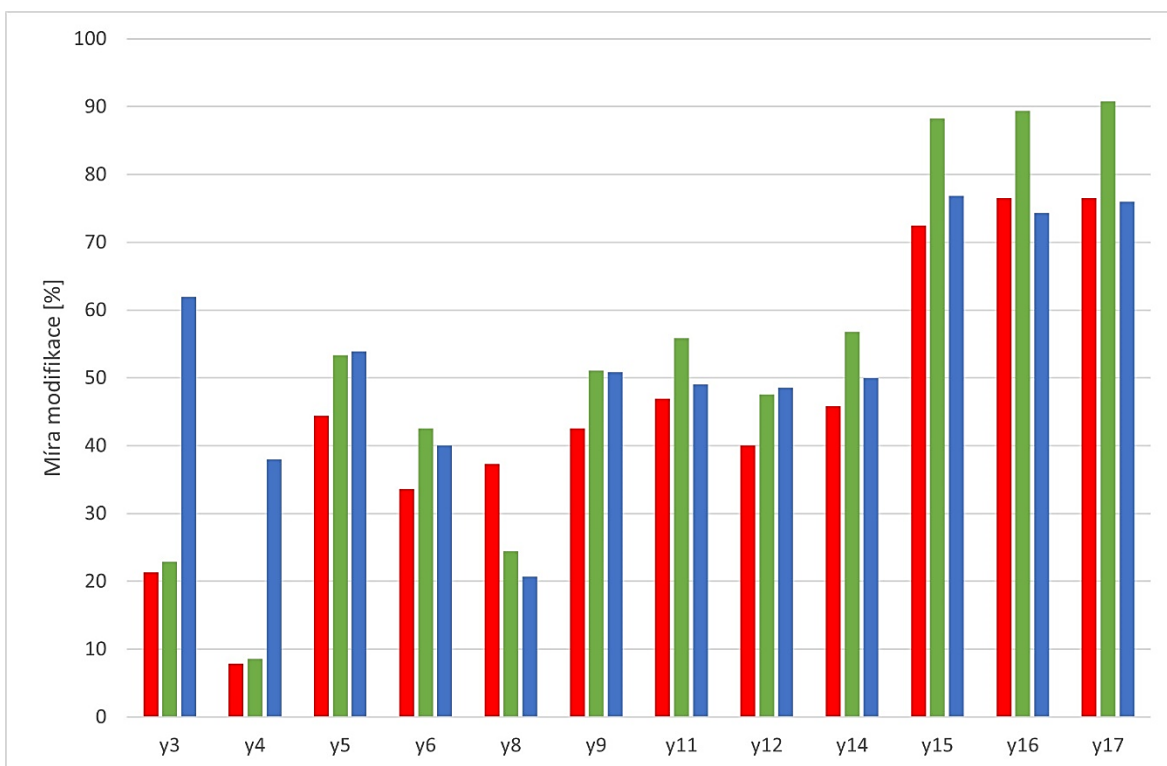
## MS/MS analýza

Obrázek 19 (str. 47) zobrazuje míry modifikace vybraných  $y$  fragmentů a obrázek 20 (str. 47)  $b$  fragmentů acetylace  $\beta$ Insulinu pomocí IA. Pro  $y$  fragmenty menší než  $y15$  (K28, T27, Y26) platí, že jejich úroveň modifikace je menší než padesát procent, nicméně i mezi těmito fragmenty jsou rozdíly. Fragment  $y3$  dosahuje poměrně vysoké míry modifikace, která poté pro  $y4$  fragment podstatně klesá, podobně jako tomu bylo u NHS-Ac. Prvním  $y$  fragmentem obsahujícím postranní řetězec tyrosinu je  $y5$ , jehož poměr intenzit je vyšší než u předchozích dvou fragmentů. Pro následující  $y$  fragmenty (včetně  $y5$ ) až do  $y14$  (včetně) platí, že jejich poměry intenzit jsou vyšší než těch, které neobsahovaly žádný postranní řetězec tyrosinu.  $y15$  a další fragmenty v tabulce obsahují dva postranní řetězce tyrosinu (Y16 a Y26). Jejich míra modifikace je mnohem vyšší než všech předchozích  $y$  fragmentů a pokaždé je vyšší než padesát procent. Ačkoliv fragmenty  $b14$  a  $b15$  (obr. 20, str. 47) obsahují jako nukleofilní skupinu N-konec, je míra modifikace  $b14$  vyšší než padesát procent, zatímco pro  $b15$  je tato hodnota nižší.  $b16$ , obsahující postranní řetězec tyrosinu (Y16), má míru modifikace větší než padesát procent, stejně jako zbylé uvedené  $b$  fragmenty. Nejvyšší úroveň modifikace z  $b$  fragmentů dosáhly  $b26$  a  $b27$ , jež obsahují N-konec a dva postranní řetězce tyrosinu (Y16 a Y26).

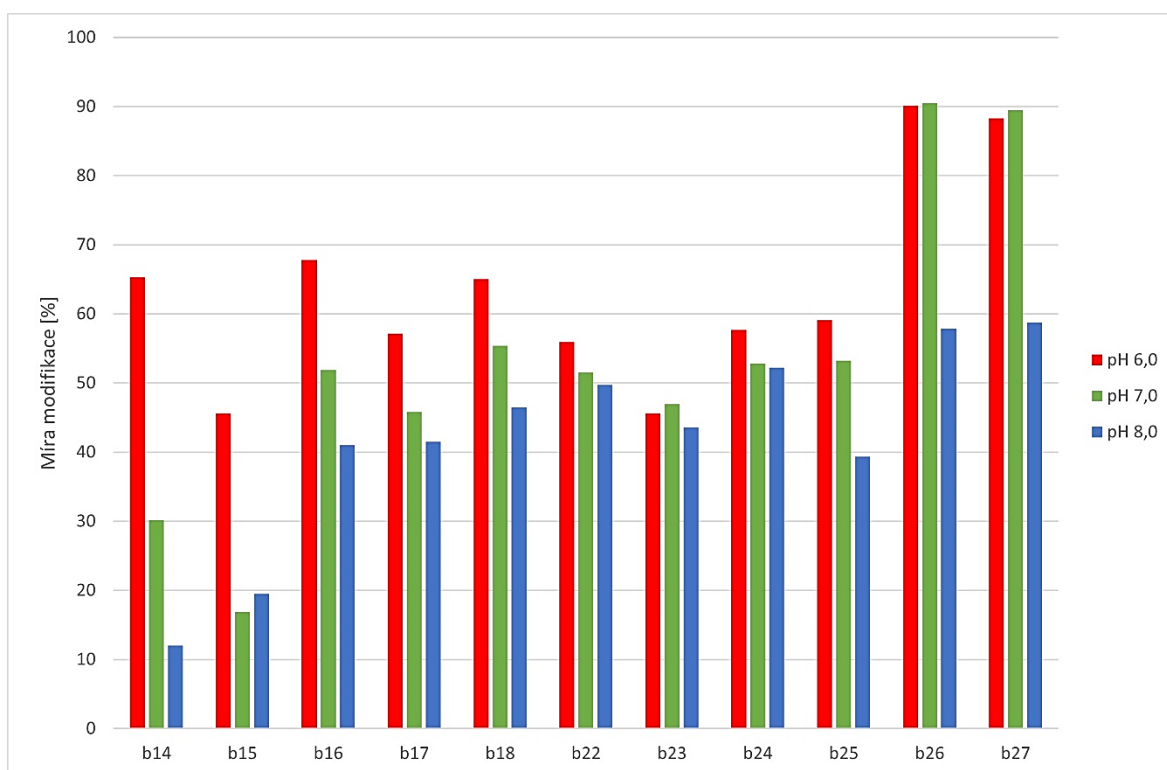
Míra modifikace fragmentů  $y3$  a  $y4$  při pH 7,0 (obr. 19, str. 47) je o trochu vyšší než při pH 6,0. U fragmentů  $y5$  a vyšších ovšem dochází k vyššímu nárůstu, kterému se vymyká iont  $y8$ , jehož míra modifikace klesla. Míra modifikace fragmentu  $y14$  je vyšší než padesát procent, fragmentů  $y15$  a vyšších, které obsahují oba postranní řetězce tyrosinů (Y16 a Y26), mnohem větší než padesát procent.  $b14$  - na rozdíl od pH 6,0 – a  $b15$  mají míru modifikace menší než padesát procent (obr. 20, str. 47).  $b16$  a ostatní  $b$  fragmenty obsahující jeden postranní řetězec tyrosinu (Y16) dosahují míry modifikace přes 50 %, zatímco  $b26$  a  $b27$ , jež mají oba postranní řetězce tyrosinu (Y16 a Y26), mají míru modifikace přibližně 90 %.

Míra modifikace  $y3$  (obr. 19, str. 47) fragmentu (acetylace při pH 8,0), který obsahuje nukleofilní skupinu v postranním řetězci lysinu (K28), dosahuje více než padesáti procent, nicméně míra modifikace  $y4$  (K28 a T27) je poloviční oproti hodnotě fragmentu  $y3$ . Stejně jako při obou předchozích pH tedy dochází k poměrně velikému poklesu míry modifikace při přechodu od  $y3$  k  $y4$  fragmentu.  $y5$  (jeden postranní řetězec tyrosinu) dosahuje vyšší míry

modifikace než *y4* a zároveň je tato hodnota nižší než pro *y3* – oproti pH 6,0 a 7,0 je tomu tak poprvé, v obou předchozích případech byla míra modifikace *y5* vyšší než fragmentů *y3* i *y4*. Následující *y* fragmenty mají míru modifikace menší než padesát procent až do fragmentu *y15*, který obsahuje oba postranní řetězce tyrosinů (Y16 a Y26, T27, K28). Všechny další fragmenty ukázané v grafu mají míru modifikace mnohem vyšší než padesát procent. *b* fragmenty (obr. 20, str. 47), obsahující jako nukleofilní skupinu jen N-konec (*b14* a *b15*), mají míru modifikace mnohem nižší než padesát procent. *b16* již obsahuje hydroxyskupinu postranního řetězce tyrosinu (Y16) a jeho míra modifikace je vyšší než u předchozích dvou fragmentů, nicméně stále je nižší než padesát procent. Fragmenty *b24*, *b26* a *b27* již mají míru modifikace vyšší než padesát procent (u *b25* je menší), nicméně tato hodnota je menší než u *y* fragmentů, které obsahují všechny nukleofilní skupiny βInsulinu krom N-konce. Při pH 8,0 vidíme značný rozdíl mezi mírou modifikace při použití NHS-Ac a IA. Zatímco míra modifikace *y* fragmentů při použití NHS-Ac byla téměř vždy vyšší než 90 %, při použití IA byla míra modifikace vysoká u *y* fragmentů obsahující všechny nukleofilní skupiny krom N-konce (ale ani jednou nedosáhla tak vysoké hodnoty jako u NHS-Ac). U *b* fragmentů je situace opačná – modifikací pomocí NHS-Ac byla míra modifikace *b* fragmentů vždy velmi nízká bez ohledu na to, zda obsahovaly jen N-konec, nebo i jiné nukleofilní skupiny. Modifikací pomocí IA byla míra modifikace *b* fragmentů různá podle jejich aminokyselinového složení – *b* fragmenty, které měly jen N-konec, dosáhly nízké míry modifikace, která poté narůstala s přibývajícimi nukleofilními skupinami v βInsulinu.



Obr. 19 Závislost míry modifikace vybraných y fragmentů na pH pro IA.



Obr. 20 Závislost míry modifikace vybraných b fragmentů na pH pro IA.

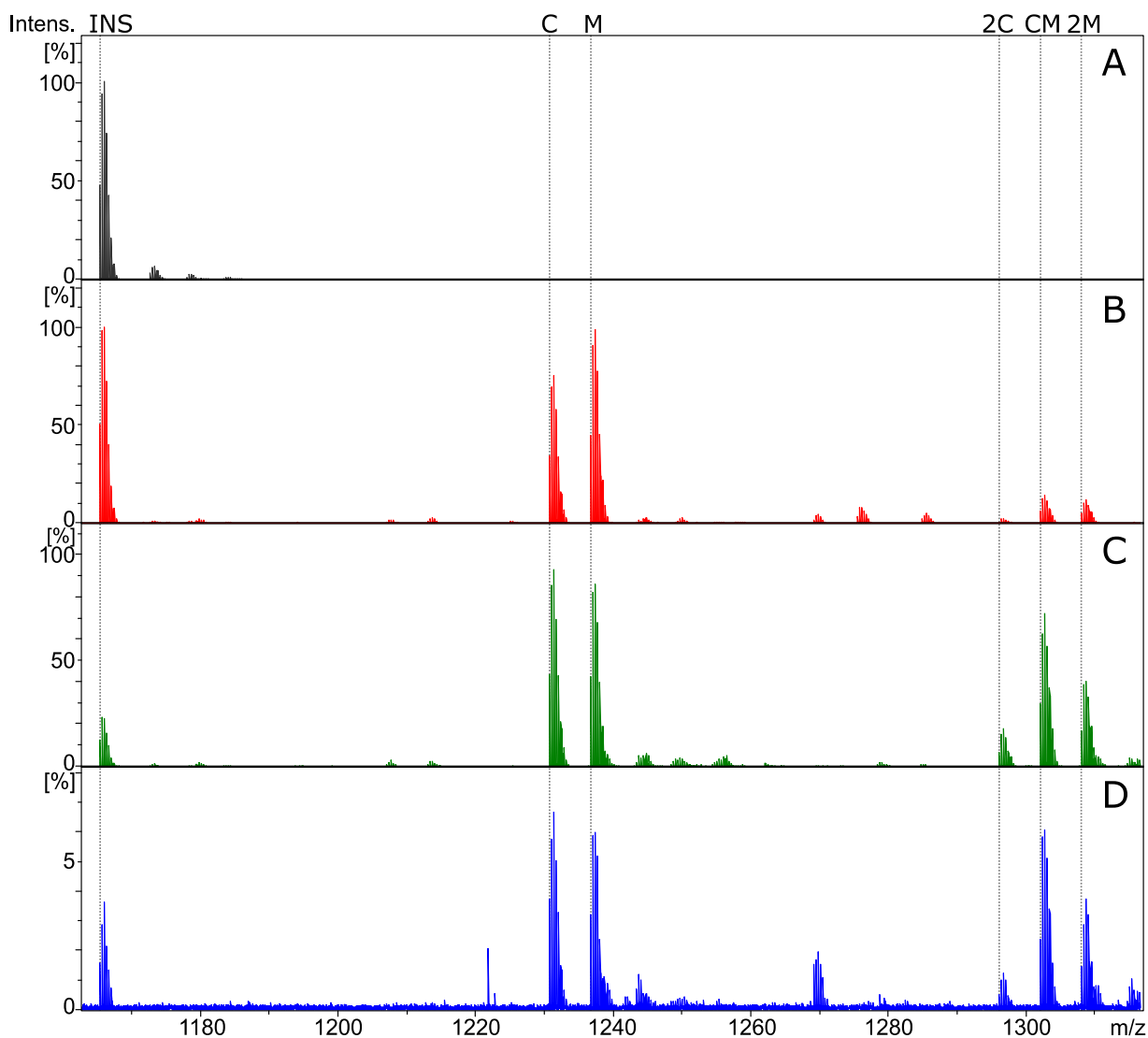
### 4.1.3 DSBU

#### Srovnání hmotnostních spekter pro různá pH

Obrázek 21 (str. 49) srovnává hmotnostní spektra modifikace  $\beta$ Insulinu pomocí DSBU při třech různých pH. Lze pozorovat, že při pH 6,0 je nejintenzivnějším z modifikovaných iontů  $\beta$ Insulinu ten modifikovaný produktem typu 0 (monolink), jehož intenzita je srovnatelná s intenzitou nemodifikovaného  $\beta$ Insulinu. Intenzita  $\beta$ Insulinu modifikovaného produktem typu 1 (intraeptidové spojení) dosahuje přibližně sedmdesáti procent intenzity iontu monolinku. Ve spektru se též vyskytují ionty odpovídající vícenásobným modifikacím  $\beta$ Insulinu, jejichž intenzita je v porovnání s výše zmíněnými ionty zanedbatelná.

Se zvýšením pH na hodnotu 7,0 (obr. 21C, str. 49) dochází ke změně poměrů intenzit ve spektru. Modifikované ionty dosahují vyšší intenzity než nemodifikovaný  $\beta$ Insulin. Nejvyšší intenzitu zaznamenáváme u  $\beta$ Insulinu s intraeptidovým spojením a monolinku s tím, že u zesíťovaného iontu je hodnota intenzity nepatrně vyšší. Z vícenásobně modifikovaných iontů dosáhl nejvyšší intenzity iont odpovídající hmotě  $\beta$ Insulinu s monolinkem a zároveň s intraeptidovým spojením, jehož intenzita dosáhla asi tří čtvrtin intenzity iontu s modifikací produktem typu 1 (intraeptidové spojení). Intenzita iontu  $\beta$ Insulinu s dvěma navázanými monolinky dosahuje přibližně poloviny intenzity iontu odpovídajícímu intraeptidovému spojení s monolinkem, zatímco intenzita  $\beta$ Insulinu s dvěma intraeptidovými spojeními je srovnatelná s intenzitou nemodifikovaného  $\beta$ Insulinu.

Při zvýšení pH na hodnotu 8,0 (obr. 21D, str. 49) nedochází k výraznějším změnám v hodnotě intenzit ve spektru. Nejintenzivnějšími ionty jsou stále ty odpovídající  $\beta$ Insulinu s intraeptidovým spojením a monolinku, dále o trochu vyšší hodnoty dosáhl  $\beta$ Insulin s intraeptidovým spojením a monolinkem, jehož intenzita byla srovnatelná s tou monolinku. Intenzita  $\beta$ Insulinu s dvěma monolinky znovu dosáhla asi poloviny  $\beta$ Insulinu s intraeptidovým spojením a s monolinkem, zatímco intenzita dvakrát  $\beta$ Insulinu s dvěma intraeptidovými spojeními byla v porovnání s ostatními modifikacemi zanedbatelná. Intenzita nemodifikovaného  $\beta$ Insulinu byla přibližně poloviční oproti nejintenzivnějšímu iontu spektra.



Obr. 21 Hmotnostní spektra  $\beta$ Insulinu nemodifikovaného (A) a modifikovaného pomocí DSBU při pH 6,0 (B), při pH 7,0 (C) při pH 8,0 (D). Všechna spektra jsou přibližena na nábojový stav 3+. Popisky nad spektry značí m/z odpovídající izotopové obálce nemodifikovanému  $\beta$ Insulinu (INS),  $\beta$ Insulinu s intrapeptidovým spojením (C),  $\beta$ Insulinu s monolinkem (M),  $\beta$ Insulinu s dvěma intrapeptidovými spojeními (2C),  $\beta$ Insulinu s dvěma monoliky (2M) a  $\beta$ Insulinu s intrapeptidovým spojením a s monolinkem (CM)

Srovnáním s hmotnostními spektry acetylace  $\beta$ Insulinu pomocí NHS-Ac (obrázek 15, str. 40) vidíme podobné závislosti. Zatímco při pH 6,0 je v obou spektrech intenzivní ion

nemodifikovaného  $\beta$ Insulinu, se zvýšením pH jeho intenzita klesá a spektrum pro pH 7,0 a 8,0 dominují ionty odpovídající modifikacím.

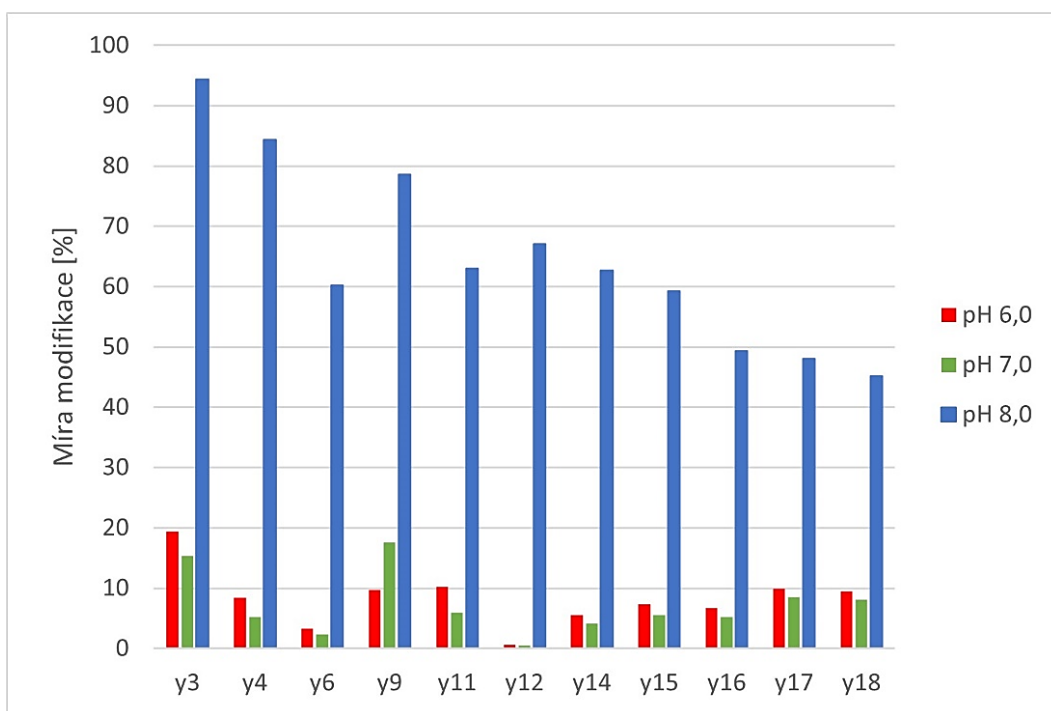
### MS-MS analýza produktů typu 0 (monolinku)

Obrázek 22 (str. 51) ukazuje míru modifikace pro vybrané *y* fragmenty.

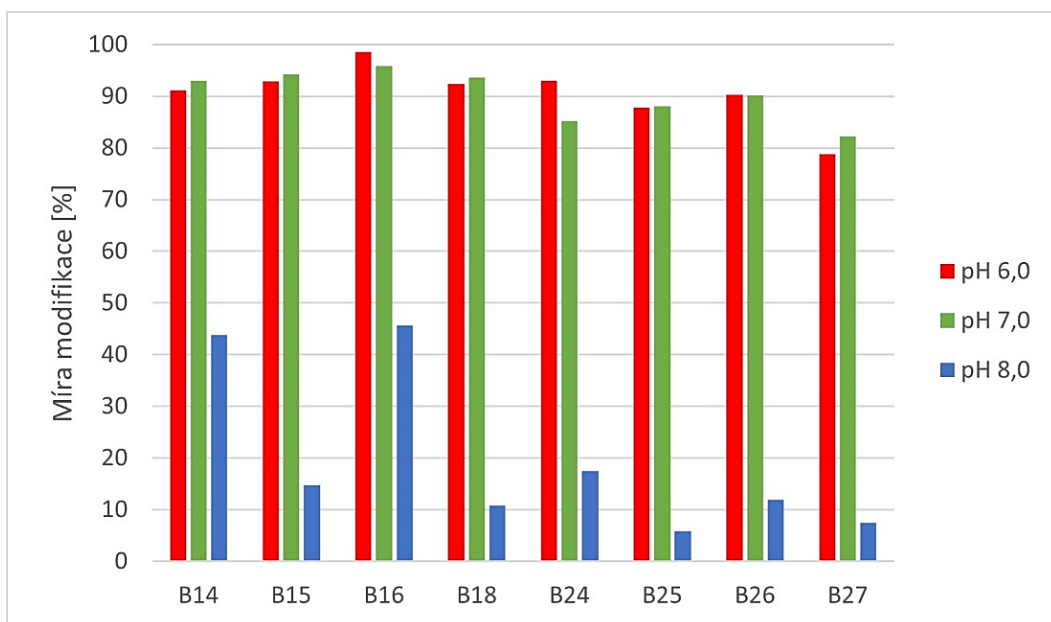
Lze pozorovat, že při pH 6,0 dosáhl nejvyšší míry modifikace fragment *y3*. Všechny ostatní *y* fragmenty při tomto pH dosáhly úrovně modifikace nižší než 10 %, ačkoliv obsahovaly více modifikovatelných skupin než *y3*. Se zvýšením pH reakce na 7,0 klesla míra modifikace všech *y* fragmentů vyjma *y9*, u kterého došlo k nárůstu modifikace. Při pH 8,0 lze sledovat u všech fragmentů signifikantní nárůst míry modifikace, která s rostoucí délkou fragmentu klesá, byť s výjimkami. Fragmenty *y16*, *y17* a *y18* jsou jediné, které při tomto pH nedosáhly míry modifikace 50 %, ačkoliv obsahují nejvíce modifikovatelných skupin z uvedených *y* fragmentů.

Dle obrázku 23 (str. 51) dosáhly všechny *b* fragmenty krom *b25* a *b27* při pH 6,0 míry modifikace vyšší než 90 %. Při pH 7,0 vykazují *b* fragmenty stále vysokou míru modifikace. Nejnižší hodnoty dosáhl fragment *b27* (82,3 %). Při pH 8,0 vidíme značný pokles míry modifikace všech *b* fragmentů, ačkoliv tyto hodnoty jsou poměrně rozptýlené. Fragmenty *b14* a *b16* dosáhly míry modifikace vyšší než 40 %, zatímco všechny ostatní nedosáhly 20 %.

Zatímco míra modifikace *y* fragmentů při pH 6,0 a 7,0 byla nízká, u *b* fragmentů byla situace opačná – nejvyšší míry modifikace dosáhly při pH 6,0 a 7,0. Při pH 8,0 dochází ke změně míry intenzity u *y* i *b* fragmentů. Míra modifikace *y* fragmentů při tomto pH je mnohem vyšší než při pH 6,0 a 7,0, zatímco u *b* fragmentů dochází ke snížení míry intenzity.



Obr. 22 Závislost míry modifikace vybraných y fragmentů na pH pro DSBU.



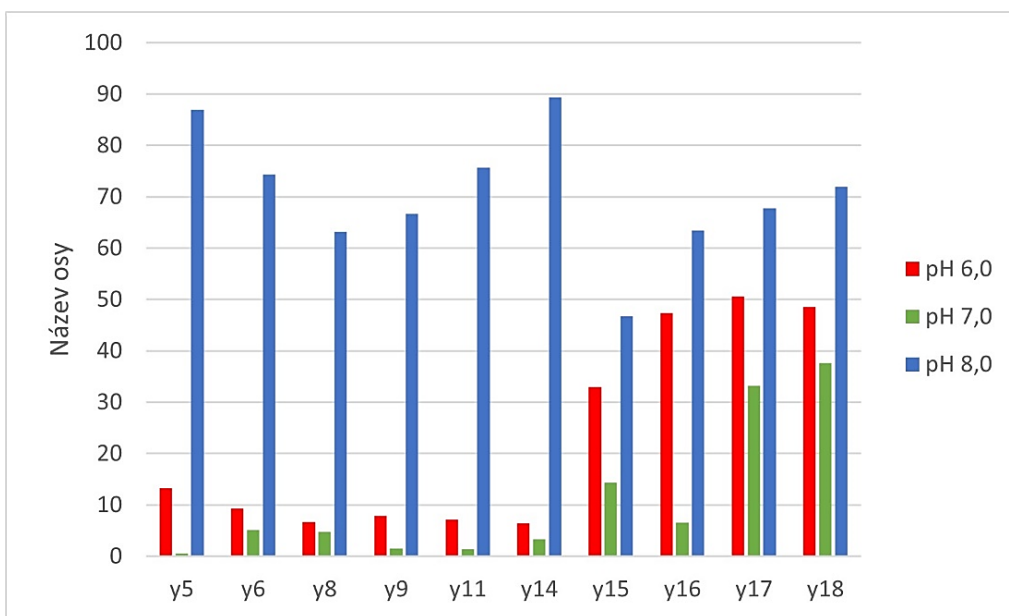
Obr. 23 Závislost míry modifikace vybraných b fragmentů na pH pro DSBU.

### MS/MS analýza produktu typu 1 (intrapeptidové spojení)

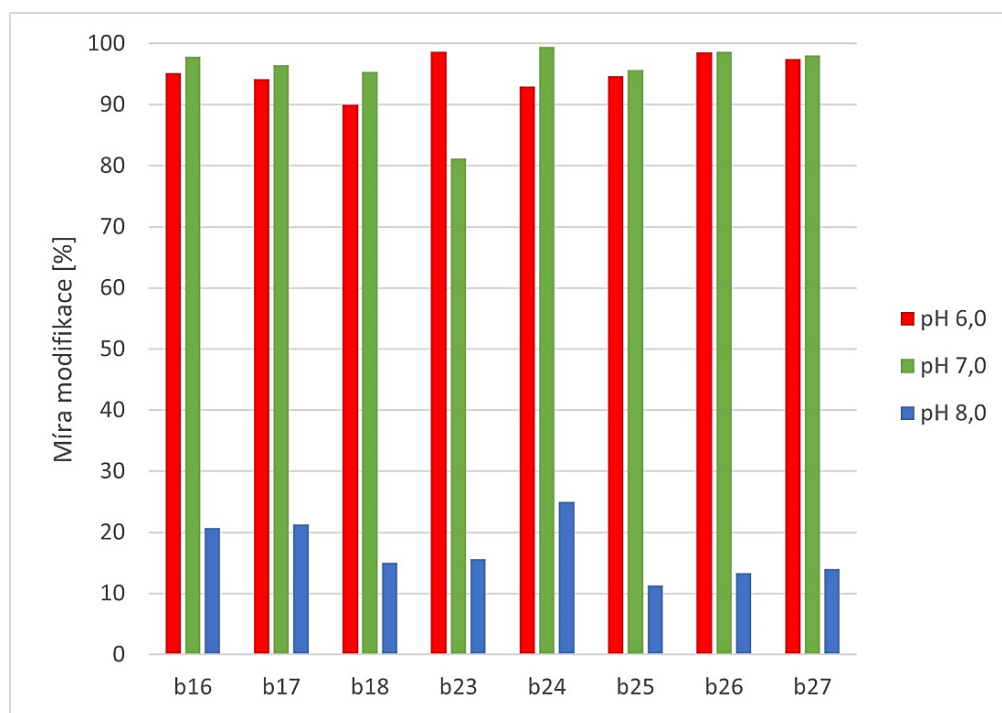
Obrázek 24 (str. 53) ukazuje míry modifikace vybraných  $y$  fragmentů při třech použitých pH.

Při pH 6,0  $y$  fragmenty menší než  $y14$  dosáhly míry modifikace kolem 10 %, zatímco u fragmentů  $y15$  a vyšších pozorujeme nárůst míry modifikace, jež se pohybovala od 30 do 50 %.  $y15$  je fragment obsahující dva postranní řetězce tyrosinu, threoninu a lysinu, zatímco  $y5$  a vyšší obsahují jen jeden postranní řetězec tyrosinu, threoninu a lysinu. Zvýšení pH na 7,0 vede k poklesu míry modifikace oproti pH 6,0. Opět pozorujeme u fragmentů  $y15$ ,  $y17$  a  $y18$  nárůst intenzity oproti ostatním fragmentům (u  $y16$  není nárůst míry modifikace tak značný). Další zvýšení pH na 8,0 vede ke zvýšení úrovně modifikace všech  $y$  fragmentů. Vidíme, že fragmenty  $y14$  a menší dosáhly při pH 8,0 mnohem vyšší míry intenzity než při pH 6,0 a 7,0, zatímco rozdíl mezi mírami intenzit pro různá pH nebyl tak veliký pro fragmenty  $y15$  a vyšší. Všechny  $y$  fragmenty v grafu dosáhly nejvyšší míry intenzity při pH 8,0.

Dle obrázku 25 (str. 53)  $b$  fragmenty při pH 6,0 dosáhly míry modifikace 90 % a vyšší bez ohledu na aminokyselinové složení fragmentu. Tento trend zůstal zachován i při pH 7,0, byť s výjimkou fragmentu  $b23$ , jenž dosáhl míry modifikace 81,2 %. Zvýšení pH na 8,0 vede k značnému snížení míry modifikace všech fragmentů – nejvyšší hodnoty dosáhl fragment  $b24$  (25 %), u všech ostatních se míra intenzity nižší.



Obr. 24 Závislost míry modifikace vybraných y fragmentů na pH pro DSBU. Fragmentace  $\beta$ Insulinu s intrapeptidovým spojením.



Obr. 25 Závislost míry modifikace vybraných b fragmentů na pH pro DSBU. Fragmentace  $\beta$ Insulinu s intrapeptidovým spojením.

#### 4.1.4 DIBU

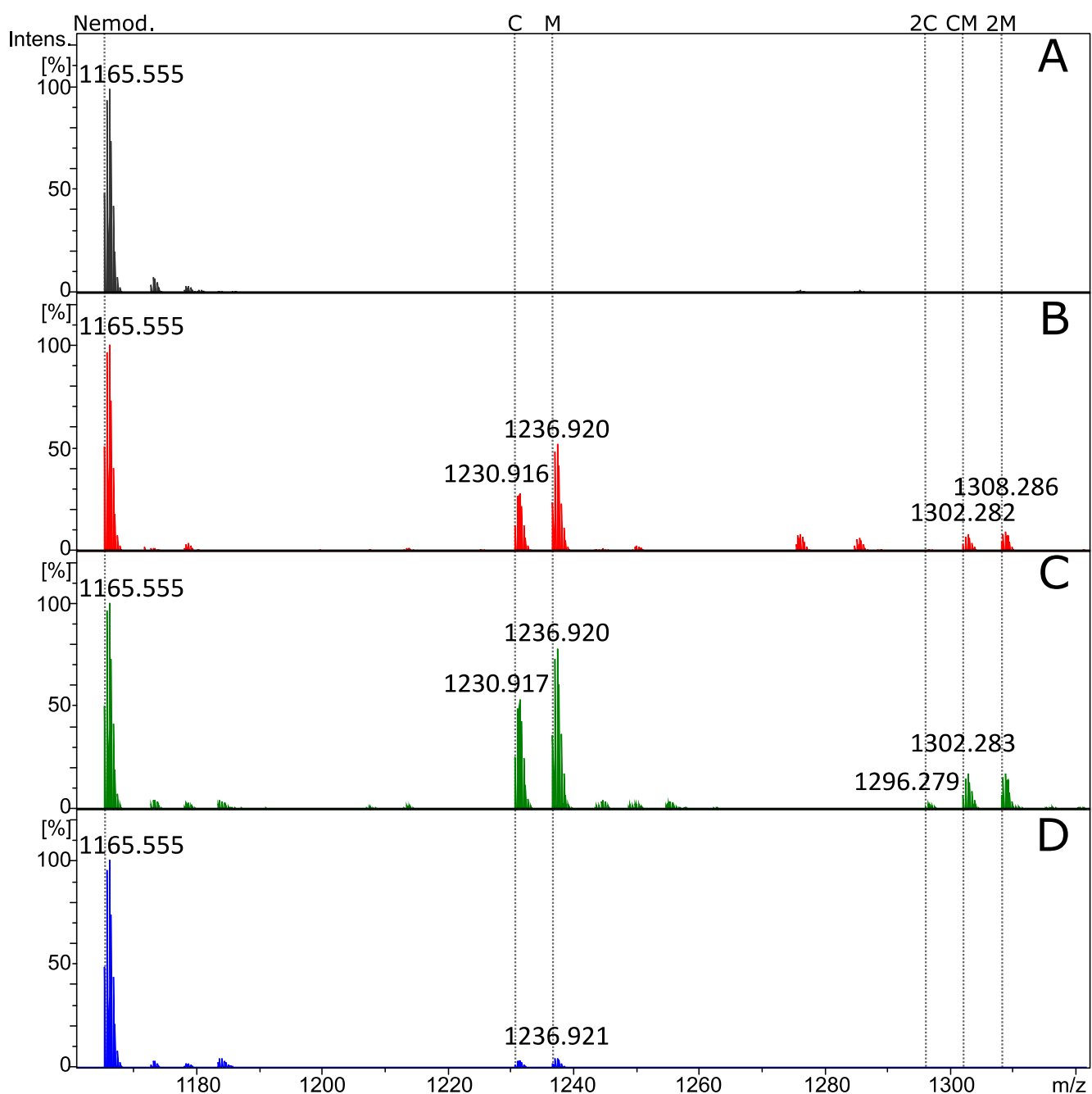
##### Srovnání hmotnostních spekter při různých pH

Níže uvedená přibližná hmotnostní spektra ukazují třikrát nabitě produkty modifikace  $\beta$ Insulinu pomocí DIBU při třech různých pH reakce. Při pH reakce 6,0 (obr. 26B, str. 55) je nejintenzivnějším iontem nemodifikovaný peptid. Ve spektru se vyskytují modifikace  $\beta$ Insulinu odpovídající monolinku, intrapeptidovému spojení, intrapeptidovému spojení a monolinku, dvěma monolinkům. Z těchto signálů je nejsilnější monolink, jehož intenzita je poloviční oproti intenzitě nemodifikovaného peptidu.

Modifikací  $\beta$ Insulinu při vyšším pH (obr. 26C, str. 55) roste intenzita signálu všech modifikací, nicméně nejintenzivnější je stále nemodifikovaný  $\beta$ Insulin. Při tomto pH (7,0) je také nejintenzivnější modifikací monolink, který má téměř stejnou intenzitu jako nemodifikovaný  $\beta$ Insulin.

Další zvýšení pH reakce (obr. 26B, str. 55) vede ke snížení intenzity všech modifikovaných peptidů a intenzita vícenásobných modifikací je zanedbatelná. Spektru modifikace při pH 8,0 dominuje nemodifikovaný peptid.

Srovnáním s hmotnostními spektry acetylace  $\beta$ Insulinu pomocí IA (obrázek 18, str. 44) vidíme podobné závislosti obou činidel na pH. Jak IA, tak DIBU reagují při pH 8,0 s  $\beta$ Insulinem nejméně, zatímco obě činidla nejvíce reagovaly při pH 7,0. Na rozdíl od NHS-Ac a DSBU je ve všech třech spektrech modifikace (pomocí IA a DIBU) přítomný intenzivní ion odpovídající nemodifikovanému  $\beta$ Insulinu. Z naměřených dat lze konstatovat, že reaktivita IA, respektive DIBU, je srovnatelná s reaktivitou NHS-Ac, respektive DSBU, při pH 6,0.



Obr. 26 Hmotnostní spektra  $\beta$ Insulinu nemodifikovaného (A) a modifikovaného pomocí DSBU při pH 6,0 (B), při pH 7,0 (C) při pH 8,0 (D). Všechna spektra jsou přibližena na nábojový stav 3+. Popisky nad spektry značí m/z odpovídající izotopové obálce nemodifikovanému  $\beta$ Insulinu (INS),  $\beta$ Insulinu s intrapeptidovým spojením (C),  $\beta$ Insulinu s monolinkem (M),  $\beta$ Insulinu s dvěma intrapeptidovými spojeními (2C),  $\beta$ Insulinu s dvěma monoliky (2M) a  $\beta$ Insulinu s intrapeptidovým spojením a s monolinkem (CM)

### MS/MS analýza produktu typu 0 (monolink)

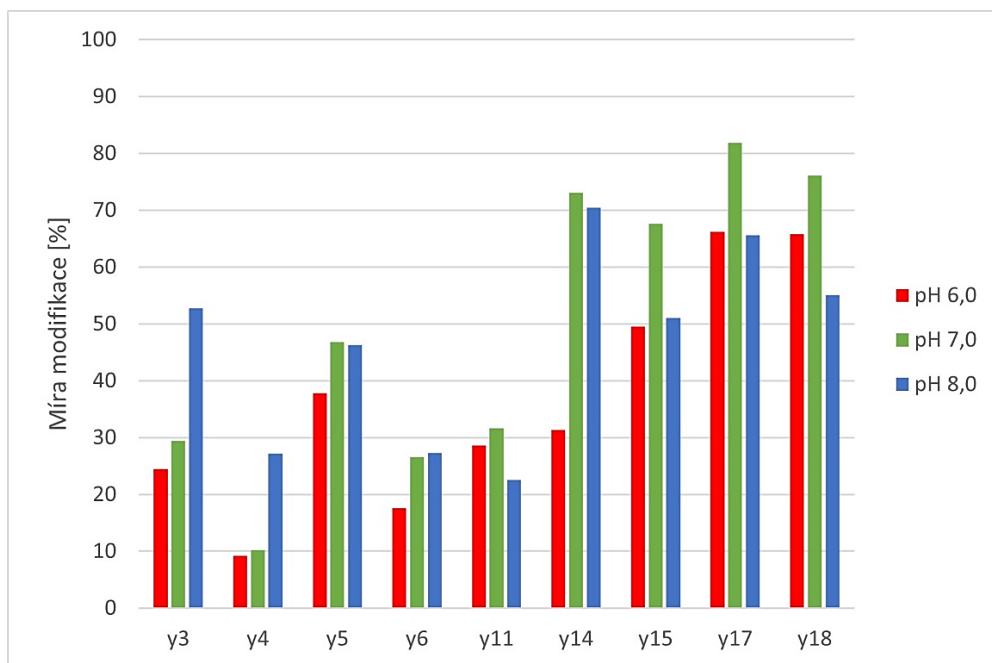
Obrázek 27 (str. 57) a obrázek 28 (str. 58) zobrazují závislost míry modifikace vybraných *y* a *b* fragmentů na použitém pH.

Při pH 6,0 vidíme, že úroveň modifikace fragmentů *y*<sub>3</sub>, *y*<sub>4</sub>, *y*<sub>5</sub>, *y*<sub>6</sub> a *y*<sub>14</sub> značně kolísá, nicméně ve všech případech je nižší než 50 %. Fragment *y*<sub>3</sub>, který obsahuje (z modifikovatelných skupin) jen aminoskupinu lysinu (K28), dosahuje míry modifikace téměř 25 %, nicméně *y*<sub>4</sub> dosahuje míry modifikace sotva 10 % (ačkoliv obsahuje také postranní řetězec lysinu a navíc postranní řetězec threoninu). Hodnota míry modifikace znovu narůstá u fragmentu *y*<sub>5</sub> (který navíc obsahuje ještě hydroxyskupinu tyrosinu, Y26) a tato hodnota je vyšší než v obou předchozích případech. *y*<sub>6</sub> má míru modifikace nižší než *y*<sub>5</sub>. Dva postranní řetězce tyrosinu obsahuje *y*<sub>15</sub>, jehož míra modifikace je téměř rovna padesáti procentům, nicméně všechny následující *y* fragmenty v obrázku 25 (které obsahují stejné nukleofilní skupiny jako *y*<sub>15</sub>) již mají míru modifikace vyšší než 50 %. Fragment *b*<sub>14</sub>, jenž obsahuje jen N-konec jako modifikovatelnou skupinu, má míru modifikace vyšší než padesát procent, ovšem hned následující fragment *b*<sub>15</sub>, který obsahuje také jen N-konec (jako modifikovatelnou skupinu), má úroveň modifikace nižší. Všechny fragmenty od *b*<sub>16</sub> (N-konec a Y16) mají míru modifikace vyšší než padesát procent s tím, že nejvyšších hodnot dosáhly fragmenty *b*<sub>24</sub> a *b*<sub>27</sub> (Y26).

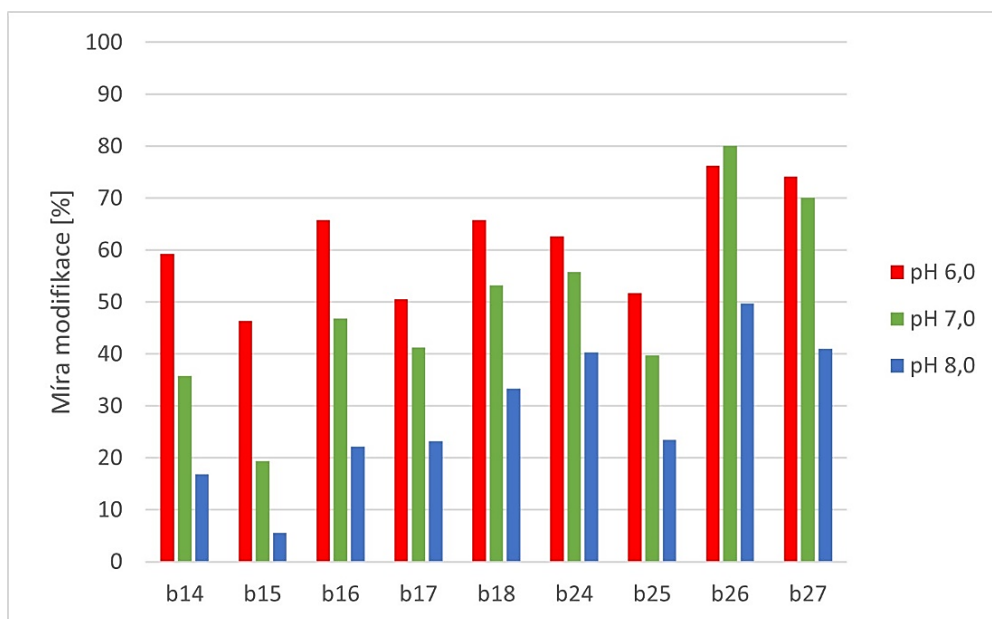
Míra modifikace *y* fragmentů se mění podobně při pH 7,0 jako při pH 6,0, ačkoliv jsou tyto hodnoty vyšší pro pH 7,0. Poměrně nápadným rozdílem jsou hodnoty u fragmentu *y*<sub>14</sub>, jehož míra modifikace je téměř 75 % a je vyšší než fragmentu *y*<sub>15</sub>, který oproti němu navíc obsahuje druhý postranní řetězec tyrosinu. Fragmenty *y*<sub>14</sub> a vyšší tedy mají míru modifikace vyšší než 50 %. Fragment *b*<sub>14</sub>, na rozdíl od pH 6,0, dosáhl míry modifikace menší než padesát procent stejně jako fragment *b*<sub>15</sub>. Fragmenty *b*<sub>16</sub> a *b*<sub>18</sub> měly míru modifikace blízkou 50 %. Velké *b* fragmenty krom *b*<sub>25</sub> dosáhly vysoké míry modifikace (*b*<sub>26</sub> a *b*<sub>27</sub> dosáhly nejvyšší míry modifikace z *b* fragmentů).

Míra modifikace *y*<sub>3</sub> fragmentu při pH 8,0 je vyšší než padesát procent, což představuje značný nárůst oproti předchozím dvěma pH. V ostatních případech v grafu je míra modifikace menší než padesát procent až po fragment *y*<sub>14</sub>, který dosáhl nejvyšší hodnoty. Všechny následující *y* fragmenty dosáhly také míry modifikace vyšší než padesát procent.

*b* fragmenty uvedené v grafu mají míru modifikace vždy menší než padesát procent bez ohledu na aminokyselinové složení fragmentu. Míra modifikace *b14* a *b15* je nižší než u ostatních *b* fragmentů, které obsahují navíc i hydroxyskupiny tyrosinu. Nejvyšší hodnoty (téměř 50 %) dosáhl fragment *b26*, který obsahuje dva postranní řetězce tyrosinu.



Obr. 27 Závislost míry modifikace vybraných *y* fragmentů na pH pro DIBU.



Obr. 28 Závislost míry modifikace vybraných *b* fragmentů na pH pro DIBU.

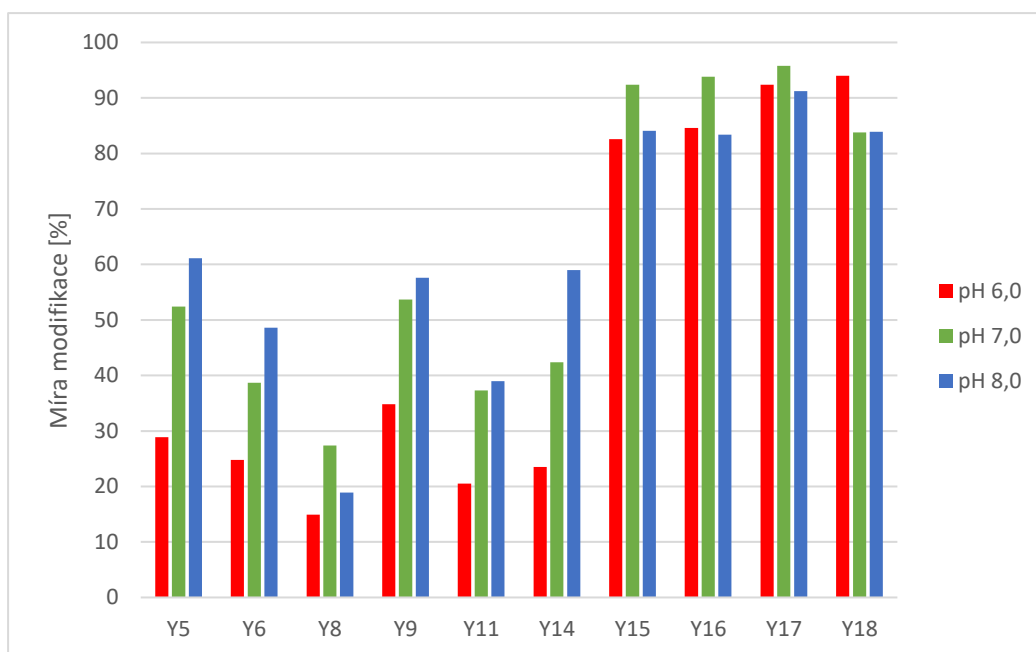
### MS-MS analýza produktu typu 1 (intrapeptidové spojení)

Níže uvedené obrázky (obr. 29, str. 59 a obr. 30, str. 59) ukazují míry modifikace  $\beta$ Insulinu s intrapeptidovým spojením pro *y* a *b* fragmenty při třech různých pH pro různé fragmenty.

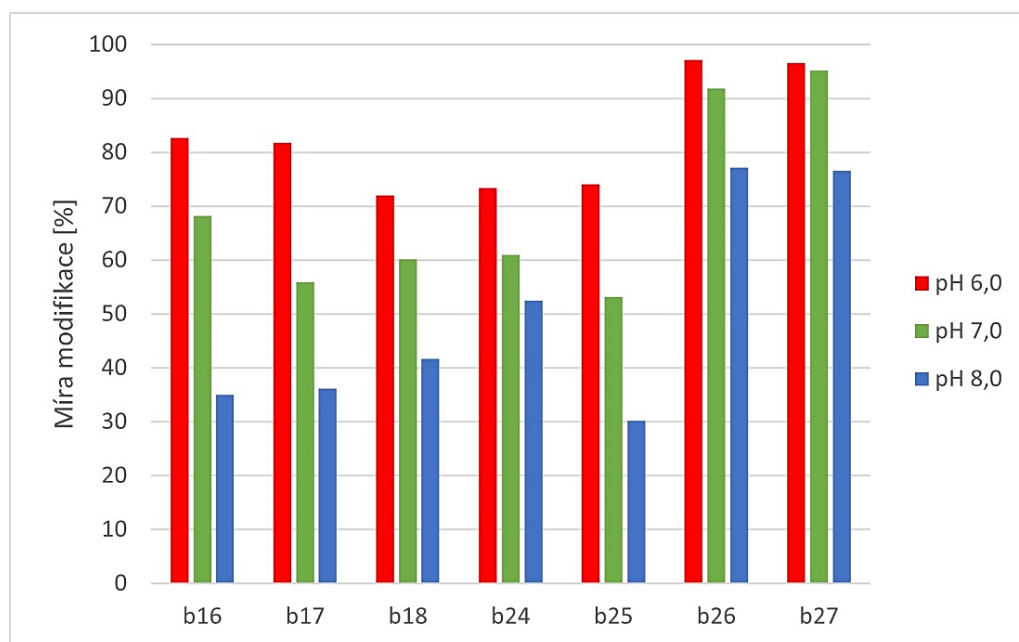
Při pH 6,0 můžeme pozorovat, že *y* fragmenty vyšší než *y15* – tedy ty obsahující postranní řetězce lysinu, threoninu a obou tyrosinů jako nukleofilní skupiny - dosahují nejvyšší míry modifikace mezi *y* fragmenty, kterou mají všechny vyšší než 80 %. Nižší *y* fragmenty mají míru modifikace menší než padesát procent a tyto hodnoty kolísají od . Tyto *y* fragmenty obsahují postranní řetězce lysinu, threoninu a tyrosinu. Všechny *b* fragmenty uvedené v tabulce dosahují míry modifikace vyšší než 70 % s tím, že nejvyšších hodnot dosáhly fragmenty *b26* a *b27*, které obsahují N-konec a dva postranní řetězce tyrosinu (*b27* navíc ještě postranní řetězec threoninu) jako modifikovatelné skupiny. Oba tyto fragmenty dosáhly míry modifikace vyšší než 95 %.

Při pH 7,0 míry modifikace *y* fragmentů menších než *y15* opět kolísají. *y5* a *y9* dokonce dosáhly míry modifikace vyšší než 50 %, nicméně všechny ostatní měly míru modifikace menší, ačkoliv obsahují stejné nukleofilní skupiny. Od fragmentu *y15* jsou míry modifikací mnohem vyšší než padesát procent - nejnižší hodnoty dosáhl fragment *y18* (83,8 %). U *b* fragmentů jsou všechny poměry intenzit větší než jedna s maximem u fragmentů *b26* a *b27*, jež mají míru modifikace vyšší než 90 %.

Při pH 8,0 se míry modifikace *y* fragmentů opět liší v závislosti na aminokyselinovém složení daného fragmentu. *y5* fragment, obsahující postranní řetězec lysinu, threoninu a tyrosinu, dosahuje míry modifikace větší než padesát procent, zatímco fragmenty *y6* a *y8* dosahují poměru nižšího (ačkoliv obsahují stejné nukleofilní skupiny jako *y5*). *y15* a větší fragmenty, které obsahují oba postranní řetězce tyrosinu, jeden lysinu a threoninu, znovu dosahují poměrů intenzit mnohem větších než jedna. Míra modifikace *b* fragmentů je nižší než při pH 6,0 a 7,0 a je nižší než 50 % u fragmentů menších než *b24*. fragmenty *b24* a vyšší mají míru modifikace vyšší než 50 % (výjimkou je fragment *b25*), ovšem i u těchto fragmentů je znatelný pokles oproti dvou předchozím pH.



Obr. 29 Závislost míry modifikace vybraných y fragmentů. Fragmentace zesítěného  $\beta$ Insulinu pro DIBU.



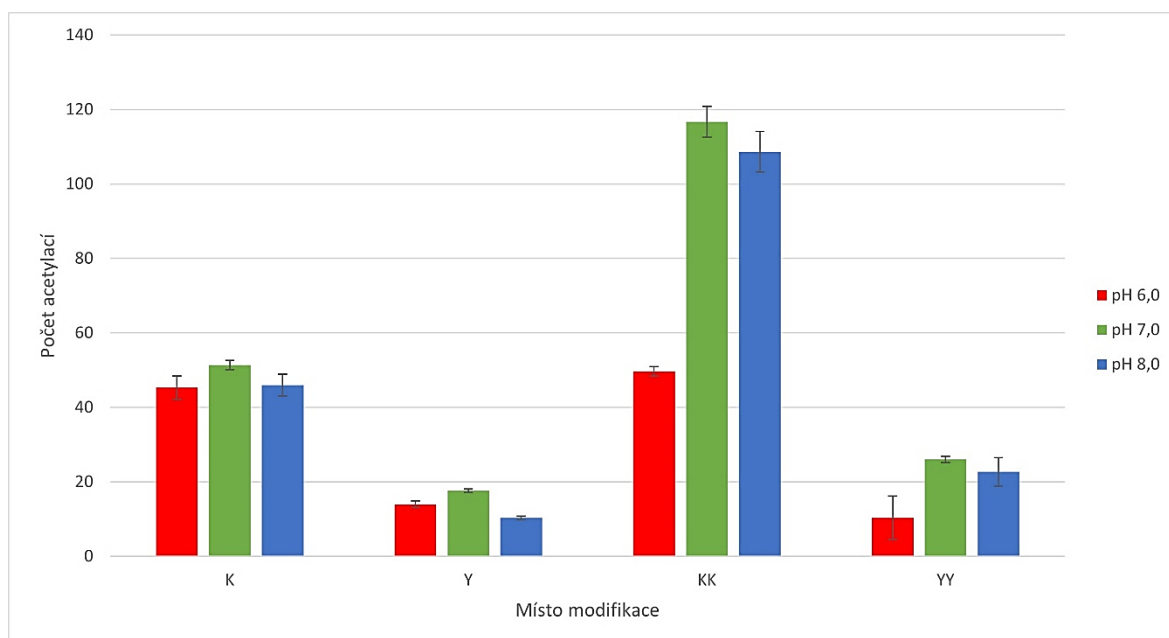
Obr. 30 Závislost míry modifikace vybraných b fragmentů. Fragmentace zesítěného  $\beta$ Insulinu pro DIBU.

## 4.2 Přístup zdola nahoru

### 4.2.1 Monolinky

#### NHS-Ac

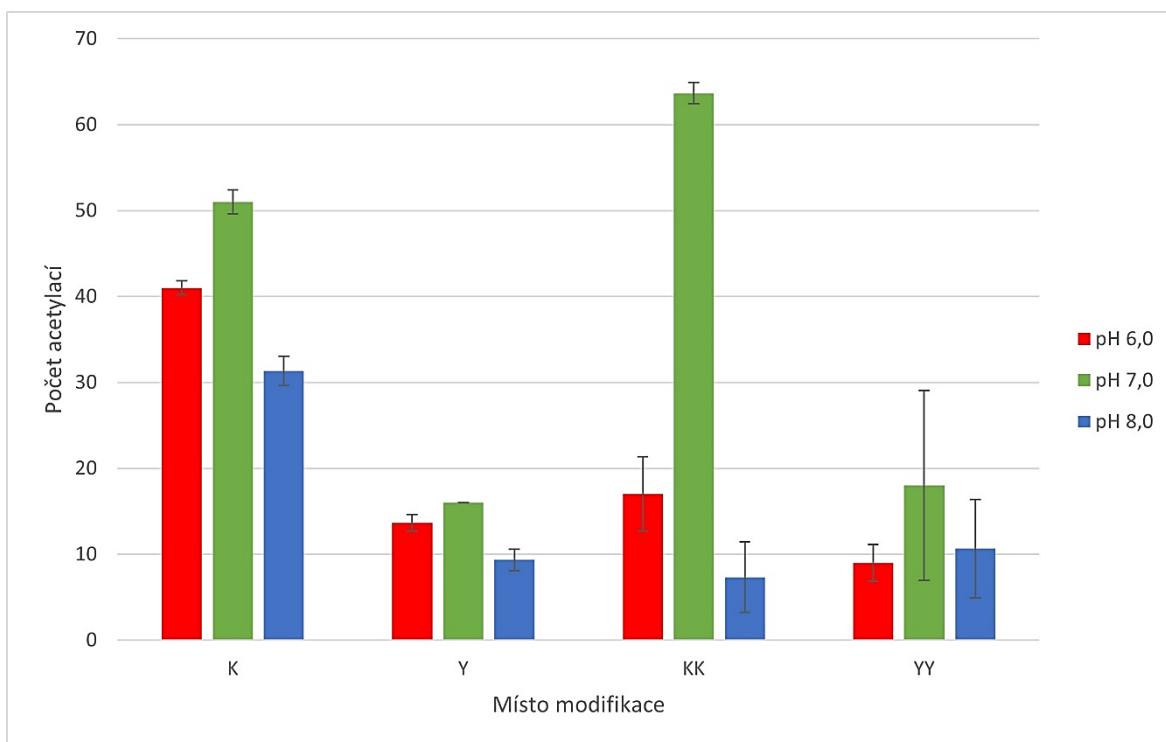
Ze srovnání počtu acetylací peptidů BSA pomocí NHS-Ac (obr. 31) při různých pH lze vyčíst, že nejvíce peptidů bylo acetylováno při pH 7,0 a při všech měřených pH byl nejčastěji acetylovanou aminokyselinou lysin. Při pH 7,0 a 8,0 lze sledovat veliký nárůst počtu vícenásobně acetylovaných peptidů, ve kterých opět dominoval postranní řetězec lysinu. Postranní řetězec tyrosinu byl acetylován méně než lysin s tím, že nejvíce byl acetylován také při pH 7,0. Počet acetylací tyrosinu při pH 6,0 a 7,0 je srovnatelný.



Obr. 31 Graf závislosti počtu identifikovaných peptidů s jednou modifikací postranního řetězce lysinu (sloupce K) a tyrosinu (sloupce Y) a s dvěma a více modifikovanými lysiny (sloupce KK) a tyrosiny (sloupce YY) při různých pH pro NHS-Ac.

## IA

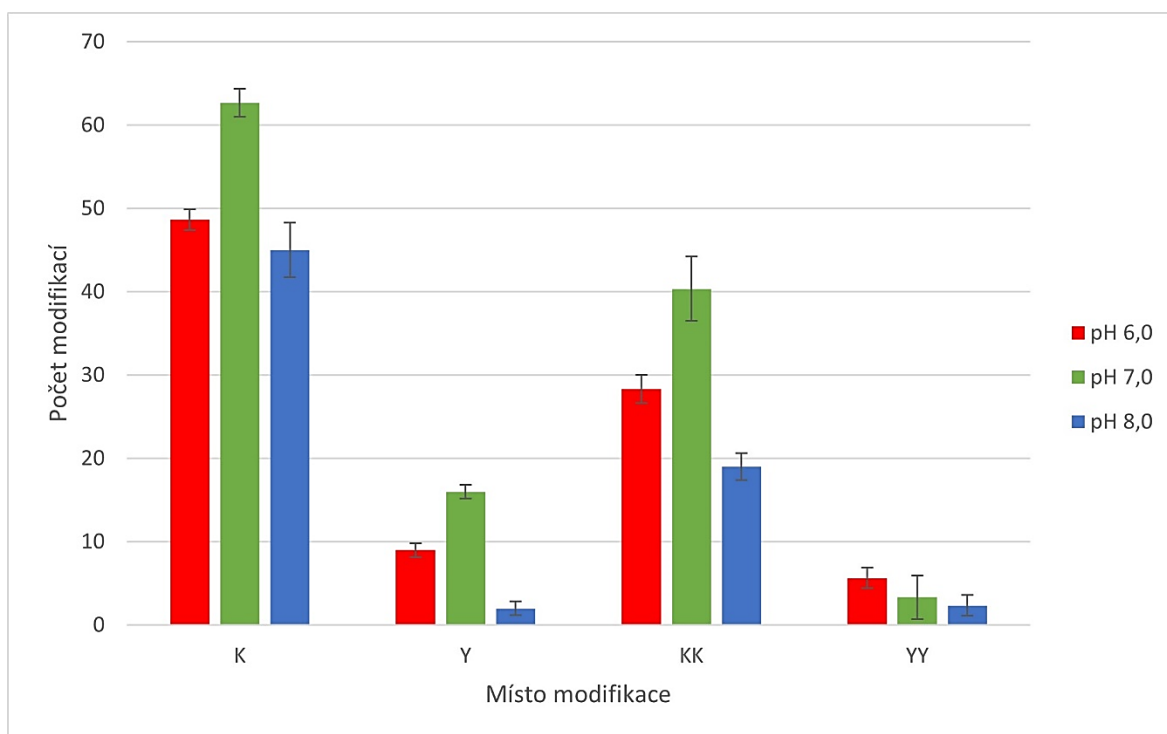
Z obrázků 32 lze pozorovat, že k acylaci BSA pomocí IA při všech třech použitých pH dochází také nejčastěji na postranním řetězci lysinu. Při pH 7,0 bylo nalezeno nejvíce takových peptidů a lze sledovat nárůst počtu vícenásobně acetylovaných peptidů, zatímco počet acetylovaných peptidů při pH 6,0 byl vyšší než při pH 8,0. Postranní řetězec tyrosinu byl nejčastěji modifikován při pH 7,0, zatímco počet modifikací při pH 6,0 a 8,0 byl srovnatelný. Srovnáním počtu acetylací při použití NHS-Ac a IA lze shrnout, že při všech třech pH byl počet acetylací pomocí NHS-Ac vyšší než při použití IA a že obě činidla nejčastěji acetylovala postranní řetězec lysinu.



Obr. 32 Graf závislosti počtu identifikovaných peptidů s jednou modifikací postranního řetězce lysinu (sloupce K) a tyrosinu (sloupce Y) a s dvěma a více modifikovanými lysiny (sloupce KK) a tyrosiny (sloupce YY) při různých pH pro IA.

## DSBU

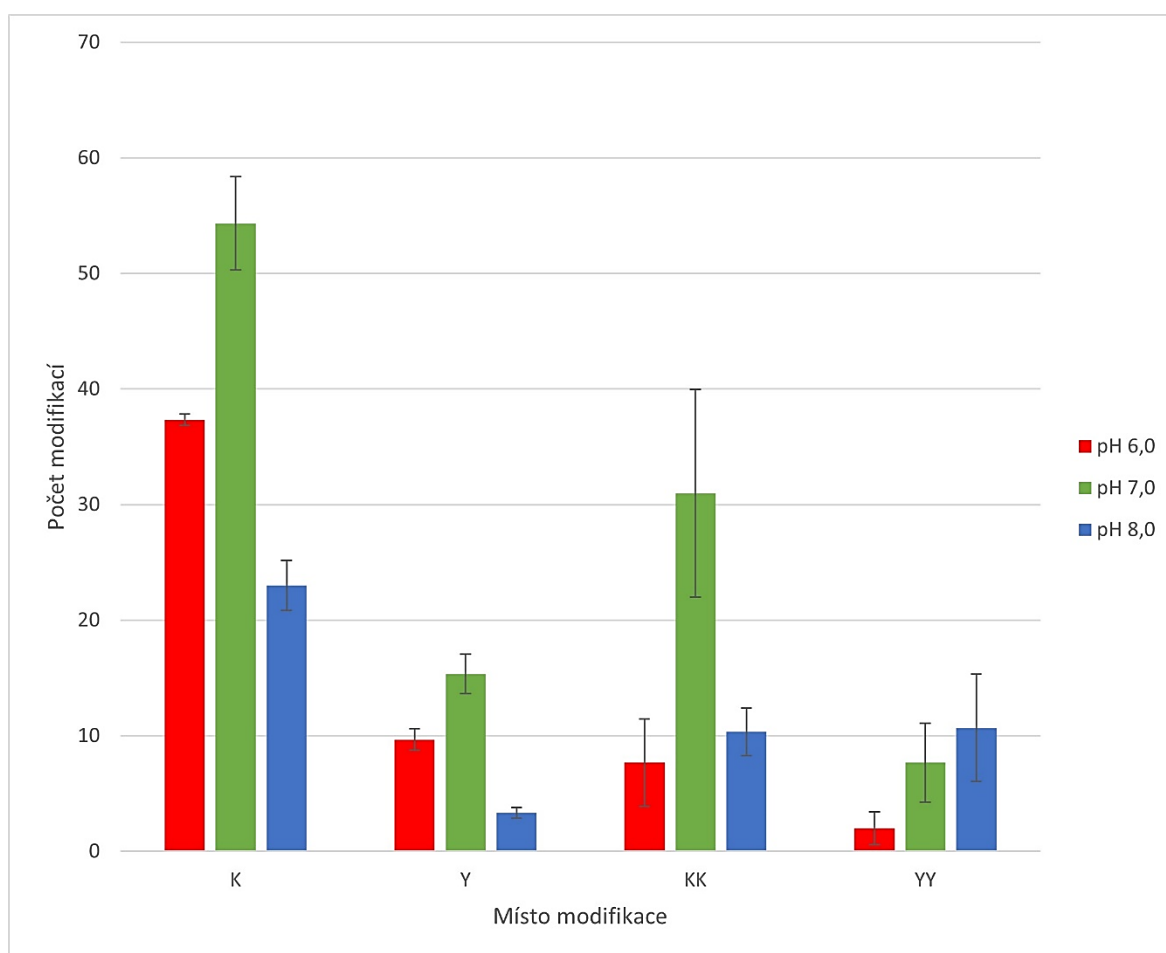
Činidlo DSBU, jehož reaktivní skupiny jsou totožné s tou NHS-Ac, je homobifunkční a reakcí s proteinem může dojít k tvorbě spojení, a to jak intrapeptidových, tak interpeptidových. V níže uvedeném obrázku (obr. 33) jsou nicméně uvedeny jen počty monolinků. Stejně jako při použití NHS-Ac bylo BSA tímto činidlem také nejvíce modifikováno při pH 7,0 – jedinou výjimkou byla modifikace postranního řetězce tyrosinu ve vícenásobně modifikovaných peptidech, kde byl tyrosin nejčastěji modifikován při pH 6,0. Při všech pH byl nejčastěji modifikován postranní řetězec lysinu. Nápadný rozdíl v počtu acetylací oproti činidlu NHS-Ac je v porovnání počtu jedenkrát a vícekrát modifikovaných peptidů – zatímco při použití NHS-Ac dominovaly při pH 7,0 a 8,0 vícekrát modifikované peptidy, u DSBU je tomu opačně. Toto činidlo modifikovalo postranní řetězec tyrosinu nejčastěji při pH 6,0 a 7,0 (při pH 7,0 trochu častěji), zatímco při pH 8,0 jen minimálně.



Obr. 33 Graf závislosti počtu identifikovaných peptidů s jednou modifikací postranního řetězce lysinu (sloupce K) a tyrosinu (sloupce Y) a s dvěma a více modifikovanými lysiny (sloupce KK) a tyrosiny (sloupce YY) při různých pH pro DSBU.

## DIBU

Činidlo DIBU má obě reaktivní skupiny stejné jako IA. Vzhledem k tomu, že toto činidlo je homobifunkční, může reakcí s proteinem dojít ke vzniku intrapeptidového spojení, nicméně v uvedeném obrázku jsou jen počty peptidů s monolinkem. Z obrázku 34 vidíme, že toto činidlo nejvíce modifikovalo BSA při pH 7,0 s tím, že nejčastěji byl modifikován postranní řetězec lysinu. Postranní řetězec tyrosinu byl tímto činidlem nejčastěji modifikován při pH 7,0 (u vícenásobně modifikovaných peptidů tomu bylo při pH 8,0, nicméně z tabulek vidíme, že tyto hodnoty jsou jednak poměrně rozptýlené a při sečtení počtu modifikací postranního řetězce tyrosinu u jedenkrát a vícekrát modifikovaných peptidů jich je více při pH 7,0). Ve srovnání s IA bylo při pH 7,0 nalezeno mnohem méně



Obr. 34 Graf závislosti počtu identifikovaných peptidů s jednou modifikací postranního řetězce lysinu (sloupce K) a tyrosinu (sloupce Y) a s dvěma a více modifikovanými lysiny (sloupce KK) a tyrosiny (sloupce YY) při různých pH pro DIBU.

vícekrát modifikovaných peptidů. Při srovnání DIBU a DSBU lze pozorovat, že obě činidla modifikovala peptidy BSA nejčastěji při pH 7,0 a také že počet modifikací peptidů BSA pomocí DSBU byl při všech pH vyšší než počet modifikací pomocí DIBU.

#### **4.2.2 Intra- a interpeptidová spojení**

##### **pH 6,0**

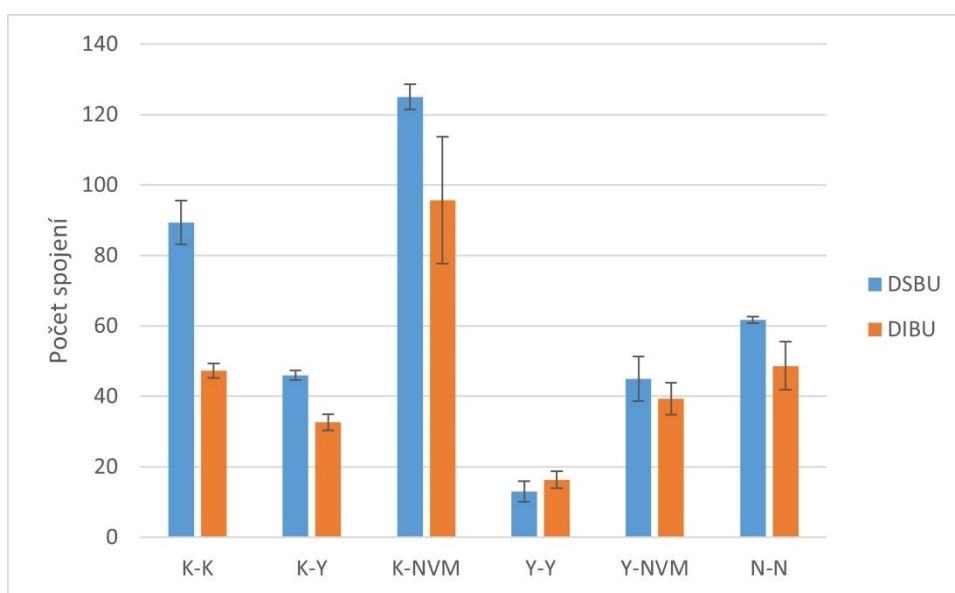
Na obrázku 35 (str. 65) lze pozorovat, že při pH 6,0 byl u obou činidel nejčastěji spojován postranní řetězec lysinu. U obou činidel bylo napočítáno nejvíce spojení mezi postranním řetězcem lysinu a druhým blíže neurčeným postranním řetězcem. Krom spojení dvou postranních řetězců tyrosinu bylo pokaždé napočítáno více spojení při použití DSBU než DIBU. Nejnápadnější rozdíl v počtu spojení byl nalezen u spojení dvou postranních řetězců lysinu, kde u DSBU byl nalezen téměř dvojnásobek spojení pomocí DIBU.

##### **pH 7,0**

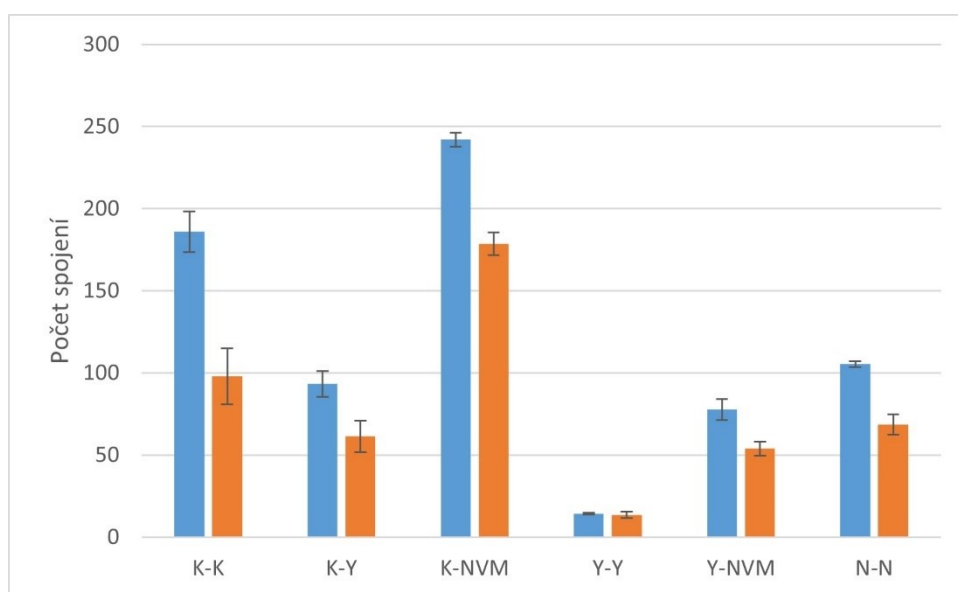
Při pH 7,0 (obr. 36, str. 65) bylo, na rozdíl od pH 6,0, nalezeno téměř shodné množství spojení mezi postranními řetězci tyrosinu jak při použití DSBU, tak i DIBU (14,3 pro DSBU a 13,6 pro DIBU). Opět platí, že více spojení bylo nalezeno při použití DSBU než DIBU. Lysin byl i při tomto pH nejčastěji spojovanou aminokyselinou. Vidíme nárůst počtu všech typů spojení u obou činidel krom zesílení dvou postranních řetězců tyrosinu.

##### **pH 8,0**

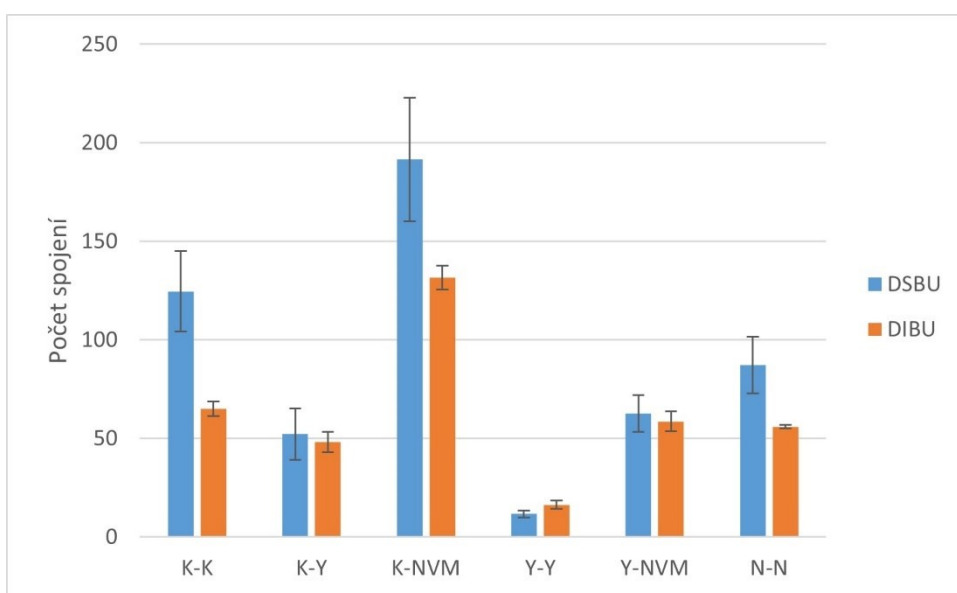
Při použití pH 8,0 (obr. 37, str. 66) vidíme pokles počtu všech typů spojení oproti pH 7,0 (nicméně jich bylo více než při pH 6,0) krom spojení dvou postranních řetězců tyrosinu, jejichž počet byl více méně konstantní napříč všemi použitými pH a pohyboval se kolem 15. Stejně jako při obou předchozích pH byl nejčastěji spojován postranní řetězec lysinu. Krom případu spojení dvou postranních řetězců tyrosinu bylo vždy napočítáno více spojení při použití DSBU než DIBU.



Obr. 35 Počty nalezených spojení mezi postranními řetězci lysinu, tyrosinu a neurčených aminokyselin pro obě činidla při pH 6,0.



Obr. 36 Počty nalezených spojení mezi postranními řetězci lysinu, tyrosinu a neurčených aminokyselin pro obě činidla při pH 7,0.



*Obr. 37 Počty nalezených zesíťení mezi postranními řetězci lysinu, tyrosinu a neurčených aminokyselin pro obě činidla při pH 8,0.*

## 5 Diskuze

Prvotním záměrem stojícím za vznikem této práce byla snaha rozšířit současnou paletu síťovacích činidel o činidlo, které by se selektivně vázalo na tyrosin. Impulsem k této snaze byla studie Leavel et al.,<sup>70</sup> která popisuje, že se činidla obsahující NHS-ester, která za pH 7,0 modifikují lysiny, se mohou za pH 6,0 vázat na tyrosin. Zároveň s činidly obsahující NHS-esterovou skupinu jsme testovali i jejich deriváty obsahující imidazolovou skupinu, o které bylo rovněž publikováno, že s tyrosiny reaguje.<sup>71</sup> K ověření tohoto chování byl jako modelový protein použit beta oxidovaný řetězec insulínu ( $\beta$ Insulin), který obsahuje 30 aminokyselin z toho 2 tyrosiny, 1 lysin.  $\beta$ Insulin byl modifikován čtyřmi činidly při třech různých pH. Z obrázků (obr. 15, str. 40; obr. 18, str. 44; obr. 21, str. 49; obr. 26, str. 55) porovnání hmotnostních spekter pro jednotlivá činidla lze pozorovat, že činidla obsahující imidazolovou skupinu se váží na  $\beta$ Insulin efektivněji při pH 6,0 a 7,0 zatímco činidla obsahující NHS-ester reagují lépe při pH 7,0 a 8,0. Tento jev naznačuje rozdílnou reaktivitu, ale nelze z něj usuzovat na případnou specifickou vazbu imidazolových činidel na tyrosin.

Naměřená data z fragmentace technikou CID jedenkrát modifikovaného  $\beta$ Insulínu odhalila několik zajímavých vlivů. Při pH 6,0 lze z úrovně modifikací  $y$  fragmentů usuzovat na preference vazných míst činidel. Z obrázků 16 (str. 42), 19 (str. 47), lze dedukovat, že u fragmentů  $y3$  (obsahující postranní řetězec lysinu) a  $y4$  (s postranním řetězcem lysinu a threoninu) lze dosáhnout vyšší míry modifikace při acetylaci pomocí NHS-Ac než za použití IA. U fragmentu  $y6$ , který navíc obsahuje postranní řetězec tyrosinu (Y26) a vyšších je tento poměr obrácený. Fragmenty  $y15$  a vyšších již obsahují dva postranní řetězce (Y26 a Y16) tyrosinu, jeden threoninu a lysinu. Lze tudíž sledovat že u fragmentů, jež obsahují jen lysin a threonin jako nukleofilní skupiny, dosahuje NHS-Ac vyšší míry modifikace než IA. U fragmentů obsahujících tyrosin je tento poměr opačný. U fragmentů  $y15$  a vyšších, acetylovaných pomocí IA, míra modifikace oproti ostatním  $y$  fragmentům ještě více narůstá. Z tohoto lze usuzovat, že IA při pH 6,0 má vyšší specifitu pro postranní řetězec tyrosinu než NHS-Ac. Z obrázků 22 (str. 51), 27 (str. 57) lze pozorovat, že činidlo DIBU dosáhlo vyšší míry modifikace než DSBU u všech fragmentů. Vzhledem k pozorovanému nárůstu míry modifikace u fragmentu  $y15$  a vyšších lze usuzovat, podobně jako u IA, na vyšší specifitu vůči postrannímu řetězci tyrosinu než má DSBU. Vzhledem k rozptýleným hodnotám míry

modifikace fragmentů *b25* a menších nelze u činidel IA (obr. 20, str. 47) a DIBU (obr. 28, str. 57) usuzovat na vazebné preference, nicméně nárůst míry modifikace u fragmentů *b26* a *b27* lze při pH 6,0 připsat postrannímu řetězci tyrosinu (Y26). Pokud tento závěr doplníme o informace získané z *y* fragmentů, lze u činidel IA i DIBU (při pH 6,0) dedukovat vyšší příspěvek postranního řetězce tyrosinu k míře modifikace daného fragmentu než u činidel NHS-Ac (obr. 20, str. 47) a DSBU (obr. 23, str. 51).

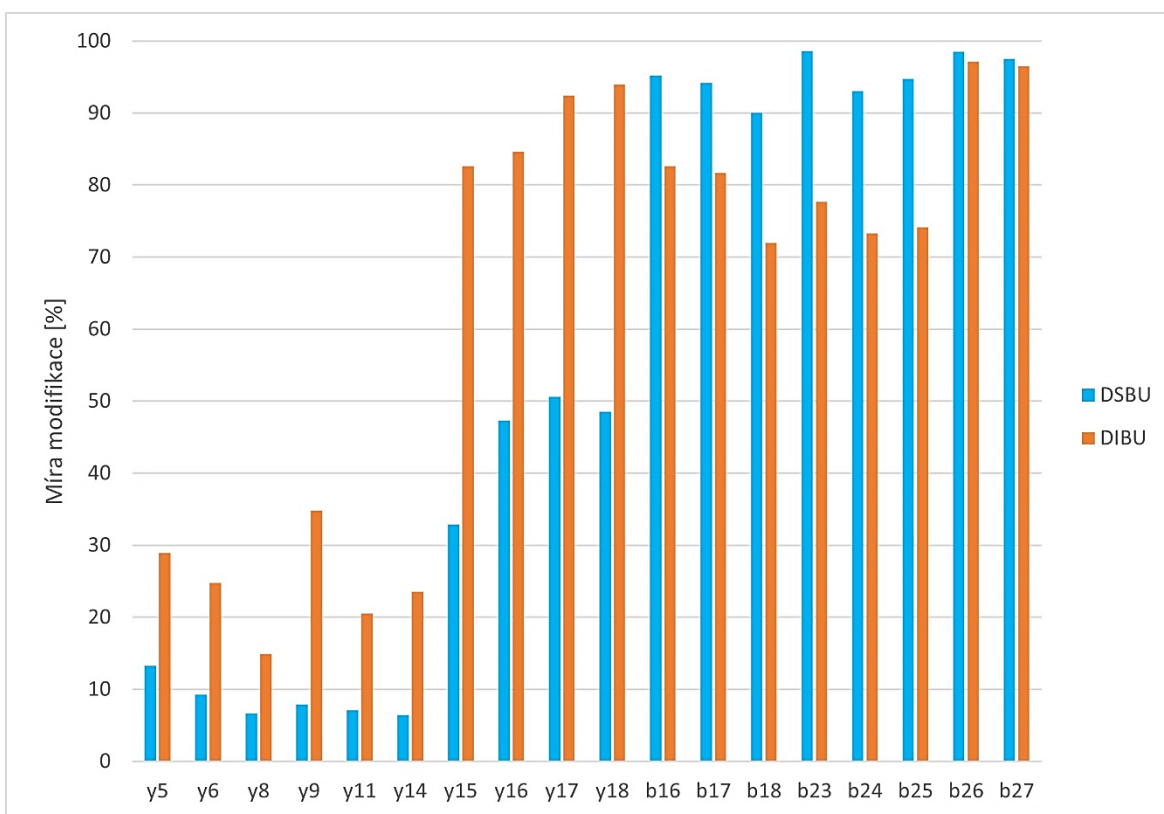
Při acetylaci při pH 7,0 pomocí IA (obr. 19, str. 47) lze vzhledem k nárůstu míry modifikace od fragmentu *y6* (Y26) do fragmentu *y14* vyvozovat na příspěvek postranního řetězce tyrosinu k celkové míře modifikace. U fragmentů *y15* a vyšších lze zaznamenat další nárůst míry modifikace, ke které může přispívat další postranní řetězec tyrosinu (Y16). Nárůst míry modifikace u fragmentu *b16* oproti ostatním *b* fragmentů (obr. 20, str. 47) lze připsat postrannímu řetězci tyrosinu (Y16) a další nárůst u fragmentů *b26* a *b27* druhému postrannímu řetězci tyrosinu (Y26). Hodnoty míry modifikace *y* fragmentů modifikovaných pomocí DIBU (obr. 27, str. 57) jsou poměrně rozptýlené a těžko z nich lze dedukovat příspěvky jednotlivých aminokyselinových zbytků. Naopak vzhledem k podobné závislosti míry modifikace *b* fragmentů jako u IA a obr. 28, str. 57) lze učinit podobné závěry ohledně příspěvků postranních řetězců tyrosinu.

Pro reakci při pH 8,0 je možné u činidla IA (obr. 19, str. 47) připsat nárůst intenzity fragmentu *y15* a vyšších postrannímu řetězci tyrosinu (Y16). Hodnoty míry modifikace fragmentů od *y3* do *y14* jsou velmi rozkolísané. Zdá se, že při pH 8,0 je příspěvek tyrosinů k celkové míře intenzity *y* fragmentů nižší než u pH 6,0 a 7,0 (ačkoliv i tak je pravděpodobně vyšší než u činidla NHS-Ac (obr. 16, str. 42), které nejeví velké rozdíly mezi *y* fragmenty). Postranním řetězcům tyrosinu lze přisoudit i nárůst míry modifikace fragmentů *b16* (Y16) a *b26* (Y16, Y26) (obr. 20, str. 47). Kvůli nekonsistentním hodnotám míry modifikace *y* fragmentů modifikovaných pomocí DIBU lze těžko usuzovat na příspěvky různých postranních řetězců k celkové míře modifikace. Z hodnot míry modifikace *b* fragmentů (obr. 28, str. 57) lze nicméně učinit podobné závěry jako u činidla IA.

V grafu monitorující úroveň modifikace u kovalentně spojených peptidů při pH 6,0 (obr. 38, str. 69) lze pozorovat, že všechny *y* fragmenty spojené pomocí DIBU dosáhly vyšší míry modifikace než ty spojené pomocí DSBU. Fragmenty *y5* až *y14* obsahují postranní řetězce lysinu, threoninu a tyrosinu. Značný nárůst míry modifikace lze zaznamenat

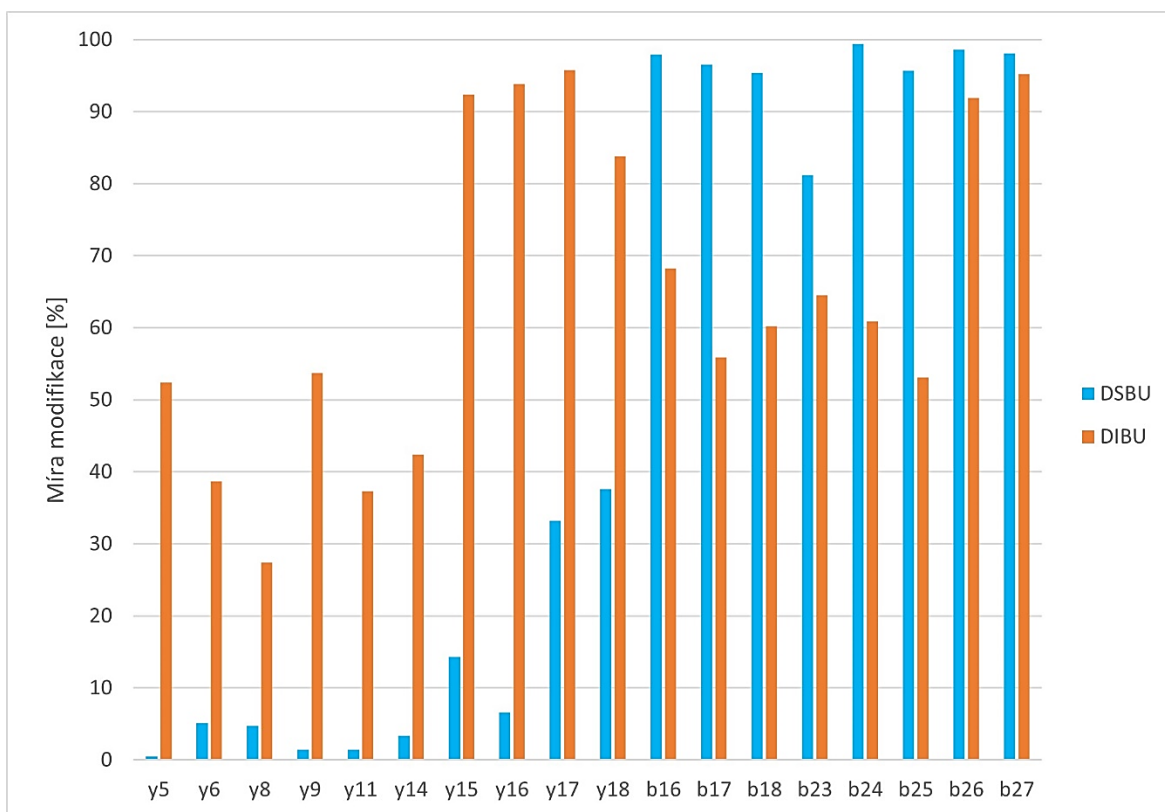
u fragmentu *y15* a vyšších, který obsahuje již oba postranní řetězce tyrosinu (Y16 a Y26). Tento přírůstek hladiny modifikace lze připsat právě tyrosinu Y16. Je ovšem třeba připustit, že skok v míře modifikace vidíme i u činidla DSBU. Ten je ovšem nižší než v případě DIBU.

U *b* fragmentů spojených pomocí DSBU vidíme (obr. 38), že míra modifikace je – do jisté míry – nezávislá na aminokyselinovém složení daného fragmentu, čili nelze zaznamenat žádný velký přírůstek míry modifikace u nějakého fragmentu. Vzhledem k tomu lze předpokládat, že spojení proběhlo jistě mezi N-koncem a postranním řetězcem tyrosinu – ať už Y16 nebo Y26. U činidla DIBU naopak lze vyvodit přírůstek míry modifikace u fragmentů *b26* a *b27*, tedy těch, které obsahují N-konec, Y16 a Y26 (u *b27* je navíc postranní řetězec threoninu, nicméně vzhledem ke všem uvedeným datům threonin nijak výrazně nepřispívá k míře modifikace). Zatímco tedy DSBU nejevilo závislost na aminokyselinovém složení daného fragmentu (míra modifikace se pohybovala kolem 90 % ve všech případech), tak u DIBU dosahujeme nejvyšší míry modifikace u fragmentů *b26* a *b27*.



Obr. 38 Míra modifikace intrapeptidového spojení u vybraných *y* i *b* fragmentů při pH 6,0.

Při pH 7,0 (obr. 39) dosáhly opět *y* fragmenty spojené pomocí DIBU vyšší míry modifikace než ty spojené pomocí DSBU. Znovu lze pozorovat signifikantní nárůst míry modifikace

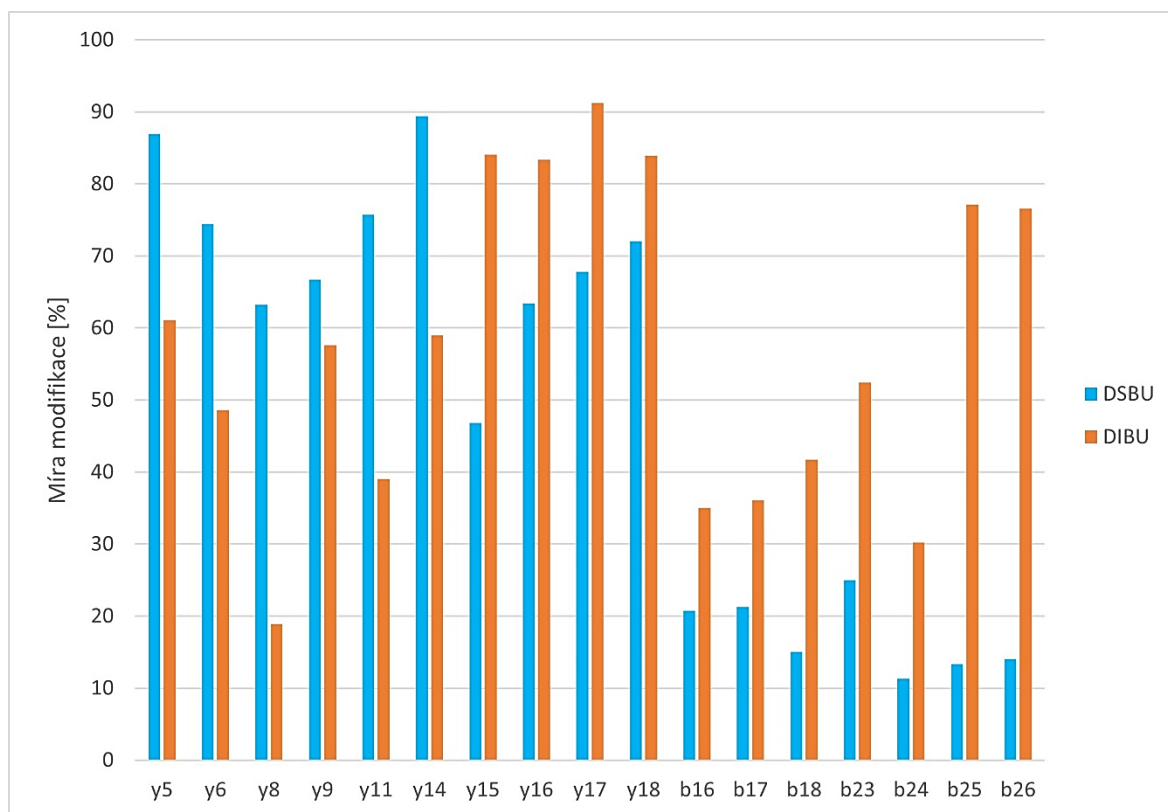


Obr. 39 Míra modifikace intrapeptidového spojení u vybraných *y* i *b* fragmentů při pH 7,0.

od fragmentu *y15* dále (u obou činidel, nicméně u DSBU není nárůst tak veliký, a navíc je hodnota míry modifikace fragmentu *y16* pravděpodobně vychýlená). U obou činidel tento nárůst lze připsat Y16, ačkoliv u činidla DIBU má mnohem větší vliv, neboť hodnota míry modifikace *y* fragmentů obsahující Y16 je vyšší než 80 %.

Co se týče *b* fragmentů spojených pomocí DSBU (obr. 37), jejich míra modifikace byla do jisté míry konstantní bez ohledu na to, zda daný fragment obsahoval jen N-konec a Y16, nebo i další tyrosin a threonin. U činidla DIBU lze sledovat jinou závislost. Fragменты *b16* až *b25* mají míru modifikace v rozmezí od 50 % do 70 %, zatímco u fragmentů *b26* a *b27* lze pozorovat skokový nárůst modifikace (oba fragmenty dosáhly míry modifikace vyšší než 90 %). U DIBU tedy může být připsán vyšší příspěvek Y26 k celkové míře modifikace než u DSBU. (A stejně tak i Y16 ze závislosti *y* fragmentů – je tedy možné, že DIBU má menší afinitu k N-konci než DSBU).

U pH 8,0 (obr. 40) u obou činidel jsou hodnoty míry modifikace  $y$  fragmentů značně rozkolísané, i přesto nelze pominout, že míra modifikace fragmentů od  $y5$  do  $y14$  je vyšší při použití DSBU než DIBU. Jsou to fragmenty obsahující postranní řetězec lysinu, threoninu a tyrosinu (Y26). Vzhledem k nárůstu hladiny modifikace fragmentů  $y15$  a vyšších spojených pomocí DIBU připisujeme větší vliv Y16 k celkové míře modifikace při použití DIBU než DSBU.



Obr. 40 Míra modifikace intrapeptidového spojení u vybraných  $y$  i  $b$  fragmentů při pH 8,0.

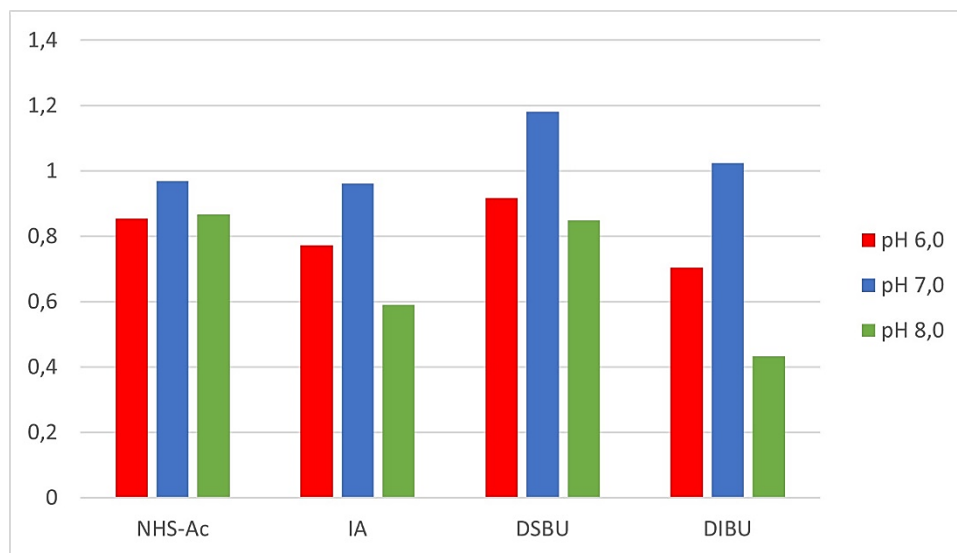
$b$  fragmenty spojené pomocí DSBU (obr. 40) mají více méně konstantní hodnotu modifikace pohybující se v rozmezí od 10 % do 20 %.  $b$  fragmenty spojené pomocí DIBU mají vyšší míru modifikace než ty spojené pomocí DSBU bez ohledu na aminokyselinové složení daného fragmentu. Skokový nárůst míry modifikace je zaznamenáván již u fragmentu  $b25$ , obsahujícího stejné nukleofilní skupiny jako  $b16$  (N-konec a Y16), což znemožňuje posoudit vliv Y26 k celkové míře modifikace. Vzhledem k výsledkům  $y$  fragmentů ovšem lze usuzovat, že vyšší míra modifikace fragmentů  $b16$  až  $b24$  spojených pomocí DIBU je vlivem většího vlivu Y16 k celkové míře modifikace než u činidla DSBU.

Data z přístupu shoda dolů trpí velkou mírou rozkolísanosti, to je částečně zapříčiněno, že veškerá publikovaná data v této práci z tohoto přístupu jsou monoplikáty. Z časových důvodů nebyly ostatní vzorky až na pár výjimek vyhodnoceny. Nicméně právě těchto pár výjimek ukazuje, že reprodukovatelnost se pohybuje v řádu 5 %. Každopádně data z MS/MS analýzy pomocí CID přístupem shora dolů na určitou rozkolísanost trpí obecně, je to způsobeno rozličným způsobem fragmentace jednotlivých vznikajících iontů. Pro zlepšení naměřených dat by bylo možné využít jemnějších technik fragmentace jako je ECD a ETD.

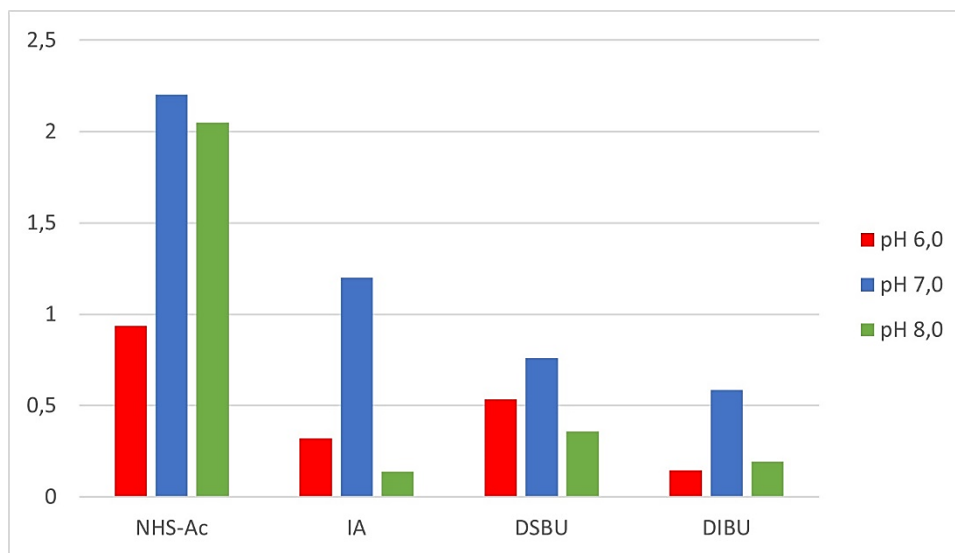
Závěry získané z dat z přístupu shora dolů byly dále doplněny o data z měření modelového proteinu BSA z přístupu zdola nahoru. V rámci tohoto přístupu byl protein studován po kovalentním značení všemi čtyřmi činidly a to při třech pH v triplikátu. Z tabulek 3 až 12 v příloze 1 a obrázků 31 (str. 61), 32 (str. 62), 33 (str. 63), 34 (str. 64) při všech třech použitých pH bylo zjištěno, že nejvíce modifikovaných peptidů dosahovaly peptidy, jež obsahovaly modifikaci postranního řetězce lysinu, bez ohledu na to, jaké činidlo bylo použito. Taktéž pro všechna činidla bylo identifikováno nejvíce modifikovaných peptidů BSA při pH 7,0, což naznačuje, že zkoumaná činidla se efektivněji váží na lysin a to při všech studovaných pH hodnotách. Nicméně když vezmeme v úvahu celkové množství aminokyselin v sekvenci BSA, kdy protein obsahuje přibližně třikrát více lysinů než tyrosinů, tak se tento závěr mění (obr. 45, str. 75). A v případě že se zaměříme jen na zbytky, které jsou dostupné rozpouštědлу, které byly identifikovány na základě výpočtu SASA, tak lze naopak pozorovat opačný efekt a tedy efektivnější vazbu na tyrosiny. Počty modifikací dokládají obrázky 41 a 42 na straně 74 a obrázky 43 a 44 na straně 75, kde byly zmíněné počty modifikovaných peptidů vztaženy na dostupné postranní řetězce lysinu a tyrosinu, vypočtené pomocí SASA (jako limitní hodnota přístupnosti bylo použito 20 %). Tak bylo určeno jako přístupných 53 lysinů, zatímco jen tři tyrosiny. Z hlediska výsledku výpočtu dostupných aminokyselinových zbytků rozpouštědлу se zdá, že použitý nadbytek činidel a to 40násobek pro monofunkční činidla a 80násobek pro činidla homobifunkční byl příliš velký a mohl negativně ovlivnit celý pokus. Nadměrné množství volného činidla v roztoku mohlo způsobit vazbu na aminokyseliny, které by se při nižším nadbytku nevázaly.

Z interpretace dat se zdá, že činidla obsahující imidazol ve své struktuře reagují s postranními řetězci tyrosinu častěji než NHS-estery, nicméně rozdíl nebyl příliš značný.

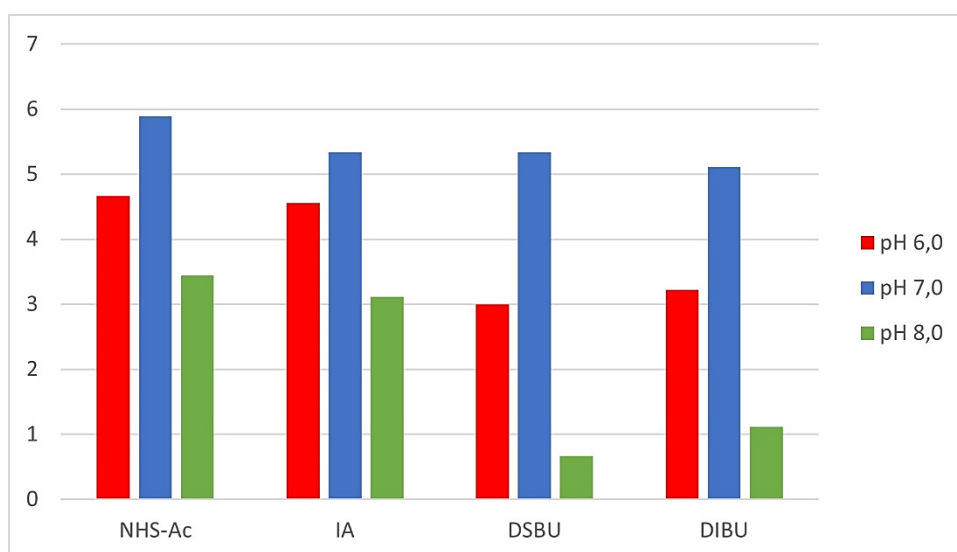
Taktéž celková reaktivita těchto činidel se jeví nižší než u zmíněných NHS-esterů. Nicméně to nelze brát jako konečný závěr a je třeba se tomuto studiu věnovat i nadále.



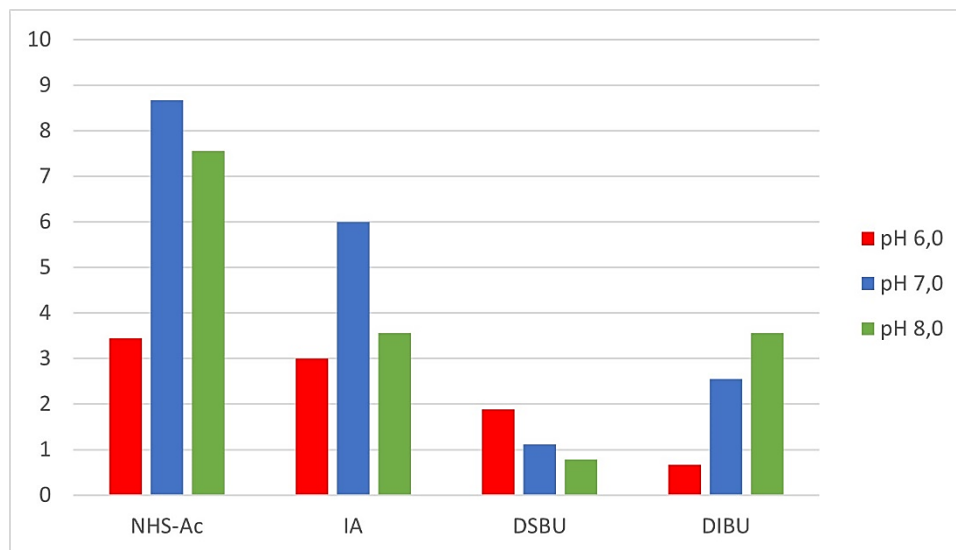
*Obr. 41 Počty nalezených modifikací lysinu v jedenkrát modifikovaných peptidech vztahované na počet přístupných lysinů.*



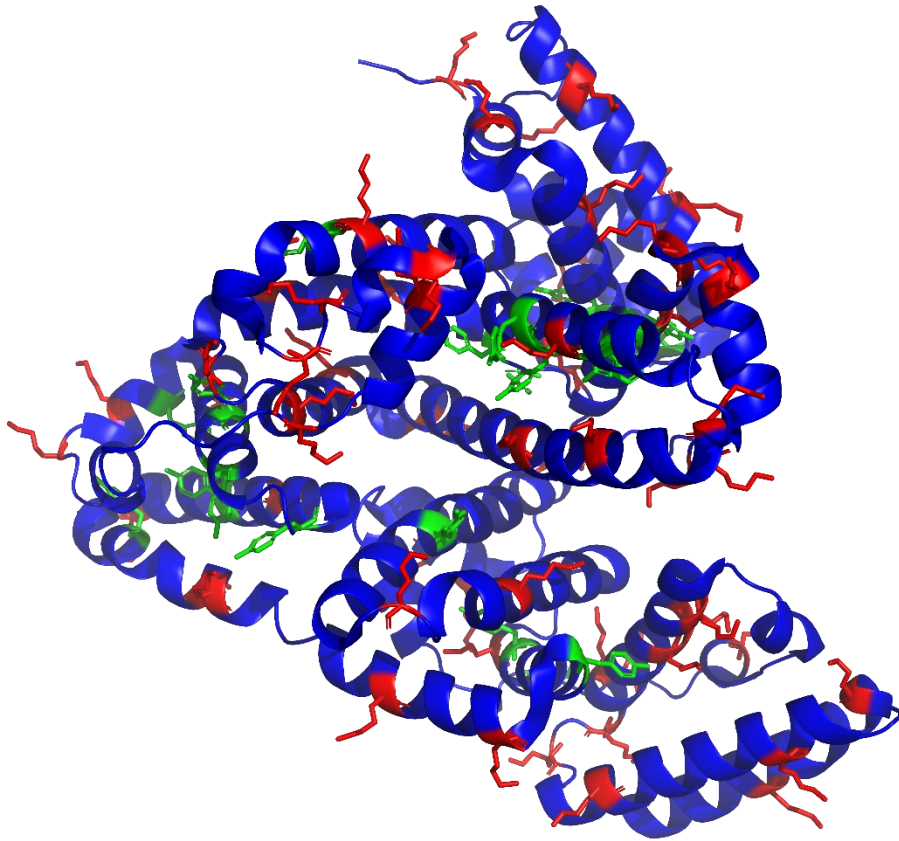
*Obr. 42 Počty nalezených modifikací lysinu ve vícekrát modifikovaných peptidech vztahované na počet přístupných lysinů.*



Obr. 43 Počet nalezených modifikací tyrosinu v jedenkrát modifikovaných peptidech vztahované na počet přístupných tyrosinů.



Obr. 44 Počet nalezených modifikací tyrosinu ve vícekrát modifikovaných peptidech vztahované na počet přístupných lysinů.



Obr. 45 Krystalová struktura BSA s výrazněnými postranními řetězci lysinu (červeně) a tyrosinu (zeleně).

## 6 Závěr

- Vybranými činidly byly úspěšně kovalentně označeny modelové proteiny
- Byla identifikována místa a míra modifikace jednotlivých fragmentů modelového proteinu oxidovaného beta řetězce insulinu přístupem shora dolů (top down)
- Byla identifikována místa modifikace hovězího sérového albuminu a celkový počet peptidů s modifikací přístupem zdola nahoru (bottom up)

## 7 Seznam použitých informačních zdrojů

- (1) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition*, 4th edition.; Garland Science: New York, 2002.
- (2) Milan Kodíček; Vladimír Karpenko. *Biofyzikální chemie*, 2.; Academia: Praha, 2002.
- (3) Peter Atkins; de Paula, J. *Fyzikální chemie*, první.; VŠCHT: Praha, 2013.
- (4) Chavez, J. D.; Bruce, J. E. Chemical Cross-Linking with Mass Spectrometry: A Tool for Systems Structural Biology. *Current Opinion in Chemical Biology* **2019**, *48*, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.08.006>.
- (5) Sinz, A. Chemical Cross-Linking and FTICR Mass Spectrometry for Protein Structure Characterization. *Anal Bioanal Chem* **2005**, *381* (1), 44–47. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2824-6>.
- (6) Yu, C.; Huang, L. Cross-Linking Mass Spectrometry (XL-MS): An Emerging Technology for Interactomics and Structural Biology. *Anal Chem* **2018**, *90* (1), 144–165. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04431>.
- (7) O'Reilly, F. J.; Rappsilber, J. Cross-Linking Mass Spectrometry: Methods and Applications in Structural, Molecular and Systems Biology. *Nat Struct Mol Biol* **2018**, *25* (11), 1000–1008. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0147-0>.
- (8) Sinz, A. Cross-Linking/Mass Spectrometry for Studying Protein Structures and Protein–Protein Interactions: Where Are We Now and Where Should We Go from Here? *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57* (22), 6390–6396. <https://doi.org/10.1002/anie.201709559>.
- (9) Sinz, A. Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry for Mapping Three-Dimensional Structures of Proteins and Protein Complexes. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38* (12), 1225–1237. <https://doi.org/10.1002/jms.559>.
- (10) Mädler, S.; Bich, C.; Touboul, D.; Zenobi, R. Chemical Cross-Linking with NHS Esters: A Systematic Study on Amino Acid Reactivities. *J. Mass Spectrom.* **2009**, *44* (5), 694–706. <https://doi.org/10.1002/jms.1544>.
- (11) Müller, M. Q.; Dreiocker, F.; Ihling, C. H.; Schäfer, M.; Sinz, A. Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis: Reliable Identification of Cross-Linking Products by Tandem MS. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (16), 6958–6968. <https://doi.org/10.1021/ac101241t>.
- (12) Chen, F.; Gerber, S.; Korkhov, V. M.; Mireku, S.; Bucher, M.; Locher, K. P.; Zenobi, R. On the Efficiency of NHS Ester Cross-Linkers for Stabilizing Integral Membrane Protein Complexes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, *26* (3), 493–498. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-1035-4>.
- (13) Kalkhof, S.; Sinz, A. Chances and Pitfalls of Chemical Cross-Linking with Amine-Reactive N-Hydroxysuccinimide Esters. *Anal Bioanal Chem* **2008**, *392* (1–2), 305–312. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2231-5>.
- (14) Leavell, M. D.; Novak, P.; Behrens, C. R.; Schoeniger, J. S.; Kruppa, G. H. Strategy for Selective Chemical Cross-Linking of Tyrosine and Lysine Residues. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, *15* (11), 1604–1611. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.07.018>.
- (15) Novák, P.; Kruppa, G. H. Intra-Molecular Cross-Linking of Acidic Residues for Protein Structure Studies. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* **2008**, *14* (6), 355–365. <https://doi.org/10.1255/ejms.963>.

- (16) Hoare, D. G.; Koshland, D. E. A Procedure for the Selective Modification of Carboxyl Groups in Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88* (9), 2057–2058. <https://doi.org/10.1021/ja00961a045>.
- (17) Sinz, A. Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry to Map Three-Dimensional Protein Structures and Protein–Protein Interactions. *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25* (4), 663–682. <https://doi.org/10.1002/mas.20082>.
- (18) Murale, D. P.; Hong, S. C.; Haque, Md. M.; Lee, J.-S. Photo-Affinity Labeling (PAL) in Chemical Proteomics: A Handy Tool to Investigate Protein-Protein Interactions (PPIs). *Proteome Science* **2017**, *15* (1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12953-017-0123-3>.
- (19) Preston, G. W.; Wilson, A. J. Photo-Induced Covalent Cross-Linking for the Analysis of Biomolecular Interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (8), 3289. <https://doi.org/10.1039/c3cs35459h>.
- (20) Brunner, J. NEW PHOTOLABELING AND CROSSLINKING METHODS. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62* (1), 483–514. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.62.070193.002411>.
- (21) Wanigasekara, M. S. K.; Huang, X.; Chakrabarty, J. K.; Bugarin, A.; Chowdhury, S. M. Arginine-Selective Chemical Labeling Approach for Identification and Enrichment of Reactive Arginine Residues in Proteins. *ACS Omega* **2018**, *3* (10), 14229–14235. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01729>.
- (22) Jones, A. X.; Cao, Y.; Tang, Y.-L.; Wang, J.-H.; Ding, Y.-H.; Tan, H.; Chen, Z.-L.; Fang, R.-Q.; Yin, J.; Chen, R.-C.; Zhu, X.; She, Y.; Huang, N.; Shao, F.; Ye, K.; Sun, R.-X.; He, S.-M.; Lei, X.; Dong, M.-Q. Improving Mass Spectrometry Analysis of Protein Structures with Arginine-Selective Chemical Cross-Linkers. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 3911. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11917-z>.
- (23) Collins, C. J.; Schilling, B.; Young, M.; Dollinger, G.; Guy, R. K. Isotopically Labeled Crosslinking Reagents: Resolution of Mass Degeneracy in the Identification of Crosslinked Peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13* (22), 4023–4026. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.08.053>.
- (24) Müller, D. R.; Schindler, P.; Towbin, H.; Wirth, U.; Voshol, H.; Hoving, S.; Steinmetz, M. O. Isotope-Tagged Cross-Linking Reagents. A New Tool in Mass Spectrometric Protein Interaction Analysis. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (9), 1927–1934. <https://doi.org/10.1021/ac001379a>.
- (25) Tang, X.; Munske, G. R.; Siems, W. F.; Bruce, J. E. Mass Spectrometry Identifiable Cross-Linking Strategy for Studying Protein–Protein Interactions. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (1), 311–318. <https://doi.org/10.1021/ac0488762>.
- (26) Tang, X.; Bruce, J. E. A New Cross-Linking Strategy: Protein Interaction Reporter (PIR) Technology for Protein–Protein Interaction Studies. *Mol Biosyst* **2010**, *6* (6), 939–947. <https://doi.org/10.1039/b920876c>.
- (27) Sedlák, B.; Štoll, I. *Elektřina a magnetismus*, 2.; Academia: Praha, 2002.
- (28) Douglas A. Skoog; Donald M. West; F. James Holler; Stanley R. Crouch. *Analytická chemie*, 1.; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Praha, 2019.
- (29) Gross, J. H. *Mass Spectrometry: A Textbook*, 3rd edition.; Springer, 2017.
- (30) El-Aneed, A.; Cohen, A.; Banoub, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews* **2009**, *44* (3), 210–230. <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>.

- (31) Watson, J. T. Electron Ionization Mass Spectrometry. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyers, R. A., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2000; p a6006. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a6006>.
- (32) Havlíček, V.; Tureček, F. Kvadrupólový analyzátor a iontové pasti. *Chemické listy* **2020**, *114* (2), 106–112.
- (33) Douglas, D. J. Linear Quadrupoles in Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28* (6), 937–960. <https://doi.org/10.1002/mas.20249>.
- (34) Dawson, P. H. Quadrupole Mass Analyzers: Performance, Design and Some Recent Applications. *Mass Spectrom. Rev.* **1986**, *5* (1), 1–37. <https://doi.org/10.1002/mas.1280050102>.
- (35) Makarov, A. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (6), 1156–1162. <https://doi.org/10.1021/ac991131p>.
- (36) Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R. The Orbitrap: A New Mass Spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40* (4), 430–443. <https://doi.org/10.1002/jms.856>.
- (37) Perry, R. H.; Cooks, R. G.; Noll, R. J. Orbitrap Mass Spectrometry: Instrumentation, Ion Motion and Applications. *Mass Spectrometry Reviews* **2008**, *27* (6), 661–699. <https://doi.org/10.1002/mas.20186>.
- (38) Volný, M. Mass Spectrometry: Review of Current Interesting Trends. *Chemické listy* **2011**, *105* (4).
- (39) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* **1989**, *246* (4926), 64–71. <https://doi.org/10.1126/science.2675315>.
- (40) Banerjee, S.; Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem* **2012**, *2012*, 282574. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- (41) Lemr, K.; Borovcová, L. Ionizace elektrosprejem. *Chemické listy* **2020**, *114* (3), 169–178.
- (42) Kebarle, P.; Verkerk, U. H. Electrospray: From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase, What We Know Now. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28* (6), 898–917. <https://doi.org/10.1002/mas.20247>.
- (43) Blades, A. T.; Ikonomou, M. G.; Kebarle, Paul. Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. Electrospray as an Electrolysis Cell. *Anal. Chem.* **1991**, *63* (19), 2109–2114. <https://doi.org/10.1021/ac00019a009>.
- (44) Kebarle, P.; Tang, L. From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase - the Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1993**, *65* (22), 972A–986A. <https://doi.org/10.1021/ac00070a001>.
- (45) Cech, N. B.; Enke, C. G. Practical Implications of Some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews* **2001**, *20* (6), 362–387. <https://doi.org/10.1002/mas.10008>.
- (46) *Figure 4. Quadrupole mass spectrometry.* ResearchGate. [https://www.researchgate.net/figure/Quadrupole-mass-spectrometry\\_fig3\\_8997538](https://www.researchgate.net/figure/Quadrupole-mass-spectrometry_fig3_8997538) (navštíveno 2022-08-23).
- (47) Douglas, D. j. Linear Quadrupoles in Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28* (6), 937–960. <https://doi.org/10.1002/mas.20249>.

- (48) Douglas, D. J.; Frank, A. J.; Mao, D. Linear Ion Traps in Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, *24* (1), 1–29. <https://doi.org/10.1002/mas.20004>.
- (49) March, R. E. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32* (4), 351–369. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199704\)32:4<351::AID-JMS512>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199704)32:4<351::AID-JMS512>3.0.CO;2-Y).
- (50) March, R. E. Quadrupole Ion Traps. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28* (6), 961–989. <https://doi.org/10.1002/mas.20250>.
- (51) Hillenkamp, F. Mass Spectrometry of Biopolymers. 11.
- (52) Volný, M. Hmotnostní analyzátor doby letu. *Chemické listy* **2020**, *114* (2), 113–118.
- (53) Radionova, A.; Filippov, I.; Derrick, P. J. In Pursuit of Resolution in Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Historical Perspective. *Mass Spectrometry Reviews* **2016**, *35* (6), 738–757. <https://doi.org/10.1002/mas.21470>.
- (54) Boesl, U. Time-of-Flight Mass Spectrometry: Introduction to the Basics. *Mass Spectrometry Reviews* **2017**, *36* (1), 86–109. <https://doi.org/10.1002/mas.21520>.
- (55) Škríba, A.; Houšť, J.; Havlíček, V. Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací. *Chemické listy* **2020**, *114* (2), 119–125.
- (56) Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.; Jackson, G. S. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: A Primer. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17* (1), 1–35. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2787\(1998\)17:1<1::AID-MAS1>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2787(1998)17:1<1::AID-MAS1>3.0.CO;2-K).
- (57) Nikolaev, E. N.; Kostyukevich, Y. I.; Vladimirov, G. N. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT ICR) Mass Spectrometry: Theory and Simulations: FT ICR MS. *Mass Spec Rev* **2016**, *35* (2), 219–258. <https://doi.org/10.1002/mas.21422>.
- (58) McLafferty, F. W. Tandem Mass Spectrometry. *Science* **1981**, *214* (4518), 280–287. <https://doi.org/10.1126/science.7280693>.
- (59) de Hoffmann, E. Tandem Mass Spectrometry: A Primer. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31* (2), 129–137. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199602\)31:2<129::AID-JMS305>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199602)31:2<129::AID-JMS305>3.0.CO;2-T).
- (60) Sadílek, M. Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy* **2020**, *114* (2), 133–144.
- (61) Chait, B. T. Mass Spectrometry: Bottom-Up or Top-Down? *Science* **2006**, *314* (5796), 65–66. <https://doi.org/10.1126/science.1133987>.
- (62) Kelleher, N. L.; Lin, H. Y.; Valaskovic, G. A.; Aaserud, D. J.; Fridriksson, E. K.; McLafferty, F. W. Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (4), 806–812. <https://doi.org/10.1021/ja973655h>.
- (63) Novak, P.; Young, M. M.; Schoeniger, J. S.; Kruppa, G. H. A Top-Down Approach to Protein Structure Studies Using Chemical Cross-Linking and Fourier Transform Mass Spectrometry. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* **2003**, *9* (6), 623–631. <https://doi.org/10.1255/ejms.590>.
- (64) Catherman, A. D.; Skinner, O. S.; Kelleher, N. L. Top Down Proteomics: Facts and Perspectives. *Biochem Biophys Res Commun* **2014**, *445* (4), 683–693. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.041>.
- (65) Dupree, E. J.; Jayathirtha, M.; Yorkey, H.; Mihasan, M.; Petre, B. A.; Darie, C. C. A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field. *Proteomes* **2020**, *8* (3), 14. <https://doi.org/10.3390/proteomes8030014>.

- (66) Kukačka, Z.; Rosůlek, M.; Jelínek, J.; Slavata, L.; Kavan, D.; Novák, P. LinX: A Software Tool for Uncommon Cross-Linking Chemistry. *J. Proteome Res.* **2021**, *20* (4), 2021–2027. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00858>.
- (67) Young, M. M.; Tang, N.; Hempel, J. C.; Oshiro, C. M.; Taylor, E. W.; Kuntz, I. D.; Gibson, B. W.; Dollinger, G. High Throughput Protein Fold Identification by Using Experimental Constraints Derived from Intramolecular Cross-Links and Mass Spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97* (11), 5802–5806. <https://doi.org/10.1073/pnas.090099097>.
- (68) Bujacz, A. Structures of Bovine, Equine and Leporine Serum Albumin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2012**, *68* (10), 1278–1289. <https://doi.org/10.1107/S0907444912027047>.
- (69) Müller, M. Q.; Dreiocker, F.; Ihling, C. H.; Schäfer, M.; Sinz, A. Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis: Reliable Identification of Cross-Linking Products by Tandem MS. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (16), 6958–6968. <https://doi.org/10.1021/ac101241t>.
- (70) Leavell, M. D.; Novak, P.; Behrens, C. R.; Schoeniger, J. S.; Kruppa, G. H. Strategy for Selective Chemical Cross-Linking of Tyrosine and Lysine Residues. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, *15* (11), 1604–1611. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.07.018>.
- (71) Hage, C.; Iacobucci, C.; Rehkamp, A.; Arlt, C.; Sinz, A. The First Zero-Length Mass Spectrometry-Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (46), 14551–14555. <https://doi.org/10.1002/anie.201708273>.