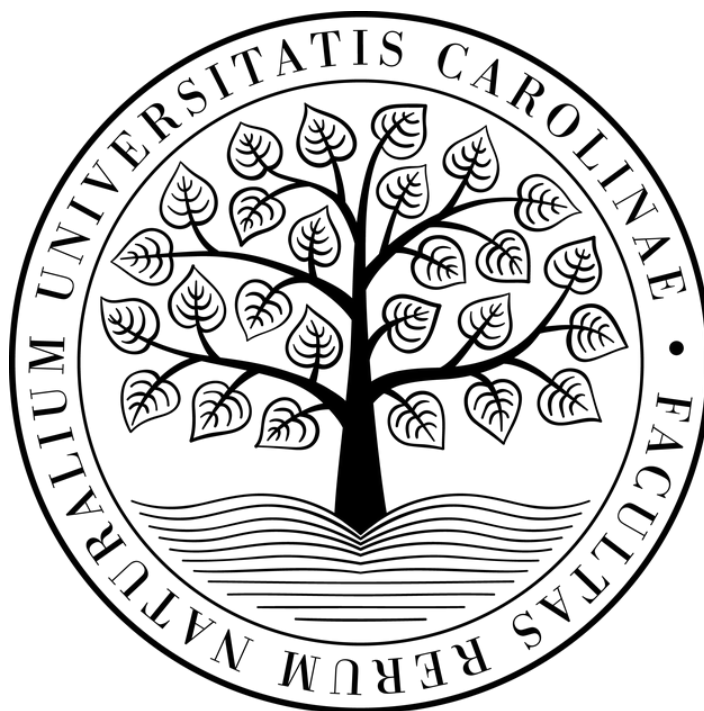


UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie



Bc. Tereza Kadavá

**Studium stability komplexu transkripčního faktoru s dsDNA v plynné
a kapalné fázi**

Stability study of the transcription factor and dsDNA complex in the gas
and the liquid phases

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Konzultant: Mgr. Jan Fiala, Ph.D.

Praha 2022

PROHLÁŠENÍ

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

V Praze dne

Podpis:

ABSTRAKT

Integrativní strukturní biologie využívá nejen techniky s vysokým rozlišením, poskytující informaci o poloze jednotlivých atomů, i techniky s nízkým rozlišením nachází své uplatnění, protože informace o dynamických a heterogenních uspořádáních je konvenčními přístupy těžko dostupná. Díky senzitivitě, specificitě a versatilitě hmotnostní spektrometrie (MS) vznikla celá škála strukturních technik, založených právě na MS. Jedním ze směrů strukturní MS je nativní hmotnostní spektrometrie, která je založena na ionizaci nanoelektrosprejem z nedenaturujících rozpouštědel. Díky tomu je v plynné fázi zachována terciární i kvarterní struktura, a lze tudíž studovat nejen složení vzorku, ale s využitím iontové mobility (IM-MS) i konformaci biomolekul. Pomocí MS je tak možné přímo zachytit i perturbaci biomolekul, jako v případě aktivace zahříváním sprejovaného roztoku (vT-nESI).

Cílem diplomové práce bylo studovat teplotní stabilitu protein-DNA komplexů DNA-vazebných domén transkripčních faktorů TEAD1 a FOXO4. Komplexy byly charakterizovány nativní MS a IM-MS s využitím aktivace zahříváním sprejovaného roztoku, pomocí aparatury vyvinuté v naší laboratoři. Nejprve byly vT-nESI stanoveny teploty tavení dvouvláknové DNA, odpovídající teoreticky vypočteným i experimentálně stanoveným hodnotám. Byla též popsána tepelná denaturace TEAD1 a FOXO4 DNA-vazebných domén. Pomocí aktivace zahříváním sprejovaného roztoku byl studován vliv orientace M-CAT motivu na stabilitu TEAD1-DNA komplexů a byl zaznamenán rozdíl mezi TEAD1 a FOXO4 komplexy s DNA. TEAD1-DNA komplexy si při zahřívání zachovávaly jednu konformaci a docházelo k výrazné stabilizaci proteinu vazbou na DNA. Zatímco u FOXO4-DNA komplexu ke stabilizaci proteinu nedocházelo a při perturbaci byly pozorovány strukturní změny.

KLÍČOVÁ SLOVA

transkripční faktor, DNA, nativní elektrosprej, měření pohyblivosti iontů, hmotnostní spektrometrie

ABSTRACT

Integrative structural biology employs not only high-resolution techniques for the determination of the structure of biomolecules. Information about dynamical and heterogeneous assemblies is hardly achievable with conventional approaches. Therefore, low-resolution techniques are being utilized. As mass spectrometry (MS) is sensitive, specific, and versatile, there are a lot of structural techniques based on MS established. Native mass spectrometry is an approach that uses non-denaturing solvents for nanoelectrospray ionization, thus preserving tertiary and quaternary structures in the gas phase. Therefore, information on the composition of native biomolecules is obtained. Moreover, employing ion mobility (IM-MS) also provides structural insight. Using MS, we can directly analyze biomolecules perturbation, such as by variable-temperature nanoelectrospray ionization (vT-nESI).

The aim of this master's thesis was to characterize the thermal stability of the protein-DNA complexes of TEAD1 and FOXO4 transcription factors DNA-binding domains. Complexes were studied using native MS and IM-MS employing an in-house developed vT-nESI source. First, vT-nESI was used to determine the melting temperatures of double-stranded DNA, which were in correspondence with those theoretically calculated and experimentally assessed. Furthermore, the thermal denaturation of the DNA-binding domains TEAD1 and FOXO4 was described. Finally, vT-nESI characterized the thermal stability of the TEAD1-DBD interaction with various orientations of the M-CAT motif. Moreover, a difference between the TEAD1 and FOXO4 complexes was observed. The TEAD1-DNA complexes retained their conformation upon heating, and a distinctive stabilization of the protein by binding to the DNA was observed. However, by the FOXO4-DNA complex, the stabilization of the protein was negligible, and structural changes were observed upon perturbation.

KEYWORDS

transcription factor, DNA, native electrospray, ion mobility, mass spectrometry

PODĚKOVÁNÍ

Této kapitoly bych chtěla bych využít pro poděkování všem, kteří se na mé diplomové práci podíleli. Na prvním místě děkuji svému školiteli, RNDr. Petru Novákovi, Ph.D., nejen za její vedení, ale také za všechny rady a ochotu, se kterou se mi věnoval. Velké díky patří také konzultantovi Mgr. Janu Fialovi, Ph.D., za všechna společná měření, a veškerou pomoc, nejen s touto prací. Ráda bych poděkovala též Ing. Aleši Hnízdovi, Ph.D. a Mgr. Vítězslavu Brinsovi, za poskytnutí DNA-vazebné domény transkripčního faktoru FOXO4 (použitá pro experimenty uvedené v této práci), a také za spolupráci na projektu charakterizujícím tepelnou denaturaci protein-DNA komplexů pomocí biofyzikálních technik a vT-nESI, jehož součástí jsou výsledky CD a DSF uvedené v diskuzi. Za cenné připomínky při sepisování práce velice děkuji Mgr. Zdeňkovi Kukačkovi, Ph.D. V neposlední řadě patří mé velké poděkování všem členům Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace, nejen za všechnu pomoc, ale také za přátelské prostředí a milou atmosféru.

OBSAH

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
1.1 Studium struktury biomolekul a integrativní strukturní biologie.....	11
1.2 Strukturní hmotnostní spektrometrie	12
1.2.1 Instrumentace ve strukturní hmotnostní spektrometrii	13
1.2.1.1 Ionizace elektrosprejem a nanoelektrosprejem	15
1.2.2 Metody strukturní hmotnostní spektrometrie	17
1.2.2.1 Kovalentní značení.....	18
1.2.2.1.1 Vodík-deuteriová výměna	19
1.2.2.1.2 Cílené chemické značení	20
1.2.2.1.3 Radikálové značení.....	21
1.2.2.1.4 Chemické sítění	22
1.2.2.2 Nativní hmotnostní spektrometrie.....	24
1.2.2.3 Iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií	28
1.2.2.4 Technika zahřívání sprejovaného roztoku	30
2. CÍLE PRÁCE.....	34
3. MATERIÁL	35
3.1 Chemikálie	35
3.1.1 Roztoky a pufrы	36
3.1.2 Vektory a oligonukleotidy	37
3.1.3 Bakteriální kmeny.....	37
3.2 Přístroje a vybavení.....	38
3.3 Softwarové nástroje.....	40
4. METODY	41
4.1 Rekombinantní exprese a purifikace TEAD1-DBD	41
4.1.1 Rekombinantní exprese TEAD1-DBD	41
4.1.2 Purifikace TEAD1-DBD	42
4.1.2.1 Afinity chromatografie.....	43
4.1.2.2 Chromatografie na iontoměničích	43
4.1.2.3 Druhá afinity chromatografie.....	44
4.1.2.4 Gelová permeační chromatografie	45
4.1.2.5 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS.....	45
4.2 Studium protein-DNA komplexů hmotnostní spektrometrií.....	47

4.2.1	Příprava vzorku pro analýzu	47
4.2.2	Výroba emitůrů pro ionizaci nanoelektrosprejem	48
4.2.3	Analýza na Bruker solariX FT-ICR.....	49
4.2.3.1	Zahřívání sprejovaného roztoku.....	49
4.2.4	Analýza na Waters Synapt G2-Si	51
4.2.4.1	Kalibrace iontové mobility.....	51
4.2.4.2	Zahřívání sprejovaného roztoku.....	52
4.2.4.3	Teoretický výpočet kolizních průřezů.....	52
5.	VÝSLEDKY.....	53
5.1	Purifikace TEAD1-DBD	53
5.1.1	Afinitní chromatografie	53
5.1.2	Chromatografie na iontoměničích	54
5.1.3	Gelová permeační chromatografie.....	56
5.2	Nativní hmotnostní spektrometrie	58
5.2.1	Zahřívání sprejovaného roztoku	58
5.2.1.1	Zahřívání sprejovaného roztoku dvouvláknové DNA	58
5.2.1.2	Zahřívání sprejovaného roztoku proteinů	63
5.2.1.3	Zahřívání sprejovaného roztoku protein-DNA komplexů	66
5.3	Nativní hmotnostní spektrometrie ve spojení s iontovou mobilitou	72
5.3.1	Kalibrace iontové mobility	72
5.3.2	Zahřívání sprejovaného roztoku	74
5.3.2.1	Zahřívání sprejovaného roztoku dvouvláknových DNA	74
5.3.2.2	Zahřívání sprejovaného roztoku proteinů	75
5.3.2.3	Zahřívání sprejovaného roztoku protein-DNA komplexů	78
5.3.3	Teoretický výpočet kolizních průřezů	80
6.	DISKUZE.....	81
7.	ZÁVĚR.....	91
8.	POUŽITÁ LITERATURA.....	92

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APS	peroxodisíran amonný (z anglického „ammonium persulfate“)
BME	2-merkapt ethanol (odvozeno z β -merkapt ethanol)
BP	bakalářská práce
CCS	kolizní průřez (z anglického „collision cross-section“)
CD	cirkulární dichroismus
CIU	kolizně indukované rozbalování (z anglického „collision induced unfolding“)
cryo-EM	kryoelektronová mikroskopie (z anglického „cryogenic electron microscopy“)
DBD	DNA-vazebná doména (z anglického „DNA-binding domain“)
DP	díplomová práce
dsDNA	dvouvláknová DNA (z anglického „double-stranded DNA“)
DSF	diferenční skenovací fluorimetrie (z anglického „differential scanning fluorimetry“)
DTIMS	iontová mobilita v driftové trubici (z anglického „drift tube ion mobility spectrometry“)
DTT	dithiotreitol
ECD	disociace záchytem elektronu (z anglického „electron capture dissociation“)
ESI	ionizace elektrosprejem (z anglického „electrospray ionization“)
ETD	disociace přenosem elektronu (z anglického „electron transfer dissociation“)
FPOP	rychlá fotochemická oxidace proteinů (z anglického „fast photochemical oxidation of proteins“)
FT-ICR-MS	hmotnostní spektrometr s iontovou cyklotronovou rezonancí a Fourierovou transformací (z anglického „Fourier transform-ion cyclotron resonance-MS“)
GPC	gelová permeační chromatografie
HDX	vodík-deuteriová výměna (z anglického „hydrogen-deuterium exchange“)
HEPES	kyselina (4-(2-hydroxyethylamino)-1-piperazin)ethansulfonová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického „high-performance liquid chromatography“)
HSP	protein teplotního šoku (z anglického „heat shock protein“)
IEX	chromatografie na iontoměničích (z anglického „ion exchange chromatography“)

IMAC	afinitní chromatografie využívající imobilizované ionty kovů (z anglického „immobilized metal affinity chromatography“)
IMS	iontová mobilitní spektrometrie (z anglického „ion mobility spectrometry“)
IM-MS	iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií (vznik spojením zkratk IMS a MS)
IRMPD	infračervená multifotonová disociace (z anglického „infrared multiphoton dissociation“)
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (z anglického „liquid chromatography-mass spectrometry“)
M	mol/l (též užívány mM: mmol/l, μ M: μ mol/l apod.)
MALDI	laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (z anglického „matrix-assisted laser desorption/ionization“)
Mb	myoglobin (též hMb a aMb pro rozlišení holo-, respektive apo- formy)
MS	hmotnostní spektrometrie (z anglického „mass spectrometry“)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie, též značena MS ²
MWCO	limit molekulové hmotnosti (z anglického „molecular weight cut-off“)
nESI	ionizace nanoelektrosprejem, miniaturizace konvenční ESI (z anglického „nanoelectrospray ionization“)
NMR	nukleární magnetická rezonance
NS	nábojový stav
OD	optická denzita
PA	projekční aproximace
PTM	posttranslační modifikace
SAXS	maloúhlový rozptyl rentgenových paprsků (z anglického „small-angle X-ray scattering“)
SDS	dodecylsírán sodný (z anglického „sodium dodecyl sulfate“)
SDS-PAGE	diskontinuální gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS (z anglického „SDS-polyacrylamide gel electrophoresis“)
ssDNA	jednovláknová DNA (z anglického „single-stranded DNA“)

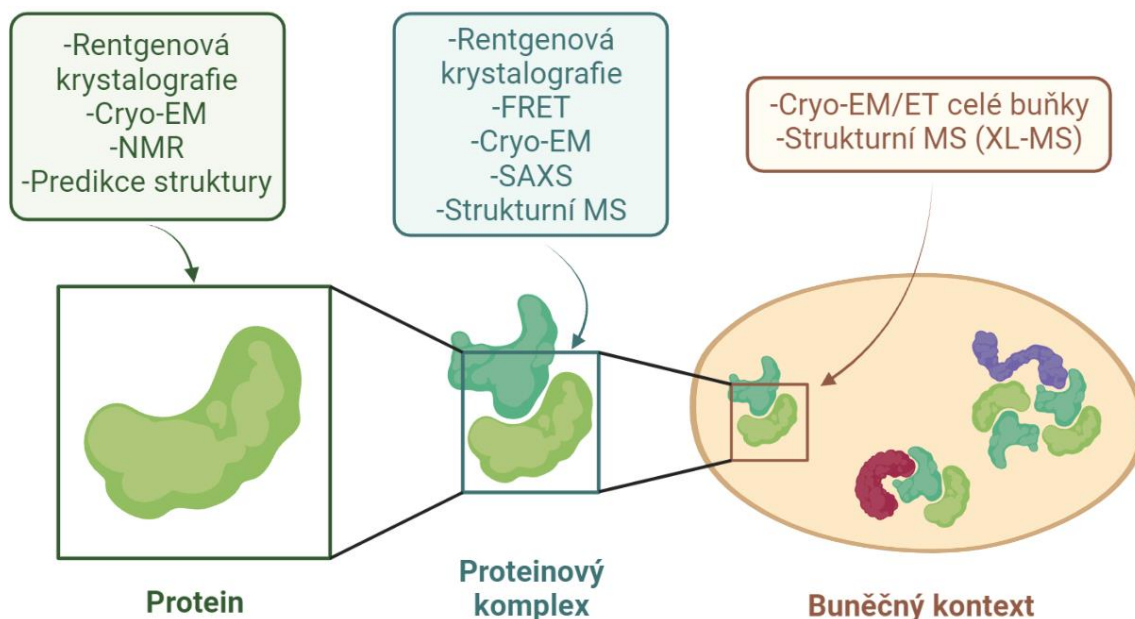
STHEM-ESI	ionizace elektrosprejem se zahříváním sprejovaného roztoku (z anglického „solution thermal melting coupled with ESI mass spectrometry“), označuje stejnou techniku jako vT-ESI
STM	skenovací tunelovací mikroskopie
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfín
TC-ESI	ionizace elektrosprejem se zahříváním sprejovaného roztoku (z anglického „temperature-controlled electrospray ionization“), označuje stejnou techniku jako vT-ESI
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)ethan
T_m	teplota tavení – používáno jako T_{m+} a T_{m-} pro pozitivní, respektive negativní mód ionizace (uváděna v °C)
ToF-MS	hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu (z anglického „time of flight MS“)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TWIMS	iontová mobilita s putující vlnou (z anglického „traveling wave ion mobility spectrometry“)
UVPD	ultrafialová fotodisociace (z anglického „ultraviolet photodissociation“)
vT-ESI	ionizace elektrosprejem se zahříváním sprejovaného roztoku (z anglického „variable-temperature ESI“)
XL-MS	chemické sítě ve spojení s MS (z anglického „cross-linking MS“)
y_T	poměr, pomocí kterého byly stanoveny T_m DNA a protein-DNA komplexů, vypočtený dle rovnice (2), respektive (3) (bezrozměrná veličina)
z_{avg}	průměrný nábojový stav (bezrozměrná veličina)

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 Studium struktury biomolekul a integrativní strukturní biologie

Studium struktury biomolekul, zejména proteinů a jejich komplexů, je kvůli úzké souvislosti mezi jejich strukturou a funkcí dynamicky se rozvíjícím oborem [1]. Pro řešení struktury se konvenčně používají tzv. techniky s vysokým rozlišením, které umožňují popsat pozici jednotlivých atomů, ze kterých je biomolekula složena. Mezi takové techniky patří rentgenová krystalografie, nukleární magnetická rezonance (NMR) a kryoelektronová mikroskopie (cryo-EM). Přestože byla díky těmto technikám vyřešena struktura mnohých důležitých biomolekul, jejich použití má svá omezení. Rentgenová krystalografie je limitována získáním kvalitních krystalů potřebných pro experiment [2]. Analýza též klade nároky na vysoké množství vzorku (řádově miligramy) a u některých, zejména flexibilních, biomolekul je získání použitelného krystalu velmi složité či zcela nemožné. Mezi hlavní nevýhody NMR patří velikostní limitace, tato technika neumožňuje charakterizovat molekuly větší než 75 kDa [3]. U cryo-EM analýzy biomolekul též narážíme na velikostní limit, na rozdíl od NMR je cryo-EM aplikovatelná na molekuly větší než 50 kDa [4].

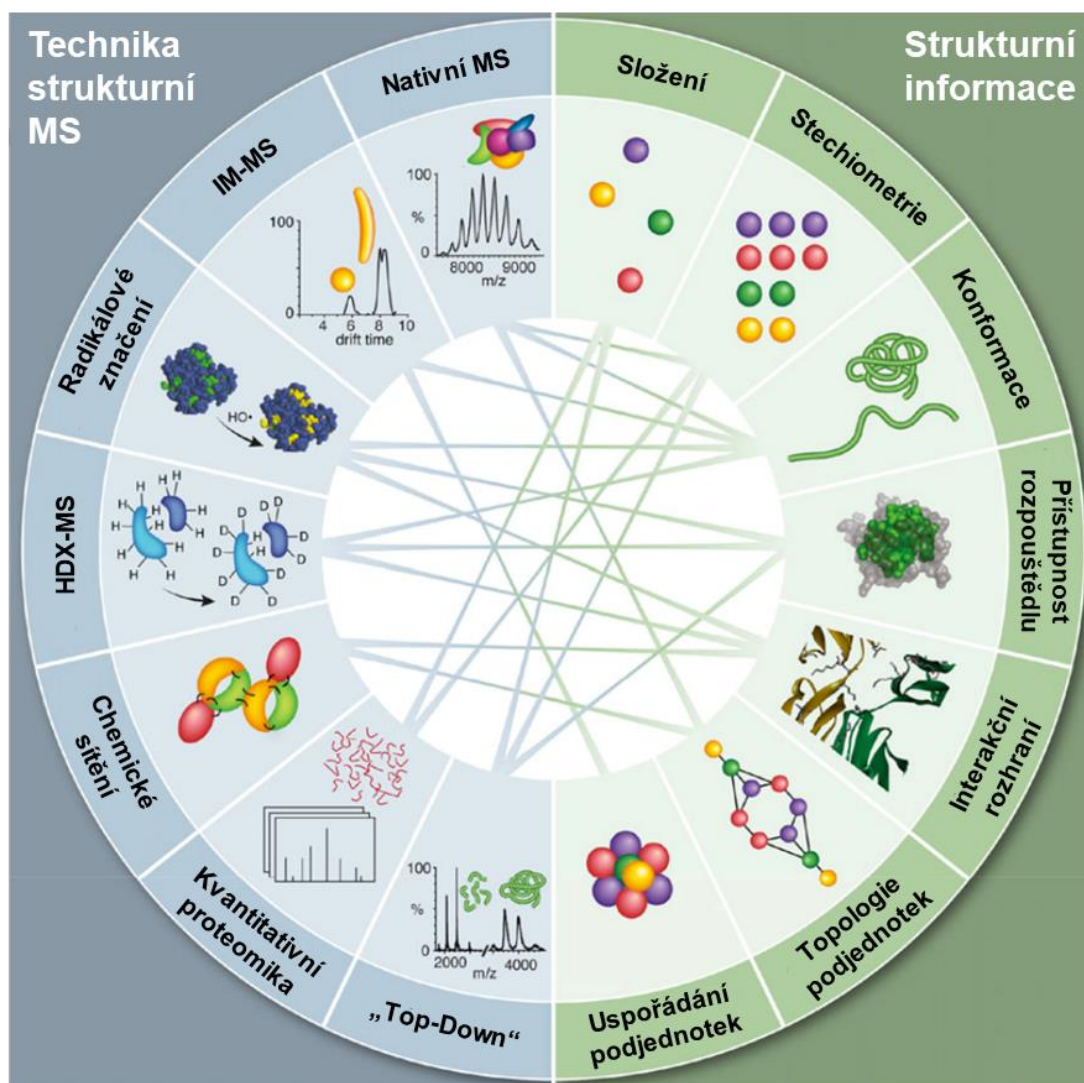
Oproti technikám s vysokým rozlišením nabízí současná strukturní biologie též techniky s tzv. nízkým rozlišením, které nedosahují atomárního rozlišení [1]. Přestože tyto techniky nemohou určit přesnou polohu jednotlivých atomů, nachází své uplatnění, zejména protože mohou překonávat některé limity technik s vysokým rozlišením. Umožňují například studovat dynamiku biomolekul, heterogenní uspořádání, a to za řádově nižší spotřeby vzorku. Navíc kombinací více takových technik můžeme získat dostatečnou informaci pro strukturní charakterizaci námi studovaných biomolekul, která by nebyla pouze pomocí konvenčních technik dostupná [5], [6]. Přístup, který využívá kombinaci většího množství komplementárních metod pro popsání struktury jednoho systému, bývá v literatuře označován jako integrativní strukturní biologie (obr. 1 na str. 12). Kromě technik založených na hmotnostní spektrometrii (MS) využívá tento obor i spektroskopické techniky, jako cirkulární dichroismus (CD) [7] či Försterův rezonanční přenos energie [8], ale i techniky s vysokým rozlišením (NMR, rentgenová krystalografie), nebo predikce struktury pomocí molekulového modelování.



Obrázek 1 Schéma přístupu integrativní strukturální biologie k charakterizaci proteinů. Kombinace technik s vysokým a nízkým rozlišením umožňuje získat informaci nejen o struktuře jedné biomolekuly, ale i jejích interakcích, a to i na buněčné úrovni. Použité zkratky značí: cryo-EM/ET – kryoelektronovou mikroskopii/tomografii, NMR – nukleární magnetickou rezonanci, FRET – Försterův rezonanční přenos energie, SAXS – malouhlový rozptyl rentgenových paprsků, MS – hmotnostní spektrometrii, XL – chemické sítění. Vytvořeno dle [5], v programu biorender.com.

1.2 Strukturální hmotnostní spektrometrie

V současné době jsou ve strukturální biologii stále více využívány techniky založené na hmotnostní spektrometrii. Díky senzitivitě, specifitě a versilitě hmotnostní spektrometrie vzniklo velké množství technik s nízkým rozlišením, charakterizujících strukturu biomolekul, založených právě na MS. Jsou tudíž označovány jako strukturální hmotnostní spektrometrie, někdy také strukturální proteomika [6], [9]. Tyto metody umožňují získat nepřeberné množství informací o biomolekulách, od primární sekvence proteinů a jejich posttranslačních modifikací, přes sekundární a terciární, až po jejich kvarterní strukturu. Pro získání takto komplexního pohledu je třeba využít širokou škálu technik (obr. 2 na str. 13), kterým budou věnovány následující kapitoly.



Obrázek 2 Přehled technik strukturální hmotnostní spektrometrie spolu se získanou strukturální informací. Pro vodík-deuteriovou výměnu použita zkratka HDX-MS a pro iontovou mobilitu ve spojení s hmotnostní spektrometrií zkratka IM-MS. Převzato z [6] a upraveno.

1.2.1 Instrumentace ve strukturální hmotnostní spektrometrii

Dlouhou dobu byla hmotnostně spektrometrická analýza omezena pouze na malé a těkavé či termostabilní molekuly, proto rozvoj strukturální hmotnostní spektrometrie úzce souvisí s rozvojem instrumentace [10]. Jelikož MS umožňuje analyzovat pouze ionty v plynné fázi, prvním krokem analýzy je přenesení molekul z kondenzované (kapalné) do plynné fáze. Pro charakterizaci proteinů je klíčové, aby při ionizaci nedocházelo k jejich fragmentaci či změnám vzorku [11]. Tyto požadavky splňují laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (MALDI) [12] a ionizace elektrosprejem (ESI) [13], které byly vyvinuty na konci 80. let. Z těchto dvou ionizačních technik je ve strukturální hmotnostní spektrometrii

dominantní ESI, a to zejména protože ionizuje oproti MALDI molekuly přímo z roztoku [11]. U MALDI je příprava vzorku komplikovanější, je třeba vytvořit směsné krystaly analytu s přebytkem matrice, UV absorbující organické sloučeniny. Takové podmínky značně perturbují vzorek a jsou dalším důvodem pro majoritní využití ionizace elektrosprejem ve strukturní hmotnostní spektrometrii.

Ionizace velkých biomolekul je ale jen první překážkou, kterou musí strukturní hmotnostní spektrometrie překonat [11]. Aby bylo možné strukturní MS používat, je třeba, aby nedocházelo k porušení intaktní struktury iontů po celou dobu jejich letu od vstupu do hmotnostního spektrometru až po detektor. Toho bylo dosaženo díky pokrokům v instrumentaci učiněným zejména na přelomu 20. a 21. století. Obecně se jedná zejména o tzv. „měkké“ nastavení iontové optiky a tlaků v jednotlivých částech hmotnostního spektrometru tak, aby mohly procházet velké molekuly [14]. Kontrola těchto parametrů je klíčová zejména pro nativní hmotnostní spektrometrii, kdy je třeba kromě udržení intaktní struktury zajistit i zachování nekovalentních interakcí v průběhu celého MS experimentu [15].

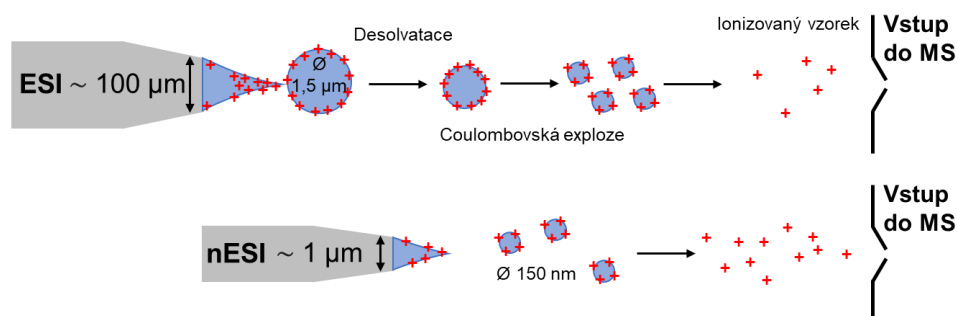
Výhodou aplikace hmotnostní spektrometrie na analýzu biomolekul je schopnost určit nejen m/z celého analytu, ale též možnost selektivní disociace konkrétních mateřských iontů [11]. Vzniklé fragmenty jsou následně analyzovány pomocí MS, proto je tato technika označována jako tandemová hmotnostní spektrometrie či MS/MS nebo MS^2 [16]. K tvorbě fragmentů dochází nejběžněji jedním ze tří mechanismů: kolizní aktivací, aktivací způsobenou interakcí s elektrony, nebo fotony. Kolizní aktivace je nejčastěji využívanou fragmentační technikou v tandemové MS, a to především díky své vysoké efektivitě. K aktivaci analytu dochází pomocí kolizí s inertním plynem (helium, dusík, argon), kdy je kinetická energie srážky převedena na vnitřní energii analytu. Nevýhodou kolizní aktivace je fragmentace labilních vazeb, která u proteinů často vede k neutrálním ztrátám (H_2O , CO_2 , NH_3) nebo fragmentaci posttranslačních modifikací [16], [17]. Naopak výhodou disociace záchytem elektronu (ECD) a přenosem elektronu (ETD) je její využitelnost pro studium lokalizace posttranslačních modifikací [17]. Při ECD interagují protonované molekuly s nízkoenergetickými elektrony generovanými zahříváním filamentem [18]. Záchyt elektronu vede k redukci nábojového stavu (NS) iontu, který následně podléhá fragmentaci. Nevýhodou disociace záchytem elektronu je její spojení s nejdražší MS instrumentací – hmotnostním spektrometrem s iontovou cyklotronovou rezonancí a Fourierovou

transformací (FT-ICR) [19]. Proto byla představena ETD, která je založena na reakci mezi dvěma ionty. Na vícenásobně protonovaný fragmentovaný peptid je přenesen nízkoenergetický elektron z jedné nabitěho aniontu (např. antracenu či fluoranthenu). V obou případech dochází k fragmentaci peptidové páteře mezi atomy N-C α . K fragmentaci iontů v plynné fázi může docházet také v důsledku absorpce fotonů – fotodisociací [16]. Výhodou fotodisociace je její selektivita a laditelnost, závisící na použitém laseru. Nejběžněji jsou pro fotodisociaci používány IR a UV lasery. V případě použití IR laseru (CO $_2$ – 10.6 μ m), mají fotony nízké energie, proto je při infračervené multifotonové disociaci (IRMPD) k fragmentaci nutná akumulace několika fotonů. Charakter IRMPD je podobný CID a dochází k fragmentaci nejlabilnějších vazeb. V případě ultrafialové fotodisociace (UVPD) jsou využívány vysoce energetické fotony, které mohou být generovány např. 157 či 193 nm excimerovými lasery. Díky vysoké energii fotonů byla pozorována široká škála fragmentačních mechanismů poskytující velké spektrum fragmentů zaručující významné sekvenční pokrytí a umožňující identifikaci posttranslačních modifikací.

1.2.1.1 *Ionizace elektrosprejem a nanoelektrosprejem*

První překážkou, kterou musí biomolekuly analyzované hmotnostní spektrometrií překonat je transfer z kondenzované fáze do formy iontů v plynné fázi. Ve většině případů aplikace hmotnostní spektrometrie na studium biomolekul je pro ionizaci vzorku využita ESI [15]. Při této ionizaci je vzorek analytu umístěn ve vodivé kapiláře, na jejímž konci se v důsledku potenciálového rozdílu mezi kapilárou a vstupem do hmotnostního spektrometru, spolu s externím tlakem na kapalinu v kapiláře, tvoří tzv. Taylorův kužel. Z konce kužele se odtrhávají malé nabitě kapičky, které se dále rozpadají v důsledku Coulombovské repulze kumulovaného náboje při odpařování rozpouštědla, viz obr. 3 na str. 16. Tento proces se opakuje až do chvíle, než je v každé kapičce pouze jedna molekula analytu, která zůstává po odpaření veškerého rozpouštědla nabitá. Pro zlepšení desolvatace bývá do prostoru mezi kapilárou a vstupem do hmotnostního spektrometru vháněn zahřátý sušící plyn. Proteiny se běžně analyzují pozitivně nabitě (protonované), což je označováno jako pozitivní ESI mód [20]. Stejně tak je ale možné generovat ESI i negativně nabitě deprotonované ionty (negativní ESI mód), tento přístup je využíván zejména pro nukleové a mastné kyseliny.

V 90. letech vznikla miniaturizací ESI technika nanoelektrospreje (nESI) [21], [22], která výrazně rozšířila aplikovatelnost ionizace elektrosprejem [23]. První důležitou předností nESI je extrémně nízká spotřeba vzorku. Pro analýzu stačí několik mikrolitrů řádově mikromolárního roztoku analytu. Při nESI analýze se běžně používají skleněné kapiláry s koncovými průměry kolem 1 μm , přesto není nESI pouze zmenšeninou konvenční ESI. Nižší průtoky nESI kapilárou totiž ovlivňují mechanismus formace iontů, jež byl pro ESI popsán výše a je znázorněn na obr. 3 [24]. U nESI vznikají díky menšímu průměru sprejovací kapiláry řádově menší kapičky (150 nm v porovnání 1,5 μm pro ESI), které mají větší koncentraci náboje na povrchu, což vede k rychlejším rozpadům a menšímu odpařování rozpouštědla. Tento fakt vysvětluje další výhody využití nESI pro analýzu biomolekul, a to větší toleranci ke kontaminaci solemi, spolu s menšími ztrátami vzorku při dělení kapek. Dalším přínosem ionizace nanoelektrosprejem je lepší stabilita spreje s rozpouštědly, která mají vysoká povrchová napětí, jako např. voda a roztoky na její bázi. Mezi ostatní benefity patří schopnost sprejovat bez působení vnějšího tlaku na kapalinu v kapiláře a dostatečná desolvatace i bez použití sušícího plynu, což dělá nESI uspořádání jednodušší.

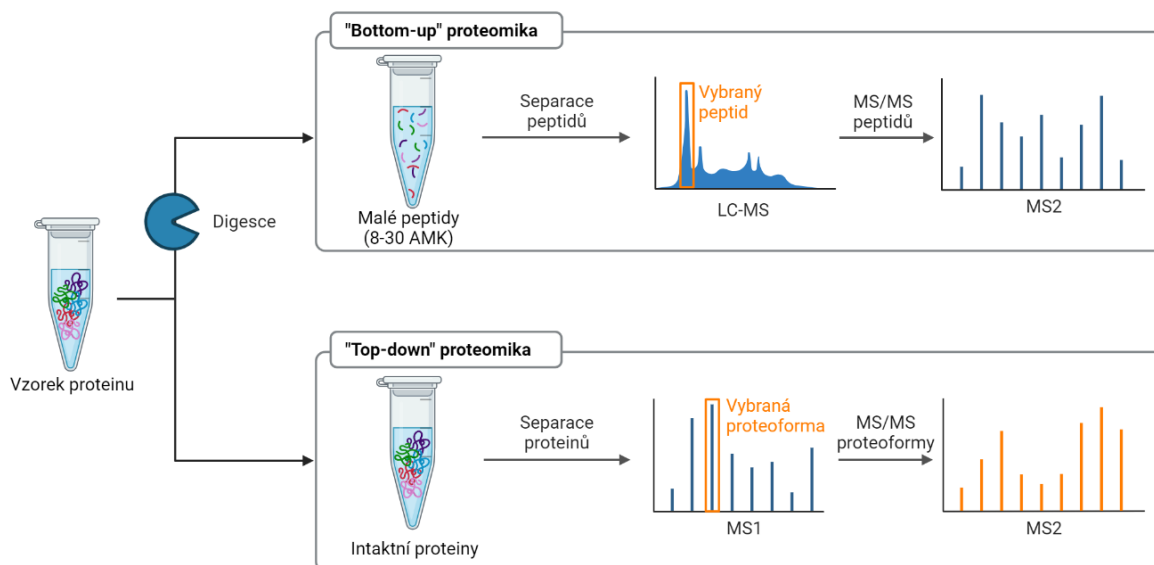


Obrázek 3 Schématické znázornění rozdílů mezi ESI a nESI. Základním rozdílem je menší průměr nESI sprejovací kapiláry. Díky tomu vznikají menší kapičky analytu, které rychleji desovatují. Proto je možné umístit nESI emitor blíže ke vstupu do hmotnostního spektrometru. Při nESI dochází též k efektivnějšímu přenosu iontů. Vytvořeno dle [25] s použitím údajů uvedených v [24].

Jak bylo naznačeno dříve, i přes svou širokou použitelnost mají ESI a nESI své limitace [15]. Pomocí těchto ionizačních technik není možné analyzovat biomolekuly přímo z běžných pufrů využívaných v biochemii a molekulární biologii, tedy roztoků obsahujících vysoké koncentrace solí, organické pufrů a surfaktanty. Složky takových pufrů se velmi snadno ionizují a vzhledem k jejich obrovskému nadbytku potlačují ionizaci samotného vzorku. Případně dochází k tvorbě aduktů mezi komponentami pufru a studovanými molekulami, což vede ke složitě interpretovatelným hmotnostním spektrům. Mezi další nevýhody patří nízká efektivita přenosu molekul, kdy je i při využití nESI detekováno asi 10 % molekul ze vzorku [11]. Naopak hlavními výhodami těchto technik je versatilita jejich použití. Lze je přímo spojit se separačními technikami jako kapilární elektroforézou či vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) [26], použít pro přímou infuzi vzorku do hmotnostního spektrometru, a to vše za využití denaturujících i nendenaturujících rozpouštědel [27].

1.2.2 Metody strukturní hmotnostní spektrometrie

Jednotlivé metody strukturní hmotnostní spektrometrie můžeme rozlišit podle toho, jak přistupují k analýze proteinů [9]. Techniky kovalentního značení analyzují pomocí MS již denaturované biomolekuly, zatímco nativní hmotnostní spektrometrie a iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií (IM-MS) studují proteiny v jejich nativní podobě. U denaturující analýzy jsou běžně užívány dva přístupy k tomu, jak získat informaci o jednotlivých částech polypeptidového řetězce (obr. 4 na str. 18). První, historicky starší přístup využívá štěpení proteasou následované chromatografickou separací, na kterou navazuje MS či MS/MS analýza [16]. Tento přístup tak skládá informaci o celém proteinu z jednotlivých peptidů, proto se nazývá proteomika zdola z anglického „Bottom-Up proteomics“. Druhým, novějším, přístupem, který je založen na tandemové hmotnostní spektrometrii nerozštěpeného analytu, je tzv. „Top-Down proteomics“, tedy proteomika shora [28]. Při tomto experimentálním uspořádání je celý protein, případně komplex více biomolekul, fragmentován v hmotnostním spektrometru. Získáváme tak informaci jak o celé vybrané proteoformě, tak o jejích jednotlivých částech.



Obrázek 4 Schematické znázornění rozdílu mezi „Bottom-up“ a „Top-down“ proteomikou. Vytvořeno dle [9] pomocí biorender.com.

1.2.2.1 Kovalentní značení

Kovalentní značení v anglické literatuře označované též jako „protein footprinting“ je přístup ke strukturní analýze biomolekul, při kterém dochází k chemické modifikaci reziduí nacházejících se na povrchu proteinu [29]. Pomocí mapování rozpouštědly přístupného povrchu je možné studovat strukturu biomolekul a její změny. Vazba značky na reziduum je doprovázená změnou hmotnosti, a je tudíž přímo detekovatelná hmotnostní spektrometrií. Pomocí proteomiky zdola či shora je možné lokalizovat modifikaci a získat tak informaci o jednotlivých částech proteinu, v určitých případech i s rozlišením jednotlivých reziduí. Pro studium struktury proteinů lze využít širokou škálu kovalentních značek o různé komplexitě od deuteria využívaného pro HDX až po rozměrné fotoafinitní značky. Jednotlivé techniky kovalentního značení, kterým budou věnovány následující kapitoly, se tak liší použitou značkou, její chemickou povahou, specifitou a velikostí.

1.2.2.1.1 VODÍK-DEUTERIOVÁ VÝMĚNA

Jednou z nejvyžívanějších technik kovalentního značení proteinů je vodík-deuteriová výměna [29]. HDX je založená na reverzibilní výměně vodíků mezi proteinem a rozpouštědlem, což ji odlišuje od ostatních značících technik, které jsou běžně založeny na ireverzibilních procesech. Výměna H za D je doprovázena změnou hmotnosti, a je tudíž snadno detekovatelná hmotnostní spektrometrií (HDX-MS). Avšak od svého vzniku v 50. letech až do 80. let byla hlavní detekční metodou pro HDX nukleární magnetická rezonance [30]. Spojení HDX s hmotnostní spektrometrií začalo být dominantní až v 90. letech, především díky technickému rozvoji MS popsanému výše (viz kap. 1.2.1 na str. 13). V nejběžnějším experimentálním uspořádání je protein rozpuštěn v H₂O a následně inkubován po určitý čas v D₂O [29]. V průběhu inkubace dochází k výměně rozpouštědla přístupných vodíků proteinu za deuteria z rozpouštědla. Tato výměna probíhá jak na N–H skupinách peptidové páteře, tak na postranních řetězcích aminokyselin, když je vodík vázán na kyslík, síru či dusík. Přesto se technika HDX zaměřuje zejména na vodíky N–H skupin peptidové páteře. Zejména z toho důvodu, že vodíky na postranních řetězcích nejsou tolik zapojeny do vodíkových vazeb, což způsobuje jejich velmi rychlou výměnu, která je stěží experimentálně zachytitelná. U běžného HDX experimentu je po inkubaci v D₂O, která probíhá ve škále od zlomku sekundy až po desítky hodin, výměna zastavena změnou pH a teploty (2,5; 0 °C). Dále je označený protein analyzován „Bottom-up“ přístupem, tedy štěpen proteasou, následně separován kapalinovou chromatografií a analyzován hmotnostní spektrometrií (LC-MS).

Výhodou HDX je schopnost studovat všechny aminokyseliny (vyjma prolinu), jelikož mají N–H skupinu, jež může podstupovat výměnu [29], [31]. Další výhodou této techniky je její schopnost zaznamenat jak lokální rychlé strukturní fluktuace, tak pomalejší strukturní změny, které nejsou ostatními technikami zachytitelné. Rychlost výměny daného vodíku, je závislá na pH, teplotě a příslušné aminokyselině, ale také na přístupnosti rozpouštědla, zapojení do vodíkových vazeb a lokální struktuře řetězce. Jak již bylo naznačeno nejrychleji dochází k výměně vodíků, které jsou přístupné rozpouštědla a nejsou zapojeny do vodíkových vazeb. Takové vodíky se nachází v nestrukturovaných částech proteinu. Naopak nejpomaleji dochází k výměně vodíků, které se nachází uvnitř proteinu a jsou zapojeny do vodíkových vazeb. Díky tomu lze studovat strukturu proteinů, neboť právě

intramolekulární vodíkové vazby mezi N–H a karbonyly peptidové vazby stabilizují sekundární struktury.

Většina HDX experimentů je diferenční, porovnává dva stavy proteinů např. s ligandem a bez ligandu nebo mutovaný a nemutovaný protein [29]. Pozoruje tak strukturní změny, které jsou způsobeny mutací či ligandem. Oproti jiným strukturním technikám je možné sledovat změny napříč celým proteinem, jelikož HDX probíhá na všech rozpouštědly přístupných amidových vodících peptidové páteře. Navíc vnesení deuteria do struktury způsobuje minimální perturbaci vzorku, což z HDX dělá univerzální a robustní nástroj pro strukturní biologii [29], [30]. Z těchto důvodů má vodík-deuteriová výměna široké spektrum aplikací a byla využita např. jako komplementární technika k cryo-EM pro popsání dynamiky proteinů [32], nebo pro mapování epitopů protilátek ve farmaceutickém průmyslu [33].

1.2.2.1.2 CÍLENÉ CHEMICKÉ ZNAČENÍ

Na rozdíl od vodík-deuteriové výměny, která cílí především na amidové vodíky peptidové páteře, se cílené značení zaměřuje na postranní řetězce aminokyselin [29]. Podobně, jako u vodík-deuteriové výměny značí tato činidla aminokyseliny na povrchu proteinů, které jsou přístupné rozpouštědly. Oproti HDX jsou tyto reakce ireverzibilní, což je výhodou pro následné zpracování vzorků. Stejně jako u ostatních technik kovalentního značení je přítomnost značky detekovatelná hmotnostní spektrometrií, neboť dochází k přesně definované změně hmotnosti označené aminokyseliny.

Vzhledem k rozmanitosti postranních řetězců aminokyselin existuje též celá řada činidel využívaných pro chemické značení, které specificky interagují s jednou či několika aminokyselinami [29]. Běžně se pro značení využívá thiolová skupina cysteinu, aromatické kruhy tryptofanu a tyrosinu, karboxylová skupina kyselin asparagové a glutamové, guandylová skupina argininu, imidazolový kruh histidinu, nebo amino skupina lysinu. Pomocí cíleného chemického značení tak lze studovat roli postranních řetězců aminokyselin ve funkci a uspořádání biomolekul (viz obr. 5 na str. 23). Kromě svých aplikací ve strukturní proteomice lze chemické značení využít i pro kvantifikaci či usnadnění MS analýzy (snazší ionizace a fragmentace vzorku) [34].

1.2.2.1.3 RADIKÁLOVÉ ZNAČENÍ

Zatímco vodík-deuteriová výměna vyniká svou rychlostí, výhodou cíleného chemického značení je jeho ireverzibilita [29]. Třetí přístup v kovalentním značení, používaný pro charakterizaci biomolekul – značení radikálovými činidly, spojuje výhody obou předchozích skupin. Jelikož jsou radikály velmi reaktivní, značící časy se pohybují v řádu mikrosekund, což umožňuje zachycení dynamiky proteinů či pohled na jejich sbalování a rozbalování. Stejně jako v případě cíleného chemického značení je reakce běžně ireverzibilní, avšak u radikálového značení není zachována stejná specifita reakce. Většinou je modifikováno více postranních řetězců aminokyselin, avšak vzhledem k odlišné reaktivitě jednotlivých reziduí vůči radikálům není dosaženo kompletního pokrytí, jako v případě HDX. Pro radikálové značení může být využita široká škála radikálů, jako např. $\text{CO}_3^{\cdot-}$, $\text{SO}_4^{\cdot-}$, I^{\cdot} nebo CF_3^{\cdot} , ale nejpoužívanější jsou hydroxylové radikály OH^{\cdot} .

Použití hydroxylových radikálů pro mapování rozpouštědly přístupného povrchu proteinu je výhodné, jelikož je OH^{\cdot} svou velikostí a hydrofobicitou podobný vodě [29]. Navíc se hydroxylový radikál vyskytuje jako přirozená součást oxidativního stresu a v organismech má regulační funkci. Další výhodou použití hydroxylových radikálů je jejich široká reaktivita, OH^{\cdot} reaguje téměř se všemi aminokyselinami (nejsnáze s aromatickými a obsahujícími síru, nejhůře s glycinem a alaninem) [35]. Reakce s hydroxylovým radikálem poskytuje napříč aminokyselinami různé produkty, nejběžněji se však vyskytuje vnesení $-\text{OH}$ skupiny doprovázené nárůstem molekulové hmotnosti o 16 Da. Běžně jsou užívány tři způsoby, jak generovat hydroxylové radikály pro značení proteinů, historicky prvním použitým byla synchrotronová radiolýza vody, druhou variantou je využití Fentonovy reakce, avšak nejpoužívanějším způsobem je fotolýza peroxidu vodíku [36]. Té využívá technika rychlé fotochemické oxidace proteinů (FPOP), která je založena na použití 248 nm KrF laseru, štěpícího peroxid vodíku. K reakci dochází v průtokovém reaktoru, kterým protéká studovaný protein v pufru s malým množstvím H_2O_2 . Výhodou FPOP je tak zejména absence použití těžce dostupného synchrotronu.

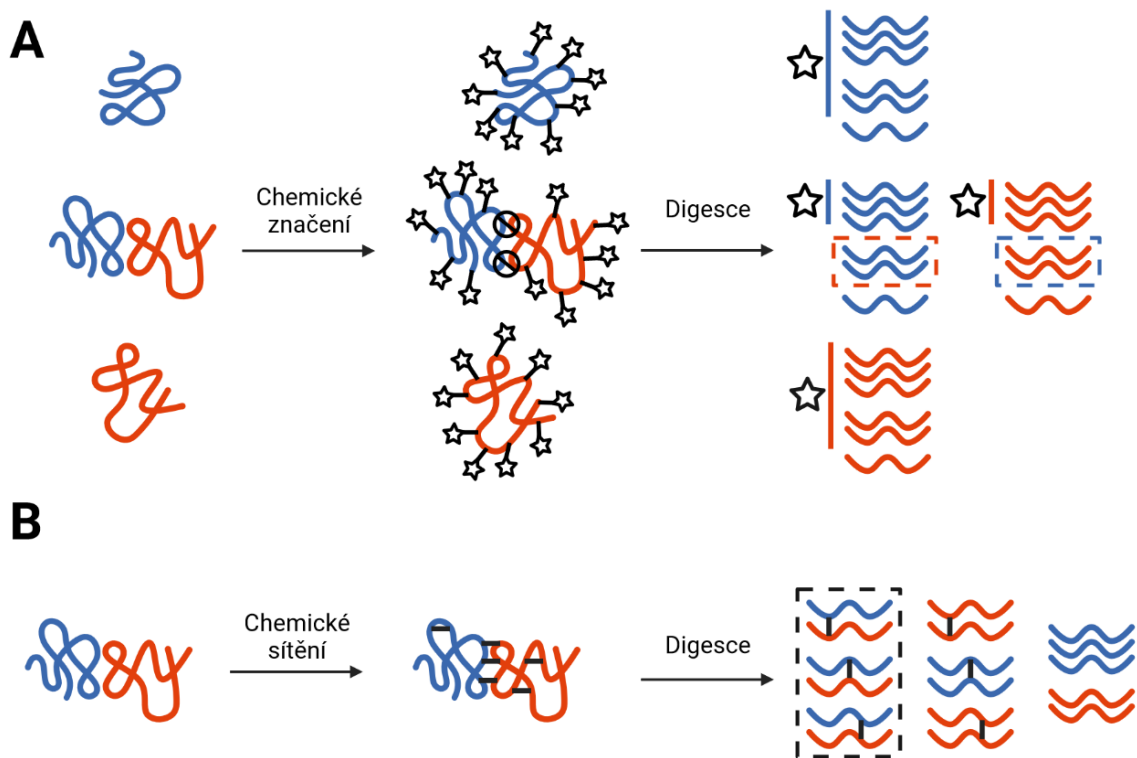
Při běžném experimentu jsou vzorky označeny hydroxylovými radikály a následně analyzovány „Bottom-up“ přístupem [36]. Při zpracování a analýze vzorků je patrná již zmíněná výhoda v ireverzibilní povaze radikálového značení OH^{\cdot} . Naopak nevýhodou techniky je široké spektrum získaných produktů reakce, které znesnadňuje interpretaci dat.

Oxidace proteinů hydroxylovými radikály též nachází, jako ostatní techniky kovalentního značení své uplatnění ve strukturní biologii. Výhody použití FPOP přístupu byly demonstrovány na studiu konformačních změn a agregace amyloidu β , proteinu souvisejícího s Alzheimerovou chorobou [37].

1.2.2.1.4 CHEMICKÉ SÍTĚNÍ

V případě, že pro chemické značení použijeme molekulu, která má dvě skupiny chemického nebo radikálového činidla spojené raménkem různé délky, můžeme vytvořit kovalentní intra- či inter- molekulární spojení [29]. Technika využívající takováto multifunkční činidla se nazývá chemické sítěnání a umožňuje studovat jak jednotlivé biomolekuly, tak jejich komplexy, díky informaci o vzdálenosti mezi propojenými rezidui (obr. 5 na str. 23) [38]. Stejně jako existuje široká škála činidel pro cílené chemické značení, existuje velké množství síťovacích činidel s odlišnými vlastnostmi, které závisí na použitých reaktivních skupinách, délce raménka, případně dalších funkčních skupinách na raménku činidla. Zlatým standardem v XL-MS je použití tzv. homobifunkčních činidel (činidla, jež mají obě reaktivní skupiny stejné), která reagují specificky s primárními aminy (N- konec a ϵ -amino skupinou lysinu) [39]. Jsou používána i fotoreaktivní síťovací činidla, která poskytují radikálové intermediáty, a tudíž jsou velmi reaktivní a v porovnání s ostatními činidly nespecifická [29]. Síťovací činidla jsou v běžném experimentu použita pro zesítěnání jednoho nativního proteinu či proteinového komplexu, který je následně analyzován standardním „Bottom-up“ přístupem [38]. Výsledky MS/MS experimentu jsou pomocí příslušných softwarových nástrojů analyzovány a získané vzdálenosti použity pro strukturní charakterizaci studovaných systémů.

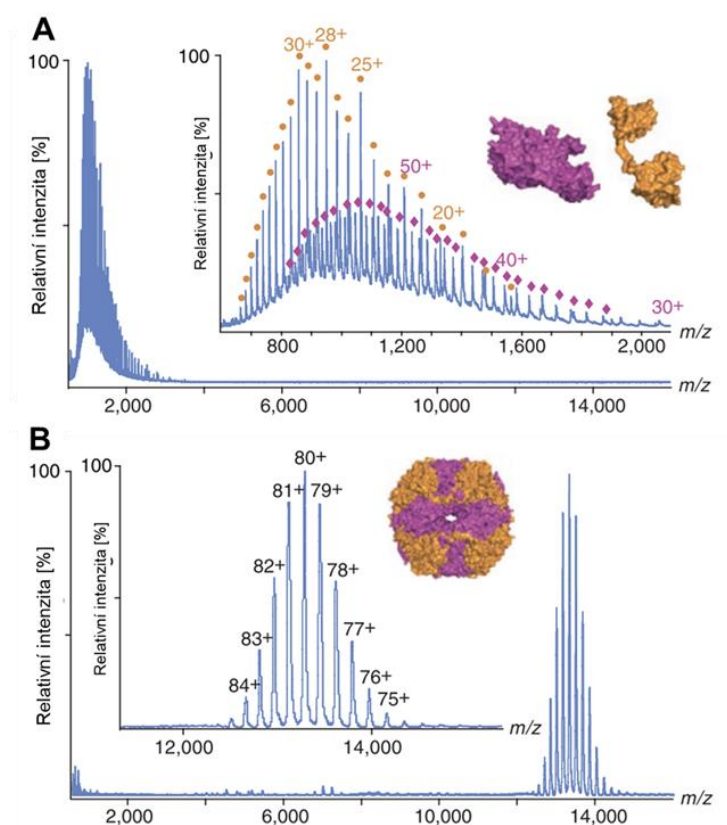
Ačkoli není technika XL-MS novinkou, stále se rozvíjí, a proto nachází ve strukturní biologii celou řadu uplatnění [40]. Byla představena nová síťovací činidla, která mají na raménku funkční skupiny, jež mohou být zachyceny pomocí afinitní chromatografie. To umožňuje XL-MS analýzu proteinových interakcí v komplexních směsích, jejímž cílem je aplikace na živé buňky, která by byla bez prekoncentrace zesíťovaných proteinů jen stěží proveditelná. Pro snazší identifikaci a MS analýzu zesíťovaných peptidů byla též představena izotopově značená či štěpitelná síťovací činidla (chemicky či pomocí disociační techniky v hmotnostním spektrometru). Díky pokrokům v chemickém síťení je možné studovat komplexní biologické systémy, jako např. celé virové částice [41] nebo kvantifikovat zesíťené proteiny při charakterizaci bakteriálního proteasomu [42].



Obrázek 5 Schematické porovnání využití cíleného chemického značení (A) a chemického síťení (B) pro identifikaci interakčního rozhraní binárního proteinového komplexu. Hvězdičky v A symbolizují kovalentní značku. Z rozdílu mezi označenými peptidy v případě samotného proteinu a proteinového komplexu bylo identifikováno interakční rozhraní (oranžový a modrý rámeček v případě modrého, respektive oranžového proteinu). Síťovací činidlo je v B značeno černou čarou, interakční rozhraní je určeno pomocí intermolekulárních peptidů (v černém rámečku). Kromě intermolekulárních zesíťení jsou přítomná i intramolekulární a nezesíťované peptidy. Vytvořeno pomocí Biorender.com, dle [34].

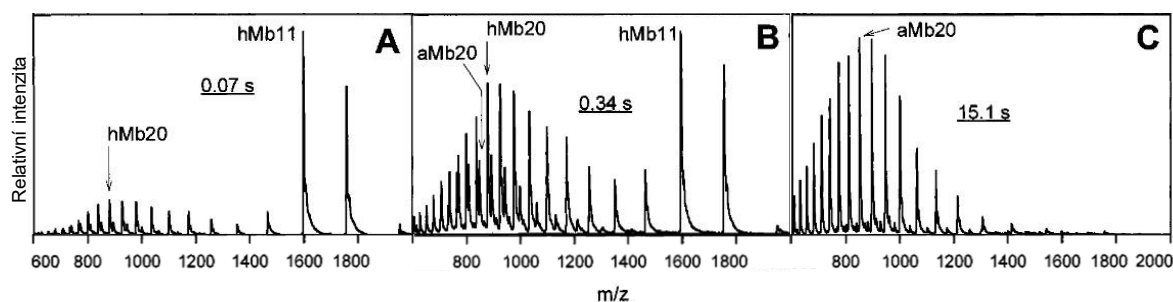
1.2.2.2 Nativní hmotnostní spektrometrie

Nativní hmotnostní spektrometrie je technika založená na ionizaci elektrosprejem (viz kap. 1.2.1.1 na str. 15) či běžněji nESI [43]. Zlepšení přípravy vzorků a pokroky v MS instrumentaci umožnily analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie i nekovalentní interakce biomolekul, např. komplexy mezi proteiny či protein-ligandové komplexy. Hlavním rozdílem mezi konvenční a nativní hmotnostní spektrometrií je využití nedenedurujících rozpouštědel, což vede k zachování kvarterní struktury i v plynné fázi (viz obr. 6). Právě díky tomu, že v průběhu experimentu nedochází k porušení intaktní struktury biomolekul, se technika nazývá nativní hmotnostní spektrometrií. Přesto zde není pojem nativní použit ve svém původním významu, tedy pro biomolekuly nacházející se ve svém přirozeném prostředí, v buňce.



Obrázek 6 Rozdíl mezi denaturujícím (A) a nativním (B) hmotnostním spektrem ureasy *Helicobacter Pyroli*. Pro získání MS spektra A byl ke sprejování využit 50% roztok acetonitrilu s 1% kyselinou octovou, tyto podmínky vedly ke ztrátě kvarterní struktury, jelikož byly detekovány samostatné α (oranžová) a β (fialová) podjednotky. V případě B byl vzorek ionizován z 200 mM (mmol/l) vodného roztoku octanu amonného, díky čemuž byla zachována kvarterní struktura protein-proteinového komplexu $\alpha_{12}\beta_{12}$. Převzato z [27] a upraveno.

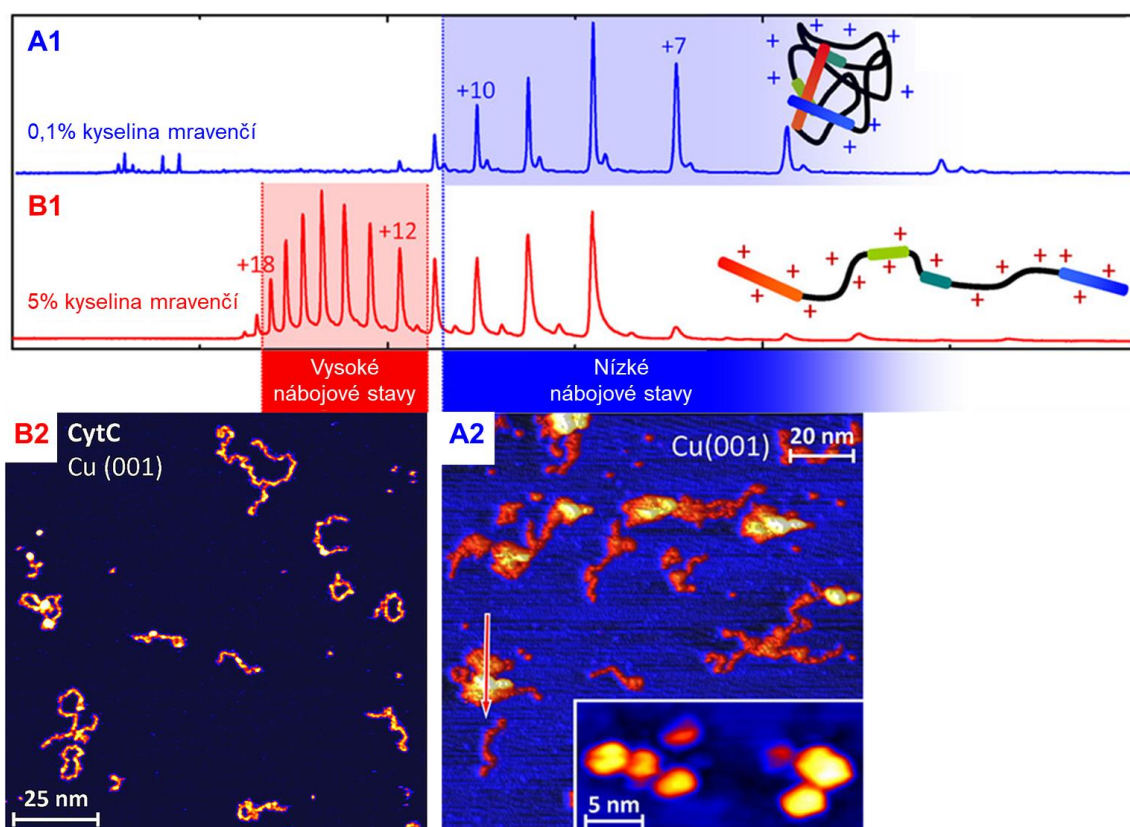
Ačkoliv byly na přelomu 20. a 21. století pomocí nativní hmotnostní spektrometrie popsány nekovalentní interakce mezi biomolekulami, panovaly nejen v komunitě zabývající se MS debaty, zda je opravdu možné zachovat kvarterní strukturu biomolekul i v plynné fázi [43]. Prvním důkazem strukturální odlišnosti biomolekul, jež jsou ionizovány elektrosprejem z nenedenaturujících rozpouštědel, byla odlišná distribuce nábojových stavů pozorovaná u stejného analytu ionizovaného za denaturujících a nenedenaturujících podmínek [44]. Při nativní ESI jsou zpravidla získávány nižší nábojové stavy proteinů (tudíž vyšší m/z). V důsledku interakce s rozpouštědlem mohou být ionizována pouze přístupná rezidua na povrchu proteinu. Zisk nízkých nábojových stavů proto odpovídá globulárnímu uspořádání proteinů, které má nejmenší povrch. Zatímco u denaturující ESI dochází k rozbalení proteinu, díky čemuž je více reziduí vystaveno rozpouštědлу a tudíž ionizováno (viz obr. 6 na str. 24). Díky odlišné distribuci nábojových stavů rozbaleného a sbaleného proteinu bylo hmotnostní spektrometrií popsáno rozbalování myoglobinu (Mb) vlivem změn pH (obr. 7) [45].



Obrázek 7 Hmotnostní spektra zachycující rozbalování myoglobinu při změně pH z 6,5 na 3,2. Obrázky A–C zachycují 3 časové intervaly (0,07; 0,34 a 15,1 s), od doby smísení holomyoglobinu (hMb) ve vodném roztoku (pH 6,5) se 45% kyselinou octovou, tak aby bylo dosaženo pH 3,2. Zkratky aMb značí apomyoglobin.

Přímý důkaz toho, že je při nativní MS zachována struktura proteinů, byl získán skenovací tunelovací mikroskopií (STM) [46]. Molekuly cytochromu C (obr. 8 na str. 26) byly ionizovány elektrosprejem, po průchodu ToF hmotnostním spektrometrem deponovány na kolektor a analyzovány STM. V závislosti na použitém sprejovacím pufru byly pozorovány nejen odlišné distribuce nábojů, ale také rozdílné konformace proteinu (obr. 8 na str. 26). V případě použití 0,1% vodného roztoku kyseliny mravenčí byly zaznamenány sbalené globule cytochromu. Naopak u 5% kyseliny mravenčí ve vodném roztoku methanolu, byly pozorovány extendované rozbalené formy analyzovaného proteinu.

Zachování nativní struktury v plynné fázi i u velkých a flexibilních proteinů potvrzuje podobný experiment provedený na monoklonálních protilátkách [47]. Dalším z důkazů, že je při ESI možné zachovat strukturu komplexů biomolekul, byl experiment na vírech žluté skvrnitosti rýže a tabákové mozaiky [48]. Virové částice byly ionizovány elektrosprejem a po průchodu hmotnostním spektrometrem sbírány na kolektor. Následně byly tyto viry inokulovány do rostlin a bylo prokázáno, že jsou schopny působit infekci. Je tedy patrné, že byly i po ionizaci elektrosprejem zachovány nekovalentní interakce a kvarterní struktura biomolekul, která je nezbytná pro správnou funkci viru.



Obrázek 8 Topografie ze skenovací tunelovací mikroskopie (STM) pro cytochrom C ionizovaný elektrosprejem a deponovaný na kolektoru po průchodu hmotnostním spektrometrem. **A1** – hmotnostní spektrum cytochromu C ionizovaného z 0,1% kyseliny mravenčí a (**A2**) STM topografie izolovaných nižších nábojových stavů (10+ a nižší) téhož vzorku. **B1** – hmotnostní spektrum cytochromu C ionizovaného z 5% kyseliny mravenčí v roztoku voda methanol a (**B2**) STM topografie izolovaných vyšších nábojových stavů (12+ až 18+) téhož vzorku. Převzato z [46] a upraveno.

Přestože poskytuje nativní hmotnostní spektrometrie strukturní informaci, může být její aplikace na heterogenní komplexy limitovaná [49]. Znalost intaktní molekulové hmotnosti je často nedostatečná pro charakterizaci heterogenních komplexů. Proto nachází disociační techniky (popsané v kap. 1.2.1 na str. 15) své uplatnění i v nativní hmotnostní spektrometrii. Využijeme-li tandemovou hmotnostní spektrometrii pro studium nativních biomolekul, můžeme např. disociovat jednotlivé podjednotky komplexu a lokalizovat vazbu ligandu. Své využití nachází nativní hmotnostní spektrometrie ve spojení fragmentačními technikami i ve studiu posttranslačních modifikací [50].

Jeden z hlavních rozdílů mezi konvenční ESI-MS a nativní MS je v přípravě vzorků [27]. V případě konvenční ESI-MS jsou pro optimální sprejování používány 50% roztoky organických rozpouštědel (např. methanol či acetonitril), které jsou pro snazší protonaci vzorku okyseleny. Pro zachování intaktní kvarterní struktury je ale třeba využít nenedaturující rozpouštědla s úzce definovanou iontovou silou a pH [51]. Avšak zdaleka ne všechny pufrы splňující tyto podmínky, jsou kompatibilní s MS analýzou. Kvůli potlačení signálu (jak je uvedeno v kap. 1.2.1.1 na str. 17) je problematický zejména obsah solí, detergentů (SDS apod.) a dalších interferujících látek, které jsou obsaženy v běžně užívaných pufrách (např. HEPES). Proto jsou standardně pro nativní MS používány 5mM až 1M vodné roztoky octanu amonného [27] s pH 6–8 obsahující 1–20 μ M vzorek [51]. Vzhledem k $pK_a(\text{NH}_4^+) = 9,25$ a $pK_a(\text{COOH}) = 4,75$ není octan amonný v neutrální oblasti dobrým pufrém. Z toho důvodu mohou být používány roztoky na bázi uhličitanu amonného, který kolem neutrálního pH pufruje lépe [52]. Přesto bylo zaznamenáno, že tento pufr způsobuje rozbalování biomolekul. Pravděpodobně se tak děje kvůli unikání molekul oxidu uhličitého při ionizaci vzorku, k čemuž v případě octanu amonného nedochází. Dalším volatilním roztokem, použitelným pro MS, je mravenčan amonný. Ten je ale kvůli nízké pK_a kyseliny mravenčí při neutrálním pH ještě horším pufrém než zmíněný octan. Proto jsou i přes své nevýhody vodné roztoky octanu amonného nejběžnějšími solventy používanými pro nativní MS. Proto musí být před analýzou vzorek do octanu amonného převeden [51]. Pro výměnu pufrů se obvykle používají miniaturizovaná gelová filtrace či mikrodialýza. Již bylo zmíněno, že je pro nativní MS používána spíše ionizace nanoelektrosprejem než běžná ESI. V porovnání ESI a nESI je nižší citlivost ionizace nanoelektrosprejem vůči solím jedním z důvodů jejího použití [24].

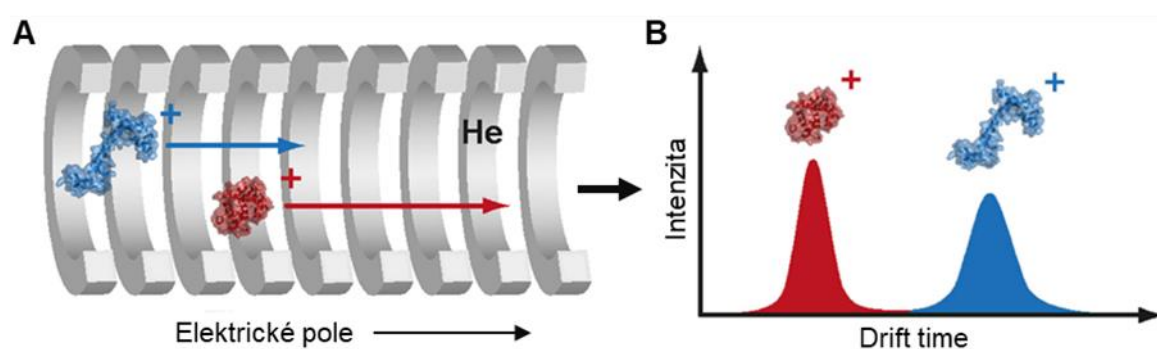
Analýza vzorků nativní hmotnostní spektrometrií přináší řadu výhod [27]. V porovnání s jinými strukturně-biologickými technikami je při použití velmi malého množství vzorku (pro analýzu stačí řádově pikomoly) možné zjistit informace o topologii a stechiometrii uspořádání biomolekul v komplexu. Díky využití MS jsou výhodami též rychlost, selektivita a schopnost analyzovat více komponent obsažených v jednom vzorku. Navíc při spojení iontové mobility s nativní hmotnostní spektrometrií získáváme v jednom IM-MS experimentu i strukturní informaci.

1.2.2.3 *Iontová mobilita ve spojení s hmotnostní spektrometrií*

Iontová mobilitní spektrometrie (IMS) je analytickou technikou, která nachází uplatnění jak samostatně, např. pro detekci výbušnin či drog na letištích, tak i ve spojení s hmotnostní spektrometrií (IM-MS [53], někdy také značeno jako IMS-MS [54] či IMMS [55]), kde je používána pro strukturní analýzu komplexních vzorků např. v proteomice a metabolomice [55]. Z pohledu integrativní strukturní biologie nabízí IM-MS informace o struktuře a konformaci jednotlivých proteinů, ale také o podjednotkovém složení a topologii komplexů biomolekul (viz obr. 2 na str. 13). Jedná se tak o komplementární techniku ke gelové permeační chromatografii či nativní gelové elektroforóze, které na rozdíl od IMS pracují se vzorky v kapalně fázi.

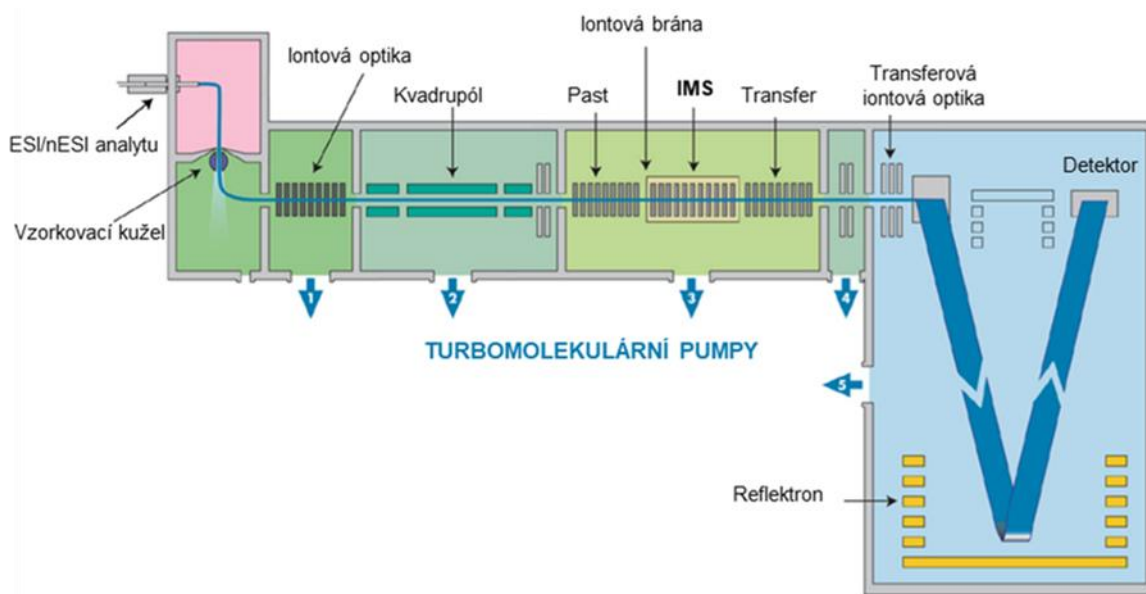
Propojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií je výhodné, neboť jsou tyto dvě instrumentace vzájemně kompatibilní [56]. V obou případech jsou analyzovány ionty v plynné fázi, kdy je pro ionizaci vzorku nejběžněji užívána ionizace elektrosprejem či nanoelektrosprejem. Z toho důvodu lze zónu iontové mobility snadno zařadit do hmotnostního spektrometru (viz obr. 10 na str. 30) a získat tak nejen informaci o m/z analyzovaných molekul, ale i o poměru jejich kolizního průřezu (CCS) ku náboji. Ten je v případě nejjednodušší instrumentace: iontové mobility v driftové trubici (DTIMS) získán přepočtem z „drift time“ [57]. „Drift time“ je doba, za jak dlouho projde analyzovaný ion trubici naplněnou inertním plynem. Mají-li dva ionty stejnou hmotnost i náboj (m/z), ale jinou velikost dojde u většího iontu k vyššímu počtu srážek s plynem, což vede k jeho zpomalení, a tudíž delšímu „drift time“ (viz obr. 9 na str. 29). Naopak menší iont proletí trubici kvůli menšímu počtu srážek rychleji. Z naměřeného „drift time“ lze vypočítat CCS Mason–Schampovou rovnicí. Nevýhodou DTIMS je velikost této instrumentace, neboť

schopnost rozlišit molekuly závisí na délce driftové trubice. Proto byly vyvinuty jiné IMS instrumentace, které tuto nevýhodu překonávají, jako např. iontová mobilita s putující vlnou (TWIMS). V případě TWIMS stejně jako u DTIMS putují ionty trubicí naplněnou inertním plynem [55]. Rozdíl je v elektrickém poli, ve kterém se ionty pohybují. U DTIMS je pomocí série elektrod vytvořeno homogenní kontinuální elektrické pole. Zatímco u TWIMS, jak název napovídá, tvoří elektrody nehomogenní pole, které způsobuje zpoždování větších iontů, oproti těm menším. Výhodou TWIMS je tudíž lepší separace iontů při stejné délce trubice. Nevýhodou pak, že kvůli nehomogennímu elektrickému poli není možné při použití TWIMS vypočítat kolizní průřez přímo z „drift time“ Mason–Schampovou rovnicí, ale je nutné provést kalibraci [58].



Obrázek 9 Schéma iontové mobility v driftové trubicí. Na obr. A je znázorněna DTIMS, sbaleného (červeného) a rozbaleného (modrého) proteinu, přičemž rozbalený protein má větší kolizní průřez než sbalený. V důsledku většího počtu srážek s inertním plynem (helium) putuje modrý rozbalený protein v gradientu elektrického pole pomaleji než červený. Což je patrné na obrázku B, kde jsou zaznamenány a vyneseny „drift time“ pro oba proteiny. Převzato z [53] a upraveno.

Nejběžněji jsou pro spojení s iontovou mobilitou používány hmotnostní spektrometry s analyzátořem doby letu (ToF-MS) (viz obr. 10 na str. 30) [55] Toto spojení je výhodné, neboť ToF analyzátoř pracují na sub-mikrosekundové škále, zatímco běžný IMS experiment trvá cca milisekundu. Pro každé IM spektrum tak získáme až tisíc MS skenů, které zobrazují hodnoty m/z pro ionty se stejnými „drift time“. Díky tomu můžeme vytvořit 2D mapu, kde jsou jednotlivým m/z přiřazeny odpovídající iontové mobility a získat tak strukturní informaci o jednotlivých komponentech obsažených ve vzorku [55], [59].



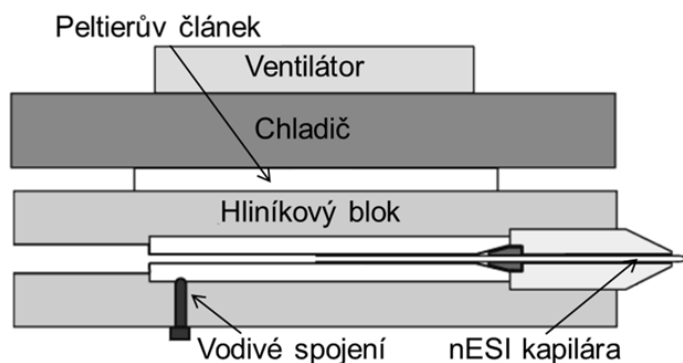
Obrázek 10 Schéma ToF hmotnostního spektrometru s iontovou mobilitou (Waters Synapt G2). Ze schématu je patrné, že jsou nejprve ionty ionizovány elektrosprejem či nanoelektrosprejem, následně putují skrz iontovou optiku do kvadrupólového hmotnostního filtru a následně zónou iontové mobility, až do analyzátoru doby letu. Převzato z [60] a upraveno.

1.2.2.4 Technika zahřívání sprejovaného roztoku

Nativní struktura biomolekul může být ovlivněna mnoha faktory, jakými jsou: změny pH, přítomnost chaotropních činidel nebo teplotní změny [61]. Iontovou mobilitou ve spojení s hmotnostní spektrometrií lze zachytit jak změny ve složení vzorku, tak konformační změny [62]. Je tudíž vhodnou technikou pro sledování vlivu perturbace některým z uvedených faktorů na nativní strukturu proteinů. Strukturní charakterizace nenativních či částečně rozbalených forem proteinů může napomoci pochopení onemocnění způsobených špatným sbalováním proteinů, jako jsou Parkinsonova a Alzheimerova choroba [61]. Proto jsou techniky poskytující informaci o struktuře a složení biomolekul při jejich perturbaci důležité.

Technika zahřívání sprejovaného roztoku je v odborné literatuře označovaná různými názvy, jako: „Variable-Temperature ESI“ (vT-ESI) [62], [63] „Variable-Temperature Native MS“ [64], „Solution thermal melting coupled with ESI mass spectrometry“ (STHEM-ESI) [65] nebo „Temperature-Controlled Electrospray Ionization“ (TC-ESI) [66]. I přes odlišnou terminologii používanou různými skupinami se principiálně jedná o stejnou techniku založenou na nativní hmotnostní spektrometrii. Ve všech případech je vzorek v ESI,

či běžněji nESI emitoru, zahříván na požadovanou teplotu (15–100 °C) a následně analyzován hmotnostní spektrometrií. Jelikož není aparatura pro zahřívání sprejovaného roztoku komerčně dostupná, existuje stejně jako několik názvů i několik experimentálních uspořádání. Ta byla vyvinuta v jednotlivých výzkumných skupinách využívající techniku vT-ESI. Obecně je ESI či nESI emitor (viz obr. 11) umístěn do tepelně vodivého těla, nejběžněji kovového, které je pomocí Peltierova článku [62], [63] či pomocí spínacího odporového drátu [65] zahříváno na požadovanou teplotu kontrolovanou termočlánkem.



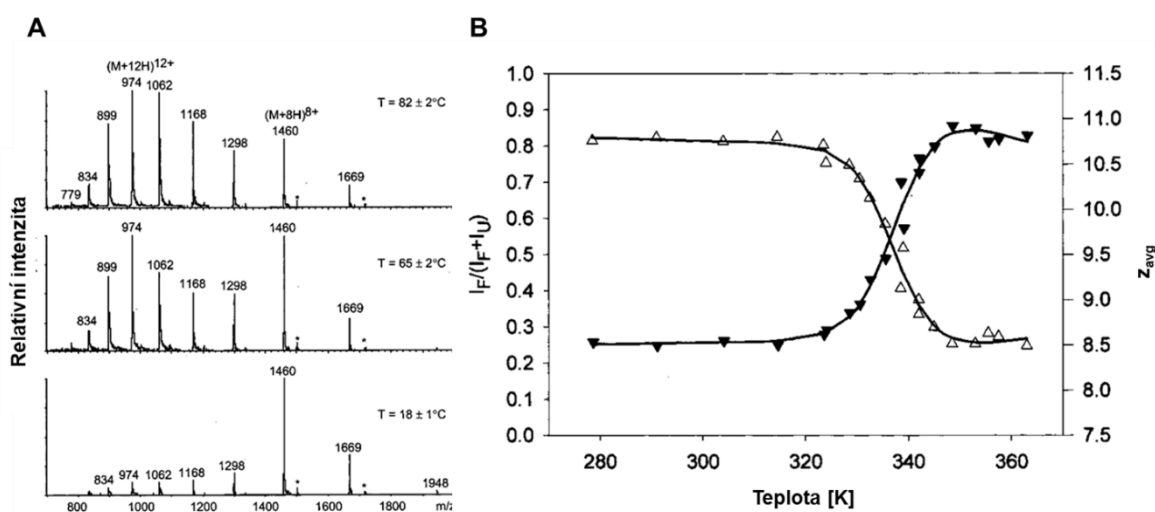
Obrázek 11 Schéma aparatury pro zahřívání sprejovaného roztoku, která využívá Peltierův článek. Převzato z [67] a upraveno.

Jeden z prvních experimentů, při kterém byl zahříván vzorek ionizovaný elektrosprejem, byl publikován v roce 1999 na proteinu thioredoxinu [68]. Autoři ohřívali analyzovaný roztok pomocí nástřikové kapiláry umístěné v temperované vodní lázni. Pozorovali, že se zvyšující se teplotou dochází ke změně v distribuci nábojových stavů proteinu. Při zvýšení teploty se objevila „rozbalená“ populace mající vyšší nábojové stavy, tudíž nižší m/z (obr. 12 A na str. 32). Z toho důvodu popsali průběh experimentu výpočtem průměrného nábojového stavu:

$$z_{avg} = \frac{\sum I_z \cdot z}{\sum I_z}, \quad (1)$$

který vynesli v závislosti na teplotě (obr. 12 B na str. 32). Ukázali tak, že lze pomocí hmotnostní spektrometrie získat podobnou informaci o rozbalování proteinů, jako v případě použití konvenčních biofyzikálních technik, jako např. cirkulárního dichroismu. Později byla aparatura pro zahřívání vylepšena přímým umístěním nESI emitoru do vyhřívaného kovového těla (obr. 11). Funkčnost aparatury a spolehlivost dosažené teploty byla ověřena srovnáním s fluorescenční spektroskopií a dále aplikována na studium disociace komplexu

malého proteinu teplotního šoku (TaHSP16.9) [67]. Dalším krokem v charakterizaci biomolekul pomocí vT-ESI MS bylo její spojení s iontovou mobilitou. To umožnilo studovat nejen změny ve složení zahřívaného vzorku, ale zároveň získat informaci o struktuře a strukturních změnách analyzovaných molekul [69]. Výhodnost vT-ESI IM-MS byla demonstrována na teplotní denaturaci myohemerythrinu, při níž dochází ke dvoukrokovému procesu rozbalení a opětovnému sbalení proteinu v důsledku formace nenativního disulfidu. Takové změny by nebyly jinou biofyzikální metodou, jako např. cirkulárním dichroismem, zachytitelné.



Obrázek 12 Experiment zahřívání sprejovaného roztoku thiorodoxinu. Na obr. A jsou hmotnostní spektra při 18, 65 a 82 °C, zachycující změnu distribuce nábojových stavů proteinu při zahřívání. Na obr. B je vynesena průměrný nábojový stav (z_{avg}) v závislosti na teplotě (černé trojúhelníky ▼). Nábojové stavy 6+ až 9+ byly označeny jako sbalené (F) a ostatní vyšší, jako rozbalené (U). Poměr sbaleného vůči veškerému proteinu ve vzorku byl vynesen v závislosti na teplotě (bílé trojúhelníky △). Proložení sigmoidou byla získána teplota tavení $T_m = 64$ °C. Převzato z [68] a upraveno.

Novým přístupem ke studiu rozbalování proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie, je zahřívání sprejovaných kapiček před vstupem do hmotnostního spektrometru (kapičky vzniklé odtržením z Taylorova kužele viz obr. 3 na str. 16) [70], [71]. K perturbaci vzorku je využit infračervený laser s laditelným výkonem. Výhodou tohoto přístupu je zejména rychlost ohřívání, která se pohybuje na mikrosekundové škále. Oproti vT-ESI, kde zahřívání probíhá řádově minuty, tak umožňuje zachytit přechodné, částečně rozbalené, struktury, které by byly jinými technikami nezachytitelné a studovat tudíž dynamiku rozbalování proteinů.

Jak již bylo nastíněno výše, vT-ESI ve spojení s hmotnostní spektrometrií je komplementární technikou k biofyzikálním technikám jako např. cirkulárnímu dichroismu (CD) či diferenční skenovací fluorimetrii (DSF). Oproti zmíněným biofyzikálním technikám nabízí hmotnostně spektrometrický přístup výhodu při analýze komplexnějších vzorků, jelikož umožňuje studovat jednotlivé komponenty vzorku odděleně [66]. Při spojení s iontovou mobilitou poskytuje vT-ESI strukturní informaci o analyzovaných molekulách, která by byla jinými technikami obtížně dostupná [69]. Právě díky zmíněným výhodám našla technika zahřívání sprejovaného roztoku své uplatnění zejména při analýze proteinů a proteinových komplexů [72]. Bylo též popsáno použití této techniky na nukleové kyseliny, pro charakterizaci G-kvadruplexů [66].

2. CÍLE PRÁCE

1. Rekombinantní exprese a purifikace DNA-vazebné domény transkripčního faktoru TEAD1 (TEAD1-DBD)
2. Studium DNA-vazebných domén transkripčních faktorů TEAD1 a FOXO4 a jejich protein-DNA komplexů pomocí iontové mobility ve spojení s hmotnostní spektrometrií s využitím aktivace zahříváním sprejovaného roztoku (vT-nESI).

3. MATERIÁL

3.1 Chemikálie

Agar, Oxoid technický	Thermo Fisher Scientific, USA
Akrylamid, pro elektroforézu $\geq 99,5$	Merck KGaA, Německo
Azid sodný, P. A. (min. 99%)	SERVA, Německo
β -laktoglobulin A, kravské mléko, $\geq 95\%$	Merck KGaA, Německo
Bromfenolová modř, P. A.	SERVA, Německo
Coomassie Brilliant Blue R-250, ultračisté $\geq 65\%$	Avantor, USA
Cytochrom C, koňské srdce, $\geq 95\%$	Merck KGaA, Německo
1,2-bis(dimethylamino)ethan (TEMED), P. A.	Bio-Rad, USA
Dithiotreitol (DTT), min. 99.0%, analytická kvalita	SERVA, Německo
Dodecylsírán sodný (SDS), $\geq 98.5\%$ (GC)	Merck KGaA, Německo
Ethanol:	
96% pro UV spektroskopii	Avantor, USA
LC-MS, LiChrosolv	Merck KGaA, Německo
Extrakt z kvasnic (yeast extract), pro biochemii	Thermo Fisher Scientific, USA
Glycerol, $\geq 99.5\%$, ACS kvalita	Avantor, USA
Hydroxid sodný, $\geq 98.0\%$, pelety	Honeywell, USA
Chloramfenikol, splňuje USP specifikaci (United States Pharmacopedia)	Merck KGaA, Německo
Chlorid sodný, kvalita pro molekulární biologii	SERVA, Německo
Imidazol, $\geq 99.5\%$ (GC)	Merck KGaA, Německo
Isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), min. 98.0%	Avantor, USA
Kyselina (4-(2-hydroxyethylamino)-1-piperazin) ethansulfonová (HEPES), $\geq 99.0\%$	Carl Roth, Německo
Kyselina chlorovodíková, P.A. min 35%	Lach-Ner, ČR
Kyselina octová, P.A.	Lach-Ner, ČR
2-merkapt ethanol (BME), $\geq 99.0\%$	Merck KGaA, Německo
Methanol, LC-MS, LiChrosolv	Merck KGaA, Německo

<i>N,N</i> -methylen-bis-akrylamid, 97%	Merck KGaA, Německo
Octan amonný (pro MS a LC-MS, LiChropur)	Merck KGaA, Německo
Peroxodisíran amonný (APS), P. A.	Bio-Rad, USA
SeeBlue Pre-stained Protein Standard	Invitrogen, USA
Síran kanamycinu, ≥ 750 I.U./mg, pro biochemii	Carl Roth, Německo
Thrombin, ≥ 1000 NIH units/mg	Merck KGaA, Německo
Trifluoracetát sodný, 98%	Merck KGaA, Německo
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), $\geq 99.9\%$	Carl Roth, Německo
Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP), P. A.	Merck KGaA, Německo
Tris-Glycin SDS pufr; 10 \times koncentrovaný	Bio-Rad, USA
Tris-HCl, $>99\%$ (titrace)	Merck KGaA, Německo
Trypton, Oxoid technický	Thermo Fisher Scientific, USA
Ubiquitin, kraví erythrocyty, min. 90%	Merck KGaA, Německo
Voda	
deionizovaná	Dostupná v centru Biocev
LC-MS, LiChrosolv	Merck KGaA, Německo

3.1.1 Roztoky a pufrы

Všechny roztoky pro chromatografii byly před použitím filtrovány (45 μ m) a odvzdušněny v ultrazvukové lázni (5 min; 25 °C).

Afinitní chromatografie (IMAC):

- A (ekvilibrační) – 20mM HEPES; 0,5M NaCl; 20mM imidazol; 1mM BME; pH 7,5
- B (eluční) – 20mM HEPES; 0,5M NaCl, 0,5M imidazol; 1mM BME; pH 7,5

Druhá afinitní chromatografie:

- A (ekvilibrační) – 20mM HEPES; 0,25M NaCl; 20mM imidazol; 1mM BME; pH 7,9
- B (eluční) – 20mM HEPES; 0,25 M NaCl; 0,5M imidazol; 1mM BME; pH 7,9

Chromatografie na iontoměniči (IEX):

- A (ekvilibrační) – 20mM HEPES; 75mM NaCl; 1mM BME; pH 7,9
- B (eluční) – 20mM HEPES; 1M NaCl; 1mM BME; pH 7,9

Gelová permeační chromatografie (GPC): 20mM HEPES; 150mM NaCl; 1mM TCEP; pH 7,5

LB agar: LB médium; 1,25% (w/v) agar; sterilizováno

LB médium: 1% (w/v) trypton; 0,5% (w/v) extrakt z kvasnic (yeast extract); 1% (w/v) NaCl; pH 7,4; sterilizováno

SDS-PAGE:

- Akrylamidová směs (30%) – 70% (v/v) H₂O; 29% (w/v) akrylamid; 1% (w/v) *N,N*-metylen-bisakrylamid
- Barvicí roztok – 45% (v/v) methanol; 10% (v/v) kyselina octová; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
- Odbarvovací roztok – 55% (v/v) H₂O; 35% (v/v) ethanol; 10% (v/v) kyselina octová
- Vzorkový pufr (redukující), 5× koncentrovaný – 250mM Tris-HCl (pH 6,8); 10% (w/v) SDS; 30% (v/v) glycerol; 100 mM DTT; 0,05% (w/v) bromfenolová modř

Nativní hmotnostní spektrometrie: 150 mM octan amonný; pH 6,8; LC-MS kvalita chemikálií

3.1.2 Vektory a oligonukleotidy

pET-28a(+)-TEAD1-DBD		Generey, Čína
<i>C-MYC</i> enhancer	F: 5'-GCAATCCTTAAAGCT-3' R: 5'-AGCTTTAAGGATTGC-3'	IDT, USA
<i>C-MYC</i> exon	F: 5'-GTAGTAATTCCAGCG-3' R: 5'-CGCTGGAATTACTAC-3'	IDT, USA
<i>DAF-16</i>	F: 5'-TTGGGTAAACAAG-3' R: 5'-CTTGTTTACCCAA-3'	IDT, USA

3.1.3 Bakteriální kmeny

E. coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL Agilent, USA
Genotyp: F⁻ *ompT hsdS*(_{1B}⁻_{mB}⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA* hte [*argU proL* Cam^r] [*argU ileY leuW strep/Spec*^r]

3.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy AL54-IC	Mettler Toledo, Švýcarsko
Automatické pipety RAININ (rozsah objemů 0,1 µl až 5 ml) s kompatibilními pipetovacími špičkami	Mettler Toledo, Švýcarsko
Centrifuga Avanti J-26 XP, výměnné rotory Úhlový rotor JA-25.50 Úhlový rotor JLA-9.1000	Beckman Coulter, USA
Centrifuga MiniSpin, rotor F-45-12-11 ($r = 6$ cm)	Eppendorf, Německo
Centrifuga 5920 R, výkyvný rotor s-4x1000	Eppendorf, Německo
Centrifuga 5415 R, rotor F-45-24-11	Eppendorf, Německo
Centrifugační kolony pro výměnu pufrů	Bio-Rad, USA
Micro Bio-Spin P-6 limit molekulové hmotnosti (MWCO) 6 kDa	
Centrifugační koncentrátoři Amicon Ultra 15 ml; 3000 MWCO 4 ml; 3000 MWCO 0,5 ml; 3000 MWCO	Merck KGaA, Německo
Centrifugační kyvety 1 l, J-lite, PP 50 ml, se šroubovacím uzávěrem, PP	Beckman Coulter, USA
Centrifugační zkumavky (50 ml; 15 ml)	Corning, USA
Dialyzační trubice SnakeSkin 3.5K MWCO, 16 mm	Thermo Fisher Scientific, USA
Drátek na čištění mikrostříkačky	Hamilton, USA
Držák nESI emiterů	Vyroben v laboratoři technikou 3D tisku
Filtrační membrány Durapore (0,45 µm)	Merck KGaA, Německo
Fotodokumentační box ChemiDoc MP	Bio-Rad, USA
Universal Hood III	
Hmotnostní spektrometr s iontovou mobilitou Synapt G2-Si	Waters Corp, USA
Hlubokomrazicí box MDF-DU500VH-PE	Panasonic, Japonsko
Hmotnostní spektrometr solariX 15T	Bruker, USA
Chladnička s mrazničkou KG49EAI40	Siemens, Německo
Chromatografický systém NGC Quest 10	Bio-Rad, USA

Inkubátor IncuSafe MCO-170AICUV-PE	Panasonic, Japonsko
Kapiláry (křemenné sklo) Q100-70-7.5	Sutter Instrument, USA
Kolona Bio-Scale mini Nuvia IMAC Ni-charged 5 ml 1 ml	Bio-Rad, USA
Kolona ENrich SEC 70 10 x 300 mm	Bio-Rad, USA
Kolona Mono S 5/50 GL	Danaher Corporation, USA
Kyveta VIS spektrofotometrická, 10 mm (PS; 1,5 ml)	Verkon, ČR
Lázeň ultrazvuková Elmasonic S 30 H	Elma Schmidbauer, Německo
Ledovač Powericer XL	Klarstein, Německo
Magnetická míchačka C-MAG HS 10 digital	IKA-Werke, Německo
Membránové filtry na injekční stříkačku (0,2 µm)	Avantor, USA
Mikroskop OSP 439; 40 ×	Kern, Německo
Mikrostříkačka (1000 µl)	Hamilton, USA
Mikrozkumavky (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Corning, USA
Páska lepicí, oboustranná	BOMA, Itálie
Petriho miska, polystyren; 60 mm	Eppendorf, Německo
pH elektroda InLab Expert	Mettler Toledo, Švýcarsko
pH metr Orion Star A111	Thermo Fisher Scientific, USA
Pipeta serologická sterilní plastová, 10 ml a 25 ml	Verkon, ČR
Pipetovací špičky GELoader (0,5–20 µl)	Eppendorf, Německo
Předvážky HF 1200G	AND, USA
Pumpa HPLC 515	Waters Corp, USA
Sběrač frakcí BioFrac	Bio-Rad, USA
Sonikační sonda UP200S (200 W; 24 kHz)	Hielscher Ultrasonics, Německo
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, USA
Spektrofotometr DS-11 FX+	DeNovix, USA
Stříkačka Injekt Solo luer (5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun, Německo
Termostat s třepačkou Thermomixer comfort	Eppendorf, Německo
Trhač kapilár P-2000	Sutter Instrument, USA
Třepačka Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko

vT-nESI aparatura

Vyvinuta v naší laboratoři
Mgr. J. Fialou, Ph.D. a
RNDr. D. Kavanem, Ph.D.

Zdroj napětí PowerPac

Bio-Rad, USA

Zdroj vysokého napětí (externí) Series 230 Bertan

Spellman, USA

3.3 Softwarové nástroje

Editace textu: Microsoft Word 365

Zobrazení a analýza MS a IM-MS dat: Waters MassLynx V4.1; Bruker Compass DataAnalysis 5.0 SR1; UniDec 5.0.2

Tvorba a zpracování obrázků a příloh: GIMP 2.10.28; Inkscape 1.1.1; CorelDRAW X7; BioRender.com; Microsoft PowerPoint 365

Výpočet kolizních průřezů: IMPACT v.0.9.1 [73]; DriftScope v2.8

Vizualizace molekul: The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

Tvorba grafů, teplotních map, výpočty: OriginPro 2015; Microsoft Excel 365

Práce se sekvencí proteinů: GPMAW 8.0

Fotodokumentace a analýza výsledků elektroforézy: Image Lab, Bio-Rad, USA

Ovládání vT-nESI aparatury: Arduino IDE 1.8.19

4. METODY

4.1 Rekombinantní exprese a purifikace TEAD1-DBD

Rekombinantní exprese a purifikace DNA-vazebné domény proteinu TEAD1, již byla optimalizována v diplomové práci Bc. R. Liškové [74] a provedena v bakalářské práci [75]. V rámci této práce byly zavedeny změny v purifikačním protokolu, při afinitní chromatografii byla využita kolona Bio-Rad Bio-Scale mini Nuvia s imobilizovanými nikelnatými ionty a eluce byla provedena gradientem imidazolu (20–500 mM) (kap. 4.1.2.1 na str. 43). Byla též zařazena chromatografie na iontoměničích (kap. 4.1.2.2 na str. 43). Sekvence purifikovaného proteinu je uvedena v příloze 1.

4.1.1 Rekombinantní exprese TEAD1-DBD

Rekombinantní exprese DNA-vazebné domény proteinu TEAD1 byla provedena v *E. Coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, jež byly transformovány plasmidem pET-28(+)-TEAD1-DBD. Nejprve bylo 200 μ l bakteriální suspenze přeneseno z hlubokomrazicího boxu (-80 °C) na led, kde bylo rozmrazeno. Ke 100 μ l rozmrazené suspenze bylo přidáno 0,5 μ l vektoru pET-28a(+)-TEAD1-DBD (0,5 μ g/ μ l). Zbylých 100 μ l bakteriální suspenze, ke kterým nebyl přidán plasmid, sloužilo jako negativní kontrola. Po 20 minutách inkubace na ledu byl proveden teplotní šok. Obě zkumavky s bakteriální suspenzí byly inkubovány v termostatickém bloku (42 °C; 45 s) a následně opět přeneseny na led, kde byl k oběma bakteriálním suspenzím přidán 1 ml LB média. Takto připravené kultury byly inkubovány v termostatickém bloku s třepačkou (550 ot/min; 37 °C; 1 h). Následně bylo provedeno odstředění na stolní minicentrifuze (1000 \times g; 5 min). Ze vzniklého supernatantu bylo odebráno 600 μ l, ve zbytku byla resuspendována peleta. Ze vzniklé suspenze bylo pod kahanem odebráno 30 μ l a rozetřeno na Petriho misku s LB agarem a antibiotiky (kanamycin 50 μ g/ml; chloramfenikol 35 μ g/ml), jak pro transformované buňky, tak pro negativní kontrolu. Takto připravené Petriho misky byly přeneseny do inkubátoru (37 °C), kde byly ponechány přibližně 16 h (přes noc).

Po vyjmutí Petriho misek z inkubátoru byl pozorován rozdíl mezi miskou s transformovanými buňkami a netransformovanou kulturou. Miska s transformovanými bakteriemi obsahovala kolonie, zatímco negativní kontrola nikoliv. Dále bylo pracováno pouze s Petriho miskou s transformovanými bakteriemi, kde došlo k růstu kolonií. LB médium s antibiotiky (20 ml; kanamycin 50 µg/ml; chloramfenikol 35 µg/ml) bylo inokulováno kolonií z Petriho misky. Inokulace byla provedena sterilním párátkem pod kahanem. Takto připravená bakteriální kultura byla inkubována v třepačce Multitron Pro (200 ot/min; 37 °C; 16 h).

Po vyjmutí kultury ze třepačky bylo do čtyřech 2l Erlenmayerových baněk se záhyby s 1 l LB média s antibiotiky (kanamycin 50 µg/ml; chloramfenikol 35 µg/ml) inokulováno 5 ml připravené kultury (do každé z baněk). Inokulace byla provedena pod kahanem sterilní plastovou pipetou. Erlenmayerovy baňky s inokulovanou kulturou byly inkubovány v třepačce (200 ot/min; 37 °C) a průběžně byla měřena optická denzita (OD) při 600 nm. Měření byla provedena v polystyrenové kyvetě s optickou dráhou 1 cm na spektrofotometru DS-11 FX+. Když bylo dosaženo OD 0,6 (přibližně po 3 h) byla snížena teplota v třepačce na 18 °C a do každé Erlenmayerovy baňky bylo přidáno IPTG (100 µg; 1 M), tak aby bylo dosaženo 0,2mM koncentrace v médiu. Následně byly všechny Erlenmayerovy baňky inkubovány v třepačce (200 ot/min; 18 °C) zhruba 15 h.

4.1.2 Purifikace TEAD1-DBD

Po ukončení inkubace byly kultury z Erlenmayerových baněk přelity do čtyřech centrifugačních kyvet (1 l) a odstředěny na centrifuze Avanti J-26 XP s rotorem JA-9.1000 (3 000× g; 4 °C; 15 min). Po centrifugaci byly supernatanty slity a dále bylo pracováno pouze s bakteriálními peletami. Každá z pelet byla resuspendována ve 20 ml pufru A pro afinitní chromatografii (20 mM HEPES; 0,5 M NaCl; 20 mM imidazol, 1mM BME; pH 7,5). Vzniklé suspenze byly rozděleny do čtyř 50ml centrifugačních zkumavek, v nichž proběhla dezintegrace sonikací. Každá ze zkumavek byla dezintegrována 3×5 min pomocí sondy Ultrasonic Homogeniser UP200S (cyklus 0,75; amplituda 75 %). Po celou dobu sonikace byly všechny zkumavky umístěny na ledu. Po dezintegraci byly obsahy jednotlivých zkumavek převedeny do 50ml centrifugačních kyvet a odstředěny na centrifuze Avanti J-26 XP s rotorem JLA-25.50 (40 000× g; 4 °C; 20 min).

4.1.2.1 *Afinitní chromatografie*

Pro afinitní chromatografii byla použita 5ml kolona Bio-Scale mini Nuvia IMAC s imobilizovanými nikelnatými ionty, se kterými interagovala histidinová kotva (6 histidinových reziduí) zařazená na N-konci sekvence exprimované DNA-vazebné domény. Histidinová kotva a vlastní sekvenci TEAD1-DBD byla oddělena štěpným místem pro thrombin (viz příloha 1).

Nejprve byla kolona s imobilizovanými nikelnatými ionty připojena k externí HPLC pumpě Waters 515 a promyta 50 ml (průtok 1,5 ml/min) pufru A pro afinitní chromatografii (20mM HEPES; 0,5M NaCl; 20mM imidazol; 1mM BME; pH 7,5). Následně byl na kolonu nanesen supernatant vzniklý centrifugací (kap. 4.2.1 na str. 42) (průtok 1 ml/min) a po nanesení byla kolona promyta 100 ml pufru A (průtok 1,5 ml/min), po celou dobu byly nezachycené frakce jímány do 50ml centrifugačních zkumavek. Po promytí byla kolona připojena ke chromatografickému systému NGC Quest 10 s automatickým sběračem frakcí BioFrac. Eluce proteinu byla provedena lineárním gradientem pufru B (20mM HEPES; 0,5M NaCl; 0,5mM imidazol; 1mM BME; pH 7,5), při průtoku 1,5 ml/min, délce gradientu 100 ml (0–100% B) a velikosti frakce 2,5 ml. Jednotlivé frakce byly sbírány automatickým sběračem BioFrac. Průběh chromatografie byl zaznamenán pomocí měření absorbance při 280 nm a konduktivity. Po skončení gradientu byla kolona promyta 20 ml pufru B a eluované frakce byly manuálně jímány.

Z frakcí se zvýšenou absorbcí při 280 nm (15, 19 a 22 viz obr. 14 na str. 54), dále pak sesbírané nezachycené frakce při nanáše a promytí pufrům A, a frakce po promytí B (po skončení gradientu) bylo do mikrozkušavek odebráno 10 μ l, které byly analyzovány diskontinuální elektroforézou v polyakrylamidovém gelu SDS (SDS-PAGE) (kap. 4.1.2.5 na str. 45).

4.1.2.2 *Chromatografie na iontoměniči*

Vybrané frakce, u kterých byla zaznamenána zvýšená absorbance při 280 nm (15–22, viz obr. 14 na str. 54) z afinitní chromatografie o celkovém objemu přibližně 20 ml (1,45 mg/ml TEAD1-DBD s histidinovou kotvou) byly smíseny a pomocí sterilní pipety převedeny do dialyzační trubice (MWCO 3000 Da). Hmotnostní koncentrace proteinu byla stanovena měřením absorbance při 280 nm pro mikroobjem na spektrofotometru DS-11 FX+,

dle molárního absorpčního koeficientu vypočteného online nástrojem ProtParam [76]. Dialyzační trubice se vzorkem byla umístěna do 2 l pufru A pro chromatografii na iontoměniči (20mM HEPES; 75mM NaCl; 1mM BME; pH 7,9) spolu s 20 µl thrombinu (1 U/µl) a za stálého míchání bylo dialyzováno (4 °C; 17 h). Po dialýze byl vzorek odstředěn na centrifuze 5920 R (40 000× g; 4 °C; 15 min) a filtrován přes membránový filtr (0,45 µm), aby byly odstraněny precipitáty.

Kolona pro chromatografii na iontoměniči (silný katex; Mono S) byla připojena k chromatografickému systému NGC Quest a ekvilibrována puftrem A pro chromatografii na iontoměniči (20mM HEPES; 75mM NaCl; 1mM BME; pH 7,9) (1 ml/min; 40 ml). Následně byl na kolonu pomocí 20ml nástřikové smyčky aplikován vzorek po dialýze obsahující purifikovaný protein. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 15 ml pufru A. Eluce byla provedena lineárním gradientem pufru B (20mM HEPES; 1M NaCl; 1mM BME; pH 7,9), při průtoku 1 ml/min a délce gradientu 40 ml (0–100 % B). Jednotlivé frakce o velikosti 1 ml byly sbírány pomocí automatického sběrače frakcí. Průběh chromatografie byl zaznamenán měřením konduktivity a absorbance při 280 nm.

Z vybraných frakcí se zvýšenou absorbancí při 280 nm (3, 4, 6, 7, 9 a 13 viz obr. 15 na str. 55) bylo do mikrozkušavek odebráno 10 µl, které byly analyzovány diskontinuální elektroforézou v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS (kap. 4.1.2.5 na str. 45).

4.1.2.3 *Druhá afinitní chromatografie*

Vybrané frakce se zvýšenou absorbancí při 280 nm (6 a 7 obr. 15 na str. 55) po chromatografii na iontoměniči, které byly analyzovány SDS-PAGE (obr. 16. na str. 56), byly smíseny a dále purifikovány druhou afinitní chromatografií. Pro druhou afinitní chromatografii byla použita 1ml kolona Bio-Scale mini Nuvia IMAC s imobilizovanými nikelnatými ionty. Kolona byla připojena k externí HPLC pumpě Waters 515 a ekvilibrována 10 ml (1 ml/min) pufru A pro druhou afinitní chromatografii (20mM HEPES; 250 mM NaCl; 20mM imidazol; 1mM BME; pH 7,9). Následně byl nanesen vzorek obsahující purifikovaný protein a kolona byla promyta 10 ml pufru A, veškeré eluované frakce obsahující purifikovaný protein bez histidinové kotvy, byly jímány. Následně byla kolona promyta puftrem B (20mM HEPES; 250mM NaCl; 500mM imidazol; 1mM BME; pH 7,9).

4.1.2.4 *Gelová permeační chromatografie*

Jímaná frakce z druhé afinitní chromatografie (12 ml), která byla eluovaná pufrém A, obsahující purifikovaný protein byla zakoncentrována. To bylo provedeno na centrifugačním koncentrátoru Amicon Ultra (15 ml; 3000 MWCO) na centrifuze 5920 R. Koncentrátor byl nejprve promyt 10 ml pufru pro gelovou permeační chromatografii (20mM HEPES; 150mM NaCl; 1mM TCEP; pH 7,5) ($4\ 000\times g$; 4 °C; 30 min). Následně byl nanesen vzorek obsahující protein a bylo centrifugováno po dobu zhruba 2 h, než došlo k redukci objemu na méně než 1 ml. Takto připravený vzorek byl purifikován gelovou permeační chromatografií na koloně ENrich SEC 70 10 x 300 mM. Ta byla připojena k chromatografickému systému NGC Quest a nejprve ekvilibrována (60 ml; průtok 1 ml/min) pufrém pro GPC. Následně byl do 1ml nástřikové smyčky mikrostríkačkou aplikován zakoncentrovaný vzorek obsahující protein (0,9 ml). Nástřik na kolonu probíhal 2 min při průtoku 1 ml/min. Eluce byla provedena při průtoku 1 ml/min, jednotlivé frakce o objemu 1 ml byly jímány automatickým sběračem BioFrac. Z frakcí se zvýšenou absorbancí při 280 nm (1–7 na obr. 17 na str. 57) bylo odebráno 10 μ l pro analýzu SDS-PAGE. Následně byly frakce 1–3 smíseny a pomocí spektrofotometru DS-11 FX+ v módu pro mikroobjem a vlnové délce 280 nm byla stanovena hmotnostní koncentrace proteinu (1,14 mg/ml). Molární absorpční koeficient byl stanoven online nástrojem ProtParam [76]. Protein byl naředěn pufrém pro gelovou permeační chromatografii na hmotnostní koncentraci 1 mg/ml (přibližně 100 μ M) a rozdělen do mikrozkušavek po 100 μ l. Vzorky s purifikovaným proteinem byly následně zmrazeny v kapalném dusíku a uchovávány v hlubokomrazicím boxu (-80 °C).

4.1.2.5 *Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS*

Průběh jednotlivých purifikačních kroků, první afinitní chromatografie, chromatografie na iontoměničích a gelové permeační chromatografie (kap. 4.1.2.1 na str. 42, kap. 4.1.2.2 na str. 43 a kap. 4.1.2.4 na str. 45) byl sledován pomocí SDS-PAGE. Ve všech případech byl použit 15% separační (malopórový) a 5% zaostřovací (velkopórový) polyakrylamidový gel o tloušťce 1,0 mm. Gely byly připraveny ze 30% akrylamidové směsi (70% H₂O; 29% akrylamid; 1% *N,N*-metylen-bisakrylamid).

Pro přípravu jednoho 15% separačního gelu bylo smíseno 1,1 ml H₂O (deionizovaná); 2,5 ml 30% akrylamidové směsi; 1,3 ml 1,5M Tris (pH 8,8) a 50 µl 10% (w/v) SDS. Následně byly přidány 2 µl TEMED a 50 µl 10% (w/v) APS, pro zahájení polymerace. Směs byla důkladně promíchána a nanášena mezi očištěná skla elektroforetické aparatury, tak aby hladina dosahovala zhruba 1,5 cm pod okraj. Následně byl separační gel převrstven deionizovanou vodou a ponechán 30 min tuhnout. Po ztuhnutí, které bylo doprovázeno vytvořením pozorovatelné hranice mezi gelem a vodou, byla všechna voda slita a odsáta pomocí buničiny. Dále byl připraven zaostřovací gel smísením: 680 µl H₂O (deionizovaná); 170 µl 30% akrylamidové směsi; 130 µl 1M Tris (pH 6,8) a 10 µl 10% (w/v) SDS. Následně byl přidán 1 µl TEMED a 10 µl 10% (w/v) APS, pro zahájení polymerace. Směs byla důkladně promíchána a nanášena na ztuhlý separační gel, tak aby byl vyplněn veškerý zbylý prostor mezi skly aparatury. Ihned poté byl do zaostřovacího gelu vložen hřeben s 10 či 14 výstupky pro vytvoření jamek a ponechán 30 min tuhnout. Po ztuhnutí byl hřeben opatrně vyjmut a jamky gelu byly promyty deionizovanou vodou.

Vzorky pro SDS-PAGE byly připraveny smísením 10 µl vzorku odebraného při jednotlivých purifikačních krocích (kap. 4.1.2.1 na str. 42, kap. 4.1.2.2 na str. 43 a kap. 4.1.2.4 na str. 45) s 2,5 µl 5× koncentrovaného vzorkového pufru (250mM Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; 30% glycerol; 100 mM DTT; 0,05% bromfenolová modř). Tato směs byla zahřáta v termostatickém bloku (95 °C; 5 min) a následně ponechána vychladnout při pokojové teplotě. Po zchladnutí byly vzorky odstředěny na stolní minicentrifuze MiniSpin (2000× g; 1 min) a následně bylo 10 µl z každého vzorku nanášeno automatickou pipetou do jamky polyakrylamidového gelu. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit SeeBlue Pre-stained Protein Standard, kterého bylo do jamky nanášeno 5 µl.

Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS byla provedena v Tris-glycin SDS pufru (200 V; 60 min). Po jejím skončení byl gel inkubován 10 min v barvicím roztoku (45% methanol; 10% kyselina octová; 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250) a následně odbarvován 16 h odbarvovacím roztokem (55% H₂O; 35% ethanol; 10% kyselina octová). Po odbarvení byl gel přesunut do 1% (v/v) kyseliny octové a zdokumentován v ChemiDoc MP Universal Hood III. Výsledky byly zobrazeny pomocí programu Image Lab.

4.2 Studium protein-DNA komplexů hmotnostní spektrometrií

V rámci této diplomové práce (DP) byly hmotnostní spektrometrií a iontovou mobilitou ve spojení s hmotnostní spektrometrií studovány DNA-vazebné domény dvou transkripčních faktorů a jejich komplexy s dvouvláknovou DNA (dsDNA). TEAD1 připravený dle (kap. 4.1 na str. 41) a FOXO4 připravený Ing. A. Hnízdou, Ph.D. s Mgr. V. Brinsou, dle [77]. Všechny tři použité dsDNA byly připraveny smísením příslušných jednovláknových DNA (ssDNA), které byly dodány výrobcem IDT.

4.2.1 Příprava vzorku pro analýzu

Před hmotnostně spektrometrickou analýzou musely být vzorky jak proteinů, tak dvouvláknových DNA, převedeny do vhodného pufru. Konkrétně octanu amonného (150 mM; pH 6,8; LC-MS kvalita chemikálií), který je kompatibilní s MS analýzou. Dvouvláknová DNA byla připravena smísením 200 μ M R- a F- jednovláknové DNA (roztok v LC-MS vodě) v molárním poměru 1:1. Směs DNA byla zahřáta (95 °C; 5 min) a následně ponechána při laboratorní teplotě vychladnout (20 min). Vzorek proteinu (1 mg/ml) byl vyjmut z hlubokomrazicího boxu (-80 °C) a rozmrazen při teplotě 37 °C, po rozmrazení byl přenesen na led.

Pro výměnu pufrů, jak u obou DNA-vazebných domén, tak u všech dvouvláknových DNA byly použity centrifugační koncentrátoři Amicon Ultra (0,5 ml; MWCO 3000 Da). Do koncentrátorů bylo před nanesením vzorku přidáno 500 μ l octanu amonného a centrifugováno na Eppendorf 5415 R (14 000 \times g; 4 °C; 30 min), tak aby došlo k promytí membrány. Dále bylo k roztoku přidáno 450 μ l octanu amonného a 50 μ l vzorku proteinu (1 mg/ml) nebo dvouvláknové DNA (100 μ M). Následně bylo centrifugováno (14 000 \times g; 4 °C; 30 min), aby došlo k redukci objemu na méně než 50 μ l. Poté bylo opět přidáno 450 μ l octanu amonného a tento postup byl zopakován ještě dvakrát (tj. celkem tři cykly výměny pufrů). Koncentrátor se vzorkem byl po třetí centrifugaci převrácen do nové mikrozkušavky a centrifugován (1000 \times g; 4 °C; 2 min) pro převedení veškerého obsahu. U takto připravených vzorku byla na spektrofotometru DS-11 FX+ změřena absorbance v módu pro mikroobjem při 280 nm či 260 nm (v případě proteinu, respektive dsDNA). Koncentrace

proteinu byla vypočtena pomocí molárních absorpčních koeficientů získaných online nástrojem ProtParam [76]. Koncentrace dvouvláknové DNA byla stanovena na základě molárních absorpčních koeficientů vypočtených pomocí IDT OligoAnalyzer [78]. Pro MS i IM-MS analýzu byly ředěním octanem amonným připraveny 5 μM vzorky proteinů a DNA. Vzorek protein-DNA komplexu byl připraven smísením 10 μM roztoků příslušného proteinu a DNA v poměru 1:1. Takto připravené vzorky (10 μl) byly bezprostředně před analýzou pomocí pipetovacích špiček GELoader aplikovány do nESI emitorů umístěných v držáku a následně centrifugovány (1450 \times g; 15 s).

4.2.2 Výroba emitorů pro ionizaci nanoelektrosprejem

Emitory pro ionizaci nanoelektrosprejem, jež byly použity pro všechny experimenty uvedené v této diplomové práci, byly vyrobeny z křemenných kapilár Q100-70-7.5 na laserovém trhači kapilár Sutter Instrument P-2000. Trhač kapilár byl nejprve zapnut a ponechán 20 min předežhřát. Následně byl zvolen dvoukrokový program (viz tab. 1), určený pro tvorbu nESI emitorů, který vznikl úpravou programu vytvořeného Mgr. J. Fialou, Ph.D. Do trhače byla vložena křemenná kapilára a byl spuštěn příslušný program. Emitory byly použity pouze v případě, že program proběhl pouze jednou (oba řádky uvedené v tab. 1) a trval pro jednotlivé kapiláry přibližně 2,6–2,8 s. Vytažené emitory (kapilára roztržená na dva díly) byly vyjmuty a vloženy do Petriho misky s oboustrannou lepící páskou. Před aplikací vzorku byl emitor zkontrolován pod mikroskopem Kern OSF 439.

Tabulka 1 Parametry laserového trhače kapilár pro výrobu nESI emitorů. V tabulce jsou zaznamenány parametry programu nastavené na trhači P-2000. Význam jednotlivých parametrů uvedených výrobcem [79] s rozsahem nastavení: HEAT [0–999] – výstupní výkon laseru, energie dodaná kapiláře; FIL (FILAMENT) [0–15] – ovlivňuje osvětlení kapiláry laserem pomocí rotace skenovacího zrcátka; VEL (VELOCITY) [0–255] – rychlost jakou se musí pohybovat uchycení kapiláry, než dojde k vypnutí laseru. Odpovídá viskozitě skla, a tudíž nepřímo jeho teplotě; DEL (DELAY) [0–255] – čas mezi deaktivací laseru (dosažení požadovaného parametru VEL) a vytažením kapiláry pomocí PUL; PUL (PULL) [0–255] – síla, jakou je emitor vytažen.

Řádek	HEAT	FIL	VEL	DEL	PUL
1.	770	4	65	128	50
2.	640	4	65	128	50

4.2.3 Analýza na Bruker solariX FT-ICR

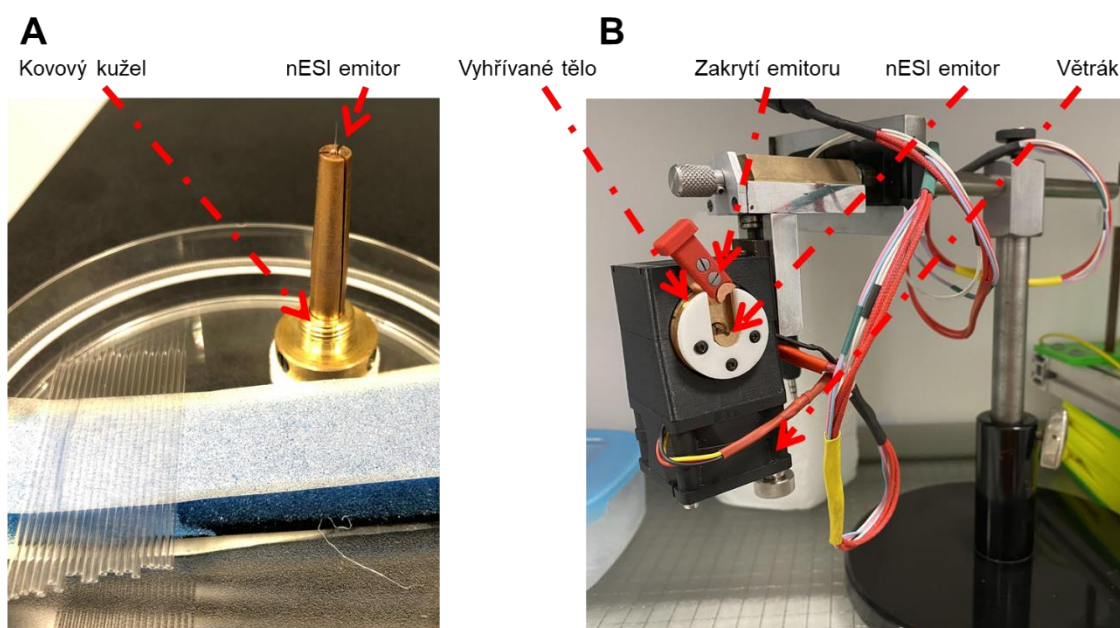
Na hmotnostním spektrometru Bruker solariX 15T FT-ICR byla v pozitivním a negativním módu ionizace provedena vT-nESI MS analýza proteinů, DNA a protein-DNA komplexů. Konkrétně DNA-vazebných domén TEAD1 a FOXO4, dvouvláknových DNA (*C-MYC* exon, *C-MYC* enhancer a *DAF-16*) a protein-DNA komplexů (TEAD1 a *C-MYC* exon/enhancer, FOXO4 a *DAF-16*). Hmotnostní spektrometr byl nejprve kalibrován na trifluoracetát sodný (0,1% (w/v); 50% (v/v) methanol v LC-MS H₂O). Pro kalibraci i vlastní měření byla použita stejná metoda, jejíž parametry jsou uvedeny pro pozitivní a negativní mód ionizace v příloze 2, respektive příloze 3.

4.2.3.1 Zahřívání sprejovaného roztoku

Pro experiment zahřívání sprejovaného roztoku byla využita aparatura na obr. 13 na str. 50, která byla vyvinuta v naší laboratoři zejména RNDr. D. Kavanem, Ph.D. a Mgr. J. Fialou, Ph.D. Mosazné tělo aparatury je vyhříváno spínacím odporovým drátem. Teplota je kontrolována pomocí termistoru umístěného uvnitř vyhřívajícího mosazného bloku. Aparatura je ovládána vývojovou deskou Arduino Nano pomocí Arduino IDE skriptu vytvořeného RNDr. D. Kavanem, Ph.D.

Na vstup do hmotnostního spektrometru byla připevněna redukce pro nESI ionizaci a teplota sušícího plynu byla nastavena na 70 °C. Následně bylo čekáno 40 min, aby došlo k ekvilibraci skleněné kapiláry iontového zdroje hmotnostního spektrometru na požadovanou teplotu. Poté byla před vstup do hmotnostního spektrometru umístěna aparatura pro zahřívání sprejovaného roztoku (obr. 13 na str. 50) s nESI emitorem obsahujícím vzorek, tak aby byl emitör zhruba 5 mm od vstupu do hmotnostního spektrometru. Do emitörü byl zasunut kovový drátek, na který bylo přivedeno vysoké napětí (0,5–1 kV) z externího zdroje Bertan 230 Series. Následně bylo kovové tělo aparatury zahříváno v rozsahu 25–95 °C po 5 °C krocích. Pro vzorek dsDNA a protein-DNA komplexu bylo kolem bodu tavení postupováno po 2,5 °C krocích (viz tab. 2 na str. 50). Aparatura byla při každé teplotě 3 min ekvilibrována, dle publikace [69]. Po dosažení teploty 95 °C (ukončení experimentu) byla nastavena teplota aparatury na 15 °C, čímž došlo k vypnutí ohřevu a zapnutí větráku. Mezi analýzou jednotlivých vzorků bylo vždy vyčkáno

minimálně 30 min, aby došlo ke zchladnutí celé aparatury. Měření bylo pro vzorky dsDNA a protein-DNA komplexů provedeno v triplicátu.



Obrázek 13 vT-nESI aparatura. Na obrázku A je nESI emitor umístěný v mosazném kuželu, který byl umístěn do vyhřívaného těla aparatury B, tak aby byl celý emitor zakryt. V případě nutnosti ochladit aparaturu dochází ke spuštění větráku ve spodní části.

Tabulka 2 Vzorek a teplotní rozsah, kdy byly použity 2,5°C kroky, při vT-nESI experimentu. Pro zbytek teplotního intervalu 25–95 °C byly použity 5°C kroky.

Vzorek	Mód ionizace	Teplotní rozsah (°C)
C-MYC exon/ C-MYC enhancer	Pozitivní Negativní	55–70 55–70
DAF-16	Pozitivní Negativní	40–50 40–55
TEAD1 + C-MYC exon/ TEAD1 + C-MYC enhancer	Pozitivní Negativní	50–70 50–70
FOXO4 + DAF-16	Pozitivní Negativní	40–50 40–55

4.2.4 Analýza na Waters Synapt G2-Si

Na hmotnostním spektrometru Waters Synapt G2-Si byla v pozitivním a negativním módu ionizace provedena vT-nESI IM-MS analýza proteinů, dsDNA a protein-DNA komplexů. Hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu byl v pozitivním i negativním módu ionizace kalibrován na trifluoracetát sodný (0,1% (w/v); 50% (v/v) methanol v LC-MS H₂O). Měření bylo provedeno v hmotnostním rozsahu 500–5000 *m/z* v „sensitivity“ (citlivostním) módu. Ostatní parametry nastavení hmotnostního spektrometru jsou pro oba módy ionizace uvedeny v přílohách 4 a 5. IM-MS experimenty mohly být provedeny, neboť je hmotnostní spektrometr Synapt G2-Si vybaven iontovou mobilitou s putující vlnou, která musela být nejprve kalibrována.

4.2.4.1 Kalibrace iontové mobility

Kalibrace iontové mobility s putující vlnou byla provedena při stejném nastavení hmotnostního spektrometru, jaké bylo použito pro všechny IM-MS experimenty v této diplomové práci. Pro pozitivní mód ionizace byl nastaven průtok IMS N₂ 60 ml/min, rychlost IMS vlny 750 m/s a výška vlny 25,0 V. Pro negativní mód ionizace byl nastaven průtok IMS N₂ 55 ml/min, rychlost IMS vlny 750 m/s a výška vlny 30,0 V. Ostatní parametry nastavení hmotnostního spektrometru Waters Synapt G2-Si jsou pro oba módy ionizace uvedeny v přílohách 4 a 5.

Pro účely kalibrace byly využity nativní proteiny se známými kolizními průřezy v He pro pozitivní [80] i negativní [81] mód ionizace. Proteiny cytochrom C, β-laktoglobulin a ubiquitin byly rozpuštěny ve 150 mM octanu amonném (výsledná koncentrace proteinu 1 mg/ml). Následně byla provedena výměna pufrů na centrifugačních kolonách Micro Bio-Spin P-6, které byly nejprve centrifugovány na Eppendorf 5415 R (1 000× *g*; 4 °C; 2 min), pro odstranění skladovacího pufru. Poté bylo na povrch nosiče nanášeno 500 μl octanu amonného a centrifugováno (1 000× *g*; 4 °C; 1 min), tento postup byl opakován celkem pětkrát. Následně byla kolona přesunuta do nové mikrozkušky, na povrch nosiče nanášeno 50 μl vzorku a centrifugováno (1 000× *g*; 4 °C; 4 min). U takto připravených vzorků byla změřena absorbance při 280 nm na spektrofotometru DS-11 FX+ a pomocí molárních absorpčních koeficientů stanovených online nástrojem ProtParam [76] byla vypočtena koncentrace jednotlivých vzorků. Analyzovány byly 5 μM vzorky proteinů

a měření bylo provedeno v triplicátu. Ze získaných „drift time“ pro jednotlivé nábojové stavy proteinů (monomeru a dimeru v případě β -laktoglobulinu) byla provedena logaritmická kalibrace TWIMS [80], [82].

4.2.4.2 Zahřívání sprejovaného roztoku

Experiment zahřívání sprejovaného roztoku na Waters Synapt G2-Si byl proveden obdobně, jako na hmotnostním spektrometru Bruker solariX FT-ICR (kap. 4.2.3.1 na str. 49). Teplota iontového zdroje byla nastavena teplota na 70 °C a aparatura pro vT-nESI byla umístěna cca 5 mm před vstup do hmotnostního spektrometru. Analýza byla provedena pro oba proteiny, tři dsDNA a tři protein-DNA komplexy, v pozitivním i negativním módu ionizace stejně jako v kap. 4.2.3.1 na str. 49. Všechny experimenty byly provedeny v IM-MS módu. Výsledky byly vizualizovány formou teplotních map. Ty byly vytvořeny v programu OriginPro 2015 z IM spekter vyhlazených v programu MassLynx pomocí Savitzky-Golay algoritmu (velikost okna – počet skenů 3; počet vyhlazení 2). Vyhlazené IMS spektrum bylo následně normalizováno (0–100 %) a použito pro tvorbu teplotní mapy. Kolizní průřezy byly z IMS spekter získány proložení Gaussovou křivkou (pomocí doplňku řešitel pro Excel 365). V případě širší distribuce kolizních průřezů, jako např. u FOXO4-DBD NS 8+ a 9+, byla získaná IMS spektra proložena několika Gaussovými křivkami. Výsledné kolizní průřezy byly stanoveny ze střední hodnoty Gaussovy křivky.

4.2.4.3 Teoretický výpočet kolizních průřezů

Z dostupných strukturních modelů byly vypočteny teoretické kolizní průřezy analyzovaných biomolekul. Výpočet byl proveden softwarovým nástrojem IMPACT [73], který pro výpočty využívá projekční aproximaci (PA). Poloměr částice IMS plynu byl zvolen 1,0 Å², odpovídající atomu He. Na helium byly přepočteny kolizní průřezy analyzovaných molekul při kalibraci iontové mobility (kap. 4.2.4.1 na str. 51). Relativní mez konvergence byla nastavena na 0,001, ostatní parametry nebyly měněny z výchozího nastavení. Takto byly vypočteny kolizní průřezy pro TEAD1-DBD komplex s *C-MYC* exon a enhancer dle modelů z publikace [8]. Pro FOXO4-DBD s *DAF-16* byl využit model (3L2C – PDB kód) [83]. Pro výpočet kolizních průřezů DNA byly využity dsDNA z modelů protein-DNA komplexů. Pro teoretický výpočet kolizních průřezů proteinů byly využity struktury deponované v PDB TEAD1-DBD (2HZD – PDB kód) [84] a FOXO4-DBD (1E17 – PDB kód) [85].

5. VÝSLEDKY

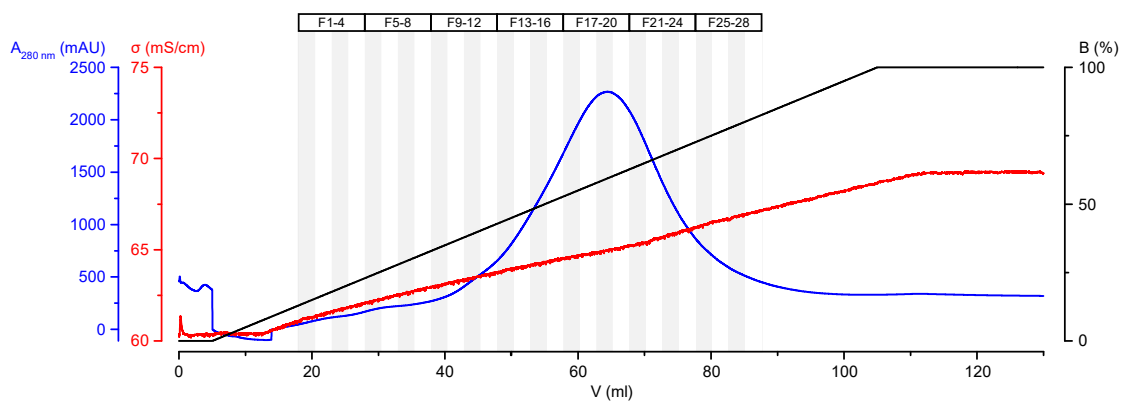
Tato kapitola shrnující výsledky diplomové práce byla rozdělena na dvě části, které odpovídají cílům práce. První část je věnována purifikaci DNA-vazebné domény proteinu TEAD1 (kap. 4.1 na str. 41), druhá pak studiu DNA-vazebných domén proteinů a jejich interakci s dsDNA pomocí nativní hmotnostní spektrometrie (kap. 4.2 na str. 47).

5.1 Purifikace TEAD1-DBD

Pro purifikaci proteinu TEAD1-DBD byly využity čtyři chromatografické kroky, afinitní chromatografie, chromatografie na iontoměničích, druhá afinitní chromatografie a gelová permeační chromatografie. V této kapitole jsou uvedeny chromatografické záznamy a výsledky SDS-PAGE pro všechny chromatografie uvedené v kap. 4.1.2 na str. 42, vyjma druhé IMAC, jež byla provedena na externí HPLC pumpě bez spektrofotometrické a konduktometrické detekce.

5.1.1 Afinitní chromatografie

Purifikace TEAD1-DBD začínala afinitní chromatografií na koloně s imobilizovanými nikelnatými kationty (mini Nuvia IMAC) se kterou interagovala hexahistidinová kotva zařazená na N-konec exprimovaného proteinu (příloha 1). Histidinová kotva byla od vlastní sekvence proteinu oddělena štěpnou sekvencí pro thrombin. Po nanesení bakteriálního lyzátu a promytí kolony byla provedena eluce proteinu gradientem imidazolu (20–500 mM). Výsledný chromatogram z eluce znázorňuje obr. 15 na str. 54, kde nejintenzivnější signál (zvýšená absorbance při 280 nm u frakcí 10–25) odpovídá exprimovanému proteinu. Ze záznamu (modrá křivka) je patrné, že eluce proteinu začala zhruba při 50% podílu pufru B (~260mM imidazol) a probíhala přibližně do 75% podílu pufru B (~380mM imidazol). Z chromatogramu je též patrný nárůst konduktivity (červená křivka), který odpovídá gradientu pufru B a je způsoben obsaženým imidazolem. Důsledkem přítomnosti imidazolu v elučním pufru B je též zvyšování absorbance při 280 nm s elučním objemem frakce. Tato skutečnost je patrná z porovnání $A_{280;20ml} = 77$ mAU a $A_{280;110ml} = 338$ mAU.

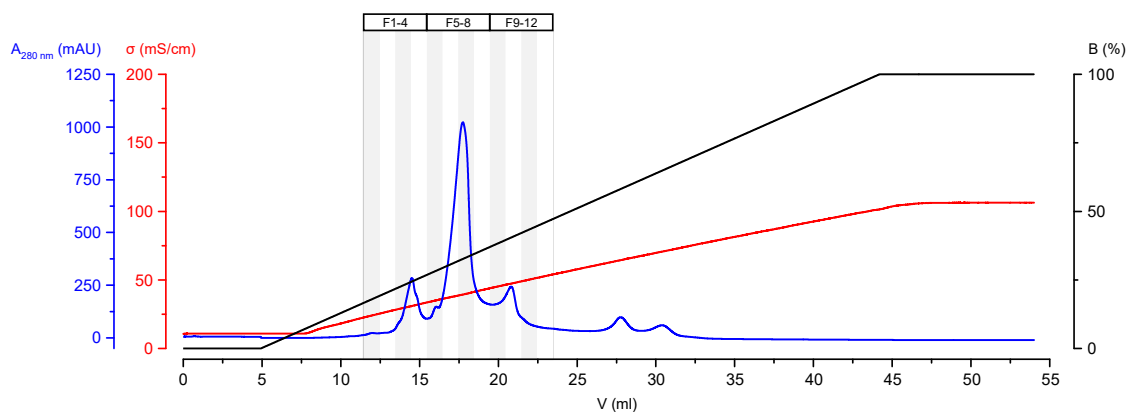


Obrázek 14 Záznam z afinitní chromatografie na koloně mini Nuvia IMAC. Na ose x vynesena eluční objem v ml; na ose y vynesena absorbance při 280 nm v mAU (modrá osa a křivka), konduktivita v mS/cm (červená osa a křivka) a podíl pufru B v % (černá osa a křivka). Byly též vyznačeny frakce 1–28 o objemu 2,5 ml, které byly jímány automatickým sběračem frakcí a vybrané dále analyzovány SDS-PAGE.

5.1.2 Chromatografie na iontoměniči

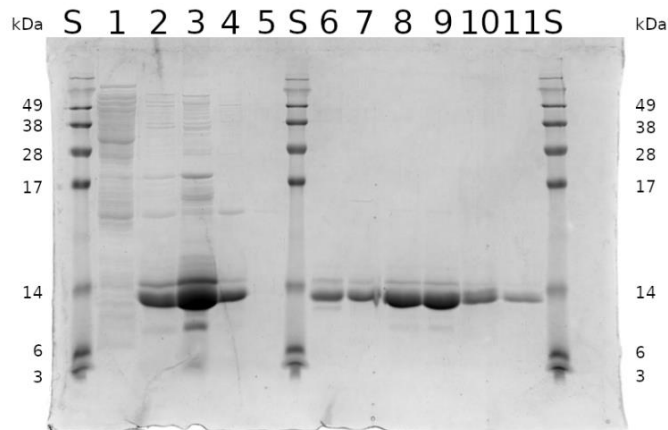
Po afinitní chromatografii následovala chromatografie na iontoměniči. Jelikož byla eluce provedena lineárním gradientem chloridu sodného (75mM–1M), musel být purifikovaný protein nejprve dialyzován do pufru s nižší koncentrací chloridu sodného. Zároveň s dialýzou byla thrombinem štěpena histidinová kotva. Iontoměničová chromatografie byla provedena na koloně Mono S, jejíž stacionární fáze je silným katexem. Proto byla exprimovaná DNA-vazebná doména TEAD1 (po štěpení thrombinem již bez histidinové kotvy) s $pI = 9,84$ [76] v pufru A s nízkou iontovou silou zachycena při pH 7,9 na koloně.

Záznam z eluce při chromatografii na iontoměniči je uveden na obr. 15 na str. 55. Jak je patrné z chromatogramu, spolu s podílem pufru B (černá křivka) rostla kvůli vyššímu obsahu NaCl v pufru B i konduktivita vzorku (červená křivka). Ze záznamu absorbance při 280nm (modrá křivka) je patrných pět píků o elučním objemu přibližně 14; 17,5; 22; 28 a 30 ml, z nichž byly pomocí SDS-PAGE analyzovány první tři, a to frakce 3;4; 6;7; 9 a 10, které byly eluovány přibližně mezi 25–45% podílem pufru B (viz obr. 15 na str. 55).



Obrázek 15 Záznam z chromatografie na iontoměničích, která byla provedena na katexu Mono S. Na ose x vynesena eluční objem v ml; na ose y vynesena absorbance při 280 nm v mAU (modrá osa a křivka), konduktivita v mS/cm (červená osa a křivka) a podíl pufru B v % (černá osa a křivka). Byly též vyznačeny frakce 1–12 o objemu 1 ml, které byly jímány automatickým sběračem frakcí a vybrané dále analyzovány SDS-PAGE.

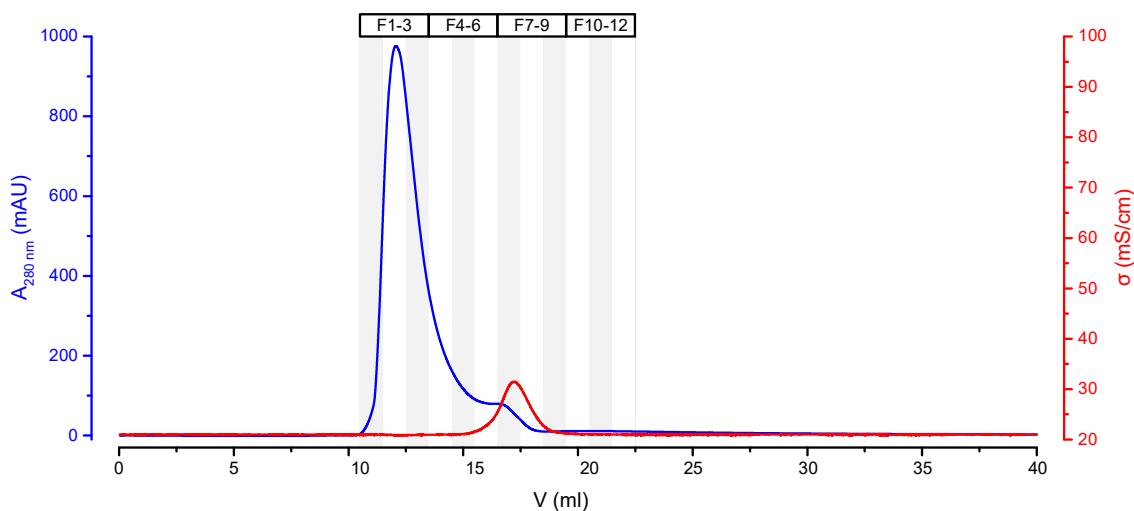
Vybrané frakce z první afinitní chromatografie a chromatografie na iontoměničích byly analyzovány diskontinuální elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (obr. 16 na str. 56). Střední molekulová hmotnost DNA-vazebné domény proteinu TEAD1 s histidinovou kotvou je 11,2 kDa, a 9,9 kDa bez histidinové kotvy (stanoveno programem GPMAW). Vzorky odpovídají zleva nejprve frakcím z afinitní chromatografie a jsou standardem odděleny od frakcí 3, 4, 6, 7, 9 a 10 z chromatografie na iontoměničích. V dráze 1, na kterou byl nanášen vzorek nezachycené frakce z nanášky na kolonu a následném promytí pufrům A, je patrné velké množství pruhů, které odpovídají proteinům bakteriálního lyzátu, bez výrazného pruhu mezi 6 a 14 kDa standardem, pro TEAD1-DBD (s histidinovou kotvou). V porovnání s ostatními dráhami jsou pruhy v dráze 1 méně intenzivní, neboť došlo k zředění nezachycené frakce z nanášky při promývání kolony. Do dráhy 2–4 byly nanášeny vzorky z frakcí 15, 19 a 22 z obr. 14 na str. 54, ve kterých nejintenzivnější pruh nacházejí se mezi 6 a 14 kDa standardem patří TEAD1-DBD s histidinovou kotvou. Ve vzorku jsou též patrné slabší pruhy proteinů bakteriálního lyzátu, které byly schopné interagovat s nikelnatými ionty imobilizovanými na koloně. V dráze 5, kam byl nanášen vzorek z frakce po promytí kolony pufrům B nejsou patrné žádné proteiny. Do drah 6–11 byly nanášeny vzorky z chromatografie na iontoměničích (zleva frakce: 3, 4, 6, 7, 9 a 10 z obr. 15). Ve všech frakcích jsou patrné pruhy mezi 6 a 14 kDa standardem, patřící exprimovanému proteinu již bez histidinové kotvy (9,9 kDa). Z porovnání vzorků v drahách 2–4 a 8–9 je patrné, že ve frakcích po IEX se nacházelo méně pruhů patřících kontaminacím z bakteriálního lyzátu.



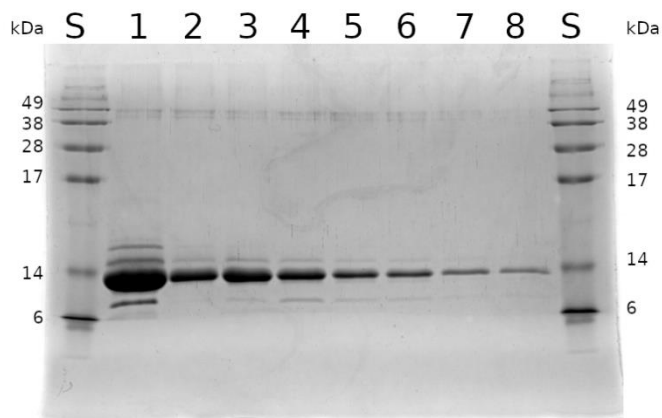
Obrázek 16 SDS-PAGE analýza vzorků po afinitní chromatografii a chromatografii na iontoměničích. S – proteinový standard; 1 – IMAC nezachycená frakce při nanášece a promytí puřrem A; 2 – f. 15 IMAC; 3 – f. 19 IMAC; 4 – f. 22 IMAC; 5 – IMAC frakce po závěrečném promytí puřrem B; 6 – f. 3 IEX; 7 – f. 4 IEX; 8 – f. 6 IEX; 9 – f. 7 IEX; 10 – f. 9 IEX; 11 – f. 10 IEX. Exprimovanému proteinu (TEAD1-DBD) patří pruhy nacházející se mezi standardem pro 6 a 14 kDa. Použitá zkratky: IMAC – afinitní chromatografie, IEX – chromatografie na iontoměničích.

5.1.3 Gelová permeační chromatografie

Po druhé afinitní chromatografii následoval závěrečný purifikační krok, gelová permeační chromatografie. GPC byla provedena na koloně ENrich SEC 70 10 x 300 mm. Na chromatogramu (obr. 17 na str. 57) byla vynesena absorbance při 280 nm (modrá křivka) a konduktivita (červená křivka). Na záznamu je patrný výrazný pík pro eluční objem 11–13 ml, který odpovídá purifikované DNA-vazebné doměně TEAD1. Dále je patrný nárůst konduktivity a absorbance při elučním objemu zhruba 17 ml, kdy došlo k eluci imidazolu. Pro vybrané frakce z GPC byla provedena analýza pomocí diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu viz obr. 18 na str. 57. Do první dráhy byl aplikován vzorek z nanášky na gelovou permeační chromatografii, do drah 2–8 pak frakce 1–7 z GPC (obr. 17 na str. 57). V dráze 1 jsou vyjma intenzivního pruhu mezi standardem pro 6 a 14 kDa, který patří TEAD1-DBD také dva slabší pruhy nad a jeden pod proteinem. Ve frakcích po GPC (dráhy 2–8) jsou tyto pruhy slabší. Kromě SDS-PAGE byl vzorek po posledním purifikačním kroku analyzován nativní hmotnostní spektrometrií (obr. 23 na str. 63), kdy pozorované signály odpovídají střední molekulové hmotnosti 9942 Da, tedy sekvenci exprimovaného proteinu bez histidinové kotvy.



Obrázek 17 Záznam z gelové permeační chromatografie, provedené na koloně ENrich SEC 70 10 x 300 mm. Na ose x vynesena eluční objem v ml; na ose y vynesena absorbance při 280 nm v mAU (modrá osa a křivka) a konduktivita v mS/cm (červená osa a křivka). Byly též vyznačeny frakce 1–12 o objemu 1 ml, které byly jímány automatickým sběračem frakcí a vybrané dále analyzovány SDS-PAGE.



Obrázek 18 SDS-PAGE analýza vzorků po gelové permeační chromatografii. S – proteinový standard; 1 – nanáška na GPC; 2–8 – frakce 1–7 z gelové permeační chromatografie. Exprimovanému proteinu bez histidinové kotvy (TEAD1-DBD) patří pruhy nacházející se mezi standardem pro 6 a 14 kDa.

5.2 Nativní hmotnostní spektrometrie

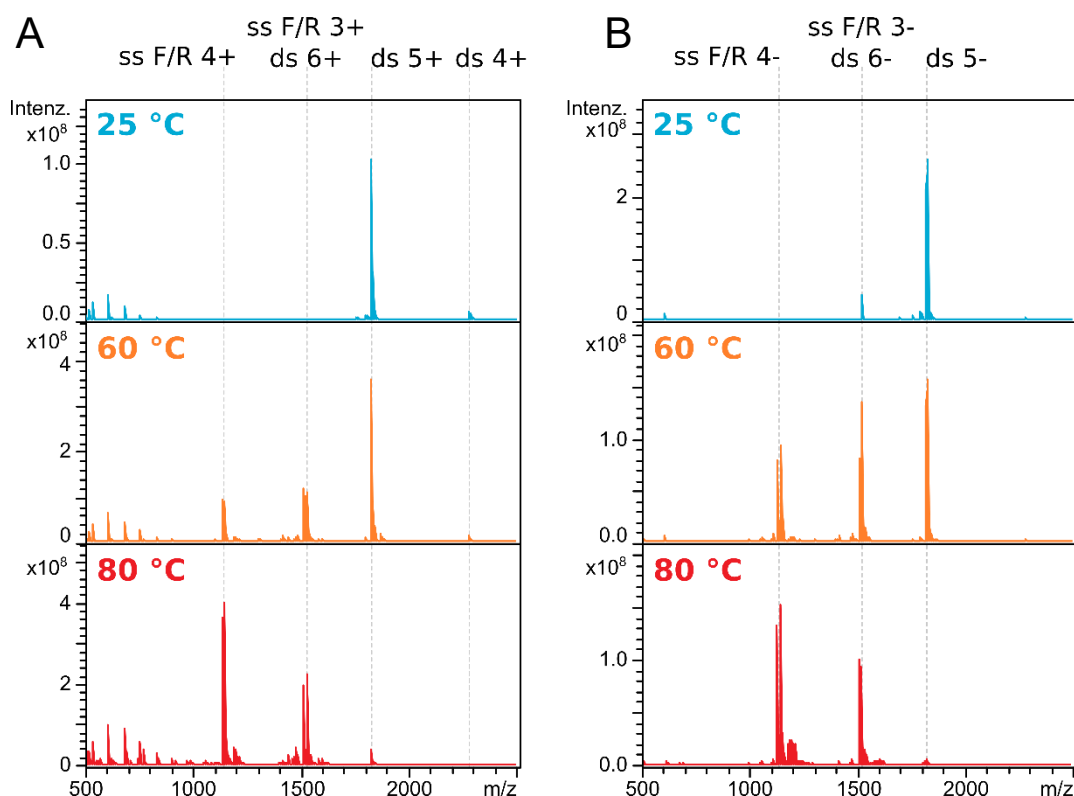
DNA-vazebné domény exprimovaného proteinu TEAD1 a proteinu FOXO4 byly studovány nativní hmotnostní spektrometrií a nativní IM-MS. V této kapitole jsou uvedeny výsledky získané na hmotnostním spektrometru Bruker solariX 15T FT-ICR. Veškeré uvedené experimenty byly provedeny v obou módech ionizace. Pro dsDNA a protein-DNA komplexy bylo měřeno v triplikátu. Pro oba proteiny bylo měření provedeno pouze jednou.

5.2.1 Zahřívání sprejovaného roztoku

Experiment zahřívání sprejovaného roztoku byl pro jednotlivé vzorky proveden v rozsahu teplot (25 – 95 °C). Pro názornost jsou vždy uvedena tři hmotnostní spektra zachycující změny analyzovaného vzorku při jeho zahřívání. Vždy bylo vybráno MS spektrum při 25 °C, druhé odpovídající stanovené teplotě tavení a poslední při teplotě, po které už nebyly zaznamenány výrazné změny v kompozici vzorku. Kompletní přehled získaných MS spekter, ze kterých byly vypočteny průměrné nábojové stavy proteinů (z_{avg}) a poměry y_t pro dsDNA a protein-DNA komplexy, je dostupný v přílohách práce: dsDNA (přílohy 6–11); proteiny (přílohy 12–15), protein-DNA komplexy (přílohy 16–21).

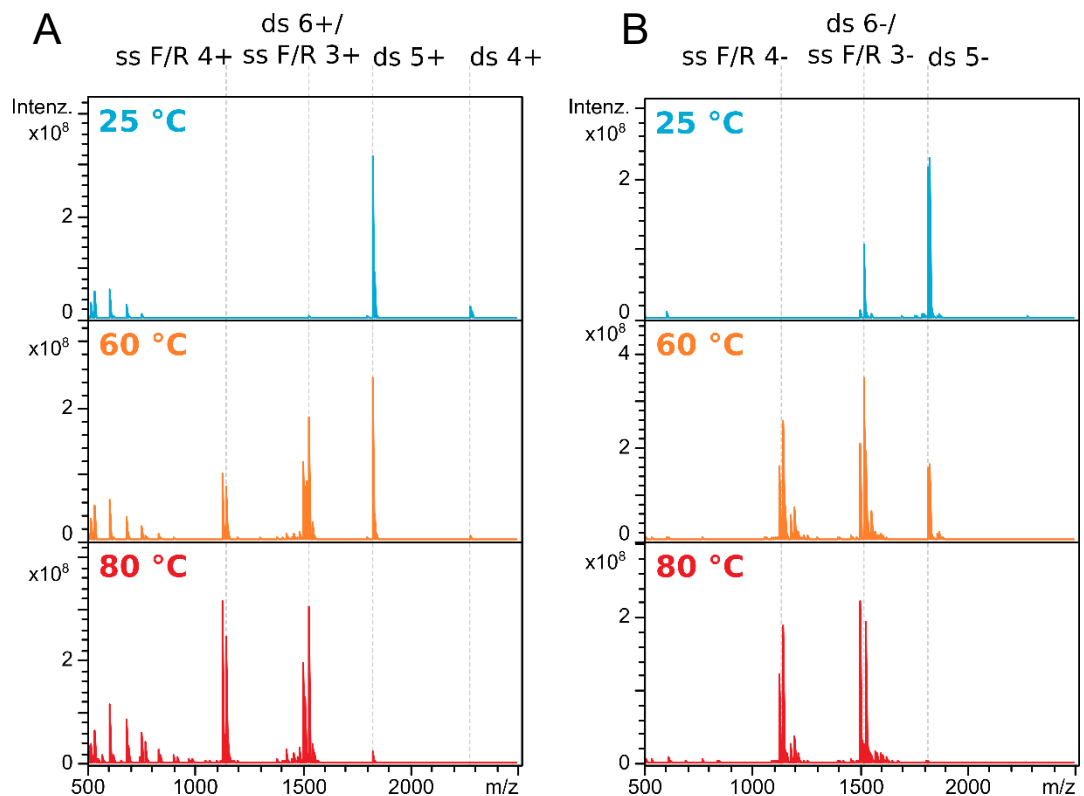
5.2.1.1 Zahřívání sprejovaného roztoku dvouvláknové DNA

U vT-nESI experimentu byl pro všechny tři použité DNA (*C-MYC* exon, *C-MYC* enhancer, *DAF-16*) v obou módech ionizace pozorován rozpad dsDNA na jednovláknové DNA, viz obr. 19–21 na str. 59, 60 a 61. Při teplotě 25 °C odpovídal nejintenzivnější signál v pozitivním módu ionizace u *C-MYC* exonu (obr. 19 A na str. 59) dvouvláknové DNA v nábojovém stavu 5⁺ (1829,8 *m/z*). U stejného vzorku v negativním módu ionizace (obr. 19 B) patřil též nejintenzivnější signál dvouvláknové DNA v NS 5⁻ (1827,8 *m/z*). Se zvyšující se teplotou byl v obou módech ionizace pozorován nárůst intenzity signálu příslušných F- a R- jednovláknových DNA v nábojových stavech 3⁺ a 4⁺, respektive 3⁻ a 4⁻. Při teplotě 80 °C a vyšších byly v hmotnostním spektru patrné zejména signály patřící jednovláknové DNA.



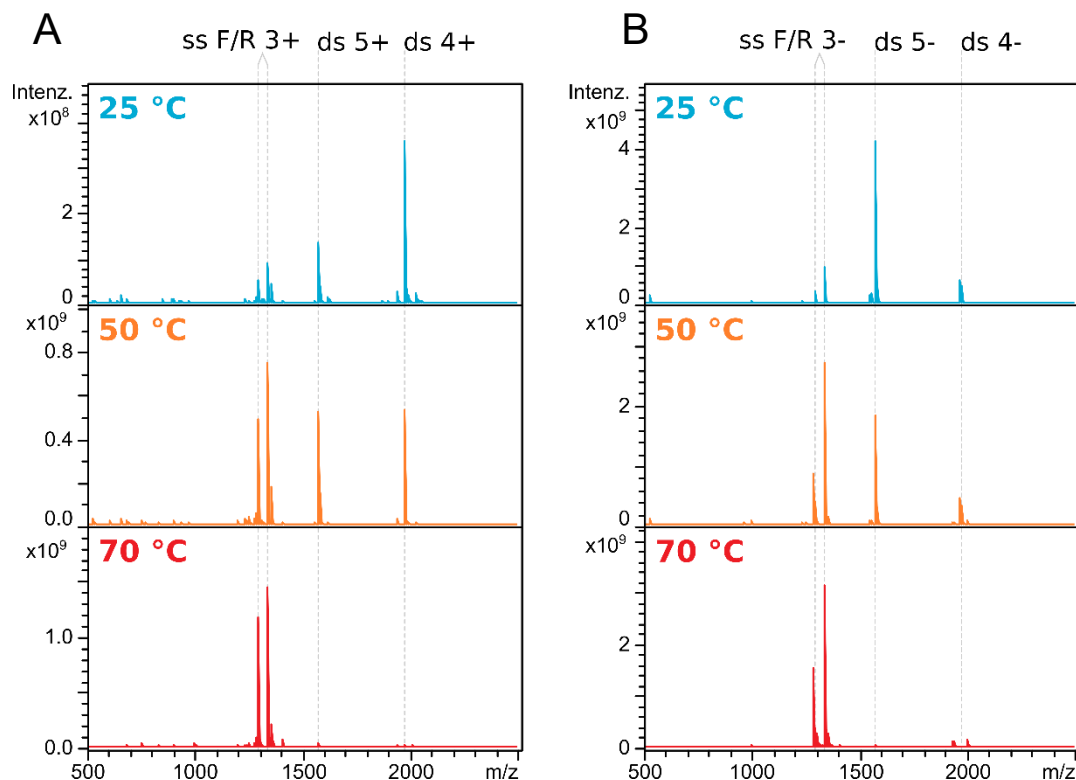
Obrázek 19 Hmotnostní spektra z vT-nESI pro C-MYC exon: A pozitivní B negativní mód ionizace. Uvedeny výsledky pro 25; 60 a 80 °C Na ose x uveden hmotnostní rozsah 500–2500 m/z, na ose y uvedena intenzita v arbitrárních jednotkách. V hmotnostním spektru byly označeny píky pro jednotlivé nábojové stavy dvouvláknové DNA (A ds 4+ 2287,0 m/z; ds 5+ 1829,8 m/z; ds 6+ 1525,0 m/z a B ds 5- 1827,8 m/z; ds 6- 1523,0 m/z) a jednovláknové DNA pro F- i R- vlákno (A ssF 3+ 1531,7 m/z; ssR 3+ 1518,3 m/z; ssF 4+ 1149,0 m/z; ssR 4+ 1139,0 m/z a B ssF 3- 1529,7 m/z; ssR 3- 1516,3 m/z; ssF 4- 1147,0 m/z; ssR 4- 1137,0 m/z).

U C-MYC enhanceru (obr. 20 na str. 60) patřil stejně jako u C-MYC exonu (obr. 19) při 25 °C v obou módech ionizace nejintenzivnější signál NS 5+ (1829,6 m/z), respektive 5- (1827,6 m/z), zatímco signály jednovláknové DNA nebyly patrné. Se zahříváním vzorku docházelo k rozpadu dsDNA na jednovláknové DNA, zhruba při teplotě 60 °C byly intenzity signálů patřící ssDNA podobné jako u píků patřících dvouvláknové DNA. Při teplotě 80 °C došlo k rozpadu většiny dvouvláknové DNA, a proto byly pozorovány pouze signály odpovídající jednovláknové DNA v NS 3+ a 4+, respektive 3- a 4-.



Obrázek 20 Hmotnostní spektra z vT-nESI pro C-MYC enhancer: **A** pozitivní **B** negativní mód ionizace. Uvedeny výsledky pro 25; 60 a 80 °C. Na ose x uveden hmotnostní rozsah 500–2500 m/z, na ose y uvedena intenzita v arbitrárních jednotkách. V hmotnostním spektru byly označeny píky pro jednotlivé nábojové stavy dvouvláknové DNA (**A** ds 4+ 2286,8 m/z; ds 5+ 1829,6 m/z; ds 6+ 1524,8 m/z a **B** ds 5- 1827,6 m/z; ds 6- 1522,8 m/z) a jednovláknové DNA pro F- i R- vlákno (**A** ssF 3+ 1513,0 m/z; ssR 3+ 1536,7 m/z; ssF 4+ 1135,0 m/z; ssR 4+ 1152,8 m/z a **B** ssF 3- 1511,0 m/z; ssR 3- 1534,7 m/z; ssF 4- 1133,0 m/z; ssR 4- 1150,8 m/z).

Při vT-nESI experimentu pro *DAF-16* docházelo obdobně, jako v případě obou *C-MYC* oligonukleotidů k rozpadu dvouvláknové DNA na DNA jednovláknovou (obr. 21 na str. 61), avšak v případě *DAF-16* byl rozpad pozorován při nižších teplotách (50 °C oproti 60 °C pro *C-MYC*). Při teplotě 25 °C patřil nejintenzivnější signál dsDNA v nábojovém stavu 4+ (obr. 21 A), respektive 5- (obr. 21 B). Se zahříváním vzorku docházelo k zvyšování intenzity ssDNA, a naopak k poklesu signálu dsDNA, jak je patrné z obr. 21, při teplotě 50 °C měly jednovláknové DNA podobné intenzity signálu jako dvouvláknové DNA. Při teplotě 70 °C byly v hmotnostním spektru patrné především signály ssDNA.



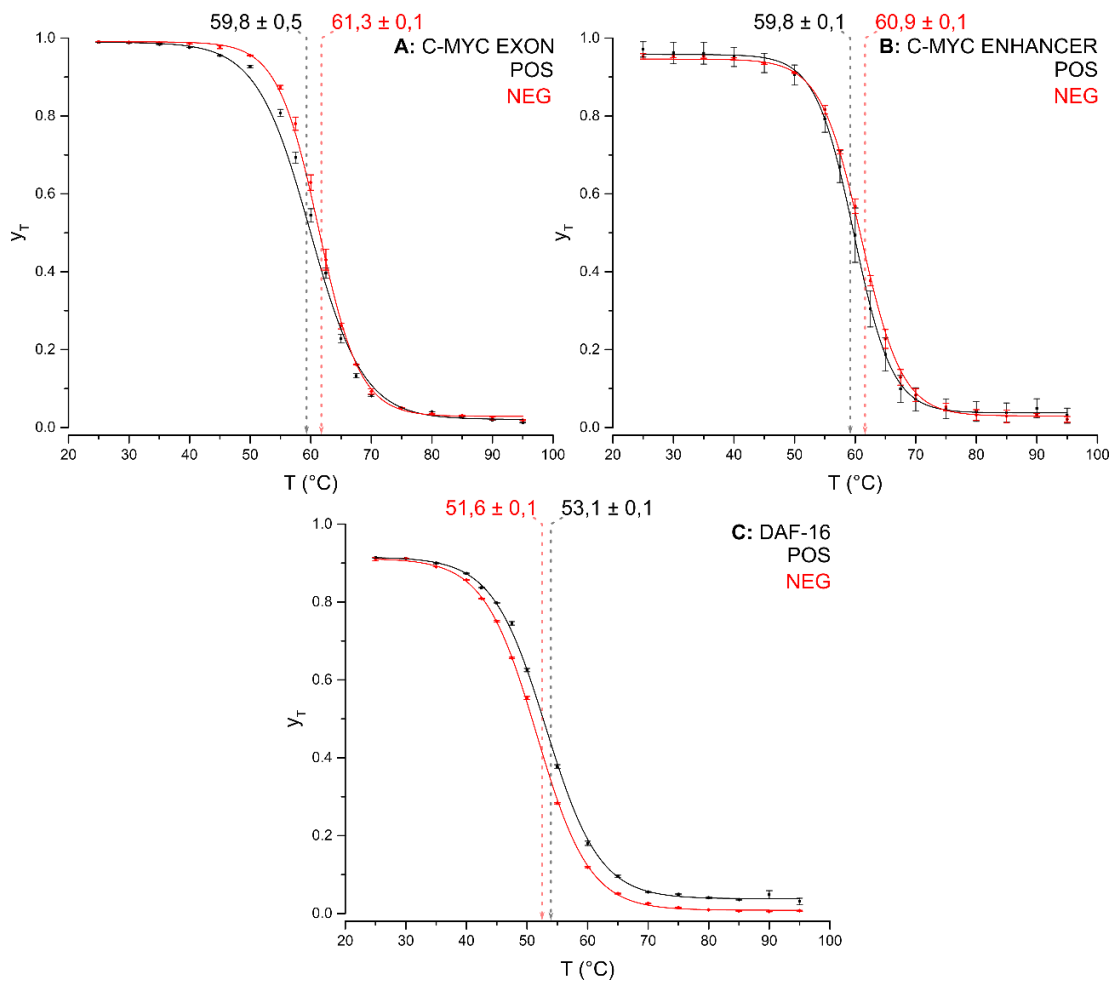
Obrázek 21 Hmotnostní spektra z vT-nESI pro DAF-16: A pozitivní B negativní mód ionizace. Uvedeny výsledky pro 25; 50 a 70 °C. Na ose x uveden hmotnostní rozsah 500–2500 m/z, na ose y uvedena intenzita v arbitrárních jednotkách. V hmotnostním spektru byly označeny píky pro jednotlivé nábojové stavy dvouvláknové DNA (A ds 4+ 1976,9 m/z; ds 5+ 1581,7 m/z a B ds 4- 1974,9 m/z; ds 5- 1579,7 m/z) a jednovláknové DNA pro F- i R- vlákno (A ssF 3+ 1341,2 m/z; ssR 3+ 1295,2 m/z a B ssF 3- 1339,2 m/z; ssR 3- 1293,2 m/z).

Následně byly pro všechny tři oligonukleotidy v obou módech ionizace stanoveny teploty tavení. Z naměřených hmotnostních spekter byly pro všechny analyzované teploty v rozsahu (25–95 °C) vypočteny y_T , dle rovnice:

$$y_T = \frac{I_{ds}}{I_{ds} + \frac{I_{ssF} + I_{ssR}}{2}}, \quad (2)$$

kde I_{ds} značí intenzitu dvouvláknové DNA, I_{ssF} a I_{ssR} značí intenzitu F-, potažmo R- jednovláknové DNA. Pro výpočet byly využity píky nejintenzivnějšího izotopu (při 25 °C pro dsDNA, respektive 60 °C pro ssDNA) dvou nejabundantnějších nábojových stavů jednovláknových, potažmo dvouvláknových DNA. Vypočtené y_T byly pro jednotlivé teploty vyneseny do grafu na obr. 22 na str. 62, a to pro pozitivní i negativní mód ionizace pro všechny tři analyzované dsDNA. Vypočtené body y_T byly v programu

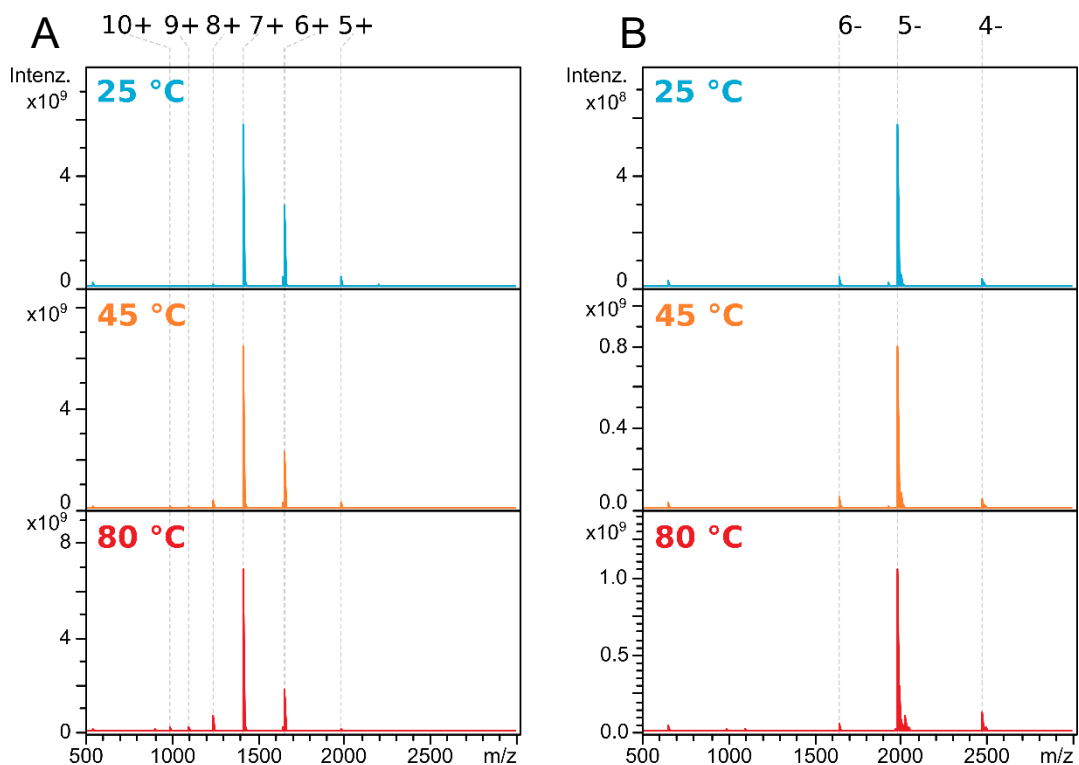
OriginPro proloženy Boltzmannovou sigmoidální funkcí (Levenberg Marquardt iterační algoritmus) a z jejího inflexního bodu byly určeny body tavení v pozitivním, respektive negativním módu ionizace pro *C-MYC* exon T_{m+} : $59,8 \pm 0,5$ °C; T_{m-} : $61,3 \pm 0,1$ °C, *C-MYC* enhancer T_{m+} : $59,8 \pm 0,1$ °C; T_{m-} : $60,9 \pm 0,1$ °C a *DAF-16* T_{m+} : $51,6 \pm 0,1$ °C; T_{m-} : $53,1 \pm 0,1$ °C



Obrázek 22 Výsledky *vT-nESI* experimentů pro *dsDNA*. **A:** *C-MYC* exon, **B:** *C-MYC* enhancer a **C:** *DAF-16*. Do grafů **A–C** byly pro pozitivní (černá) a negativní (červená) mód ionizace vyneseny y_T vypočtené dle (2) v závislosti na teplotě vzorku T (°C). V grafech byly též vyznačeny směrodatné odchylky triplikátu. Červená a černá křivka značí proložení Boltzmannovou sigmoidální funkcí, pomocí níž byly určeny uvedené teploty tavení.

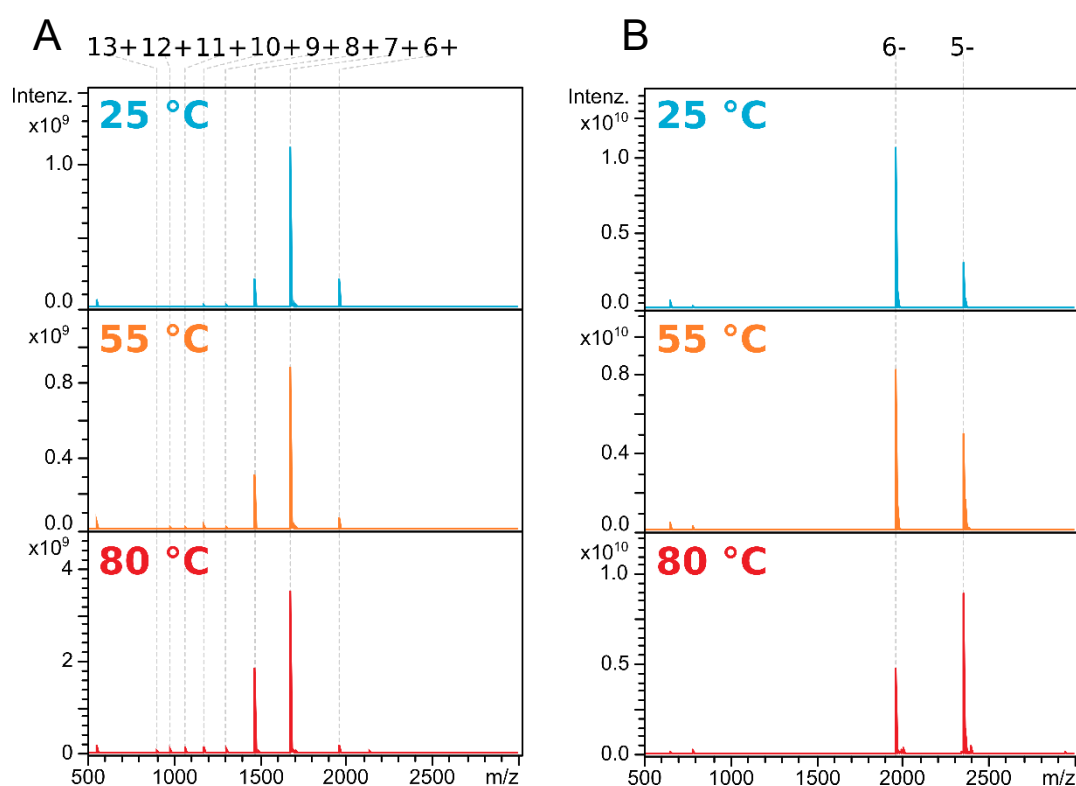
5.2.1.2 Zahřívání sprejovaného roztoku proteinů

Dále byla technikou vT-nESI sledována tepelná denaturace proteinů. U vzorku obou proteinů TEAD1-DBD i FOXO4-DBD byla v pozitivním módu ionizace pozorována změna v distribuci nábojových stavů. U proteinu TEAD1-DBD (obr. 23 A pro pozitivní mód ionizace) patřil při teplotě 25 °C nejintenzivnější signál NS 7+, nejvyšší patrný nábojový stav byl 8+. Se zvyšující se teplotou docházelo ke snižování intenzity signálu nižších nábojových stavů (vyšších m/z), což je patrné zejména u NS 6+. Současně byl pozorován nárůst intenzit vyšších nábojových stavů 8+ až 10+ (oblast nižších m/z). Zatímco v pozitivním módu ionizace byly při vT-nESI experimentu u proteinu TEAD1-DBD pozorovány změny v distribuci nábojových stavů, v negativním módu nebyly takové změny pozorovány. Při teplotě 25 °C i 80 °C na obr. 23 B patřil nejintenzivnější signál NS 5-, nejvyšší pozorovaný byl v obou případech NS 6-.



Obrázek 23 Hmotnostní spektra z vT-nESI pro TEAD1-DBD: A pozitivní B negativní mód ionizace. Uvedeny výsledky pro 25; 45 a 80 °C. Na ose x uveden hmotnostní rozsah 500–3000 m/z , na ose y uvedena intenzita v arbitrárních jednotkách. V hmotnostním spektru byly označeny píky pro jednotlivé nábojové stavy proteinu (A 5+ 1989,5 m/z ; 6+ 1658,1 m/z ; 7+ 1421,8 m/z ; 8+ 1243,8 m/z ; 9+ 1103,7 m/z ; 10+ 995,2 m/z a B 4- 2484,6 m/z ; 5- 1987,5 m/z ; 6- 1656,1 m/z).

U proteinu FOXO4-DBD byl v pozitivním módu ionizace nejzastoupenějším nábojovým stavem při teplotě 25 °C 7+, nejvyšším pozorovaným byl NS 8+ (obr. 24 A). Obdobně, jako u proteinu TEAD1-DBD docházelo se zvyšující se teplotou k poklesu intenzit NS 6+ a nárůstu intenzit vyšších nábojových stavů (nižších m/z), při teplotě 55 i 80 °C byly patrné signály odpovídající nábojovým stavům 9+ až 13+ proteinu. V negativním módu ionizace (obr. 24 B) nebyl při experimentu, obdobně jako v případě TEAD1-DBD, pozorován posun k vyšším nábojovým stavům. Při teplotě 25 °C byl nejabundantnější NS 6-, dále byl pozorován nábojový stav 5-. Při teplotě 80 °C byl NS 5-, přičemž jediný další pozorovaný nábojový stav proteinu byl 6-.

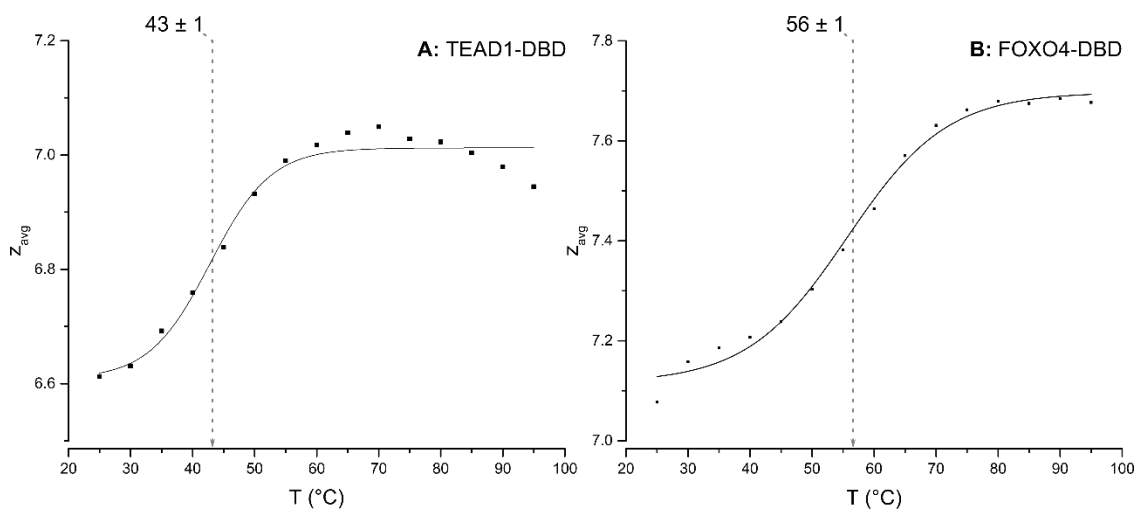


Obrázek 24 Hmotnostní spektra z vT-nESI pro FOXO4-DBD: **A** pozitivní **B** negativní mód ionizace. Uvedeny výsledky pro 25; 55 a 80 °C. Na ose x uveden hmotnostní rozsah 500–3000 m/z , na ose y uvedena intenzita v arbitrárních jednotkách. V hmotnostním spektru byly označeny píky pro jednotlivé nábojové stavy proteinu (**A** 6+ 1966,2 m/z ; 7+ 1685,5 m/z ; 8+ 1474,9 m/z ; 9+ 1311,1 m/z ; 10+ 1180,1 m/z ; 11+ 1072,9 m/z ; 12+ 983,6 m/z ; 13+ 908,0 m/z a **B** 5- 2357,2 m/z ; 6- 1964,2 m/z).

Při vT-nESI MS obou proteinů v pozitivním módu ionizace byla pozorována změna v distribuci nábojových stavů, obdobně jako v publikacích [67], [68]. Proto bylo jejich chování při zahřívání popsáno výpočtem průměrného nábojového stavu:

$$z_{avg} = \frac{\sum I_z \cdot z}{\sum I_z}, \quad (1)$$

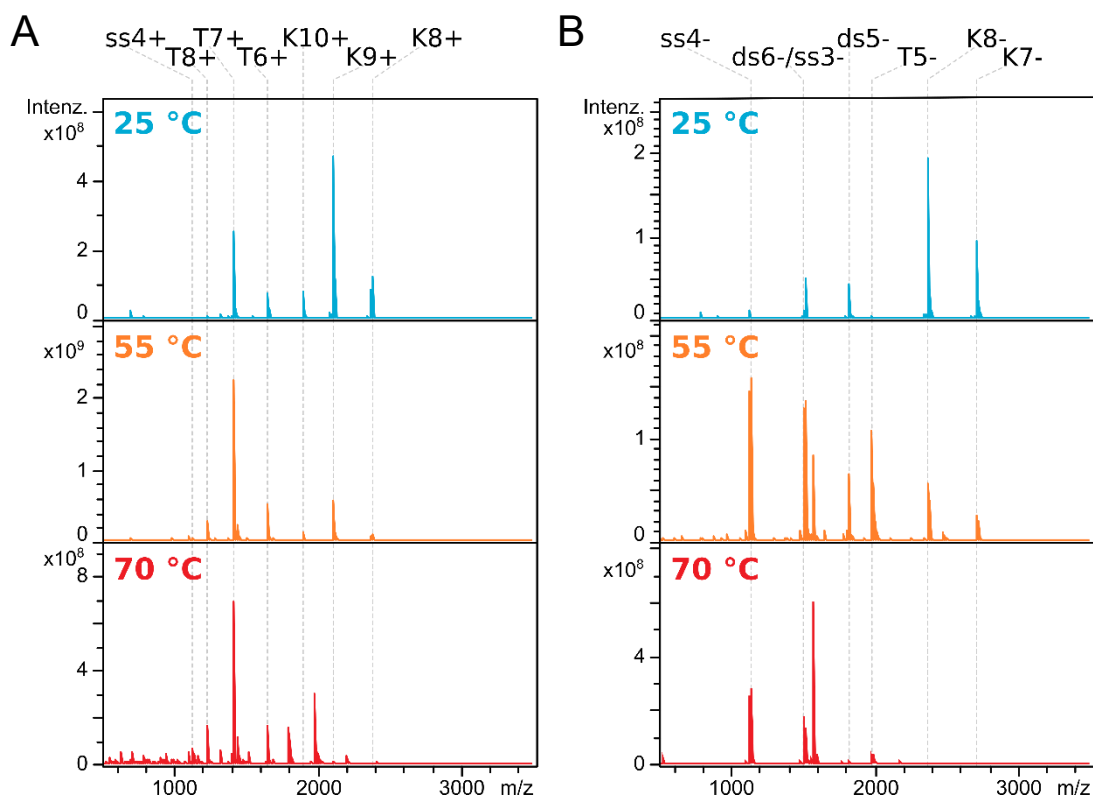
kde I_z značí intenzitu nejzastoupenějšího izotopového píku daného nábojového stavu a z jeho náboj. Pro tento výpočet byly využity nábojové stavy 5+ až 12+ u proteinu TEAD1 a 6+ až 15+ u FOXO. Průměrný nábojový stav byl následně vyneseno pro TEAD1-DBD a FOXO4-DBD do grafu na obr. 25. Z grafu je patrné, že se zvyšující se teplotou docházelo u obou proteinů ke zvyšování průměrného nábojového stavu. Body byly proloženy v programu OriginPro Boltzmannovou sigmoidální závislostí (Levenberg Marquardt iterační algoritmus), z jejíhož inflexního bodu byly stanoveny teploty tavení: $T_{m+;TEAD1} = 43 \pm 1$ °C a $T_{m+;FOXO4} = 56 \pm 1$ °C. V negativním módu ionizace nebyla změna v distribuci nábojových stavů pozorována. Proto nebyly na obr. 25 pro tento mód ionizace vyneseny z_{avg} , respektive stanoveny teploty tavení.



Obrázek 25 Výsledky vT-nESI experimentů pro proteiny. **A:** TEAD1-DBD a **B:** FOXO4-DBD. Do grafů **A** a **B** byly pro pozitivní mód ionizace vyneseny z_{avg} vypočtené dle (1) v závislosti na teplotě vzorku T (°C). Křivka znázorňuje proložení Boltzmannovou sigmoidální funkcí, pomocí které byly určeny uvedené teploty tavení

5.2.1.3 Zahřívání sprejovaného roztoku protein-DNA komplexů

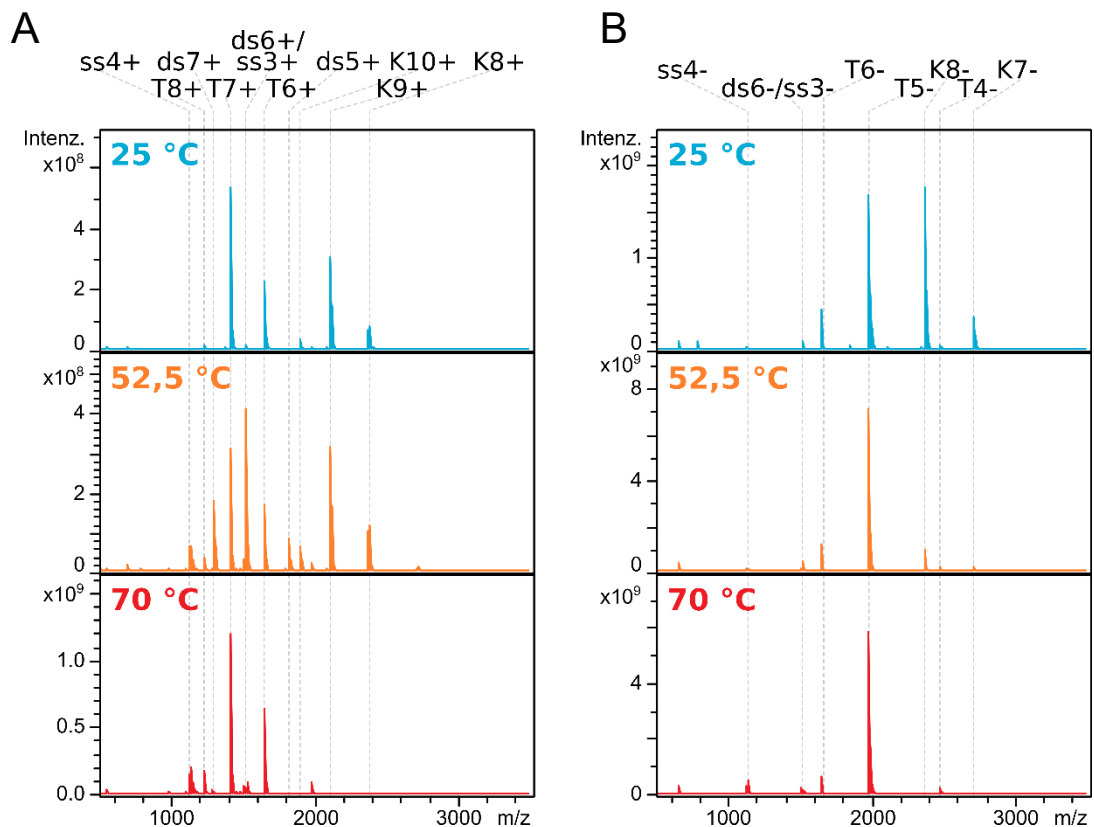
Při experimentu zahřívání sprejovaného roztoku byl u všech protein-DNA komplexů v obou módech ionizace pozorován rozpad komplexů na jednotlivé komponenty. V případě komplexu DNA-vazebné domény proteinu TEAD1 s *C-MYC* exonem patřil při 25 °C v pozitivním (obr. 26 A na str. 67) i negativním módu ionizace (obr. 26 B) nejintenzivnější signál v hmotnostním spektru protein-DNA komplexu (NS 9+, respektive 8-). Se zahříváním vzorku byl v pozitivním módu ionizace pozorován nárůst intenzity volného proteinu NS 6+, 7+ a 8+ a jednovláknové DNA NS 4+. Při teplotě 70 °C už nebyly patrné signály patřící protein-DNA komplexu, pouze signály ssDNA a proteinu. V negativním módu ionizace byl při teplotě 55 °C pozorován nárůst intenzity signálu proteinu (NS 5-), dvouvláknové DNA (NS 5- a 6-) a DNA jednovláknové (NS 4- a 3-). Při teplotě 70 °C už nebyl pozorován signál odpovídající protein-DNA komplexu, ani dsDNA, byl pozorován pouze protein a jednovláknová DNA.



Obrázek 26 Hmotnostní spektra z vT-nESI pro komplex TEAD1-DBD s C-MYC exonem: *A* pozitivní *B* negativní mód ionizace. Uvedeny výsledky pro 25; 55 a 70 °C. Na ose *x* uveden hmotnostní rozsah 500–3500 *m/z*, na ose *y* uvedena intenzita v arbitrárních jednotkách. V hmotnostním spektru byly označeny píky pro jednotlivé nábojové stavy protein-DNA komplexu (*A* K8+ 2386,8 *m/z*; K9+ 2121,7 *m/z*; K10+ 1909,6 *m/z*, *B* K7- 2725,6 *m/z*; K8- 2384,8 *m/z*), proteinu (*A* T7+ 1685,5 *m/z*; T8+ 1474,9 *m/z*, *B* T5- 1987,5 *m/z*), dvouvláknové DNA (*B* ds5- 1827,8 *m/z*; ds6- 1523,0 *m/z*) a jednovláknové DNA (*A* ss4+ F: 1149,0 *m/z*; ss4+ R: 1139,0 *m/z*, *B* ss3- F: 1529,7 *m/z*; ss3- R: 1516,3 *m/z*; ss4- F: 1137,0 *m/z*; ss4- R: 1147,0 *m/z*). Na obr. *A* nebyly při teplotě 70 °C popsány signály 1809,9 *m/z*; 1990,7 *m/z* a 2211,8 *m/z*, patřící dimeru proteinu TEAD1-DBD (NS 9+ až 11+).

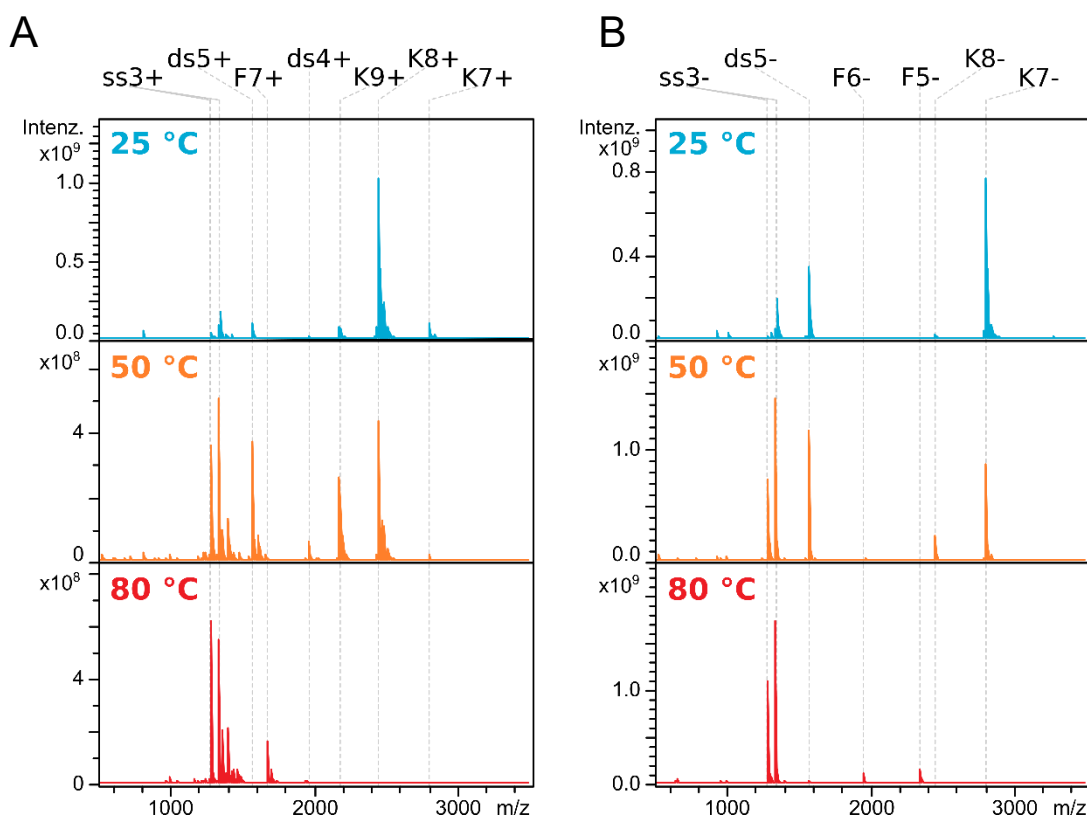
Při vT-nESI MS TEAD1 C-MYC enhancer komplexu (obr. 27 na str. 68) bylo pozorováno podobné chování, jako u komplexu s C-MYC exonem (obr. 26). Rozdíl mezi oběma komplexy byl patrný v podílu vázaných a nevázaných komponent při 25 °C. U C-MYC exonu patřily nejintenzivnější signály MS spektra protein-DNA komplexu. Zatímco v případě TEAD1 C-MYC enhancer komplexu byly v pozitivním (obr. 27 A) i negativním (obr. 27 B) módu ionizace pozorovány podobně intenzivní signály protein-DNA komplexu (NS 8+ až 10+, respektive 7- a 8-) a nevázaných komponent komplexu, zejména proteinu (NS 6+ a 7+, potažmo 5- a 6-). Se zahříváním vzorku (52,5 °C) byl v pozitivním módu ionizace pozorován nárůst intenzity signálu volného proteinu

a dvouvláknové DNA, spolu s poklesem intenzity signálu protein-DNA komplexu. Při teplotě 70 °C odpovídaly signály v hmotnostním spektru nevázanému proteinu a ssDNA. V negativním módu ionizace byl při vT-nESI experimentu pozorován pokles intenzity protein-DNA komplexu, doprovázený nárůstem intenzity signálu zejména u proteinu (NS 5- a 6-).



Obrázek 27 Hmotnostní spektra z vT-nESI pro komplex TEAD1-DBD s C-MYC enhancerem: **A** pozitivní **B** negativní mód ionizace. Uvedeny výsledky pro 25; 52,5 a 70 °C. Na ose x uveden hmotnostní rozsah 500–3500 m/z, na ose y uvedena intenzita v arbitrárních jednotkách. V hmotnostním spektru byly označeny píky pro jednotlivé nábojové stavy protein-DNA komplexu (**A** K8+ 2386,7 m/z; K9+ 2121,6 m/z; K10+ 1909,6 m/z, **B** K7- 2725,5 m/z; K8- 2384,7 m/z), proteinu (**A** T6+ 1658,1 m/z; T7+ 1685,5 m/z, **B** T4- 2484,6 m/z; T5- 1987,5 m/z; T6- 1656,1 m/z), dvouvláknové DNA (**A** ds5+ 1829,6 m/z; ds6+ 1524,9 m/z; ds7+ 1307,2 m/z, **B** ds6- 1523,0 m/z) a jednovláknové DNA (**A** ss3+ F: 1513,0 m/z; ss3+ R: 1536,7 m/z; ss4+ F: 1135,0 m/z; ss4+ R: 1152,8 m/z; **B** ss3- F: 1511,0 m/z; ss3- R: 1534,7 m/z; ss4+ F: 1133,0 m/z; ss4+ R: 1150,8 m/z).

V případě FOXO4-DBD komplexu s *DAF-16* patřil při 25 °C v pozitivním (obr. 28 A) i negativním (obr. 28 B) módu ionizace nejintenzivnější signál v hmotnostním spektru protein-DNA komplexu (NS 8+, respektive 7+). Obdobně, jako v případě TEAD1-DNA komplexů byl při teplotě kolem 50 °C pozorován rozpad protein-DNA komplexu na komponenty. V obou módech ionizace došlo při 50 °C k patrnému poklesu signálu komplexu, zatímco vzrostla intenzita zejména ssDNA (NS 3+, potažmo 3-), dsDNA (NS 4+ a 5+, respektive 5-) a proteinu FOXO4-DBD v nábojových stavech 7+ v pozitivním a 6- a 5- v negativním módu ionizace. Při teplotě 80 °C patřily nejintenzivnější signály jednovláknové DNA, signály dsDNA a protein-DNA komplexu nebyly patrné.

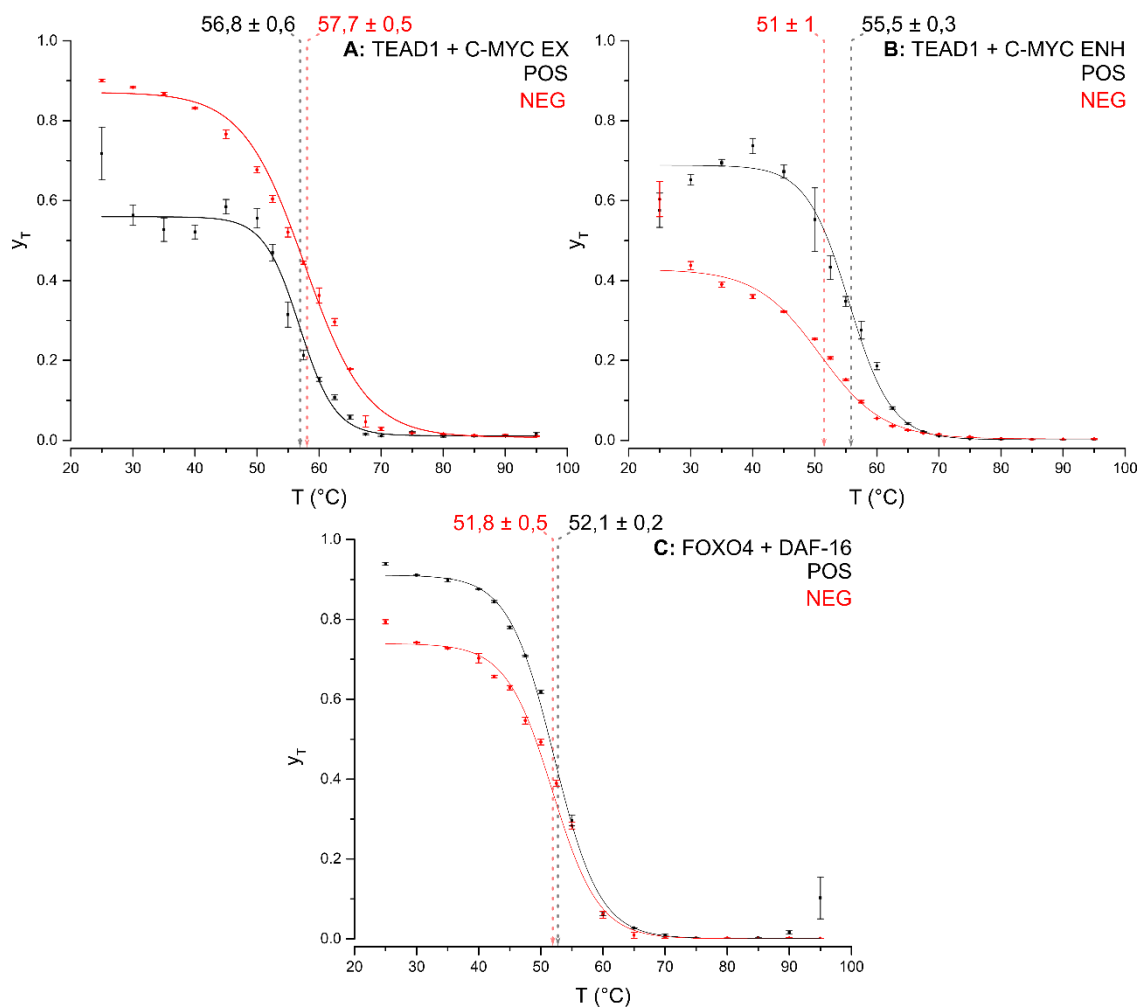


Obrázek 28 Hmotnostní spektra z vT-nESI pro komplex FOXO4-DBD s DAF-16: A pozitivní B negativní mód ionizace. Uvedeny výsledky pro 25; 50 a 80 °C. Na ose x uveden hmotnostní rozsah 500–3500 m/z, na ose y uvedena intenzita v arbitrárních jednotkách. V hmotnostním spektru byly označeny píky pro jednotlivé nábojové stavy protein-DNA komplexu (A K7+ 2814,5 m/z; K8+ 2462,8 m/z; K9+ 2189,3 m/z, B K7- 2815,5 m/z; K8- 2460,8 m/z), proteinu (A F7+ 1685,5 m/z, B F5- 2357,2 m/z; F6- 1964,2 m/z), dvouvláknové DNA (A ds4+ 1976,9 m/z; ds5+ 1581,7 m/z, B ds5- 1579,7 m/z) a jednovláknové DNA (A ss3+ F: 1341,2 m/z; ss3+ R: 1295,2 m/z, B ss3- F: 1339,2; ss3- R: 1293,2 m/z).

Ze získaných výsledků byly pro všechny protein-DNA komplexy v obou módech ionizace stanoveny teploty tavení. Z naměřených hmotnostních spekter byly, analogicky jako v případě dsDNA (rovnice 2 na str. 61), pro analyzované teploty v rozsahu (25–95 °C) vypočteny y_T , dle rovnice:

$$y_T = \frac{I_K}{I_K + \frac{I_{ds}}{2} + \frac{I_{ssF}}{4} + \frac{I_{ssR}}{4}}, \quad (3)$$

kde I_K značí intenzitu protein-DNA komplexu, I_{ds} značí intenzitu dvouvláknové DNA, I_{ssF} a I_{ssR} značí intenzitu F-, potažmo R- jednovláknové DNA. Pro výpočet byly využity píky nejintenzivnějšího izotopu (při 25 °C pro protein-DNA komplex, protein a dsDNA; při 60 °C pro ssDNA) třech nejzastoupenějších NS pro protein a protein-DNA komplex a dvou nejabundantnějších nábojových stavů dvouvláknové a jednovláknové DNA. Vypočtené y_T byly pro jednotlivé teploty vyneseny do grafu na obr. 29 na str. 71, a to pro pozitivní i negativní mód ionizace pro všechny tři analyzované protein-DNA komplexy. Dále byly v programu OriginPro proloženy Boltzmannovou sigmoidální funkcí (Levenberg Marquardt iterační algoritmus) a z jejího inflexního bodu byly určeny body tavení pro TEAD1-DBD *C-MYC* exon T_{m+} : $56,8 \pm 0,6$ °C; T_{m-} : $57,7 \pm 0,5$ °C, TEAD1-DBD *C-MYC* enhancer T_{m+} : $55,5 \pm 0,3$ °C; T_{m-} : 51 ± 1 °C a FOXO4 *DAF-16* T_{m+} : $52,1 \pm 0,2$ °C; T_{m-} : $51,8 \pm 0,5$ °C.



Obrázek 29 Výsledky y_T -nESI experimentů pro protein-DNA komplexy. **A:** TEAD1-DBD a C-MYC exon, **B:** TEAD1-DBD a C-MYC enhancer a **C:** FOXO4 a DAF-16. Do grafů **A–C** byly pro pozitivní (černá) a negativní (červená) mód ionizace vyneseny y_T vypočtené dle (3) v závislosti na teplotě vzorku T ($^{\circ}\text{C}$). V grafech byly též vyznačeny směrodatné odchylky triplikátu. Červená a černá křivka značí proložení Boltzmannovou sigmoidální funkcí, pomocí níž byly určeny uvedené teploty tavení.

5.3 Nativní hmotnostní spektrometrie ve spojení s iontovou mobilitou

V předchozí kapitole (kap. 5.2 na str. 58) jsou uvedeny výsledky z vT-ESI MS experimentu, který umožnil sledovat změny ve složení vzorku při jeho perturbaci v kapalně fází zahříváním. Výsledky, uvedené v této kapitole, byly naměřeny na hmotnostním spektrometru s TWIMS Waters Synapt G2-Si. Iontová mobilita byla využita pro studium strukturních změn vzorků při aktivaci zahříváním sprejovaného roztoku (vT-nESI). Výsledky jsou prezentovány pomocí tzv. teplotních map, kde byla na osu x vynesena teplota pro vT-nESI, osu y pak kolizní průřezy. Relativní intenzita signálu je vyjádřena pomocí barevné škály.

5.3.1 Kalibrace iontové mobility

Iontová mobilita s putující vlnou byla kalibrována pro oba módy ionizace pomocí tří nativních proteinů: cytochromu C, β -laktoglobulinu a ubikvitinu (viz tab. 3 na str. 73). Ze získaných „drift time“ pro jednotlivé nábojové stavy proteinů (monomeru a dimeru v případě β -laktoglobulinu) byla stanovena logaritmická kalibrace TWIMS [80], [82]. Všechna IM-MS měření u kalibrantů i vzorků byla provedena v N_2 , ale pro kalibraci byly využity experimentálně získané kolizní průřezy v He (pozitivní [80] a negativní [81]). Proto jsou všechny výsledky v této práci uvedeny jako: $^{TW}CCS_{N_2 \rightarrow He}$ [86].

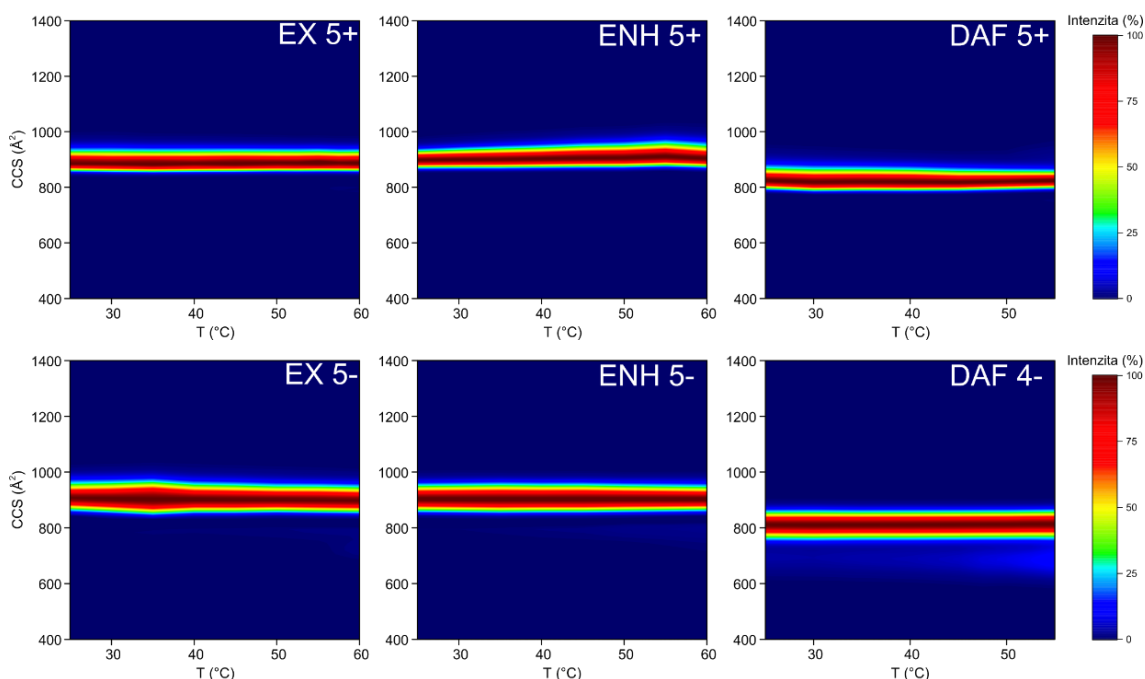
Tabulka 3 Kalibrace iontové mobility s putující vlnou, pro pozitivní a negativní mód ionizace. V tabulce uvedeny zkratky pro proteiny: bLG monomer/dimer – monomer/dimer β -laktoglobulinu, CytC – cytochrom C, UBQ – ubiquitin. Dále byly zaznamenány zaokrouhlené střední molekulové hmotnosti (kDa), z – náboj, m/z, CCS_{He} – referenční kolizní průřezy pro He (\AA^2) a t_D „drift time“ naměřené pro dané nábojové stavy kalibrantů.

Protein	M_{avg} (kDa)	Pozitivní mód ionizace				Negativní mód ionizace			
		z	m/z	CCS_{He} (\AA^2)	t_D (ms)	z	m/z	CCS_{He} (\AA^2)	t_D (ms)
bLG dimer	37	11	3340	2850	17,529	9	4080	2790	14,284
					17,457				14,284
					17,464				14,305
		12	3062	2900	15,369	10	3671	2790	11,663
					15,268				11,672
					15,276				11,677
13	2826	2960	13,873						
			13,767						
			13,737						
bLG monomer	18	7	2624	1660	14,452	6	3060	1660	10,638
					14,328				10,627
					14,333				10,612
		8	2296	1690	11,791	7	2622	1660	7,989
					11,730				7,967
					11,682				7,956
9	2040	1780	10,330						
			10,300						
			10,330						
CytC	12	6	2061	1240	11,270	5	2417	1240	8,635
					11,257				8,633
					11,252				8,644
		7	1767	1280	8,887	6	2059	1250	6,164
					8,882				6,171
					8,874				6,167
UBQ	8,6	5	1714	983	9,775	4	2140	950	8,061
					9,784				8,099
					9,794				8,096
		6	1429	1000	7,483	5	1712	960	5,310
					7,509				5,318
					7,510				5,287

5.3.2 Zahřívání sprejovaného roztoku

5.3.2.1 Zahřívání sprejovaného roztoku dvouvláknových DNA

Pro reprezentaci výsledků vT-nESI IM-MS u dvouvláknové DNA byly vybrány nejnižší pozorované nábojové stavy příslušných oligonukleotidů (obr. 30), teplotní mapy pro ostatní nábojové stavy jsou uvedeny v příloze 22 a jejich kolizní průřezy při 25°C byly zaznamenány do tab. 4 na str. 75. Jak je patrné z obr. 30 při perturbaci *C-MYC* exonu a *C-MYC* enhanceru zahříváním nebyly v pozitivním ani negativním módu ionizace pozorovány strukturální změny u dsDNA, pokud nedošlo k jejich rozpadu na jednovláknové DNA. Jednotlivé dsDNA měly při 25 °C i při 60 °C CCS přibližně 900 Å². U *DAF-16* též nebyly pozorovány změny kolizního průřezu se změnou teploty, v rozsahu teplot 25 až 55 °C měla dsDNA kolizní průřez zhruba 800 Å².



Obrázek 30 Teplotní mapy z vT-nESI IM-MS experimentu pro dsDNA. Pro *C-MYC* exon (EX) a *C-MYC* enhancer (ENH) jsou uvedeny teplotní mapy pro NS 5+, respektive 5- s teplotním rozsahem 25–60 °C. Pro *DAF-16* (DAF) jsou uvedeny teplotní mapy pro nábojový stav 5+ a 4- v teplotním rozsahu 25–55 °C. Na ose y byl vynesena rozsah kolizních průřezů 400–1400 Å². Na obrázku jsou uvedeny nejnižší pozorované NS příslušných dsDNA, teplotní mapy ostatních NS jsou uvedeny v příloze 22.

Tabulka 4 Kolizní průřezy dsDNA při 25 °C. V tabulce jsou uvedeny kolizní průřezy (\AA^2) pro všechny pozorované nábojové stavy (z) dsDNA v pozitivním a negativním módu ionizace.

Vzorek	Mód ionizace	z	CCS (\AA^2)
C-MYC exon	Pozitivní	5+	890
		6+	960
	Negativní	5-	910
		6-	950
C-MYC enhancer	Pozitivní	5+	900
		6+	990
	Negativní	5-	910
		6-	940
DAF-16	Pozitivní	5+	830
		6+	930
	Negativní	4-	810
		5-	830

5.3.2.2 Zahřívání sprejovaného roztoku proteinů

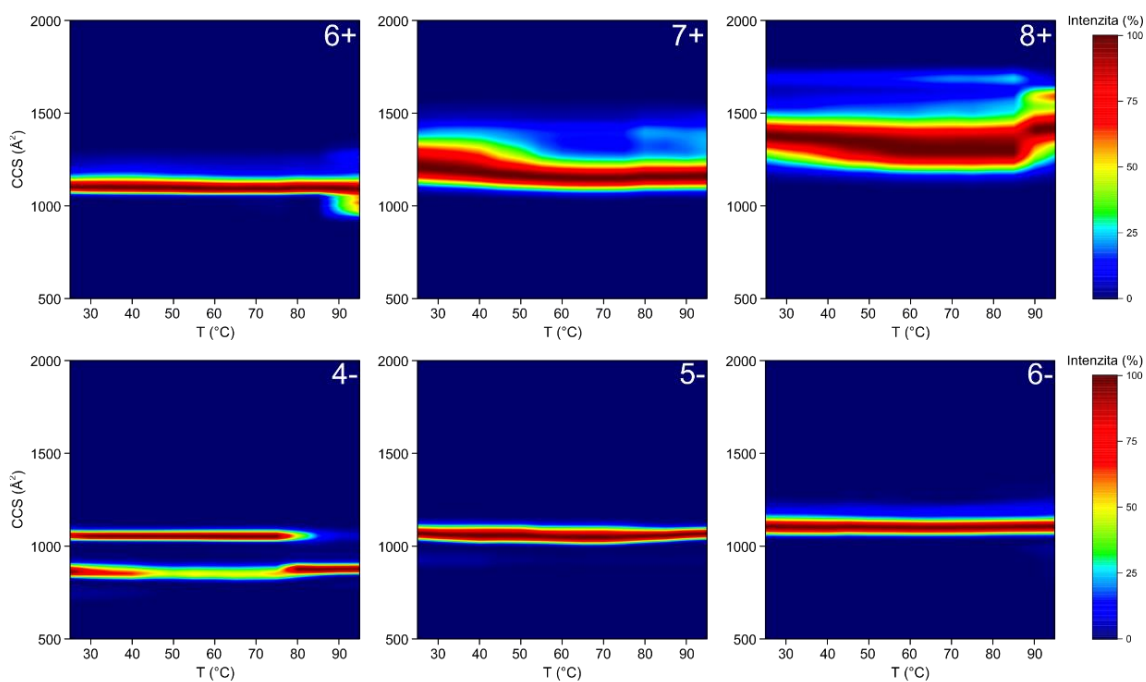
Při vT-nESI obou proteinů, byly na rozdíl od dsDNA, pozorovány strukturální změny v rámci jednoho nábojového stavu. U proteinu TEAD1-DBD (obr. 31 na str. 77) v negativním módu ionizace u NS 4- byly při teplotě 25 °C patrné dvě populace, jedna odpovídající CCS zhruba 900 \AA^2 a druhá s větším kolizním průřezem cca 1100 \AA^2 . Při zvýšení teploty nad 80 °C už byla patrná pouze populace s nižším kolizním průřezem, zhruba 900 \AA^2 . U nábojového stavu 5- i 6- nebyly u DNA-vazebné domény TEAD1 pozorovány strukturální změny, jelikož nedošlo ke změně kolizního průřezu, který byl přibližně 1100 \AA^2 při 25 i 95 °C. V pozitivním módu ionizace byly u TEAD1-DBD pozorovány výrazné změny v kolizním průřezu u NS 7+ a 8+. U NS 6+, který měl obdobně jako v negativním módu ionizace CCS přibližně 1100 \AA^2 , je patrná změna pouze při teplotě nad 90 °C.

Při vT-nESI IM-MS u FOXO4-DBD (obr. 32 na str. 77) byly obdobně, jako pro protein TEAD1 zaznamenány strukturální změny v obou módech ionizace. V pozitivním módu ionizace nebyly u NS 6+ a 7+ s CCS přibližně 1200 \AA^2 zaznamenány výrazné změny v kolizním průřezu. Zatímco u vyšších nábojových stavů 8+ a 9+ byla patrná širší distribuce kolizních průřezů, přičemž byly pozorovány i její změny. U nábojového stavu 9+ byla při teplotě 25 °C intenzita signálu odpovídajícího CCS přibližně 2000 \AA^2 nižší než 50 %. Se zvyšující se teplotou docházelo k nárůstu intenzity tohoto signálu, až na více než 75 % při 90 °C. V negativním módu ionizace byly u NS 5- při teplotě 25 °C patrné dvě populace s CCS přibližně 1000 a 1200 \AA^2 , se zvyšující se teplotou byl pozorován ubytok

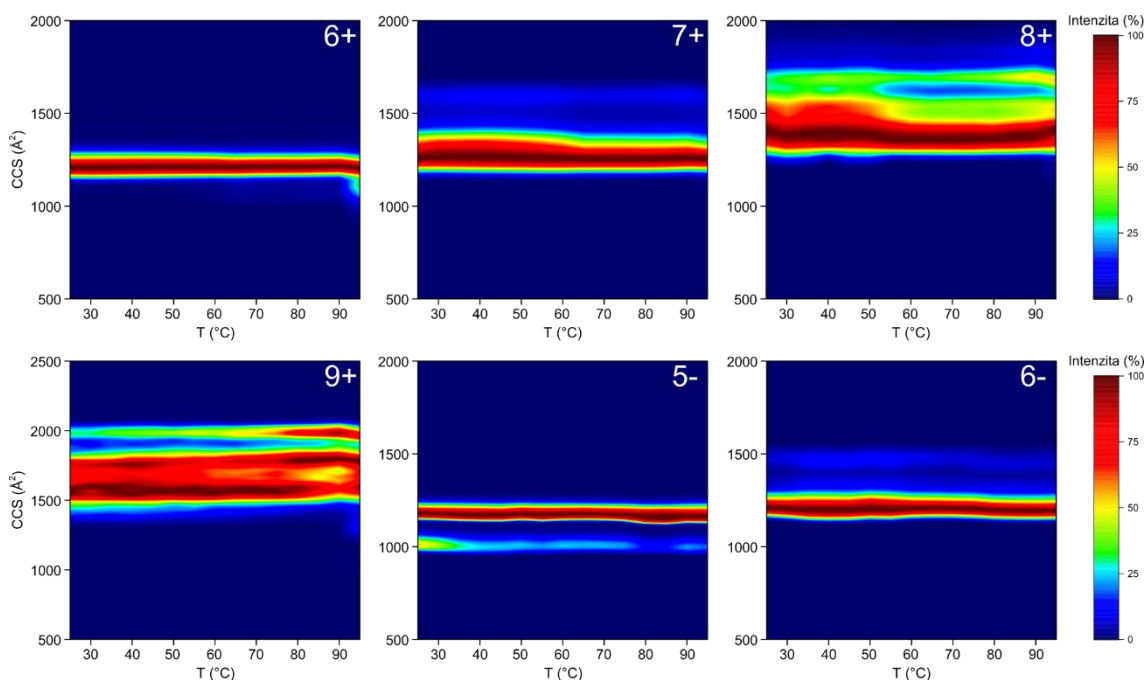
intenzity signálu u menšího kolizního průřezu. Stanovené kolizní průřezy všech nábojových stavů obou proteinů jsou uvedeny v tab. 5.

Tabulka 5 Kolizní průřezy proteinů při 25 °C. V tabulce jsou uvedeny kolizní průřezy (\AA^2) pro všechny pozorované nábojové stavy (z) proteinů TEAD1-DBD a FOXO4-DBD v pozitivním a negativním módu ionizace. V případě, že je pro jeden nábojový stav uvedeno více hodnot CCS, bylo třeba proložit IMS spektrum několika Gaussovými křivkami.

Vzorek	Mód ionizace	z	CCS (\AA^2)
TEAD1-DBD	Pozitivní	6+	1110
		7+	1190
			1270
			1370
		8+	1380
		1680	
	Negativní	4-	870
			1060
		5-	1070
			1110
6-		1110	
FOXO4-DBD	Pozitivní	6+	1210
		7+	1250
			1310
			1400
		8+	1540
		1670	
		1570	
	9+	1760	
		1980	
	Negativní	5-	1020
		1180	
		1200	
6-		1240	
	1440		



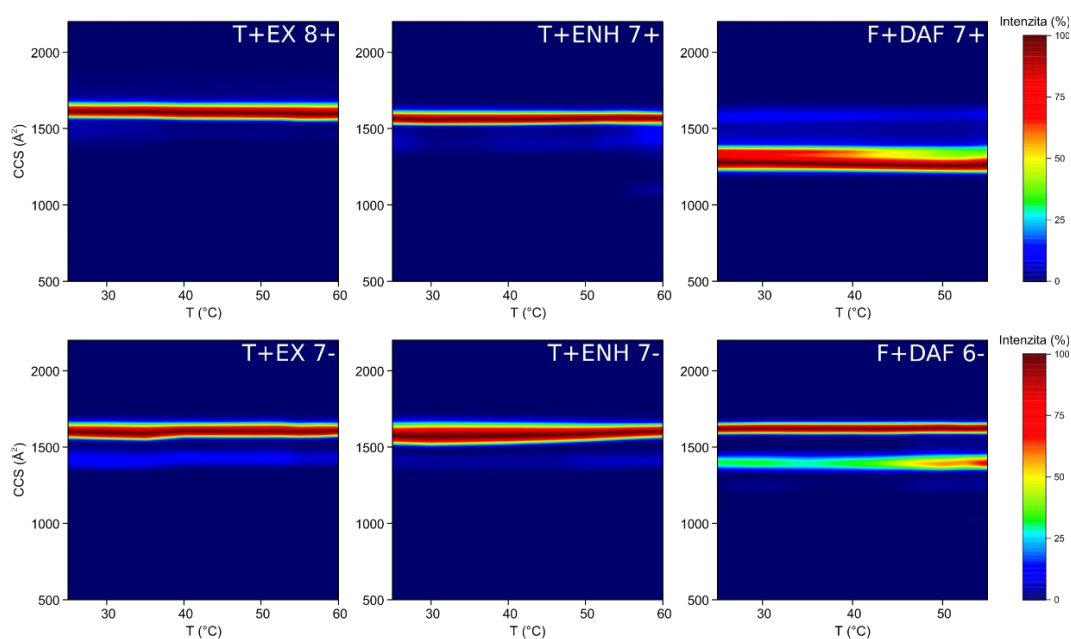
Obrázek 31 Teplotní mapy z *vT-nESI IM-MS* experimentu pro *TEAD1-DBD*. Uvedeny teplotní mapy pro NS 6+ až 8+ a 4- až 6-, v teplotním rozsahu 25–95 °C. Na ose y byl vynesena rozsah kolizních průřezů 500–2000 Å², pro všechny nábojové stavy proteinu. Na obrázku jsou uvedeny všechny pozorované NS proteinu *TEAD1-DBD*.



Obrázek 32 Teplotní mapy z *vT-nESI IM-MS* experimentu pro *FOXO4-DBD*. Uvedeny teplotní mapy pro NS 6+ až 9+ a 5-, 6-, v teplotním rozsahu 25–95 °C. Na ose y byl pro NS 9+ vynesena rozsah kolizních průřezů 500–2500 Å², pro všechny ostatní nábojové stavy proteinu rozsah 500–2000 Å². Na obrázku jsou uvedeny všechny pozorované NS proteinu *FOXO4-DBD*.

5.3.2.3 Zahřívání sprejovaného roztoku protein-DNA komplexů

Výsledky IM-MS experimentu zahřívání sprejovaného roztoku pro protein-DNA komplexy jsou uvedeny na obr. 33. Byly znázorněny teplotní mapy pro nejnižší nábojové stavy protein-DNA komplexů v obou módech ionizace, které byly pozorovány. Teplotní mapy zachycující průběh experimentu pro ostatní NS jsou uvedeny v přílohách 23 a 24. Kolizní průřezy získané z IMS spekter pro 25 °C jsou uvedeny v tab. 6 na str. 9. Z obr. 33 je patrné odlišné chování u TEAD1 a FOXO4-DNA komplexů. Pokud nedošlo k rozpadu komplexu v důsledku perturbace, měly TEAD1-DNA komplexy v pozitivním i negativním módu ionizace kolizní průřezy přibližně 1600 Å². V průběhu zahřívání nebyly u žádného z TEAD1-DNA komplexů zaznamenány výrazné změny v CCS. Avšak u komplexu FOXO4 s *DAF-16* byly v negativním módu ionizace při 25 °C (F+DAF 6-) pozorovány dvě populace CCS, odpovídající přibližně 1400 a 1600 Å². Se zvyšující se teplotou docházelo ke zvyšování intenzity signálu menšího kolizního průřezu z cca 25 % na více než 75 %.



Obrázek 33 Teplotní mapy z vT-nESI IM-MS experimentu pro protein-DNA komplexy. Pro komplex proteinu TEAD1 s C-MYC exonem (T+EX) jsou uvedeny NS 8+ a 7-, pro TEAD1 a C-MYC enhancer (T+ENH) NS 7+ a 7-. Pro oba TEAD1-DNA komplexy v teplotním rozsahu 25–60 °C. Pro FOXO4-DBD komplex s DAF-16 jsou uvedeny teplotní mapy pro NS 7+ a 6- v teplotním rozsahu 25–55 °C. Na ose y byl ve všech případech vynesena rozsah kolizních průřezů 500–2200 Å².

Tabulka 6 Kolizní průřezy protein-DNA komplexů při 25 °C. V tabulce jsou uvedeny kolizní průřezy (\AA^2) pro všechny pozorované nábojové stavy (z) protein-DNA komplexů v pozitivním a negativním módu ionizace. V případě, že je pro jeden nábojový stav uvedeno více hodnot CCS, bylo třeba proložit IMS spektrum několika Gaussovými křivkami.

Vzorek	Mód ionizace	z	CCS (\AA^2)
TEAD1-DBD C-MYC exon	Pozitivní	8+	1620
		9+	1660
		10+	1730 1850
	Negativní	7-	1420
		8-	1600
		9-	1610 1650
TEAD1-DBD C-MYC enhancer	Pozitivní	7+	1570
		8+	1590
		9+	1650
	Negativní	7-	1580
		8-	1810
FOXO4-DBD DAF-16	Pozitivní	7+	1600
		8+	1620
		9+	1670
			1740
	Negativní	6-	1400
		7-	1620
		8-	1620 1640

5.3.3 Teoretický výpočet kolizních průřezů

Pomocí softwarového nástroje IMPACT [73], který využívá projekční aproximaci, byly stanoveny kolizní průřezy pro všechny tři dsDNA, oba proteiny a protein-DNA komplexy (tab. 7). Byla též provedena korekce výpočtu projekční aproximace na experimentální hodnoty vynásobením 1,14 – dle publikace [87]. V případě TEAD1-DBD a FOXO4-DBD, u nichž byla pro výpočet využita struktura vyřešená NMR, a tudíž bylo v PDB deponováno více uspořádání, je uveden aritmetický průměr všech vypočtených CCS.

Tabulka 7 *Vypočtené hodnoty kolizních průřezů, pro všechny studované vzorky spolu s modelem, který byl pro výpočet použit. V tabulce jsou uvedeny vypočtené hodnoty CCS_{PA} pro He u všech vzorků, studovaných v této práci. Byly též uvedeny kolizní průřezy vynásobené korekčním faktorem 1,14; který slouží jako korekce projekční aproximace na experimentálně stanovené hodnoty [87].*

Vzorek / Model	CCS_{PA} (\AA^2)	CCS_{PA} (\AA^2) * 1,14
TEAD1-DBD / 2HZD	1280	1460
FOXO4-DBD / 1E17	1130	1290
C-MYC exon / [8]	1030	1180
C-MYC enhancer / [8]	1140	1180
DAF-16 / 3L2C	930	1060
TEAD1 + C-MYC exon / [8]	1590	1820
TEAD1 + C-MYC enhancer / [8]	1600	1830
FOXO4 + DAF-16 / 3L2C	1470	1670

6. DISKUZE

Prvním z cílů této diplomové práce byla rekombinantní exprese a purifikace DNA-vazebné domény proteinu TEAD1, u níž byla v porovnání s bakalářskou prací (BP) [75] provedena optimalizace protokolu. Změny se týkají: objemu LB média a teplotě při expresi proteinu (2 l – BP a 4 l – DP; 32 °C – BP a 18 °C – DP), použití kolony Nuvia IMAC s imobilizovanými nikelnatými ionty pro obě afinitní chromatografie (v BP byla použita kolona naplněná Talon Superflow s imobilizovanými kobaltnatými kationty), gradientové eluce při první afinitní chromatografii a zařazení chromatografie na iontoměniči.

Výtěžek po první afinitní chromatografii byl 9,9 mg (11 ml; 0,9 mg/ml) v BP, v porovnání s 29 mg (20 ml; 1,45 mg/ml) v této práci. Důvodem většího výtěžku je především provedení exprese ve 4 l LB média (oproti původním 2 l). Jako v BP bylo pracováno ve čtyřech Erlenmayerových baňkách o stejné velikosti, avšak v tomto případě se záhyby ve stěnách, které umožňují lepší aeraci a míchání kultury [88]. Bylo tudíž možné zachovat počet lahví, ale zvětšit objem LB média. Dalším faktorem ovlivňujícím výtěžek může být změna teploty při expresi proteinu z 32 °C na 18 °C [89]. Výtěžek mohl být ovlivněn také odlišným provedením IMAC, použitím jiné kolony a eluce gradientem. Jak je patrné porovnáním obr. 16 na str. 45, dráha 4 v BP (též uveden jako příloha 25) a obr. 16 na str. 56, v obou případech protein po první IMAC obsahoval kontaminace z bakteriálního lyzátu o nižších i vyšších relativních molekulových hmotnostech. Vzhledem k tomu, že v obou drahách nebylo nanášeno stejné množství proteinu, není možné obsah kontaminací přímo porovnat.

Hlavní změnou v optimalizovaném purifikačním protokolu bylo zařazení chromatografie na iontoměniči (záznam viz obr. 15 na str. 56). Výsledek tohoto purifikačního kroku je zřejmý z porovnání nanášky na gelovou permeační chromatografii v BP (obr. 16 na str. 45, dráha 5; též uveden jako příloha 25) a DP (obr. 18 na str. 57; dráha 1). V případě dráhy 5 (příloha 25) bylo pozorováno velké množství kontaminujících proteinů z bakteriálního lyzátu o nižších a vyšších relativních molekulových hmotnostech, zatímco v případě dráhy 1 (obr. 18 na str. 57), po IEX, byly pozorovány pouze tři výrazné pruhy kontaminujících proteinů, dva s vyšší a jeden s nižší relativní molekulovou hmotností. Je též patrný rozdíl v chromatogramu z gelové permeační chromatografie (v obou případech absorbance při 280 nm – modrá křivka). Zatímco v BP (obr. 15 na str. 44, též uveden jako

příloha 26) byly pozorovány tři píky, s elučními objemy 9; 13 a 18 ml, přičemž první patřil kontaminujícím proteinům z bakteriálního lyzátu, druhý purifikovanému TEAD1-DBD a třetí imidazolu, jelikož zároveň došlo k nárůstu konduktivity. V této práci (obr. 17 na str. 57) byly pozorovány pouze dva píky s elučními objemy 12,5 a 17,5 ml, pro exprimovaný protein, respektive imidazol. Jelikož na chromatogramu nejsou píky kontaminantů z bakteriálního lyzátu, je zřejmé, že byly odstraněny díky chromatografii na iontoměničích. Celkový výtěžek DNA-vazebné domény TEAD1 činil 3,4 mg (0,9 mg v BP). Je proto patrné, že optimalizace purifikačního protokolu přinesla kromě vyšší čistoty proteinu před nanesením na GPC i vyšší výtěžek. Kromě již zmíněných změn při expresi mohlo k vyššímu výtěžku přispět i použití kolony o menším objemu pro druhou afinitní chromatografii. Zatímco v BP byla použita v laboratoři plněná kolona s 5 ml nosiče pro obě afinitní chromatografie, v případě druhé IMAC byla v této práci použita kolona o objemu 1 ml. Díky tomu mohlo dojít ke snížení ztráty při tomto purifikačním kroku a zároveň bylo zamezeno riziku opětovné kontaminace TEAD1-DBD proteiny bakteriálního lyzátu.

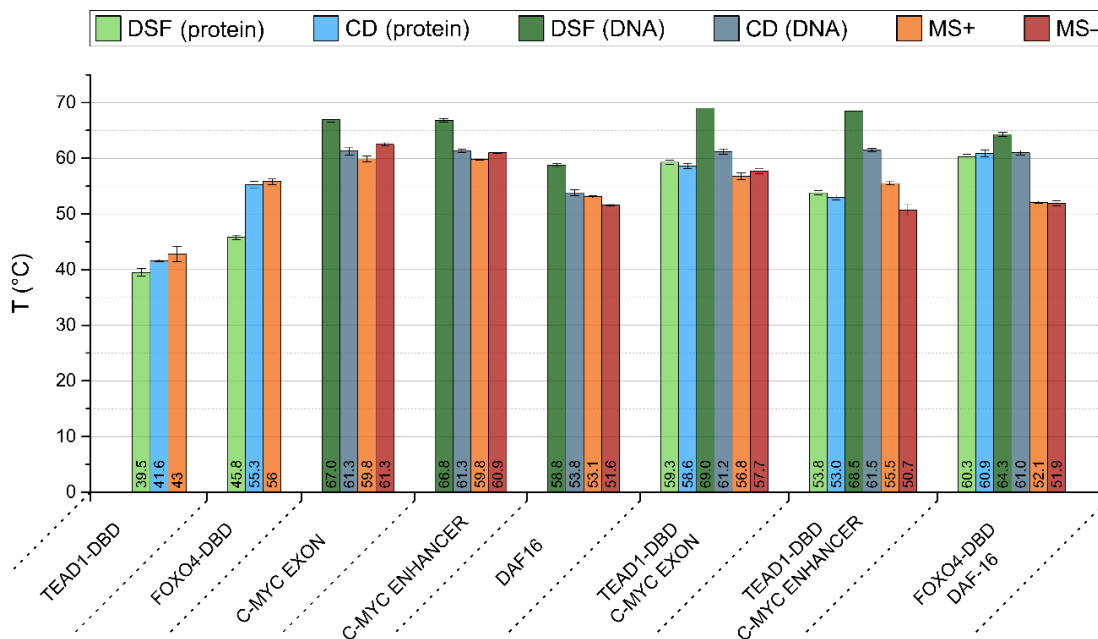
Druhým z cílů této diplomové práce bylo studovat protein-DNA komplexy exprimovaného proteinu TEAD1-DBD, a také DNA-vazebnou doménu transkripčního faktoru FOXO4 a její komplexy s *DAF-16*. Pro charakterizaci TEAD1-DNA komplexu bylo pracováno se dvěma dsDNA, z exonu a enhanceru genu *C-MYC*, které byly vybrány na základě publikace [8]. Oba oligonukleotidy obsahují stejný vazebný motiv (M-CAT) ATTCC [90], [91], ale v opačné orientaci. U *C-MYC* exonu se M-CAT motiv nachází v orientaci od 5' k 3' 5'-GTAGTAATTCCAGCG-3, zatímco u *C-MYC* enhanceru v opačné 5'-GCAATCCTTAAAGCT-3'. Právě tato dvojice byla vybrána, jelikož byla interakce TEAD1-DBD a *C-MYC* enhancer nejsilnější ze studovaných oligonukleotidů, které měly vazebný motiv v orientaci od 3' k 5' [8]. FOXO4-DBD spolu s *DAF-16* (vazebný motiv TTGTTTAC v orientaci od 5' k 3) je též systémem, který byl v naší laboratoři též studován [77]. DNA-vazebná doména TEAD1 se strukturně řadí mezi helix-otočka-helix homeodomény [92] a svou účastí v Hippo signální dráze ovlivňuje např. proliferaci a apoptózu [90]. Proteiny z FOXO rodiny, mezi které patří i FOXO4, jsou transkripčními aktivátory, reagujícími na vnější podněty (např. insulin a oxidativní stress) [93]. Strukturně mají FOX („forkhead box“ transkripční faktory) konzervovanou „wing-helix“ DNA-vazebnou doménu [94]. Cílem této diplomové práce bylo porovnat interakci DNA-vazebné domény TEAD1 s M-CAT motivem v kanonické orientaci od 5' k 3' s opačnou, od 3' k 5'.

Zároveň také porovnat TEAD1 a FOXO4-DNA komplexy, s cílem studovat, zda má odlišná struktura DNA-vazebné domény vliv na chování protein-DNA komplexu při jeho perturbaci teplotními změnami.

Pro charakterizaci těchto protein-DNA komplexů byla zvolena nativní hmotnostní spektrometrie, potažmo nativní hmotnostní spektrometrie ve spojení s iontovou mobilitou v obou módech ionizace. Zatímco MS analýza nukleových kyselin se běžně provádí v negativním módu ionizace, pro nativní hmotnostní spektrometrii proteinů je většinou užíván pozitivní mód [20]. Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat protein-DNA komplexy, proto byla měření provedena v obou módech ionizace. Tepelná denaturace analyzovaných biomolekul byla studována metodou zahřívání sprejovaného roztoku (vT-nESI). Jedná se o techniku, kdy je roztok před MS (IM-MS) analýzou zahříván, a tudíž je možné zachytit změny ve složení, ale i strukturní změny jednotlivých komponent vzorku. V bakalářské práci [75] bylo ukázáno, že je možné tuto techniku aplikovat na dsDNA a protein-DNA komplexy v pozitivním módu ionizace. Avšak byl pozorován velký rozdíl ve zjištěných teplotách tavení mezi *C-MYC* exon a *C-MYC* enhancer, který nebyl v souladu s teoreticky vypočtenými, ani experimentálně zjištěnými výsledky (bylo diskutováno v BP). Proto bylo pro dosažení druhého cíle práce nutné nejprve optimalizovat vT-nESI experiment, tak aby byl reprodukovatelný a získané výsledky korespondovaly se zavedenými biofyzikálními technikami, cirkulárním dichroismem a diferenční skenovací fluorimetrií.

Funkčnost a spolehlivost vT-nESI aparatury byla testována na dsDNA, konkrétně stanovení jejího bodu tavení, který lze určit i jinými technikami a teoreticky vypočíst. Teploty tavení byly stanoveny IDT OligoAnalyzer [95], pro *C-MYC* exon 56,7 °C; *C-MYC* enhancer 56,9 °C a *DAF-16* 51,1 °C. Optimalizace byla provedena na hmotnostním spektrometru Bruker Solarix 15T. Jelikož se jedná o FT-ICR hmotnostní spektrometr, který dosahuje řádově lepšího rozlišení než ToF [96], překonává problém s izotopovým rozlišením u dsDNA, ale i protein-DNA komplexů, který byl nastíněn v diskusi BP. Tedy, že na hmotnostním spektrometru Synapt G2-Si nebylo u dsDNA (potažmo proteinů a protein-DNA komplexů), na rozdíl od ssDNA dosaženo izotopového rozlišení. Proto musela být hmotnostní spektra před výpočtem vyhlazena, což pravděpodobně vnáší nepřesnosti do výpočtu (intenzita píku po vyhlazení je závislá na izotopovém rozlišení). U výsledků z FT-ICR, které jsou uvedeny v této práci, bylo možné poměry y_i , potažmo z_{avg} pro proteiny

vypočíst přímo ze signálu nejintenzivnějšího izotopu a překonat tak problém s vyhlazováním MS spekter. Po dokončení optimalizace byly též provedeny IM-MS experimenty na Waters Synapt G2-Si. V rámci optimalizace experimentu byla aparatura upravena, tak aby byla zakryta a vyhřívána celá kapilára, přidáním výsuvného dílu, který zakrývá úplný konec nESI emitoru, aby nedocházelo k jeho ochlazování (vysunutý červený díl na obr. 13 na str. 50). Dále byla stanovena doba vyhřívání mezi měřeními pro jednotlivé teploty na minimálně 3 min, a též zařazeny 2,5°C kroky (místo 5°C) v okolí teploty tavení, v souladu s [62]. Pomocí optimalizované aparatury byly stanoveny teploty tavení dsDNA (viz obr. 22 na str. 62). Ty byly porovnány s T_m , stanovenými biofyzikálními technikami CD a DSF Mgr. A. Hnízdou, Ph.D. a Mgr. V. Brinsou (obr. 34 na str. 85). V porovnání s BP, kde byl pozorován rozdíl 9 °C, se nově stanovené teploty tavení pro *C-MYC* exon a *C-MYC* enhancer v souladu s ostatními metodami vzájemně výrazně neliší, a to v obou módech ionizace. Z výsledků vT-nESI MS je též patrný rozdíl v T_m mezi *C-MYC* dsDNA s patnácti páry bází a *DAF-16*, který má pouze třináct párů bází, a nižší teploty tavení. Z uvedených výsledků je patrné, že teploty tavení stanovené hmotnostní spektrometrií odpovídají hodnotám z CD a jsou nižší, než je tomu u DSF. V případě DSF může být vyšší výsledná teplota ovlivněna přítomností interkalačního činidla a odlišnými podmínkami provedení experimentu (při DSF byla použita nejvyšší koncentrace vzorku).



Obrázek 34 Porovnání teplot tavení stanovených vT-nESI MS, DSF a CD. Na obrázku jsou uvedeny teploty tavení analyzovaných vzorků, které byly v této diplomové práci stanoveny vT-nESI MS v pozitivním (MS+), respektive negativním módu ionizace (MS-). Dále byly použity hodnoty pro biofyzikální techniky DSF a CD, které byly získány Mgr. A. Hnízdou, Ph.D. a Mgr. V. Brinsou. Pro cirkulární dichroismus byly T_m proteinu (CD protein) získány z elipticity při 222 nm, pro dsDNA (CD DNA) při 249 nm. Diferenční skenovací fluorimetrie proteinu (DSF protein) využívala SYPRO orange a SYBR green pro dsDNA (DSF DNA). Všechny experimenty byly provedeny ve 150 mM octanu amonném, pro 5 μ M (MS), 25 μ M (DSF) a 20 μ M (CD) vzorky.

Jelikož byla měření pro dsDNA s upravenou vT-nESI aparaturou provedena i na hmotnostním spektrometru s TWIMS, byl v této práci zachycen vliv teploty na strukturu dsDNA (obr. 30 na str. 74). Z teplotních map je patrné, že při zahřívání dsDNA nedocházelo ke strukturálním změnám. Získané CCS v pozitivním módu pro všechny tři oligonukleotidy odpovídají těm, jež byly získány v negativním módu ionizace. Experimentálně získané CCS dsDNA jsou nižší než ty vypočtené (tab. 4 na str. 74). To může být způsobeno několika faktory. Prvním je strukturální deformace dsDNA v plynné fázi. V publikaci [97] bylo u dsDNA s dvanácti páry bází pozorováno zmenšení kolizního průřezu o zhruba 20 %, pro 36 párů bází tato hodnota dosáhla až 30 %. V této práci, byly experimentálně stanoveny kolizní průřez obou C-MYC dsDNA přibližně 900 Å², oproti teoreticky vypočteným 1250 Å² (po vynásobení korekčním faktorem pro PA 1,14 [87]), byl tudíž zaznamenán zhruba 28 % rozdíl. V případě DAF-16 je tento rozdíl přibližně 26 %. Pro studované oligonukleotidy s třinácti, respektive patnácti páry bází byly pozorovány vyšší hodnoty,

než pro dvanáctimer v [97], avšak trend zvyšování rozdílu experimentálně stanoveného a vypočteného kolizního průřezu s délkou dsDNA souhlasí. Větší rozdíl mezi experimentálně získanými a teoreticky vypočtenými výsledky, než v [97] by mohl být způsoben odlišným experimentálním uspořádáním. V [97] byla použita iontová mobilita v driftové trubici, umožňující přímé stanovení kolizních průřezů. V této práci byla použita TWIMS, kalibrovaná na nativní proteiny, což mohlo vnést do stanovení kolizních průřezů dsDNA nepřesnost [98]. Dalším důvodem odlišnosti teoreticky vypočtených a experimentálně stanovených kolizních průřezů, může být přepočítání teoreticky vypočtených CCS_{PA} . Experimentálně určená konstanta 1,14 pro přepočítání kolizních průřezů byla stanovena pro proteiny a proteinové komplexy [87], proto nemusí být pro DNA vhodná.

Díky tomu, že byly pomocí vT-ESI MS, respektive IM-MS dosaženy konzistentní výsledky pro triplikáty dsDNA v obou módech ionizace, mohla být technika využita pro studium proteinu a protein-DNA komplexů. Teplota tavení byla pro oba studované proteiny stanovena pouze v pozitivním módu ionizace (obr. 25 na str. 65), výpočtem průměrného nábojového stavu z_{avg} , jako 43 °C a 56 °C, pro TEAD1-DBD, respektive FOXO4-DBD. V negativním módu ionizace nebylo možné teploty tavení stanovit, neboť nedošlo ke změně v distribuci nábojových stavů. Změna průměrného nábojového stavu v pozitivním módu ionizace byla pozorována, jelikož v důsledku strukturních změn způsobených perturbací zahříváním došlo k odhalení bazických reziduí, která mohla být ionizována [44]. Pozorování koresponduje s již publikovanými vT-nESI pracemi [99], ve kterých byly proteiny studovány výhradně v pozitivním módu ionizace. V případě TEAD1 a FOXO4 DNA-vazebných domén, může být pozorovaná změna průměrného nábojového stavu pouze v pozitivním módu ionizace ovlivněna i převahou pozitivně nabitých reziduí v primární struktuře obou proteinů. U FOXO4 s teoretickým $pI = 10,06$ se v sekvenci nachází osm negativně nabitých reziduí, dvě kyseliny asparagové a šest glutamových kyselin v porovnání s celkem šestnácti bazickými lysiny a argininy [76]. Pro protein TEAD1 je teoretické $pI = 9,84$ a poměr negativně a pozitivně nabitých reziduí 11:17, ve prospěch pozitivně nabitých. Z porovnání obr. 23 na str. 63 pro TEAD1-DBD a obr. 24 na str. 64 pro FOXO4-DBD a obr. 12 na str. 32 je patrné, že u obou proteinů studovaných v této práci nebyly pozorovány tak výrazné změny v nábojové distribuci, jako v případě thioredoxinu. Tato skutečnost může být důsledkem toho, že jsou obě DNA-vazebné domény značně flexibilní [100], [101], a proto se při rozbalování mohou chovat

odlišně než jiné, globulární, proteiny, kterým se většina dosavadních publikací v tomto oboru zabývala. Důvodem odlišnosti teplot tavení stanovených CD, DSF a vT-nESI MS pro proteiny (obr. 34 na str. 85), je patrně způsob, jakým tyto techniky na perturbovaný protein nahlíží. V případě MS byla studována již zmíněná změna průměrného nábojového stavu, způsobená odhalením bazických reziduí. Při DSF dochází v důsledku ztráty terciární struktury k interakci fluorescenční značky s hydrofobními rezidui [102], zatímco cirkulární dichroismus studuje výhradně změny v sekundárních strukturách [103]. Jelikož dochází při rozbalování proteinů nejprve ke ztrátě terciární struktury ve stavu tzv. „roztavené globule“ a poté až k rozpadu sekundárních struktur [104], je patrné, že každá z výše uvedených technik stanoví odlišnou T_m .

Již bylo nastíněno, že se při vyšších teplotách (obr. 23 na str. 63 pro TEAD1-DBD a obr. 24 na str. 64 pro FOXO4-DBD) u obou proteinů v pozitivním módu ionizace objevila rozbalená distribuce s vyššími nábojovými stavy. To, že se v případě vyšších nábojových stavů pravděpodobně jedná o rozbalený protein je nejen v souladu s dostupnými publikacemi [99], ale i patrné z výsledků IM-MS experimentu (obr. 31 – TEAD1-DBD a 32 – FOXO4-DBD oba na str. 77 a tab. 6 na str. 76). Pro oba proteiny v pozitivním módu ionizace byly pozorovány jak strukturní změny v rámci jednoho nábojového stavu (NS 7+ a 8+ pro TEAD1 na obr. 31, respektive NS 8+ a 9+ pro FOXO4 na obr. 32, oba na str. 77), tak nárůst CCS se zvyšujícím se nábojovým stavem. U proteinu TEAD1 byl kolizní průřez NS 6+ 1110 Å², zatímco největší CCS v NS8+ byl stanoven 1680 Å² (hodnoty z tab. 5 na str. 76). Dále je zejména u FOXO4-DBD (NS 8+ a 9+ na obr. 32 na str. 77, kde byl pozorován široký pás CCS s více maximy) patrné, že protein ve vyšších nábojových stavech není strukturně homogenní, ale vyskytuje se ve více konformacích. Strukturní změny byly zaznamenány u obou proteinů i v negativním módu ionizace a to u (NS 4- a 5-). Kolizní průřez pro TEAD1-DBD byl experimentálně stanoven 1100 Å² (NS 6+ a 6-), který lépe odpovídá hodnotě CCS_{PA} bez užití přepočtu s užitím konstanty 1,14 (1280 Å²). Což by mohlo značit nevhodnost použití tohoto přepočtu. Avšak pro DNA-vazebnou doménu FOXO4 teoreticky stanovená hodnota kolizního průřezu po přepočtu (1290 Å²) lépe odpovídá získaným výsledkům, pro NS6+ a 7+, potažmo 6- (viz tab. 7 na str. 80). Důvodem odlišnosti experimentálně stanovených výsledků pro TEAD1-DBD, oproti vypočteným hodnotám, může být částečná odlišnost sekvence modelu 2HZD [84] oproti studované. Model 2HZD je o pět aminokyselin kratší a sekvence začíná na deváté aminokyselině

exprimovaného proteinu. Druhou možnou příčinou je již zmíněná flexibilita proteinu [100], zejména pak přítomnost dynamické L1 smyčky, která je v NMR strukturách extendovaná.

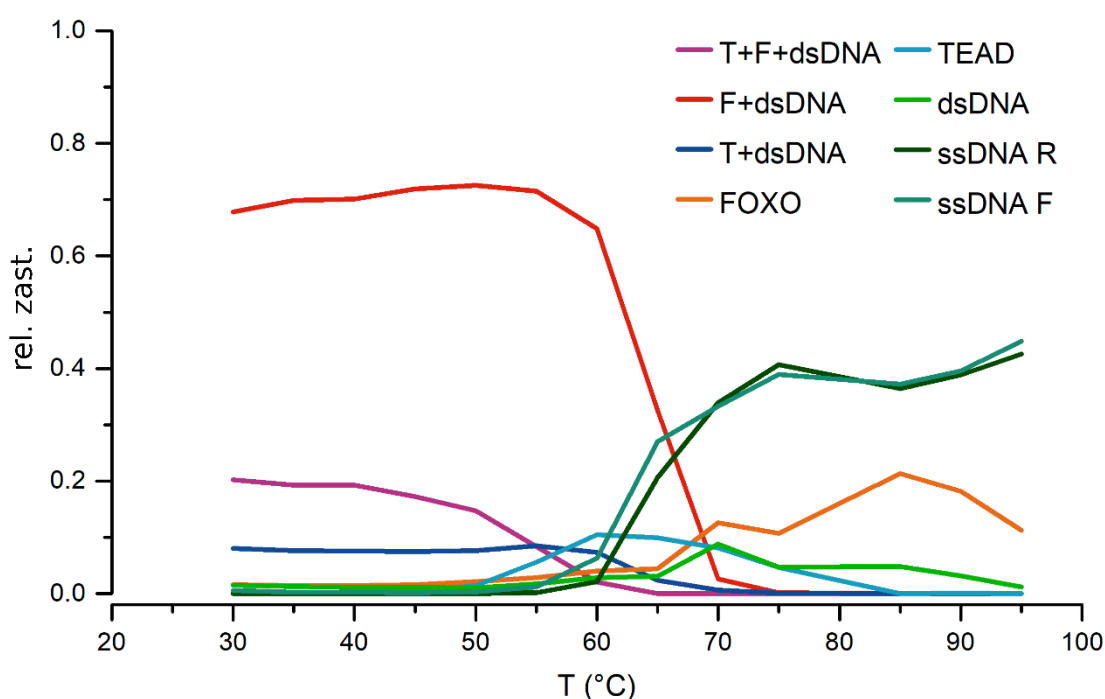
Hlavním cílem práce bylo charakterizovat protein-DNA komplexy technikou zahřívání sprejovaného roztoku. Jedná se o komplexnější vzorky než v případě volných proteinů a dsDNA, u nichž jsou patrné výhody této techniky. Z porovnání vT-ESI MS výsledků pro dsDNA a protein-DNA komplexy (obr. 34 na str. 85) vyplývá, že u volné DNA byly menší rozdíly v teplotách tavení stanovených v pozitivním a negativním módu ionizace. Přesto je z výsledků pro protein-DNA komplexy možné usuzovat, že nejstabilnější z analyzovaných protein-DNA komplexů byl TEAD1 *C-MYC* exon, s teplotou tavení kolem 57 °C pro oba módy ionizace. Je tudíž patrné, že interakce DNA-vazebné domény proteinu TEAD1 s M-CAT vazebnou sekvencí v orientaci od 5' k 3' je při perturbaci zahříváním stabilnější, než je tomu v případě 3' k 5'. Tyto výsledky, poukazující na vyšší stabilitu komplexu s vazebným motivem od 5' k 3', korespondují s HDX a nativní hmotnostní spektrometrií, které byly publikovány [8]. Uvedené publikaci odpovídají též poměry y_i pro 25 °C obou protein-DNA komplexů, popisující podíl komponent vázaných v protein-DNA komplexu. Pro komplex s *C-MYC* exonem byly vypočteny y_i v rozmezí 0,65 a 0,95, zatímco pro *C-MYC* enhancer 0,5-0,7, které naznačují že ve vzorku s *C-MYC* exonem bylo více komponent vázáno ve formě komplexu. Z výsledků je též patrné, že stejně, jako byl *DAF-16* méně stabilní, než oba *C-MYC* oligonukleotidy, byl i FOXO4-DNA komplex s $T_m \sim 52$ °C pro oba módy ionizace méně teplotně stabilní. V případě TEAD1-DNA komplexu je z vT-nESI experimentu patrná stabilizace proteinu vazbou na DNA. Zatímco samotný protein má teplotu tavení 43 °C, oba protein-DNA komplexy se rozpadají při teplotách vyšších než 50 °C. K rozpadu komplexu tak patrně dochází v důsledku strukturní perturbace proteinu. Z teplot tavení samotné DNA a hmotnostních spekter (obr. 26 na str. 67 a obr. 27 na str. 68, pro komplex TEAD1-DBD s *C-MYC* exonem, respektive enhancerem) je patrné, že se protein-DNA komplex rozpadá na protein a dsDNA, která až při teplotách vyšších než 60 °C disociuje na ssDNA. Avšak pokud je TEAD1-DNA komplex přítomný, zachovává si svou strukturu, to je zřejmé z teplotních map (obr. 33 na str. 78), kde nebyly pro TEAD1 DNA-komplexy zaznamenány strukturní změny. Na rozdíl od TEAD1-DNA komplexů, u komplexu FOXO4 s *DAF-16* nebyla stabilizace proteinu pozorována. Volný protein FOXO4-DBD má teplotu tavení 56 °C, avšak rozpad protein-DNA komplexu nastal již při ~ 52 °C, což odpovídá teplotě tavení volné dsDNA. Oproti TEAD1-DNA komplexům, byly

zaznamenány i strukturní změny při perturbaci zahříváním v obou módech ionizace (obr. 33 na str. 78), je tudíž možné, že byl rozpad komplexu způsoben strukturní perturbací u proteinu či dsDNA, nebo v důsledku nižší stability dsDNA. Z výsledků je zřejmá odlišnost mezi komplexy obou DNA-vazebných domén transkripčních faktorů. U FOXO4 *DAF-16* nebyla pozorována výrazná stabilizace tvorbou protein-DNA komplexu, navíc si při zahřívání nezachoval protein-DNA komplex svou konformaci.

Ze srovnání na obr. 34 na str. 85 je patrné, že pro TEAD1-DNA komplexy výsledky získané biofyzikálními technikami odpovídají vT-ESI MS experimentu. Pro oba protein-DNA komplexy došlo k stabilizaci proteinu vazbou na dsDNA, přičemž pro komplex s *C-MYC* exonem je tato stabilizace výraznější. Též potvrzují navrhovaný mechanismus rozpadu komplexu, tedy že nejprve dochází k rozvolnění proteinu a uvolnění dsDNA, která až při teplotách vyšších než 60 °C disociuje ssDNA. Na druhou stranu, pro FOXO4 *DAF-16* byl zaznamenán takřka 10 °C rozdíl mezi teplotami tavení stanovenými MS a biofyzikálními technikami (obr. 34 na str. 85). Vysvětlení tohoto jevu by mohlo být dáno rozdílem v metodách, jimiž byly protein-DNA komplexy studovány. Zatímco biofyzikální techniky umožňují sledovat pouze jednotlivé komponenty, zahřívání sprejovaného roztoku, jako jediná z použitých technik opravdu nahlíží na rozpad komplexu. Je tak možné, že v případě FOXO4 *DAF-16* komplexu (obr. 33 na str. 78) došlo vlivem strukturních změn na straně proteinu či DNA k jeho rozpadu, avšak obě komponenty byly v roztoku stále přítomné v strukturně perturbované formě, která ale nebyla biofyzikálními technikami zachytitelná. Vzhledem k nízké teplotní stabilitě *DAF-16*, je možné, že oligonukleotid s pouze třinácti páry bází nemusí být ideálním modelem pro studium a bylo by vhodné toto chování ověřit na FOXO4-DNA komplexu, s DNA s vyšší teplotou tavení.

Zahřívání sprejovaného roztoku ve spojení s IM-MS je relativně novou technikou, nabízející alternativu k biofyzikálním metodám DSF a CD. Jak bylo ukázáno v této práci, zatímco pomocí vT-nESI IM-MS můžeme z jednoho experimentu stanovit teplotu tavení protein-DNA komplexu, zachytit případně strukturní změny při jeho zahřívání a sledovat zastoupení jednotlivých komponent ve vzorku, v případě DSF je pro studium protein-DNA komplexu třeba provést dva oddělené experimenty. Jeden s interkalačním barvivem pro dsDNA a druhý s fluorescenčním činidlem interagujícím s hydrofobními rezidui. V případě CD stačí provést pouze jeden experiment, avšak stejně jako v případě DSF je získána separátní informace o proteinu a o DNA, nikoli o celém protein-DNA komplexu.

Je tudíž patrné, že pomocí vT-nESI můžeme získat informace, které by byly biofyzikálními technikami jen těžko dostupné, nebo vyžadovaly využití dalších metod, jako např. SAXS, pro získání strukturní informace. V kontextu této diplomové práce, zabývající se transkripčními faktory, je perspektivní potenciální aplikace na kolokalizaci dvou transkripčních faktorů na jedné dsDNA, která byla pro TEAD1 a FOXO4 pozorována [105]. V případě ternárního komplexu dvou proteinů s DNA by mohla technika vT-ESI pomoci charakterizovat složení vzorku jednotlivých protein-DNA komplexů v porovnání s ternárním komplexem, přičemž vT-nESI MS umožňuje stanovit, který z proteinů disociuje z komplexu nejprve (předběžné výsledky získané v naší laboratoři na obr. 35).



Obrázek 35 vT-nESI dvou transkripčních faktorů na jedné dsDNA. Graf znázorňuje relativní zastoupení (rel. zast.) komponent vzorku v závislosti na teplotě. Vypočtené body byly pro přehlednost spojeny přímkami. **T+F+dsDNA** značí ternární komplex dvou proteinů interagujících s jednou dsDNA, **F+dsDNA** a **T+dsDNA** je FOXO, respektive TEAD1-DNA komplex, **FOXO** a **TEAD** nevázané proteiny, **dsDNA** volnou dvouvláknovou DNA a **ssDNA R** a **F** příslušné jednovláknové DNA.

Experiment byl proveden na Bruker solariX 15T, stejně jak je uvedeno v kap. 4.2.3 na str. 49.

7. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat protein-DNA komplexy nativní hmotnostní spektrometrií ve spojení s iontovou mobilitou, konkrétně technikou zahřívání sprejovaného roztoku (vT-nESI). Nejprve byla provedena rekombinantní exprese jednoho ze studovaných proteinů: DNA-vazebné domény TEAD1. Protein byl následně purifikován afinitní chromatografií, chromatografií na iontoměničích a gelovou permeační chromatografií s výtěžkem 3,4 mg, čímž byl splněn první cíl práce.

Druhým cílem práce bylo studovat exprimovaný protein TEAD1-DBD spolu s dvouvláknovými DNA z exonu a enhanceru genu *C-MYC* hmotnostní spektrometrií a hmotnostní spektrometrií ve spojení s iontovou mobilitou v pozitivním a negativním módu ionizace. Obdobně též charakterizovat i DNA-vazebnou doménu FOXO4 a její interakci s *DAF-16*. Nejprve byly pomocí vT-nESI MS v pozitivním a negativním módu ionizace stanoveny teploty tavení *C-MYC* exon ($T_{m+} 59,8 \pm 0,5$ °C; $T_{m-} 61,3 \pm 0,1$ °C), *C-MYC* enhancer ($T_{m+} 59,8 \pm 0,1$ °C; $T_{m-} 60,9 \pm 0,1$ °C) a *DAF-16* ($T_{m+} 51,6 \pm 0,1$ °C; $T_{m-} 53,1 \pm 0,1$ °C). Dále byly pomocí výpočtu průměrného nábojového stavu v pozitivním módu ionizace stanoveny $T_{m+;TEAD1} = 43 \pm 1$ °C a $T_{m+;FOXO4} = 56 \pm 1$ °C a IM-MS zaznamenány strukturní změny při zahřívání obou proteinů v obou módech ionizace. V neposlední řadě byla technika zahřívání sprejovaného roztoku aplikována na protein-DNA komplexy TEAD1-DBD *C-MYC* exon ($T_{m+} 56,8 \pm 0,6$ °C; $T_{m-} 57,7 \pm 0,5$ °C), TEAD1-DBD *C-MYC* enhancer ($T_{m+} 55,5 \pm 0,3$ °C; $- 51 \pm 1$ °C) a FOXO4 *DAF-16* ($T_{m+} 51,8 \pm 0,5$ °C; $T_{m-} 52,1 \pm 0,2$ °C). Z výsledků je patrné, že TEAD1 *C-MYC* exon je stabilnější než komplex s enhancerem. Též byl zaznamenán rozdíl mezi TEAD1 a FOXO4-DNA komplexy, u TEAD1-DBD byla v případě obou komplexů pozorována stabilizace proteinu vazbou na DNA, zatímco u FOXO4 tento efekt patrný nebyl. Zatímco si oba komplexy TEAD1-DBD zachovávaly při vT-nESI svou strukturu, u FOXO1-DBD *DAF-16* byly vlivem perturbace pozorovány strukturní změny v obou módech ionizace. Experimentálně stanovené kolizní průřezy byly porovnány s teoreticky hodnotami vypočtenými programem IMPACT pracujícím na základě projekční aproximace.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] M. Faini; F. Stengel; and R. Aebersold: The Evolving Contribution of Mass Spectrometry to Integrative Structural Biology. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **27**:6, 966–974, (2016).
- [2] K. R. Acharya; M. D. Lloyd: The advantages and limitations of protein crystal structures. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**:1, 10–14, (2005).
- [3] G. M. Colore; A. M. Gronenborn: New methods of structure refinement for macromolecular structure determination by NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:11, 5891–5898 (1998).
- [4] K. Murata; M. Wolf: Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic biological macromolecules. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1862**:2, 324–334, (2018)
- [5] S. J. Ziegler; S. J. B. Mallinson; P. C. st. John; Y. J. Bomble: Advances in integrative structural biology: Towards understanding protein complexes in their cellular context. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **19**:214 (2021).
- [6] D. S. Chorev; G. Ben-Nissan; M. Sharon, Exposing the subunit diversity and modularity of protein complexes by structural mass spectrometry approaches. *Proteomics*, **15**:16, 2777 (2015).
- [7] A. Marchand; F. Rosu; R. Zenobi; V. Gabelica: Thermal Denaturation of DNA G-Quadruplexes and Their Complexes with Ligands: Thermodynamic Analysis of the Multiple States Revealed by Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **140**:39, 12553–12565, (2018).
- [8] R. Filandrová; K. Vališ; J. Černý; J. Chmelík; L. Slavata; J. Fiala; M. Rosůlek; D. Kavan; P. Man; T. Chum; M. Cebecauer; D. Fabris; P. Novák: Motif orientation matters: structural characterization of TEAD1 recognition of genomic DNA. *Structure*, **29**:4, 345-356 (2020).
- [9] T. M. Allison; C. Bechara: Structural mass spectrometry comes of age: new insight into protein structure, function and interactions. *Biochem. Soc. Trans.* **47**:1, 317–327 (2019).
- [10] B. Domon; R. Aebersold: Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, **312**:5771, 212–217 (2006).
- [11] J. L. Benesch; B. T. Ruotolo; D. A. Simmons; C. V. Robinson: Protein complexes in the gas phase: technology for structural genomics and proteomics. *Chem. Rev.* **107**:8, 3544–3567 (2007).
- [12] M. Karas; F. Hillenkamp: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**:20, 2299–2301 (1988).
- [13] J. B. Fenn; M. Mann; C. K. Meng; S. F. Wong; C. M. Whitehouse: Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**:4926, 64–71 (1989).

- [14] A. L. Burlingame; R. K. Boyd; S. J. Gaskell: Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **66**, 634-683 (1994).
- [15] J. Snijder; A. J. R. Heck: Analytical approaches for size and mass analysis of large protein assemblies. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **7**, 43–64 (2014).
- [16] J. S. Brodbelt: Ion Activation Methods for Peptides and Proteins. *Anal. Chem.* **88**:1, 30-51 (2016).
- [17] J. Wiesner; T. Premisler; A. Sickmann: Application of electron transfer dissociation (ETD) for the analysis of posttranslational modifications. *Proteomics*, **8**:21, 4466–4483 (2008).
- [18] R. A. Zubarev; N. L. Kelleher; F. W. McLafferty: Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process. *J. Am. Chem. Soc.* **120**:13, 3265–3266 (1998).
- [19] J. E. P. Syka; J. J. Coon; M. J. Schroeder; J. Shabanowitz; D. F. Hunt: Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**:26, 9528–9533 (2004).
- [20] N. B. Cech; C. G. Enke: Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* **20**:6, 362–387 (2001).
- [21] M. S. Wilm; M. Mann: Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **136**:2–3, 167–180, (1994)
- [22] M. Wilm; M. Mann: Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* **68**:1, 1–8 (1996).
- [23] M. Karas; U. Bahr; T. Dülcks: Nano-electrospray ionization mass spectrometry: Addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **366**:6–7, 669–676 (2000).
- [24] R. Juraschek; T. Dülcks; M. Karas: Nanoelectrospray—more than just a minimized-flow electrospray ionization source. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**:4, 300–308 (1999).
- [25] A. J. Chetwynd and A. David, A review of nanoscale LC-ESI for metabolomics and its potential to enhance the metabolome coverage. *Talanta*, **182**, 380–390 (2018).
- [26] W. F. Smyth; P. Brooks: A critical evaluation of high performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the detection and determination of small molecules of significance in clinical and forensic science. *Electrophoresis*, **25**:10–11, 1413–1446 (2004).
- [27] A. J. R. Heck: Native mass spectrometry: A bridge between interactomics and structural biology. *Nat. Methods*, **5**:11, 927–933 (2008).
- [28] N. L. Kelleher; H. Y. Lin; G. A. Valaskovic; D. J. Aaserud; and E. K. Fridriksson; F. W. McLafferty: Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **121**:4, 806–812 (1999).

- [29] X. R. Liu; M. M. Zhang; M. L. Gross: Mass Spectrometry-Based Protein Footprinting for Higher-Order Structure Analysis: Fundamentals and Applications. *Chem. Rev.* **120**:10, 4355–4454 (2020).
- [30] G. R. Masson *et al.*: Recommendations for performing, interpreting and reporting hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) experiments. *Nat. Methods*, **16**:7, 595–602 (2019).
- [31] E. A. Hodge; M. A. Benhaim; K. K. Lee: Bridging protein structure, dynamics, and function using hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry. *Protein Sci.* **29**:4, 843–855 (2020).
- [32] J. R. Engen; E. A. Komives: Complementarity of Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry and Cryo-Electron Microscopy. *Trends Biochem. Sci.* **45**:10, 906–918, (2020).
- [33] G. R. Masson; M. L. Jenkins; J. E. Burke: An overview of hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) in drug Discovery. *Expert Opin. Drug. Discov.* **12**:10, 981–994, (2017).
- [34] A. Leitner: A review of the role of chemical modification methods in contemporary mass spectrometry-based proteomics research, *Anal. Chim. Acta*, **1000**, 2–19 (2018).
- [35] G. Xu; M. R. Chance: Radiolytic Modification of Acidic Amino Acid Residues in Peptides: Probes for Examining Protein-Protein Interactions. *Anal. Chem.* **76**:5, 1213–1221 (2004).
- [36] K. S. Li; L. Shi; M. L. Gross: Mass Spectrometry-Based Fast Photochemical Oxidation of Proteins (FPOP) for Higher Order Structure Characterization. *Acc. Chem. Res.* **51**:3, 736–744 (2018).
- [37] K. S. Li; D. L. Rempel; M. L. Gross: Conformational-Sensitive Fast Photochemical Oxidation of Proteins and Mass Spectrometry Characterize Amyloid Beta 1-42 Aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **138**:37, 12090–12098, (2016).
- [38] A. Leitner; M. Faini; F. Stengel; R. Aebersold: Crosslinking and Mass Spectrometry: An Integrated Technology to Understand the Structure and Function of Molecular Machines. *Trends Biochem. Sci.* **41**:1, 20–32 (2016).
- [39] J. D. Chavez; J. E. Bruce: Chemical cross-linking with mass spectrometry: a tool for systems structural biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **48**, 8–18 (2019).
- [40] A. Sinz: Investigation of protein–protein interactions in living cells by chemical crosslinking and mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**:8, 3433–3440 (2010).
- [41] P. Singh; E. Nakatani; D. R. Goodlett; C. E. Catalano: A pseudo-atomic model for the capsid shell of bacteriophage lambda using chemical cross-linking/mass spectrometry and molecular modeling. *J. Mol. Biol.* **425**:18, 3378–3388 (2013).
- [42] C. Guerrero; C. Tagwerker; P. Kaiser; L. Huang: An integrated mass spectrometry-based proteomic approach: quantitative analysis of tandem affinity-purified in vivo cross-linked protein complexes (QTAX) to decipher the 26 S proteasome-interacting network. *Mol. Cell. Proteomics*, **5**:2, 366–378 (2006).

- [43] A. C. Leney; A. J. R. Heck: Native Mass Spectrometry: What is in the Name? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28**:1, 5–13 (2017).
- [44] J. F. De La Mora: Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. *Anal. Chim. Acta*, **406**:1, 93–104 (2000).
- [45] L. Konermann; F. I. Rosell; A. G. Mauk; D. J. Douglas: Acid-induced denaturation of myoglobin studied by time-resolved electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry*, **36**:21, 6448–6454 (1997).
- [46] Z. Deng; N. Thontasen; N. Malinowski; G. Rinke; L. Harnau; S. Rauschenbach; K. Kern: A close look at proteins: Submolecular resolution of two- and three-dimensionally folded cytochrome c at surfaces. *Nano Lett.* **12**:5, 2452–2458 (2012).
- [47] H. Ochner; S. Szilagy; S. Abb; J. Galut; C. V. Robinson; L. Malavolti; S. Rauschenbach; K. Kern: Low-energy electron holography imaging of conformational variability of single-antibody molecules from electrospray ion beam deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**:51, e2112651118 (2021).
- [48] G. Siuzdak; B. Bothner; M. Yeager; C. Brugidou; C. M. Fauquet; K. Hoey; C. M. Chang: Mass spectrometry and viral analysis. *Chem. Biol.* **3**:1, 45–48 (1996).
- [49] M. Zhou; C. Lantz; K. A. Brown; Y. Ge; L. Paša-Tolić; J. A. Loo; F. Lermyte: Higher-order structural characterisation of native proteins and complexes by top-down mass spectrometry. *Chem. Sci.* **11**:48, 12918–12936 (2020).
- [50] A. D. Catherman; O. S. Skinner; and N. L. Kelleher: Top Down Proteomics: Facts and Perspectives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445**:4, 683–693 (2014).
- [51] M. Barth; C. Schmidt: Native mass spectrometry—A valuable tool in structural biology,” *J. Mass Spectrom.* **55**:10, e4578 (2020).
- [52] L. Konermann: Addressing a Common Misconception: Ammonium Acetate as Neutral pH ‘Buffer’ for Native Electrospray Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28**:9, 1827–1835 (2017).
- [53] M. Göth; K. Pagel: Ion mobility–mass spectrometry as a tool to investigate protein–ligand interactions. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**:18, 4305–4310 (2017).
- [54] J. L. Lippens; J. B. Mangrum; W. McIntyre; B. Redick; D. Fabris: A simple heated-capillary modification improves the analysis of non-covalent complexes by Z-spray electrospray ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **30**:6, 773–783 (2016).
- [55] A. B. Kanu; P. Dwivedi; M. Tam; L. Matz; H. H. Hill: Ion mobility-mass spectrometry *J. Mass Spectrom.* **43**:1, 1–22 (2008).
- [56] A. Konijnenberg; A. Butterer; F. Sobott: Native ion mobility-mass spectrometry and related methods in structural biology,” *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**:6, 1239–1256 (2013).
- [57] R. Cumeras; E. Figueras; C. E. Davis; J. I. Baumbach; and I. Gràcia: Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 1: Current instrumentation. *Analyst*, **140**:5, 1376–1390, (2015).

- [58] M. F. Bush; I. D. G. Campuzano; C. V. Robinson: Ion mobility mass spectrometry of peptide ions: Effects of drift gas and calibration strategies. *Anal. Chem.* **84**:16, 7124–7130 (2012).
- [59] K. Jeanne Dit Fouque; M. Wellmann; D. Leyva Bombuse; M. Santos- Fernandez; Y. L. Cintron-Diaz; M. E. Gomez-Hernandez; D. Kaplan; V. G. Voinov; F. Fernandez-Lima: Effective discrimination of gas-phase peptide conformers using TIMS-ECD-ToF MS/MS. *Anal. Methods*, **13**:43, 5216–5223 (2021).
- [60] S. D. Pringle; K. Giles; J. L. Wildgoose; J. P. Williams; S. E. Slade; K. Thalassinou; R. H. Bateman; M. T. Bowers; J. H. Scrivens: An investigation of the mobility separation of some peptide and protein ions using a new hybrid quadrupole/travelling wave IMS/oa-ToF instrument. *Int. J. Mass Spectrom.* **261**, 11–12 (2007).
- [61] T. J. El-Baba; D. E. Clemmer: Solution thermochemistry of concanavalin A tetramer conformers measured by variable-temperature ESI-IMS-MS. *Int. J. Mass Spectrom.* **443**, 93–100 (2019).
- [62] D. W. Woodall; T. J. El-Baba; D. R. Fuller; W. Liu; C. J. Brown; A. Laganowsky; D. H. Russell; D. E. Clemmer: Variable-Temperature ESI-IMS-MS Analysis of Myohemerythrin Reveals Ligand Losses, Unfolding, and a Non-Native Disulfide Bond. *Anal. Chem.* **91**:10; 6808–6814 (2019).
- [63] M. Shirzadeh; M. L. Poltash; A. Laganowsky; D. H. Russell: Structural Analysis of the Effect of a Dual-FLAG Tag on Transthyretin: *Biochemistry*, **59**:9, 1013–1022 (2020).
- [64] S. K. Thangaraj; S. James; J. Rouvinen; and J. Jänis: Thermokinetic Analysis of Protein Subunit Exchange by Variable-Temperature Native Mass Spectrometry. *Biochemistry*, **58**:50, 5025–5029 (2019).
- [65] A. Sosic; R. Göttlich; D. Fabris; B. Gatto: B-CePs as cross-linking probes for the investigation of RNA higher-order structure. *Nucleic Acids Res.* **49**:12, 6660–6672 (2021).
- [66] A. Pruška; A. Marchand; R. Zenobi: Novel Insight into Proximal DNA Domain Interactions from Temperature-Controlled Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Angew. Chem., Int. Ed.* **60**:28, 15390–15398 (2021).
- [67] J. L. P. Benesch; F. Sobott; C. v. Robinson: Thermal dissociation of multimeric protein complexes by using nanoelectrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**:10, 2208–2214 (2003).
- [68] C. S. Maier; M. I. Schimerlink; M. L. Deinzer: Thermal denaturation of Escherichia coli thioredoxin studied by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionization mass spectrometry: monitoring a two-state protein unfolding transition. *Biochemistry*, **38**:3, 1136–1143 (1999).
- [69] T. J. El-Baba; D. W. Woodall; S. A. Raab; D. R. Fuller; A. Laganowsky; D. H. Russell; D. E. Clemmer: Melting Proteins: Evidence for Multiple Stable Structures upon Thermal Denaturation of Native Ubiquitin from Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry Measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **139**:18, 6306–6309 (2017).

- [70] T. J. El-Baba; D. R. Fuller; D. W. Woodall; S. A. Raab; C. R. Conant; J. M. Dilger; Y. Toker; E. R. Williams; D. H. Russell; D. E. Clemmer: Melting proteins confined in nanodroplets with 10.6 μm light provides clues about early steps of denaturation. *Chem. Commun.* **54**:26, 3270–3273 (2018).
- [71] D. W. Woodall; L. W. Henderson; S. A. Raab; K. Honma; and D. E. Clemmer, Understanding the Thermal Denaturation of Myoglobin with IMS-MS: Evidence for Multiple Stable Structures and Trapped Pre-equilibrium States. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **32**:1, 64–72 (2021).
- [72] D. W. Woodall; C. J. Brown; S. A. Raab; T. J. El-Baba; A. Laganowsky; D. H. Russell; D. E. Clemmer: Melting of Hemoglobin in Native Solutions as measured by IMS-MS. *Anal. Chem.* **92**:4, 3440–3446 (2020).
- [73] E. G. Marklund; M. T. Degiacomi; C. v. Robinson; A. J. Baldwin; J. L. P. Benesch: Collision cross sections for structural proteomics. *Structure*, **23**:4, 791–799 (2015).
- [74] R. Lišková: Rekombinantní příprava transkripčního faktoru TEAD. Praha, 2016.
- [75] T. Kadavá: Strukturní charakterizace interakce dvouvláknových DNA s transkripčním faktorem. Praha, 2020.
- [76] ExPASy - ProtParam tool. Dostupné z URL: <<https://web.expasy.org/protparam/>> (cit 2. 4. 2022).
- [77] L. Slavata; J. Chmelík; D. Kavan; R. Filandrová; J. Fiala; M. Rosůlek; H. Mrázek; Z. Kukačka; K. Vališ; P. Man; M. Miller; W. McIntyre; D. Fabris; P. Novák: MS-Based Approaches Enable the Structural Characterization of Transcription Factor/DNA Response Element Complex. *Biomolecules*, **9**:10, 535 (2019).
- [78] IDT-Oligo Analyzer. Dostupné z URL: <<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>> (cit 8. 1. 2021).
- [79] P-2000 Laser-Based Micropipette Puller System Operation Manual, Sutter Instruments, 2020. Dostupné z URL: <https://www.sutter.com/manuals/P-2000_OpMan.pdf> (cit 4. 9. 2021).
- [80] M. F. Bush; Z. Hall; K. Giles; J. Hoyes; C. V. Robinson; B. T. Ruotolo: Collision cross sections of proteins and their complexes: A calibration framework and database for gas-phase structural biology: *Anal. Chem.* **82**:22, 9557–9565 (2010).
- [81] S. J. Allen; K. Giles; T. Gilbert; M. F. Bush: Ion mobility mass spectrometry of peptide, protein, and protein complex ions using a radio-frequency confining drift cell. *Analyst*, **141**:3; 884–891 (2016).
- [82] B. T. Ruotolo; J. L. P. Benesch; A. M. Sandercock; S. J. Hyung; and C. V. Robinson: Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes. *Nat. Protoc.* **3**:7, 1139–1152 (2008).
- [83] E. Boura; L. Rezaczkova; J. Brynda; V. Obsilova; T. Obsil: Structure of the human FOXO4-DBD–DNA complex at 1.9 Å resolution reveals new details of FOXO binding to the DNA. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **66**:12, 1351–1357 (2010).

- [84] A. Anbanandam; D. C. Albarado; C. T. Nguyen; G. Halder; X. Gao, and S. Veeraraghavan: Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:46, 17225–17230 (2006).
- [85] J. Weigelt; I. Climent; K. Dahlman-Wright; and M. Wikström: Letter to the Editor: ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the DNA binding domain of the human Forkhead transcription factor AFX. *J. Biomol. NMR*, **17**:2, 181–182 (2000).
- [86] V. Gabelica *et al.*: Recommendations for reporting ion mobility Mass Spectrometry measurements. *Mass Spectrom. Rev.* **38**:3, 291–320 (2019).
- [87] J. L. P. Benesch; B. T. Ruotolo: Mass spectrometry: come of age for structural and dynamical biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**:5, 641–649 (2011).
- [88] P-LAB = Potřeby pro laboratoř, Chemikálie, Life Science, Nábytek. Baňka kultivační Erlenmeyerova se záhyby, DURAN®. Dostupné z URL: <<https://www.p-lab.cz/banka-kultivacni-erlenmeyerova-se-zahyby-duransupsup>> (cit 9. 4. 2022).
- [89] D. M. Francis; R. Page: Strategies to Optimize Protein Expression in E. coli. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **61**:1, (2010).
- [90] J. K. Holden; C. N. Cunningham: Targeting the hippo pathway and cancer through the TEAD family of transcription factors. *Cancers*, **10**:3, 81 (2018).
- [91] A. Khan *et al.*: JASPAR 2018: Update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Res.* **46**:D1, D260-D266 (2018).
- [92] A. Anbanandam; D. C. Albarado; C. T. Nguyen; G. Halder, X. Gao; and S. Veeraraghavan: Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:46, 17225–17230 (2006).
- [93] W. Link: Introduction to FOXO Biology. *Methods Mol. Biol.* **1890**, 1–9 (2019).
- [94] D. R. Calnan; A. Brunet: The FoxO code. *Oncogene*, **27**:16, 2276–2288 (2008).
- [95] IDT-Oligo Analyzer. Dostupné z URL: <<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>> (cit 2. 4. 2022).
- [96] J. H. Gross: *Mass spectrometry: A textbook*, 3rd edition. Cham, Springer Publishing, 2011.
- [97] M. Porrini, F. Rosu; C. Rabin; L. Darré; H. Gómez; M. Orozoco; V. Gabelica: Compaction of Duplex Nucleic Acids upon Native Electrospray Mass Spectrometry. *ACS Cent. Sci.* **3**:5, 454–461 (2017).
- [98] F. Lanucara; S. W. Holman; C. J. Gray; C. E. Eyers: The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nat. Chem.* **6**:4, 281–294 (2014).
- [99] J. A. Harrison; A. Pruška; I. Oganessian; P. Bittner; R. Zenobi: Temperature-controlled Electrospray Ionization: Recent Progress and Applications. *Chem. Eur. J.* **27**:72, 18015–18028 (2021).

- [100] D. S. Lee; C. Vornheim; D. Albarado; C. S. Raman; S. Veeraraghavan: A Potential Structural Switch for Regulating DNA-Binding by TEAD Transcription Factors. *J. Mol. Biol.* **428**:12, 2557–2568 (2016).
- [101] K. Psenakova; K. Kohoutova; V. Obsilova; M. J. Ausserlechner; V. Veverka; and T. Obsil: Forkhead Domains of FOXO Transcription Factors Differ in both Overall Conformation and Dynamics. *Cells* **8**:9, 966 (2019).
- [102] F. H. Niesen; H. Berglund; and M. Vedadi: The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* **2**:9, 2212–2221 (2007).
- [103] N. J. Greenfield: Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat. Protoc.* **1**:6, 2527 (2006).
- [104] G. V. Semisotnov; N. A. Rodionova; O. I. Razgulyaev; V. N. Uversky; A. F. Gripas; R. I. Gilmanshin: Study of the ‘molten globule’ intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*, **31**:1, 119–128 (1991).
- [105] A. Jolma; Y. Yin; K. R. Nitta; K. Dave; A. Popov; M. Taipale; M. Enge; T. Kivioja; E. Morgunova; J. Taipale: DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity. *Nature*, **527**:7578, 384–388 (2015).