

Proteinová chemie a hmotnostní spektrometrie v biochemickém výzkumu

Petr Pompach

Disertační práce (2006)

Katedra Biochemie, Přírodovědecká Fakulta Univerzity Karlovy

Abstrakt

Hmotnostní spektrometrie se díky svému velmi rychlému rozvoji zařadila mezi oblíbené analytické metody nejen pro detekci malých molekul, ale i pro detekci makromolekul, jakými jsou například proteiny. V této disertační práci jsou shrnuty některé aplikace hmotnostní spektrometrie jednak pro nalezení a popsání jednotlivých proteinů v komplexních směsích, tak i aplikace pro řešení struktury proteinů a jejich postranslačních modifikací. V jednotlivých kapitolách jsou popsány poslední poznatky o analytických přístupech zahrnující separaci proteinů pomocí dvoudimenzionální elektroforézy, vysokoúčinnou separaci proteinů/peptidů na kolonách s obrácenou fází, dále potom sekvenace proteinů Edmanovým odbouráváním, atd. Jako příklad využití hmotnostní spektrometrie pro identifikaci proteinů je v této práci ukázána metoda pro nabohacení a následnou charakterizaci proteinů asociovaných s tzv. membránovými mikrodomény. Pro řešení struktury proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie se využívá její spojení s metodami proteinové chemie, konkrétně reakcí proteinů s tzv. zesíťovacími činidly. Délka raménka zesíťovacího činidla určuje poté vzdálenost modifikovaných aminokyselin. Informace o vzdálenostech se využívá k sestavení nebo zpřesnění stávající struktury proteinu. Toho lze uplatnit především u proteinů, které špatně nebo vůbec krystalují a jejich trojrozměrná struktura není známa. Jako příklad charakterizace postranslační modifikace proteinů je v této práci uvedena metoda pro detekci stavu disulfidových můstků enzymu beta N-acetylhexosaminidázy a dále potom identifikace a charakterizace jeho glykanových struktur. Jako součást práce jsou uvedeny publikace autora popisující výše zmíněné přístupy hmotnostní spektrometrie v biochemických aplikacích.