

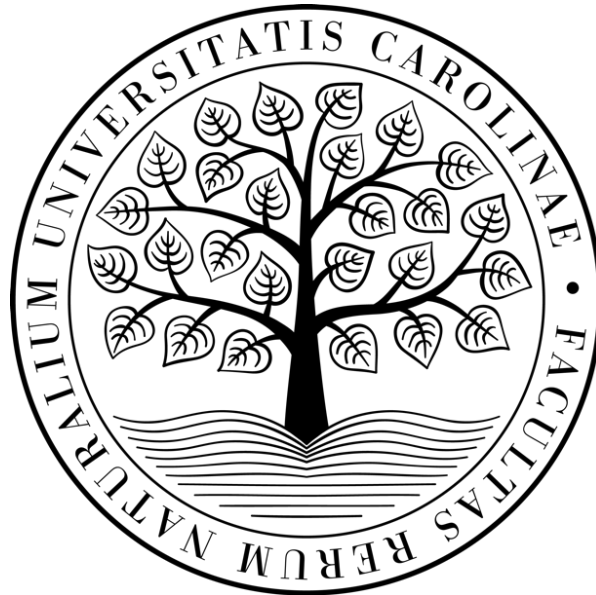
UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Lada Dlabolová

**Strukturní analýza intermediálních filament
pomocí chemického zesíťení**

Analysis of intermediate filament structure
by chemical cross-linking

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Konzultant: Mgr. Zdeněk Kukačka, Ph.D.

Praha 2023

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

Proteiny intermediálních filament vytvářejí dynamickou síť cytoskeletálních vláken, která díky svým elastickým vlastnostem výrazně přispívá k odolnosti buněk a tkání vůči mechanickému namáhání. Významným proteinem z rodiny intermediálních filament je vimentin, exprimovaný především v buňkách mezenchymálního původu. Vimentin je spojován s velkým množstvím patofyziologických stavů a současné studie jej považují za klinicky perspektivní cíl pro diagnostiku, prognózu a léčbu širokého spektra chorob od rakoviny po infekční a zánětlivá onemocnění. Přestože z pohledu strukturní charakterizace patří vimentin mezi jeden z nejvíce prozkoumaných proteinů rodiny intermediálních filament, naše znalost je v současné době omezena na strukturu vimentinového tetrameru. V buňkách se vimentin samovolně sestavuje do vláken tvořených homo-oligomerními podjednotkami ULF v procesu, který zahrnuje několik kroků organizace podjednotek. Detailní strukturní charakterizace oligomerních podjednotek vznikajících v průběhu skládání vimentinových vláken je předpokladem k objasnění architektury zralých filament, která může výrazně přispět k pochopení a propojení mechanismů mnoha onemocnění souvisejících se změnami v expresi vimentinu.

Tato práce se zaměřuje na strukturní analýzu ULF podjednotek vimentinu vznikajících asociací vimentinových tetramerů. S využitím techniky MIX CXMS založené na chemickém sítění směsi izotopově značeného a neznačeného proteinu, která umožňuje identifikaci a rozlišení intermolekulárních a intramolekulárních interakcí, byla identifikována unikátní peptidová spojení poskytující informace o původu spojených peptidů v rámci ULF. Následnou kvantifikací zastoupení intertetramerního a intratetramerního sítění bylo zjištěno 27 unikátních peptidových spojení pocházejících z rozhraní tetramer-tetramer, poskytujících informace o vzdálenostních omezeních tetramerů v ULF pro strukturní charakterizaci ULF podjednotky vimentinu.

Klíčová slova: intermediální filamenta, chemické zesítění, izotopově značené proteiny, hmotnostní spektrometrie

Abstract

Intermediate filament proteins create a dynamic cytoskeletal filamentous network, which due to its elastic properties, significantly contributes to the resistance of cells and tissues to mechanical stress. An important protein from the family of intermediate filaments, vimentin, is expressed mainly in cells of mesenchymal origin. Vimentin has been associated with a large number of pathophysiological conditions, and current studies consider vimentin as clinically promising target for the diagnosis, prognosis and treatment of a wide range of diseases from cancer to infectious and inflammatory diseases. Although in terms of structural characterization, vimentin belongs to one of the most studied proteins from the family of intermediate filaments, our knowledge is currently limited to the structure of the vimentin tetramer. Vimentin is capable of self-assembly into filaments formed by homo-oligomeric ULF subunits and the assembly process involves several steps of the organization of subunits. Structural characterization of the oligomeric subunits involved in the assembly of vimentin filaments is a prerequisite for elucidating the architecture of mature filaments, which can significantly contribute to understanding and connecting the mechanisms of many diseases associated with changes in vimentin expression.

This thesis is focused on the structural analysis of vimentin ULF subunits arising from the association of vimentin tetramers. Using the MIX CXMS technique based on a chemical cross-linking of isotopically labeled and unlabeled protein mixture, which enables to identify and distinguish intermolecular and intramolecular interactions, unique peptide cross-links were identified providing information on the origin of the cross-linked peptides within the ULF. Subsequent quantification of the representation of intertetrameric and intratetrameric cross-links revealed 27 unique peptide cross-links originating from the tetramer-tetramer interface, providing information on the distance constraints of tetramers in the ULF for the structural characterization of vimentin ULF subunit.

Key words: intermediate filaments, chemical cross-linking, isotopically labeled proteins, mass spectrometry

[IN CZECH]

Poděkování

Na tomto místě bych ráda upřímně poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Zdeňku Kukačkovi, PhD. za odborné vedení této práce, za jejich motivující a inspirativní přístup, za nepřetržitou podporu v průběhu celého mého působení v Laboratoři strukturní biologie a buněčné signalizace. Chtěla bych vyjádřit vděčnost za jejich vstřícnost, ochotu, trpělivost a veškerý čas, který mi věnovali. Velký dík patří i všem členům laboratoře za příjemné a přátelské prostředí, které jako kolektiv vytvářejí, ale i za jejich cenné rady a předané zkušenosti. Také bych ráda vyjádřila svůj dík Mgr. Janu Fialovi PhD., který mne jako konzultant provázel na začátku mé cesty v Laboratoři strukturní biologie a buněčné signalizace a seznámil mne s technikou chemického sítění v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Dále děkuji členům Laboratoře biokrystalografie v Lovani za poskytnutí proteinů použitých pro experimenty provedené v této práci a spolupráci na projektu strukturní analýzy intermediálních filament.

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

Obsah

| | |
|--|----|
| SEZNAM ZKRATEK | 8 |
| 1 TEORETICKÝ ÚVOD | 10 |
| 1.1 STRUKTURNÍ ANALÝZA PROTEINŮ POMOCÍ CHEMICKÉHO SÍTĚNÍ V KOMBINACI S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ | 10 |
| 1.1.1 Strategie chemického sítění | 11 |
| 1.1.2 Studium struktury homopolymerů pomocí chemického sítění | 14 |
| 1.1.2.1 Technika MIX CXMS | 14 |
| 1.1.2.2 Technika SILAC CXMS | 16 |
| 1.2 INTERMEDIÁLNÍ FILAMENTA | 18 |
| 1.2.1 Vimentin | 18 |
| 1.2.1.1 Lokalizace a funkce | 18 |
| 1.2.1.2 Struktura | 20 |
| 1.2.1.3 Sestavení vimentinových filament | 22 |
| 1.2.1.4 Sestavení vimentinových filament in vitro | 25 |
| 1.2.1.5 Patologie | 26 |
| 1.2.1.6 Současná problematika | 27 |
| 2 CÍLE PRÁCE | 29 |
| 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 30 |
| 3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE | 30 |
| 3.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL | 31 |
| 3.3 ROZTOKY | 31 |
| 3.4 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A MATERIÁL | 32 |
| 3.5 SOFTWARE | 32 |
| 3.5 METODY | 33 |
| 3.5.1 Studovaný materiál | 33 |
| 3.5.2 Analýza tetramerních a ULF podjednotek vimentinu technikou MIX CXMS | 33 |
| 3.5.2.1 Tvorba vimentinových tetramerů pomocí postupné dialýzy | 33 |
| 3.5.2.2 Stanovení koncentrace vimentinu ^{14}N a ^{15}N | 34 |
| 3.5.2.3 MS analýza vzorků pro přípravu směsi vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N | 34 |
| 3.5.2.4 Příprava $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek vimentinu | 34 |
| 3.5.2.5 Chemické sítění vimentinových vzorků | 35 |
| 3.5.2.6 Kontrola síťovací reakce pomocí SDS-PAGE | 35 |

| | |
|---|----|
| 3.5.2.7 Příprava vzorků pro LC-MS analýzu | 36 |
| 3.5.2.8 LC-MS analýza produktů síťovací reakce | 36 |
| 3.5.2.9 Vyhodnocení LC-MS dat..... | 37 |
| 3.5.3 Analýza tetramerních a ULF podjednotek vimentinu ¹⁴ N pomocí CXMS..... | 38 |
| 3.5.3.1 Příprava vimentinových vzorků pro chemické sítění – tvorba tetramerního vimentinu a ULF podjednotek | 38 |
| 3.5.3.2 Chemické sítění vimentinových vzorků..... | 38 |
| 3.5.3.3 Kontrola síťovací reakce pomocí SDS-PAGE | 39 |
| 3.5.3.4 Příprava vzorků pro LC-MS/MS analýzu | 39 |
| 3.5.3.5 LC-MS/MS analýza produktů síťovací reakce..... | 39 |
| 3.5.3.6 Vyhodnocení LC-MS/MS dat..... | 40 |
| 4 VÝSLEDKY | 41 |
| 4.1 ANALÝZA TETRAMERNÍCH A ULF PODJEDNOTEK VIMENTINU TECHNIKOU MIX CXMS . | 41 |
| 4.1.1 Příprava směsi vimentinových tetramerů ¹⁴ N a ¹⁵ N..... | 41 |
| 4.1.2 Kontrola síťovací reakce pomocí SDS-PAGE..... | 42 |
| 4.1.3. Identifikované produkty sítění směsi vimentinových tetramerů ¹⁴ N a ¹⁵ N z LC-MS analýzy | 44 |
| 4.1.3.1 Kvantifikace zastoupení INTER-dimerního a INTRA-dimerního sítění | 45 |
| 4.1.4 Identifikované produkty sítění ¹⁴ N/ ¹⁵ N ULF podjednotek vimentinu z LC-MS analýzy | 47 |
| 4.1.4.1 Kvantifikace zastoupení INTER-tetramerního a INTRA-tetramerního sítění ... | 48 |
| 4.2 ANALÝZA TETRAMERNÍCH A ULF PODJEDNOTEK VIMENTINU ¹⁴ N POMOCÍ CXMS..... | 50 |
| 4.2.1 Příprava tetramerního vimentinu ¹⁴ N | 50 |
| 4.2.2 Kontrola síťovací reakce pomocí SDS-PAGE..... | 50 |
| 4.2.3 Identifikované produkty chemického sítění ULF podjednotek pomocí LC-MS/MS analýzy | 51 |
| 5 DISKUZE..... | 53 |
| 6 ZÁVĚR | 60 |

Seznam zkratek

| | |
|---------------|--|
| BuS | fragmentový iont – peptidový iont modifikovaný kyselinou 4-aminomáselnou vznikající fragmentací raménka síťovacího činidla DSBU v kolizní cele při MS/MS |
| BuUrS | fragmentový iont – peptidový iont nesoucí modifikaci 1,3-oxazepan-2-onu, vznikající fragmentací raménka síťovacího činidla DSBU v kolizní cele při MS/MS |
| CAA | chloracetamid |
| CID | kolizně indukovaná disociace (z angl. collision-induced dissociation) |
| CXMS | chemické sítění v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (z angl. Cross-linking Mass Spectrometry) |
| DDA | datově závislé měření (z angl. Data-Dependent Acquisition). |
| DIA | datově nezávislé měření (z angl. Data-Independent Acquisition) |
| DMSO | dimethyl sulfoxid |
| DSBU | disukcinimidyl dibutyric močovina |
| DSG | disukcinimidyl glutarát |
| DSPU | disukcinimidyl dipropionic močovina |
| DSS | disukcinimidyl suberát |
| DTT | 1,4-dithiothreitol |
| EDC | 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| EMT | epiteliální mezenchymální přechod (z angl. Epithelial-Mesenchymal Transition) |
| ESI | ionizace elektrosprejem (z angl. Electrospray Ionization) |
| FT-ICR | iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (z angl. Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance) |
| GFAP | gliální fibrilární acidický protein |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina |
| IF | intermediální filamenta |
| LC-MS | kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (z angl. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) |

| | |
|-------------------|--|
| LC-MS/MS | kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (z angl. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry) |
| <i>m/z</i> | poměr hmotnosti ku náboji |
| MAC | methylamin hydrochlorid |
| MALDI | matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace pomocí (z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) |
| mgf | výstupní formát souboru z programu MASCOT (z angl. Mascot Generic File) |
| MIX | chemické sítě s použitím směsi izotopově značeného a neznačeného proteinu (z angl. Mixed Isotope Cross-linking) |
| MOPS | 3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfonová kyselina |
| MS | hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass Spectrometry) |
| MS/MS | tandemová hmotnostní spektrometrie (z angl. Tandem Mass Spectrometry) |
| MWCO | mezní molekulová hmotnost (z angl. Molecular Weight Cut-off) |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| PTM | posttranslační modifikace |
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsiranu sodného (z angl. Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electroforesis) |
| SILAC | značení proteinu stabilními izotopy pomocí značených aminokyselin v buněčné kultuře (z angl. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture) |
| TCEP | tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid |
| Tims | iontová mobilní spektrometrie (z angl. Trapped Ion Mobility Spectrometry) |
| TOF | analyzátor doby letu (z angl. Time of Flight) |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| ULF | podjednotky tvořící filamentum (z angl. Unit-Length Filaments) |

1 TEORETICKÝ ÚVOD

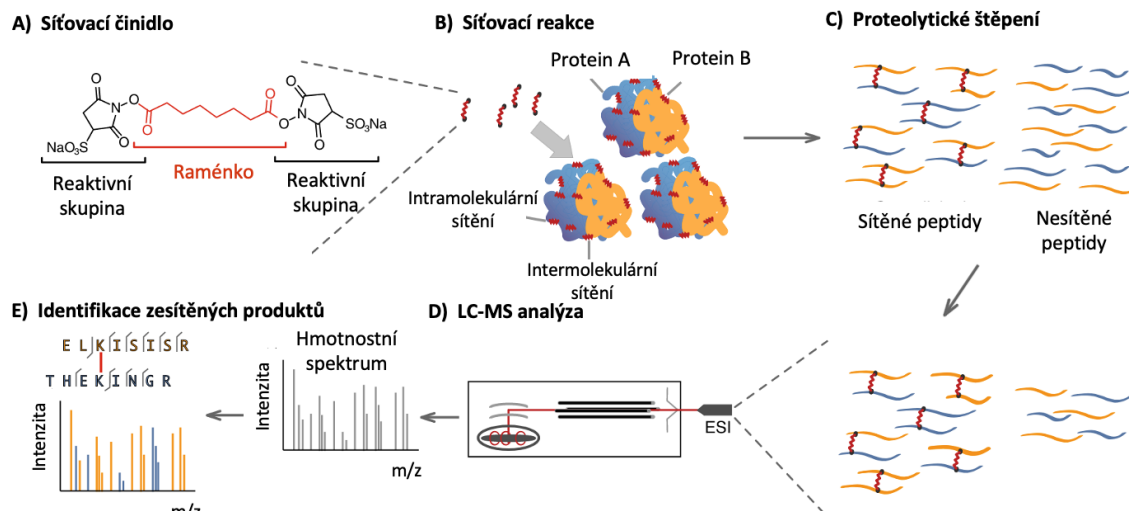
1.1 Strukturní analýza proteinů pomocí chemického sítění v kombinaci s hmotnostní spektrometrií

Předpokladem pro pochopení mnoha biologických procesů je detailní znalost trojrozměrné proteinové struktury a interagujících sekvencí v proteinových komplexech. Chemické sítění v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (CXMS, z angl. Cross-linking Mass Spectrometry) je dnes zavedená metoda ve strukturní biologii, která doplňuje další strukturně analytické techniky jako je rentgenová krystalografie, NMR nebo elektronová mikroskopie. CXMS umožňuje strukturní analýzu proteinů i velkých proteinových komplexů, poskytuje informace o protein-proteinových interakcích, dynamických vlastnostech proteinů a jejich flexibilních oblastech. Síťovací reakce probíhá v roztoku v podmínkách blízkých přirozenému prostředí, umožňuje tedy zachytit nativní konformaci a konformační změny proteinů [1–3]. Podává užitečné strukturní informace, které jinými technikami pro strukturní analýzu není možné získat.

Princip chemického sítění proteinů je založen na použití síťovacího činidla, které zprostředkovává kovalentní spojení funkčních skupin dvou aminokyselinových zbytků, které jsou si v nativní konformaci prostorově blízké [4]. Síťovací činidlo obsahuje minimálně dvě reaktivní skupiny propojené tzv. raménkem, jehož délka udává vzdálenost dvou aminokyselinových zbytků, které mohou být spojeny. Dnes existuje mnoho druhů síťovacích činidel [1,5]. Jednotlivá síťovací činidla se liší svými *reaktivními skupinami* – ty určují, které aminokyseliny mohou být spojeny, *délkou raménka*, kterým jsou spojeny a celou řadou dalších parametrů. Nejčastěji používaná činidla obsahují reaktivní skupiny, které cílí především na primární aminoskupiny nacházející se na postranním řetězci lysinu či N-konci proteinu, dále mohou také reagovat s postranním řetězcem serinu, threoninu či tyrosinu. Existují i činidla která mohou reagovat s jinými skupinami, například s karboxylovými skupinami na postranním řetězci asparaginu, glutaminu či C-konci proteinu.

Kovalentně spojené proteiny jsou po síťovací reakci zpravidla proteolyticky štěpeny a výsledná směs peptidů je analyzována pomocí kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS, z angl. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry) [4]. Délka síťovacího činidla a pozice spojených aminokyselin v proteinu udávají vzdálenostní omezení, která slouží jako základ pro následné výpočetní

modelování trojrozměrné struktury proteinu či proteinového komplexu. Obecný postup techniky CXMS je znázorněn na Obrázku 1.



Obrázek 1. Obecný postup techniky CXMS. A) Síťovací činidlo obsahující dvě reaktivní skupiny spojené raménkem, B) Při síťovací reakci dochází ke kovalentnímu spojení funkčních skupin dvou aminokyselinových zbytků na povrchu proteinu. Vzdálenost dvou aminokyselin, které mohou být spojeny je dána délkou síťovacího činidla, C) Proteolytické štěpení za vzniku směsi modifikovaných a nemodifikovaných peptidů, probíhá nejčastěji použitím trypsinu, D) Výsledná směs modifikovaných a nemodifikovaných peptidů je analyzována pomocí kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS), E) pomocí příslušných softwarů pro analýzu LC-MS/MS dat jsou ze získaných hmotnostních spekter identifikovány produkty chemického sítění. Převzato z [4] a upraveno

1.1.1 Strategie chemického sítění

Velká komplexita peptidových směsí vznikajících po štěpení modifikovaných proteinů komplikuje CXMS analýzu. Peptidy ve výsledné směsi mohou být modifikované mnoha různými způsoby, a kromě toho obsahuje také nemodifikované peptidy. V průběhu let byla vyvinuta řada strategií usnadňujících identifikaci produktů síťovací reakce v hmotnostních spektrech [3].

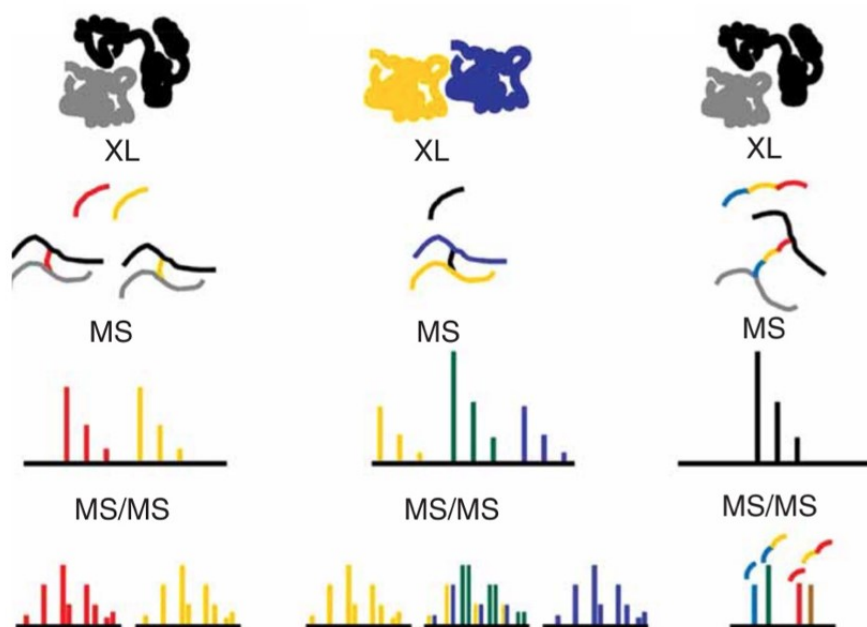
V roce 2001 byl zveřejněn článek o použití izotopově značených síťovacích činidel [6]. Většinou se jedná se o ekvimolární směsi deuterovaných („těžkých“) a nedeuterovaných („lehkých“) síťovacích činidel [3]. Jejich použitím vznikají v hmotnostních spektrech charakteristické *dublety* izotopových obálek dané posunem hmoty způsobené přítomností lehkého a těžkého síťovacího činidla v poměru 1:1 (Obrázek 3A, str.13).

Alternativní strategií využívanou pro usnadnění identifikace produktů síťovací reakce je použití štěpitelných síťovacích činidel [3,7]. Štěpitelná síťovací činidla obsahují labilní kovalentní vazbu, která umožňuje specifickou fragmentaci pomocí tzv. kolizně indukované disociace (CID, z angl. collision induced dissociation) v tandemové hmotnostní spektrometrii (MS/MS). Ze dvou spojených peptidů vznikají fragmentací

Uvedené strategie chemického sítění jsou však stále nedostačující v případě, kdy chceme zkoumat protein-proteinové interakce či proteinové komplexy, které jsou složeny z několika sekvenčně podobných nebo dokonce identických podjednotek, např. homodimerů. Výše uvedené strategie neumožňují rozlišit spojení v rámci jednoho monomeru (intramolekulární) od spojení vzniklých mezi dvěma monomery (intermolekulární).

Přístup, který umožňuje rozlišit intramolekulární a intermolekulární spojení představil Taverner *et al.* při strukturní charakterizaci dimeru interleukinu-6, a nazval jej MIX (angl. Mixed Isotope Cross-linking) [9]. V přístupu MIX se pro chemické sítění používá izotopově ^{15}N -značený protein ve směsi v poměru 1:1 s neznačeným (^{14}N) proteinem. Výsledné intermolekulární produkty chemického sítění jsou pak složeny z $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ s $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ peptidů, které poskytují kvadrupletové/tripletové izotopové obálky v hmotnostním spektru (Obrázek 3B) umožňující odlišit spojení, které vzniklo mezi dvěma monomery (intermolekulární) od spojení, které vzniklo v rámci jednoho monomeru (intramolekulární). Jednotlivé uvedené techniky chemického sítění jsou znázorněny na Obrázku 3.

A) Izotopově značená činidla B) Izotopově značené proteiny C) MS/MS štěpitelná činidla

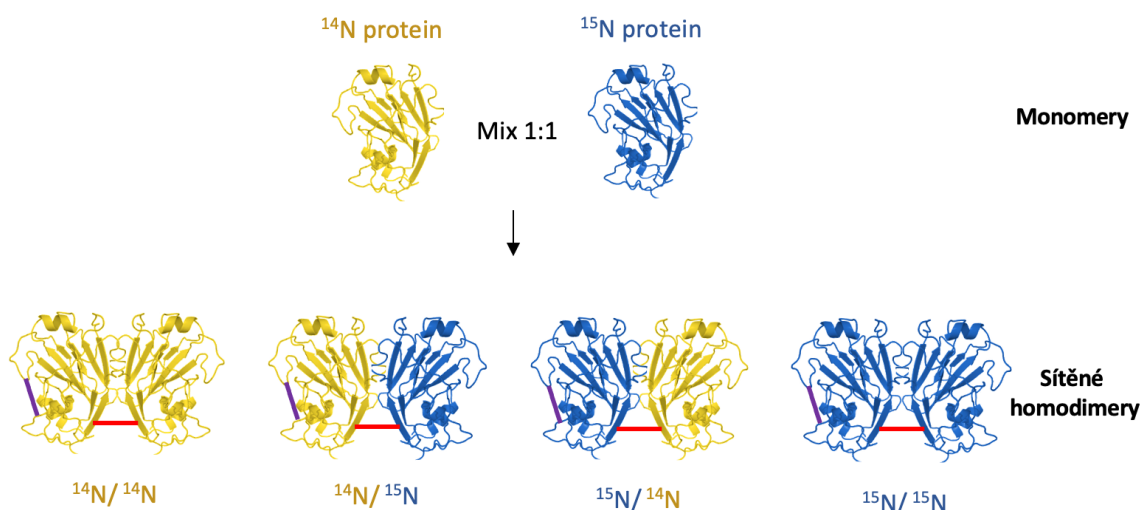


Obrázek 3. Přehled uvedených technik chemického sítění. Po chemickém sítění a proteolytickém štěpení proteinů jsou zaznamenána MS a MS/MS data. Pro zjednodušení identifikace sítěných produktů, síťovací reakce mohou být provedeny s (A) izotopově značenými (směs lehký a těžký) činidly, (B) izotopově značenými (směs lehký a těžký) proteiny nebo (C) MS/MS štěpitelnými činidly. XL = síťovací činidlo. Převzato z [3] a upraveno

1.1.2 Studium struktury homopolymerů pomocí chemického sítění

1.1.2.1 Technika MIX CXMS

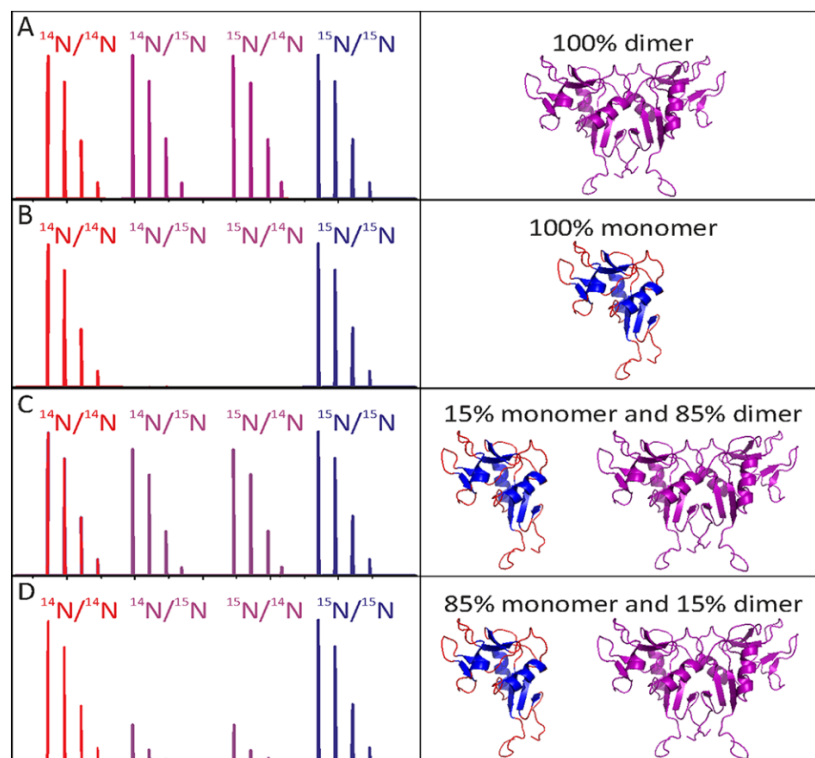
Jelikož se v této práci věnujeme strukturní analýze homopolymerů, bude v následující části podrobněji vysvětlen princip techniky MIX na nejjednodušším příkladu – homodimeru. Přístup MIX je založený na použití proteinu značeného těžkým izotopem dusíku ^{15}N . Smícháním ^{15}N -značeného a neznačeného (^{14}N) proteinu v poměru 1:1 vzniká směs izotopicky značených a neznačených homodimerů $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ (Obrázek 4). K této směsi je přidáno činidlo chemického sítění. Směs modifikovaných peptidů je dále proteolyticky štěpena a vzniklá směs modifikovaných peptidů je analyzována pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC-MS, z angl. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry).



Obrázek 4. Schéma techniky MIX. Smíchání 1:1 izotopicky ^{15}N -značeného a (^{14}N) neznačeného proteinu poskytuje směs obsahující čtyři formy homodimerů $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$. Chemickým sítěním této homodimerní směsi mohou vznikat intramolekulární spojení, tedy v rámci jednoho monomeru (fialová) nebo intermolekulární spojení, tedy mezi dvěma monomery (červená). Po proteolytickém štěpení směsi homodimerů modifikované síťovacím činidlem a LC-MS analýze získáváme charakteristická hmotnostní spektra, která umožňují rozlišit intramolekulární a intermolekulární spojení. Intermolekulární produkty sítění (červená) poskytují hmotnostní spektra s kvadrupletovými izotopovými obálkami odpovídajícími peptidovým formám $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$, jejichž posun v hmotnostním spektru je dán posunem hmotností jednotlivých peptidových forem, která závisí na počtu dusíků ve spojených peptidech. Oproti tomu intramolekulární produkty sítění (fialová) mohou vzniknout pouze mezi peptidy pocházejícími z homodimerů $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$, a proto jejich hmotnostní spektra obsahují dubletové izotopové obálky.

Produkty chemického sítění intermolekulárního původu (tedy spojení, které vzniklo mezi dvěma monomery v rámci dimeru) poskytují charakteristická, snadno identifikovatelná hmotnostní spektra. Produkty sítění intermolekulárního původu obsahují peptidové formy

$^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ a v hmotnostním spektru poskytují kvadrupletové izotopové obálky (Obrázek 5A), jejichž vzdálenost ve spektru je dána počtem dusíků v aminokyselinové sekvenci spojených peptidů. V případě, že intermolekulárně spojené peptidy obsahují stejný počet dusíků, získáváme ve spektru *tripletové* izotopové obálky, což je dáno tím, že peptidové formy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ mají stejnou hmotnost a ve spektru se překrývají. Zatímco produkty sítěni intramolekulárního původu obsahují pouze peptidové formy $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ a v hmotnostním spektru poskytují *dubletové* izotopové obálky (Obrázek 5B).



Obrázek 5. Hmotnostní spektra produktů chemického sítěni získaná technikou MIX, kde je neznačený (^{14}N) protein smíchaný s izotopově ^{15}N -značeným proteinem v poměru 1:1 před sítovací reakcí. (A) Hmotnostní spektrum 100% intermolekulárních produktů sítěni – spojení mezi dvěma monomery, (B) Hmotnostní spektrum 100% intramolekulárního produktu sítěni – spojení v rámci jednoho monomeru, (C) Hmotnostní spektrum směšného produktu sítěni (inter- a intramolekulárního sítěni se překrývají), kde preferenčně vzniká intermolekulární sítěni a poměr inter/intra je 85:15, (D) Hmotnostní spektrum směšného produktu sítěni (inter- a intramolekulárního sítěni se překrývají), kde preferenčně vzniká intramolekulární sítěni a poměr inter/intra je 15:85. Převzato z [10]

Díky schopnosti spolehlivě identifikovat a rozlišit sítěni intermolekulárního a intramolekulárního původu představuje tato technika velmi užitečný nástroj pro studium intermolekulárních interakcí. V reálných experimentech chemického sítěni se však izotopové vzorce inter- a intra- molekulárního sítěni často překrývají a vytvářejí tzv. směšná hmotnostní spektra (Obrázek 5C, D) o různé intenzitě *kvadrupletových*

izotopových obálek. K získání užitečných informací pro výpočetní modelování trojrozměrné proteinové struktury je nezbytné spolehlivě určit, zda jsou identifikovaná spojení intermolekulární, případně který typ sítěni ve směsi převládá a v jakém poměru. Ke kvantifikaci inter-/intramolekulárního sítěni je třeba vzít v úvahu intenzity jednotlivých peptidových forem.

Přestože všechny výše uvedené strategie chemického sítěni byly představeny již před dvaceti lety, chemické sítěni s využitím izotopově značených či štěpitelných síťovacích činidel je dnes dobře zavedená a běžně využívaná technika ve strukturní biologii, zatímco o použití techniky MIX zatím existuje jen minimum publikací. To je dáno tím, že po dlouhá léta nebyl vyvinut software zaměřený na analýzu CXMS dat z techniky MIX, což činilo analýzu těchto dat velmi náročnou a zdlouhavou. Až v roce 2013 byla publikována další studie, ve které byla využita technika MIX ke strukturní studii homodimerního proteinu GCAP-2 [11], kde však byla získaná data analyzována manuálně.

Teprve nedávno byl vyvinut software LinX, který umožňuje vyhodnocení CXMS dat a identifikaci a kvantifikaci intermolekulárního sítěni z techniky MIX [10], což velmi usnadňuje analýzu získaných dat a zpřístupňuje tuto techniku pro širší použití. S využitím tohoto softwaru byla pomocí techniky MIX provedena strukturní analýza homodimerního proteinu Nkrp1b (receptor myších přirozených zabíjácích buněk) a proteinového komplexu LEDGF/p75 [12,13].

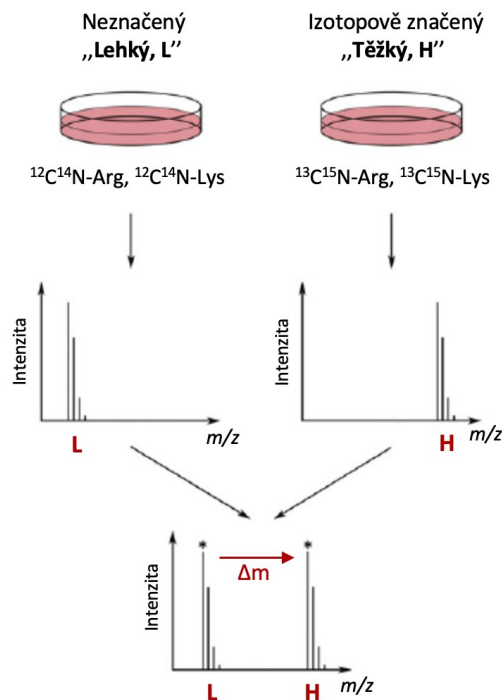
Technika MIX byla aplikována i na strukturní analýzu složitějších homomerů než jsou homodimery. Konkrétně bylo touto technikou dosaženo objasnění trojrozměrné struktury vimentinového tetrameru [14]. V této práci byla použitím izotopově ^{15}N -značeného a (^{14}N) neznačeného dimeru získána směs tetramerů, ze které bylo po provedení chemického sítěni možné identifikovat spojení pocházející z dimerního rozhraní, které poskytlo informace o uspořádání dimerních podjednotek pro výpočetní modelování vimentinového tetrameru.

1.1.2.2 Technika SILAC CXMS

Další způsob řešení strukturní analýzy oligomerních proteinů pomocí CXMS popsal Makarov *et al.* na laminu, ve kterém bylo využito izotopové značení proteinu metodou SILAC (z angl. Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) [15]. V metodě SILAC jsou buňky produkující požadovaný protein kultivovány v buněčné kultuře

obsahující médium s aminokyselinami značenými stabilními těžkými izotopy, čímž je získán izotopově značený protein. Princip techniky SILAC pro kvantitativní hmotnostní spektrometrii je uveden na Obrázku 6. V principu se tato technika příliš neliší od techniky MIX, je také založena na použití směsi izotopově značeného (těžkého, H) a neznačeného (lehkého, L) proteinu v ekvimolárním poměru pro síťovací reakci. V této práci byla použita kombinace neznačeného proteinu a proteinu značeného pomocí $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -argininu a $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -lysinu ke stanovení interakcí v rámci laminových dimerů a mezi dimery ve vyšším polymerním uspořádání a směs modifikovaných proteinů byla následně proteolyticky štěpena pomocí trypsinu, který štěpí za aminokyselinami argininem a lysinem. Způsob rozlišení inter- a intramolekulárních (nebo inter- a intradimerních) spojení v rámci laminových homomerů je opět založen na přítomnosti L/L, L/H, H/L, H/H peptidů, které poskytují v hmotnostních spektrech charakteristické *kvadrupletové* či *dubletové* izotopové obálky, jejichž vzdálenost ve spektru je dána počtem argininů a lysinů modifikovaných peptidů.

Technika SILAC CXMS využívá jiný způsob značení proteinu stabilními izotopy, princip identifikace intermolekulárního síťení je však stejný. Limitací této techniky je však chybějící specializovaný software, který by umožňoval automatickou identifikaci a kvantifikaci inter- a intramolekulárního síťení. To zatím musí být prováděno manuálně, což je především časově velmi náročné.



Obrázek 6. Technika izotopového značení proteinů metodou SILAC pro kvantitativní hmotnostní spektrometrii. Poměr intenzit „lehkých“ a „těžkých“ izotopových forem proteinu (či peptidu) poskytuje kvantitativní informaci o relativním množství tohoto proteinu (či peptidu).

1.2 Intermediální filamenta

Intermediální filamenta (IF) představují jednu ze tří hlavních složek cytoskeletu, vytvářející rozsáhlou síť vláken v cytosolu eukaryotických buněk [16]. IF zprostředkovávají vzájemnou komunikaci mezi ostatními složkami cytoskeletu. Díky svým jedinečným elastickým vlastnostem výrazně přispívají k pružnosti a pevnosti buněk a tkání, a poskytují ochranu před buněčným stresem způsobeným mechanickým namáháním [17]. IF jsou tvořeny velkou rodinou vláknitých proteinů, které jsou specificky exprimovány ve všech diferencovaných buňkách. Protein tvořící intermediální filamenta je dán typem buňky a její tkáňovou lokalizací. U člověka bylo objeveno více než 50 různých proteinů IF, které byly klasifikovány do pěti hlavních kategorií na základě jejich sekvenční a strukturní homologie, jako IF Typu I až V [18]. Konkrétně vimentin, na který se tato práce zaměřuje, se řadí mezi IF typu III, společně s desminem, gliálním fibrilárním acidickým proteinem (GFAP), a periferinem [19].

1.2.1 Vimentin

1.2.1.1 Lokalizace a funkce

Vimentin je protein z rodiny intermediálních filament s molekulovou hmotností 53,7 kDa tvořený 466 aminokyselinami, exprimovaný především v buňkách mezenchymálního původu jako jsou například fibroblasty, endoteliální buňky, melanocyty, Schwannovy buňky, makrofágy nebo lymfocyty [20,21]. Databáze Human Protein Atlas uvádí, že vimentin je konstitutivně exprimován ve velké škále tkání včetně kůže, ledvin, plic, kostní dřeni a lymfatických uzlin [22].

V buňkách tvoří vimentinová vlákna dynamickou síť, která se rozpíná mezi jadernou a buněčnou membránou, ale lze je také nalézt na buněčném povrchu a v extracelulárním prostoru. Vimentin se podílí na široké škále buněčných funkcí a je spojován s velkým množstvím patofyziologických stavů. Přední funkcí vimentinových filament je zajištění strukturní integrity buněk a tkání, stability a opory pro udržení tvaru buněk. Síť vimentinových vláken poskytuje buňkám odolnost vůči mechanickému namáhání a působí jako pohyblivá konstrukce uvnitř buňky pro zprostředkování optimálních buněčných reakcí na intracelulární změny doprovázející fyziologické aktivity.

Bylo také prokázáno, že se účastní široké škály specializovaných, nemechanických buněčných procesů, jako je ukotvení organel, adheze a migrace buněk, zánětlivé a imunitní reakce nebo signalizace, díky svým interakcím s různými proteiny [20,23].

Vimentin reguluje buněčnou adhezi tím, že interaguje s cytoplazmatickou doménou integrinu a ovlivňuje jeho funkci [20]. Integriny transmembránové receptory, hlavní mediátory buněčné adheze, které zprostředkovávají spojení mezi buňkami a extracelulární matrix. Tato funkce vimentinu také souvisí s jeho rolí v buněčné migraci.

Schopnost migrace mezenchymálních buněk, je dále ovlivňována interakcí vimentinu s aktinovými filamenty [24,25]. Ty vytvářejí membránové výběžky, jejichž prodloužením a ukotvením k extracelulární matrix buňky migrují. V tomto procesu se aktinová vlákna spojují s kolagenovými vlákny extracelulární matrix pomocí integrinu. Vimentin usnadňuje a podporuje tvorbu buněčné extenze prostřednictvím asociace s aktinovými vlákny. Jeho elastické vlastnosti stabilizují aktinová vlákna vyrovnáním kontraktálního stresu při buněčné migraci. Vimentin tedy podporuje buněčnou migraci prostřednictvím regulace síly integrin-dependentních adhezí a interakcí s aktinovými filamenty. Buněčná migrace má zásadní/podstatný význam v procesech embryonálního vývoje, imunitní obrany (migrace imunitních buněk) a hojení ran (migrace fibroblastů za účelem tvorby a přestavby extracelulární matrix).

Některé buňky jako jsou makrofágy, neutrofilové, astrocyty nebo endoteliální buňky mohou sekretovat vimentin do extracelulárního prostředí [20]. Bylo zjištěno, že přítomnost vimentinu na buněčném povrchu a extracelulárním prostoru má zřejmě úlohu v imunitní odpovědi. Několik studií ukázalo, že za určitých podmínek, například při infekci, exprimují imunitní buňky (monocyty a makrofágy) vimentin na své membráně. Sekrece vimentinu je spouštěna prozánětlivým cytokinem TNF (tumor nekrotizující faktor) produkovaným makrofágy, zatímco je inhibována protizánětlivým cytokinem IL-10 (interleukin-10). Vimentin přítomný na povrchu infikovaných monocytů je rozpoznáván NK buňkami.

Vimentin hraje důležitou roli v procesu přechodu z epitelu na mezenchym (EMT, z angl. Epithelial-Mesenchymal Transition) [26,27]. Tento proces umožňuje nepohyblivým epiteliálním buňkám přejít do mezenchymálního fenotypu, což jim poskytuje migrační schopnost a buňky se stávají odolnější. Během EMT buňky ztrácejí adhezi k sousedním buňkám a bazálním membránám a stávají se pohyblivými. Epiteliální buňky, které normálně exprimují pouze keratinové IF (jiný typ intermediálních filament typicky exprimovaný právě v epiteliálních buňkách) iniciují expresi vimentinových IF. Tato změna v expresi IF, tedy nadměrná exprese vimentinu slouží jako marker EMT. EMT je

fyziologický proces, ke kterému dochází v ranném stádiu embryogeneze, kdy dochází k vývoji a diferenciaci buněk, při regeneraci tkání a hojení ran. Relativně nedávne pokroky v biochemických studiích odhalily, že EMT působí jako centrální mechanismus progresu karcinomu, který napomáhá metastázování buněk do vzdálených míst a podporuje chemorezistentní schopnosti těchto buněk. Bylo zjištěno, že míra exprese vimentinu koreluje s progresí a agresivitou určitých typů rakoviny. Zvýšená exprese vimentinu byla hlášena u různých epiteliálních rakovin včetně rakoviny prostaty, gastrointestinálních nádorů, nádorů centrální nervové soustavy, rakoviny prsu, maligního melanomu, rakoviny plic a dalších typů rakoviny [28]. Nadměrná exprese vimentinu se tedy stala klinickým biomarkerem některých druhů rakoviny.

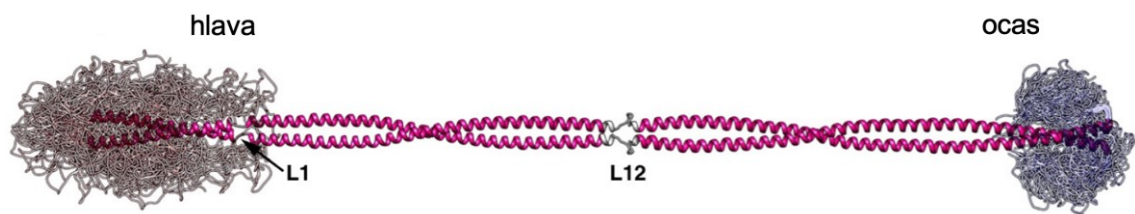
V posledních letech byla věnována zvýšená pozornost EMT vzhledem jeho roli v rezistenci na léky proti rakovině. Rezistence vůči chemoterapeutikům je hlavní příčinou selhání léčby rakoviny. Zacílení na klíčové složky mechanismu EMT včetně vimentinu, za účelem překonání rezistence vůči chemoterapeutikům je proto považováno za novou příležitost v léčbě rakoviny [28–30].

1.2.1.2 Struktura

Stejně jako všechny proteiny IF se vimentin skládá ze tří domén, z centrální domény tvořené třemi α -helikálními segmenty (1A, 1B a 2), propojené dvěma vysoce flexibilními oblastmi, tzv. linkery L1 a L12 [31]. Centrální doména je ohraničena vnitřně neuspořádanými flexibilními koncovými doménami, N-terminální ("hlava") a C-terminální ("ocas"). Srovnání primárních sekvencí napříč jednotlivými proteiny IF odhalilo, že všechny proteiny intermediálních filament vykazují značnou strukturní homologii v centrální doméně. Naopak terminální domény a oblasti flexibilních linkerů se napříč různými proteiny IF liší, a to složením primární aminokyselinové sekvence i délkou. Výjimkou je zachovaná délka linkeru L1 pro všechny proteiny IF typu III (Obrázek 8, str. 22) [32].

Centrální doména vimentinu je tvořena 310 aminokyselinovými zbytky, z nichž je 46 bazických a 70 kyselých, což uděluje centrální doméně záporný náboj [33]. N-terminální doména vimentinu obsahuje kladně nabitě oblasti dané převahou bazických aminokyselin, zatímco centrální doména nese záporný náboj v důsledku přebytku aminokyselin kyselé povahy. Interakce mezi kladně nabitými oblastmi N-terminální domény a záporně nabitou centrální doménou se zdá být klíčová v prvních fázích při sestavování vláken intermediálních filament [34].

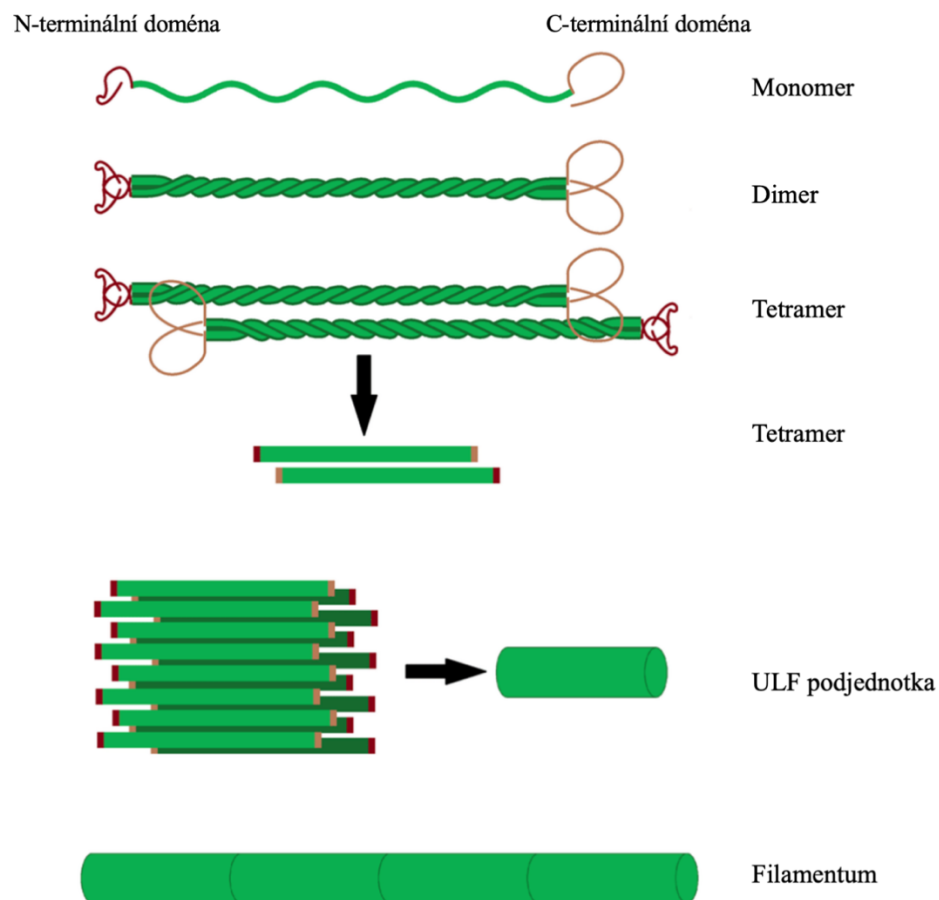
Aminokyselinová sekvence centrální domény se vyznačuje charakteristickým vzorem tzv. *heptadové repetice* (z angl. heptad repeat), což je opakování sedmi aminokyselinových zbytků s pravidelnou distribucí hydrofobních aminokyselinových, kde se v pozicích 1 a 4 nachází aminokyseliny hydrofobního charakteru jako je leucin, isoleucin, valin nebo methionin [32]. Tento motiv je zodpovědný za paralelní asociaci dvou molekul vimentinu za tvorby dimerní levotočivé dvoušroubovice, znázorněna na Obrázku 7. Segmenty 1B a 2 obsahují oblasti vykazující nepravidelnost heptadové repetice danou vznikem tzv. *undekadové repetice* (z angl. hendecad repeat), neboli opakování jedenácti aminokyselinových zbytků s hydrofobními aminokyselinami v pozicích 1, 4 a 8 [35].



Obrázek 7. Model vimentinového dimeru (levotočivá dvoušroubovice). Molekula vimentinu je tvořena α -helikální centrální doménou ohraničenou vnitřně neuspořádanými koncovými doménami, N-terminální (hlava) a C-terminální (ocas). Centrální doména je rozdělena flexibilními linkery L1 a L12 na tři α -helikální segmenty. Převzato z [31] a upraveno

Přestože celkové složení aminokyselinové sekvence se napříč různými IF liší, doménové složení a homologní motivy centrální domény jsou to, co definuje rodinu proteinů IF [31]. Konkrétně, jak délka aminokyselinové sekvence všech tří α -helikálních segmentů, tak motivy *heptadové/undekadové repetice* jsou konzervované u všech typů IF, jak je znázorněno na Obrázku 8 (str. 22) pro proteiny IF typu III vimentin, desmin, GFAP a periferin. Konkrétně, segment 1A obsahuje 42 aminokyselinových zbytků (6 *heptadových repetice*), segment 1B obsahuje 102 zbytků (13 *heptadových repetice* a 1 *undekadová repetice*) a segment 2 obsahuje 140 zbytků (13 *heptadových repetice* a 4 *undekadové repetice*) [31]. Kromě toho všechny proteiny IF obsahují dva absolutně shodné motivy na obou koncích centrální domény, které se zdají být obzvlášť důležité pro proces skládání filament.

terminální domény, C-terminální domény i s izolovanou centrální doménou vimentinu a zjistil, že vimentin postrádající N-terminální domény není schopen tvořit tetramery, zatímco delece C-terminální domény neměla na proces tvorby filament vliv [36]. Podle této studie se však ocasní domény účastní poslední fáze, kdy dochází k radiálnímu zhuštění vláken a ovlivňuje jejich výslednou tloušťku. Podrobnější zkoumání provedl o pár let později Shoeman *et al.* a odhalil aminokyselinové sekvence hlavové domény kritické pro polymeraci do filament [37].



Obrázek 9. Schématické znázornění procesu skládání vimentinových filament. Dvě paralelně spojené molekuly vimentinu tvoří levotočivou dvoušroubovici – základní stavební jednotku intermediálních filament. Dimery se spojují antiparalelně za vzniku tetramerů. Laterální asociací zpravidla 8 tetramerů vznikají tzv. ULF podjednotky, které se navzájem napojují podélně za vzniku prodlužujícího se vimentinového vlákna. Převzato z [16] a upraveno

Tetramery po jejich vytvoření velmi rychle asociují v laterálním směru za vzniku takzvaných ULF podjednotek (z angl. unit length filament) o průměru přibližně 16 nm a délce 58 nm [33]. ULF podjednotka se většinou skládá z osmi tetramerů. Po vytvoření ULF následuje mnohem pomalejší fáze, ve které se ULF podjednotky napojují podélně za vzniku rostoucího vlákna. Během této poslední fáze skládání dochází k vnitřnímu

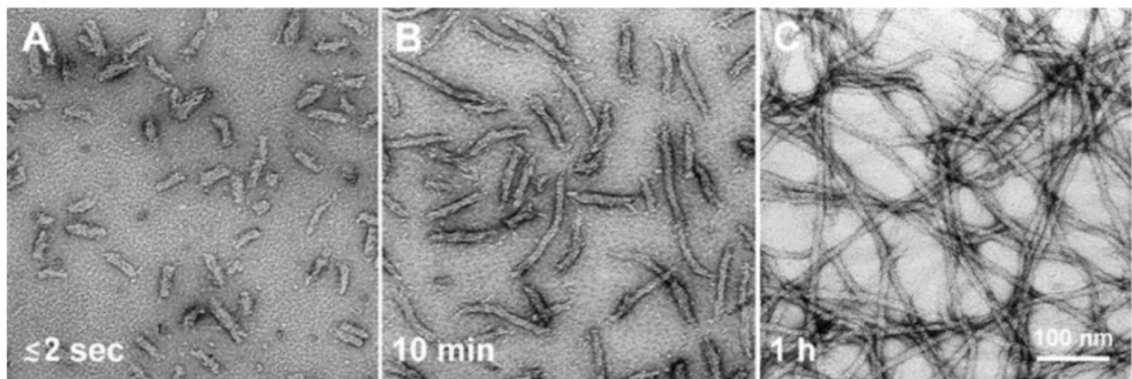
přeskupování podjednotek, které vede k radiálnímu zhuštění vlákna za vzniku zralých vimentinových filament o průměru 10-12 nm. Uvádí se, že zralá vlákna lidského vimentinu obsahují v průřezu cca 32 monomerů.

Síť intermediálních filament je neustále reorganizována v reakcích na vnitřní i vnější podněty při mnoha fyziologických funkcích. Proteiny IF včetně vimentinu prochází mnoha post-translačními modifikacemi (PTM), které regulují jejich funkce i dynamiku skládání a (re)organizace vláknitých sítí. Nejčastější modifikace zahrnují fosforylaci, glykosylaci, sumoylaci, acetylaci, prenylaci [38]. Studie PTM proteinů IF odhalily regulační vliv fosforylace a defosforylace na dynamiku reorganizace vimentinové sítě. Konkrétně, fosforylace serinových a threoninových zbytků (typicky v doménách hlavy a ocasu) podporuje depolymeraci vimentinových vláken na ULF podjednotky, zatímco defosforylace zvyšuje stabilitu vlákna [39,40]. Polymerace/depolymerace vimentinových filament může probíhat připojováním/odpojováním ULF podjednotek z obou konců vlákna. Podjednotky uvolněné depolymerací vlákna se podílí na přestavbě vimentinových sítí a mohou se opět zapojit na kterýkoliv konec jiného vlákna, avšak mohou se začleňovat i po celé délce vlákna [41]. Tvorba vimentinových filament je dynamická, ačkoliv ULF se z rostoucích vláken uvolňují nízkou rychlostí. Intracelulární pohyb a distribuce vimentinových podjednotek i zralých vimentinových filament v buňkách je zprostředkován pomocí molekulárních motorů kinesinu a dyneinu pohybujících se podél mikrotubulů [42].

1.2.1.4 Sestavení vimentinových filament *in vitro*

Proteiny intermediálních filament se za fyziologických podmínek sestavují samovolně do tetramerních podjednotek přes ULF až do zralých vláken. Experimenty sledované elektronovou mikroskopií ukazují, že vimentinové podjednotky za fyziologických podmínek spontánně polymerují do vláken během několika minut (Obrázek 10).

Rekombinantní vimentin je v monomerní formě stabilní v 8mol/l močovinovém pufru. Snižováním iontové síly dochází k asociaci monomerů a v 6mol/l močovinovém pufru tvoří vimentin dimery. Dalším snižováním iontové síly dochází k asociaci dimerních podjednotek, v pufru s nízkým obsahem solí (např. 5mmol/l Tris-HCl pufr, pH 8,4) obsahuje roztok rekombinantního vimentinu převážně tetramery [43]. Sestavení vimentinových filament z tetramerních podjednotek může být následně snadno iniciováno opětovým zvýšením iontové síly roztoku. Během několika sekund po přidání soli dochází k asociaci tetramerů za vzniku ULF (Obrázek 10A), které se následně v pomalejším kroku (během několika minut) podélně napojují do narůstajících vláken (Obrázek 10 B,C).



Obrázek 10. *In vitro* sestavování filament rekombinantního lidského vimentinu pozorované elektronovým mikroskopem. Snímky elektronové mikroskopie pořízené po (A) 1-2 sekundách, (B) 10 minutách a (C) 1 hodině po iniciaci sestavení vimentinových vláken. Převzato z [43]

1.2.1.5 Patologie

Změny exprese vimentinu jsou spojovány s velkým počtem patologických stavů, včetně již dříve zmíněné karcinogeneze, ale také autoimunitních a zánětlivých onemocnění, onemocnění srdce, cév, plic, onemocnění kosterního, endokrinního a reprodukčního systému, infekční a kožní onemocnění [25,44,45]. V poslední době se výzkumy zaměřují na souvislost vimentinu s revmatoidní artritidou, Crohnovou chorobou (zánětlivé onemocnění střev) nebo fibrózou plic a jater, a vývoj příslušných terapeutických přístupů cílících na vimentin [46–49].

Nedávno byly detekovány a zkoumány specifické mutace vimentinu způsobující šedý zákal [50] a syndrom předčasného stárnutí [51]. Tyto mutace pravděpodobně ovlivňují funkci vimentinu tím, že dochází k narušení iontových interakcí zapojených do skládání vimentinových filament, což se projevuje vznikem vimentinových agregátů v postižených buňkách.

Ve studii publikované před několika lety byla odhalena bodová mutace vimentinu E151K vedoucí k šedému zákalu, který je často způsobený nesprávným složením a agregací proteinů [50]. Mutace E151K, způsobuje záměnu kyseliny glutamové lysinem v poloze „5“ první *heptadové repetice* α -helikálního segmentu 1B centrální domény vimentinu. Glutamová kyselina v pozici 151 je v sekvenci vimentinu vysoce konzervovaná u všech obratlovců. V buňkách postižených touto mutací byly pozorovány cytoplazmatické agregáty způsobené defektním skládáním vimentinové sítě. Mutace E151K pravděpodobně narušuje iontové interakce mezi molekulami vimentinu nezbytnými pro sestavování vláken.

V další studii byla detekována mutace vimentinu L378P vedoucí k syndromu předčasného stárnutí [51]. Mutace L378P způsobuje záměnu leucinu v pozici 387 za prolin. Leucin v pozici 387 vimentinu je v rodině IF proteinů vysoce konzervovaný a nachází se v poloze „5“ *heptadové repetice* α -helikálního segmentu 2 centrální domény. Studie na buňkách získaných od pacienta s touto mutací i transfekovaných buňkách opět odhalily poruchu ve skládání vimentinové sítě vedoucí ke vzniku agregátů.

Zajímavé je, že analogické mutace u dalších proteinů IF, konkrétně desminu a keratinu 14, byly spojeny s nervosvalovým onemocněním myofibrilární myopatie a kožním onemocněním epidermolysis bullosa simplex, známější pod názvem nemoc motýlích křídel [51].

1.2.1.6 Současná problematika

Současné studie považují vimentin za klinicky perspektivní cíl pro diagnostiku, prognózu a léčbu širokého spektra chorob od rakoviny po infekční a zánětlivá onemocnění [25].

Dohromady, na základě uvedených skutečností je zřejmé, že je důležité se dále věnovat studiu struktury a funkcí vimentinových filament, jak se IF proteiny organizují do vláken a jak interagují s dalšími proteiny. Studie ze všech těchto oblastí mohou přinést cenné informace, které by umožnily pochopit a propojit mechanismy mnoha nemocí souvisejících se změnami v expresi proteinů IF, poskytnout nové poznatky pro vývoj a výzkum nových terapeutických přístupů, a umožnit účinnější a personalizovanější diagnostiku a léčbu.

Vimentin je jedním z nejznámějších a rozsáhle studovaných členů rodiny proteinů IF. Co se strukturní charakteristiky týče, je vimentin jeden z nejvíce prozkoumaných proteinů IF. Vzhledem ke strukturní podobnosti mezi jednotlivými proteiny IF, a především proteinů stejného typu IF (viz Obr. 6), je na vimentin pohlíženo jako na modelový protein IF. Detailní strukturní charakterizace oligomerních podjednotek vznikajících v průběhu skládání vimentinových vláken je předpokladem k objasnění architektury zralých filament.

První modely architektury IF poskytl již před třiceti lety Steinert *et al.*, čímž připravil půdu pro další výzkumy strukturní analýzy oligomerů IF [52]. Tehdy bylo na základě experimentů chemického sítění (oligomerů, polymerů a zralých vláken) vimentinu navrženo několik modelů představujících možné způsoby asociace dimerních podjednotek (dimer-dimer), ke kterým dochází v procesu skládání filament, a označil je jako model A₁₁, A₁₂, A₂₂ (tři způsoby laterální asociace) a A_{CN} (způsob podélné asociace). Strukturní analýza homopolymerů však dlouho představovala komplikaci, především z hlediska dostupných analytických metod a příslušných softwarů pro vyhodnocení.

Další pokrok poskytla až nedávná podrobná strukturní charakterizace tetrameru vimentinu, které bylo dosaženo použitím techniky MIX chemického sítění umožňující identifikaci a rozlišení intermolekulárních a intramolekulárních interakcí [14]. Bylo zjištěno, že v tetramerním vimentinu asociují dimerní podjednotky podle modelu A₁₁, tzn. centrální domény dimerních podjednotek jsou zarovnány α -helikálními segmenty 1B, a dále byly odhaleny oblasti stabilizující tetramerní strukturu.

V současné době je tedy architektura vimentinových IF známá až po strukturu tetrameru. Dále se nabízí zaměřit se na strukturní analýzu vyšších oligomerů vznikajících v dalších fázích skládání IF, tedy ULF podjednotky a následně zralá vlákna. Podrobnější zkoumání si zaslouží i terminální domény (obzvlášť hlavová) vzhledem k jejich roli a nezbytnému zapojení ve skládání IF.

2 CÍLE PRÁCE

1) **Ověřit, že ve směsi vimentinových tetramerů v podmínkách pro stabilní tetramery nedochází k výměně dimerních podjednotek**

- Příprava směsi dusíkem ^{15}N izotopově značených a ^{14}N neznačených tetramerů vimentinu pro techniku MIX CXMS
- Chemické sítění směsi vimentinových tetramerů a LC-MS analýza sítěných peptidů
- Interpretace získaných dat, identifikace produktů síťovací reakce a kvantifikace zastoupení interdimerního a intradimerního sítění identifikovaných produktů

2) **Pomocí techniky MIX CXMS získat informace o vzdálenostních omezeních mezi tetramery v ULF podjednotkách pro výpočetní modelování struktury ULF podjednotky vimentinu**

- Příprava směsi $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek vimentinu pro techniku MIX CXMS
- Chemické sítění směsi ULF podjednotek a LC-MS analýza sítěných peptidů
- Interpretace získaných dat, identifikace produktů síťovací reakce, kvantifikace zastoupení intertetramerního a intratetramerního sítění identifikovaných peptidových spojení
- Identifikace peptidových spojení pocházejících z rozhraní tetramer-tetramer

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

| | |
|---|----------------------------|
| 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDC) | Sigma Aldrich, USA |
| 1,4-Dithiothreitol (99%) | Sigma Aldrich, USA |
| 3-(<i>N</i> -Morfolino)propansulfonová kyselina (99,5%) | Sigma Aldrich, USA |
| 4-Ethylmorfolin (99,5%) | Sigma Aldrich, USA |
| Acetonitril (LC-MS kvalita) | Merck, Německo |
| Coomassie Brilliant Blue R 250 | VWR International, USA |
| Dimethyl sulfoxid | Merck, Německo |
| Disukcinimidyl dibutyric močovina (DSBU) | CF Plus Chemicals, ČR |
| Disukcinimidyl dipropionic močovina (DSPU) | CF Plus Chemicals, ČR |
| Disukcinimidyl glutarát (DSG) | Creative Molecules, Kanada |
| Disukcinimidyl suberát (DSS) | Creative Molecules, Kanada |
| Dodecylsíran sodný | VWR International, USA |
| Ethanol (HPLC kvalita) | Lach-ner, ČR |
| HEPES (99,5 %) | Carl Roth, Německo |
| Hydroxid draselný (85%) | Sigma Aldrich, USA |
| Chloracetamid (98%) | Sigma Aldrich, USA |
| Chlorid sodný (p.a. kvalita) | Lach-ner, ČR |
| Chlorid draselný (p.a. kvalita) | Lach-ner, ČR |
| Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová | Bruker Daltonics, USA |
| Kyselina octová (99,5%) | Sigma Aldrich, USA |
| Kyselina mravenčí (98%) | Merck, Německo |
| Kyselina trifluoroctová (99%) | Sigma Aldrich, USA |
| Methanol (LC-MS kvalita) | Merck, Německo |
| Močovina (99,9%) | VWR International, USA |
| Methylamin hydrochlorid (98%) | Sigma Aldrich, USA |
| NuPAGE® LDS vzorkový pufr | Invitrogen, USA |
| Proteasa Trypsin gold | Promega, USA |
| Proteázová směs Trypsin/Lys-C | Promega, USA |
| Proteinový standard Novex Sharp Pre-Stained | Invitrogen, USA |
| Proteinový standard Precision Plus Protein All Blue Prestained | BioRad, USA |
| Tris (2-karboxyethyl) fosfin hydrochlorid | Sigma Aldrich, USA |
| Voda deionizovaná (LC-MS kvalita) | Merck, Německo |

3.2 Biologický materiál

| | |
|---|--|
| Vimentin Y400L značený těžkým izotopem dusíku ¹⁵ N | Laboratoř biokrytalografie, KU Leuven, Belgie |
| Vimentin Y400L ¹⁴ N neznačený | Laboratoř biokrytalografie, KU Leuven, Belgie |

3.3 Roztoky

Asociační pufr (2x koncentrovaný)

40mmol/l HEPES, 300mmol/l KCl, pH 7,5

Barvicí roztok pro SDS-PAGE

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

Dialyzační pufr A

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

Dialyzační pufr B

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

Elektrodový pufr

5 % (v/v) MOPS SDS pufr

Ethylmorfolinový pufr

100mmol/l 4-ethylmorfolin, 10 % (v/v) acetonitril, pH 8,4

Monomerní pufr

8mol/l močovina, 5mmol/l Tris, 2mmol/l DTT, 5mmol/l MAC, 2mmol/l EDTA, 1mol/l chlorid sodný, pH 7,5

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE

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

Odsolovací roztok A

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

Odsolovací roztok B

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

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE

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

3.4 Použité přístroje a materiál

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

3.5 Software

| | |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| Data Analysis 5.0 | Bruker Daltonics, USA |
| LinX 1.14 | MBÚ AVČR, ČR [53] |
| MeroX 1.6.6. | StavroX.com, Michael Götze [54] |
| PyMOL Molecular Graphics System 2.1.0 | Schrödinger, LCC [55] |

3.5 Metody

3.5.1 Studovaný materiál

Pro účely této práce byl použit vimentin s bodovou mutací Y400L, při které dochází k záměně tyrosinu v pozici 400 za leucin. Tato mutace způsobuje narušení sestavování vimentinových filament. Konkrétně, sestavování vimentinu probíhá pouze do ULF podjednotek a nedochází k jejich spontánní polymeraci do vláken. Vimentin s bodovou mutací Y400L tedy umožňuje zaměřit se na studium struktury ULF podjednotek.

Rekombinantní vimentin Y400L značený těžkým izotopem dusíku ^{15}N (dále označován jako vimentin ^{15}N) a neznačený vimentin Y400L (dále označován jako vimentin ^{14}N), který byl využit pro tyto experimenty byl poskytnut Laboratoří biokrytalografie, KU Leuven, Belgie. Rekombinantní vimentin je jako monomer stabilní v pufru o složení: 8mol/l močovina, 5mmol/l Tris, 2mmol/l DTT, 5mmol/l MAC, 2mmol/l EDTA, 1mol/l chlorid sodný, pH 7,5.

3.5.2 Analýza tetramerních a ULF podjednotek vimentinu technikou MIX CXMS

3.5.2.1 Tvorba vimentinových tetramerů pomocí postupné dialýzy

Tvorba tetramerů rekombinantního vimentinu byla dosažena snižováním iontové síly z podmínek pro stabilní monomery pomocí postupné dialýzy s použitím dvou dialyzačních roztoků A (6mol/l močovina, 10mmol/l HEPES, 5mmol/l MAC, pH 8,2) a B (2mmol/l HEPES, 0,3mmol/l DTT, pH 8,2). Příprava tetramerního vimentinu pomocí postupné dialýzy probíhala odděleně pro vimentin ^{14}N a vimentin ^{15}N v kazetách s dialyzační membránou zadržující molekuly o relativní molekulové hmotnosti vyšší než 10 kDa. Dialýza probíhala při teplotě 4°C za stálého míchání na magnetické míchačce.

Vimentin ^{14}N o koncentraci 1,11 mg/ml a vimentin ^{15}N o koncentraci 1,8 mg/ml byly rozmrazeny a odděleně přesunuty do dialyzační kazety. První krok postupné dialýzy probíhal v 1 litru dialyzačního roztoku A do následujícího dne. V dalším kroku byly dialyzační kazety se vzorky přesunuty do kádinky s roztokem tvořeným 200 ml dialyzačního pufru A a 100 ml dialyzačního pufru B. V těchto podmínkách probíhala dialýza po dobu 20 minut. Poté bylo z kádinky odebráno 100 ml roztoku, a přidáno 100 ml dialyzačního pufru B a dialýza opět probíhala po dobu 20 minut. Následně bylo odebráno 150 ml roztoku, přidáno 150 ml dialyzačního roztoku B a vzorky byly dialyzovány 20 minut. Tento krok byl opakován ještě jednou a následně byly dialyzační kazety se vzorky umístěny do 1 litru dialyzačního pufru B, kde dialýza probíhala po dobu

1,5 hodiny. Vzorky byly poté přesunuty do nové kádinky obsahující 2 litry dialyzačního pufru B, ve kterém dialýza probíhala přes noc. V posledním kroku postupné dialýzy byly vzorky přeneseny do 1,5 litru dialyzačního pufru B a ponechány dialyzovat po dobu 3 hodin. Tímto bylo dosaženo sestavení tetramerního vimentinu ^{14}N a vimentinu ^{15}N .

3.5.2.2 Stanovení koncentrace vimentinu ^{14}N a ^{15}N

Obsah dialyzačních kazet byl po ukončení dialýzy převeden do mikrozkušavek a spektrofotometricky (A_{280}) byla určena koncentrace tetramerního vimentinu ^{14}N a vimentinu ^{15}N . Z absorbance vzorků při 280 nm byla stanovena hmotnostní koncentrace tetramerního vimentinu ^{14}N a ^{15}N . Teoretická hodnota molárního absorpčního koeficientu vimentinu Y400L při 280 nm je $21\,050\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

3.5.2.3 MS analýza vzorků pro přípravu směsi vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N

Principem techniky MIX je použití směsi proteinu ^{14}N a ^{15}N v poměru 1:1. Vhodný poměr pro smíchání tetramerního vimentinu ^{14}N a ^{15}N byl nejprve experimentálně ověřen pomocí MALDI-TOF MS (MALDI, z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, TOF, z angl. Time of Flight). Na základě stanovených koncentrací tetramerního vimentinu ^{14}N a ^{15}N byl připraven vzorek vimentinu $^{14}\text{N}:$ ^{15}N v poměru 1:1. Tento vzorek byl třikrát naředěn 100mmol/l ethylmorfolinovým pufrům a následně byl ke vzorku přidán trypsin v hmotnostním poměru 1:10 (proteasa : protein). Proteolytické štěpení probíhalo v termostatu při 37 °C po dobu 1,5 hodiny. Před MS analýzou byly vzniklé peptidy odsoleny na koloně pomocí odsolovacích roztoků A a B podle výrobcem uvedeného protokolu [56]. Na MALDI terčík byl poté nanesen 1 μl vzorku a po zaschnutí byl vzorek převrstven 1 μl MALDI matrice (kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová). Měření a nastavení hmotnostního spektrometru bylo provedeno Mgr. Janem Fialou PhD. Ze získaného hmotnostního spektra vzniklých peptidů byl ověřen vhodný poměr pro smíchání tetramerního vimentinu ^{14}N a ^{15}N .

3.5.2.4 Příprava $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek vimentinu

Směs tetramerního vimentinu ^{14}N a ^{15}N byla připravená smícháním obou proteinů v hmotnostním poměru 1:1. Tato směs byla dále využita k přípravě $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek vimentinu následujícím způsobem. Ze směsi tetramerního vimentinu (^{14}N a ^{15}N) byla odebrána část vzorku (zbytek byl použit pro chemické síťení), která byla nejprve umístěna na 5 minut do termostatu o 37 °C společně s asociačním pufrům.

Následně byl vzorek tetramerní směsi vimentinu dvakrát naředěn asociačním pufrem o složení 40mmol/l HEPES, 300mmol/l KCl, pH 7,5 a reakční směs byla dále ponechána inkubovat na třepačce při 750 rpm a 37 °C po dobu 1 hodiny. Zvýšení iontové síly vyvolává asociaci tetramerů na ULF podjednotky.

Vzorky tetramerní směsi vimentinu (^{14}N a ^{15}N) a $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek vimentinu byly dále použity pro chemické sítění.

3.5.2.5 Chemické sítění vimentinových vzorků

Pro chemické sítění byla použita činidla disukcinimidyl glutarát (**DSG**), disukcinimidyl suberát (**DSS**), disukcinimidyl dibutyric močovina (**DSBU**) a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (**EDC**).

Zásobní roztoky jednotlivých síťovacích činidel o koncentraci 2 mg/ml byly připraveny rozpuštěním DSG, DSS a DSBU v dimethyl sulfoxidu (DMSO) a rozpuštěním EDC ve vodě. Pro každou síťovací reakci bylo použito 20 μg proteinu. Jednotlivá činidla chemického sítění byla ke vzorkům přidána v padesátinásobném molárním nadbytku síťovacího činidla ku proteinu. Reakční směs byla poté zamíchána a ponechána inkubovat při laboratorní teplotě po dobu jedné hodiny pro vzorky s činidly DSG, DSS a DSBU, a po dobu pěti hodin pro vzorky s činidlem EDC. Všechny vzorky byly připraveny v triplicátech, společně s příslušným kontrolním vzorkem bez přídavku síťovacího činidla.

Po dokončení síťovací reakce byla z každého vzorku odebrána polovina reakční směsi, která byla využita pro kontrolu síťovací reakce pomocí polyakrylamidové elektroforézy. Druhá polovina vzorku (10 μg modifikovaného proteinu) byla zpracována pro LC-MS analýzu.

3.5.2.6 Kontrola síťovací reakce pomocí SDS-PAGE

Pro kontrolu síťovací reakce byla využita metoda polyakrylamidové gelové elektroforézy v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE, z angl. Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electroforesis). Ke vzorkům obsahujícím 10 μg proteinu modifikovaného síťovacím činidlem byl přidán 4x koncentrovaný vzorkový pufr v poměru 3:1 (v/v). Takto připravené vzorky byly zamíchány, inkubovány po dobu 5 minut v termostatu při 95 °C a nakonec centrifugovány. Do dvanácti-jamkového polyakrylamidového NuPage 4-12% Bis-Tris gelu bylo nanášeno 20 μl (5 μg proteinu) jednotlivých vzorků a příslušné kontroly. Použit byl vždy jeden vzorek z triplicátu (směs

tetramerů ^{14}N a ^{15}N či $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotky s jednotlivými síťovacími činidly). Do první a poslední jamky gelu bylo pipetováno 10 μl proteinového standardu Novex Sharp Pre-Stained.

Separace produktů chemického sítění probíhala ve 20x ředěném MOPS elektrodozem pufru při 200 V po dobu 40 minut. Separované proteiny v gelu byly následně vizualizovány pomocí barvicího roztoku s Coomassie Brilliant Blue R 250. Po obarvení bylo barvivo z gelu vymýváno odbarvovacím roztokem.

3.5.2.7 Příprava vzorků pro LC-MS analýzu

Zpracování vzorků pro LC-MS analýzu zahrnovalo redukcí pomocí Tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochloridu (TCEP), alkylaci pomocí chloracetamidu (CAA) a následné proteolytické štěpení proteinu modifikovaného síťovacími činidly pomocí trypsinu.

Nejprve byly vzorky třikrát naředěny 100mmol/l ethylmorfolinovým puftrem. Redukce byla provedena přidáním 1mol/l zásobního roztoku TCEP ke vzorkům v takovém množství, aby konečná koncentrace TCEP v reakční směsi činila 5 mmol/l. Pro alkylaci byl ke vzorkům přidán 1mol/l zásobní roztok CAA tak, aby výsledná koncentrace CAA ve směsi činila 20mmol/l. Poté byla reakční směs zamíchána a ponechána inkubovat po dobu 5 minut v termostatu při 70 °C. Následně byla k reakční směsi přidána proteasa Trypsin gold v hmotnostním poměru 1:20 proteasa ku proteinu a vzniklá směs byla ponechána inkubovat v termostatu při teplotě 37 °C přes noc. Přídavek trypsinu byl další den opakován tak, aby výsledný hmotnostní poměr proteasa ku proteinu činil 1:10 a štěpení opět probíhalo v termostatu při 37 °C po dobu 4 hodin. Štěpící reakce byla poté ukončena přidáním kyseliny trifluoroctové k reakční směsi v takovém množství, aby byla ve směsi 0,1%.

Nakonec byly vzorky s roztokem peptidové směsi umístěny do lyofilizátoru, a peptidy zbylé po odpaření rozpouštědla byly resuspendovány ve 25 μl 0,1% kyseliny mravenčí v LC-MS čistotě. Takto připravené vzorky byly převedeny do vialek se septem pro LC-MS analýzu.

3.5.2.8 LC-MS analýza produktů síťovací reakce

Měření a nastavení hmotnostního spektrometru byla provedena Mgr. Janem Fialou, PhD. Při LC-MS analýze bylo 5 μl vzorku obsahující zhruba 2 μg peptidů naneseno na chromatografickou kolonu s reverzní fází. Separované peptidy eluované z kolony byly

následně ionizovány elektrosprejem hmotnostního spektrometru a analyzovány pomocí iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací [14].

3.5.2.9 Vyhodnocení LC-MS dat

Data získaná LC-MS analýzou byla nejprve zpracována v programu Data Analysis 5.0, dekonvoluce spekter byla provedena SNAP algoritmem. Data zpracovaná v programu Data Analysis byla vyexportována a dále zpracována v programu LinX 1.14., který umožňuje přiřazení a kvantifikaci peptidů spojených síťovacím činidlem, značených dusíkem ^{14}N a ^{15}N .

Zpracování dat v programu LinX 1.14. bylo provedeno následujícím způsobem. Na základě nastavení příslušných parametrů byla vytvořena teoretická knihovna možných peptidových spojení. Po vytvoření teoretické knihovny byla do programu LinX vložena získaná experimentální data, tedy hodnoty m/z detekovaných peptidů. Experimentálně zjištěné hodnoty m/z byly programem porovnány s teoretickými hodnotami hmotností peptidů spojených daným síťovacím činidlem, které je možné získat štěpením vimentinu Y400L trypsinem. Experimentální hodnoty m/z byly přiřazeny konkrétním spojeným peptidům, jestliže relativní odchylka teoretické a experimentální hodnoty nepřesahovala předem definovanou přesnost měření. Všechny peptidy spojené síťovacím činidlem identifikované programem LinX byly následně manuálně ověřeny jejich vyhledáním v hmotnostních spektrech v programu Data Analysis 5.0.

Konkrétní nastavení parametrů pro hledání v programu LinX bylo následující. Byla vložena aminokyselinová sekvence vimentinu Y400L ve formátu fasta (Příloha 1). Poté byla zvolena použitá proteasa, tedy trypsin, a jeho specifita štěpení peptidové vazby za aminokyselinami argininem a lysinem, v případě že po nich nenásleduje prolin. Zároveň byl nastaven maximální počet štěpících míst vynechaných proteázou na tři. Dále byly nastaveny modifikace – fixní modifikace: karbamidomethylace cysteinu a variabilní modifikace: oxidace methioninu. Následně bylo definováno použité síťovací činidlo (DSG, DSS, DSBU či EDC) a jeho specifita. V případě činidel DSG, DSS a DSBU byla nastavena specifita vůči lysinu, serinu a N-konci, v případě EDC specifita vůči kyselině asparagové, kyselině glutamové, a C-konci. Chyba měření byla nastavena na nejvýše 2 ppm.

Kvantifikace inter- a intra-tetramerního síťení byla u většiny identifikovaných produktů chemického síťení provedena manuálně s využitím informací získaných v programech

LinX a Data Analysis. Procentuální zastoupení inter-tetramerního sítění v daném produktu chemického sítění bylo vypočítáno podle uvedeného vzorce (1), ve kterém I představuje intenzitu jednotlivých peptidových forem $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$, které vznikly proteolytickým štěpením směsi izotopově značeného a neznačeného vimentinu po chemickém sítění. Jednotlivé peptidové formy se liší svou hmotností, což je dáno různým počtem dusíků v aminokyselinové sekvenci spojených peptidů. Do výpočtu byly zahrnuty všechny příspěvky intenzit izotopické obálky daného produktu sítění.

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

3.5.3 Analýza tetramerních a ULF podjednotek vimentinu ^{14}N pomocí CXMS

3.5.3.1 Příprava vimentinových vzorků pro chemické sítění – tvorba tetramerního vimentinu a ULF podjednotek

Pro tento experiment byl použit pouze neznačený vimentin Y400L (vimentin ^{14}N). Nejprve byly připraveny vzorky vimentinových tetramerů a ULF podjednotek pro chemické sítění. Původní koncentrace vimentinu Y400L ^{14}N činila 1,9 mg/ml.

Tvorba **vimentinových tetramerů** byla provedena stejným způsobem jako je popsáno v oddíle 3.5.2.1. Po ukončení dialýzy byla spektrofotometricky stanovena koncentrace tetramerního vimentinu (popsáno v oddílu 3.5.2.2.). Příprava **ULF podjednotek vimentinu ^{14}N** z roztoku tetramerního vimentinu získaného postupnou dialýzou byla provedena obdobným způsobem jak bylo popsáno v oddílu 3.5.2.4.

3.5.3.2 Chemické sítění vimentinových vzorků

Pro chemické sítění vimentinových tetramerů a ULF podjednotek vimentinu byla použita činidla **DSBU** a disukcinimidyl dipropionic močovina (**DSPU**).

Zásobní roztoky DSBU a DSPU o koncentraci 2 mg/ml byly připraveny rozpuštěním síťovacích činidel v DMSO. Parametry síťovací reakce a její postup byl proveden stejně, jako bylo popsáno v oddílu 3.5.2.5. Reakční směs byla zamíchána a ponechána inkubovat při laboratorní teplotě po dobu jedné hodiny. Vzorky byly připraveny v triplikátech, společně s příslušným kontrolním vzorkem bez přídavku síťovacího činidla.

Po dokončení síťovací reakce byla z každého vzorku odebrána polovina reakční směsi, která byla využita pro kontrolu síťovací reakce pomocí polyakrylamidové elektroforézy. Druhá polovina vzorku (obsahující 10 µg modifikovaného proteinu) byla zpracována pro LC-MS/MS analýzu.

3.5.3.3 Kontrola síťovací reakce pomocí SDS-PAGE

Kontrola síťovací reakce metodou SDS-PAGE byla provedena za stejných podmínek a způsobem jako bylo popsáno v oddílu 3.5.2.6. Do polyakrylamidového NuPage 4-12% Bis-Tris gelu byl nanesen vždy jeden vzorek z triplikátu a příslušná kontrola. Na gel bylo nanášeno 5 µg proteinu vzorků vimentinových tetramerů, v případě vzorků ULF podjednotek 3 µg proteinu. Jako proteinový standard byl zde použit Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standard, který byl nanesen (5 µl) do první a poslední jamky gelu.

3.5.3.4 Příprava vzorků pro LC-MS/MS analýzu

Příprava vzorků pro LC-MS analýzu byla provedena stejným způsobem jako bylo popsáno v oddílu 3.5.2.7. Pro proteolytické štěpení byla použita směs proteáz Trypsin/Lys-C.

3.5.3.5 LC-MS/MS analýza produktů síťovací reakce

Měření a nastavení hmotnostního spektrometru byla provedena Mgr. Zdeňkem Kukačkou, Ph.D. Vzorky byly analyzovány metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Pro analýzu vzorků byly využity dva hmotnostní spektrometry s různými analyzátory.

Při první MS/MS analýze byl využit timsTOF (tims, z angl. Trapped Ion Mobility Spectrometry, TOF, z angl. Time of Flight) v módu datově závislého měření (DDA, z angl. Data Dependent Acquisition). Před MS/MS analýzou byly vzorky s použitím zařízení Evosep odsoleny podle návodu uvedeného výrobcem [57] a separovány pomocí kapalinové chromatografie. Využitím techniky timsTOF v DDA módu byly separované peptidy eluované z chromatografické kolony ionizovány elektrosprejem hmotnostního spektrometru a v první fázi analyzovány pomocí iontové mobilitní spektrometrie. Nejintenzivnější prekurzorové ionty byly poté fragmentovány v kolizní cele a dále analyzovány pomocí analyzátoru doby letu.

V druhém případě byla MS/MS analýza provedena pomocí FT-ICR v módu datově nezávislého měření (DIA, z angl. Data Independent Acquisition). Využitím této techniky byly separované peptidy eluované z chromatografické kolony ionizovány elektrosprejem hmotnostního spektrometru a analyzovány pomocí iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací. V kolizní cele byly fragmentovány všechny ionty v definovaných oblastech m/z .

3.5.3.6 Vyhodnocení LC-MS/MS dat

Data získaná LC-MS/MS analýzou byla nejprve zpracována v programu Data Analysis 5.0. Dekonvoluce spekter byla provedena SNAP algoritmem. Takto zpracovaná data byla vyexportována ve formátu .mgf, a dále zpracovávána v programu MeroX 1.6.6.

V programu MeroX byla vytvořena teoretická knihovna spojených či modifikovaných peptidů nastavením příslušných parametrů. Po vytvoření teoretické knihovny byla do programu MeroX vložena získaná experimentální data, která byla porovnána s teoretickými hodnotami reportérových iontů – hmotností peptidů spojených daným síťovacím činidlem, které je možné získat štěpením vimentinu Y400L pomocí trypsinu/Lys-C a fragmentových iontů, vzniklých rozštěpením daného peptidu spojeného síťovacím činidlem v kolizní cele hmotnostního spektrometru. Experimentální hodnoty m/z byly přiřazeny konkrétním spojeným peptidům, jestliže relativní odchylka teoretické a experimentální hodnoty nepřesahovala nastavené hodnoty ppm pro prekurzorové a fragmentové ionty. Peptidy spojené či modifikované síťovacím činidlem identifikované programem MeroX byly následně manuálně zkontrolovány.

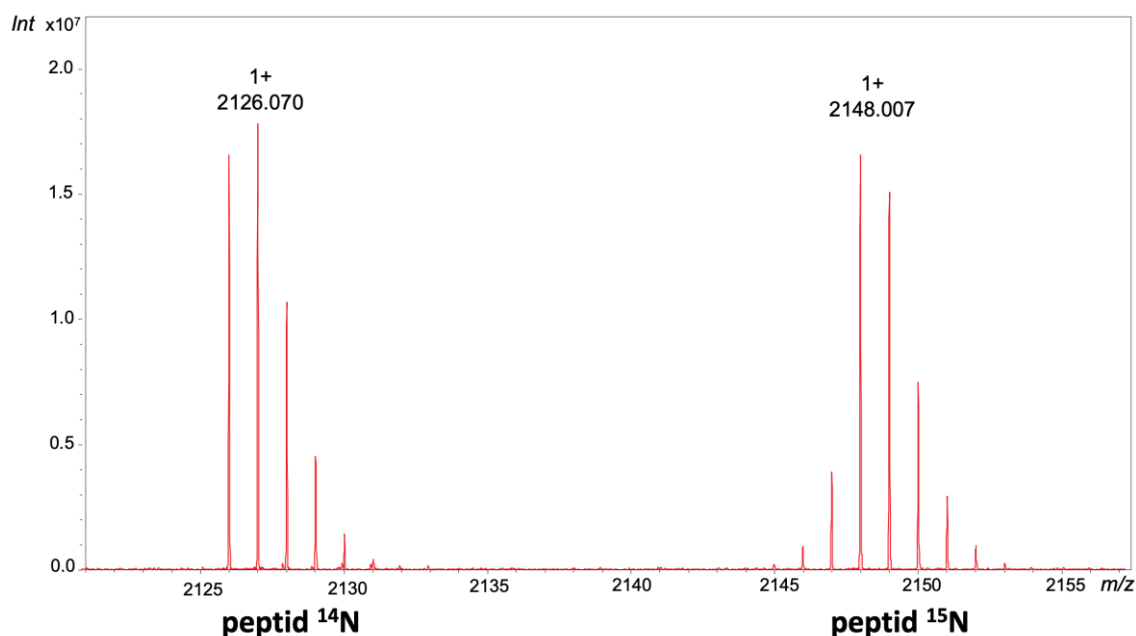
Konkrétní nastavení parametrů pro hledání v programu MeroX bylo následující. Byla vložena aminokyselinová sekvence vimentinu Y400L ve formátu fasta (Příloha 1). Poté byla zvolena specifita štěpení použité proteázy (trypsin, Lys-C), tedy štěpení peptidové vazby za aminokyselinami argininem a lysinem. Zároveň byl nastaven maximální počet štěpících míst vynechaných proteázou na tři a minimální délka vzniklého peptidu na pět aminokyselin. Dále byly nastaveny modifikace – variabilní oxidace methioninu (maximálně jedna na peptid) a fixní karbamidomethylace cysteinu. Následně bylo definováno použité síťovací činidlo, tedy DSBU či DSPU a jeho specifita – vůči lysinu, serinu a N-konci. Chyba měření byla nastavena na nejvýše 5 ppm pro prekurzorové ionty a 10 ppm pro fragmentové ionty v případě dat získaných měřením pomocí FT-ICR MS, a nejvýše 10 ppm pro prekurzorové ionty a 20 ppm pro fragmentové ionty v případě dat získaných měřením pomocí timsTOF MS.

4 VÝSLEDKY

4.1 Analýza tetramerních a ULF podjednotek vimentinu technikou MIX CXMS

4.1.1 Příprava směsi vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N

Pro přípravu vimentinových tetramerů bylo nezbytné provést dialýzu s postupným snižováním iontové síly z 8 mol/l močovinného pufru (monomerní pufr) obsahujícího monomery do pufru s nízkou koncentrací iontů (dialyzační pufr B). Po ukončení dialýzy byla spektrofotometricky (A_{280}) zjištěna koncentrace vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N . Koncentrace tetramerního vimentinu ^{14}N činila 0,3 mg/ml, koncentrace tetramerního vimentinu ^{15}N činila 1,5 mg/ml. K ověření ideálního poměru pro přípravu směsi vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N byl na základě stanovených koncentrací proteinů vytvořen vzorek, ve kterém byly tyto proteiny smíchány v hmotnostním poměru 1:1. Tato směs tetramerů byla proteolyticky štěpena a analyzována pomocí MALDI-TOF MS, čímž byla získána hmotnostní spektra peptidů obsahujících izotop ^{14}N a jejich odpovídajících ^{15}N forem. Příklad hmotnostního spektra (oblast m/z 2120-2155) odpovídající peptidu LLQDSVDFSLADAINTEFK a jeho ^{15}N formě je uvedena na Obrázku 11.



Obrázek 11. MS spektrum peptidu LLQDSVDFSLADAINTEFK a jeho ^{15}N formy o přibližně stejné intenzitě, identifikované ve vzorku tvořeném směsí vimentinu ^{14}N a ^{15}N v poměru 1:1.

Porovnáním intenzit peptidů ^{14}N a ^{15}N pocházejících ze směsi vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N v poměru 1:1 byl tento poměr ověřen jako vhodný k přípravě jejich směsi

pro techniku MIX. Tato směs byla poté využita pro přípravu $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek vimentinu. ULF podjednotky připravené tímto způsobem jsou složeny z kombinací tetramerů $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$.

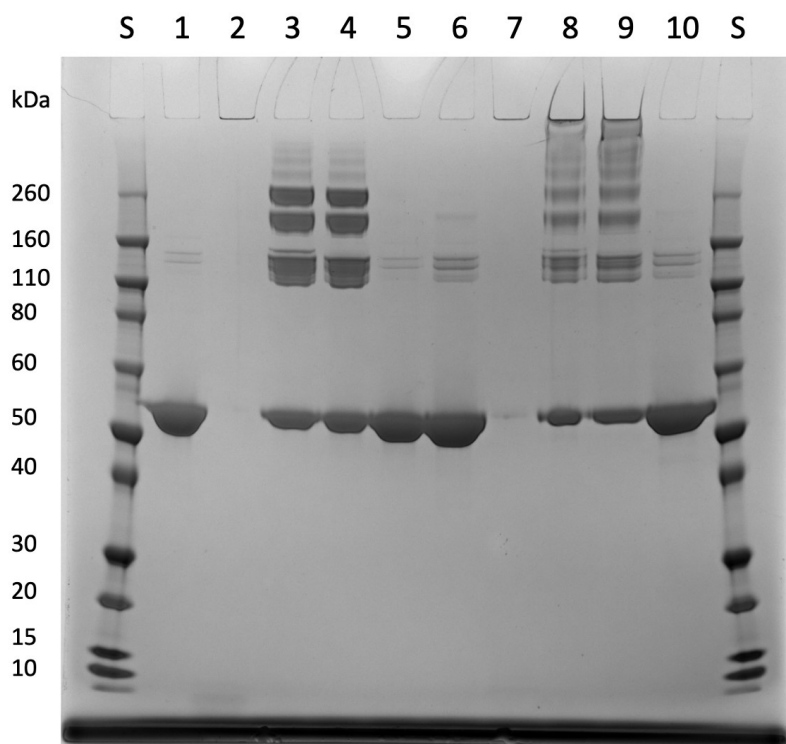
Vzorky směsi vimentinových tetramerů (^{14}N a ^{15}N) a $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek vimentinu byly dále využity pro chemické sítění.

4.1.2 Kontrola síťovací reakce pomocí SDS-PAGE

Kontrola chemického sítění vimentinových vzorků byla provedena pomocí SDS-PAGE a její výsledek je uveden na Obrázku 12 (str. 43). Do každé dráhy byl nanesen jeden vzorek z triplikátu. Do dráhy 1 byl nanesen kontrolní vzorek směsi tetramerů bez přídavku síťovacího činidla. V drahách 2-5 se nachází vzorky směsi tetramerů (^{14}N a ^{15}N) po sítění jednotlivými činidly, konkrétně v dráze 2 s činidlem EDC, v dráze 3 s činidlem DSS, v dráze 4 s činidlem DSG a v dráze 5 s činidlem DSBU. V drahách 7-10 se pak nachází směs $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek po chemickém sítění jednotlivými činidly ve výše uvedeném pořadí a v dráze 6 příslušný kontrolní vzorek.

V případě vimentinových tetramerů můžeme u vzorků sítěných činidlem DSS (dráha 3) a DSG (dráha 4) v porovnání s kontrolním vzorkem obsahujícím pouze monomerní formu vimentinu (~ 53 kDa) pozorovat přítomnost vyšších vimentinových struktur. Konkrétně vimentinové dimery v oblasti okolo 110 kDa, trimerní formy v oblasti okolo 170 kDa a tetramery, kterým odpovídají pruhy v oblasti okolo 250 kDa. U těchto vzorků můžeme pozorovat i přítomnost struktur vyšších než tetramery, ačkoliv ve výrazně menším množství. Vzorek s činidlem DSBU se naopak od kontrolního vzorku neliší, což naznačuje že síťovací reakce neproběhla anebo proběhla v minimální míře. V případě vzorku sítěného činidlem EDC můžeme pozorovat, že vzorek z jamky nezaputoval do gelu, a proto nebylo možné pomocí SDS-PAGE ověřit průběh síťovací reakce.

V případě vzorků $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek vimentinu jsou výsledky sítění jednotlivými činidly analogické výsledkům sítění tetramerní směsi. U vzorků $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek sítěných činidly DSS (dráha 8) a DSG (dráha 9) můžeme navíc v porovnání se vzorky sítěné směsi tetramerů pozorovat vyšší struktury v oblastech nad 260 kDa odpovídající přítomnosti ULF podjednotek.



Obrázek 12. Polyakrylamidový NuPage 4-12% Bis-Tris gel s produkty síťovací reakce činidly DSS, DSG, DSBU a EDC. V drahách S – Proteinový Standard Novex Sharp Pre-Stained, **dráha 1** – kontrolní vzorek (směs vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N bez přidavku síťovacího činidla), **dráha 2** – směs vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N síťených činidlem EDC, **dráha 3** – směs vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N síťených činidlem DSS, **dráha 4** – směs vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N síťených činidlem DSG, **dráha 5** – směs vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N síťených činidlem DSBU, **dráha 6** – kontrolní vzorek ($^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotky vimentinu bez přidavku síťovacího činidla), **dráha 7** – $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotky vimentinu síťené činidlem EDC, **dráha 8** – $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotky vimentinu síťené činidlem DSS, **dráha 9** – $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotky vimentinu síťené činidlem DSG, **dráha 10** – $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotky vimentinu síťené činidlem DSBU.

Na základě výsledků SDS-PAGE lze tvrdit, že síťovací reakce s činidly DSS a DSG proběhla úspěšně, zatímco síťovací reakce činidlem s DSBU pravděpodobně proběhla neúspěšně, a to u vzorků tetramerní směsi i $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek vimentinu. Průběh síťovací reakce činidlem s EDC z těchto výsledků nebylo možné ověřit.

4.1.3. Identifikované produkty sítění směsi vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N z LC-MS analýzy

Cílem této části práce bylo ověřit předpoklad, že ve směsi vimentinových tetramerů, která sloužila jako výchozí materiál pro přípravu $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek nedochází k výměně dimerních podjednotek.

Tato směs byla připravena smícháním vimentinu ^{14}N a vimentinu ^{15}N v podmínkách pro stabilní vimentinové tetramery. Pokud v těchto podmínkách nedochází k výměně dimerních podjednotek mezi tetramery, po chemickém sítění a proteolytickém štěpení této směsi by vznikaly pouze spojené peptidy $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ a jejich příslušná těžká forma $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$, které v hmotnostních spektrech poskytují *dubletové* izotopové obálky. V případě výměny dimerních podjednotek mezi tetramery by tato směs obsahovala také tetramery tvořené kombinací dimerů ^{14}N a dimerů ^{15}N , které by po chemickém sítění a proteolytickém štěpení poskytovaly spojené peptidy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

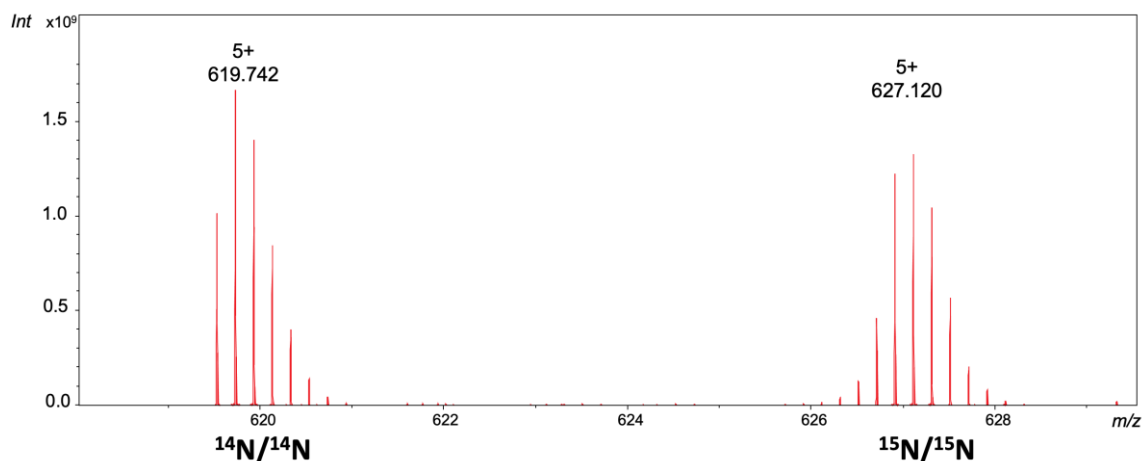
Chemickým sítěním směsi vimentinových tetramerů (^{14}N a ^{15}N) s použitím činidel DSS, DSG, EDC a DSBU bylo z LC-MS analýzy pomocí programu LinX 1.13 a následného manuálního ověření v programu Data Analysis 5.0 identifikováno 542 unikátních produktů síťovací reakce (peptidových spojení).

22 z těchto 542 produktů síťovací reakce (4,06 %) obsahovalo v hmotnostních spektrech *kvadrupletovou* izotopovou obálku, která reprezentuje přítomnost čtyř peptidových forem $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ pocházejících z tetramerů tvořených analogickou kombinací dimerů. Poměr intenzit izotopových obálek jednotlivých peptidových forem potom udává jejich relativní množství v sítěné směsi, a tím i relativní zastoupení INTER-dimerního sítění a INTRA-dimerního sítění vimentinových tetramerů. Zastoupení INTER-dimerního sítění podává informace o relativním množství tetramerů, které vznikly výměnou dimerních podjednotek, jelikož intenzity peptidových forem $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ jsou dány POUZE zastoupením INTER-dimerního sítění. U těchto 22 produktů síťovací reakce byla proto provedena kvantifikace zastoupení INTER-dimerního a INTRA-dimerního sítění podle vzorce (1) uvedeného na straně 38, jejíž výsledky jsou uvedeny v následující kapitole 4.1.3.1.

Všechny ostatní produkty síťovací reakce obsahovaly v hmotnostních spektrech *dubletovou* izotopovou obálku, která představuje přítomnost dvou forem peptidových spojení $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ pocházejících z tetrameru ^{14}N a tetrameru ^{15}N . Příkladem takového produktu jsou peptidy ETNLDSLPLVDTHSKR – TLLIKTVETR spojené

čínidlem DSG, jejichž hmotnostní spektrum je uvedeno na Obrázku 13. Do této kategorie spadají produkty sítěni vzniklého mezi dvěma identickými dimery, dvěma identickými monomery, či v rámci jednoho monomeru, jelikož tímto způsobem není možné uvedené typy sítěni rozlišit. Pro náš účel však toto rozlišení není podstatné.

Dále bylo identifikováno 83 intrapeptidových produktů síťovací reakce, tedy spojení vznikající v rámci jednoho peptidu.



Obrázek 13. Hmotnostní spektrum peptidů ETNLDSLPLVDTHSKR – TLLIKTVETR spojených čínidlem DSG obsahující *dubletovou* izotopovou obálku, která reprezentuje přítomnost peptidové formy ¹⁴N/¹⁴N (pocházející z tetrameru ¹⁴N) a peptidové formy ¹⁵N/¹⁵N (pocházející z tetrameru ¹⁵N).

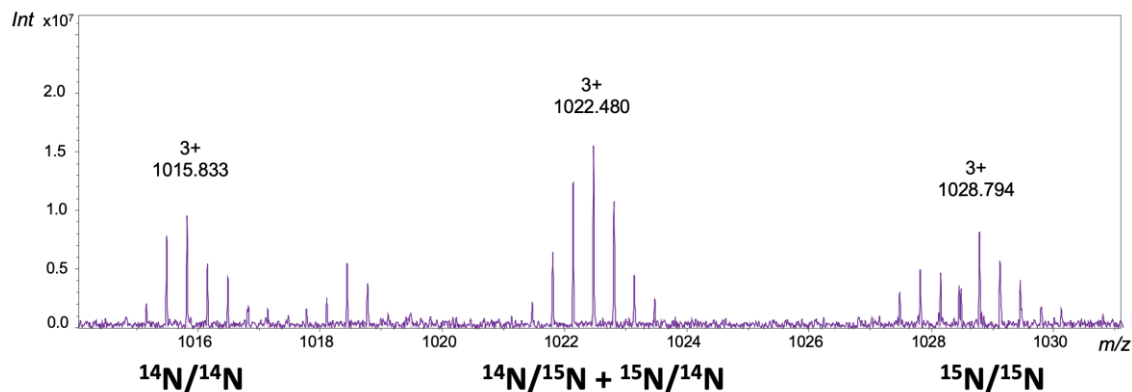
Ze všech 542 identifikovaných produktů bylo analýzou vzorků sítěných čínidlem DSBU nalezeno pouze 9 peptidových spojení, přičemž všechny obsahovaly jen lehké peptidové formy ¹⁴N/¹⁴N a těžké peptidové formy ¹⁵N/¹⁵N (*dubletové* izotopové obálky).

4.1.3.1 Kvantifikace zastoupení INTER-dimerního a INTRA-dimerního sítěni

Kvantifikace zastoupení INTER-dimerního a INTRA-dimerního sítěni byla provedena podle vzorce (1) uvedeného na straně 38. Konečný výsledek kvantifikace každého produktu síťovací reakce je průměrem hodnot vypočítaných pro celý triplikát.

Ze všech identifikovaných produktů síťovací reakce, pouze u jednoho produktu přesahovalo zastoupení INTER-dimerního sítěni hodnotu 90. Konkrétně se jedná o spojené peptidy QAKQESTYRR – QAKQESTYRR s výsledkem kvantifikace 92:8 ve prospěch INTER-dimerního sítěni. Jejich hmotnostní spektrum je uvedeno na Obrázku 14 (str. 46). Produkt s druhým nejvyšším zastoupením INTER-dimerního sítěni dosahoval poměru 62:38. U dalších produktů bylo zastoupení INTER-dimerního sítěni výrazně nižší, přičemž u většiny (16 z 22 produktů), u kterých byla provedena kvantifikace, byla hodnota stanovená pro INTER-dimerní sítěni nižší než 10. Přehled

výsledků kvantifikace je uveden v Tabulce 1. Seznam všech produktů chemického sítění vimentinových tetramerů s výsledky kvantifikace INTER-dimerního a INTRA-dimerního sítění je uveden v tabulce v Příloze 2.

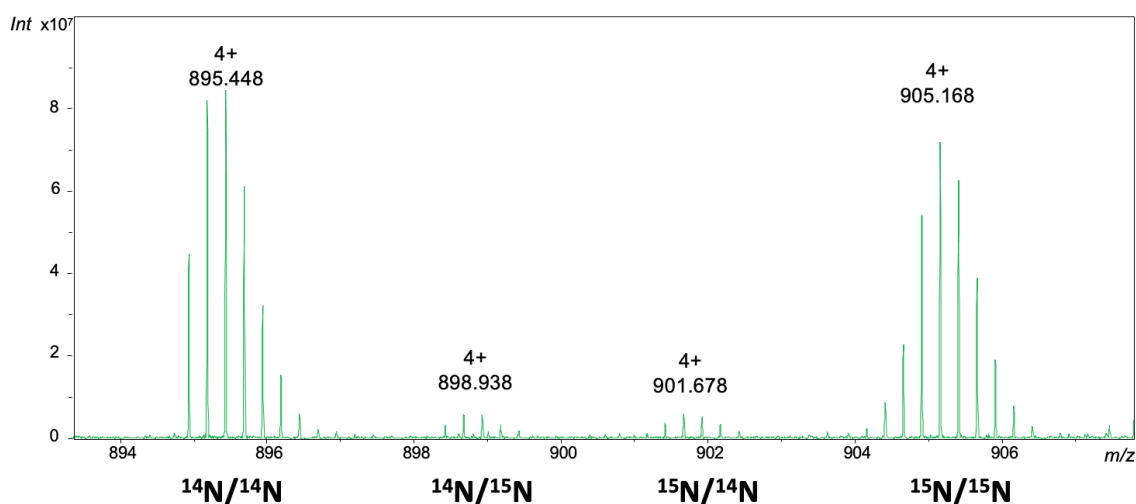


Obrázek 14. Hmotnostní spektrum peptidů QAKQESTYR – QAKQESTYR spojených činidlem DSG, pro které byl kvantifikací stanoven poměr 92:8 ve prospěch zastoupení INTER-dimerního sítění. Hmotnostní spektrum obsahuje *tripletovou* izotopovou obálku – ve speciálním případě, kdy spojené peptidy obsahují ve své aminokyselinové sekvenci stejný počet dusíků, potom mají jejich peptidové formy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ stejnou hmotnost a jejich izotopové obálky se překrývají, čímž vzniká v hmotnostním spektru charakteristický vzor *tripletové* izotopové obálky.

Tabulka 1. Přehled výsledků kvantifikace INTER-dimerního a INTRA-dimerního sítění vimentinových tetramerů.

| Produkty sítění | INTER-dimerní sítění (%) | INTRA-dimerní sítění (%) |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 92 | 8 |
| 2 | 62 | 38 |
| 3 | 28 | 72 |
| 4 | 18 | 82 |
| 5 | 18 | 82 |
| 6 | 12 | 88 |
| 7 až 22 | <10 | >90 |

Příkladem reprezentujícím výsledky kvantifikace většiny produktů sítění vimentinových tetramerů jsou peptidy FANYIDKVR – QQYESVAAK^RNLQEAEWYK spojené činidlem DSS, u nichž byl kvantifikací stanoven poměr 7:93 ve prospěch INTRA-dimerního sítění. Jejich hmotnostní spektrum je uvedeno na Obrázku 15 (str. 47).



Obrázek 15. Hmotnostní spektrum peptidů FANYIDKVR – QQYESVAAKNLQEAEEWYK spojených činidlem DSS. Hmotnostní spektrum obsahuje kvadrupletovou izotopovou obálku o různých intenzitách, která reprezentuje přítomnost čtyř peptidových forem ¹⁴N/¹⁴N, ¹⁴N/¹⁵N, ¹⁵N/¹⁴N a ¹⁵N/¹⁵N. Poměr intenzit izotopových obálek jednotlivých peptidových forem udává jejich relativní zastoupení v sítěné směsi, a tím i zastoupení INTER-dimerního a INTRA-dimerního sítění. Pomocí vzorce (1) na str 38 byla provedena kvantifikace INTER- a INTRA-dimerního sítění, kterou bylo pro tento produkt stanoveno poměr 7:93 ve prospěch INTRA-dimerního sítění.

4.1.4 Identifikované produkty sítění ¹⁴N/¹⁵N ULF podjednotek vimentinu z LC-MS analýzy

V této části práce bylo cílem získat informace o vzdálenostních omezeních mezi tetramery v ULF podjednotkách, které mohou být využity pro výpočetní modelování struktury ULF podjednotek vimentinu. Tyto informace poskytují produkty sítění vznikajícího mezi dvěma různými tetramery. Takové produkty síťovací reakce obsahují v hmotnostním spektru kvadrupletové izotopové obálky, představující peptidové formy ¹⁴N/¹⁴N, ¹⁴N/¹⁵N, ¹⁵N/¹⁴N a ¹⁵N/¹⁵N, o přibližně stejné intenzitě.

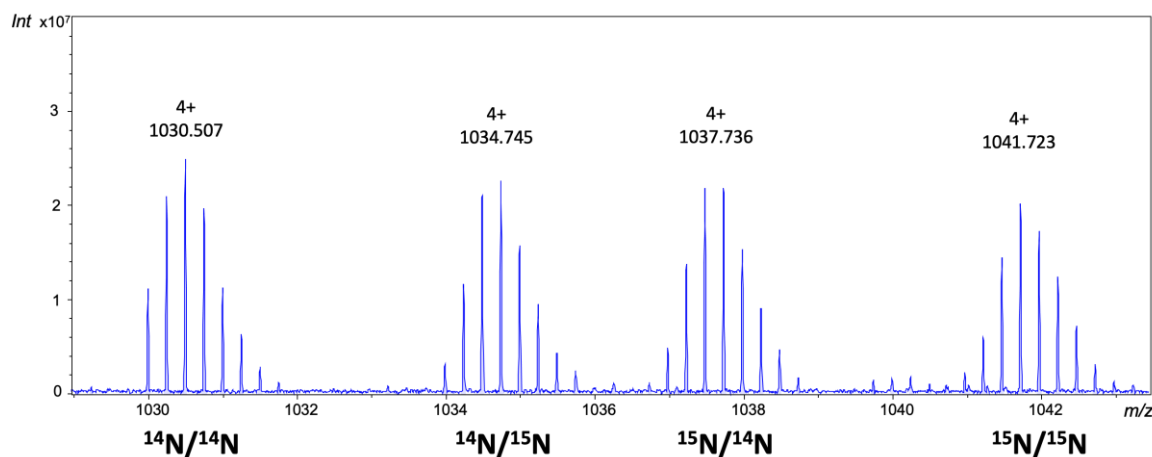
Chemickým sítěním ¹⁴N/¹⁵N ULF podjednotek vimentinu s použitím činidel DSS, DSG a EDC bylo z LC-MS analýzy pomocí programu LinX 1.13 a následného manuálního ověření v programu Data Analysis 5.0 identifikováno 83 unikátních produktů síťovací reakce (peptidových spojení) obsahujících v hmotnostních spektrech kvadrupletovou izotopovou obálku. U těchto produktů síťovací reakce bylo dále nezbytné provést kvantifikaci zastoupení INTER-tetramerního a INTRA-tetramerního sítění, která závisí na intenzitě izotopových obálek jednotlivých peptidových forem.

Analýzou vzorků sítěných činidlem DSBU nebyla nalezena žádná peptidová spojení obsahující kvadrupletovou izotopovou obálku.

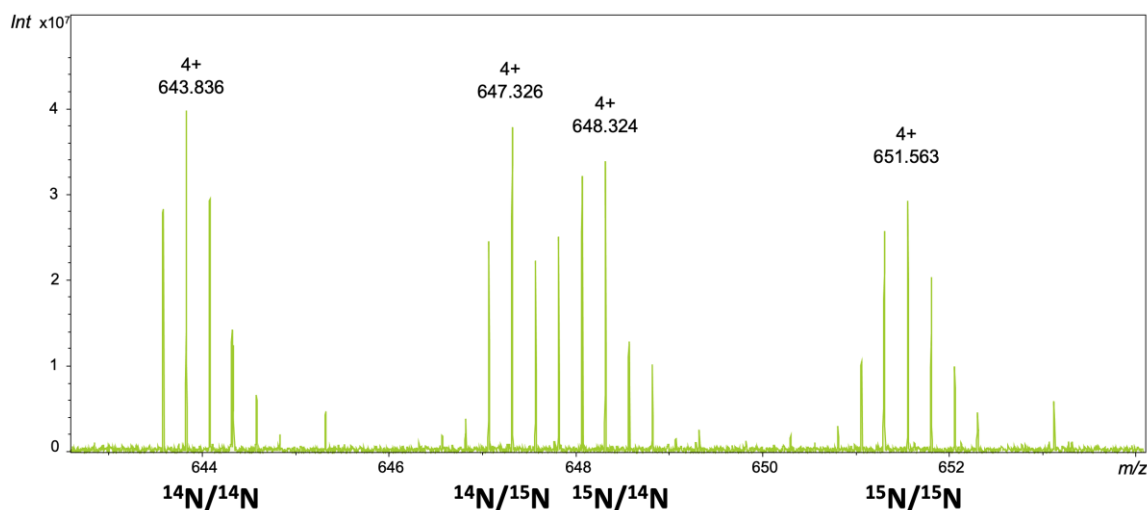
4.1.4.1 Kvantifikace zastoupení INTER-tetramerního a INTRA-tetramerního sítění

Kvantifikace byla opět provedena podle vzorce (1) na straně 38 a konečný výsledek je průměrem hodnot vypočítaných pro celý triplikát daného produktu síťovací reakce. Seznam všech 83 identifikovaných produktů síťovací reakce s výsledky kvantifikace je uveden v tabulce v Příloze 3 a v Příloze 5. Jako spojené peptidy pocházející z tetramerního rozhraní byly označeny takové produkty, u nichž byla kvantifikací stanovena hodnota zastoupení INTER-tetramerního sítění 90 a vyšší.

Na základě výsledků kvantifikace bylo získáno 27 unikátních produktů síťovací reakce (spojených peptidů) pocházejících z rozhraní tetramer-tetramer, poskytujících nové informace o vzdálenostních omezeních tetramerů v ULF podjednotkách. Příkladem takového produktu jsou peptidy LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR – NLQEAEWYKSK spojené činidlem DSG, jejichž hmotnostní spektrum je uvedeno na Obrázku 16 nebo peptidy FANYIDKVR – SKFADLSEAANR spojené činidlem DSS, jejichž hmotnostní spektrum je na Obrázku 17 (str. 49).

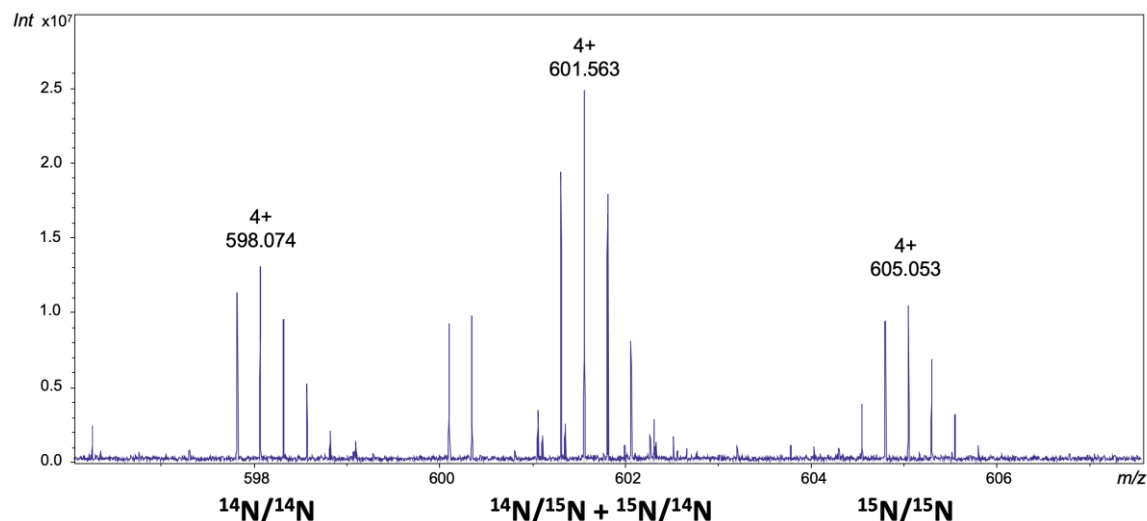


Obrázek 16. Hmotnostní spektrum produktu INTER-tetramerního sítění, peptidů LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR – NLQEAEWYKSK spojených činidlem DSG. Hmotnostní spektrum INTER-tetramerního sítění obsahuje kvadrupletovou izotopovou obálku o stejném poměru intenzit pro jednotlivé peptidové formy ¹⁴N/¹⁴N, ¹⁴N/¹⁵N, ¹⁵N/¹⁴N a ¹⁵N/¹⁵N. Kvantifikací byl stanoven poměr 98:2 pro INTER:INTRA-tetramerní sítění.



Obrázek 17. Hmotnostní spektrum produktu INTER-tetramerního sítění, peptidů FANYIDKVR – SKFADLSEAANR spojených činidlem DSS, pro které byl kvantifikací stanoven poměr 96:4 ve prospěch INTER-tetramerního sítění.

Ve speciálním případě, kdy spojené peptidy obsahují ve své aminokyselinové sekvenci stejný počet dusíků, mají peptidové formy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ stejnou hmotnost a jejich izotopové obálky se překrývají. Tím vzniká v jejich hmotnostním spektru charakteristický vzor *tripletové* izotopové obálky. U INTER-tetramerních produktů sítění potom dosahuje intenzita izotopové obálky forem $^{14}\text{N}/^{15}\text{N} + ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dvojnásobné hodnoty oproti formám $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$. Příkladem jsou peptidy FANYIDKVR – FANYIDKVR spojené činidlem DSS s výsledkem kvantifikace 99:1 pro INTER-tetramerní, jejichž hmotnostní spektrum je na Obrázku 18.



Obrázek 18. Hmotnostní spektrum produktu INTER-tetramerního sítění, peptidů FANYIDKVR – FANYIDKVR spojených činidlem DSS, pro které byl kvantifikací stanoven poměr 99:1 ve prospěch INTER-tetramerního sítění. V případě, že spojené peptidy pocházející z tetramerního rozhraní, obsahují tedy ve své aminokyselinové sekvenci stejný počet dusíků. Potom mají jejich peptidové formy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ stejnou hmotnost a jejich izotopové obálky se překrývají, čímž vzniká v hmotnostním spektru charakteristický vzor *tripletové* izotopové obálky, kde peptidové formy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dosahují dvojnásobné intenzity oproti formám $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$.

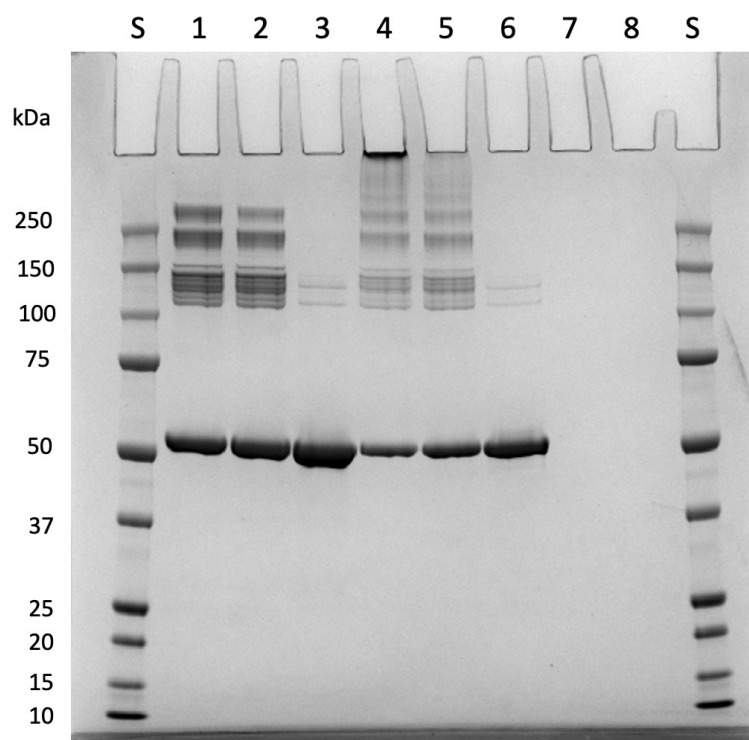
4.2 Analýza tetramerních a ULF podjednotek vimentinu ^{14}N pomocí CXMS

4.2.1 Příprava tetramerního vimentinu ^{14}N

Pro přípravu vimentinových tetramerů byla provedena postupná dialýza za snižování iontové síly z 8 mol/l močovinného pufru (monomerní pufr) obsahujícího monomery do pufru s nízkou koncentrací iontů (dialyzační pufr B). Koncentrace vimentinových tetramerů ^{14}N po ukončení dialýzy byla stanovena spektrofotometricky (A_{280}) a činila 1 mg/ml.

4.2.2 Kontrola síťovací reakce pomocí SDS-PAGE

Reakce chemického sítění vimentinových vzorků byly ověřeny pomocí SDS-PAGE a výsledek separace produktů chemického sítění je uveden na Obrázku 19. Do každé dráhy byl nanesen jeden vzorek z triplikátu. U vzorků vimentinových tetramerů bylo na gel nanášeno 5 μg proteinu, v případě vzorků ULF podjednotek 3 μg proteinu.



Obrázek 19. Polyakrylamidový NuPage 4-12% Bis-Tris gel s produkty síťovací reakce činidly DSBU a DSPU. V drahách S – Proteinový Standard Precision Plus Protein All Blue Pre-stained, **dráha 1** – vimentinové tetramery sítěné činidlem DSBU, **dráha 2** – vimentinové tetramery sítěné činidlem DSPU, **dráha 3** – kontrolní vzorek (tetramery vimentinu bez přídavku síťovacího činidla), **dráha 4** – ULF podjednotky vimentinu sítěné činidlem DSBU, **dráha 5** – ULF podjednotky vimentinu sítěné činidlem DSPU, **dráha 6** – kontrolní vzorek (ULF podjednotky vimentinu bez přídavku síťovacího činidla).

V drahách 1-3 se nachází vzorky vimentinových tetramerů, přičemž v dráze 1 je vzorek vimentinových tetramerů sítěný činidlem DSBU, v dráze 2 vimentinové tetramery sítěné činidlem DSPU a v dráze 3 příslušný kontrolní vzorek bez přídavku síťovacího činidla. V drahách 4-6 se pak nachází vzorky ULF podjednotek vimentinu, přičemž v dráze 4 je vzorek ULF podjednotek po sítění činidlem DSBU, v dráze 5 je vzorek ULF podjednotek po sítění činidlem DSPU a v dráze 6 příslušný kontrolní vzorek.

U vzorků sítěných vimentinových tetramerů s činidlem DSBU (dráha 1) i DSPU (dráha 2) můžeme kromě monomerů vimentinu (~ 53 kDa) pozorovat také přítomnost dimerů v oblasti mezi 100-150 kDa, trimerů v oblasti mezi 150-250 kDa a tetramerů, kterým odpovídají pruhy v oblasti těsně nad 250 kDa. V těchto vzorkách nebyla pozorována přítomnost žádných vyšších struktur než tetramerů.

Oproti tomu, v případě vzorků $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek vimentinu sítěných činidlem DSBU (dráha 4) i činidlem DSPU (dráha 5) můžeme navíc v oblastech nad 250 kDa pozorovat přítomnost struktur vyšších než tetramery odpovídající přítomnosti ULF podjednotek.

Z výsledků SDS-PAGE lze tvrdit, že síťovací reakce s činidly DSBU a DSPU byla úspěšná u vzorků tetramerů i ULF podjednotek.

4.2.3 Identifikované produkty chemického sítění ULF podjednotek pomocí LC-MS/MS analýzy

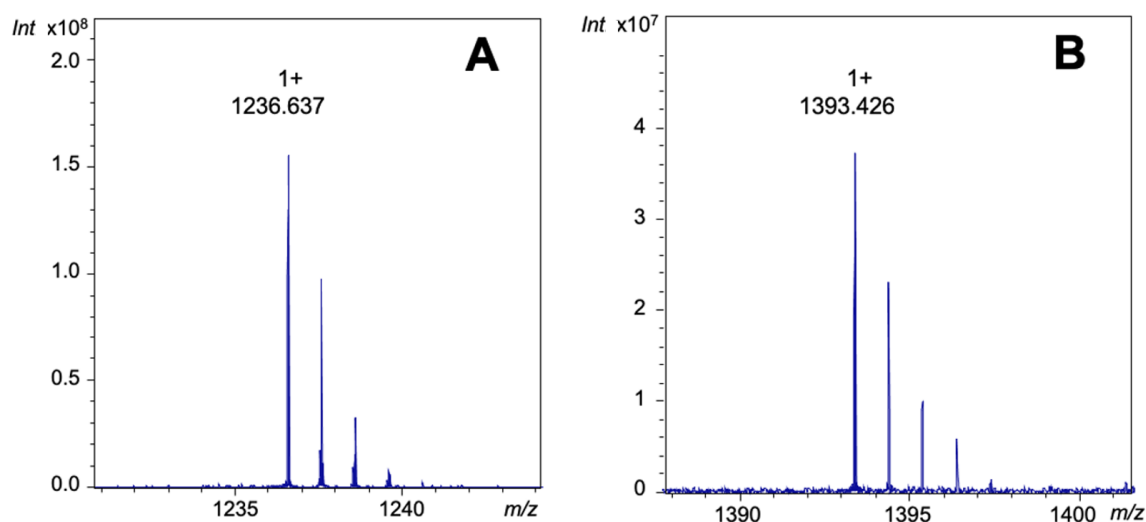
Chemickým sítěním ULF podjednotek vimentinu ^{14}N s použitím štěpitelných činidel DSBU a DSPU bylo z výsledků LC-MS/MS (FT-ICR) analýzy pomocí programu MeroX 1.6.6. identifikováno 37 produktů síťovací reakce, odpovídajících produktům identifikovaných při LC-MS analýze s použitím činidel DSS a DSG. Z výsledků LC-MS/MS analýzy a LC-MS analýzy bylo tedy odlišnými činidly sítění se stejnou reakční specifikou nalezeno 37 shodných peptidových spojení (53,6 %). Tím byla ověřena přítomnost peptidových spojení v ULF podjednotkách, u nichž byla dříve provedena kvantifikace zastoupení INTER-tetramerního a INTRA-tetramerního sítění.

LC-MS/MS analýzou byly například identifikovány spojené peptidy pocházející z tetramerního rozhraní FANYIDKVR – SKFADLSEAANR, jejichž MS spektrum umožňující kvantifikaci je uvedeno na Obrázku 17 (str. 49). MS/MS spektrum fragmentů těchto peptidů spojených činidlem DSBU je na Obrázku 20 (str. 53).

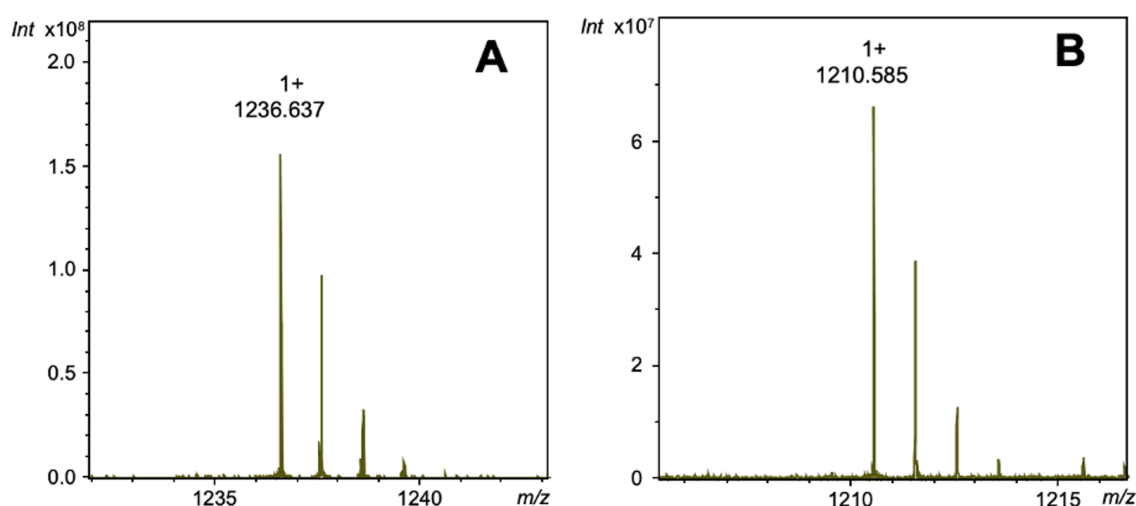
Dalším příkladem jsou spojené peptidy FANYIDKVR – FANYIDKVR s výsledkem kvantifikace 99:1 pro INTER-tetramerní sítění, jejichž MS spektrum je uvedeno

na Obrázku 18 (str. 49). MS/MS spektrum fragmentů těchto peptidů spojených činidlem DSBU je uvedeno na Obrázku 21.

Seznam všech shodných peptidových spojení i identifikovaných LC-MS/MS analýzou, které byly dříve identifikovány a kvantifikovány z MS spekter získaných využitím techniky MIX CXMS je uveden v tabulce v Příloze 4.



Obrázek 20. Část MS/MS spektra zobrazující fragmenty BuUrS (A) a BuS (B) – fragmenty peptidů FANYIDKVR – SKFADLSEAANR spojených činidlem DSBU. MS spektrum shodných peptidů spojených činidlem DSS, ze kterého byl kvantifikací stanoven poměr 96:4 pro INTER:INTRA-tetramerní síťení je uvedeno na Obrázku 17 (str. 49). BuUrS a BuS = modifikované lineární peptidy vznikající fragmentací raménka síťovacího činidla DSBU v kolizní cele hmotnostního spektrometru



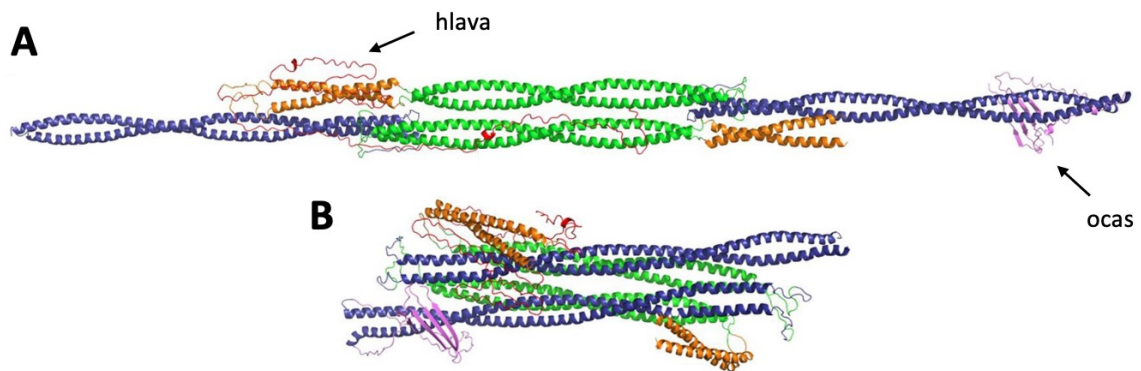
Obrázek 21. Část MS/MS spektra zobrazující fragmenty BuS (A) a BuUrS (B) – fragmenty peptidů FANYIDKVR – FANYIDKVR spojených činidlem DSBU. MS spektrum shodných peptidů spojených činidlem DSS je uvedeno na Obrázku 18 (str. 49). MS spektrum shodných peptidů spojených činidlem DSS, ze kterého byl kvantifikací stanoven poměr 99:1 pro INTER:INTRA-tetramerní síťení je uvedeno na Obrázku 16. BuUrS a BuS = modifikované lineární peptidy vznikající fragmentací raménka síťovacího činidla DSBU v kolizní cele hmotnostního spektrometru

5 DISKUZE

Vimentin je protein intermediálních filament, který se za fyziologických podmínek samovolně skládá do vláken tvořených homo-oligomerními podjednotkami. Strukturní analýza homo-oligomerů či homopolymerů dlouho představovala komplikaci především z hlediska dostupných strukturně analytických technik a příslušných softwarů pro vyhodnocení. Kromě toho, komplikovaný způsob procesu skládání vimentinu *in vitro* představuje další důvod, proč vždy byla strukturní charakterizace vimentinu obtížná. *In vitro* vyžaduje vimentin v průběhu celého procesu skládání do vláken různé iontové podmínky, což omezuje možnost použití některých metod strukturní analýzy. Právě technika chemického sítění v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (CXMS) umožňuje zkoumat konformace proteinů za nativních podmínek.

Již před třiceti lety představil Steinert *et al.* na základě experimentů chemického sítění vimentinu několik modelů asociace dimerních podjednotek (dimer-dimer) [52]. Tyto modely, které byly označeny jako model A₁₁, A₁₂, A₂₂ (tři způsoby laterální asociace) a A_{CN} (způsob podélné asociace), představují způsoby asociace dimerních podjednotek, ke kterým může docházet v procesu skládání vimentinových filament. Dalšího pokroku ve strukturní charakterizaci vimentinu, který byl umožněn díky vývoji strukturně analytických technik a nových softwarů pro vyhodnocení, bylo dosaženo teprve nedávno. Konkrétně použití techniky MIX CXMS, která umožňuje identifikaci a rozlišení intermolekulárních a intramolekulárních interakcí, a příslušného softwaru LinX pro vyhodnocení MIX CXMS dat, představuje velký potenciál pro strukturní analýzu homo-oligomerů.

Již dříve jsme se s využitím techniky MIX CXMS věnovali strukturní charakterizaci vimentinového tetrameru. Na základě informací o INTER-dimerních a INTRA-dimerních vzdálenostních omezeních získaných touto technikou byl poté v Laboratoři biokrytalografie, KU Leuven vytvořen strukturní model vimentinového tetrameru (Obrázek 22, str. 54) zveřejněný v publikaci Vermiere *et al.* [14], který odhalil, že dimerní podjednotky asociují podle modelu A₁₁, ve kterém jsou centrální domény dimerních podjednotek jsou zarovnané α -helikálními segmenty 1B, a zároveň byly odhaleny oblasti stabilizující tetramerní strukturu.



Obrázek 22. Strukturní model vimentinového tetrameru. (A) Vimentinový tetramer je tvořen antiparalelně uspořádanými dimery, jejichž α -helikální segmenty 1B se překrývají. Oranžovou barvou jsou vyznačeny α -helikální segmenty 1A, zelenou α -helikální segmenty 1B, modrou α -helikální segmenty 2. Terminální domény (hlava a ocas) jsou zde zobrazeny pouze pro jeden dimer (B) Kompaktní model vimentinového tetrameru. Převzato z [14] a upraveno.

V této práci jsme se proto dále zaměřili na následnou fázi v procesu sestavení zralých vimentinových filament, tedy na strukturní analýzu ULF podjednotek vimentinu, které vznikají asociací zpravidla osmi tetramerů. K získání informací o uspořádání tetramerů v ULF podjednotce jsme opět zvolili techniku MIX CXMS.

Abychom získali informace o uspořádání tetramerů v ULF podjednotce, je nutné abychom byli schopni identifikovat právě ta spojení, která vznikla mezi dvěma tetramery a odlišit je od ostatních spojení, která mohou vznikat také mezi dvěma dimery, dvěma monomery nebo v rámci jednoho monomeru. V případě, že jsou ULF podjednotky sestaveny z kombinací tetramerů ^{14}N a tetramerů ^{15}N , potom spojení které vzniknou mezi dvěma tetramery poskytují po proteolytickém štěpení a LC-MS analýze charakteristická hmotnostní spektra s kvadrupletovými izotopovými obálkami o stejné intenzitě pro všechny peptidové formy pocházející z možných kombinací asociací dvou tetramerů $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$.

Tomu však předchází důležitý předpoklad, že ve směsi vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N (v podmínkách pro stabilní vimentinové tetramery), která je výchozím materiálem pro přípravu $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek nedochází k disociaci tetramerů a výměně dimerních podjednotek mezi tetramery.

Za tohoto předpokladu očekáváme po chemickém sítění směsi vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N , následném proteolytickém štěpení a LC-MS analýze takové produkty síťovací reakce, které v hmotnostním spektru obsahují pouze $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ formu a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ formu spojených peptidů (dubletová izotopová obálka).

Pokud by však tento předpoklad nebyl splněn a ve směsi tetramerů by před sestavením ULF docházelo k výměně dimerních podjednotek mezi tetramery, potom by výše popsaná hmotnostní spektra charakterizující produkty INTER-tetramerního sítění (hmotnostní spektra s *kvadrupletovými* izotopovými obálkami o stejné intenzitě pro všechny peptidové formy $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$) mohla odpovídat také produktům INTER-dimerního sítění, vznikajícího mezi dvěma dimery. V takovém případě by nebylo možné s jistotou určit INTER-tetramerní produkty sítění.

Tento předpoklad bylo nutné experimentálně ověřit, aby nedocházelo k záměně INTER-dimerních spojení za INTER-tetramerní spojení, tedy abychom identifikovaná charakteristická hmotnostní spektra mohli s jistotou přiřadit INTER-tetramerním produktům sítění, které poskytují nové stěžejní informace o vzdálenostních omezeních tetramerů pro výpočetní modelování ULF podjednotky vimentinu. Ověření tohoto předpokladu zajišťuje spolehlivost výsledků analýzy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek.

K ověření tohoto předpokladu sloužila první část experimentu, ve které bylo provedeno chemické sítění směsi vimentinových tetramerů ^{14}N a ^{15}N , která sloužila jako výchozí materiál pro přípravu ULF podjednotek.

Z výsledků chemického sítění směsi tetramerů ^{14}N a ^{15}N vyplývá, že méně než 5 % ze všech identifikovaných unikátních produktů síťovací reakce obsahuje v hmotnostních spektrech *kvadrupletovou* izotopovou obálku, což představuje téměř zanedbatelné množství, které by výrazně neovlivnilo výsledky analýzy ULF podjednotek. Důležitější informace však poskytují výsledky kvantifikace zastoupení INTER-dimerního a INTRA-dimerního sítění (Tabulka 1, str. 46 a Příloha 2), ze kterých vyplývá, že pouze u jediného identifikovaného produktu výrazně převažuje zastoupení INTER-dimerního sítění s poměrem 92:8 (Obrázek 14, str. 46), a mohl by tedy být potenciálně zaměnitelný s INTER-tetramerním produktem sítění ULF podjednotek. U ostatních produktů je zastoupení INTER-dimerního sítění v podstatě zanedbatelné, tudíž by neovlivnilo výsledky analýzy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek, kde nás zajímají především produkty síťovací reakce, u kterých zastoupení INTER-tetramerního sítění převyšuje hodnotu 90.

Tyto výsledky by naznačovaly, že u velmi malého procenta tetramerů dochází k výměně dimerních podjednotek. Zde je však důležité zohlednit výsledky kontroly síťovací reakce pomocí SDS-PAGE, kde byla zaznamenána přítomnost malého množství struktur vyšších než tetramery ve vzorcích sítěné směsi tetramerů ^{14}N a ^{15}N (Obrázek 12, str. 43). Přítomnost peptidových forem $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ a $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ v hmotnostních spektrech několika

produktů síťovací reakce a jejich velmi nízká intenzita koreluje s výsledky pozorovanými při kontrole síťovací reakce. Příčinou přítomnosti produktů síťení obsahujících *kvadrupletovou* izotopovou obálku je tedy s největší pravděpodobností právě přítomnost vyšších struktur ve směsi síťených tetramerů ^{14}N a ^{15}N . Teoreticky bychom mohli provést štěpení v gelu, abychom potvrdili, že tyto produkty síťení pochází z pozorovaných vyšších struktur. To však pro účely našeho experimentu nebylo nutné, jelikož z uvedených dat vyplývá, že tyto výsledky neovlivňují výsledky analýzy ULF podjednotek. Problematický by mohl být pouze jeden identifikovaný produkt síťení se zastoupením INTER-dimerního síťení převyšujícím hodnotu 90 (ID 1 v Příloze 2), který by mohl být zaměnitelný s INTER-tetramerními produkty síťení ULF podjednotek. V případě, že by byl tento produkt identifikován jako INTER-tetramerní produkt síťení ULF podjednotek, byl by z výsledků vyloučen pro zachování spolehlivosti dat pro modelování struktury ULF. Tento produkt síťení byl sice identifikován ve výsledcích LC-MS analýzy síťených ULF (ID 31 v Příloze 3), avšak nebyl kvantifikací stanoven jako INTER-tetramerní produkt síťení, a tedy nebude použit pro tvorbu modelu ULF.

Na základě všech výše uvedených výsledků lze vyvodit závěr, že v rámci tetramerů nedochází k výměně dimerních podjednotek, která by ovlivňovala výsledky analýzy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek. Velmi malé procento tetramerů ve směsi pravděpodobně začalo tvořit ULF ještě před přidáním soli, která vyvolává asociaci tetramerů za tvorby ULF podjednotek.

Tím byla ověřena spolehlivost a důvěryhodnost výsledků analýzy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek, u nichž bylo identifikováno 83 produktů síťovací reakce s *kvadrupletovou* izotopovou obálkou s následnou kvantifikací zastoupení INTER- a INTRA-tetramerního síťení. Kvantifikací bylo nalezeno 27 unikátních peptidových spojení pocházejících z rozhraní tetramer-tetramer (Příloha 3), poskytujících nové důležité informace o vzdálenostních omezeních tetramerů v ULF podjednotkách. Tato data byla poskytnuta Laboratoři biokrytalografie, KU Leuven, kde budou dále využita pro *in silico* simulaci struktury ULF podjednotky.

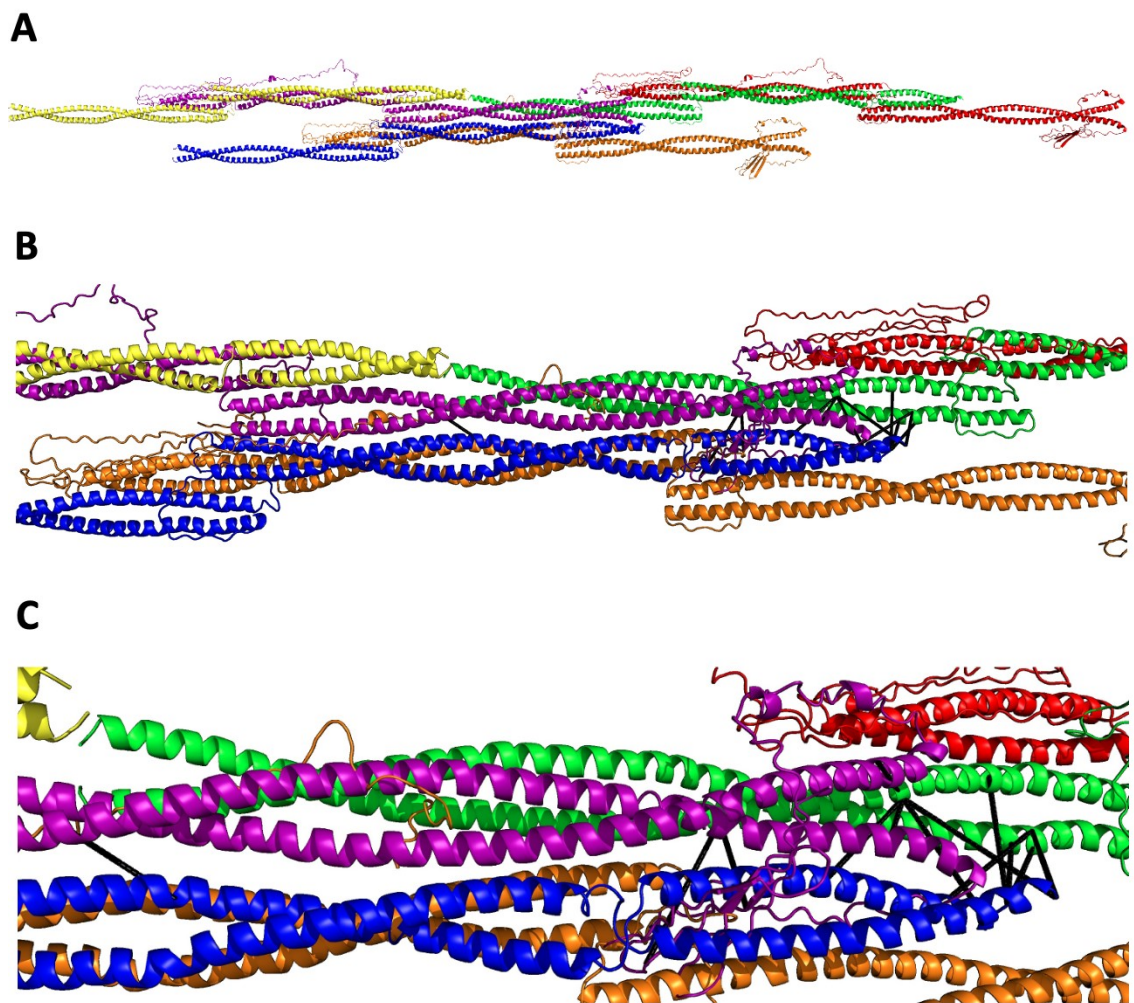
Výsledky LC-MS analýzy síťených $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek poskytly zásadní informace o původu peptidových spojení v rámci ULF podjednotky. Pomocí činidel DSS a DSG bylo identifikováno 69 peptidových spojení. Při porovnání s výsledky LC-MS/MS analýzy neznačených (^{14}N) ULF podjednotek síťených štěpitelnými činidly DSBU a DSPU, vykazujících stejnou reakční specifitu jako činidla DSS a DSG, byla nalezena

identická peptidová spojení (Příloha 3, Příloha 4). LC-MS/MS analýzou byla ověřena přítomnost 37 peptidových spojení (53,6 %) identifikovaných při LC-MS analýze pomocí s použitím DSS a DSG. To však nesnižuje důvěryhodnost ostatních identifikovaných produktů, které LC-MS/MS analýzou nebyly nalezeny, jelikož se jedná o dva samostatně provedené experimenty, za použití odlišných činidel, kde k variacím výsledků může přispívat mnoho faktorů.

Přestože bychom při použití různých síťovacích činidel se stejnou reakční specifitou mohli očekávat velmi podobné výsledky, rozdíly mohou být způsobeny několika faktory jako je například reaktivita či stabilita činidla, rozdíly v reakční selektivitě činidla, velikost, struktura, objem a flexibilita síťovacích činidel, která může vést k rozdílům v jejich schopnosti přístupu k cílovým funkčním skupinám a reakce s nimi. Dále reakční podmínky jako je pH, teplota a reakční doba mohou ovlivnit výsledek síťovací reakce, a i malé rozdíly v těchto podmínkách mohou vést k odchylkám ve výsledcích. Stejně tak proteolytické štěpení není opakovatelné. Nakonec také podmínky samotného měření vzorků a použití odlišných softwarů pro vyhodnocení může přispívat k určitým variacím. Kombinace všech těchto faktorů může mít za následek pozorované rozdíly v uvedených výsledcích LC-MS a LC-MS/MS analýzy.

Síťovací reakce činidlem DSBU u vzorků směsi ^{14}N a ^{15}N tetramerů i $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek proběhla na základě zjištěných výsledků pouze v minimálním rozsahu, přičemž získané výsledky byly konzistentní pro celý triplikát obou vzorků (tetramerů i ULF), což bylo nejpravděpodobněji důsledkem použití degradovaného činidla. Dále, u vzorků směsi ^{14}N a ^{15}N tetramerů i $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek síťovaných činidlem EDC nebylo možné ověřit výsledek síťovací reakce pomocí SDS-PAGE, jelikož vzorky nezaputovaly z jamky do gelu (Obrázek 12, str. 43). EDC je činidlo s tzv. nulovou délkou raménka, jehož mechanismus síťovací reakce může vést ke tvorbě velkých síťových proteinových komplexů či agregátů, které kvůli své velikosti špatně prostupují do pórů polyakrylamidového gelu. To mohlo být příčinou retence vzorků v jamkách.

V Laboratoři biokrytalografie v Lovani, se kterou probíhá spolupráce na tomto projektu, byl na základě předchozích dat nedávno vytvořen model tzv. vimentinové protofibrily tvořené třemi tetramery (uveden na Obrázku 23A). Překrytím úseků těchto třech tetramerů v protofibrile vzniká struktura vimentinového oktameru (jeho detail je zobrazen na Obrázku 23B). Námi získaná data pro INTER-tetramerní peptidová spojení byla porovnána se současným modelem vimentinového oktameru a bylo zjištěno, že 12 z 28 INTER-tetramerních peptidových spojení odpovídá tomuto modelu (Obrázek 23C).



Obrázek 23. (A) Strukturní model vimentinové protofibrily tvořené třemi tetramery. Jednotlivé tetramery jsou tvořeny dimery komplementárních barev žlutá-fialová (tetramer 1), modrá-oranžová (tetramer 2), zelená-červená (tetramer 3). Překrytím úseků těchto třech tetramerů vzniká struktura vimentinového oktameru. (B) Detail vimentinového oktameru tvořeného překrytím úseků třech tetramerů, na který byla aplikována námi získaná data pro INTER-tetramerní peptidová spojení. (C) Detail části modelu, který zobrazuje vimentinový oktamer s námi identifikovanými peptidovými spojeními, která odpovídají aktuálnímu modelu.

Některá peptidová spojení nebylo možné na tento model aplikovat, jelikož aktuální model vimentinové protofibrily neobsahuje hlavové domény (sekvence 1-96) a ocasní domény (sekvence 405-466) pro všechny molekuly, což jsou oblasti, ze kterých některá námi identifikovaná peptidová spojení pochází. Domény hlavy a ocasu obsahují převážně nestrukturované oblasti komplikované pro modelování vimentinových struktur, avšak bylo zjištěno, že především hlavová doména je obzvlášť důležitá v procesu sestavování vimentinových filament [36,37]. Naše data by tedy mohla přinést užitečné strukturní informace pro zapojení hlavové a ocasní domény do strukturního modelu.

Dále, naše data byla získána analýzou ULF podjednotek vimentinu, jež jsou tvořeny průměrně osmi tetramery, a proto identifikovaná peptidová spojení, která neodpovídají tomuto modelu mohou poskytnout nové informace o uspořádání tetramerů ULF. Námi získaná data tedy mohou pomoci k upřesnění aktuálního modelu a k dalšímu pokroku v modelování struktury vimentinových ULF.

6 ZÁVĚR

- Na základě uvedených výsledků lze vyvodit závěr, že v rámci tetramerů nedochází k výměně dimerních podjednotek, která by ovlivňovala výsledky analýzy $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek.
- Chemickým sítěním vimentinových $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek s použitím činidel DSS, DSG a EDC bylo z LC-MS analýzy identifikováno 83 unikátních peptidových spojení poskytujících informace o původu spojených peptidů v rámci ULF.
- Následnou kvantifikací zastoupení INTER-tetramerního a INTRA-tetramerního sítění bylo zjištěno 27 unikátních peptidových spojení pocházejících z rozhraní tetramer-tetramer, poskytujících informace o vzdálenostních omezeních tetramerů v ULF pro výpočetní modelování struktury ULF podjednotky.

Literatura

1. Sinz, A. (2003) Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. *J. Mass Spectrom.* **38**, 1225–37.
2. Sinz, A. (2018) Cross-Linking/Mass Spectrometry for Studying Protein Structures and Protein–Protein Interactions: Where Are We Now and Where Should We Go from Here? *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 6390–96.
3. Sinz, A. (2014) The advancement of chemical cross-linking and mass spectrometry for structural proteomics: from single proteins to protein interaction networks. *Expert Rev. Proteomics* **11**, 733–43.
4. O’Reilly, F.J., Rappsilber, J. (2018) Cross-linking mass spectrometry: methods and applications in structural, molecular and systems biology. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 1000–1008.
5. Piersimoni, L., Kastritis, P.L., Arlt, C., Sinz, A. (2022) Cross-Linking Mass Spectrometry for Investigating Protein Conformations and Protein–Protein Interactions—A Method for All Seasons. *Chem. Rev.* **122**, 7500–7531.
6. Müller, D.R., Schindler, P., Towbin, H., Wirth, U., Voshol, H., Hoving, S., Steinmetz, M.O. (2001) Isotope-Tagged Cross-Linking Reagents. A New Tool in Mass Spectrometric Protein Interaction Analysis. *Anal. Chem.* **73**, 1927–34.
7. Back, J.W., Hartog, A.F., Dekker, H.L., Muijsers, A.O., De Koning, L.J., De Jong, L. (2001) A new crosslinker for mass spectrometric analysis of the quaternary structure of protein complexes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 222–27.
8. Müller, M.Q., Dreiocker, F., Ihling, C.H., Schäfer, M., Sinz, A. (2010) Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis: Reliable Identification of Cross-Linking Products by Tandem MS. *Anal. Chem.* **82**, 6958–68.
9. Taverner, T., Hall, N.E., O’Hair, R.A.J., Simpson, R.J. (2002) Characterization of an Antagonist Interleukin-6 Dimer by Stable Isotope Labeling, Cross-linking, and Mass Spectrometry. *J. Biol. Chem.* **277**, 46487–92.
10. Kukačka, Z., Rosůlek, M., Jelínek, J., Slavata, L., Kavan, D., Novák, P. (2021) LinX: A Software Tool for Uncommon Cross-Linking Chemistry. *J. Proteome Res.* **20**, 2021–27.
11. Pettelkau, J., Thondorf, I., Theisgen, S., Lilie, H., Schröder, T., Arlt, C., Ihling, C.H., Sinz, A. (2013) Structural Analysis of Guanylyl Cyclase-Activating Protein-2 (GCAP-2) Homodimer by Stable Isotope-Labeling, Chemical Cross-Linking, and Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **24**, 1969–79.
12. Hernychová, L., Rosůlek, M., Kádek, A., Mareška, V., Chmelík, J., Adámková, L., Grobárová, V., Šebesta, O., Kukačka, Z., Skála, K., Spiwok, V., Černý, J., Novák, P. (2019) The C-type lectin-like receptor Nkrp1b: Structural proteomics reveals features affecting protein conformation and interactions. *J. Proteomics* **196**, 162–72.
13. Lux, V., Brouns, T., Čermáková, K., Srb, P., Fábry, M., Mádlíková, M., Hořejší, M., Kukačka, Z., Novák, P., Kugler, M., Brynda, J., DeRijck, J., Christ, F., Debyser, Z., Veverka, V. (2020) Molecular Mechanism of LEDGF/p75 Dimerization. *Structure* **28**, 1288-1299.e7.

14. Vermeire, P.-J., Lilina, A.V., Hashim, H.M., Dlabolová, L., Fiala, J., Beelen, S., Kukačka, Z., Harvey, J.N., Novák, P., Strelkov, S.V. (2023) Molecular structure of soluble vimentin tetramers. *Sci. Rep.* **13**, 8841.
15. Makarov, A.A., Zou, J., Houston, D.R., Spanos, C., Solovyova, A.S., Cardenal-Peralta, C., Rappsilber, J., Schirmer, E.C. (2019) Lamin A molecular compression and sliding as mechanisms behind nucleoskeleton elasticity. *Nat. Commun.* **10**, 3056.
16. Hohmann, Dehghani (2019) The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells* **8**, 362.
17. Block, J., Schroeder, V., Pawelzyk, P., Willenbacher, N., Köster, S. (2015) Physical properties of cytoplasmic intermediate filaments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1853**, 3053–64.
18. Kornreich, M., Avinery, R., Malka-Gibor, E., Laser-Azogui, A., Beck, R. (2015) Order and disorder in intermediate filament proteins. *Febs Lett.* **589**, 2464–76.
19. Hol, E.M., Capetanaki, Y. (2017) Type III Intermediate Filaments Desmin, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Vimentin, and Peripherin. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a021642.
20. Arrindell, J., Desnues, B. (2023) Vimentin: from a cytoskeletal protein to a critical modulator of immune response and a target for infection. *Front. Immunol.* **14**, 1224352.
21. CCDS Report for Consensus CDS URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcdsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&DATA=CCDS7120.1&ORGANISM=9606&BUILDS=CURRENTBUILDS> [cit. srpen 25, 2023].
22. Tissue expression of VIM - Summary - The Human Protein Atlas URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000026025-VIM/tissue> [cit. duben 5, 2023].
23. Ivaska, J., Pallari, H.-M., Nevo, J., Eriksson, J.E. (2007) Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp. Cell Res.* **313**, 2050–62.
24. Battaglia, R.A., Delic, S., Herrmann, H., Snider, N.T. (2018) Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Research* **7**, 1796.
25. Danielsson, F., Peterson, M., Caldeira Araújo, H., Lautenschläger, F., Gad, A. (2018) Vimentin Diversity in Health and Disease. *Cells* **7**, 147.
26. Datta, A., Deng, S., Gopal, V., Yap, K.C.-H., Halim, C.E., Lye, M.L., Ong, M.S., Tan, T.Z., Sethi, G., Hooi, S.C., Kumar, A.P., Yap, C.T. (2021) Cytoskeletal Dynamics in Epithelial-Mesenchymal Transition: Insights into Therapeutic Targets for Cancer Metastasis. *Cancers* **13**, 1882.
27. Mendez, M.G., Kojima, S.-I., Goldman, R.D. (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* **24**, 1838–51.
28. Satelli, A., Li, S. (2011) Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3033–46.
29. Du, B., Shim, J. (2016) Targeting Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules* **21**, 965.

30. Li, M., Zhang, B., Sun, B., Wang, X., Ban, X., Sun, T., Liu, Z., Zhao, X. (2010) A novel function for vimentin: the potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **29**, 109.
31. Chernyatina, A.A., Guzenko, D., Strelkov, S.V. (2015) Intermediate filament structure: the bottom-up approach. *Curr. Opin. Cell Biol.* **32**, 65–72.
32. Chernyatina, A.A., Nicolet, S., Aebi, U., Herrmann, H., Strelkov, S.V. (2012) Atomic structure of the vimentin central α -helical domain and its implications for intermediate filament assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 13620–25.
33. Herrmann, H., Aebi, U. (2004) Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 749–89.
34. Meng, J.J., Khan, S., Ip, W. (1994) Charge interactions in the rod domain drive formation of tetramers during intermediate filament assembly. *J. Biol. Chem.* **269**, 18679–85.
35. Parry, D.A.D. (2006) Hendecad repeat in segment 2A and linker L2 of intermediate filament chains implies the possibility of a right-handed coiled-coil structure. *J. Struct. Biol.* **155**, 370–74.
36. Herrmann, H., Häner, M., Brettel, M., Müller, S.A., Goldie, K.N., Fedtke, B., Lustig, A., Franke, W.W., Aebi, U. (1996) Structure and Assembly Properties of the Intermediate Filament Protein Vimentin: The Role of its Head, Rod and Tail Domains. *J. Mol. Biol.* **264**, 933–53.
37. Shoeman, R.L., Hartig, R., Berthel, M., Traub, P. (2002) Deletion Mutagenesis of the Amino-Terminal Head Domain of Vimentin Reveals Dispensability of Large Internal Regions for Intermediate Filament Assembly and Stability. *Exp. Cell Res.* **279**, 344–53.
38. Snider, N.T., Omary, M.B. (2014) Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 163–77.
39. Sihag, R.K., Inagaki, M., Yamaguchi, T., Shea, T.B., Pant, H.C. (2007) Role of Phosphorylation on the Structural Dynamics and Function of Types III and IV Intermediate Filaments. *Exp. Cell Res.* **313**, 2098–2109.
40. Inagaki, M., Nishi, Y., Nishizawa, K., Matsuyama, M., Sato, C. (1987) Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. *Nature* **328**, 649–52.
41. Leube, R.E., Schwarz, N. (2016) in *Encyclopedia of Cell Biology* (Elsevier), s 569–78.
42. Robert, A., Hookway, C., Gelfand, V.I. (2016) Intermediate filament dynamics: What we can see now and why it matters. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **38**, 232–43.
43. Strelkov, S.V., Herrmann, H., Aebi, U. (2003) Molecular architecture of intermediate filaments. *BioEssays* **25**, 243–51.
44. Omary, M.B., Coulombe, P.A., McLean, W.H.I. (2004) Intermediate Filament Proteins and Their Associated Diseases. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2087–2100.
45. Omary, M.B. (2009) “IF-pathies”: a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *J. Clin. Invest.* **119**, 1756–62.

46. Henderson, P., Wilson, D.C., Satsangi, J., Stevens, C. (2012) A role for vimentin in Crohn disease. *Autophagy* **8**, 1695–96.
47. Van Steendam, K., Tilleman, K., De Ceuleneer, M., De Keyser, F., Elewaut, D., Deforce, D. (2010) Citrullinated vimentin as an important antigen in immune complexes from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients with antibodies against citrullinated proteins. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R132.
48. Surolia, R., Li, F.J., Wang, Z., Li, H., Dsouza, K., Thomas, V., Mirov, S., Pérez-Sala, D., Athar, M., Thannickal, V.J., Antony, V.B. (2019) Vimentin intermediate filament assembly regulates fibroblast invasion in fibrogenic lung injury. *JCI Insight* **4**, e123253.
49. Musaelyan, A., Lapin, S., Nazarov, V., Tkachenko, O., Gilburd, B., Mazing, A., Mikhailova, L., Shoenfeld, Y. (2018) Vimentin as antigenic target in autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmun. Rev.* **17**, 926–34.
50. Müller, M., Bhattacharya, S.S., Moore, T., Prescott, Q., Wedig, T., Herrmann, H., Magin, T.M. (2009) Dominant cataract formation in association with a vimentin assembly disrupting mutation. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1052–57.
51. Cogné, B., Bouameur, J.-E., Hayot, G., Latypova, X., Pattabiraman, S., Caillaud, A., Si-Tayeb, K., Besnard, T., Küry, S., Chariou, C., Gaignerie, A., David, L., Bordure, P., Kaganovich, D., Bézieau, S., Golzio, C., Magin, T.M., Isidor, B. (2020) A dominant vimentin variant causes a rare syndrome with premature aging. *Eur. J. Hum. Genet.* **28**, 1218–30.
52. Steinert, P.M., Marekov, L.N., Parry, D.A. (1993) Diversity of intermediate filament structure. Evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that in keratin intermediate filaments. *J. Biol. Chem.* **268**, 24916–25.
53. Laboratory of Structural Biology and Cell Signaling URL: <https://peterslab.org/downloads/LinX/> [cit. červenec 18, 2021].
54. StavroX and MeroX: Tools for Identifying Cross-Linked Peptides from Mass Spectrometric Data URL: <http://stavrox.com/> [cit. listopad 8, 2023].
55. PyMOL | Schrödinger URL: <https://www.schrodinger.com/products/pymol> [cit. listopad 23, 2023].
56. Brožura Optimize Technologies. URL: https://www.bgb-info.com/files/master/Optimize/Optimize_Trapping_Brochure.pdf.
57. Evosep sample loading protocol URL: <https://www.evosep.com/wp-content/uploads/2020/03/Sample-loading-protocol.pdf>.

Přílohy

Příloha 1. Aminokyselinová sekvence vimentinu Y400L

MATRSVSSSSYRRMFGGPGTASRPSSRSYVTTSTRTYSLGSALRPSTSRSLYASSPGG
 VYATRSSAVRLRSSVPGVRLQLQDSVDFSLADAINTEFKNTRTNEKVELQELNDRFANYI
 DKVRFLEQQNKILLAELEQLKGQGSRLGDLYEEMRELRRQVDQLTNDKARVEVERDN
 LAEDIMRLREKLQEEMLQREEAENTLQSFQDQVDNASLARLDLERKVESLQEEIAFLKK
 LHEEEIQELQAQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALRDVRRQYQYESVAAKNLQEAEEWYKSKF
 ADLSEAANRNNDALRQAKQESTEYRRQVQSLTCEVDALKGTNESLERQMREMEENFAVE
 AANYQDTIGRLQDEIQNMKEEMARHLREYQDLLNVKMALDIEIATLRKLLLEGEESRISL
 PLPNFSSLNLRETNLDSLPLVDTHSKRTLLIKTVETRDGQVINETSQHHDDLE

Příloha 2. Seznam produktů chemického sítění směsi vimentinových tetramerů (¹⁴N a ¹⁵N) s výsledky kvantifikace zastoupení INTER- a INTRA-dimerního sítění (%). Dále je v tabulce uvedena směrodatná odchylka (SD) pro výsledky kvantifikace.

| ID produktu | Číslo | Spojené peptidy (A-B) | Pozice spojených peptidů [A] - [B] | INTER (%) | INTRA (%) | SD (%) |
|-------------|-------|---------------------------------------|------------------------------------|-----------|-----------|--------|
| 1 | DSG | QAKQESTEYRR - QAKQESTEYRR | (311, 321) [A] - (311, 321) [B] | 92 | 8 | 5 |
| 2 | EDC | LLEGEESR - DGQVINETSQHHDDLE | (403, 410) [A] - (451, 466) [B] | 62 | 38 | 5 |
| 3 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFK - NLQEAEEWYKSK | (79, 97) [A] - (283, 294) [B] | 28 | 72 | 3 |
| 4 | DSS | FANYIDKVR - FANYIDKVR | (114, 122) [A] - (114, 122) [B] | 18 | 82 | 0 |
| 5 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - NLQEAEEWYK | (79, 100) [A] - (283, 292) [B] | 18 | 82 | 1 |
| 6 | DSS | FANYIDKVR - ILLAELEQLKGQGK | (114, 122) [A] - (130, 143) [B] | 12 | 88 | 0 |
| 7 | DSG | TNEKVELQELNDR - QAKQESTEYRR | (101, 113) [A] - (311, 321) [B] | 8 | 92 | 1 |
| 8 | EDC | LLEGEESR - ETNLDSLPLVDTHSKR | (403, 410) [A] - (425, 440) [B] | 7 | 93 | 0 |
| 9 | DSS | FANYIDKVR - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (114, 122) [A] - (274, 292) [B] | 7 | 93 | 1 |
| 10 | DSG | FANYIDKVR - QAKQESTEYRR | (114, 122) [A] - (311, 321) [B] | 7 | 93 | 1 |
| 11 | DSS | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - NLQEAEEWYKSK | (79, 100) [A] - (283, 294) [B] | 7 | 94 | 1 |
| 12 | DSG | SKFADLSEAANR - SKFADLSEAANR | (293, 304) [A] - (293, 304) [B] | 6 | 94 | 1 |
| 13 | EDC | NLQEAEEWYK - NLQEAEEWYK | (283, 292) [A] - (283, 292) [B] | 5 | 95 | 0 |
| 14 | DSS | ETNLDSLPLVDTHSKR - ETNLDSLPLVDTHSKR | (425, 440) [A] - (425, 440) [B] | 4 | 96 | 0 |
| 15 | EDC | TLLIKTVETR - DGQVINETSQHHDDLE | (441, 450) [A] - (451, 466) [B] | 4 | 96 | 0 |
| 16 | DSS | TNEKVELQELNDR - TNEKVELQELNDR | (101, 113) [A] - (101, 113) [B] | 3 | 97 | 0 |
| 17 | DSG | NLQEAEEWYKSK - SKFADLSEAANR | (283, 294) [A] - (293, 304) [B] | 3 | 97 | 0 |
| 18 | DSG | FANYIDKVR - FLEQQNKILLAELEQLKGQGK | (114, 122) [A] - (123, 143) [B] | 3 | 97 | 0 |
| 19 | DSG | NLQEAEEWYKSK - SKFADLSEAANRNNDALR | (283, 294) [A] - (293, 310) [B] | 3 | 97 | 0 |
| 20 | DSS | KVESLQEEIAFLKK - KVESLQEEIAFLKK | (223, 236) [A] - (223, 236) [B] | 3 | 97 | 0 |
| 21 | DSS | KVESLQEEIAFLK - KVESLQEEIAFLKK | (223, 235) [A] - (223, 236) [B] | 2 | 98 | 0 |
| 22 | DSS | KLLEGEESR - ETNLDSLPLVDTHSKR | (402, 410) [A] - (425, 440) [B] | 2 | 98 | 1 |

Příloha 3. Seznam unikátních peptidových spojení získaných pomocí chemického sítění $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek vimentinu identifikovaných LC-MS analýzou a výsledky kvantifikace zastoupení INTER- a INTRA-tetramerního sítění (%). Dále je v tabulce uvedena směrodatná odchylka (SD) pro výsledky kvantifikace. Spojené peptidy pocházející z rozhraní tetramer-tetramer jsou vyznačeny zelenou barvou. Pro peptidová spojení ID 77-83 nejsou uvedeny výsledky kvantifikace, jelikož intenzita jednotlivých peptidových forem ($^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$) v hmotnostním spektru byla pro provedení kvantifikace příliš nízká.

| ID produktu | Činidlo | Spojené peptidy (A-B) | Pozice spojených peptidů [A] - [B] | INTER (%) | INTRA (%) | SD (%) |
|-------------|----------|--|------------------------------------|-----------|-----------|--------|
| 1 | DSG, DSS | SKFADLSEAAANR - KLEGEESR | (293, 304) [A] - (402, 410) [B] | 116 | 0 | 14 |
| 2 | DSG, DSS | TNEKVELQELNDR - SKFADLSEAAANR | (101, 113) [A] - (293, 304) [B] | 114 | 0 | 11 |
| 3 | DSG | TNEKVELQELNDRFANYIDKVR - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (101, 122) [A] - (274, 292) [B] | 106 | 0 | 15 |
| 4 | DSG | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - NLQEAEEWYKSK | (79, 100) [A] - (283, 294) [B] | 103 | 0 | 2 |
| 5 | DSS | SKFADLSEAAANR - DGQVINETSQHDDLE | (293, 304) [A] - (451, 466) [B] | 103 | 0 | 11 |
| 6 | DSG, DSS | QAKQESTEYRR - TLLIKTVETR | (311, 321) [A] - (441, 450) [B] | 103 | 0 | 5 |
| 7 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFK - SKFADLSEAAANR | (79, 97) [A] - (293, 304) [B] | 103 | 0 | 4 |
| 8 | DSG, DSS | FANYIDKVR - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (114, 122) [A] - (274, 292) [B] | 101 | 0 | 1 |
| 9 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - FADLSEAAANR | (79, 100) [A] - (295, 304) [B] | 101 | 0 | 8 |
| 10 | DSS | EKLQEEMLQREEAENTLQSFRRQDVNANSLAR - QAKQESTEYRR | (187, 217) [A] - (311, 321) [B] | 100 | 0 | 8 |
| 11 | DSG, DSS | FANYIDKVR - FANYIDKVR | (114, 122) [A] - (114, 122) [B] | 99 | 1 | 2 |
| 12 | DSS, DSG | TNEKVELQELNDR - QAKQESTEYRR | (101, 113) [A] - (311, 321) [B] | 99 | 1 | 4 |
| 13 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFK - NLQEAEEWYKSK | (79, 97) [A] - (283, 294) [B] | 98 | 2 | 2 |
| 14 | DSS | TNEKVELQELNDR - SKFADLSEAAANRNDALR | (101, 113) [A] - (293, 310) [B] | 98 | 2 | 15 |
| 15 | DSS, DSG | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - SKFADLSEAAANR | (79, 100) [A] - (293, 304) [B] | 97 | 3 | 2 |
| 16 | EDC, DSG | TNEKVELQELNDR - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (101, 113) [A] - (274, 292) [B] | 97 | 4 | 1 |
| 17 | EDC | EEAENTLQSF - EYQDLLNVK | (197, 207) [A] - (382, 390) [B] | 95 | 5 | 7 |
| 18 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - NLQEAEEWYK | (79, 100) [A] - (283, 292) [B] | 95 | 5 | 3 |
| 19 | DSG, DSS | QAKQESTEYRR - KLEGEESR | (311, 321) [A] - (402, 410) [B] | 94 | 6 | 10 |
| 20 | DSG | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - QAKQESTEYR | (79, 100) [A] - (311, 320) [B] | 94 | 6 | 4 |
| 21 | DSS | QQVSLTCEVDALKGTNESLER - TLLIKTVETR | (322, 342) [A] - (441, 450) [B] | 94 | 6 | 3 |
| 22 | DSS | ILLAELEQLKGQK - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (130, 143) [A] - (274, 292) [B] | 94 | 6 | 0 |
| 23 | DSS, DSG | FANYIDKVR - SKFADLSEAAANR | (114, 122) [A] - (293, 304) [B] | 93 | 7 | 2 |
| 24 | DSS, DSG | SKFADLSEAAANR - ETNLDLPLVDTHSKR | (293, 304) [A] - (425, 440) [B] | 93 | 7 | 1 |
| 25 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - EEAENTLQSF | (79, 100) [A] - (197, 207) [B] | 93 | 7 | 2 |
| 26 | DSG | FANYIDKVR - QAKQESTEYRR | (114, 122) [A] - (311, 321) [B] | 92 | 8 | 4 |
| 27 | DSS | QQYESVAAKNLQEAEEWYK - KLEGEESR | (274, 292) [A] - (402, 410) [B] | 91 | 9 | 4 |
| 28 | DSS | QQVSLTCEVDALKGTNESLER - ETNLDLPLVDTHSKR | (322, 342) [A] - (425, 440) [B] | 91 | 9 | 9 |
| 29 | DSG | FANYIDKVR - TLLIKTVETR | (114, 122) [A] - (441, 450) [B] | 89 | 11 | 7 |
| 30 | DSS, DSG | FANYIDKVR - NLQEAEEWYKSK | (114, 122) [A] - (283, 294) [B] | 88 | 12 | 2 |
| 31 | DSG, DSS | QAKQESTEYRR - QAKQESTEYRR | (311, 321) [A] - (311, 321) [B] | 87 | 13 | 6 |
| 32 | DSS | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - KLEGEESR | (79, 100) [A] - (402, 410) [B] | 86 | 14 | 1 |
| 33 | DSS | FANYIDKVR - VESLQEEIAFLK | (114, 122) [A] - (224, 236) [B] | 85 | 15 | 3 |
| 34 | DSS | FANYIDKVR - KVESLQEEIAFLK | (114, 122) [A] - (223, 235) [B] | 84 | 16 | 3 |
| 35 | DSS, DSG | QAKQESTEYRR - DGQVINETSQHDDLE | (311, 321) [A] - (451, 466) [B] | 83 | 17 | 6 |
| 36 | DSG, DSS | QAKQESTEYRR - ETNLDLPLVDTHSKR | (311, 321) [A] - (425, 440) [B] | 82 | 18 | 6 |
| 37 | DSG | FANYIDKVR - QQVSLTCEVDALKGTNESLER | (114, 122) [A] - (322, 342) [B] | 82 | 18 | 11 |
| 38 | DSS | SKFADLSEAAANR - TLLIKTVETR | (293, 304) [A] - (441, 450) [B] | 82 | 18 | 9 |
| 39 | DSG | QAKQESTEYRR - QQVSLTCEVDALKGTNESLER | (311, 321) [A] - (322, 342) [B] | 77 | 23 | 8 |
| 40 | DSS, DSG | TNEKVELQELNDR - KLEGEESR | (101, 113) [A] - (402, 410) [B] | 72 | 28 | 4 |
| 41 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - DNLAEDIMR | (79, 100) [A] - (176, 184) [B] | 70 | 30 | 1 |
| 42 | EDC | TNEK - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (101, 104) [A] - (274, 292) [B] | 64 | 36 | 0 |
| 43 | DSG, DSS | QQYESVAAKNLQEAEEWYK - QAKQESTEYRR | (274, 292) [A] - (311, 321) [B] | 63 | 37 | 2 |
| 44 | DSG | FANYIDKVR - ILLAELEQLKGQK | (114, 122) [A] - (130, 143) [B] | 61 | 39 | 12 |
| 45 | EDC | ILLAELEQLKGQK - EEAENTLQSF | (130, 143) [A] - (197, 207) [B] | 60 | 40 | 0 |
| 46 | DSG | SVSSSSYR - FANYIDKVR | (5, 12) [A] - (114, 122) [B] | 60 | 40 | 3 |
| 47 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFK - ILLAELEQLKGQK | (79, 97) [A] - (130, 143) [B] | 52 | 48 | 3 |
| 48 | DSG, DSS | SKFADLSEAAANR - QAKQESTEYRR | (293, 304) [A] - (311, 321) [B] | 49 | 51 | 1 |
| 49 | DSG | SKFADLSEAAANR - SKFADLSEAAANR | (293, 304) [A] - (293, 304) [B] | 48 | 52 | 1 |
| 50 | DSS, DSG | TLLIKTVETR - TLLIKTVETR | (441, 450) [A] - (441, 450) [B] | 47 | 53 | 2 |
| 51 | DSS | SKFADLSEAAANR - SKFADLSEAAANRNDALR | (293, 304) [A] - (293, 310) [B] | 44 | 56 | 7 |
| 52 | DSS | SLYASSPGGVYATR - ILLAELEQLKGQK | (51, 64) [A] - (130, 143) [B] | 42 | 58 | 1 |
| 53 | DSG | ETNLDLPLVDTHSKR - ETNLDLPLVDTHSKR | (425, 440) [A] - (425, 440) [B] | 31 | 69 | 1 |
| 54 | DSG, DSS | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - FANYIDKVR | (79, 100) [A] - (114, 122) [B] | 31 | 69 | 1 |
| 55 | DSG | TNEKVELQELNDR - TNEKVELQELNDR | (101, 113) [A] - (101, 113) [B] | 28 | 72 | 3 |
| 56 | DSS | SLYASSPGGVYATR - FANYIDKVR | (51, 64) [A] - (114, 122) [B] | 26 | 74 | 1 |
| 57 | DSG | QQYESVAAKNLQEAEEWYK - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (274, 292) [A] - (274, 292) [B] | 23 | 77 | 1 |
| 58 | EDC | ILLAELEQLKGQK - LGDLYEEEMR | (130, 143) [A] - (146, 155) [B] | 19 | 81 | 2 |
| 59 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFK - FANYIDKVR | (79, 97) [A] - (114, 122) [B] | 17 | 83 | 1 |
| 60 | DSS, DSG | LQDEIQNMKEEMAR - TLLIKTVETR | (365, 378) [A] - (441, 450) [B] | 17 | 83 | 0 |
| 61 | DSG, DSS | QQYESVAAKNLQEAEEWYK - SKFADLSEAAANR | (274, 292) [A] - (293, 304) [B] | 14 | 86 | 0 |
| 62 | DSS, DSG | FANYIDKVR - FLEQQNKILLAELEQLKGQK | (114, 122) [A] - (123, 143) [B] | 12 | 88 | 3 |
| 63 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - VELQELNDR | (79, 100) [A] - (105, 113) [B] | 11 | 89 | 1 |
| 64 | DSG, DSS | TNEKVELQELNDR - FANYIDKVR | (101, 113) [A] - (114, 122) [B] | 11 | 89 | 1 |

| ID produktu | Činidlo | Spojené peptidy (A-B) | Pozice spojených peptidů [A] - [B] | INTER (%) | INTRA (%) | SD (%) |
|-------------|---------------|--|------------------------------------|-----------|-----------|--------|
| 65 | DSS | KVESLQEEIAFLKK - KVESLQEEIAFLKK | (223, 236) [A] - (223, 236) [B] | 9 | 91 | 1 |
| 66 | DSG | NLQEAEEWYKSK - NLQEAEEWYKSKFADLSEAANR | (283, 294) [A] - (283, 304) [B] | 9 | 91 | 4 |
| 67 | EDC | NLQEAEEWYK - NLQEAEEWYK | (283, 292) [A] - (283, 292) [B] | 8 | 92 | 0 |
| 68 | DSG, DSS | KLLEGEESR - ETNLDLPLVDTHSKR | (402, 410) [A] - (425, 440) [B] | 8 | 92 | 1 |
| 69 | DSS, DSG | NLQEAEEWYKSK - SKFADLSEAANRNDALR | (283, 294) [A] - (293, 310) [B] | 7 | 93 | 0 |
| 70 | DSG | NLQEAEEWYKSK - SKFADLSEAANR | (283, 294) [A] - (293, 304) [B] | 7 | 93 | 0 |
| 71 | DSS, DSG | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - TNEKVELQELNDR | (79, 100) [A] - (101, 113) [B] | 6 | 94 | 0 |
| 72 | DSS | KLLEGEESR - ISLPLPNFSSLNLR | (402, 410) [A] - (411, 424) [B] | 5 | 95 | 0 |
| 73 | DSG, DSS, EDC | ETNLDLPLVDTHSKR - DGQVINETSQHDDLE | (425, 440) [A] - (451, 466) [B] | 5 | 95 | 0 |
| 74 | DSG, DSS | ISLPLPNFSSLNLR - ETNLDLPLVDTHSKR | (411, 424) [A] - (425, 440) [B] | 3 | 97 | 0 |
| 75 | DSS, DSG | ETNLDLPLVDTHSKR - TLLIKTVETR | (425, 440) [A] - (441, 450) [B] | 3 | 97 | 0 |
| 76 | DSS, DSG, EDC | TLLIKTVETR - DGQVINETSQHDDLE | (441, 450) [A] - (451, 466) [B] | 2 | 98 | 0 |
| 77 | DSS | FANYIDKVR - LQDEIQNMKEEMAR | (114, 122) [A] - (365, 378) [B] | - | - | - |
| 78 | DSS | FLEQQNKILLAELEQLKGQK - QAKQESTEYRR | (123, 143) [A] - (311, 321) [B] | - | - | - |
| 79 | DSG | KVESLQEEIAFLK - QVQSLTCEVDALKGTTNESLER | (223, 235) [A] - (322, 342) [B] | - | - | - |
| 80 | DSG | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - KVESLQEEIAFLK | (79, 100) [A] - (223, 235) [B] | - | - | - |
| 81 | DSS | NLQEAEEWYKSK - TLLIKTVETR | (283, 294) [A] - (441, 450) [B] | - | - | - |
| 82 | DSS | QVDQLTNDKAR - SKFADLSEAANR | (160, 170) [A] - (293, 304) [B] | - | - | - |
| 83 | DSS | SKFADLSEAANR - LQDEIQNMKEEMAR | (293, 304) [A] - (365, 378) [B] | - | - | - |

Příloha 4. Seznam peptidových spojení pocházejících z ULF podjednotek vimentinu identifikovaných LC-MS/MS analýzou, které byly dříve identifikovány a kvantifikovány z MS spekter získaných využitím techniky MIX CXMS (viz Příloha 3).

| | Činidlo | Spojené peptidy (A-B) | Pozice peptidu A | Pozice peptidu B |
|----|------------|---------------------------------------|------------------|------------------|
| 1 | DSBU, DSPU | ETNLDSLPLVDTHSKR - DGQVINETSQHDDLE | (425 - 440) | (451 - 467) |
| 2 | DSBU, DSPU | ETNLDSLPLVDTHSKR - ETNLDSLPLVDTHSKR | (425 - 440) | (425 - 440) |
| 3 | DSBU, DSPU | FANYIDKVR - FANYIDKVR | (114 - 122) | (114 - 122) |
| 4 | DSBU, DSPU | FANYIDKVR - NLQEAEEWYKSK | (114 - 122) | (283 - 294) |
| 5 | DSBU, DSPU | FANYIDKVR - QAKQESTEYRR | (114 - 122) | (311 - 321) |
| 6 | DSBU, DSPU | FANYIDKVR - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (114 - 122) | (274 - 292) |
| 7 | DSBU, DSPU | FANYIDKVR - QVQSLTBEVDALKGTNESLER | (114 - 122) | (322 - 342) |
| 8 | DSPU | FANYIDKVR - TLLIKTVETR | (114 - 122) | (441 - 450) |
| 9 | DSBU, DSPU | KVESLQEEIAFLK - QVQSLTBEVDALKGTNESLER | (223 - 235) | (322 - 342) |
| 10 | DSBU | NLQEAEEWYKSK - SKFADLSEAANRNDALR | (283 - 294) | (293 - 310) |
| 11 | DSBU, DSPU | QAKQESTEYRR - ETNLDSLPLVDTHSKR | (311 - 321) | (425 - 440) |
| 12 | DSBU | QAKQESTEYRR - QAKQESTEYRR | (311 - 321) | (311 - 321) |
| 13 | DSBU, DSPU | QAKQESTEYRR - QVQSLTBEVDALKGTNESLER | (311 - 321) | (322 - 342) |
| 14 | DSBU, DSPU | SKFADLSEAANR - QAKQESTEYRR | (293 - 304) | (311 - 321) |
| 15 | DSBU, DSPU | SKFADLSEAANR - SKFADLSEAANR | (293 - 304) | (293 - 304) |
| 16 | DSBU, DSPU | SVSSSSYR - FANYIDKVR | (5 - 12) | (114 - 122) |
| 17 | DSBU, DSPU | TNEKVELQELNDR - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (101 - 113) | (274 - 292) |
| 18 | DSBU | TNEKVELQELNDR - TNEKVELQELNDR | (101 - 113) | (101 - 113) |
| 19 | DSBU, DSPU | FANYIDKVR - FLEQQNKILLAELEQLKGQGK | (114 - 122) | (123 - 143) |
| 20 | DSBU, DSPU | FANYIDKVR - ILLAELEQLKGQGK | (114 - 122) | (130 - 143) |
| 21 | DSBU, DSPU | FANYIDKVR - KVESLQEEIAFLK | (114 - 122) | (223 - 235) |
| 22 | DSBU, DSPU | FANYIDKVR - SKFADLSEAANR | (114 - 122) | (293 - 304) |
| 23 | DSBU, DSPU | FANYIDKVR - VESLQEEIAFLK | (114 - 122) | (224 - 236) |
| 24 | DSBU | ILLAELEQLKGQGK - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (130 - 143) | (274 - 292) |
| 25 | DSBU, DSPU | ISLPLPNFSSLNLR - ETNLDSLPLVDTHSKR | (411 - 424) | (425 - 440) |
| 26 | DSBU, DSPU | KLLEGEESR - ETNLDSLPLVDTHSKR | (402 - 410) | (425 - 440) |
| 27 | DSBU, DSPU | KLLEGEESR - ISLPLPNFSSLNLR | (402 - 410) | (411 - 424) |
| 28 | DSBU, DSPU | KVESLQEEIAFLK - KVESLQEEIAFLK | (223 - 236) | (223 - 236) |
| 29 | DSBU, DSPU | QAKQESTEYRR - DGQVINETSQHDDLE | (311 - 321) | (451 - 467) |
| 30 | DSBU, DSPU | QVDQLTNDKAR - SKFADLSEAANR | (160 - 170) | (293 - 304) |
| 31 | DSBU | SKFADLSEAANR - DGQVINETSQHDDLE | (293 - 304) | (451 - 467) |
| 32 | DSBU, DSPU | SKFADLSEAANR - ETNLDSLPLVDTHSKR | (293 - 304) | (425 - 440) |
| 33 | DSBU | SKFADLSEAANR - LQDEIQNmKEEMARHLR | (293 - 304) | (365 - 381) |
| 34 | DSBU | SKFADLSEAANR - SKFADLSEAANRNDALR | (293 - 304) | (293 - 310) |
| 35 | DSBU | SLYASSPGGVYATR - ILLAELEQLKGQGK | (51 - 64) | (130 - 143) |
| 36 | DSBU, DSPU | TLLIKTVETR - DGQVINETSQHDDLE | (441 - 450) | (451 - 467) |
| 37 | DSBU | TLLIKTVETR - TLLIKTVETR | (441 - 450) | (441 - 450) |

Příloha 5. Seznam všech produktů chemického sítění $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ULF podjednotek vimentinu identifikovaných pomocí LC-MS analýzy. Pro jednotlivé produkty sítění jsou v tabulce uvedeny výsledky kvantifikace zastoupení INTER- a INTRA-tetramerního sítění (%) a směrodatná odchylka (SD) výsledků kvantifikace. Spojené peptidy pocházející z rozhraní tetramer-tetramer jsou vyznačeny zelenou barvou. Tabulka dále obsahuje informace o modifikacích peptidů, nábojovém stavu (X^+) a hodnotách m/z (X^+) pro všechny čtyři peptidové formy ($^{14}\text{N}/^{14}\text{N} = \text{LL}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N} = \text{LH}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = \text{HL}$, $^{15}\text{N}/^{15}\text{N} = \text{HH}$).

| ID produktu | Čidlo | Spojené peptidy (A-B) | Pozice spojených peptidů [A] - [B] | Modifikace | Náboj (X^+) | LL m/z (X^+) | LH m/z (X^+) | HL m/z (X^+) | HH m/z (X^+) | INTER (%) | INTRA (%) | SD (%) |
|-------------|-------|--|------------------------------------|---------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------|-----------|--------|
| 1 | DSG | SKFADLSEAAANR - KLEGEESR | (293, 304) [A] - (402, 410) [B] | | 3 | 822,082 | 826,403 | 827,732 | 832,052 | 116 | 0 | 14 |
| 1 | DSS | SKFADLSEAAANR - KLEGEESR | (293, 304) [A] - (402, 410) [B] | | 4 | 627,325 | 630,565 | 631,562 | 634,803 | 96 | 4 | 7 |
| 2 | DSG | TNEKVELQELNDR - SKFADLSEAAANR | (101, 113) [A] - (293, 304) [B] | | 4 | 748,622 | 752,859 | 753,607 | 757,844 | 114 | 0 | 11 |
| 2 | DSS | TNEKVELQELNDR - SKFADLSEAAANR | (101, 113) [A] - (293, 304) [B] | | 4 | 759,134 | 763,371 | 764,119 | 768,356 | 86 | 14 | 2 |
| 3 | DSG | TNEKVELQELNDRFANYIDKVR - QQYESVAAKNLQEAEEW | (101, 122) [A] - (274, 292) [B] | | 6 | 851,422 | 855,743 | 857,072 | 861,393 | 106 | 0 | 15 |
| 4 | DSG | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - NLQEAEEWYKSK | (79, 100) [A] - (283, 294) [B] | | 4 | 1030,006 | 1034,244 | 1037,235 | 1041,472 | 103 | 0 | 2 |
| 5 | DSS | SKFADLSEAAANR - DGQVINETSQHDDLE | (293, 304) [A] - (451, 466) [B] | | 4 | 821,384 | 827,117 | 825,622 | 831,354 | 103 | 0 | 11 |
| 6 | DSG | QAKQESTEYRR - TLLIKTVETR | (311, 321) [A] - (441, 450) [B] | | 5 | 533,692 | 536,484 | 537,680 | 540,472 | 103 | 0 | 5 |
| 6 | DSS | QAKQESTEYRR - TLLIKTVETR | (311, 321) [A] - (441, 450) [B] | | 4 | 677,375 | 680,865 | 682,360 | 685,850 | 96 | 4 | 9 |
| 7 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFK - SKFADLSEAAANR | (79, 97) [A] - (293, 304) [B] | | 4 | 854,681 | 858,918 | 860,165 | 864,402 | 103 | 0 | 4 |
| 8 | DSG | FANYIDKVR - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (114, 122) [A] - (274, 292) [B] | | 4 | 884,435 | 890,916 | 887,925 | 894,405 | 101 | 0 | 1 |
| 8 | DSS | FANYIDKVR - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (114, 122) [A] - (274, 292) [B] | | 4 | 894,947 | 901,427 | 898,436 | 904,917 | 97 | 3 | 2 |
| 9 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - FADLSEAAANR | (79, 100) [A] - (295, 304) [B] | | 4 | 893,697 | 897,187 | 900,926 | 904,415 | 101 | 0 | 8 |
| 10 | DSS | EKLQEEMLRQEEAENTLQSFQRQVDNASLAR - QAKQESTE | (187, 217) [A] - (311, 321) [B] | | 6 | 869,263 | 872,586 | 877,073 | 880,396 | 100 | 0 | 8 |
| 11 | DSG | FANYIDKVR - FANYIDKVR | (114, 122) [A] - (114, 122) [B] | | 4 | 587,312 | 590,801 | 590,801 | 594,291 | 99 | 1 | 2 |
| 11 | DSS | FANYIDKVR - FANYIDKVR | (114, 122) [A] - (114, 122) [B] | | 4 | 597,823 | 601,313 | 601,313 | 604,803 | 93 | 7 | 8 |
| 12 | DSS | TNEKVELQELNDR - QAKQESTEYRR | (101, 113) [A] - (311, 321) [B] | | 4 | 780,894 | 785,880 | 785,880 | 790,865 | 99 | 1 | 4 |
| 12 | DSG | TNEKVELQELNDR - QAKQESTEYRR | (101, 113) [A] - (311, 321) [B] | | 5 | 616,508 | 620,496 | 620,496 | 624,484 | 91 | 0 | 6 |
| 13 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFK - NLQEAEEWYKSK | (79, 97) [A] - (283, 294) [B] | | 4 | 908,701 | 912,938 | 914,184 | 918,422 | 98 | 2 | 2 |
| 14 | DSS | TNEKVELQELNDR - SKFADLSEAAANRNDALR | (101, 113) [A] - (293, 310) [B] | | 5 | 744,175 | 749,759 | 748,163 | 753,747 | 98 | 0 | 15 |
| 15 | DSS | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - SKFADLSEAAANR | (79, 100) [A] - (293, 304) [B] | | 4 | 986,498 | 990,736 | 993,727 | 997,964 | 97 | 3 | 2 |
| 15 | DSG | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - SKFADLSEAAANR | (79, 100) [A] - (293, 304) [B] | | 4 | 975,987 | 980,224 | 983,215 | 987,453 | 101 | 0 | 4 |
| 16 | EDC | TNEKVELQELNDR - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (101, 113) [A] - (274, 292) [B] | | 5 | 777,381 | 782,566 | 781,370 | 786,554 | 97 | 4 | 1 |
| 16 | DSG | TNEKVELQELNDR - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (101, 113) [A] - (274, 292) [B] | | 4 | 999,983 | 1006,464 | 1004,968 | 1011,449 | 95 | 5 | 3 |
| 17 | EDC | EEAENTLQSF - EYQDLLNVK | (197, 207) [A] - (382, 390) [B] | | 3 | 809,399 | 813,388 | 814,717 | 818,705 | 95 | 5 | 7 |
| 18 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - NLQEAEEWYK | (79, 100) [A] - (283, 292) [B] | | 4 | 947,717 | 951,206 | 954,945 | 958,435 | 95 | 5 | 3 |
| 19 | DSG | QAKQESTEYRR - KLEGEESR | (311, 321) [A] - (402, 410) [B] | | 4 | 638,574 | 641,815 | 643,559 | 646,800 | 94 | 6 | 10 |
| 19 | DSS | QAKQESTEYRR - KLEGEESR | (311, 321) [A] - (402, 410) [B] | | 4 | 649,086 | 652,326 | 654,071 | 657,311 | - | - | - |
| 20 | DSG | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - QAKQESTEYR | (79, 100) [A] - (311, 320) [B] | | 4 | 958,722 | 962,710 | 965,951 | 969,939 | 94 | 6 | 4 |
| 21 | DSS | QVQSLTCEVDALKGTTNESLER - TLLIKTVETR | (322, 342) [A] - (441, 450) [B] | Karbamidace (A.328) | 4 | 922,742 | 926,232 | 929,722 | 933,211 | 94 | 6 | 3 |
| 22 | DSS | ILLAELEQLKGQK - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (130, 143) [A] - (274, 292) [B] | | 4 | 998,523 | 1005,004 | 1003,010 | 1009,490 | 94 | 6 | 0 |
| 23 | DSS | FANYIDKVR - SKFADLSEAAANR | (114, 122) [A] - (293, 304) [B] | | 4 | 643,586 | 647,823 | 647,075 | 651,313 | 93 | 7 | 2 |
| 23 | DSG | FANYIDKVR - SKFADLSEAAANR | (114, 122) [A] - (293, 304) [B] | | 4 | 633,074 | 637,311 | 636,563 | 640,801 | 90 | 10 | 1 |

| ID produktu | Číslo | Spojené peptidy (A-B) | Pozice spojených peptidů [A] - [B] | Modifikace | Náboj (X+) | LL m/z (X+) | LH m/z (X+) | HL m/z (X+) | HH m/z (X+) | INTER (%) | INTRA (%) | SD (%) |
|-------------|-------|--|------------------------------------|---------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------|--------|
| 24 | DSS | SKFADLSEAANR - ETNLDSLPLVDTHSKR | (293, 304) [A] - (425, 440) [B] | | 5 | 654,938 | 659,524 | 658,328 | 662,914 | 93 | 7 | 1 |
| 24 | DSG | SKFADLSEAANR - ETNLDSLPLVDTHSKR | (293, 304) [A] - (425, 440) [B] | | 5 | 646,528 | 651,115 | 649,918 | 654,505 | 90 | 10 | 2 |
| 25 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - EEAENTLQSFRR | (79, 100) [A] - (197, 207) [B] | | 4 | 951,220 | 955,208 | 958,448 | 962,436 | 93 | 8 | 2 |
| 26 | DSG | FANYIDKVR - QAKQESTYRR | (114, 122) [A] - (311, 321) [B] | | 4 | 654,835 | 659,820 | 658,324 | 663,309 | 92 | 8 | 4 |
| 27 | DSS | QQYESVAAKNLQEAEEWYK - KLLEGEESR | (274, 292) [A] - (402, 410) [B] | | 4 | 878,686 | 881,927 | 885,167 | 888,407 | 91 | 9 | 4 |
| 28 | DSS | QVQSLTCEVDALKGTNESLER - ETNLDSLPLVDTHSKR | (322, 342) [A] - (425, 440) [B] | Karbamidace (A.328) | 5 | 868,640 | 873,227 | 874,224 | 878,810 | 91 | 9 | 9 |
| 29 | DSG | FANYIDKVR - TLLIKTVETR | (114, 122) [A] - (441, 450) [B] | | 4 | 599,340 | 602,830 | 602,830 | 606,320 | 89 | 11 | 7 |
| 30 | DSS | FANYIDKVR - NLQEAEEWYKSK | (114, 122) [A] - (283, 294) [B] | | 4 | 697,605 | 701,843 | 701,095 | 705,332 | 88 | 12 | 2 |
| 30 | DSG | FANYIDKVR - NLQEAEEWYKSK | (114, 122) [A] - (283, 294) [B] | | 4 | 687,093 | 691,331 | 690,583 | 694,820 | 88 | 12 | 3 |
| 31 | DSG | QAKQESTYRR - QAKQESTYRR | (311, 321) [A] - (311, 321) [B] | | 5 | 578,088 | 582,076 | 582,076 | 586,064 | 87 | 13 | 6 |
| 31 | DSS | QAKQESTYRR - QAKQESTYRR | (311, 321) [A] - (311, 321) [B] | | 5 | 586,497 | 590,485 | 590,485 | 594,473 | 86 | 14 | 3 |
| 32 | DSS | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - KLLEGEESR | (79, 100) [A] - (402, 410) [B] | | 4 | 924,476 | 927,716 | 931,704 | 934,945 | 86 | 14 | 1 |
| 33 | DSS | FANYIDKVR - VESLQEEIAFLKK | (114, 122) [A] - (224, 236) [B] | | 4 | 699,885 | 703,873 | 703,375 | 707,363 | 85 | 15 | 3 |
| 34 | DSS | FANYIDKVR - KVESLQEEIAFLK | (114, 122) [A] - (223, 235) [B] | | 4 | 699,885 | 703,873 | 703,375 | 707,363 | 84 | 16 | 3 |
| 35 | DSS | QAKQESTYRR - DGQVINETSQHDDLE | (311, 321) [A] - (451, 466) [B] | | 5 | 674,717 | 679,304 | 678,706 | 683,292 | 83 | 17 | 6 |
| 35 | DSG | QAKQESTYRR - DGQVINETSQHDDLE | (311, 321) [A] - (451, 466) [B] | | 5 | 666,308 | 670,894 | 670,296 | 674,883 | 70 | 30 | 16 |
| 36 | DSG | QAKQESTYRR - ETNLDSLPLVDTHSKR | (311, 321) [A] - (425, 440) [B] | | 5 | 663,937 | 668,524 | 667,925 | 672,512 | 82 | 18 | 6 |
| 36 | DSS | QAKQESTYRR - ETNLDSLPLVDTHSKR | (311, 321) [A] - (425, 440) [B] | | 5 | 672,347 | 676,933 | 676,335 | 680,921 | 79 | 21 | 4 |
| 37 | DSG | FANYIDKVR - QVQSLTCEVDALKGTNESLER | (114, 122) [A] - (322, 342) [B] | Karbamidace (B.328) | 4 | 900,202 | 907,181 | 903,691 | 910,671 | 82 | 18 | 11 |
| 38 | DSS | SKFADLSEAANR - TLLIKTVETR | (293, 304) [A] - (441, 450) [B] | | 4 | 655,614 | 659,104 | 659,852 | 663,341 | 82 | 18 | 9 |
| 39 | DSG | QAKQESTYRR - QVQSLTCEVDALKGTNESLER | (311, 321) [A] - (322, 342) [B] | Karbamidace (B.328) | 5 | 774,381 | 779,965 | 778,370 | 783,953 | 77 | 23 | 8 |
| 40 | DSS | TNEKVELQELNDR - KLLEGEESR | (101, 113) [A] - (402, 410) [B] | | 4 | 697,111 | 700,351 | 702,096 | 705,336 | 72 | 28 | 4 |
| 41 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - DNLAEDIMR | (79, 100) [A] - (176, 184) [B] | | 4 | 889,441 | 892,682 | 896,670 | 899,910 | 70 | 31 | 1 |
| 42 | EDC | TNEK - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (101, 104) [A] - (274, 292) [B] | | 4 | 697,337 | 703,818 | 698,833 | 705,313 | 64 | 36 | 0 |
| 43 | DSG | QQYESVAAKNLQEAEEWYK - QAKQESTYRR | (274, 292) [A] - (311, 321) [B] | | 5 | 761,768 | 765,756 | 766,952 | 770,941 | 63 | 37 | 2 |
| 43 | DSS | QQYESVAAKNLQEAEEWYK - QAKQESTYRR | (274, 292) [A] - (311, 321) [B] | | 5 | 770,177 | 774,165 | 775,362 | 779,350 | 68 | 32 | 1 |
| 44 | DSG | FANYIDKVR - ILLAELEQLKGQGK | (114, 122) [A] - (130, 143) [B] | | 4 | 690,888 | 695,375 | 694,377 | 698,864 | 61 | 39 | 12 |
| 45 | EDC | ILLAELEQLKGQGK - EEAENTLQSFRR | (130, 143) [A] - (197, 207) [B] | | 4 | 711,883 | 715,871 | 716,370 | 720,358 | 60 | 40 | 0 |
| 46 | DSG | SVSSSSYR - FANYIDKVR | (5, 12) [A] - (114, 122) [B] | | 4 | 524,013 | 527,503 | 526,755 | 530,244 | 60 | 40 | 3 |
| 47 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFK - ILLAELEQLKGQGK | (79, 97) [A] - (130, 143) [B] | | 4 | 912,495 | 916,982 | 917,979 | 922,465 | 52 | 48 | 3 |
| 48 | DSG | SKFADLSEAANR - QAKQESTYRR | (293, 304) [A] - (311, 321) [B] | | 4 | 700,597 | 705,582 | 704,834 | 709,819 | 49 | 51 | 1 |
| 48 | DSS | SKFADLSEAANR - QAKQESTYRR | (293, 304) [A] - (311, 321) [B] | | 4 | 711,109 | 716,094 | 715,346 | 720,331 | 22 | 78 | 1 |
| 49 | DSG | SKFADLSEAANR - SKFADLSEAANR | (293, 304) [A] - (293, 304) [B] | | 4 | 678,836 | 683,073 | 683,073 | 687,311 | 48 | 52 | 1 |
| 50 | DSS | TLLIKTVETR - TLLIKTVETR | (441, 450) [A] - (441, 450) [B] | | 4 | 621,881 | 625,370 | 625,370 | 628,860 | 47 | 53 | 2 |
| 50 | DSG | TLLIKTVETR - TLLIKTVETR | (441, 450) [A] - (441, 450) [B] | | 4 | 611,369 | 614,859 | 614,859 | 618,348 | 33 | 67 | 1 |
| 51 | DSS | SKFADLSEAANR - SKFADLSEAANRNDALR | (293, 304) [A] - (293, 310) [B] | | 4 | 860,182 | 864,161 | 864,419 | 871,398 | 44 | 56 | 7 |
| 52 | DSS | SLYASSPGGVYATR - ILLAELEQLKGQGK | (51, 64) [A] - (130, 143) [B] | | 4 | 777,176 | 781,663 | 781,414 | 785,900 | 42 | 58 | 1 |
| 53 | DSG | ETNLDSLPLVDTHSKR - ETNLDSLPLVDTHSKR | (425, 440) [A] - (425, 440) [B] | | 5 | 749,787 | 754,373 | 754,373 | 758,959 | 31 | 69 | 1 |
| 54 | DSG | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - FANYIDKVR | (79, 100) [A] - (114, 122) [B] | | 4 | 930,224 | 933,714 | 937,453 | 940,943 | 31 | 69 | 1 |
| 54 | DSS | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - FANYIDKVR | (79, 100) [A] - (114, 122) [B] | | 4 | 940,736 | 944,226 | 947,965 | 951,454 | 26 | 74 | 1 |

| ID produktu | Číslo | Spojené peptidy (A-B) | Pozice spojených peptidů [A] - [B] | Modifikace | Náboj (X+) | LL m/z (X+) | LH m/z (X+) | HL m/z (X+) | HH m/z (X+) | INTER (%) | INTRA (%) | SD (%) |
|-------------|-------|---|------------------------------------|---------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------|--------|
| 55 | DSG | TNEKVELQELNDR - TNEKVELQELNDR | (101, 113) [A] - (101, 113) [B] | | 4 | 818,408 | 823,393 | 823,393 | 828,378 | 28 | 72 | 3 |
| 56 | DSS | SLYASSPGGVYATR - FANYIDKVR | (51, 64) [A] - (114, 122) [B] | | 3 | 897,797 | 902,450 | 903,447 | 908,100 | 26 | 74 | 1 |
| 57 | DSG | QQYESVAAKNLQEAEEWYK - QQYESVAAKNLQEAEEWYK | (274, 292) [A] - (274, 292) [B] | | 4 | 1181,558 | 1188,039 | 1188,039 | 1194,520 | 23 | 77 | 1 |
| 58 | EDC | ILLAELEQLKGGQK - LGDLYEEEMR | (130, 143) [A] - (146, 155) [B] | | 4 | 694,620 | 697,861 | 699,107 | 702,347 | 19 | 82 | 2 |
| 59 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFK - FANYIDKVR | (79, 97) [A] - (114, 122) [B] | | 4 | 808,919 | 812,408 | 814,402 | 817,892 | 17 | 83 | 1 |
| 60 | DSS | LQDEIQNMKEEMAR - TLLIKTVETR | (365, 378) [A] - (441, 450) [B] | | 4 | 762,154 | 765,644 | 767,389 | 770,879 | 17 | 83 | 0 |
| 60 | DSG | LQDEIQNMKEEMAR - TLLIKTVETR | (365, 378) [A] - (441, 450) [B] | | 4 | 751,643 | 755,132 | 756,877 | 760,367 | 19 | 81 | 5 |
| 61 | DSG | QQYESVAAKNLQEAEEWYK - SKFADLSEAAANR | (274, 292) [A] - (293, 304) [B] | | 4 | 930,197 | 934,435 | 936,678 | 940,915 | 14 | 86 | 0 |
| 61 | DSS | QQYESVAAKNLQEAEEWYK - SKFADLSEAAANR | (274, 292) [A] - (293, 304) [B] | | 4 | 940,709 | 944,946 | 947,190 | 951,427 | 12 | 88 | 0 |
| 62 | DSS | FANYIDKVR - FLEQQNKILLAELEQLKGGQK | (114, 122) [A] - (123, 143) [B] | | 5 | 738,811 | 744,594 | 741,603 | 747,386 | 12 | 88 | 3 |
| 62 | DSG | FANYIDKVR - FLEQQNKILLAELEQLKGGQK | (114, 122) [A] - (123, 143) [B] | | 5 | 730,402 | 736,185 | 733,193 | 738,976 | 14 | 86 | 0 |
| 63 | EDC | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - VELQELNDR | (79, 100) [A] - (105, 113) [B] | | 4 | 899,208 | 902,697 | 906,436 | 909,926 | 11 | 89 | 1 |
| 64 | DSG | TNEKVELQELNDR - FANYIDKVR | (101, 113) [A] - (114, 122) [B] | | 4 | 702,860 | 706,349 | 707,845 | 711,334 | 11 | 89 | 1 |
| 64 | DSS | TNEKVELQELNDR - FANYIDKVR | (101, 113) [A] - (114, 122) [B] | | 4 | 713,371 | 716,861 | 718,356 | 721,846 | 0 | 100 | 0 |
| 65 | DSS | KVESLQEEIAFLK - KVESLQEEIAFLK | (223, 236) [A] - (223, 236) [B] | | 5 | 692,997 | 696,586 | 696,586 | 700,176 | 9 | 91 | 1 |
| 66 | DSG | NLQEAEEWYKSK - NLQEAEEWYKSKFADLSEAAANR | (283, 294) [A] - (283, 304) [B] | | 5 | 844,604 | 850,785 | 847,994 | 854,175 | 9 | 91 | 4 |
| 67 | EDC | NLQEAEEWYK - NLQEAEEWYK | (283, 292) [A] - (283, 292) [B] | | 4 | 650,804 | 654,294 | 654,294 | 657,783 | 8 | 92 | 0 |
| 68 | DSG | KLLEGEESR - ETNLDLPLVDTHSKR | (402, 410) [A] - (425, 440) [B] | | 4 | 745,886 | 751,619 | 749,126 | 754,859 | 8 | 92 | 1 |
| 68 | DSS | KLLEGEESR - ETNLDLPLVDTHSKR | (402, 410) [A] - (425, 440) [B] | | 5 | 605,320 | 609,906 | 607,912 | 612,498 | 9 | 91 | 0 |
| 69 | DSS | NLQEAEEWYKSK - SKFADLSEAAANRNDALR | (283, 294) [A] - (293, 310) [B] | | 5 | 731,562 | 737,146 | 734,952 | 740,536 | 7 | 93 | 0 |
| 69 | DSG | NLQEAEEWYKSK - SKFADLSEAAANRNDALR | (283, 294) [A] - (293, 310) [B] | | 5 | 723,153 | 728,736 | 726,543 | 732,126 | 7 | 93 | 1 |
| 70 | DSG | NLQEAEEWYKSK - SKFADLSEAAANR | (283, 294) [A] - (293, 304) [B] | | 4 | 732,856 | 737,093 | 737,093 | 741,331 | 7 | 93 | 0 |
| 71 | DSS | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - TNEKVELQELNDR | (79, 100) [A] - (101, 113) [B] | | 4 | 1056,284 | 1061,269 | 1063,513 | 1068,498 | 6 | 94 | 0 |
| 71 | DSG | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - TNEKVELQELNDR | (79, 100) [A] - (101, 113) [B] | | 4 | 1045,773 | 1050,758 | 1053,001 | 1057,986 | 5 | 95 | 0 |
| 72 | DSS | KLLEGEESR - ISLPLPNFSSLNLR | (402, 410) [A] - (411, 424) [B] | | 4 | 692,885 | 697,621 | 696,126 | 700,862 | 5 | 95 | 0 |
| 73 | DSG | ETNLDLPLVDTHSKR - DGQVINETSQHDDLE | (425, 440) [A] - (451, 466) [B] | | 5 | 752,158 | 756,744 | 756,744 | 761,330 | 5 | 95 | 0 |
| 73 | DSS | ETNLDLPLVDTHSKR - DGQVINETSQHDDLE | (425, 440) [A] - (451, 466) [B] | | 5 | 760,567 | 765,153 | 765,153 | 769,740 | 5 | 95 | 0 |
| 73 | EDC | ETNLDLPLVDTHSKR - DGQVINETSQHDDLE | (425, 440) [A] - (451, 466) [B] | | 5 | 729,351 | 733,938 | 733,938 | 738,524 | 10 | 90 | 0 |
| 74 | DSG | ISLPLPNFSSLNLR - ETNLDLPLVDTHSKR | (411, 424) [A] - (425, 440) [B] | | 5 | 698,977 | 703,563 | 702,765 | 707,352 | 3 | 97 | 0 |
| 74 | DSS | ISLPLPNFSSLNLR - ETNLDLPLVDTHSKR | (411, 424) [A] - (425, 440) [B] | | 5 | 707,386 | 711,972 | 711,175 | 715,761 | 4 | 96 | 0 |
| 75 | DSS | ETNLDLPLVDTHSKR - TLLIKTVETR | (425, 440) [A] - (441, 450) [B] | | 4 | 784,687 | 788,177 | 790,420 | 793,910 | 3 | 97 | 0 |
| 75 | DSG | ETNLDLPLVDTHSKR - TLLIKTVETR | (425, 440) [A] - (441, 450) [B] | | 5 | 619,542 | 622,333 | 624,128 | 626,920 | 3 | 97 | 0 |
| 76 | DSS | TLLIKTVETR - DGQVINETSQHDDLE | (441, 450) [A] - (451, 466) [B] | | 4 | 787,651 | 793,384 | 791,140 | 796,873 | 2 | 98 | 0 |
| 76 | DSG | TLLIKTVETR - DGQVINETSQHDDLE | (441, 450) [A] - (451, 466) [B] | | 4 | 777,139 | 782,872 | 780,628 | 786,361 | 1 | 99 | 0 |
| 76 | EDC | TLLIKTVETR - DGQVINETSQHDDLE | (441, 450) [A] - (451, 466) [B] | | 5 | 599,106 | 603,693 | 601,898 | 606,484 | 9 | 91 | 0 |
| 77 | DSS | FANYIDKVR - LQDEIQNMKEEMAR | (114, 122) [A] - (365, 378) [B] | | 4 | 750,126 | 755,360 | 753,615 | 758,850 | - | - | - |
| 78 | DSS | FLEQQNKILLAELEQLKGGQK - QAKQESTEYRR | (123, 143) [A] - (311, 321) [B] | | 5 | 792,830 | 796,818 | 798,612 | 802,601 | - | - | - |
| 79 | DSG | KVESLQEEIAFLK - QVQSLTCEVDALKGTNESLER | (223, 235) [A] - (322, 342) [B] | Karbamidace (B.328) | 4 | 1002,264 | 1009,243 | 1006,252 | 1013,231 | - | - | - |
| 80 | DSG | LLQDSVDFSLADAINTEFKNTR - KVESLQEEIAFLK | (79, 100) [A] - (223, 235) [B] | | 4 | 1032,286 | 1036,274 | 1039,515 | 1043,503 | - | - | - |
| 81 | DSS | NLQEAEEWYKSK - TLLIKTVETR | (283, 294) [A] - (441, 450) [B] | | 4 | 709,634 | 713,124 | 713,871 | 717,361 | - | - | - |
| 82 | DSS | QVDQLTNDKAR - SKFADLSEAAANR | (160, 170) [A] - (293, 304) [B] | | 4 | 684,101 | 688,338 | 688,587 | 692,825 | - | - | - |
| 83 | DSS | SKFADLSEAAANR - LQDEIQNMKEEMAR | (293, 304) [A] - (365, 378) [B] | | 4 | 795,888 | 801,122 | 800,125 | 805,360 | - | - | - |