

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Biochemie



Michal Binar

RADIKÁLOVÉ ZNAČENÍ PROTEINŮ JAKO NÁSTROJ
VALIDACE BIOLOGICKÝCH TERAPEUTIK

Protein radical footprinting as a tool for protein therapeutics validation

Bakalářská práce

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

Konzultant: Mgr. Zdeněk Kukačka, Ph.D.

Praha 2018

PROHLÁŠENÍ

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

V Praze dne 13. 04. 2018

PODĚKOVÁNÍ

Tímto děkuji mému vedoucímu práce RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. a zejména konzultantovi Mgr. Zdeňku Kukačkovi, Ph.D. za trpělivost, vstřícnost a cenné rady při tvorbě této bakalářské práce. Děkuji také Mgr. Michalu Rosůlkovi za pomoc při práci s hmotnostním spektrometrem a následné změření jednotlivých vzorků.

Také bych rád poděkoval členům Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace Biotechnologického a biomedicinského centra Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci za příjemné a přátelské prostředí a možnost vypracování této práce v jejich prostorách.

V neposlední řadě bych velice rád poděkoval rodině a přátelům, kteří mě během celého studia podporovali.

ABSTRAKT

Hmotnostní spektrometrie a techniky s ní spojené jsou velice důležitým a užitečným nástrojem při studiu struktury proteinů. Jednou z těchto technik je i kovalentní značení proteinů, které je možné použít ke zkoumání přístupnosti jejich povrchu a jejich dynamiky obecně. Přestože již byla pro tuto metodu vyvinuta spousta činidel, většina z nich je limitována jejich schopností selektivně reagovat jen s omezeným počtem aminokyselin, většinou lysinem, argininem nebo tyrosinem a neselektivní metody, jako rychlá fotochemická oxidace proteinů, jsou velice náročné a nákladné. Z toho důvodu existuje stále snaha o vývoj nových metod kovalentního značení. Touto novou metodou by mohla být trifluormethylace, která je stále více používanou technikou modifikace organických molekul a jejíž možný potenciál jsme se proto rozhodli studovat. V této práci jsme použili novou skupinu formálně elektrofilních činidel, která je vytvořena na bázi cyklického hypervalentního jodidového jádra. Tato skupina tzv. Togniho činidel byla použita jako nástroj radikálového značení proteinů. Jako modelový protein byla vybrána lidská karbonická anhydrasa, jejíž struktura je velice dobře prostudována. Modifikovaný protein byl analyzován přístupem bottom up pomocí kombinace kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Ze získaných dat vyplývá, že reakcí s Togniho činidly dochází k modifikaci postranních řetězců aminokyselin, a to především u aminokyselin aromatických. Ukazuje se tedy, že by trifluormethylace pomocí Togniho činidel s následnou hmotnostně-spektrometrickou analýzou mohla představovat rychlou, účinnou a časově i finančně nenáročnou metodu k charakterizaci struktury proteinů a posléze i k validaci terapeutik.

Klíčová slova: lidská karbonická anhydrasa, hmotnostní spektrometrie, kovalentní značení proteinů, trifluormethylace, Togniho činidla

ABSTRACT

Mass spectrometry techniques are very important and useful tool in studying of protein structure. One of these techniques is the covalent labeling of proteins. The covalent labeling can be used for determination of the accessibility of protein surface and their dynamics in general. Although a lot of reagents have already been developed for this method, most of them are limited by their ability to selectively react with only some of amino acids, mostly lysine, arginine or tyrosine, and non-selective methods such as fast photochemical oxidation of proteins are very demanding and costly. Therefore, there is still an endeavor to develop new methods of covalent labeling. This new method could be trifluoromethylation, which is increasingly used in the modification of organic molecules, and whose potential we have decided to study. In this work we used a new group of formally electrophilic agents, which is formed on the basis of a cyclic hypervalent iodide nucleus. This group so-called Togni reagents was used as a tool for radical protein labeling. Since the structure was well characterized by X-ray, NMR and MS, the human carbonic anhydrase has been selected as a model protein. The modified protein was analyzed by a bottom up approach using a combination of liquid chromatography and high resolution tandem mass spectrometry. The obtained data show the reaction with Togni reagents leads to amino acid side chain modifications, especially amino acids containing aromatic groups. Thus, trifluoromethylation using Togni reagents, followed by mass spectrometric analysis, suggests a rapid, straightforward, effective and low-cost method for characterizing the protein structure and validation of protein therapeutic in the future.

Key words: human carbonic anhydrase, mass spectrometry, covalent labeling of proteins, trifluoromethylation, Togni reagents

SEZNAM ZKRATEK

ACN	Acetonitril
CYP	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-dithiothreitol
EDC	1-ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	Ionizace elektrosprejem (z angl. electrospray ionization)
EtMor	Ethylmorfolin
FA	Kyselina mravenčí (z angl. formic acid)
FPOP	Rychlá fotochemická oxidace proteinů (z angl. fast photochemical oxidation of proteins)
FTICR	Iontově cyklotronová resonance s Fourierovou transformací (z angl. fourier-transform ion cyclotron resonance)
GEE	Ethylester glycinu
H/D	Vodík-deuteriová výměna
hCA	Lidská karbonická anhydrasa (z angl. human carbonic anhydrase)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
KrF	Kryptonfluorový laser (z angl. krypton fluoride laser)
LC-MS	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (z angl. liquid chromatography-mass spectrometry)
LC-FTICR-MS	Kapalinová chromatografie spojená s vysoko rozlišenou hmotnostní spektrometrií s Fourierovou transformací
LDS	Dodecylsulfát lithný
mAb	Monoklonální protilátka (z angl. monoclonal antibody)
MCO	Oxidace katalyzovaná kovem (z angl. metal-catalyzed oxidation)
MES	2-(<i>N</i> -morfolino) ethansulfonová kyselina
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NHSAc	<i>N</i> -hydroxysukcinimid acetát
NMR	Nukleární magnetická rezonance

PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. polyacrylamid gel electrophoresis)
PDMS	Plazmová desorpční hmotnostní spektrometrie (z angl. plasma desorption mass spectrometry)
SDS	Dodecylsulfát sodný
TOF-MS	Hmotnostní spektrometrie s analyzátozem doby letu (z angl. time of flight mass spectrometry)
YAG	Yttrium hliníkový granátový laser (z angl. yttrium aluminium garnet laser)

Obsah

1	TEORETICKÝ ÚVOD.....	10
1.1	Kovalentní značení	10
1.1.1	Vodík-deuteriová výměna.....	10
1.1.2	Chemické značení.....	12
1.1.1.1	Metody založené na „shora-dolů“ principech	13
1.1.1.2	Značení karboxylových skupin proteinu	14
1.1.3	Fotochemické značení.....	16
1.1.4	Radikálové značení.....	18
1.1.1.3	Metody vzniku radikálů	18
a)	Radiolýza vody pomocí synchrotronových rentgenových pulsů.....	18
b)	Radiolýza vody pomocí gama záření	20
c)	Oxidace proteinů katalyzována kovem	21
d)	Fotolýza peroxidu vodíku pomocí UV záření	23
e)	Štěpení peroxidu vodíku pomocí impulsního laseru	25
1.1.1.4	Trifluormethylace.....	26
a)	Togniho činidla	27
b)	Reaktivita Togniho činidel.....	27
1.2	Karbonická anhydrasa.....	29
2	CÍLE PRÁCE	31
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
3.1	Seznam přístrojů	32
3.2	Biologický materiál.....	32
3.3	Seznam chemikálií	32
3.4	Seznam roztoků	33
3.5	Softwarové vybavení	33
3.6	Reakce s Togniho činidlem	34
3.6.1	Optimalizace podmínek reakce Togniho činidel	34
3.6.2	Příprava roztoku proteinu hCA	34
3.6.3	Stanovení koncentrace proteinu	34

3.6.4	Příprava zásobních roztoků kyseliny askorbové a Togniho činidel	35
3.7	Modifikace proteinu Togniho činidlem	35
3.8	Elektroforetická separace modifikovaného proteinu	36
3.9	Barvení a odbarvování proteinu v polyakrylamidovém gelu.....	36
3.10	Proteolytické štěpení proteinu	37
3.11	Analýza modifikovaného proteinu pomocí LC-MS/MS.....	37
3.12	Vyhodnocení dat z LC-MS/MS analýzy	37
4	VÝSLEDKY	38
4.1	Optimalizace podmínek reakce	38
4.2	Elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu	40
4.3	Výsledky analýzy alkoholového činidla po LC-MS/MS	41
4.3.1	Modifikace fragmentu NGPEQWSK	42
4.3.2	Modifikace fragmentu YSAELHVAHWNSAK.....	43
4.3.3	Struktura modifikovaného proteinu alkoholovým činidlem	45
4.4	Výsledky analýzy imidazolového-alkoholového činidla po LC-MS/MS	46
4.4.1	Modifikace fragmentu HDTSLKPISVSYNPATAK	47
4.4.2	Modifikace fragmentu ASPDWGYDDKNGPEQWSK	48
4.4.3	Struktura proteinu modifikovaného imidazolovým-alkoholovým činidlem	50
5	DISKUZE	53
6	ZÁVĚR	57
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58
8	PŘÍLOHY	62

1 TEORETICKÝ ÚVOD

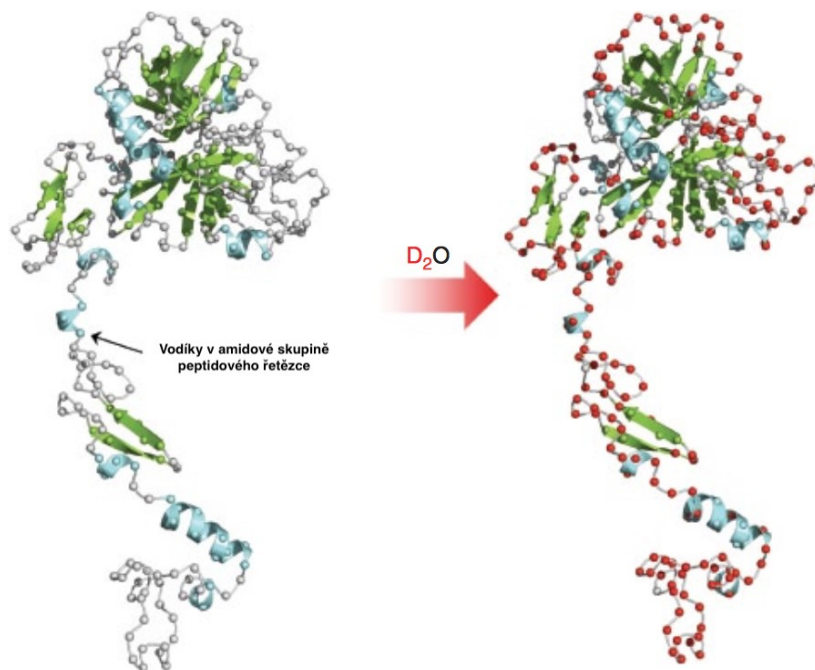
1.1 Kovalentní značení

Společným rysem značení proteinů ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) je tvorba nové kovalentní vazby proteinu, která může být iniciována fotochemicky nebo přidavkem modifikačního činidla. Tyto experimenty předpokládají, že stupeň expozice rozpouštědla moduluje reaktivitu cílových míst na proteinu. Stericky chráněné lokality jsou označeny v menší míře než ty, které jsou volně přístupné. Mnoho kovalentních sond reaguje se specifickými postranními řetězci, jako je Cys nebo Lys. Modifikovaný protein je následně analyzován hmotnostním spektrometrem a ze získaných hmotnostních spekter jsou vzniklá značení přesně lokalizována. Výstupem analýzy produktů značených experimentů je soubor vzdálenostních omezení vybraných funkčních skupin v molekule proteinu. Protein je nutné převést do pufru, který nebude obsahovat žádné složky se stejnými funkčními skupinami, které jsou cílem značené reakce [1].

Kovalentní techniky značení ve spojení s MS významně přispěly k pochopení sekundárních a terciárních proteinových konformací a jejich dynamiky a nabízejí podrobnou informaci o postavení peptidů nebo postranních řetězců vzhledem ke struktuře [2].

1.1.1 Vodík-deuteriová výměna

Metoda je založená na principu, při kterém molekula proteinu ponořená do roztoku podléhá výměně proteinových vodíků za vodíky obsažené v roztoku. Samotná výměna je nedetekovatelná, proto se pro značení využívají izotopy vodíku, které mají vyšší molekulovou hmotnost. Dříve se pro výměnu vodíků používalo tritium, dnes se používá stabilnější deuterium. Při detekci se sledují hodnoty deuterace molekuly. Ne všechny vodíky proteinu jsou vyměňovány stejnou rychlostí. Pro správnou analýzu dat je důležité vědět, které vodíky a jejich hodnoty deuterace sledovat. Vodíky na postranních řetězcích se vyměňují vysokou rychlostí. Stejně velkou rychlostí se ale vyměňují zpět, tudíž je hodnota deuterace zanedbatelná. Vodíky vázané na uhlících se téměř nevyměňují, pro měření také nejsou vhodné. Ideální vodíky pro sledování hodnot deuterace jsou vodíky v amidové skupině hlavního peptidového řetězce, kterou obsahují všechny aminokyseliny kromě prolinu (Obr. 1). Rychlost výměny vodíků závisí na pH [3], teplotě, přístupu rozpouštědla a přítomnosti intra- a intermolekulárních vodíkových vazeb.



Obr. 1 - Schéma výměny deuteriových vodíků obsažených v roztoku za vodíky proteinu. Po vložení proteinu do roztoku obsahující D_2O se vodíky v amidové skupině peptidového řetězce (šedá) spontánně vyměňují za vodíky deuteria obsažené v roztoku. Vyměněné vodíky jsou zobrazené červenou barvou. Rychlost výměny vodíků závisí na pH, teplotě, přístupu rozpouštědla a přítomnosti intra- a intermolekulárních vodíkových vazeb, upraveno podle [4].

Aby mohl být deuterovaný protein zanalyzován, musí se daná reakce výměny zastavit, respektive zpomalit na tolik, aby nedocházelo ke zpětné výměně. Proto je nutné snížit pH na hodnotu kolem 2,5 a snížit teplotu alespoň na $0^\circ C$, kdy je výměna minimální [4]. Poté je deuterovaný protein proteolyticky štěpen. V pH v oblasti 2,5 velice účinně působí právě aspartátové proteasy, zejména pepsin. Po štěpení následuje analýza jednotlivých fragmentů proteinu, například pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (LC-MS).

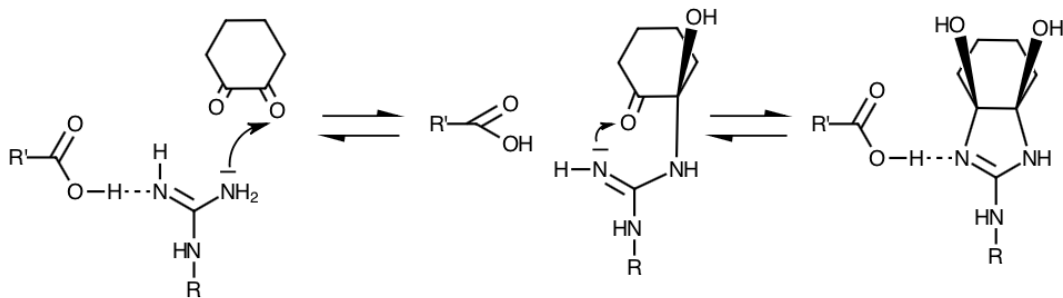
V 50. letech 20. století Pauling objevil strukturu α -helixu a β -listu, u nichž se předpokládala stabilizace vodíkovými můstky [5]. Toto tvrzení o přítomnosti vodíkových vazeb zanedlouho potvrdil Lindestrøm-Lang a Hvidt při experimentu, ve kterém rozpustili insulin v 99,6% oxidu deuteria, přičemž probíhala výměna vodíku insulinu za atomy deuteria. Po určité reakční době byl proces zmražením zastaven, přebytečná voda byla lyofilizací odstraněna a ve vakuu za sníženého tlaku byly následně vzorky sesušeny. Sesušený protein byl poté rozpuštěn v čisté vodě. Hodnota deuterace proteinu byla stanovena na základě hustot čisté vody a vody s deuteriem, ve kterém byl protein

rozpuštěn [6]. V 60. letech poté Englander a spol. vyvinuli metodu, která monitorovala izotopovou výměnu kapalinovou scintilací za použití radioaktivního izotopu tritium (^3H).

Zavedení jednorozměrné nukleární magnetické rezonanční (NMR) spektroskopie umožnilo měření vodík-deuteriové výměny (H/D) u spektrálně rozdělených amidových vazeb. Díky vývoji hmotnostní spektrometrie tato metoda postupně vystřídala analýzu vodík-deuteriové výměny pomocí NMR, která se do té doby používala. Výhoda spojení H/D výměny s MS spočívá v tom, že při analýze je potřeba mnohem menší množství proteinu než při spojení s NMR a také MS dokáže zanalyzovat protein o velikosti, který je již nad limity analýzy pomocí NMR. Nezbytnou součástí vodík-deuteriové výměny je krok okyselení, který je nutný pro zpomalení výměny vodíků deuteria zpět za vodíky proteinu. Při takto rapidním okyselení je možné použít pro následné proteolytické štěpení pouze úzkou škálu proteas, kterým by vyhovovalo takto kyselé prostředí. Další nevýhodou H/D výměny je pokles deuterace při proteolýze, který je za jakýchkoli podmínek nevyhnutelný [7].

1.1.2 Chemické značení

Mapování přístupnosti povrchu proteinu rozpouštědly lze také provést chemickým značením. S metodou acetylace aminokyselinových zbytků lysinu acetanhydridem a argininu 1,2-cyklohexandionem jako účinným a citlivým nástrojem modifikace proteinu přišli v roce 1992 Suckau a spol. Jako modelový protein byl použit slepičí lysozym. Identifikace modifikovaných lysinových a argininových zbytků v proteinu byla zajištěna pomocí plazmové desorpční hmotnostní spektrometrie (PDMS), kdy po tryptickém štěpení proteinu na jednotlivé peptidy stanovili molekulovou hmotnost modifikovaných i nemodifikovaných peptidů. Korelace struktury a reaktivity v této studii naznačují, že přístupnost povrchu je primárně důležitá pro vysoce reaktivní systémy, jako je lysin a acetanhydrid, zatímco sousedící proton-akceptorové skupiny, jako je karboxylová skupina kyseliny asparagové, mohou mít dominantní vliv na systémy s nízkou reaktivitou argininu [8].



Obr. 2 - Reakční mechanismus modifikace *N7,N8*-(dihydroxy-1,2-cyklohexyliden) argininu pomocí intramolekulárního akceptoru protonů. R značí arginylový zbytek a R' zbytek akceptoru protonu, upraveno podle [8].

Dva roky poté, v roce 1994 skupina profesora Przybylského vydala rozšířenou studii o mapování povrchů a modifikaci lysinových zbytků proteinů pomocí aminoacetylačních a aminosukcinylačních reakcí. Přesný počet acylových skupin v částečně modifikovaných proteinech byl získán analýzou směsi peptidů trypticky štěpených proteinů pomocí kombinace kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s plazmovou desorpcí. Jako modelový protein byla použita bovinní ribonukleasa A, lysozym získaný z kuřecího bílku a myoglobin z koňského srdce. Přesné místo modifikace opět určili pomocí sledování rozdílů molekulové hmotnosti nativního a částečně modifikovaného proteinu [9].

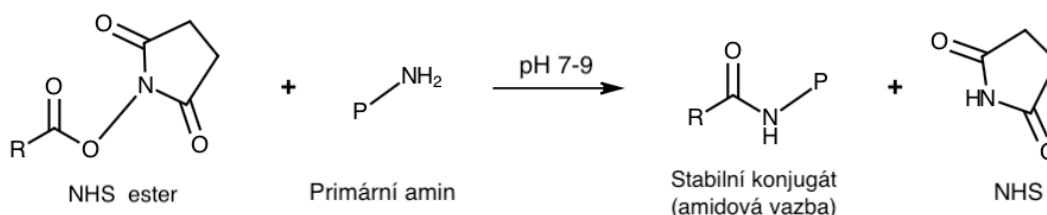
Na konci 20. století s nástupem nového způsobu ionizace nanoelektrosprejem (nanoESI) bylo zkoumání proteinového povrchu proteinů a jejich modifikací o to účinnější a přesnější. NanoESI byl také využit v kombinaci s chemickým značením pro zkoumání reakční kinetiky a k přímému studiu konformačních změn, například při skládání proteinu [10].

1.1.1.1 Metody založené na „shora-dolů“ principech

Při optimalizaci podmínek pro chemické zesílení proteinů se vědci začali zajímat o to, jak vnitřní reaktivita lysinů v přirozené struktuře proteinu ovlivňuje výsledek síťovacích reakcí za použití činidel reagujících s lysinem. Metody používající proteolytické štěpení, po kterých následuje MS pro identifikaci peptidů byly nazvány "zdola-nahoru" (z angl. bottom-up), jelikož začínají od fragmentů proteinu, aby identifikovali peptidy a analyzovali modifikace na proteinu. V roce 2003 Novák a spol. vyvinuli nový přístup analýzy bílkovin, „shora-dolů“ (z angl. top-down). Tato metoda nevyužívá proteolytické štěpení, ale začíná přímo analýzou MS celého proteinu [11]. Proteolytické

štěpení se obvykle provádí na celém proteinu, který může obsahovat jednu nebo více modifikací, přičemž separační metody jako například LC nebo elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu (PAGE) nemají dostatečnou schopnost rozlišit nemodifikovaný protein od modifikovaného (fosforylace, glykosylace atd). V metodách založených na „shora-dolů“ principu mohou být ionty odpovídající proteinu s modifikacemi v hmotnostním spektrometru izolovány a fragmentovány a ze získaných dat následně určena přesná místa modifikace. Tento přístup tedy velice zjednodušuje analýzu dat, jelikož analyzujeme pouze již zmodifikované fragmenty.

Autoři ve studii také ukázali, že lze metodu zkombinovat se značením primárních aminoskupin ke stanovení dostupnosti rozpouštědla lysinů a N-konce ubiquitinu. Jejich přístup zahrnuje reakci ubiquitinu s primárním aminovým acetylačním činidlem *N*-hydroxysukcinimidylacetátem (NHSAc, Obr.3). Všechny vzorky byly analyzovány pomocí MS s iontovou cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací (FTICR). Bylo prokázáno, že čím více je ubiquitin denaturován, tím větší byl rozsah acetylace. Nativní protein vykazoval jistou odolnost vůči značení [12].

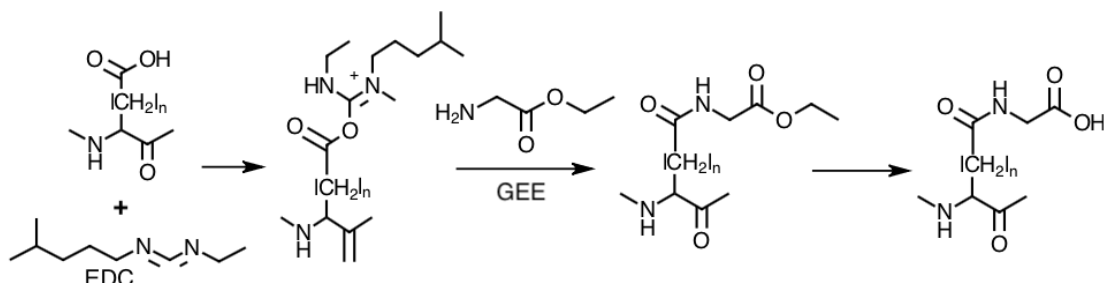


Obr. 3 - Reakční schéma NHS esteru pro chemickou konjugaci s primárním aminem. „R“ představuje síťovací činidlo, které má na sobě navázanou reaktivní skupinu NHS esteru. „P“ představuje protein nebo jinou molekulu, která obsahuje cílovou funkční skupinu (tj. primární amin). Vzniká stabilní konjugát s amidovou vazbou a jako vedlejší produkt NHS, upraveno podle [13].

1.1.1.2 Značení karboxylových skupin proteinu

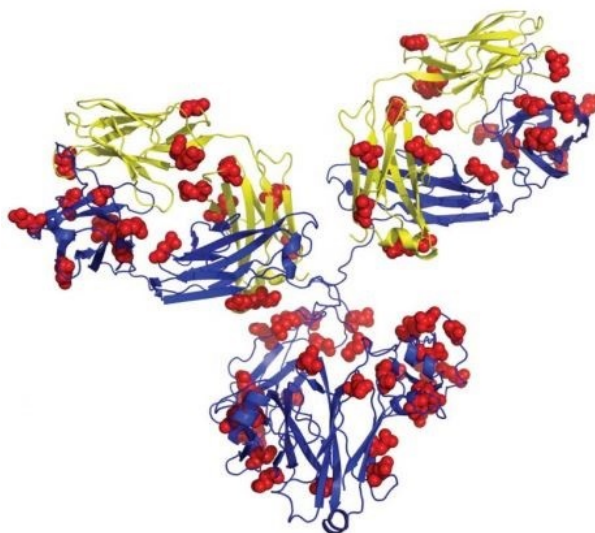
Strukturní charakterizace bílkovin a jejich antigenických komplexů je nezbytná pro vývoj nových biologických léčiv. Aminokyselinově specifické kovalentní značení je vhodné pro zkoumání zejména takových struktur, u kterých je obtížné použít alternativní způsoby značení z důvodu velikosti, složitosti nebo nestability. Chance a spol. v roce 2015 přišli na metodu značení karboxylových skupin za použití hydrochloridu 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC) v přítomnosti ethylesteru glycinu (GEE), kterou použili na strukturní charakterizaci glykosylované monoklonální

protilátky (mAb). Cílovými místy molekuly byly kyseliny asparagová, glutamová a C-konec proteinu [2]. Vzorke proteinů jsou za podmínek fyziologického pH aktivovány karbodiimidy, jako je EDC, čímž se vytvářejí nestabilní meziproducty s amin-reaktivní O-acylisomočovinou (Obr. 4) [14].



Obr. 4 - Reakční mechanismus značení karboxylových skupin. Protein obsahující karboxylovou skupinu reaguje s EDC za vzniku nestabilního amin-reaktivního O-acylisomočovinnového meziproductu. Nukleofilní primární aminy GEE reagují s reaktivními meziproducty a vytvářejí stabilní konečné producty, upraveno podle [2].

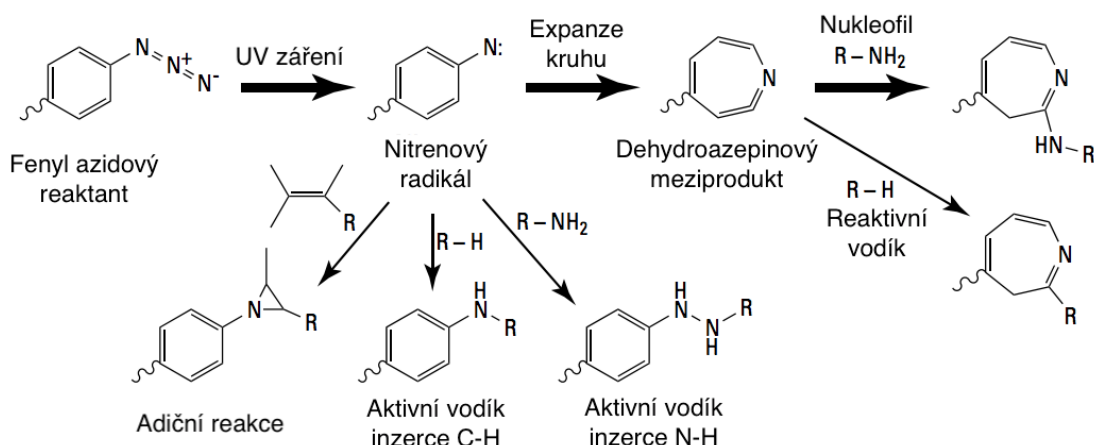
Primární amin tvoří amidovou vazbu s původní karboxylovou skupinou za vzniku stabilních finálních produktů a vedlejší produkt EDC se uvolňuje jako rozpustný derivát močoviny. Výsledky poskytují doplňující informace k oxidačnímu značení proteinů (viz kap. 1.1.4.), čímž se zvyšuje celková mapa pokrytí sekvencí proteinu o cca 10 % [2].



Obr. 5 - Homologní model struktury mAb. Karboxylové skupiny značené pomocí karbodiimidu EDC v přítomnosti GEE jsou zvýrazněny červenou barvou [15].

1.1.3 Fotochemické značení

Při fotochemickém značení se využívá fotoaktivovatelných činidel. Fotoaktivovatelná činidla jsou chemicky inertní sloučeniny, které se stávají reaktivní při vystavení ultrafialovému nebo viditelnému světlu [16]. Běžně využívaná fotoaktivovatelná činidla obsahují v molekule azidovou funkční skupinu. Fotoaktivovatelné syntetické analogy aminokyselin, obsahující v molekule diazirinové kruhy, se využívají k síťování proteinových molekul. Když je aryl azid vystaven UV záření (250 až 350 nm), vytvoří se nitrenový radikál, který může iniciovat adiční reakce na dvojně vazby za inserce C-H a N-H vazeb nebo expanzi kruhu na dehydroazepinový meziprodukt, který následně reaguje s nukleofilem, např. primárními aminy (Obr. 6). Před a během fotoaktivace je zapotřebí se vyhnout všem redukčním činidlům obsahující thiolovou skupinu (např. 1,4-dithiothreitol nebo 2-merkaptoethanol), protože redukují azidovou funkční skupinu na amin, což brání fotoaktivaci. Reakce se musí provádět v pufrech, a to bez aminů. Existují tři základní formy arylových azidů: jednoduché fenyl azidy, hydroxyfenyl azidy a nitrofenyl azidy lišící se vlnovou délkou UV světla při aktivaci [13].

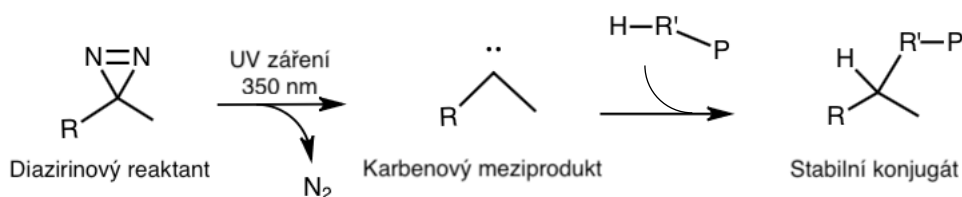


Obr. 6 - Reakční schéma aryl azidu pro světelnou aktivovanou fotochemickou konjugací. „R“ představuje protein či jinou molekulu, která obsahuje nukleofilní nebo aktivní vodíkové skupiny. Po fotoaktivaci UV zářením fenyl azidu se vytvoří nitrenový radikál, který dále může reagovat s dalšími molekulami za vzniku různých produktů. Tučné šipky znázorňují dominantní cestu reakce, upraveno podle [13].

Této metody bylo například využito při značení několika typů cytochromů, při kterých byly následně odhaleny aminokyseliny nacházející se v aktivním centru. Heterobifunkční fotoafinitní sondy byly navrženy tak, aby se přes aminoskupinu navázaly na hem v aktivním centru cytochromu P450 (CYP) 2B4 a ke kovalentní modifikaci dostupných

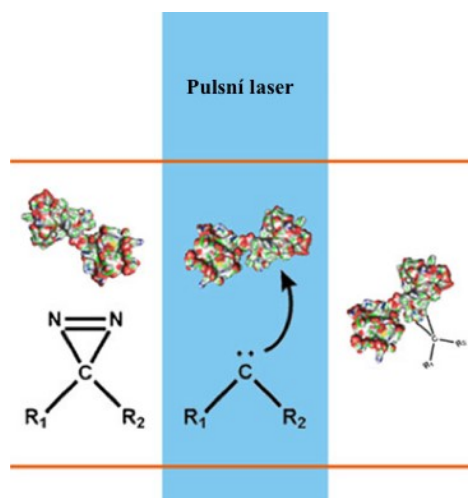
aminokyselinových zbytků fotoaktivovanou azidoskupinou v definované vzdálenosti od hemu. Pomocí těchto fotoafinitních sond byla prokázána platnost modelu CYP 2B4 a také byla odhalena cesta, kterou substrát vstupuje do aktivního centra enzymu [16].

Novějšími fotochemicky aktivovatelnými činidly pro síťování a značení proteinů jsou diaziriny. Diazirin má vyšší fotostabilitu než fenyl azidová činidla a je snadněji a účinněji aktivovatelný dlouhovlnným UV zářením (330-370nm). Fotoaktivace diaziru vytváří vysoce reaktivní karbenové meziproducty. Takové meziproducty mohou vytvářet kovalentní vazby adičními reakcemi s libovolným postranním řetězcem aminokyselin (Obr. 7) [13].



Obr. 7 - Reakční schéma diaziru pro světelně aktivovanou fotochemickou konjugaci. „R“ představuje modifikační činidlo, které má na sobě navázanou reaktivní diazirinovou skupinu. „P“ představuje protein nebo jinou molekulu, která obsahuje nukleofilní nebo aktivní vodíkové skupiny. Po fotoaktivaci diaziru UV zářením se odštěpí molekula dusíku za vzniku reaktivního karbenového meziproductu, který poté v reakci např. s proteinem vytvoří stabilní konjugát, upraveno podle [13].

Této skutečnosti využil v roce 2011 Jumper a Schriemer. Pomocí pulsní laserové fotolýzy při 355 nm z fotoaktivovatelného činidla na bázi diaziru fotoleucinu odstranili dusík za vzniku vysoce reaktivního karbenového radikálu, kterým následně značili proteiny kalmodulin, myoglobin a kinázu lehkého řetězce myosinu (Obr. 8). Pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) a hmotnostní spektrometrie s dobou letu (TOF-MS) poté analyzovali rozsah modifikace proteinů. Experimenty ukázaly, že nejvhodnějšími aminokyselinovými zbytky pro reakci fotoleucinu jsou Asp a Glu. Dále byly také nalezeny modifikace Arg, Tyr, Ser a Thr [17].



Obr. 8 - Reakční schéma modifikace proteinu pomocí pulsního laseru při 355 nm. Po vystavení proteinu pulsnímu laseru dochází k vytvoření karbenového radikálu, který následně reaguje s proteinem za tvorby modifikací některých jeho aminokyselinových zbytků, upraveno podle [18].

1.1.4 Radikálové značení

Radikálové sondy jsou široce používané pro oxidační značení proteinů. Jednou z radikálových sond mohou být hydroxylové radikály. Hydroxylové radikály vykazují nízkou specifíčnost, což jim umožňuje reagovat s celou řadou cílových míst. Klíčovou výhodou hydroxylové skupiny jako strukturní sondy je její malá velikost, díky níž je možno sledovat změny dostupnosti rozpouštědel ve vazebných místech. OH značení cílového místa na proteinu závisí na přítomnosti rozpouštědla a vnitřní reaktivitě. Přítomnost atomu síry v Met a Cys způsobuje, že jsou tyto dvě aminokyseliny nejreaktivnější. Mezi vysoce reaktivní aminokyseliny se dále řadí Phe, Tyr a Trp. Příčinou jejich vysoké reaktivity je přítomnost aromatických kruhů v jejich struktuře [19].

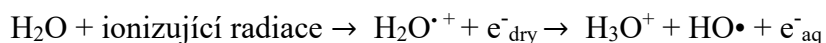
1.1.1.3 Metody vzniku radikálů

a) Radiolýza vody pomocí synchrotronových rentgenových pulsů

Pro výrobu hydroxylových radikálů existuje několik metod. Pravděpodobně nejlépe charakterizovanou technikou je radiolýza vody pomocí synchrotronových rentgenových pulsů. Radiolýza peptidových a bílkovinných roztoků s vysokofrekvenčními rentgenovými paprsky indukuje stabilní, kovalentní modifikace aminokyselinových zbytků [19].

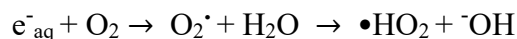
V roce 1999 Maleknia, Brenowitz a Chance vybrali řadu peptidů s 5 až 14 aminokyselinovými zbytky různých sekvencí pro studium jejich synchrotronové radiolýzy. Peptidy byly vystaveny rentgenovému záření a následně byly za aerobních podmínek zkoumány jejich modifikace pomocí hmotnostní spektrometrie. Jejich analýza ukázala následující pořadí reaktivity aminokyselin: Cys, Met \gg Phe, Tyr, > Trp > Pro > His, Leu. Experiment také ukázal, že při radiolýze peptidů ve vodě za aerobních podmínek také vznikají radikály s kyslíkem pocházejícím ze vzduchu, které přispívají k modifikaci postranních řetězců aminokyselin. Radiolýza vytváří hydroxylové zbytky (rovnice 1). Ionizací vody vzniká radikál vody, který reaguje během několika pikosekund s další molekulou vody za vzniku hydroxylových radikálů a hydronových elektronů.

Rovnice 1:

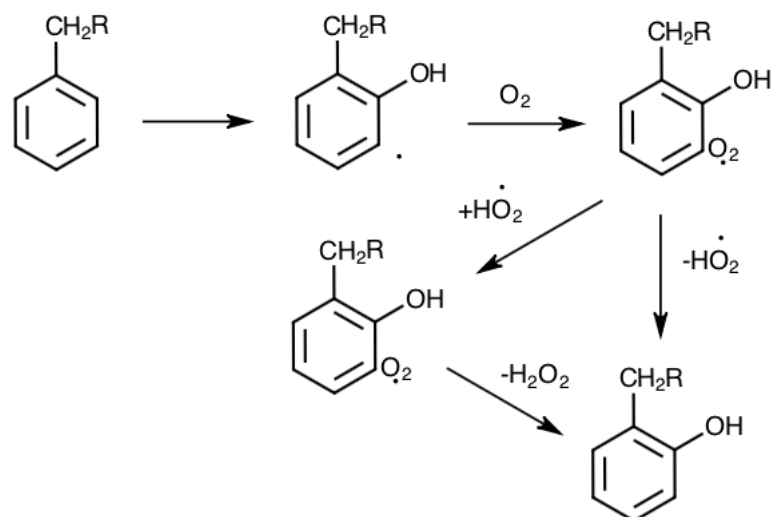


Pokud je reakce prováděna v přítomnosti vzduchu, dochází k tvorbě hydroperoxylových a superoxidových radikálů (rovnice 2).

Rovnice 2:



Ukázkou využití radiolýzy vody je mechanismus radikálového oxidačního značení aromatické aminokyseliny (např. Phe). Tento mechanismus byl podrobněji popsán skupinou M.R. Chance. V jejich experimentu radiolýza peptidu probíhala ve vodě značené atomem kyslíku O^{18} za aerobních podmínek [20]. Při reakci Phe s hydroxylovými radikály vznikají hydroxycyklohexadienylové zbytky, které mohou dále reagovat molekulou kyslíku za vzniku peroxyradikálů, které mohou dále reagovat s hydroperoxylovými radikály za vzniku peroxidu vodíku a Tyr (para) nebo kresolů (ortho a meta) [21].



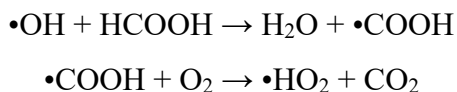
Obr. 9 - Reakční mechanismus radikálového oxidačního značení aromatické aminokyseliny. „R“ představuje zbytek aminokyseliny Phe. Při reakci s hydroxylovými radikály vznikají hydroxycyklohexadienylové zbytky, které mohou dále reagovat s molekulou kyslíku za vzniku meziproduktů peroxyradikálů. Následně mohou procházet následnými reakcemi zahrnující hydroperoxylové radikály za vzniku peroxidu vodíku a Tyr (para) nebo kresolů (ortho a meta), upraveno podle [20].

Konvenční rentgenové zdroje vytvářejí nízký tok radikálů a vyžadují experimenty proteinu nebo nukleových kyselin, které je potřeba zastavovat v delších reakčních intervalech. Naproti tomu vysoký tok radikálů generovaných synchrotronovou radiolýzou zajišťuje dostatečnou koncentraci OH radikálu ke štěpení RNA nebo indukuje modifikaci aminokyselin v peptidech a proteinech v řádu milisekund [22].

b) Radiolýza vody pomocí gama záření

Alternativní metodou pro vznik hydroxylových radikálů pomocí radiolýzy vody je radiolýza pomocí gama záření, jež využívá synchrotronových rentgenových pulsů a jež byla zveřejněna Jay A. LaVernem v roce 2000. Při ozáření vody pomocí gama paprsků za aerobních podmínek vznikají hydroxylové radikály a pomocí kyseliny mravenčí se přemění na radikály karboxylové kyseliny, které se poté na vzduchu dále oxidují na oxid uhličitý (rovnice 3 a 4). Hmotnostní spektrometrií lze určit množství oxidu uhličitého, které odráží množství vytvořených hydroxylových radikálů. [23].

Rovnice 3 a 4:



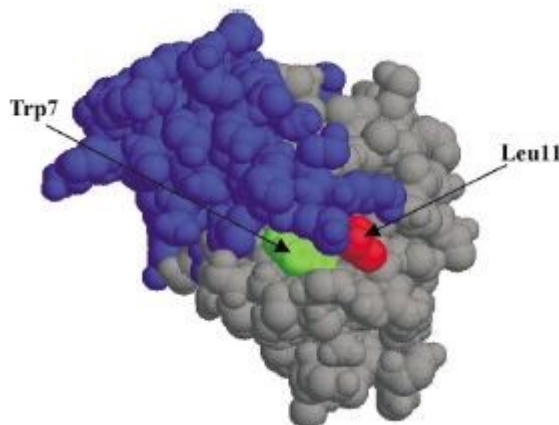
c) Oxidace proteinů katalyzována kovem

Rok 2003 přinesl další metodu oxidace proteinů pomocí Fentonovy reakce, při které reaguje peroxid vodíku s železnatými ionty za vzniku vysoce aktivních hydroxylových radikálů (rovnice 5), které následně oxidují aminokyselinové zbytky proteinu [24].

Rovnice 5:



Sharp, Becker a Hettich využili těchto chemicky vytvořených hydroxylových radikálů pro oxidaci modelového proteinu apomyoglobinu, čímž objasnili vliv dostupnosti rozpouštědla na místě oxidace. Za podmínek nízké oxidace (nula až tři atomy kyslíku přidané na molekulu apomyoglobinu) pomocí kapalinové chromatografie spojené s vysoko rozlišenou hmotnostní spektrometrií s Fourierovou transformací (LC-FTICR-MS) pozitivně identifikovali pět míst oxidace (Phe¹⁵¹, Trp⁷, Leu¹¹, Met¹³¹ a Met⁵⁵). Princip metody spočívá v reakci lyofilizovaného apomyoglobinu ve fosfátovém pufru s roztokem Mohrovy soli ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂), EDTA. Do reakční směsi byl přidán askorbát sodný, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) a nakonec pro iniciaci oxidace peroxid vodíku. Poté byl oxidovaný protein štěpen pomocí trypsinu a následně analyzován pomocí LC-MS/MS [25]. NMR struktura části apomyoglobinu z velrybích spermií ukazuje, že se na tomto proteinu vyskytují tři neuspořádané oblasti, které jsou extrémně přístupné pro rozpouštědlo [26]. Aminokyselinové zbytky, které se vyskytují v těchto oblastech (Phe¹⁵¹ a Met⁵⁵) jsou tedy mnohem více přístupné rozpouštědlu a mají větší chemickou reaktivitu, než se původně předpokládalo na základě výpočtů založených na navržené krystalové struktuře holomyoglobinu. Nicméně nedochází k oxidaci jen v těchto oblastech, což dokládá oxidace Trp⁷ a Leu¹¹ (Obr. 10) [25].



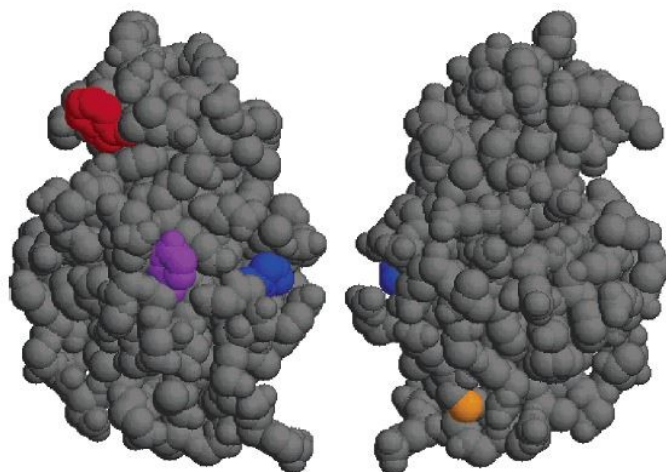
Obr. 10 - Struktura krystalu holomyoglobinu. V zelené oblasti je zobrazen postranní řetězec Trp⁷, v červené je zobrazen postranní řetězec Leu¹¹ a modrá oblast znázorňuje tři neuspořádané oblasti, které byly určeny NMR analýzou apomyoglobinu z velrybích spermií [25].

Výhodou této metody je použití běžně dostupných chemikálií a vysoké rychlosti reakce. Na druhou stranu nelze tuto metodu oxidace provést na proteiny přirozeně obsahující kovy a také lze jen velmi obtížně zmapovat rozsáhlejší části povrchu proteinu [25].

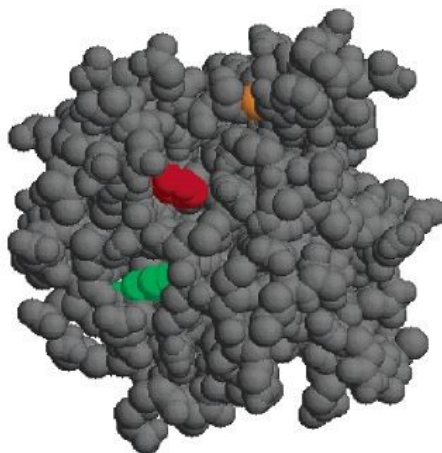
Metaloproteiny hrají důležitou roli v chemii procesů života, jako je transport dioxygeny, přenos elektronů, katalýza apod. Důležitým krokem k pochopení chemie metaloproteinů je určení koordinačního prostředí kolem kovu, a proto tentýž rok spolu s Fentonovou reakcí byla vyvinuta metoda, která využívá reakce oxidace katalyzované kovem (MCO) a následně MS k identifikaci vazebného místa mědi v metaloproteinech. Lim a Vachet přišli s metodou, která využívá reakce MCO k oxidaci aminokyselin ve vazebném místě kovu a MS k identifikaci oxidovaných aminokyselin. Kovem katalyzované oxidační reakce způsobují inaktivaci enzymů a vytvářejí reaktivní kyslíkové ($\bullet\text{O}_2$) a hydroxylové radikály ($\bullet\text{OH}$). Radikály mohou poté interagovat s blízkými aminokyselinovými zbytky a oxidovat nebo štěpit polypeptid na místech, kde tyto reaktivní radikály vznikly. Autoři hledali podmínky, umožňující reakce MCO specificky modifikovat pouze aminokyseliny vázané na kov. Pro malé peptidy, jako je angiotensin I (Agt I), optimální podmínky pro specifickou oxidaci zahrnují použití Cu (II), askorbátu a O_2 . Pro větší proteiny, jako je například azurin, rychlost a specifčnost MCO reakcí je zvýšena přítomností vysoké koncentrace askorbátu a nízké koncentrace peroxidu vodíku [28].

d) Fotolýza peroxidu vodíku pomocí UV záření

V roce 2004 Sharp, Becker a Hettich v návaznosti na předchozí studii vzniku hydroxylových radikálů pomocí Fentonovy reakce našli další způsob tvorby hydroxylových radikálů a následnou modifikaci proteinů. Tato technika nese označení FPOP (z angl. Fast Photochemical oxidation of Proteins). K tomuto účelu byl opět využit peroxid vodíku, který byl ozářen UV paprsky. Cílem této studie bylo vyvinout jednoduchý a rychlý způsob výroby hydroxylových radikálů a zároveň se vyhnout problémům s vyčištěním vzorku a vysokým koncentracím solí, které jsou nutné pro předchozí přístup využívající Fentonovu chemii nebo použití vysokoenergetického rentgenového synchrotronového paprsku, který většina výzkumných pracovišť nemá k dispozici. Sharp, Becker a Hettich tuto metodu použili pro oxidaci specifických aminokyselinových vedlejších řetězců dvou modelových proteinů (lysozym, β -laktoglobulin A), které mají velmi odlišné sekundární a terciární struktury a dobře slouží jako testovací modely pro mapování povrchu. Lysozym a β -laktoglobulin A byly ve fosfátovém pufru smíchány s peroxidem vodíku a následně po specifickou dobu ozařovány ve Stratalinkeru. Oxidované proteiny byly následně štěpeny pomocí trypsinu za vzniku peptidů, které byly dále analyzovány. Konkrétní místa stabilní modifikace byla identifikována kapalinovou chromatografií na obrácené fázi spojenou s tandemovou hmotnostní spektrometrií s kvadrupólovým analyzátozem. Největší rozsah oxidace v obou modelových proteinech vykazoval Cys obsahující atom síry, dále aromatické aminokyseliny His a Tyr v případě lysozymu a Phe v případě β -laktoglobulinu A (Obr. 11 a 12) [29].



Obr. 11 - Krystalová struktura lysozimu. Oxidované zbytky potvrzené pomocí LC-MS/MS jsou zbarveny následovně: atom síry v Cys⁶ je oranžový, postranní řetězec His¹⁵ je modrý, Tyr²⁰ fialový a Trp⁶² červený. [29].



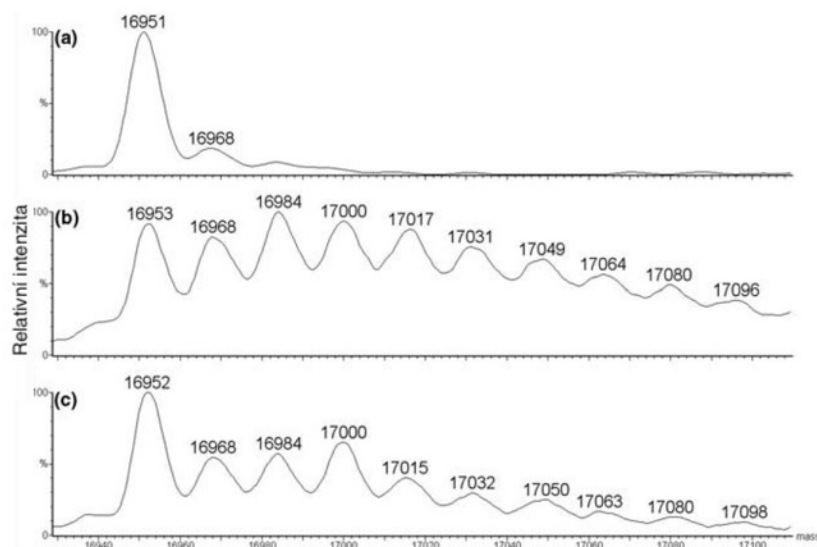
Obr. 12 - Krystalová struktura hovězího β -laktoglobulinu A. Oxidované zbytky potvrzené pomocí LC-MS/MS jsou zbarveny následovně: atom síry v Cys¹⁶⁰ je oranžový, postranní řetězec Phe¹³⁶ je zelený a Phe¹⁵¹ červený [29].

Bylo prokázáno, že pro rychlost oxidace proteinu touto metodou hraje zásadní roli přístupnost rozpouštědla k aminokyselinovým zbytkům a jejich následná reaktivita. I přes výhody rychlého a jednoduchého vzniku hydroxylových radikálů a následné oxidace proteinů je nevýhodou použití peroxidu vodíku, který nelze aplikovat na proteinech vázající přechodné kovy kvůli nekontrolovatelné Fentonově reakci, která by ihned poté za těchto podmínek následovala [29].

e) Štěpení peroxidu vodíku pomocí impulsního laseru

Při oxidačním značení může docházet k proteinovým konformačním změnám. Značení pomocí hydroxylových radikálů není výjimka. Nicméně jestliže se nejedná o vysoký stupeň značení, výsledná konformační změna je malá. Na tento problém poprvé poukázali v roce 2015 Hambly a Gross [19]. V roce 2008 také Tong, Wren a Konermann vydali článek, který poukazoval na fakt, že ke konformačním změnám proteinu také dochází při dlouhodobém vystavování proteinu gama záření [30]. Zjištění, že konformační změny proteinu závisí na době expozice, vedlo ke snaze nalézt způsob, jak celý proces urychlit. Pokoušeli se vymyslet strategii, při níž by byl protein vystaven pouze jednomu pulzu záření, který by byl kratší než nejrychlejší možná konformační změna v proteinu, která by mohla nastat [19].

Takový přístup může být realizován použitím nanosekundového impulsního KrF excimerového laseru (248 nm), který štěpí peroxid vodíku v nízkých koncentracích za vzniku hydroxylových radikálů, které modifikují protein za méně než 1 ms. Radikály se tedy vytvářejí v řádu nanosekund, ale vyžadují až 100 ms pro samozhášení. Během takového časového úseku se může protein sbalit například do supersekundární struktury, což je pro naši oxidaci nežádoucí. Proto musela být do reakce přidána vhodná molekula, která by životnost radikálů zkrátila na dobu kratší než 1 ms. Metoda byla testována za použití proteinu apomyoglobin s přidáním Phe nebo Glu (Obr. 13). Místa oxidace byla lokalizována za použití LC-MS/MS, které vyžadovaly méně než 1 nmol bílkoviny [31].



Obr. 13 - Porovnání stupně oxidace apomyoglobinu při použití různých podmínek. (a) oxidace 10 μM apomyoglobinu v 10 mM NaH_2PO_4 (pH 7,8), 15 mM H_2O_2 a 20 mM Phe. (b) za obdobných podmínek jako (a), ale bez Phe. (c) za obdobných podmínek jako (a) ale 20 mM Glu místo Phe. V případě (a) nebyly prakticky pozorovány žádné další oxidace, což naznačuje, že Phe při 2000násobném přebytku je schopen úplně zhaset hydroxylové radikály vytvořené laserem. V případě (b), kdy nebyl použit Phe, bylo pozorováno velké množství oxidace. Použití Glu (c) poskytlo přiměřené množství oxidace, které by mělo omezit počet modifikací na ty zbytky, které jsou vysoce reaktivní a vystaveny působení rozpouštědla, upraveno podle [31].

V roce 2015 Zhang, Rempel a Gross přišli na způsob, jak kalmodulin značit pomocí fotoleucinu rychleji a efektivněji. Jednalo se o rozšíření metody FPOP o průtokový systém (FPOP flow system), při kterém je možné použít více laserových snímků, ale s omezenou expozicí na určité místo zásahu. Díky omezení reakce na určité malé místo, byli schopni používat laserové impulsy s relativně nízkou energií k dosažení vyššího procenta modifikace. Aby mohli tento způsob provést, museli zabudovat do reakce druhý laser. Při reakci byly střídány laserové pulsy pomocí YAG laseru a KrF laseru [19].

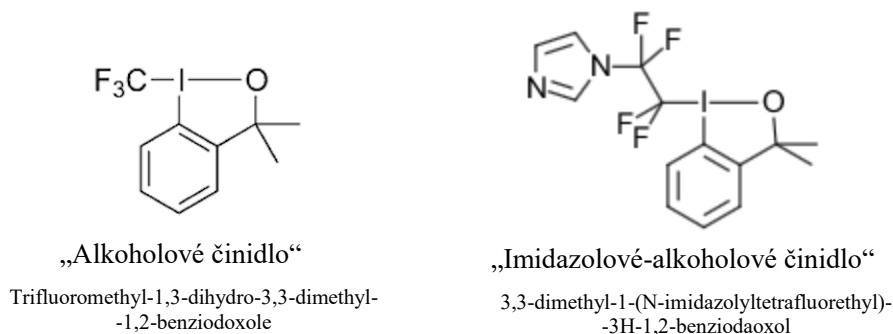
1.1.1.4 Trifluormethylace

Trifluormethylace je stále více používanou metodou modifikace organických molekul. Tento fakt je spojen s přínosy získaných z nových molekul s pozoruhodnými vlastnostmi [32], jako je například odolnost vůči chemické a enzymatické degradaci, vliv na acidobazickou rovnováhu a zvýšení lipofilicity [33]. Obrovskou výhodou trifluormethylace je rychlá, levná a jednoduchá proveditelnost reakce. Není k ní potřeba rentgenové záření či synchrotron, který nemá většina pracovišť k dispozici. Přímý přenos trifluormethylové skupiny obvykle vyžaduje podmínky, které jsou často neslučitelné

s citlivějšími funkcemi v molekule. Nicméně nedávno byla publikována nová metoda popisující trifluormethylaci Trp za účelem inkorporace atomu ^{19}F pro měření pomocí NMR. Tato metoda je ovšem vysoce selektivní, a proto se k nesespecifickému značení proteinů nedá použít [34]. Nejběžnější metodou zavedení trifluormethylové skupiny do molekuly je nukleofilní trifluormethylace. Tomuto účelu je nejčastěji používáno Ruppert-Prakash činidlo (Me_3SiCF_3) [35].

a) Togniho činidla

Činidla pro elektrofilní C- a S-trifluormethylaci jsou stále ve fázi raného vývoje. Antonio Togni a spol. nedávno popsali novou skupinu elektrofilních činidel, která dobře doplňuje nukleofilní Ruppert-Prakash činidla. Nová skupina formálně elektrofilních činidel, jež přenáší CF_3 , je vytvořena na bázi cyklického hypervalentního jodidového jádra, z nichž nejúspěšnější jsou tzv. „alkoholová“ činidla (Obr. 14) [35]. Fakt, že nebyla původní syntéza Togniho činidel patentována, usnadnil ostatním laboratorům možnost zkoumat a vyvíjet další metody výroby a jejich následné reakce [32]. Togniho činidla jsou snadno použitelná a mohou být vystaveny vzdušné vlhkosti po krátkou dobu bez jakýchkoliv negativních změn [35]. Nicméně se tyto látky na vzduchu při laboratorní teplotě po několika týdnech rozkládají, tudíž by se měly skladovat při nízkých teplotách. Jelikož se jedná o hypervalentní jodové sloučeniny, mohou se exotermně rozkládat [34].



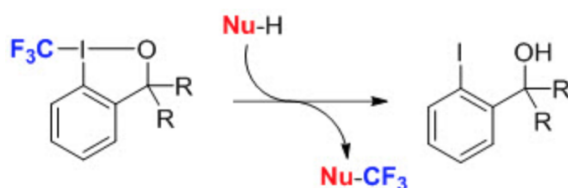
Obr. 14 - Strukturní vzorce tzv. „alkoholových“ Togniho činidel

Vzorce Togniho činidel „alkoholového“ obsahující trifluormethylovou skupinu CF_3 a „imidazolového-alkoholového“ Togniho činidla obsahující skupinu $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_2\text{F}_4$ [32].

b) Reaktivita Togniho činidel

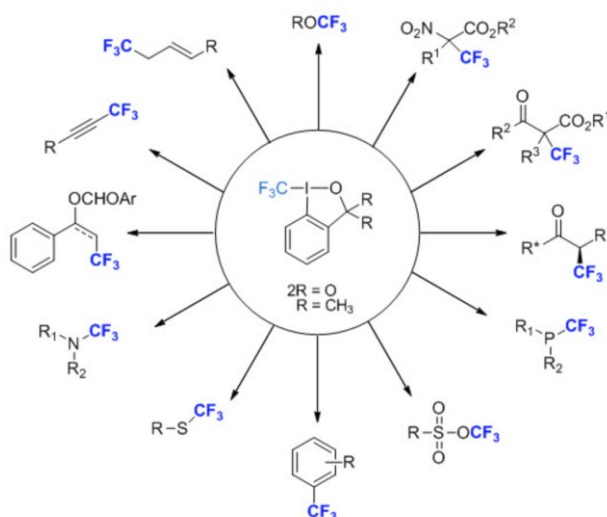
Při reakci Togniho činidel je nejprve potřeba aktivovat trojnou vazbu fenylacetylenů. K tomu účelu je možno použít několik druhů sloučenin, například Lewisovy kyseliny,

jako jsou různé druhy kovových solí, například $\text{Zn}(\text{OTf})_2$, dále Brønstedovy kyseliny, například sulfonové kyseliny, hydrogen fosfáty nebo také mohou být aktivovány pomocí různých kovů obsahující například rhenium nebo měď [32]. Po aktivaci činidla se CF_3 skupina uvolní a přenesse se na cílovou molekulu. Substráty nesoucí enolizovatelná centra uhlíku se ukázaly být vhodnými kandidáty pro stereoselektivní zavedení CF_3 skupiny. Reakce Togniho činidel s nukleofily zjednodušeně popisuje schéma na obr. 15 [36].



Obr. 15 - Reakční schéma Togniho činidla s nukleofilním činidlem [36]

Ještě v roce 2006 představovala tato činidla spíše než standardní nástroj fluororganické chemie důležitý zdroj informací o vlastnostech perfluoralkyliodonových reagentů. Nicméně během několika málo let se situace dramaticky změnila, neboť jejich využitelnost byla prokázána několika výzkumnými skupinami v množství nových transformací (Obr. 16) [36].



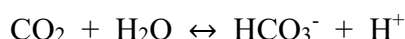
Obr. 16 - Reakční schéma Togniho činidel a jejich možné transformace [36].

Díky jejich jednoduchému použití, vysoké reaktivitě a podmínkám nenáročným na skladování se postupně zvyšuje zájem o tyto činidla. V současné době nacházejí rozsáhlé využití v přípravách nových molekul v různých materiálech [36].

1.2 Karbonická anhydrasa

Karbonická anhydrasa, s molekulovou hmotností 29 kDa, je zinek obsahující metaloenzym, který katalyzuje reverzibilní konverzi oxidu uhličitého a hydrogen uhličitanu v mnoha organismech (rovnice 6) [37]. Zinek v prostetické skupině enzymu je koordinován třemi histidinovými postranními řetězci. U zvířat je funkce enzymu důležitá pro udržení acidobazické rovnováhy v krvi a jiných tkáních pro transport oxidu uhličitého.

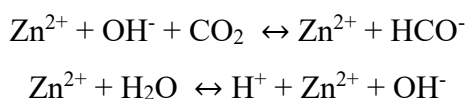
Rovnice 6:



Karbonická anhydrasa byla z erytrocytů poprvé purifikována v roce 1933 [38]. Přestože je od čtyřicátých let známo, že karbonická anhydrasa je v rostlinách nezbytná pro fixaci CO_2 , bylo zaznamenáno poměrně málo studií, které by se tomuto faktu věnovaly [39]. Srovnání sekvencí a krystalových struktur savčích a rostlinných enzymů demonstruje, že se vyvinuly nezávisle a byly označeny jako třídy α a β . Další nezávisle vyvinutá třída γ byla nalezena v roce 1994 a fylogenetické analýzy u ní předpovídají starodávny původ [40].

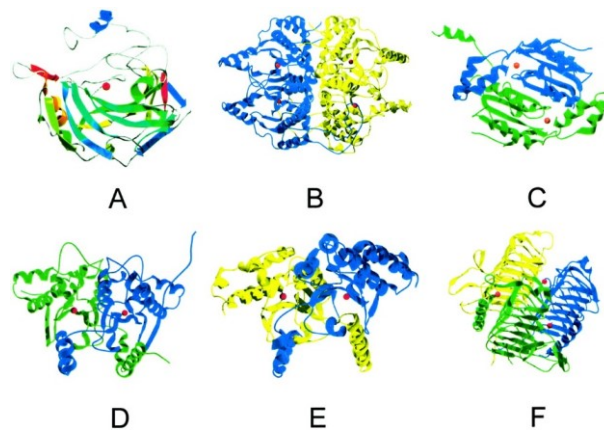
Tři třídy nemají významnou sekvenční identitu. Avšak i přes velké rozdíly ve struktuře se v aktivních centrech všech tří tříd nalézá atom zinku, který je nezbytný pro katalýzu [41]. Kinetické studie ukazují, že všechny tři třídy používají obdobný dvoustupňový mechanismus [42]. Prvním krokem je nukleofilní atak hydroxidového iontu vázajícího zinek na CO_2 (rovnice 7). Druhým krokem je regenerace aktivního místa ionizací molekuly vody navázané na zinek a odstranění protonu z aktivního místa (rovnice 8) [38].

Rovnice 7 a 8:



Třída α je zdaleka nejlépe prostudovaná s ohledem na mechanismus katalýzy. Do této skupiny patří všichni savci. Třída enzymů β , do které patří rostliny, řasy, bakterie a archea, se z hlediska struktury ostře odlišuje od ostatních dvou tříd. Zatímco třídy α a γ jsou striktně monomery a trimery, třída β jsou dimery, tetramery, hexamery a oktamery, což

naznačuje, že základní jednotka je dimer [43]. Předpokládá se, že třída γ se vyvinula před 3 až 4,5 miliardami lety [39].



Obrázek 10 - Diagramy krystalových struktur α , β , a γ třídy karbonické anhydrasy. Aktivní ionty zinku jsou zobrazeny jako červené kuličky. Diagram A náleží třídě α lidského izozymu II, B třídě β *Porphyridium purpureum*, C třídě β *Pisum sativum*, D třídě β *Methanothermobacter thermoautotrophicum*, E třídě β *Escherichia coli* a F třídě γ *Methanosarcina thermophila* [44].

2 CÍLE PRÁCE

- Optimalizace reakce proteinů s Togniho činidlem, které má schopnost radikálovým mechanismem vnést halogen-alkyl do molekuly proteinu
- Analýza chemicky modifikovaných proteinů pomocí hmotnostně spektrometrických metod, aby se přesně lokalizovaly modifikované postranní řetězce aminokyselin

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam přístrojů

Analytické váhy	Mettler Toledo, Švýcarsko
Automatické pipety	Eppendorf, Německo
Centrifuga 5415R	Eppendorf, Německo
Centrifuga Minispin	Eppendorf, Německo
Elektroforetická souprava	BioRad, USA
Fotodokumentační systém Chemidoc MP	BioRad, USA
Hmotnostní spektrometr solariX XR	Bruker Daltonics, USA
μHPLC systém Agilent 1200	Agilent, USA
Chladnička	Zanussi, Itálie
Chromatografická kolona Zeba Micro Bio-Spin	Thermo Scientific, USA
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris gel (zkontrolovat)	Invitrogen, USA
pH metr Orion 2D star	Thermo Scientific, USA
Sonikační lázeň	Bandellin, Německo
Termostat stolní	Grant, Velká Británie
Termostat Thermomixer Comfort	Eppendorf, Německo
UV-VIS spetkrometr DeNovix DS-11	DeNovix, USA
Vakuová odparka SpeedVac	Jouan, Francie
Vortex VELP	Scientifica, Itálie
Zdroj napětí PowerPac	BioRad, USA

3.2 Biologický materiál

Protein hCA	Sigma-Aldrich, USA
Proteasa trypsin	Promega, USA

3.3 Seznam chemikálií

Acetonitril (LC-MS grade)	Merck, Německo
Alkoholové Togniho činidlo	CF Plus Chemicals, ČR
Comassie Brilliant Blue R 250	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid	Fluka, Švýcarsko
1,4-dithiothreitol	Fluka, Švýcarsko
Ethanol	Merck, Německo

Ethylmorfolin	Fluka, Švýcarsko
Imidazolové Togniho činidlo	CF Plus Chemicals, ČR
Kyselina askorbová	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina mravenčí	Merck, Německo
Kyselina octová (LC-MS grade)	Merck, Německo
Methanol (LC-MS grade)	Merck, Německo
NuPAGE® SDS elektrodový pufr	Thermo Scientific, USA
NuPAGE® vzorkový pufr LDS	Thermo Scientific, USA
Proteinový standard SeeBlue	Thermo Scientific, USA
Kyselina trifluoroctová	Fluka, Švýcarsko
Triethylamin	Jersey Lab supply, USA
Voda (LC-MS grade)	Merck, Německo

3.4 Seznam roztoků

Barvicí roztok

45% methanol, 10% kyselina octová, 0,25% Comassie Brilliant Blue R 250,

Elektrodový pufr

5% MES SDS Running pufr

Odbarvovací roztok

45% ethanol, 10% kyselina octová,

Redukující vzorkový pufr

200mM dithiothreitol v NuPAGE® LDS vzorkovém pufru

Štěpící pufr

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

Triethylamin-karbonátový pufr

50mM triethylamin ve vodě, probubláno CO₂, pH 7,5

3.5 Softwarové vybavení

Data analysis 4.4	Bruker Daltonics, USA
LinX 1.0	peterslab.org
mMass 5.5.0	mMass.org

3.6 Reakce s Togniho činidlem

3.6.1 Optimalizace podmínek reakce Togniho činidel

Pro optimalizaci podmínek byl na základně malé velikosti vybrán protein ubiquitin (8,5 kDa). Zásobní roztok ubiquitinu byl připraven rozpuštěním komerčního vzorku v triethylamin-karbonátovém pufru o pH 7,5. Výsledná koncentrace proteinu činila 0,5 g/l. Pro jednotlivé reakce bylo vždy použito 20 μ g proteinu. Toto množství bylo za laboratorní teploty smícháno s různými nadbytky kyseliny askorbové a s jednotlivými Togniho činidly, která byla před experimentem vždy čerstvě rozpuštěna v dimethylsulfoxidu (DMSO). Zásobní roztoky Togniho činidel byly připraveny o koncentraci 10 g/l a zásobní roztok kyseliny askorbové o koncentraci 500 g/l. Reakce byla vždy ponechána 1 hodinu za laboratorních teploty. Po jedné hodině byly všechny vzorky analyzovány pomocí ESI-FTICR-MS.

3.6.2 Příprava roztoku proteinu hCA

Protein hCA byl pro potřeby experimentu skladován při teplotě -80°C ve formě alikvotů o hmotnosti 10 μ g a koncentraci 0,1 g/l ve vodě. Pro reakci s Togniho činidly bylo nutné nejprve převést protein do reakčního pufru, který představoval 50mM triethylamin-karbonátový pufr o pH 7,5. K převodu do pufru byla využita gelová filtrace pomocí kolony Micro BioSpin. Ke koloně bylo přidáno 500 μ l pufru a byla centrifugována po dobu 1 minuty při 1000 g. Prošlá frakce byla odstraněna a celý postup se opakoval. Celkově byla kolonka promyta třikrát. Po náležitém promytí byl na kolonu nanesen vzorek proteinu (75 μ l). Kolona byla po nanesení vzorku centrifugována 4 minuty při 2000 g. U eluovaného proteinu byla změřena koncentrace a byl použit k dalším experimentům.

3.6.3 Stanovení koncentrace proteinu

Koncentrace roztoku proteinu hCA byla stanovena pomocí UV-VIS spektrometru DeNovix při vlnové délce (280 nm). Jako slepý vzorek pro měření byl použit triethylamin-karbonátový pufr o pH 7,5. Vzorek byl proměřen třikrát, aby byla případná chyba měření redukována na minimum. Výsledná koncentrace byla při znalosti molárního absorpčního koeficientu (44 380 l/mol·cm) pro hCA pro 280 nm a délky absorpční vrstvy vypočítána pomocí Lambert-Beerova zákona jako průměr těchto tří

hodnot. Jelikož byla koncentrace proteinu stanovena na 0,6 g/l a požadovaná koncentrace činila 0,6 g/l, roztok již nebyl dále ředěn.

3.6.4 Příprava zásobních roztoků kyseliny askorbové a Togniho činidel

Aby mohlo dojít k modifikaci proteinu trifluormethylovou skupinou, musela být reakce nejdříve aktivována. Pro aktivaci přenosu CF₃ skupiny alkoholového činidla C₅H₃N₂F₄ skupiny imidazolového-alkoholového činidla byl použit roztok kyseliny askorbové. Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 50 mg kyseliny askorbové v triethylamin-karbonátovém pufru, aby bylo dosaženo koncentrace 500 g/l. Zásobní roztoky Togniho činidel byly připraveny rozpuštěním jednotlivých činidel v DMSO. Výsledná koncentrace byla 10 g/l pro alkoholové činidlo a 15 g/l pro činidlo imidazolové-alkoholové.

3.7 Modifikace proteinu Togniho činidlem

Po přípravě všech potřebných roztoků byla zahájena modifikace proteinu hCA Togniho činidlem. Byly připraveny dvě sady reakcí. Jedna sada pro alkoholové Togniho činidlo, druhá sada pro imidazolové-alkoholové Togniho činidlo. V každé sadě byl použit 100 a 200násobný molární nadbytek látkového množství činidla oproti látkovému množství proteinu spolu s 50 a 100násobným nadbytkem látkového množství kyseliny askorbové oproti látkovému množství proteinu pro alkoholové činidlo a 75 a 150násobným nadbytkem látkového množství kyseliny askorbové oproti látkovému množství proteinu pro imidazolové-alkoholové činidlo. Nejprve byl protein smíchán s činidlem. Aby bylo množství reakční směsi ve všech jamkách stejné a aby byl zachován poměr nadbytku oproti proteinu, pro 200násobný nadbytek byl použit zásobní roztok činidla, pro 100násobný nadbytek byl zásobní roztok dvakrát ředěný roztokem DMSO. Poté byla ke směsi pro aktivaci reakce přidána kyselina askorbová. Množství jednotlivých přidaných složek je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1 - Množství jednotlivých přidaných složek

Reakce	Protein [μl]	Činidlo [μl]	Kys. askorbová [μl]
Alk 100 VitC 50	16,6	2,3	2,4
Alk 200 VitC 100	16,6	2,3	2,4
Imid 100 VitC 75	16,6	2,3	2,4
Imid 200 VitC 150	16,6	2,3	2,4

Po pipetování všech složek byly vzorky pomocí Vortexu zamíchány a ponechány 1 hodinu za laboratorní teploty. Poté byla reakce zastavena přidávkem nadbytku kyseliny askorbové.

3.8 Elektroforetická separace modifikovaného proteinu

Výsledek reakce s Togniho činidlem byl monitorován pomocí elektroforetické separace v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu litního (LDS). Nejprve bylo do každého vzorku přidáno 5 μ l čtyřikrát koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru LDS s 200mM DTT. Každá frakce byla pomocí Vortexu zamíchána a ponechána inkubovat 5 minut v termostatu při teplotě 95°C. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 15 s (12000 g). Následně byly vzorky ze všech frakcí nanесeny do jamek již komerčně dodávaného gradientového 4-12% polyakrylamidového gelu. Vedle vzorků byl na gel nanесen také proteinový standard a samotný protein s kyselinou askorbovou jako kontrola. Gel byl vložen do elektroforetické aparatury, která byla naplněna elektrodoým pufrem, připraveným 20násobným naředěním koncentrovaného MES SDS elektrodoého pufru vodou. Elektroforéza probíhala přibližně 60 minut s nastaveným konstantním napětím 200 V a horní limitní hodnotou proudu 130 mA.

3.9 Barvení a odbarvování proteinu v polyakrylamidovém gelu

Polyakrylamidový gel byl pro zviditelnění jednotlivých proteinů vložen do vaničky s barvicím roztokem. Po 10 minutách byl roztok odstraněn a gel byl ponořen do odbarvovacího roztoku. Odbarvovací roztok byl několikrát vyměněn, dokud nebylo dosaženo dostatečného odbarvení gelu. Po vyjmutí z odbarvovací lázně byl gel pomocí fotodokumentačního systému Chemidoc MP vyfocen. Jelikož byl použit proteinový standard SeeBlue, byly možné díky tabelovaným hodnotám molekulové hmotnosti od výrobce přiřadit k jednotlivým proužkům hodnoty molekulové hmotnosti pro náš separovaný protein.

Po odbarvení byly z gelu skalpelem vyříznuty proužky odpovídající modifikovanému proteinu hCA. Proužky gelu byly nařezány na přibližně stejně velké kousky (1×1 mm) a přeneseny do označených mikrozkuavek. Dále byly kousky gelu odbarvovány pomocí ethylmorfolinového (EtMor) pufru a acetonitrilu (ACN) v poměru 1:1. Mikrozkuavky byly míchány na vortexu, 2 minuty sonikovány a stočeny po dobu 15 s (12 000 g). Modrý roztok byl následně opatrně odstraněn, aby nedošlo k nasátí kousků gelu a do mikrozkuavek byl opět přidán EtMor pufr a ACN v poměru 1:1. Tento postup byl

opakován do té doby, než se z gelu úplně neodstranila modrá barva. Po odbarvení bylo do mikroskopu přidáno 30 μ l ACN. Vzorky byly míchány na vortexu a roztok opět odebrán pipetou. Ke vzorkům bylo přidáno 30 μ l EtMor pufru a poté byly opět vortexovány, 2 minuty sonikovány, 15 s centrifugovány (12 000 g) a roztok pipetou odebrán.

3.10 Proteolytické štěpení proteinu

Mikroskopavky s kousky gelu byly po odebrání roztoku EtMor pufru umístěny na 30 minut do lyofilizátoru, ve které byly gely při teplotě 30°C sesušeny. Sesušený gel byl převrstven 20 μ l štěpícího pufru, jež obsahoval 10% AcN. K takto připraveným vzorkům byla dále přidána samotná proteasa trypsin v poměru 1:20 (w/w). Štěpení proteinu probíhalo přes noc v termostatu při teplotě 37°C.

3.11 Analýza modifikovaného proteinu pomocí LC-MS/MS

Vlastní LC-MS analýza vzorků byla provedena mým konzultantem Mgr. Michalem Rosůlkem. Peptidy byly odděleny na 50°C vyhřívané koloně Zorbax SB 300, C18 pomocí kapalinové chromatografie na obrácené fázi (μ HPLC systém Agilent 1200). Roztoky mobilní fáze měly toto složení: roztok A (0,1% FA; 2% AcN ve vodě) a roztok B (0,1% FA; 2% voda v AcN). Nástřik vzorku činil 5 μ l a průtok 10 μ l/min. Kolonou zachycené peptidy byly vymyty lineárním gradientem pufru B od 5 do 40 % za 32 minut a následně od 40 do 95 % za 5 minut. HPLC systém byl přímo spojen s hmotnostním spektrometrem (solariX XR, Bruker Daltonics). Separované peptidy byly nabity pomocí ESI ionizace a analyzovány pomocí FT-ICR.

3.12 Vyhodnocení dat z LC-MS/MS analýzy

Získaná data byla interpretována pomocí speciálních programů DataAnalysis 4.4, LinX a mMass. Pomocí SNAP algoritmu byla spektra deisotopována a dekonvoluována, k jednotlivým absorpčním maximům byly přiřazeny náboje a hmoty. Vygenerovaný seznam m/z byl pomocí programu LinX porovnán s teoretickou knihovnou m/z vytvořenou pro sekvenci hCA. V případě nalezené shody m/z (rozdíl max. 2 ppm) byly modifikované a nemodifikované peptidy přiřazeny. MS/MS spektra byla vyhodnocena manuálně porovnáním s vygenerovanou teoretickou knihovnou všech iontů pro daný peptid programem mMass. Na základě dat získaných z tohoto porovnání byly lokalizovány aminokyseliny modifikované Togniho činidlem.

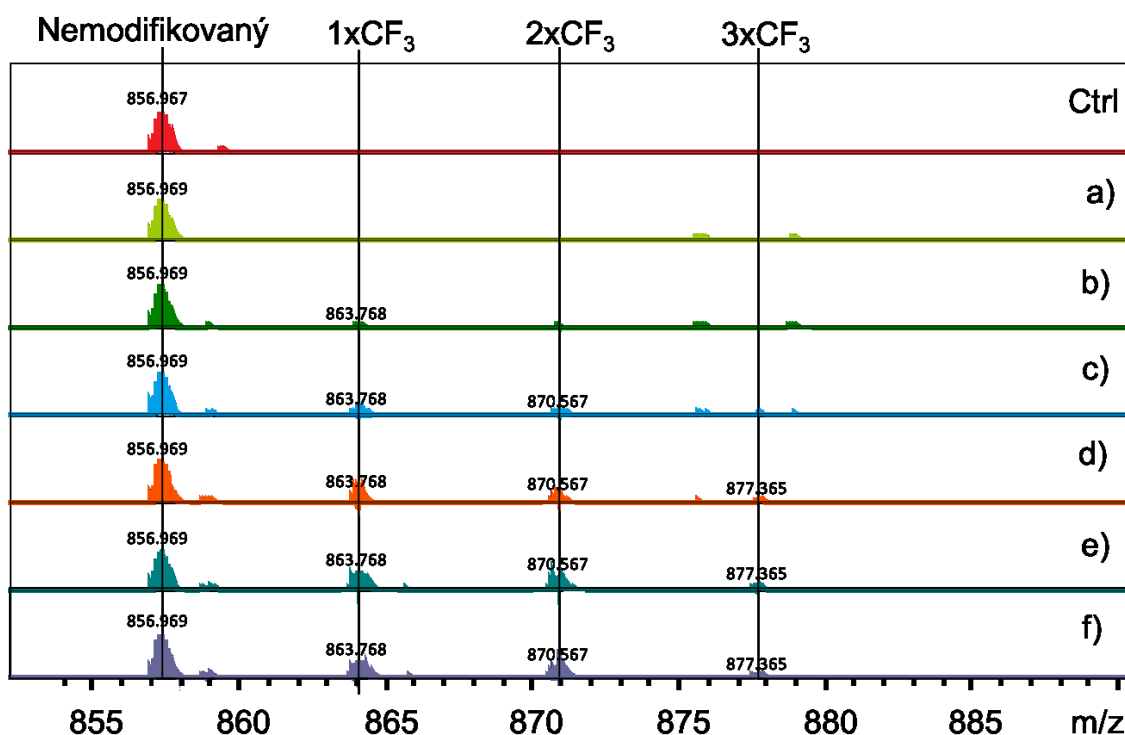
4 VÝSLEDKY

4.1 Optimalizace podmínek reakce

Pro dostatečnou funkčnost a vysokou efektivitu reakce bylo potřeba provést optimalizaci podmínek reakce Togniho činidla s proteinem. Jako testovací protein byl použit ubiquitin. Nejprve byla vybrána dvě činidla (tzv. alkoholové, imidazolové-alkoholové), která se po reakci s testovacím proteinem jevila jako nejvhodnější kandidáti pro další optimalizační reakce a reakci s modelovým proteinem. Následně se testovaly různé poměry a nadbytky látkového množství činidla a kyseliny askorbové proti látkovému množství proteinu (Tabulka 2, Obr. 11).

Tabulka 2 - Nadbytky činidla, kyseliny askorbové a jejich poměr

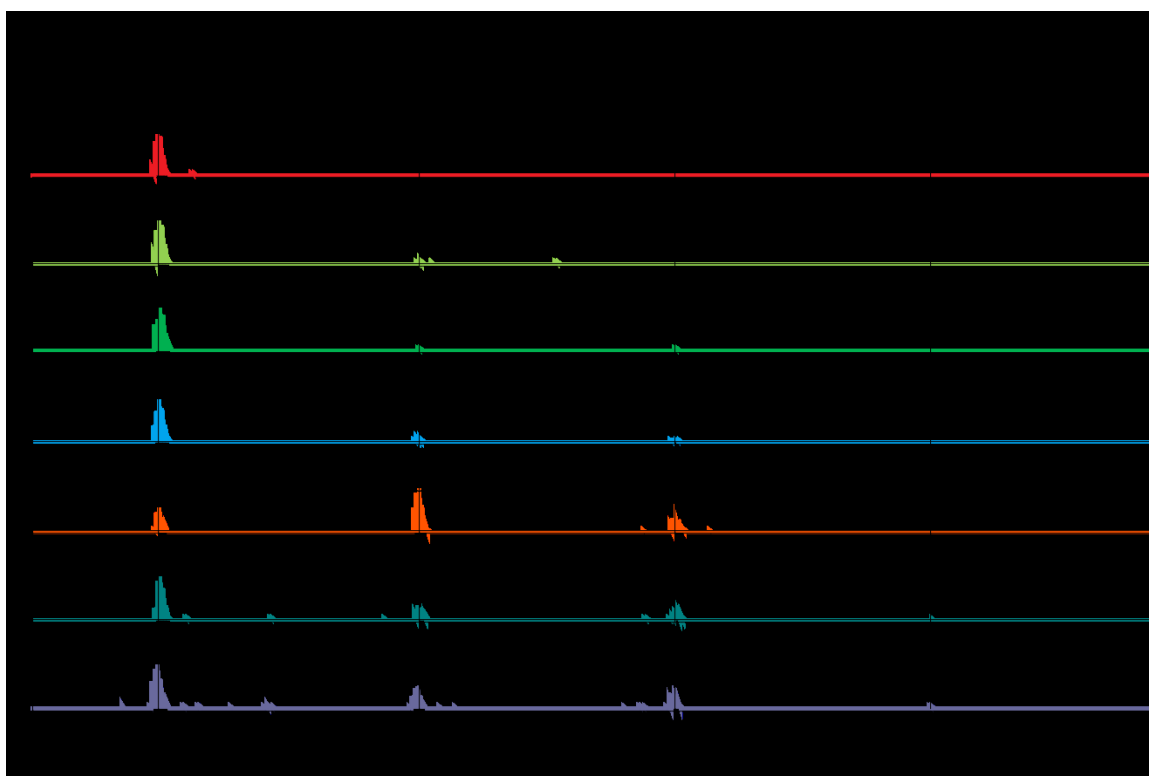
Vzorek	Nadbytek činidlo	Nadbytek kys. askorbová
a	100	200
b	100	150
c	100	100
d	100	75
e	100	50
f	100	25



Obrázek 11 - Porovnání hmotnostních spekter alkoholového činidla pro jednotlivé nadbytky činidla a kyseliny askorbové vůči proteinu pro nábojový stav 10^+ . Na obrázku je zobrazena hmota nemodifikovaného proteinu a jedenkrát, dvakrát a třikrát modifikovaného proteinu ($1xCF_3$, $2xCF_3$, $3xCF_3$). Ctrl značí kontrolní vzorek, ve kterém se nenacházelo žádné činidlo. Podle tabulky 2 mají vzorky následující nadbytky látkového množství činidla a kys. askorbové oproti proteinu: a) 100:200, b) 100:150, c) 100:100, d) 100:75, e) 100:50, f) 100:25.

Z porovnání je patrné, že oproti kontrole, ve které lze vidět jen izotopovou obálku odpovídající nemodifikovanému ubiquitinu (nábojový stav 10^+), se snižujícím se obsahem kyseliny askorbové vzrůstá intenzita 1x modifikovaného ubiquitin. Od určitých podmínek (viz vzorek c-f) lze pozorovat i 2x a 3x modifikovaný ubiquitin. Po nahlédnutí do hmotnostních spekter je zřetelné, že nejvhodnější poměr pro reakci je 100:50 náležící vzorku e.

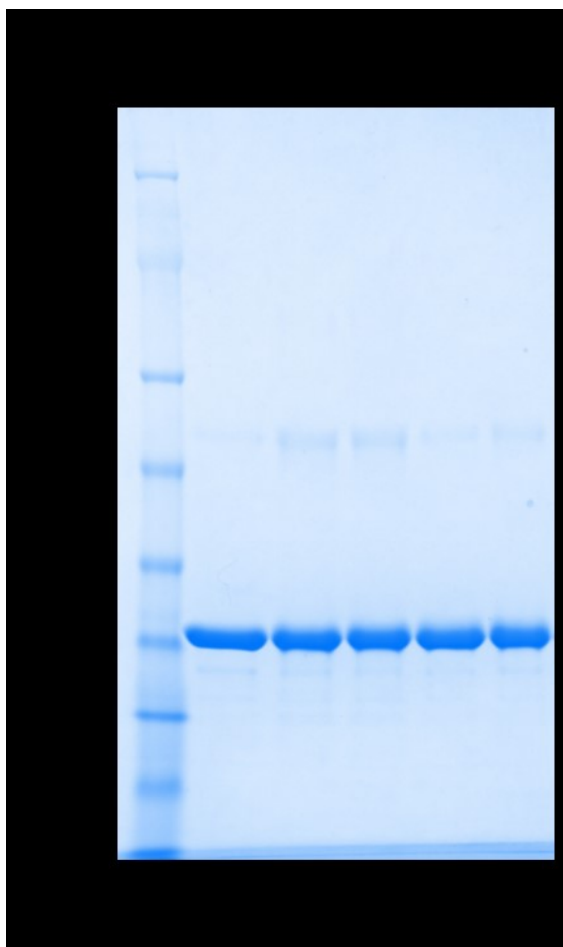
Obdobně při nahlédnutí do porovnání hmotnostních spekter imidazolového-alkoholového činidla (Obr. 12) lze pozorovat stejný trend jako u alkoholového činidla na obrázku 11. Se snižujícím se obsahem kyseliny askorbové vzrůstá intenzita 1x modifikovaného ubiquitin. Také lze pozorovat ve vzorcích c-f 2x a 3x modifikovaný ubiquitin. Nejvhodnější poměr pro reakci proteinu s imidazolovým-alkoholovým činidlem je v tomto případě 100:75 náležící vzorku d.



Obrázek 12 - Porovnání hmotnostních spekter imidazolového-alkoholového činidla pro jednotlivé nadbytky činidla a kyseliny askorbové vůči proteinu pro nábojový stav 10^+ . Na obrázku je zobrazena hmota nemodifikovaného proteinu a jedenkrát, dvakrát a třikrát modifikovaného proteinu ($1 \times C_5H_3N_2F_4$, $2 \times 1 \times C_5H_3N_2F_4$, $3 \times 1 \times C_5H_3N_2F_4$). Ctrl značí kontrolní vzorek, ve kterém se nenacházelo žádné činidlo. Podle tabulky 2 mají vzorky následující nadbytky látkového množství činidla a kys. askorbové oproti proteinu: a) 100:200, b) 100:150, c) 100:100, d) 100:75, e) 100:50, f) 100:25.

4.2 Elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu

Po provedení experimentů hCA s Togniho činidly byly produkty reakce studovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 13). Vzhledem k molekulové hmotnosti hCA (29 kDa) byl pro separaci v SDS-PAGE vybrán 4-12% gradientový gel.



Obrázek 13 - Polyakrylamidový gel se separovaným proteinem hCA po reakci s jednotlivými činidly a jejich nadbytky M značí proteinový standard SeeBlue, Ctrl značí kontrolní vzorek obsahující pouze protein a kyselinu askorbovou, * značí alkoholové činidlo a † značí imidazolové-alkoholé činidlo. Lze pozorovat proužky s molekulovou hmotností přibližně 29 kDa odpovídající proteinu hCA a další nepatrné proužky s molekulovou hmotností 50-60 kDa.

Na gelu jsou viditelné proužky odpovídající molekulové hmotnosti přibližně 28 kDa, což koresponduje s molekulovou hmotností lidské karbonické anhydrasy. Je patrné, že po přidání činidel nedochází k zásadním změnám proteinu (např. oligomerizace atd.). Oproti kontrole vidíme ve vzorcích s činidly kolem 50-60 kDa nepatrný další proužek.

4.3 Výsledky analýzy alkoholového činidla po LC-MS/MS

Analýza alkoholového činidla ukázala, že kvalita získaných spekter je vyšší při 200násobném nadbytku činidla oproti proteinu, a proto jsou dále v práci uváděna pouze data pro tento nadbytek. Výsledky analýzy alkoholového činidla shrnuje tabulka 3. Ukazuje jednotlivé peptidy proteinu, jejich modifikace, sken odpovídající retenčnímu času, ve kterém byl prekurzor eluován z kolony, m/z peptidu a nalezené modifikované a nemodifikované fragmenty (y a b ionty). Aminokyseliny, které byly modifikovány CF₃

skupinou pomocí alkoholového činidla, jsou v peptidu vyznačeny červenou barvou. Analýza výsledných dat byla provedena za předpokladu výskytu modifikací Togniho činidlem pouze na aromatických aminokyselinách proteinu. Tento předpoklad byl vytvořen na základě analýzy dat proteinu ubiquitin, které nejsou součástí této práce.

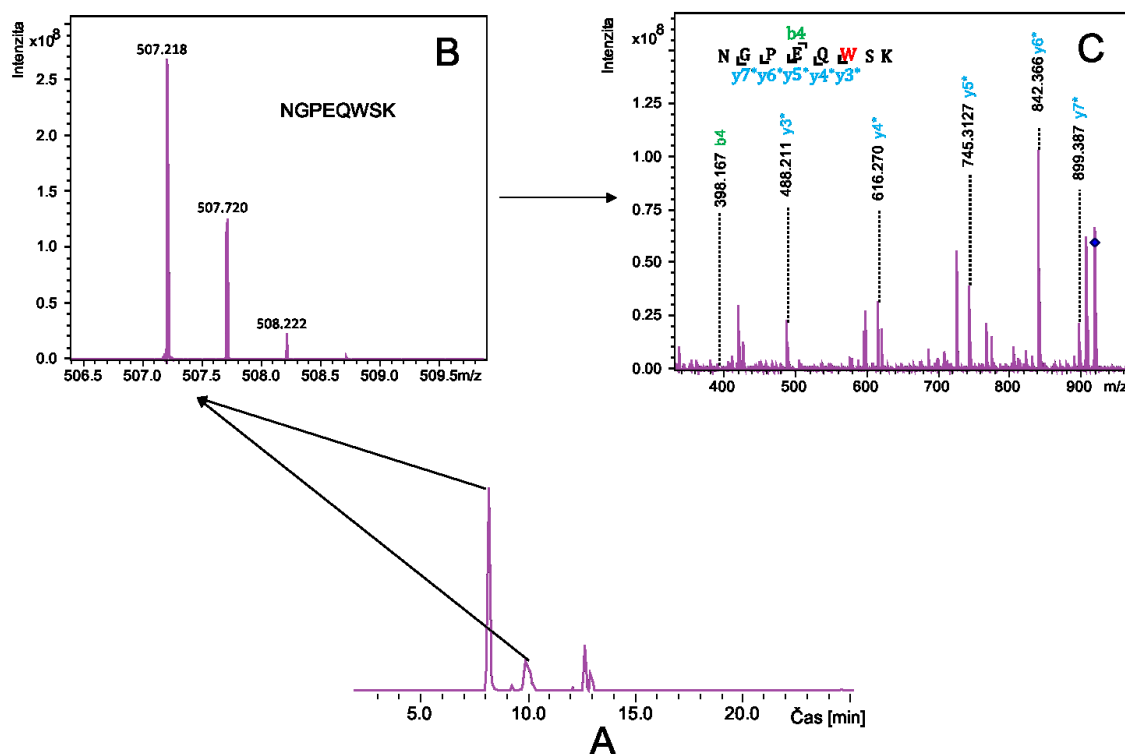
Peptid	Modifikace	Sken	m/z	y ionty	b ionty
ASPDWGYDDK	Acetylce (N-konec), 1xCF ₃	269	632.242	y5/y6*-y9*	b7*
ASPDWGYDDK	Acetylce (N-konec), 1xCF ₃	289	632.242	y6*-y8*	-
ASPDWGYDDK	Acetylce (N-konec), 2xCF ₃	325	666.236	y5,y6/y6**-y9**	-
ASPDWGYDDK	Acetylce (N-konec), 2xCF ₃	343	666.236	y5/y6**-y8**	-
ASPDWGYDDK	Acetylce (N-konec), 2xCF ₃	357	666.236	Y5/y6**-y9**	-
NGPEQWSK	1xCF ₃	149	507.219	y3*-y7*	b4
NGPEQWSK	1xCF ₃	189	507.219	y3*-y7*	-
NGPEQWSK	2xCF ₃	209	541.212	y7/y6*/y6**	-
NGPEQWSK	2xCF ₃	217	541.212	y6*,y7*/y6**	-
ESISVSSEQLAQFR	1xCF ₃	331	824.893	y3-y5/y2*-y4*,y6*	-
YSAELHVAHWNSAK	1xCF ₃	207	560.930	y5,y7-y10/y5*-y7*,y9*-13*	-
YSAELHVAHWNSAK	1xCF ₃	227	560.930	y5-y13	b6,b7,b9/b3*,b6*,b7*
LFQFHFHWGSTNEHGSEHTVDGK	1xCF ₃	301	573.662	y4-y7,y9-y11,y14-y17/y8*,y14*,y17*,y18*	b5,b7,b21-b23
ASPDWGYDDKNGPEQWSK	Acetylce (N-konec), 1xCF ₃	287	730.639	y11/y10*,y13*-y16*	b5/b10*
ASPDWGYDDKNGPEQWSK	Acetylce (N-konec), 1xCF ₃	319	730.639	y11,y13/y13*-y16*	b15/b10*
ASPDWGYDDKNGPEQWSK	Acetylce (N-konec), 2xCF ₃	315	753.301	y10*,y13*-y16*	b10*
SLLSNVEGDNAVPMQHNNRPTQPLK	1xCF ₃	299	707.600	y14/y11*,y13*,y14*,y18*,y19*	b6,b11
HDLSLKPISVSNPATAK	1xCF ₃	251	666.337	y5-y10,y16/y7*	b5/b14*
YSSLAEAAASK	1xCF ₃	193	547.752	y5-y9	-
EIIIVGHSFHVNFEDNDNR	1xCF ₃	321	581.763	y4-y8	b17*
LYPIANGNNQSPVDIK	1xCF ₃	309	905.951	y5-y10,y14,y15	b14

Tabulka 3 - Jednotlivé peptidy s nalezenými modifikacemi CF₃ skupinou alkoholového činidla, sken odpovídající retenčnímu času, ve kterém byl prekursor eluován z kolony, m/z peptidu a nalezenými modifikovanými a nemodifikovanými fragmenty (y a b ionty). 1x modifikované ionty jsou vyznačeny hvězdičkou, 2x modifikované ionty jsou vyznačeny dvěma hvězdičkami. Výsledná modifikovaná aminokyselina je v peptidu vyznačena červeně. Aminokyseliny, u kterých nebyla modifikace jednoznačně prokázána, jsou vyznačeny žlutou barvou.

4.3.1 Modifikace fragmentu NGPEQWSK

Jako modelový příklad vyhodnocení jednotlivých peptidů je uveden peptid NGPEQWSK (Obr. 14). Extrahovaný iontový chromatografický záznam LC-MS/MS analýzy (Obr. 14 A) ukazuje eluční maxima pro dané m/z, která odpovídají m/z peptidu NGPEQWSK, což dokládá MS spektrum daného elučního maxima (Obr. 14 B). Na chromatografickém záznamu lze také pozorovat eluční maxima, která ovšem neodpovídají danému peptidu. Fragmentací tohoto iontu odpovídajícímu m/z peptidu, bylo získáno kolizní spektrum s vyznačenými modifikovanými a nemodifikovanými fragmenty peptidu a jejich hodnotami m/z (Obr. 14 C). Kolizní spektrum bylo pro obě

eluční maxima téměř totožné, proto je zde uvedeno jen jedno. Díky nalezeným fragmentům (y a b iontům) bylo možné usoudit, jaká je výsledná modifikovaná aminokyselina. Zásadní proto byla přítomnost modifikovaného fragmentu y_3^* , který dokládá přítomnost modifikace na jedné z posledních tří aminokyselin. Na základě analýzy dat ubiquitinu, která ukázala, že jsou přednostně modifikovány aromatické aminokyseliny, lze usuzovat, že modifikovanou aminokyselinou je Trp¹⁶.

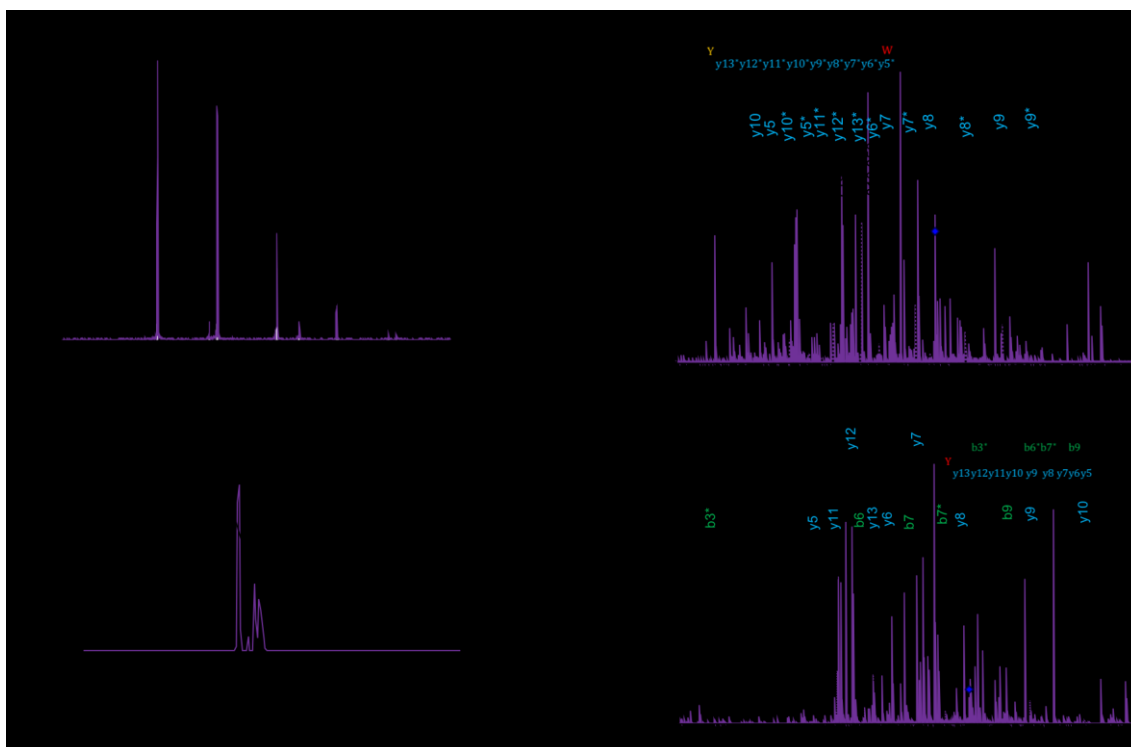


Obrázek 14 - Záznamy z MS analýzy pro peptid NGPEQWSK. A) Extrahovaný iontový chromatografický záznam LC-MS/MS analýzy s elučními maximy pro m/z odpovídající peptidu. B) MS spektrum odpovídající elučním maximům s hmotou daného peptidu. C) Kolizní spektrum získané fragmentací prekursorového iontu odpovídajícímu m/z peptidu se sekvencí peptidu s vyznačenými modifikovanými a nemodifikovanými fragmenty (y a b ionty), díky kterým byla nalezena výsledná modifikovaná aminokyselina. Tato aminokyselina je zvýrazněná červenou barvou. Modifikované fragmenty jsou označeny hvězdičkou.

4.3.2 Modifikace fragmentu YSAELHVAHWNSAK

Modelový příklad, kde nebyla identifikována modifikace pouze na jedné aminokyselině jak v případě peptidu NGPEQWSK, je například peptid YSAELHVAHWNSAK. Extrahovaný iontový chromatografický záznam LC-MS/MS analýzy ukazující eluční maxima pro dané m/z, která odpovídají m/z peptidu a jeho MS spektrum představující daný peptid jsou znázorněny v obrázku 15 (A, B). Kolizní spektra

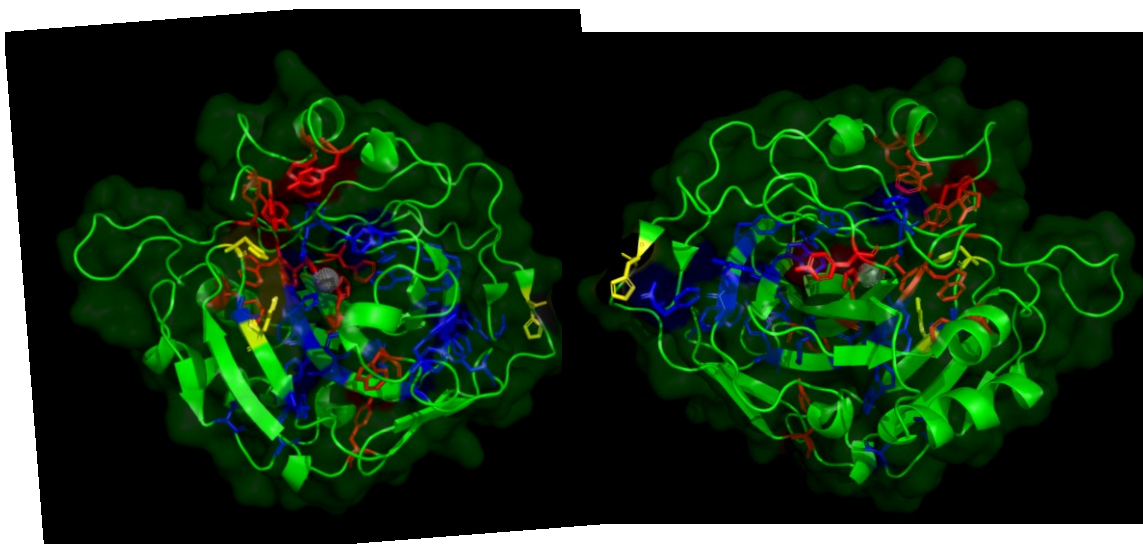
odpovídající danému elučnímu maximu dokládá obrázek 15 C a D. V kolizním spektru C nebyly pozorovány žádné b ionty, a proto byla modifikovaná aminokyselina identifikována pouze na základě y iontů. Z těch lze určit, že modifikovaná je aromatická aminokyselina Trp¹²³. Nicméně ze získaných dat ze spektra C nemůžeme s jistotou říci, zda není modifikován i Tyr¹¹⁴, protože nepřítomnost b iontů může být způsobena právě modifikací první aminokyseliny peptidu, respektive nábojem, který je tam modifikací vnesen. Oproti tomu v kolizním spektru D již byly b ionty pozorovány a výše popsanou domněnku, poukazující na přítomnost modifikace na Tyr¹¹⁴, potvrdily.



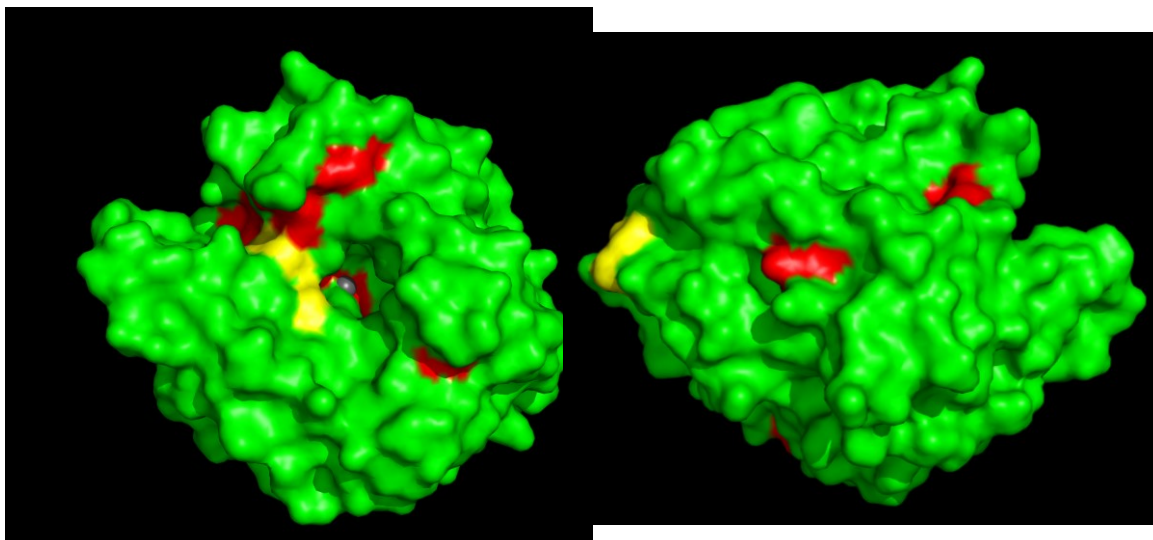
Obrázek 15 - Záznamy z MS analýzy pro peptid YSAELHVAHWNSAK. A) Extrahovaný iontový chromatografický záznam LC-MS/MS analýzy s elučními maximy pro m/z odpovídající peptidu. B) MS spektrum odpovídající elučním maximům s hmotou daného peptidu. C) a D) Kolizní spektra získané fragmentací prekurzorových iontů představující peptid odpovídající jednotlivým elučním maximům se zobrazenými modifikovanými a nemodifikovanými fragmenty peptidu se sekvencí peptidu s vyznačenými modifikovanými a nemodifikovanými fragmenty (y a b ionty), díky kterým byly nalezeny výsledné modifikované aminokyseliny. Tyto aminokyseliny jsou zvýrazněny červenou barvou. Aminokyselina, u které nebyla modifikace jednoznačně prokázána, je vyznačena žlutou barvou. Modifikované fragmenty jsou označeny hvězdičkou.

4.3.3 Struktura modifikovaného proteinu alkoholovým činidlem

Aminokyseliny, které byly na základě dat z kolizních spekter interpretovány jako modifikované, jsou zvýrazněny v krystalové struktuře proteinu hCA (Obr. 16). Pro porovnání byly ve struktuře zobrazeny také nemodifikované aromatické aminokyseliny. Pro lepší představu přístupnosti k modifikovaným aminokyselinám byly tyto aminokyseliny vizualizovány rovněž ve struktuře proteinu hCA zobrazující povrch její molekuly (Obr. 17). Ze struktury proteinu je patrné, že se modifikované aminokyseliny vyskytují v částech proteinu, které jsou přístupná činidlu. Pohled do struktury ukazuje, že jsou modifikovány i aminokyseliny v aktivním centru proteinu, což umožňuje malá velikost skupiny CF₃.



Obrázek 16 - Krystalová struktura proteinu hCA modifikovaným alkoholovým činidlem. A) Pohled se vstupem do aktivního centra s atomem zinku. B) Pohled o 180° otočený oproti A). Ve struktuře jsou zvýrazněny všechny aromatické aminokyseliny, které protein obsahuje. Modifikované aromatické aminokyseliny jsou zvýrazněny červenou barvou. Aminokyseliny, u kterých nebyla modifikace jednoznačně prokázána, jsou vyznačeny žlutou barvou. Modrou barvou jsou zvýrazněny nemodifikované aromatické aminokyseliny, upraveno podle 1hcb [45].



Obrázek 17 - Povrch krystalové struktury proteinu hCA modifikovaným alkoholovým činidlem. A) Pohled se vstupem do aktivního centra s atomem zinku. B) Pohled o 180° otočený oproti A). Modifikované aminokyseliny se nacházejí převážně na místech přístupných pro činidlo. Modifikované aminokyseliny jsou zvýrazněny červenou barvou. Aminokyseliny, u kterých nebyla modifikace jednoznačně prokázána, jsou vyznačeny žlutou barvou, upraveno podle 1hcb [45].

4.4 Výsledky analýzy imidazolového-alkoholového činidla po LC-MS/MS

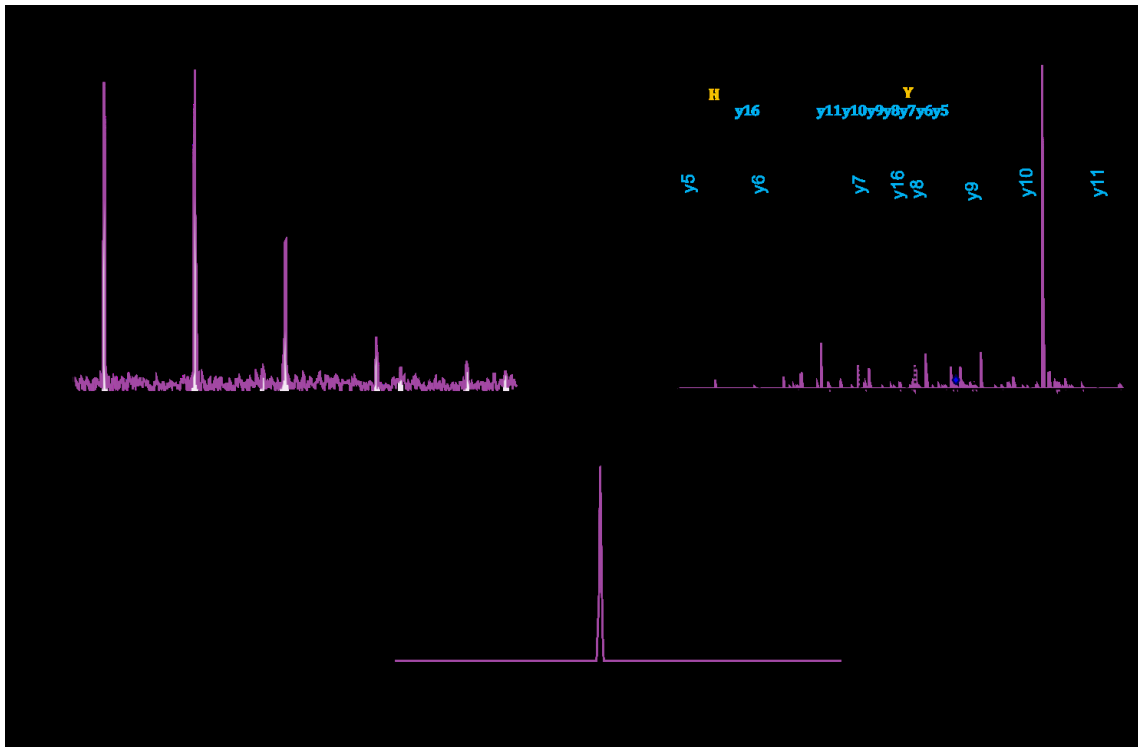
Výsledky analýzy imidazolového-alkoholového činidla shrnuje tabulka 4. Obdobně jak v tabulce 3 pro alkoholové činidlo ukazuje jednotlivé peptidy proteinu, jejich modifikace, sken odpovídající retenčnímu času, ve kterém byl prekurzor eluován z kolony, m/z peptidu a nalezené modifikované a nemodifikované fragmenty (y a b ionty). Aminokyseliny, které byly modifikovány imidazolovou ($C_5H_3N_2F_4$) skupinou pomocí imidazolového-alkoholového činidla, jsou v peptidu vyznačeny červenou barvou.

Peptid	Modifikace	Sken	m/z	y ionty	b ionty
ASPD ^W GYDDK	Acetylace (N-konec), 1xImidazol	313	681.256	y6*-y9*	b7*-b9*
ASPD ^W GYDDK	Acetylace (N-konec), 1xImidazol	269	681.257	y6*-y9*	b6*-b9*
ASPD ^W GYDDK	Acetylace (N-konec), 1xImidazol	299	681.257	y5	-
NGPEQ ^W SK	1xImidazol	163	556.233	y3*-y7*	b7*
YSAELHVAH ^W NSAK	1xImidazol	215	445.460	y5-y13/y5*-y9*,y12*,y13*	b4-b11
YSAELHVAH ^W NSAK	1xImidazol	237	445.460	y5-y13	b7,b9
LYPIANGNNQSPVDIK	1xImidazol	315	636.979	y3,y5-y10,y14/y6*-y9*	b4,b5/b10*,b15*
HDTSLKPISVSYNPATAK	1xImidazol	263	699.013	y5-y11,y16	-
ASPD ^W GYDDKNGPEQ ^W SK	Acetylace (N-konec), 2xImidazol	315	818.653	y9,y11/y13*,y14*,y16*/y16**	b8*,b10*,b10**
ASPD ^W GYDDKNGPEQ ^W SK	Acetylace (N-konec), 1xImidazol	295	763.315	y5-y7,y10,y11/y14*,y16*	-
SLSNVEGDNAVPMQH ^N NRPTQPLK	1xImidazol	299	732.107	y13-y15,y18,y19/y13*,y18*	b11,b12
LFQFHFH ^W GSTNEHGSEHTVDGVK	1xImidazol	319	593.267	y5-y8,y10,y14,y16,y17/y17*	b7/b21*
LFQFHFH ^W GSTNEHGSEHTVDGVK	1xImidazol	299	593.267	y4-y8,y10,y11,y13-y19/y17*	b5,b7,b21,b22/b21*

Tabulka 4 - Jednotlivé peptidy s nalezenými modifikacemi C₅H₃N₂F₄ skupinou imidazolového-alkoholového činidla, sken odpovídající retenčnímu času, ve kterém byl prekursor eluován z kolony, celkovou hmotou peptidu a nalezenými modifikovanými a nemodifikovanými fragmenty (y a b ionty). 1x modifikované ionty jsou vyznačeny hvězdičkou, 2x modifikované ionty jsou vyznačeny dvěma hvězdičkami. Výsledná modifikovaná aminokyselina je v peptidu vyznačena červeně. Aminokyseliny, u kterých nebyla modifikace jednoznačně prokázána, jsou vyznačeny žlutou barvou.

4.4.1 Modifikace fragmentu HDTSLKPISVSYNPATAK

Jako modelový příklad vyhodnocení MS analýzy pro protein modifikovaný imidazolovým-alkoholovým činidlem je uveden peptid HDTSLKPISVSYNPATAK (Obr. 18). V případě tohoto peptidu nebyly nalezeny žádné modifikované ani nemodifikované b ionty. Na základě nalezených nemodifikovaných y iontů (y5-y11, y16) a informací o nepřítomnosti b iontů nebylo možné jednoznačně určit, kde se modifikace nalézá. Nepřítomnost b iontů nepřímou naznačuje modifikaci His⁴⁰. Nicméně bez informace o modifikovaných iontech nelze s jistotou vyloučit modifikaci jiné aminokyseliny včetně Tyr⁵¹, byť se to v tomto případě jeví nepravděpodobné.

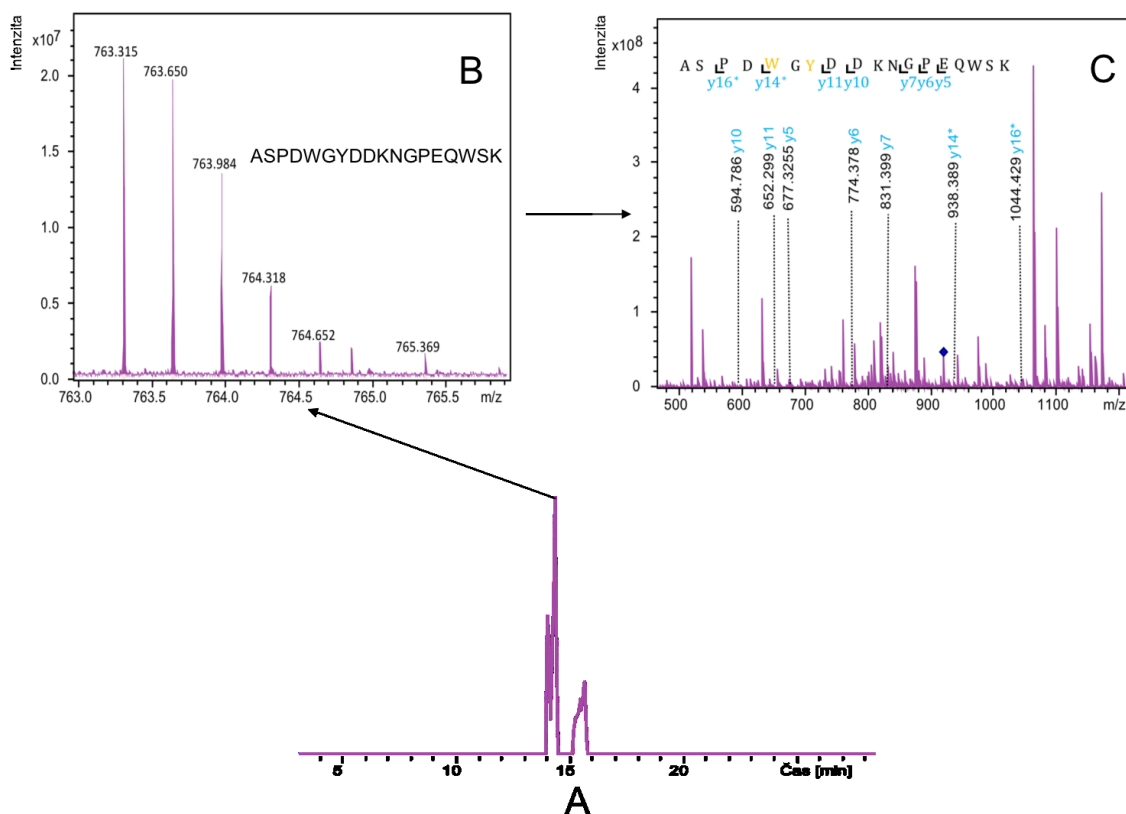


Obrázek 18 - Záznamy z MS analýzy pro peptid HDTSLKPISVSYNPATAK.

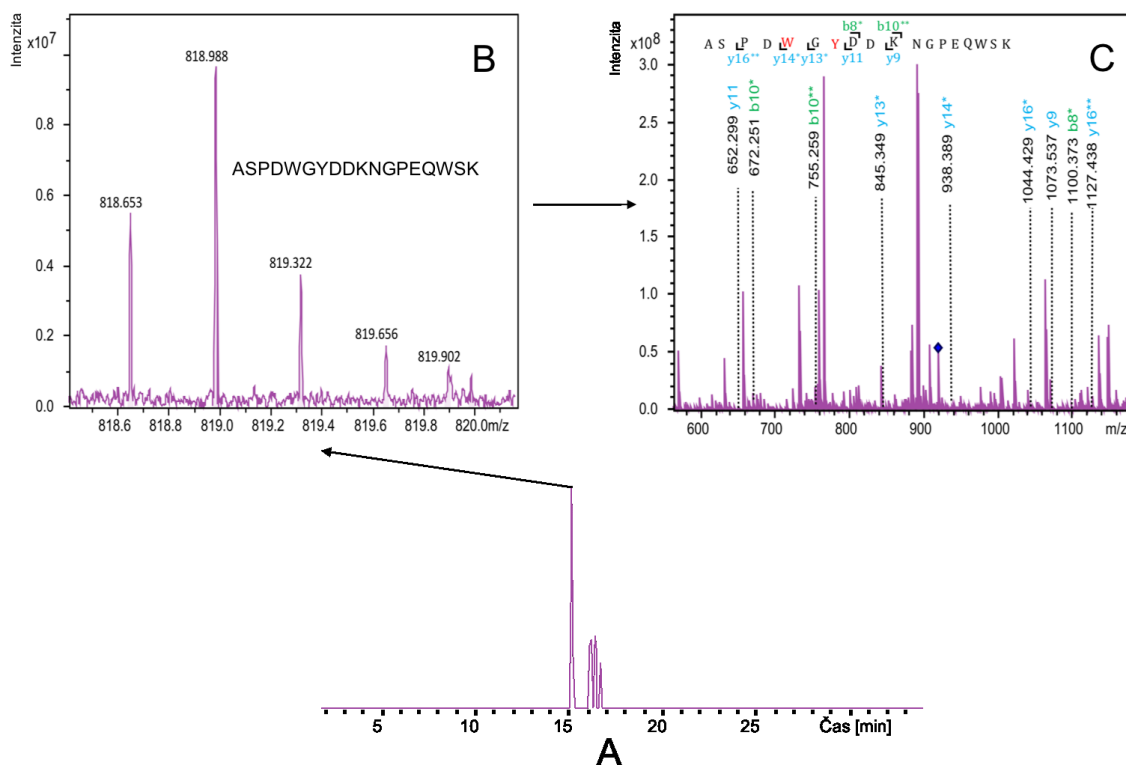
A) Extrahovaný iontový chromatografický záznam LC-MS/MS analýzy s elučním maximem pro m/z odpovídající peptidu. B) MS spektrum odpovídající elučnímu maximu s hmotou daného peptidu. C) Kolizní spektrum získané fragmentací prekursorového iontu odpovídajícímu m/z peptidu se sekvencí peptidu s vyznačenými nemodifikovanými fragmenty (y ionty), díky kterým byly identifikovány aminokyseliny, které jsou potenciálně modifikované. Tyto aminokyseliny jsou zvýrazněny žlutou barvou.

4.4.2 Modifikace fragmentu ASPDWGYDDKNGPEQWSK

V případě peptidu ASPDWGYDDKNGPEQWSK, obsahující více aromatických aminokyselin, byly identifikovány dvě modifikace Togniho činidlem. V kolizním spektru pro jedenkrát modifikovaný peptid (Obr. 19C) byly nalezeny pouze dva modifikované ionty y_{14}^* a y_{16}^* , které naznačují možné modifikace na Trp^5 a Tyr^7 . Na základě změřených spekter (Obr. 19) nelze s jistotou určit, zda je Togniho činidlem modifikována pouze jedna aminokyselina nebo je modifikace rozdělena mezi obě aminokyseliny. V případě kolizního spektra pro dvakrát modifikovaný peptid (Obr. 20C) byly nalezeny 1x modifikované ionty b_{10}^* , b_{15}^* , y_{13}^* , y_{14}^* , y_{16}^* a 2x modifikovaný y_{16}^{**} , které modifikaci Trp^5 a Tyr^7 potvrdily.



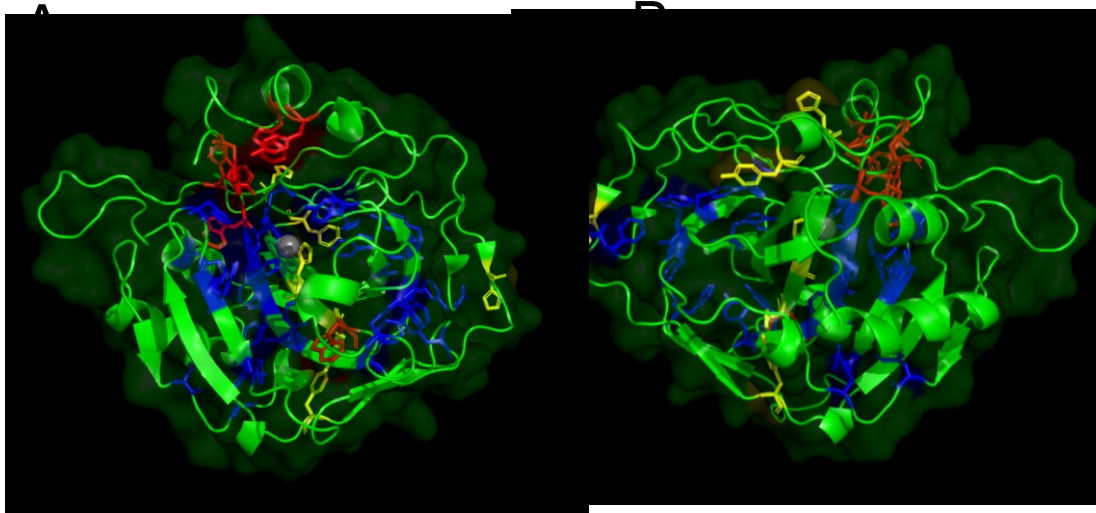
Obrázek 19 - Záznamy z MS analýzy pro peptid jedenkrát modifikovaný peptid ASPDWGYDDKNGPEQWSK sken 295. A) Extrahovaný iontový chromatografický záznam LC-MS/MS analýzy s elučním maximem pro m/z odpovídající peptidu. B) MS spektrum odpovídající elučnímu maximu s hmotou daného peptidu. C) Kolizní spektrum získané fragmentací prekurzorového iontu odpovídajícímu m/z peptidu se sekvencí peptidu s vyznačenými modifikovanými i nemodifikovanými fragmenty (y a b ionty), díky kterým byly nalezeny výsledné modifikované aminokyseliny. Nelze s jistotou určit, zda je Togniho činidlem modifikována pouze jedna aminokyselina nebo je modifikace rozdělena mezi obě aminokyseliny. Tyto aminokyseliny jsou zvýrazněny žlutou barvou.



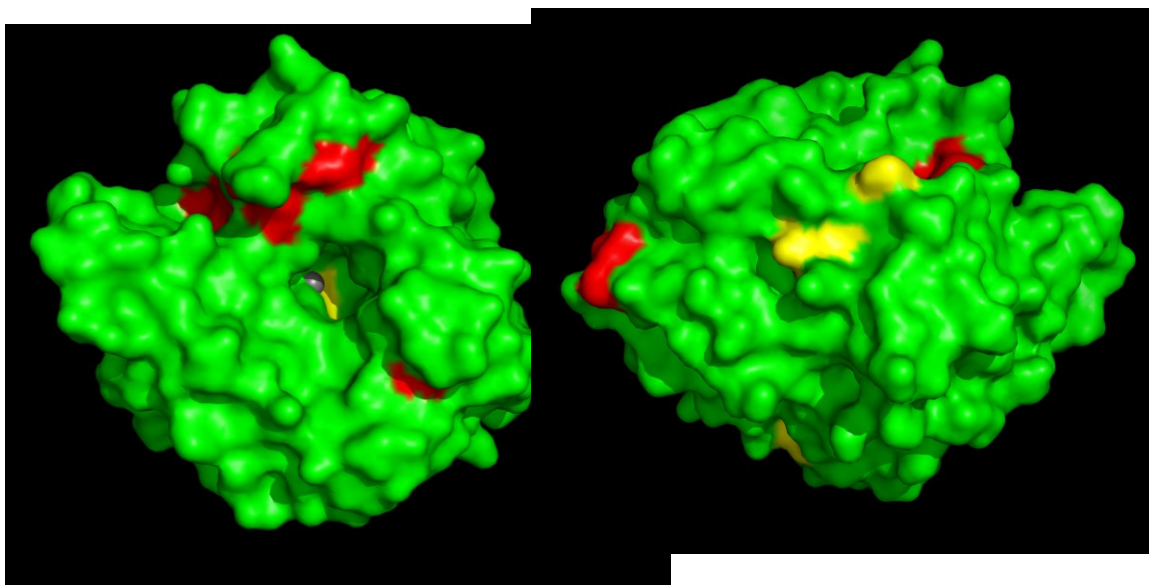
Obrázek 20 - Záznamy z MS analýzy pro dvakrát modifikovaný peptid ASPDWGYDDKNGPEQWSK sken 315. A) Extrahovaný iontový chromatografický záznam LC-MS/MS analýzy s elučním maximem pro m/z odpovídající peptidu. B) MS spektrum odpovídající elučnímu maximu s hmotou daného peptidu. C) Kolizní spektrum získané fragmentací prekurzorového iontu odpovídajícímu m/z peptidu se sekvencí peptidu s vyznačenými modifikovanými i nemodifikovanými fragmenty (y a b ionty), díky kterým byly nalezeny výsledné modifikované aminokyseliny. Tyto aminokyseliny jsou zvýrazněny červenou barvou.

4.4.3 Struktura proteinu modifikovaného imidazolovým-alkoholovým činidlem

Krystalová struktura proteinu hCA znázorňuje identifikované nemodifikované i modifikované aromatické aminokyseliny imidazolovým-alkoholovým činidlem (Obr. 21). Obdobně jak v případě alkoholového činidla, pro lepší představu přístupnosti k modifikovaným aminokyselinám byl protein s těmito aminokyselinami vizualizován také ve struktuře proteinu hCA zobrazující povrch její molekuly (Obr. 22). Při pohledu na strukturu proteinu lze pozorovat stejný trend jak u modifikovaného proteinu alkoholovým činidlem. Je patrné, že se modifikované aminokyseliny vyskytují v částech proteinu, které jsou přístupná činidlu.



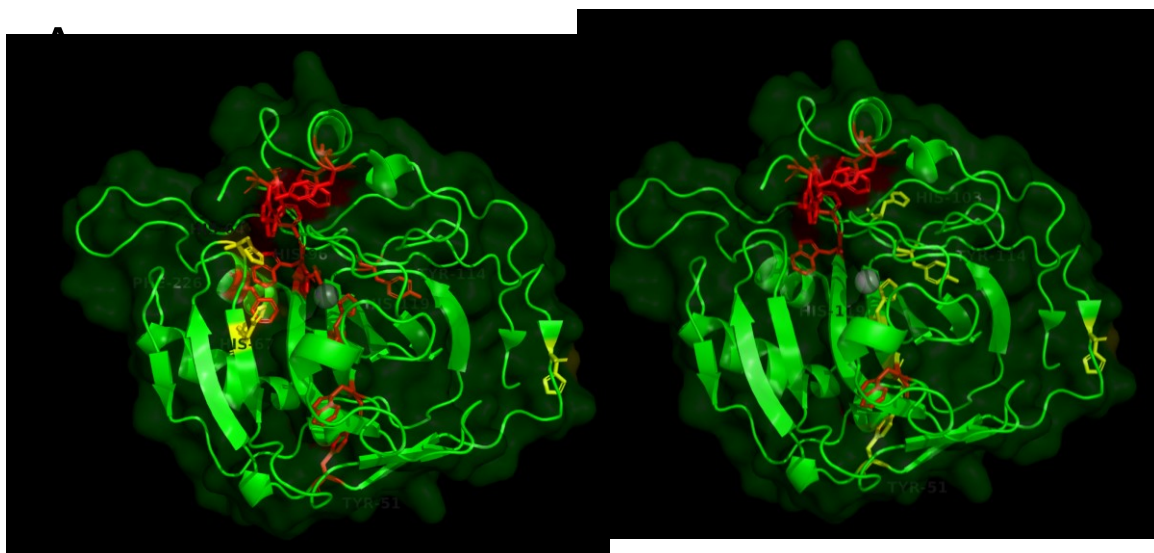
Obrázek 21 - Krystalová struktura proteinu hCA modifikovaným imidazolovým-alkoholovým činidlem. A) Pohled se vstupem do aktivního centra s atomem zinku. B) Pohled o 180° otočený oproti A). Ve struktuře jsou zvýrazněny všechny aromatické aminokyseliny, které protein obsahuje. Modifikované aromatické aminokyseliny jsou zvýrazněny červenou barvou. Aromatické aminokyseliny, u kterých nebyla modifikace jednoznačně prokázána, jsou vyznačeny žlutou barvou. Modrou barvou jsou zvýrazněny nemodifikované aromatické aminokyseliny, upraveno podle 1hcb [45].



Obrázek 22 - Povrch krystalové struktury proteinu hCA modifikovaným imidazolovým-alkoholovým činidlem. A) Pohled se vstupem do aktivního centra s atomem zinku. B) Pohled o 180° otočený oproti A). Modifikované aminokyseliny jsou zvýrazněny červenou barvou. Aminokyseliny, u kterých nebyla modifikace jednoznačně prokázána, jsou vyznačeny žlutou barvou, upraveno podle 1hcb [45].

Z porovnání struktur hCA s vyznačenými modifikovanými aminokyselinami z alkoholového (Obr. 23 A) a imidazolového-alkoholového (Obr. 23 B) činidla je patrné, že se modifikované aminokyseliny, až na výjimky, překrývají. Rozdíl představují Phe²²⁶

a v aktivním centru lokalizovaný His⁹⁶, které byly modifikovány pouze v případě alkoholového činidla. Aminokyseliny, které by byly modifikovány pouze v případě imidazolového-alkoholového činidla, zaznamenány nebyly. Lze pozorovat i další rozdíly v aminokyselinách, které byly modifikovány, His⁶⁴, His⁶⁷ a Tyr⁵¹ u alkoholového činidla a His¹¹⁹ a His¹⁰³ u imidazolového-alkoholového činidla. Nicméně u těchto aminokyselin nebylo možné s jistotou říci, zdali jsou Togniho činidlem modifikovány.



Obrázek 23 - Porovnání struktur hCA modifikovaného alkoholovým činidlem (A) imidazolovým-alkoholovým činidlem (B). Červeně vyznačené Phe²²⁶ a v aktivním centru His⁹⁶ jsou v případě alkoholového činidla na rozdíl od imidazolového-alkoholového činidla modifikovány. Rozdíly jsou také ve žlutě označených His⁶⁴, His⁶⁷ a Tyr⁵¹ u alkoholového činidla a His¹¹⁹ a His¹⁰³ u imidazolového-alkoholového činidla. U těchto aminokyselin není zcela prokazatelné, zdali jsou Togniho činidlem modifikovány, upraveno podle 1hcb [45].

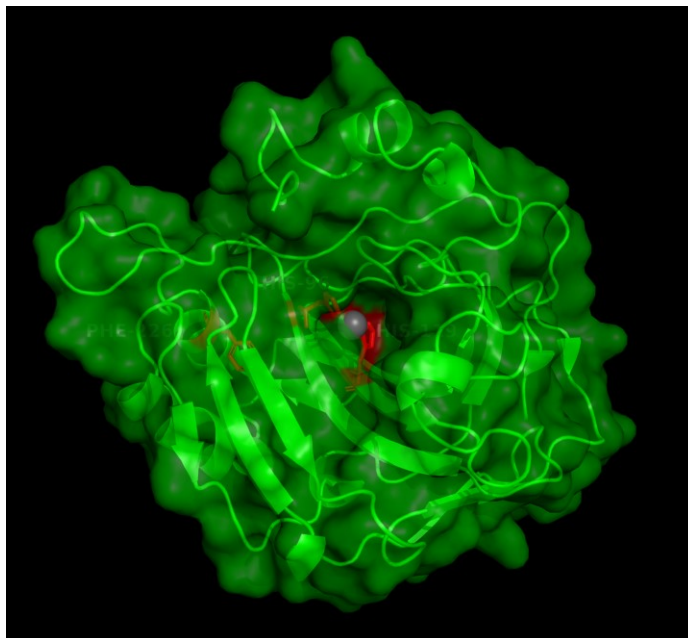
5 DISKUZE

V této práci jsme se zabývali radikálovým značením lidské karbonické anhydrasy pomocí Togniho činidel. Před samotnou reakcí karbonické anhydrasy s Togniho činidlem, bylo potřeba provést optimalizaci podmínek reakce s testovacím proteinem ubiquitinem. Z porovnání jednotlivých nadbytků činidla a kyseliny askorbové pro imidazolové-alkoholové činidlo bylo zřejmé, že nejvhodnějším poměrem nadbytků je poměr 100:75 (Obr. 12). Nicméně u alkoholového Togniho činidla jsou intenzity u 1x modifikovaného ubiquitinu pro poměr 100:75 a 100:50 téměř totožné, ale intenzita 2x modifikovaného ubiquitinu je výrazně vyšší pro poměr 100:50, a proto byl pro další experimenty využit tento poměr (Obr. 11). I přesto, že nejvhodnější poměr nadbytků látkového množství činidla a kyseliny askorbové oproti proteinu se pro ubiquitin jevil 100:75, při následné reakci s proteinem hCA byly také použity nadbytky dvojnásobně velké, tedy 200:150, protože hCA obsahuje více aminokyselin, které mohou být činidlem modifikovány.

Reakce činidel s hCA byla kontrolována pomocí elektroforetické separace v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti LDS (Obr. 13). Z gelu je patrné, že vlivem činidel nedošlo k rozpadu či multimerizaci proteinu, tudíž byla konformace proteinu zachována. Zároveň ovšem lze kromě separovaného proteinu pozorovat i další proužky s molekulovou hmotností kolem 55 kDa, které jsou nejintenzivnější v případě alkoholového činidla. Jelikož je tento proužek pozorovatelný i v případě kontroly, lze usuzovat, že se jedná o artefakt vytvořený během zpracování vzorku před samotnou elektroforetickou separací

Následné vyhodnocení hmotnostně spektrometrických dat bylo provedeno za předpokladu výskytu modifikací Togniho činidlem pouze na aromatických aminokyselinách proteinu. Tento předpoklad byl vytvořen na základě analýzy dat proteinu ubiquitin, která nebyla součástí této práce. Nicméně nelze vyloučit, že nebyly při reakci činidel s hCA modifikovány i nearomatické aminokyseliny. Získaná data ovšem tento fakt nenaznačují. Analýza dat proteinu hCA s alkoholovým a imidazolovým-alkoholovým činidlem ukázala, že kvalita získaných spekter je vyšší při 200násobném nadbytku činidla oproti proteinu, a proto jsou v práci uváděna pouze data pro tento nadbytek.

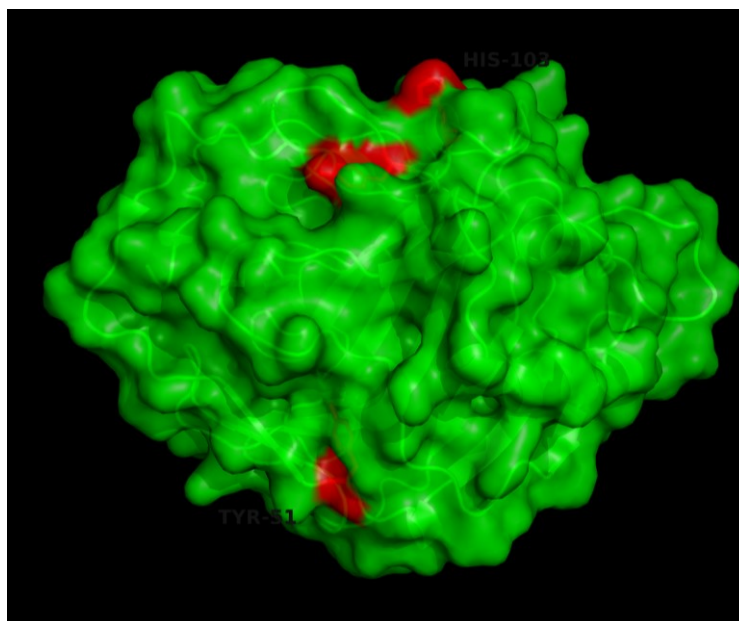
Porovnání analyzovaných dat proteinu modifikovaným Togniho činidly ukázalo několik rozdílů mezi výsledky pro alkoholové a imidazolové-alkoholové činidlo (Obr. 22). Jednalo se o výskyt a lokalizaci některých modifikovaných aromatických aminokyselin. Konkrétně se jedná o Phe²²⁶ a v aktivním centru se vyskytující His⁹⁶, které jsou modifikovány v případě alkoholového činidla na rozdíl od imidazolového-alkoholového činidla. U His¹¹⁹, lokalizovaném také v aktivním centru molekuly, nelze zcela jednoznačně říci, zda je v případě imidazolového-alkoholového činidla modifikován. Tyto rozdíly byly pravděpodobně způsobeny rozdílnou velikostí jednotlivých činidel. Větší velikost imidazolového-alkoholového činidla pravděpodobně bránila přístupu k aminokyselinám lokalizovaným v aktivním centru (His⁹⁶ a His¹¹⁹) a Phe²²⁶ lokalizovanému uvnitř molekuly proteinu (Obr. 23).



Obrázek 24 - Krystalová struktura hCA modifikovaná alkoholovým činidlem s vyznačenými aminokyselinami Phe²²⁶, His⁹⁶ a His¹¹⁹. Upraveno podle 1hcb [45].

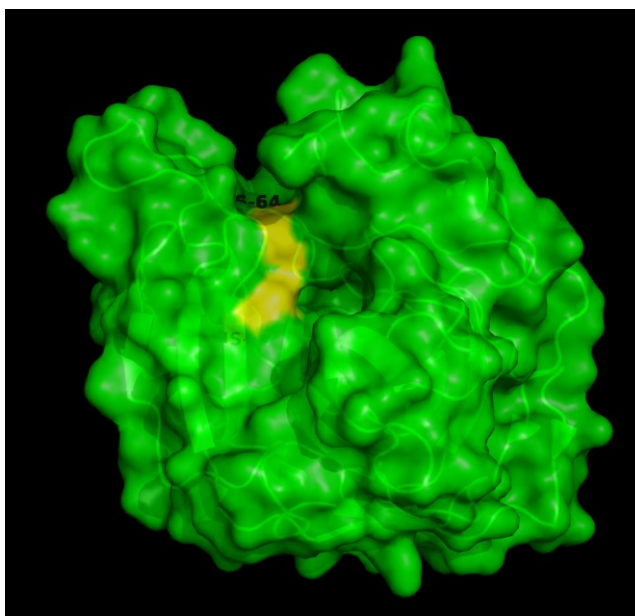
Další rozdíly jsou pozorovány pro aminokyseliny lokalizované na povrchu proteinu, které jsou modifikovány v případě alkoholového činidla. V případě imidazolového-alkoholového se však tyto aminokyseliny vyskytovaly v peptidech, u nichž bylo prokázáno, že modifikaci obsahují, ale kvůli nepřítomnosti modifikovaných y iontů nebylo možné jednoznačně určit, na které aminokyselině se tato modifikace nalézá. Jedná se o aminokyseliny Tyr¹¹⁴, Tyr⁵¹ a His¹⁰³ (Obr. 24). Nepřítomnost modifikovaných y iontů v peptidech proteinu modifikovaném

imidazolovým-alkoholovým činidlem mohla být způsobena nízkou intenzitou prekurzorového iontu.



Obrázek 25 - Krystalová struktura hCA modifikovaná alkoholovým činidlem s vyznačenými aminokyselinami Tyr¹¹⁴, Tyr⁵¹ a His¹⁰³. Upraveno podle 1hcb [45].

Data také poukazují na modifikaci His⁶⁴ nebo His⁶⁷ u alkoholového činidla, nacházející se na povrchu molekuly (Obr. 25). Informace o tomto peptidu v případě imidazolového-alkoholového činidla ovšem chybí. Tento fakt byl způsoben tím, že peptid obsahující His⁶⁴ a His⁶⁷ nebyl hmotnostně spektrometrickou analýzou identifikován. Nelze tedy jistě říci, zda se od alkoholového činidla liší.



Obrázek 26 - Krystalová struktura hCA modifikovaná alkoholovým činidlem s vyznačenými aminokyselinami His⁶⁴ a His⁶⁷. Upraveno podle 1hcb [45].

Předkládaná práce ukázala, že radikálová metoda značení proteinů pomocí Togniho činidel lze použít jako novou metodu kovalentního značení proteinů. Obdobně jako protein hCA by mohl být značen jakýkoliv protein včetně protilátek, k jejichž charakterizaci se kovalentní značení používá [2]. V důsledku toho by tato metoda mohla posloužit jako nástroj validace biologických terapeutik. Je nutno ovšem přiznat, že tato metoda má zatím své limity, které mohou být ale v budoucnu odstraněny. Příkladem mohou být vyšší výtěžky reakce vedoucí k vyšší intenzitě hmotnostních spekter nebo také zpřesnění informace o lokalizaci modifikace získaná z překrývajících se peptidů vytvořených použitím nespecifických proteas nebo použitím více proteas s různou specifitou.

6 ZÁVĚR

- Pomocí proteinu ubiquitin byly optimalizovány podmínky radikálové reakce s Togniho činidly.
- Byla provedena modifikace proteinu lidské karbonické anhydrasy jednotlivými Togniho činidly.
- Získaná data odhalila přesná místa modifikace CF_3 a $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_2\text{F}_4$ skupinou postranních řetězců aminokyselin proteinu lidské karbonické anhydrasy.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques* (Third Edition). Elsevier Science: San Diego, 1996.
2. P. Kaur, S. E. Tomechko, J. Kiselar, et al. Characterizing monoclonal antibody structure by carboxyl group footprinting. *MAbs*. 2015, **7**(3), 540-552.
3. Y. Bai, J. S. Milne, L. Mayne a S. W. Englander. Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 1993, **17**(1), 75-86.
4. P. F. Jensen a K. D. Rand. Hydrogen Exchange. D. D. Weis, ed. *Hydrogen Exchange Mass Spectrometry of Proteins*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2016, 2016-01-15, 1-17.
5. S. W. Englander, L. Mayne, Y. BAI a T. R. Sosnick. Hydrogen exchange: The modern legacy of Linderstrøm-Lang. *Protein Science*. 1997, **6**(5), 1101-1109.
6. A. Hvidt, K. Lindestrøm-Lang: *Biochim. Biophys. Acta* **14**, 574-5. 1954
7. J. Pan, S. Zhang, C. E. Parker a C. H. Borchers. Subzero Temperature Chromatography and Top-Down Mass Spectrometry for Protein Higher-Order Structure Characterization: Method Validation and Application to Therapeutic Antibodies. *Journal of the American Chemical Society*. 2014, **136**(37), 13065-13071.
8. D. Suckau, M. Mak a M. Przybylski. Protein surface topology-probing by selective chemical modification and mass spectrometric peptide mapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992, **89**(12), 5630-5634.
9. M. O. Glocker, C. Borchers, W. Fiedler, D. Suckau a M. Przybylski. Molecular Characterization of Surface Topology in Protein Tertiary Structures by Amino-Acylation and Mass Spectrometric Peptide Mapping. *Bioconjugate Chemistry*. 2002, **5**(6), 583-590.
10. T. A. Fligge, J. Kast, K. Bruns a M. Przybylski. Direct monitoring of protein-chemical reactions utilising nanoelectrospray mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1999, **10**(2), 112-118.
11. N. L. Kelleher, H. Y. Lin, G. A. Valaskovic, D. J. Aaserud, E. K. Fridriksson a F. W. McLafferty. Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*. 1999, **121**(4), 806-812.
12. P. Novak, G. H. Kruppa, M. M. Young a J. Schoeniger. A Top-down method for the determination of residue-specific solvent accessibility in proteins. *Journal of Mass Spectrometry*. 2004, **39**(3), 322-328.

13. Thermo Fisher Scientific, dostupné z <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602163-Crosslinking-Reagents-Handbook.pdf> (cit. 14.12.2017)
14. D. G. Hoare, A. Olson a D. E. Koshland. The reaction of hydroxamic acids with water-soluble carbodiimides. A lossen rearrangement. *Journal of the American Chemical Society*. 1968, **90**(6), 1638-1643.
15. L. J. Harris, E. Skaletsky a A. Mcpherson. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. Edited by I. A. Wilson. *Journal of Molecular Biology*. 1998, **275**(5), 861-872.
16. P. Hodek, B. Sopko, L. Antonovic, M. Šulc, P. Novak a H. Strobel. Evaluation of comparative cytochrome P450 2B4 model by photoaffinity labeling. *General physiology and biophysics*. 2004, **23**(4), 467-88.
17. C. C. Jumper a D. C. Schriemer. Mass Spectrometry of Laser-Initiated Carbene Reactions for Protein Topographic Analysis. *Analytical Chemistry*. 2011, **83**(8), 2913-2920.
18. B. Zhang, D. L. Rempel a M. L. Gross. Protein Footprinting by Carbenes on a Fast Photochemical Oxidation of Proteins (FPOP) Platform. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. 2016, **27**(3), 552-555.
19. L. Konermann, B. B. Stocks, Y. Pan a X. Tong. Mass spectrometry combined with oxidative labeling for exploring protein structure and folding. *Mass Spectrometry Reviews*. 2010, **29**(4), 651-67
20. S. D. Maleknia, M. Brenowitz a M. R. Chance. Millisecond Radiolytic Modification of Peptides by Synchrotron X-rays Identified by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 1999, **71**(18), 3965-3973.
21. W. M. Garrison, Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chemical Reviews*. 1987, **87**(2), 381-398.
22. S. D. Maleknia, C. Y. Ralston, M. D. Brenowitz, K. M. Downard a M. R. Chance. Determination of Macromolecular Folding and Structure by Synchrotron X-Ray Radiolysis Techniques. *Analytical Biochemistry*. 2001, **289**(2), 103-115.
23. J A. LaVerne, OH Radicals and Oxidizing Products in the Gamma Radiolysis of Water. *Radiation Research*. 2000, **153**(2), 196-200.
24. M. Ledvina, et al. *Biochemie pro studující medicíny* (First Edition). Praha: Karolinum, 2004.
25. J. S. Sharp, J. M. Becker a R. L. Hettich. Protein surface mapping by chemical oxidation: Structural analysis by mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 2003, **313**(2), 216-225.

26. J. T. J. Lecomte, S. F. Sukits, S. Bhattacharya a C. J. Falzone. Conformational properties of native sperm whale apomyoglobin in solution. *Protein Science*. 1999, **8**(7), 1484-149.
27. S. V. Evans a G. D. Brayer. High-resolution study of the three-dimensional structure of horse heart metmyoglobin. *Journal of Molecular Biology*. 1990, **213**(4), 885-897.
28. J. Lim a R. W. Vachet. Development of a Methodology Based on Metal-Catalyzed Oxidation Reactions and Mass Spectrometry To Determine the Metal Binding Sites in Copper Metalloproteins. *Analytical Chemistry*. 2003, **75**(5), 1164-1172.
29. J. S. Sharp, J. M. Becker a R. L. Hettich. Analysis of Protein Solvent Accessible Surfaces by Photochemical Oxidation and Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2004, **76**(3), 672-683.
30. X. Tong, J. C. Wren a L. Konermann. Γ -Ray-Mediated Oxidative Labeling for Detecting Protein Conformational Changes by Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2008, **80**(6), 2222-2231.
31. D. M. Hambly a M. L. Gross. Laser flash photolysis of hydrogen peroxide to oxidize protein solvent-accessible residues on the microsecond timescale. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2005, **16**(12), 2057-2063.
32. V. Matoušek, E. Pietrasiak, R. Schwenk a A. Togni. One-Pot Synthesis of Hypervalent Iodine Reagents for Electrophilic Trifluoromethylation. *The Journal of Organic Chemistry*. 2013, **78**(13), 6763-6768.
33. F. R. Leroux, , B. Manteau, J. P. Vors a S. Pazenok. Trifluoromethyl ethers – synthesis and properties of an unusual substituent. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* [online]. 2008, **4**.
34. M. Imiołek, G. Karunanithy, W. L. Ng, A. J. Baldwin, V. Gouverneur a B. G. Davis. Selective Radical Trifluoromethylation of Native Residues in Proteins. *Journal of the American Chemical Society*. 2018, **140**(5), 1568-1571.
35. Sigma-Aldrich, dostupné z <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/chemfiles/3-3-dimethyl-1-trifluoromethyl.html> (cit. 20.12.2017)
36. CF Plus Chemical, dostupné z http://www.cfplus.cz/togni-reagents/#_ENREF_4 (cit. 21.12.2017)
37. M. R. Badger a G. D. Price, The Role of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1994, **45**(1), 369-392.
38. B. C. Tripp, K. Smith a J. G. Ferry. Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, **276**(52), 48615-48618.

39. K. S. Smith, C. Jakubzick, T. S. Whittam a J. G. Ferry. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999, **96**(26), 15184-15189.
40. B. E. Alber a J. G. Ferry. A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994, **91**(15), 6909-6913.
41. S. Lindskog, Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology & Therapeutics*. 1997, **74**(1), 1-20.
42. D. B. Northrop a F. B. Simpson. Kinetics of Enzymes with Isomechanisms: Britton Induced Transport Catalyzed by Bovine Carbonic Anhydrase II, Measured by Rapid-Flow Mass Spectrometry. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1998, **352**(2), 288-292.
43. M. S. Kimber. The active site architecture of *Pisum sativum* beta-carbonic anhydrase is a mirror image of that of alpha -carbonic anhydrases. *The EMBO Journal*. **19**(7), 1407-1418.
44. Journal of Biological Chemistry, dostupné z <http://www.jbc.org/content/276/52/48615/F1.expansion.html> (cit. 21.12.2017)
45. V. Kumar a K. K. Kannan. Enzyme-Substrate Interactions. *Journal of Molecular Biology*. 1994, **241**(2), 226-232.

8 Přílohy

