

Abstrakt

Strukturní proteomika ve spojení s hmotnostní spektrometrií je rychle se rozvíjející vědecké odvětví, které se zabývá charakterizací trojrozměrných struktur proteinů, ale také jejich dynamiky. Současné standardní postupy vyžadují, zvláště v případech, kdy jsou strukturní data získávána analýzou peptidů, získaných proteolytickým štěpením studované molekuly, velké množství navzájem oddělených procesních kroků.

Tato práce cílí na vývoj a přípravu proteolytických nosičů vhodných pro přímou analýzu za pomoci hmotnostního spektrometru s MALDI iontovým zdrojem a jejich využití v oblasti strukturní proteomiky. Tyto modifikované povrchy umožňují v rámci jedné aktivní pozice provést jak štěpení studovaného proteinu, tak i krystalizaci ionizační matrice a následnou hmotnostně-spektrometrickou analýzu. Technikou vhodnou pro modifikaci vodivých povrchů biologicky aktivními látkami se ukázala být měkká depozice iontů prováděná za atmosférického tlaku. Tato technika umožňuje pomocí elektrospreje modifikovat rovné, hladké a vodivé nosiče, tedy ty, které se využívají i v MALDI iontovém zdroji.

Vysoké množství aktivních pozic na jednom čipu umožňuje současně testovat velké množství vzorků. Nízké pracovní objemy aplikovaného vzorku nebo činidla zhášejí proteolytickou reakci přispívají k vysoké opakovatelnosti výsledných měření. Zmíněné parametry jsou velmi vhodné pro metody limitované proteolýzy. Použití těchto povrchů i pro analýzu produktů vodík deuteriové výměny se zdálo být v porovnání s přístrojovou náročností standardní hmotnostní detekce ve spojení s kapalinovou chromatografií velmi výhodné, avšak vysoká míra zpětné výměny deuterií vlivem vzdušní vlhkosti se ukázala být nepřekonatelnou překážkou. Nicméně, kromě limitované proteolýzy lze proteázou funkcionalizované povrchy využít i pro jiné strukturně proteomické aplikace, jako například lokalizace disulfidových vazeb či ověřování identity proteinu.

Pro zpracování velké množství naměřených spekter bylo nutné vyvinout a integrovat spolehlivé postupy pro automatické vyhodnocení a interpretaci dat. Vývoj těchto postupů a softwarových řešení byl nedílnou součástí uvedení proteolyticky aktivních povrchů, a nejen těchto, do praktického využití.

Klíčová slova:

Strukturní proteomika, hmotnostní spektrometrie, měkká depozice iontů za atmosférického tlaku, limitovaná proteolýza, vodík deuteriová výměna, MALDI, biologicky aktivní čip, imobilizace protein, datová analýza.