

Abstrakt

Metody výzkumu proteinů založené na hmotnostní spektrometrii přibývají v posledních letech na svém významu. Pro takzvaný bottom-up přístup je zásadní proteolytický krok, který určuje úspěšnost a relevanci identifikace a charakterizace proteinu, sekvenční pokrytí a ve vodík/deuteriové výměně spojené s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS) prostorové rozlišení. Běžně používané proteázy mají ale své limity. Z tohoto důvodu je snahou najít alternativy, které mají především jiné štěpné preference a aktivní profil. *AnPEP* proteáza (prolyl endoproteáza z *Aspergillus niger*) je výhodná v tom, že je možné ji získat komerčně ve velkém množství a vyznačuje se štěpením za prolinem, v blízkosti kterého mnohé proteázy neštěpí.

Tato práce se zabývá optimalizací štěpení *AnPEP* proteázou získanou z komerčního preparátu Gluten Rid with Tolerance G. Nejprve bylo provedeno štěpení *AnPEP* proteázou za různých podmínek na modelovém proteinu (bovinní karbonická anhydráza 2) a snahou bylo zjistit, jak se při změně podmínek (teploty, pH, koncentrace proteázy na nosiči nebo v roztoku) mění efektivita štěpení a štěpné preference této proteázy. Provedené experimenty ukázaly, že je *AnPEP* vhodný pro vodík/deuteriovou výměnu spojenou s hmotnostní spektrometrií v imobilizované formě i v roztoku. Naopak méně vhodný je z důvodu nespecifického a redundantního štěpení při vyšších teplotách (20-50 °C) pro metody výzkumu proteinů jako je proteomika, chemické síťení či rychlá fotochemická oxidace. Na rekombinantním fosforylovaném proteinu (translokáza 34 vnější mitochondriální membrány) byla ověřena aplikace této proteázy v analýze fosforylace.