

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Barbora Jirečková

VÝVOJ ALTERNATIVNÍCH PROTEOLYTICKÝCH POSTUPŮ PRO  
IDENTIFIKACI PROTEINU

Development of Alternative Proteolysis for Protein Identification

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Man, Ph.D.

Konzultant: Mgr. František Filandr

Praha 2020

## **Poděkování**

V první řadě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Petru Manovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Františku Filandrovi za cenné rady, ochotu komplexně vysvětlit danou problematiku a hlavně za jejich čas a trpělivost. Dále bych ráda poděkovala celému týmu Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace za vytvoření příjemné atmosféry při práci, především Pavle Vaňkové za její nekončící optimismus. V neposlední řadě děkuji Martinu Šefčíkovi a své rodině za psychickou podporu.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 8. června 2020.

## 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.

## Abstract

Methods of protein research based on mass spectrometry have become increasingly significant in the last few years. The proteolytic step is essential in a bottom-up approach, determining the success and relevance of identification and characterization of a protein and also the sequence coverage and spatial resolution of HDX-MS protocols. Conventionally used proteases however have their limitations and therefore efforts are being made to find alternatives that have, above all, different cleaving preferences and activity profiles. *An*PEP protease (*Aspergillus niger* prolyl endoprotease) has the advantages of both characteristic cleavage in the presence of proline (unlike many other proteases) and easy accessibility due to its commercial obtainability in large quantities.

This thesis examines the optimization of cleavage using *An*PEP protease obtained from commercially prepared Gluten Rid with Tolerase G. Firstly *An*PEP cleavage was tested on model protein (bovine carbonic anhydrase 2) under various conditions (temperature, pH, concentration of protease on a carrier or in solution). The objective was to find out how various conditions influence cleavage efficiency and preferences of this protease. It was discovered that *An*PEP protease is suitable for hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry in both immobilized and solution form. On the other hand, due to non-specific and redundant cleavage at higher temperatures (20-50 °C), it is less suitable for methods of protein research like proteomics, chemical cross-linking or fast photochemical oxidation. Using recombinant protein (translocase of outer mitochondrial membrane 34), it was discovered that *An*PEP is applicable in the analysis of protein phosphorylation.

# Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod	9
1.1 Proteázy	9
1.2 Význam proteáz při identifikaci a studiu struktury proteinů	12
1.2.1 Role proteázy v proteomice	12
1.2.1.1 Alternativní proteázy v proteomice	15
1.2.2 Role proteázy ve strukturní biologii	16
1.2.2.1 Alternativní proteázy v HDX-MS	19
1.3 Prolyl endoproteáza z <i>Aspergillus niger</i> ( <i>AnPEP</i> )	22
1.3.1 Celiakie a její alternativní terapie	25
2 Cíle práce	27
3 Experimentální část	28
3.1 Materiál	28
3.1.1 Přístroje a pomůcky	28
3.1.2 Chemikálie	29
3.1.3 Pufry a roztoky	30
3.1.4 Ostatní	30
3.2 Metody	31
3.2.1 Příprava roztoku <i>AnPEP</i> proteázy z tablety Gluten Rid with Tolerase G	31
3.2.2 Zjištění obsahu tablety Gluten Rid with Tolerase G	31
3.2.3 Vytvoření knihovny <i>AnPEP</i> :bCA2 v programu mMass	31
3.2.4 Imobilizace <i>AnPEP</i> proteázy a plnění kolony	32
3.2.5 Online štěpení bCA2 pomocí imobilizované <i>AnPEP</i> proteázy	32
3.2.5.1 Vliv kyseliny mravenčí	34
3.2.5.2 Vliv průtoku a ředění kolony	34
3.2.5.3 Vliv pH	35
3.2.5.4 Vliv teploty	35
3.2.6 Online štěpení fosforylovaného proteinu TOMM34 imobilizovanou <i>AnPEP</i> proteázou	36
3.2.7 Offline štěpení bCA2 pomocí <i>AnPEP</i> proteázy	38

3.2.8	Hmotnostně spektrometrická analýza.....	39
3.2.9	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného 40	
3.2.10	LC-MS/MS – štěpné preference <i>AnPEP</i> proteázy a peptidové mapy.....	42
3.2.10.1	Různé způsoby prohledání databázemi .....	42
4	Výsledky .....	43
4.1	Štěpení <i>AnPEP</i> proteázou za HDX-MS podmínek.....	43
4.2	Knihovna pro mMass.....	44
4.3	Obsah tablety Gluten Rid with Tolerase G .....	44
4.4	Trendy ve štěpení proteinu bCA2 imobilizovanou <i>AnPEP</i> proteázou za různých podmínek .....	46
4.4.1	Vliv kyseliny mravenčí.....	46
4.4.2	Vliv průtoku a denzity proteázy .....	47
4.4.3	Vliv pH.....	50
4.4.4	Vliv teploty při pH 2,3 .....	52
4.4.5	Vliv teploty při pH 5,0.....	53
4.5	Trendy ve štěpení proteinu bCA2 <i>AnPEP</i> proteázou v roztoku za různých podmínek .....	55
4.5.1	Štěpení v při 4 °C.....	56
4.5.2	Štěpení při 40 °C.....	57
4.6	Různé přístupy při prohledávání databázemi .....	58
4.7	Štěpné preference a peptidové mapy <i>AnPEP</i> proteázy .....	58
4.7.1	Protein bCA2.....	59
4.7.2	Protein TOMM34 – aplikace <i>AnPEP</i> proteázy při identifikaci fosforylovaných míst v proteinu.....	63
5	Diskuze.....	65
6	Závěr .....	71
7	Literatura .....	72
	Přílohy.....	77

## Seznam zkratek

<i>An</i> PEP	prolyl endoproteáza z <i>Aspergillus niger</i> ( <i>Aspergillus niger</i> prolyl endoprotease)
APS	peroxodisíran amonný (amonium persulfate)
bCA2	bovinní karbonická anhydráza 2 (bovine carbonic anhydrase 2)
CCA	kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)
FA	kyselina mravenčí (formic acid)
HDX-MS	vodík/deuteriová výměna v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry)
kDa	kilodalton
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spectrometry)
rNep	rekombinantní nepenthesin
SA	kyselina sinapová (sinapinic acid)
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulphate)
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v prostředí dodecylsíranu sodného
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)-ethan (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TOF	analyzátor doby letu (time of flight)
TOMM34	translokáza 34 vnější mitochondriální membrány (translocase of outer mitochondrial membrane 34)

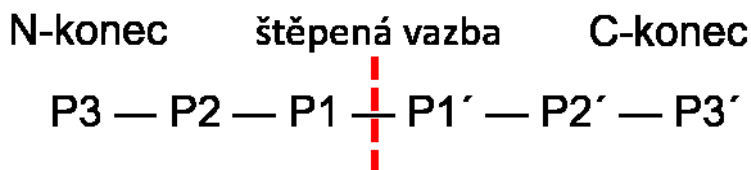


# 1 Úvod

## 1.1 Proteázy

Proteázy jsou enzymy, které katalyzují hydrolyzu peptidové vazby proteinů<sup>1</sup>. Vyskytují se u všech organismů, primárně zajišťují energetickou rovnováhu degradací proteinů jak vlastních, tak z potravy, ale kromě toho také hrají roli při regulaci buněčného cyklu, ovlivňují imunitní systém, účastní se signalizace a mají vliv na replikaci DNA a transkripci<sup>2</sup>. Infekční mikroorganismy využívají proteázy ke své replikaci nebo jako virulenci faktor. Například virus HIV potřebuje k maturaci nové virové částice aspartátovou proteázu HIV-1. Vývoj léčiv inhibujících HIV-1 proteázu umožnil zlepšení prognózy pacientů trpících onemocněním AIDS<sup>2</sup>. Proteolýza je přísně regulovaný proces a její deregulace může být taktéž příčinou mnoha závažných onemocnění<sup>3</sup>. Aby se zabránilo nechtěné degradaci proteinu, jsou proteolytické enzymy syntetizovány ve formě neaktivních prekurzorů nebo zymogenů<sup>4</sup>.

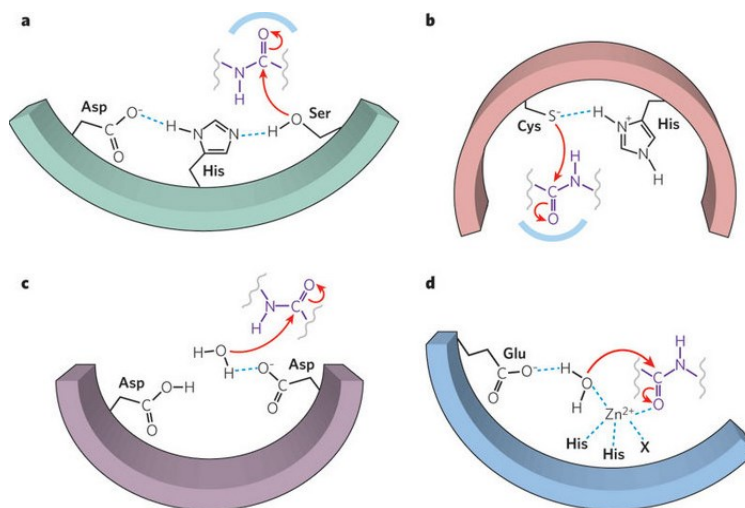
Proteázy rozdělujeme do dvou hlavních skupin na exopeptidázy a endopeptidázy, v závislosti na místě jejich působení. Exopeptidázy štěpí peptidové vazby blízko N- (aminopeptidázy) nebo C-konce substrátu (karboxypeptidázy), zatímco endopeptidázy štěpí uvnitř polypeptidového řetězce. Aktivní centrum proteáz je tvořeno vazebnými podmiesty a ta jsou na substrátu označována dle konvence uvedené na **Obr. 1**. Enzym štěpí substrát mezi aminokyselinami P1 a P1', které nejčastěji určují jeho specifitu, ale svou roli mohou hrát i aminokyseliny na dalších (P2, P3, atd.) místech.



*Obr. 1: Nomenklatura štěpení. P1-P3 místo je směrem k N-konci štěpené peptidové vazby (vlevo) a P1'-P3' směrem k C-konci (vpravo).*

Proteázy se dělí podle složení jejich aktivního místa na proteázy serinové, aspartátové, cysteinové a metaloproteázy.

**Serinové proteázy** jsou charakterizovány přítomností serinu v aktivním místě. Mohou být exopeptidázami, endopeptidázami i oligopeptidázami (štěpí pouze peptidy). Jejich katalytická triáda obsahuje serin (nukleofil), aspartát (elektrofil) a histidin (báze)<sup>5</sup>. Tyto tři aminokyseliny netvoří v sekvenci konzervovaný triplet, ale ve struktuře enzymu se dostávají do blízkého kontaktu, kde jsou stabilizovány pomocí vodíkových můstků. Proteolytická reakce je víceokrová. Serin z katalytické triády enzymu nukleofilně atakuje karbonylový uhlík peptidového substrátu. Vytvoří se první tetrahedrání intermediát, jehož vznik je podpořen přítomností histidinu v katalytické triádě, který přijme vodík serinu. Protonovaný histidin je stabilizován tvorbou vodíkové vazby s aspartátem. Oxoanion tetrahedráního intermediátu je stabilizován interakcí s NH skupinami hlavního řetězce enzymu. Tetrahedrání intermediát se rozpadne odstoupením N-koncového peptidu nebo aminokyseliny za pomoci protonovaného histidinu. To dá vznik acyl-enzymovému intermediátu. Protonace histidinu dále umožní nukleofilní atak acyl-enzymového intermediátu zprostředkovaný vodou a vytvoří se druhý tetrahedrání intermediát. Tento intermediát se rozpadá po odštěpení serinu ze substrátu a vytvoří se C-koncový peptid nebo aminokyselina (**Obr. 2**)<sup>6-8</sup>.



**Obr. 2:** Mechanismy proteolytických reakcí (a) serinových, (b) cysteinových, (c) aspartátových proteáz a (d) metaloproteáz<sup>8</sup>.

Mezi zástupce serinových proteáz patří například proteázy trypsin a chymotrypsin, které jsou sekretovány pankreatickou šťávou do tenkého střeva a napomáhají trávení proteinů přijatých z potravy<sup>1,9</sup>, elastáza<sup>7</sup> a GluC spolu s LysC<sup>9</sup>, které jsou vhodným doplněním trypsinu v proteomice a bude o nich zmínka později (kap. 1.2.1.1, str. 15). Serinové proteázy se také účastní procesu koagulace krve a jsou součástí kaskády zymogenů, které jsou postupně aktivovány. Příkladem může být trombin, jehož působením se fibrinogen přemění na fibrin a vznikne krevní sraženina. Deregulace tohoto pochodu může vést k trombóze nebo zvýšené krvácivosti<sup>3</sup>. Serinová proteáza plazmin reguluje produkci cytokinů. Je dále důležitá při fibrinolýze a přispívá hojení ran<sup>10</sup>.

**Aspartátové proteázy**, známé též jako kyselé proteázy (kyselé pH optimum), jsou endoproteázami. Ve svém aktivním místě mají kyselinu asparagovou (nenabitá forma) a aspartát (nabitá forma)<sup>5</sup> (**Obr. 2**, str. 10)<sup>11-13</sup>. Aspartátová proteáza pepsin s kyselým pH optimum štěpí v žaludku proteiny přijaté z potravy. Mezi aspartátové proteázy patří také renin, který je součástí systému renin-angiotenzin-aldosteron podílejícího se na regulaci krevního tlaku a hospodaření organismu se sodíkem a vodou<sup>3</sup>. Katepsin D se vyskytuje v lysozomech. Degraduje tam intracelulární proteiny a aktivuje a degraduje hormony<sup>14</sup>.

**Cysteinové proteázy** jsou charakteristické katalytickou dyádou, která obsahuje cystein a histidin (**Obr. 2**, str. 10). Obecně jsou cysteinové proteázy aktivní pouze v redukčním prostředí<sup>5</sup>. Mezi cysteinové proteázy patří například papain<sup>5</sup>, některé katepsiny<sup>15</sup> a proteáza ArgC<sup>9</sup>, která je vhodným doplněním trypsinu v proteomice a bude o ní zmínka později (kap. 1.2.1.1, str. 15). Zástupci jsou taktéž kaspázy, které se v organismu podílí na apoptóze. Jejich deregulace může způsobit selhání ledvin, rakovinu, cévní a autoimunitní onemocnění<sup>3,15</sup>.

**Metaloproteázy** mají ve svém aktivním místě dvojmocný kation kovu, nejčastěji Zn<sup>2+</sup> (méně často Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> nebo Cu<sup>2+</sup>), který aktivuje molekulu vody<sup>16</sup>. Většina metaloproteáz obsahuje motiv, kde se nachází His a Glu<sup>5</sup> (**Obr. 2**, str. 10)<sup>5,17,18</sup>. Metaloproteázy degradují všechny součásti extracelulární matrix, a tím ovlivňují mnoho důležitých procesů jako je růst buňky, její diference, migrace, apoptóza a interakce mezi buňkami. Mezi metaloproteázy také patří například bakteriální termolysin<sup>17</sup> nebo lidské pankreatické karboxypeptidázy<sup>16</sup>.

Proteázy AspN, LysN a LysargiNáza<sup>9</sup> mohou v proteomice díky svým vlastnostem doplnit trypsin. Budou podrobněji zmíněny v kap. 1.2.1.1, str. 15.

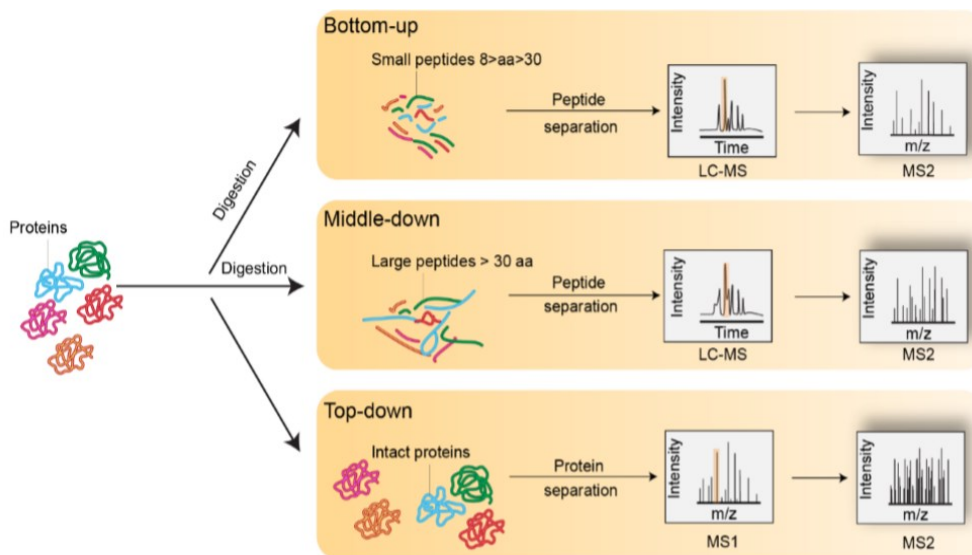
## 1.2 Význam proteáz při identifikaci a studiu struktury proteinů

Proteolýza se využívá v proteomické analýze ke studiu primární struktury proteinů a jejich posttranslačních modifikací, nebo ve strukturní biologii, kdy je zkoumána prostorová struktura proteinu, její dynamika či interakce s jinými molekulami. Každý z těchto přístupů využívá proteáz, jejichž volba je určována vlastnostmi proteázy, charakteristikou cílových proteinů, či pH, při kterém bude proteolýza probíhat<sup>19</sup>.

### 1.2.1 Role proteázy v proteomice

Proteomika je oblast výzkumu, která se zabývá studiem proteomu. Proteom můžeme definovat jako souhrn proteinů v buňce, nebo celém organismu, reprezentující konečný výsledek genové transkripce, translace a post/translačních modifikací proteinu v daném čase. Proteomický experiment začíná zpracováním buněčného lyzátu daného organismu pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). V závislosti na tom, jakou skupinu proteinů chceme identifikovat, volíme různé chromatografické či elektroforetické techniky<sup>20</sup>. Proteomika má tři hlavní experimentální přístupy – top-down, bottom-up a middle-down (**Obr. 3**, str. 13).

Top-down přístup je používán pro přímou charakterizaci intaktních proteinů bez enzymatického štěpení. Je vhodný při určování proteinových izoform a posttranslačních modifikací za využití fragmentačních metod jako je kolizně indukovaná disociace (CID), disociace elektronovým záchytem (ECD) a disociace elektronovým přenosem (ETD). V top-down přístupu jsou celé proteiny ionizovány elektrosprejem a následně analyzovány na základě jejich poměru m/z. Při analýze celých proteinů může být z důvodu velké velikosti molekul problém s frakcionací nebo ionizací a též s dostačující fragmentací proteinu v plynné fázi<sup>21</sup>.



**Obr. 3: Proteomické přístupy: bottom-up, middle-down a top-down<sup>22</sup>.** U bottom-up a middle-down přístupu je protein nejprve štěpen vhodnou proteázou, vzniklé peptidy jsou separovány chromatografií na obrácené fázi, ionizovány pomocí elektrospreje hmotnostního spektrometru a následně analyzovány. Přesná identifikace peptidů nebo intaktních proteinů a jejich posttranslačních modifikací je umožněna měřením fragmentačních spekter ( $MS^2$ ). Top-down přístup se od bottom-up a middle down liší absencí proteolytického kroku.

Při nejvíce využívané bottom-up analýze se protein podrobí enzymatickému štěpení specifickou proteázou, nejčastěji trypsinem. Vzniklé peptidy (8-30 aminokyselin<sup>22</sup>) jsou separovány chromatografií na obrácené fázi, ionizovány pomocí elektrospreje a následně analyzovány. Různé fragmentační techniky při MS analýze umožňují přesnou identifikaci peptidů a jejich posttranslačních modifikací. Aminokyselinová sekvence fragmentovaných peptidů je identifikována pomocí vyhledávacích algoritmů jako je MASCOT nebo PEAKS, kdy se porovnávají experimentálně zjištěné hmotnosti fragmentových iontů s teoretickými hmotnostními spektry spočtenými na základě proteinových databází<sup>20</sup>. Nevýhodou bottom-up přístupu je nemožnost identifikovat jednotlivé proteoformy<sup>23</sup> a často není dosaženo dostatečného sekvenčního pokrytí, což může být řešeno použitím alternativních proteáz<sup>24</sup>.

Middle-down přístup kombinuje výhody obou výše uvedených přístupů a umožňuje analýzu delších peptidových fragmentů (30 a více aminokyselin<sup>22</sup>), čímž se minimalizuje peptidová redundance mezi proteiny.

Delší peptidové fragmenty umožňují lepší sekvenční pokrytí, vypovídající náhled do posttranslačních modifikací<sup>21</sup> a jsou unikátnější než ty kratší, což minimalizuje vzájemnou záměnu peptidů pocházejících z různých proteinů<sup>20</sup>. K proteolýze se využívají jiné specifické proteázy než trypsin. Například pro analýzu silně bazických histonů se jako vhodné prokázaly Asp-N nebo Glu-C<sup>25</sup>.

V proteomice (bottom-up a middle-down) je žádoucí co nejvyšší pokrytí proteinové sekvence a co nejmenší komplexita vzniklé směsi. Dále je potřeba, aby proteáza štěpila specificky, predikovatelně a reprodukovatelně. Predikovatelnost štěpení zjednodušuje vyhledávání v databázích a následnou identifikaci peptidové sekvence<sup>26</sup>. Štěpení proteinů na peptidy má na rozdíl od analýzy celých proteinů několik dalších výhod, jmenovitě efektivnější separaci pomocí LC a přítomnost menšího počtu nábojových stavů a izotopových signálů zjednodušujících hmotnostní spektra a zlepšujících citlivost metody<sup>19</sup>. Zároveň nízká molekulová hmotnost vzniklých peptidů dává proteomice založené na hmotnostní spektrometrii možnost analyzovat proteiny o téměř neomezené velikosti.

Mezi proteázami má dominantní postavení v proteomice trypsin<sup>20</sup>. Tato serinová proteáza štěpí specificky na C-konci proteinu/peptidu za Lys a Arg, ale když je v pozici P1' prolin, trypsin danou vazbu neštěpí<sup>19,27</sup>. Štěpením za Lys a Arg vytváří trypsin peptidy s bazickými centry (centra protonace v ionizaci) na obou koncích, což zjednodušuje fragmentaci a identifikaci pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Výhodou trypsinu je snadná dostupnost, cena a reprodukovatelnost štěpení. Trypsin má ale i několik nevýhod. Při štěpení především bazických proteinů trypsinem vznikají příliš krátké peptidy (< 6 aminokyselin), které jsou obtížně detekovatelné pomocí MS a zároveň mohou vznikat příliš dlouhé peptidy (v důsledku opomenutých štěpení – tzv. missed cleavage), což komplikuje vyhledávání v proteinových databázích. Opomenutá místa štěpení vznikají přítomností negativně nabitých aminokyselin (Asp a Glu) a fosforylovaného Ser a Thr. Dále trypsin vykazuje menší efektivitu štěpení za Lys než Arg, což zhoršuje přesnost a citlivost ve kvantifikaci peptidů. Peptidy pocházející z C-konce proteinu vzniklé štěpením trypsinem mohou být také kvůli absenci bazické aminokyseliny na C-konci hůře identifikovatelné pomocí MS/MS z důvodu obtížnější ionizace<sup>20</sup>.

V důsledku těchto nevýhod je za pomoci trypsinu možné charakterizovat pouze část proteomu, protože není možné získat dobré sekvenční pokrytí všech proteinů. Nedostatky trypsinu je možné eliminovat multi-enzymovým štěpením za využití alternativních proteáz<sup>20,28,29</sup>.

### 1.2.1.1 Alternativní proteázy v proteomice

Paralelní nebo následné použití více proteáz v proteomickém experimentu může zvýšit sekvenční pokrytí a množství identifikovaných peptidů. Proteázy chymotrypsin, LysC, LysN, AspN, GluC and ArgC mají odlišnou specifitu a vytváří různé peptidy (**Tab. 1**)<sup>9</sup>.

**Tab. 1: Přehled alternativních proteáz a jejich specifit<sup>9</sup>.** V závorce jsou uvedeny méně časté štěpy. Vysvětlivky: \*oxidovaný cystein, \*\* hydrogenuhličitan amonný a octan amonný – preferenčně štěpí za E, fosfátový pufr – štěpí za D a E<sup>30</sup>.

Proteáza	Skupina proteáz	Štěpné preference
ArgC	cysteinová	C-konec - R, (K)
AspN	metaloproteáza	N-konec - D, (E, K, C*)
chymotrypsin	serinová	C-konec - F, Y, L, W a M
GluC	serinová	C-konec - D, E**
LysargiNáza	metaloproteáza	N-konec - R, K
LysC	serinová	C-konec - K
LysN	metaloproteáza	N-konec - K (A, S a R)

Současným předmětem výzkumu je hledání nových proteáz s odlišnými preferencemi štěpení. Při pohledu na **Tab. 1** zjistíme, že žádná z alternativních proteáz neštěpí za prolinem. Důvodem je jeho unikátní struktura, která při zapojení do peptidové vazby dává vznik terciárnímu amidu. V posledních letech byly popsány proteázy, které jsou schopné tuto mezeru vyplnit. Neprosin je prolylová endoproteáza, která se ukázala jako nový vhodný nástroj pro middle-down proteomiku při analýze silně bazických histonů. Vzhledem k tomu, že štěpí za prolinem, který není u histonů obvykle modifikovaný a tvoří delší peptidy, umožňuje lepší charakterizaci posttranslačních modifikací. Neprosin je možné izolovat z rostlin rodu *Nepenthes* nebo rekombinantně exprimovat v *E. coli*. Oba z těchto přístupů neposkytují neprosin v dostatečném množství<sup>31</sup>.

Proto získává význam další objevená prolyl endoproteáza z *Aspergillus niger*<sup>32,33</sup>, která je lépe dostupná (podrobněji v kap. 1.3, str. 22).

Alternativní proteázy mohou rovněž pomoci při analýze některých posttranslačních modifikací. Například místa fosforylace (Ser, Thr nebo Tyr) jsou na proteinech obtížně identifikovatelná vzhledem k tomu, že mnoho proteáz má svá zásahová místa v blízkosti negativně nabitého fosfátu (bioinformatická analýza, nepublikovaná data z laboratoře), který je důvodem pro vznik opomenutých míst štěpení. Analýza peptidů generovaných různými proteázami, štěpícími dále (4-5 aminokyselin) od negativně nabitého fosfátu, může ulehčit jejich identifikaci<sup>20</sup>. Bylo popsáno, že při paralelním štěpení trypsinem, LysN a LysC se zvýšil počet identifikovaných míst fosforylace oproti štěpení pouze trypsinem<sup>34</sup>.

## 1.2.2 Role proteázy ve strukturní biologii

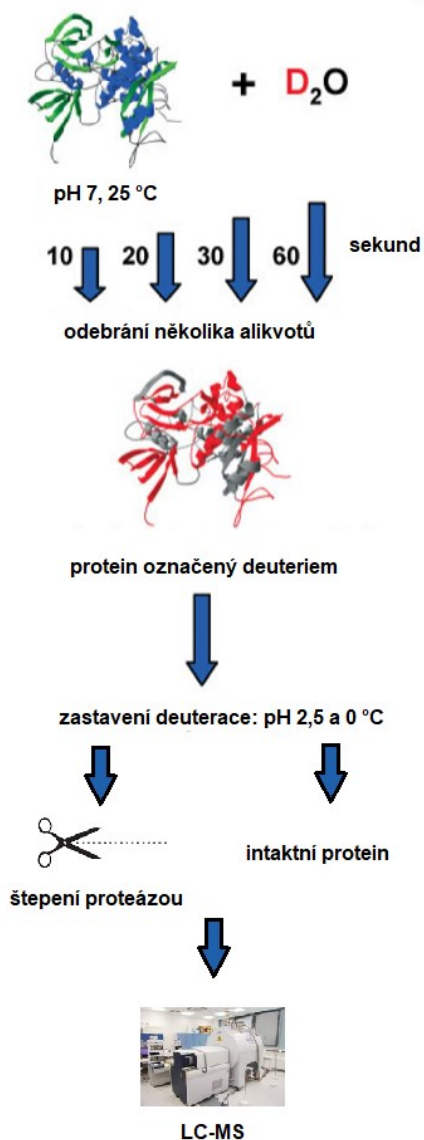
Abychom mohli plně porozumět úloze proteinů v organismech, je důležité vědět, jak je jejich struktura spjata s funkcí. To nám umožňují stále se rozvíjející biofyzikální metody poskytující informaci o konformaci a dynamice proteinu. Těmito metodami se zabývá oblast strukturní biologie a patří mezi ně například metody založené na hmotnostní spektrometrii jako je chemické sítění<sup>35</sup>, rychlá fotochemická oxidace<sup>36</sup> a vodík/deuteriová výměna<sup>37</sup>.

Vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS) nám může podat cennou informaci o struktuře proteinu a jejích změnách způsobených vazbou různých molekul nebo podmínkami prostředí. HDX-MS nám může dále poskytnout informace o průběhu sbalování a rozbalování proteinů, lokalizaci a vlastnostech vazebných míst, disociačních konstantách a veličinách vypovídajících o stabilitě proteinu za různých podmínek. Vzhledem k tomu, že HDX-MS zkoumá konformaci a dynamiku proteinu v roztoku, je vhodná pro studium proteinů, které neposkytují krystal. Umožňuje také analyzovat proteiny, se kterými může být manipulováno pouze za nízkých koncentrací (0,1  $\mu\text{M}$ ). Také je možné analyzovat těžko purifikovatelné proteiny<sup>38,39</sup> nebo proteiny ve směsi s nerozpustnými složkami<sup>40</sup>.

Princip HDX-MS je založen na sledování rychlosti výměny amidových vodíků peptidové páteře za deuteria z rozpouštědla. Všechny aminokyseliny kromě prolinu obsahují amidový vodík, a tak je možné deuteriovou výměnu monitorovat po celé délce polypeptidu.



Vodíky na funkčních skupinách postranních řetězců aminokyselin také deuterium vyměňují, ale rychlost reakce je zde mnohonásobně vyšší než na peptidové páteři a je téměř neměřitelná<sup>39</sup>. Změnu deuterace v závislosti na lokální struktuře můžeme pozorovat



**Obr. 4: Průběh HDX-MS experimentu při kontinuálním značení. (převzato a upraveno z ref.<sup>44</sup>)**

Pro zjištění míst s odlišnou mírou deuterace je nutné využít proteolytické štěpení (nejčastěji pepsinem) před MS analýzou<sup>42,43</sup>. Při znalosti umístění aminokyselin proteinu z jeho krystalové struktury pak můžeme zdůvodnit menší/větší míru deuterace peptidu<sup>38</sup>.

HDX-MS experiment se nejčastěji provádí formou kontinuálního značení (**Obr. 4**)<sup>44</sup>.

především díky tomu, že amidové vodíky v proteinu nevyměňují deuterium stejnou měrou a rychlost výměny je ovlivněna strukturou proteinu. Vodíky nejlépe přístupné rozpouštědлу, jako jsou například smyčky spojující alfa-helixy, jsou vyměňovány za deuteria mnohem rychleji než vodíky umístěné hluboko uvnitř struktury proteinu. Pomaleji se vyměňují také vodíky v alfa-helixu a beta-skládaném listu, protože se podílejí na tvorbě vodíkových můstků stabilizujících tyto sekundární struktury<sup>39,41</sup>. Ve chvíli, kdy dojde ke změně přístupnosti určité oblasti proteinu rozpouštědлу nebo ke změně sítě vodíkových vazeb, zaznamenáme jinou rychlost výměny amidových vodíků v dané oblasti za deuteria z roztoku<sup>38</sup>. Závislost rychlosti výměny amidových vodíků na různých podmínkách sledujeme pomocí hmotnostního spektrometru, který je schopen, díky rozdílné hmotnosti deuteria a vodíku, odlišit signál deuterovaného a nedeuterovaného proteinu<sup>37</sup> a určit průměrnou míru deuterace proteinu nebo peptidu. Měřením hmotnosti celého intaktního proteinu získáme pouze globální informaci o deuteraci.

Vzorek proteinu je při laboratorní teplotě rozpuštěn ve vodném pufru zvoleného pH (např. 7,4). Poté se roztok proteinu ředí deuterovaným pufr<sup>45,41</sup>. Po různých časových úsecích v rozmezí vteřin až hodin odebíráme z reakční směsi vzorky. Výměna je zastavena úpravou pH na 2,3 a rapidním snížením teploty, případně zmražením v kapalném dusíku<sup>39</sup>. Tyto podmínky zajistí zachování deuteriové značky pro analýzu tím, že se sníží rychlost výměny přibližně o pět řádů<sup>39,43</sup>. Pomocí hmotnostního spektrometru pak měříme molekulovou hmotnost celého proteinu<sup>37</sup>, nebo peptidů vzniklých proteolytickým štěpením<sup>42,43</sup>. Štěpení se musí provádět za podmínek minimální výměny (pH 2,3 a nízká teplota), abychom zabránili ztrátě deuteria<sup>39,45</sup>.

V HDX-MS se proto využívá nespecifických proteáz, nejčastěji pepsinu. Pepsin je mnohem méně specifický než např. trypsin a štěpí preferenčně v pozici P1 za hydrofobními aminokyselinami jako je fenylalanin a leucin<sup>46,47</sup>. Pro HDX-MS je vhodný především proto, že má kyselé pH optimum. U pepsinu se bohužel nedá plně predikovat místo štěpení z aminokyselinové sekvence<sup>44</sup>. Na druhou stranu, tyto proteázy vytváří překrývající se peptidy po celé proteinové sekvenci (tzv. redundanci), které napomáhají úplnému pokrytí sekvence proteinu a zvyšují prostorové rozlišení výsledné analýzy míry deuterace. V některých případech je ale štěpení pepsinem neefektivní<sup>48</sup>. To může vést ke vzniku příliš dlouhých, nebo naopak krátkých peptidů, nebo je nutné použít vyšší koncentrace enzymu<sup>49</sup>. Optimální délka peptidů pro HDX-MS je 5-10 aminokyselin<sup>44</sup>. Nedostatky pepsinu může eliminovat použití alternativních proteáz nebo jejich kombinací. Pro HDX - MS již byly například použity plasmepsin 2<sup>50</sup>, aspergillopepsin (proteáza XIII)<sup>51,52</sup>, rhizopuspepsin (proteáza XVIII)<sup>53</sup>, tekutina z láčkovky s proteolytickou aktivitou<sup>49</sup> a v ní obsažené nepenthesin 1<sup>54,55</sup> (Nep-1) a nepenthesin 2<sup>56</sup> (Nep-2). V neposlední řadě byly představeny specifičtější proteázy jako je neprosin<sup>31</sup> a AnPEP<sup>48</sup> (kap. 1.3, str. 22).

Pro usnadnění zpracování dat z HDX-MS experimentů je mimo jiné důležitá i reprodukovatelnost štěpení proteázou (opakovaná tvorba stejných peptidů). Pro dosažení reprodukovatelnosti je nutné dodržet stálé pH a složení reakční směsi, dobu enzymatického štěpení a poměr enzym:substrát<sup>57</sup>. Reprodukovatelnost štěpení může být dále zvýšena imobilizací proteázy na kolonu. Zkrátí se tím potřebný čas štěpení, zvýší se stabilita proteázy, její efektivita štěpení a zamezí se autolýze<sup>58</sup>.

### 1.2.2.1 Alternativní proteázy v HDX-MS

Využití alternativních proteáz v HDX bylo popsáno již před 40 lety. Rosa a Richards tehdy v experimentech použili dvě proteázy současně. Sledovali, jak ovlivní přítomnost S - proteinu konformaci S-peptidu (součásti ribonukleázy). Paralelní štěpení deuterovaného S-peptidu imobilizovaným prasečím pepsinem a kyselou proteázou pocházející z *Rhizopus chinensis*, poskytlo detailnější informace o změně konformace. Každá z těchto dvou proteáz měla odlišné štěpné preference a tvořila tak různé peptidy<sup>42</sup>.

Až do 90. let 20. století, kdy byla míra deuterace poprvé analyzována pomocí hmotnostního spektrometru<sup>43</sup>, se používala jiná instrumentace (např. nukleární magnetická rezonance<sup>59</sup>, scintilační detektory<sup>42</sup>). O 10 let později byly pro HDX-MS experimenty použity paralelně tři proteázy. Kombinací aspergillopepsinu (proteáza XIII), rhizopuspepsinu (proteáza XVIII) a prasečího pepsinu bylo v porovnání se samotným prasečím pepsinem dosaženo lepšího prostorového rozlišení. Díky tomu bylo možné lépe specifikovat deuterované oblasti modelového proteinu (penicilin vázající protein X - PBP-2X\*)<sup>60</sup>. Později bylo potvrzeno, že jsou aspergillopepsin (proteáza XIII) a rhizopuspepsin (proteáza XVIII) komplementární k pepsinu a navíc preferují štěpení i za bazickými aminokyselinami<sup>51,53</sup>.

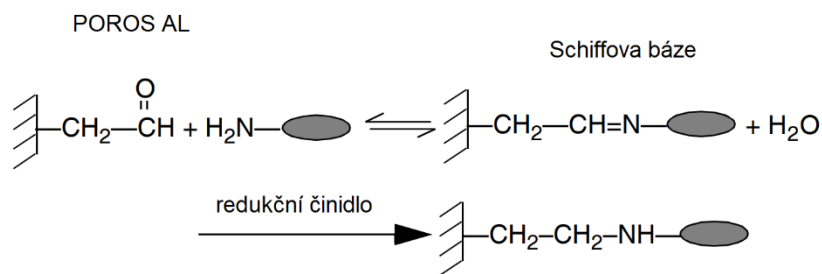
Přírodní extrakt rhizopuspepsinu nebylo možné získat v dostatečném výtěžku a čistotě a zároveň štěpení nevykazovalo příliš vysokou efektivitu. Řešením byla jeho rekombinantní produkce, která poskytla vysoký výtěžek. Následně byl rhizopuspepsin imobilizován a byly sledovány štěpné preference za použití modelového substrátu apomyoglobinu. Imobilizovaný rekombinantní rhizopuspepsin měl podobné štěpné preference jako aspergillopepsin, avšak vykazoval vyšší efektivitu štěpení<sup>53</sup>. Aspergillopepsin (proteáza XIII) má výhodu v tom, že je možné ho získat komerčně ve velkém množství, štěpí i za bazickými aminokyselinami (Lys, Arg, His)<sup>52</sup> a v některých případech se prokázalo štěpení za prolinem. Kombinace aspergillopepsinu a pepsinu byla využita například při studiu závislosti interakce apomyoglobinu s lipidovou dvojvrstvou<sup>61</sup>.

Plasmepsin 2 prokázal za HDX-MS podmínek nízkou, ale reprodukovatelnou aktivitu bez výrazné substrátové specifity<sup>50</sup>.

Pepsiny A1 a A2 (izoenzymy) z antarktické ryby z čeledi ledovkovitých (*Trematomus bernacchii*) byly pro HDX-MS zajímavé především proto, že pochází z organismu adaptovaného na nízké teploty (až -1,9 °C). Tyto izoenzymy byly exprimovány v *E. coli*. Po štěpení kreatin fosfokinázy byly porovnávány peptidy generované těmito dvěma izoenzymy s peptidy pocházejícími z prasečího pepsinu. Štěpné preference izoenzymu A1 a A2 byly podobné preferencím pepsinu a všechny studované enzymy upřednostňovaly štěpení za hydrofobní aminokyselinami. Byly pozorovány drobné odlišnosti ve štěpných preferencích (His, Met, Lys a Thr) mezi studovanými enzymy, avšak vzhledem k příliš malé populaci peptidů v těchto experimentech nebylo možné vytvořit definitivní závěry<sup>62</sup>. V publikaci zaměřené na využití pepsinu z žaludku úhoře z rýžových polí (*Monopterus albus*) podrobili fosforylázu b třem separátním proteolytickým štěpením. Proteázy prasečí pepsin, aspergillopepsin a pepsin z žaludku úhoře z rýžových polí (*Monopterus albus*) tolerovaly kyselé pH, nutné pro HDX-MS experimenty. Tyto proteázy vykazovaly nízkou specifitu jak v P1, tak v P1' pozici. Avšak pepsin z *Monopterus albus* štěpil v porovnání s ostatními proteázami s vyšší frekvencí za Arg, Asn a Gly. Vzhledem k tomu, že prasečí pepsin, aspergillopepsin a pepsin z *Monopterus albus* produkují odlišné peptidy, zvýší jejich paralelní použití pokrytí sekvence proteinu a prostorové rozlišení HDX-MS dat<sup>57</sup>.

Aminokyselinové preference proteáz využitelných pro HDX-MS rozšířilo studium extraktu z láčky *Nepenthes gracilis* vykazujícího proteolytickou aktivitu. Byla to první studie, která prezentovala použití rostlinných proteáz pro HDX-MS. Dominantní složku tohoto extraktu představují aspartátové proteázy nepenthesiny (Nep-1 a Nep-2), které jsou za nízké teploty a pH schopné štěpit široké spektrum substrátů s 1400× vyšší efektivitou než pepsin<sup>49</sup>. Nepenthesiny se ukázaly jako stabilní v širokém rozsahu pH a teplot<sup>54,55</sup>. Tyto aspartátové proteázy kopírují štěpné preference pepsinu, navíc ukazují silnou preferenci štěpení za bazickými aminokyselinami (histidin, lysin a arginin) a v případě šťávy z láčky i za prolinem. Kromě nepenthesinů se v láčkové tekutině totiž nachází i neprosin<sup>63</sup>, pro který byla popsána silná selektivita pro štěpení za prolinem a alaninem. Tato prolylová endoproteáza může sloužit jako selektivní náhrada v HDX-MS běžně používaných aspartátových proteáz jako je pepsin<sup>31</sup>.

Tekutina z láčkovky není praktickým zdrojem proteolytické aktivity. Zároveň jsou láčkovky omezeně dostupné a v jejich extraktu se nachází malé množství proteáz. Jako vhodné řešení se ukázala heterologní rekombinantní exprese, při které se podařilo produkovat velké množství Nep-1. Rekombinantní Nep-1 (rNep-1) sdílí s přírodním izolátem vlastnosti jako je citlivost vůči denaturantům a redukčním činidlům a má taktéž maximální aktivitu okolo pH 2,5. Denaturační činidla mohou negativně ovlivnit štěpení tím, že sníží aktivitu proteázy, rozpustnost substrátu nebo míru zachycení vzniklých peptidů na chromatografické koloně. Rekombinantní Nep-1 byl imobilizován na aldehydem aktivovaný nosič a bylo zjištěno, že imobilizací se citlivost vůči již zmíněným činidlům eliminuje a také se zvyšuje efektivita štěpení<sup>54,55</sup>. **Obr. 5** ukazuje mechanismus, pomocí kterého byl rNep-1 imobilizován<sup>64</sup>.

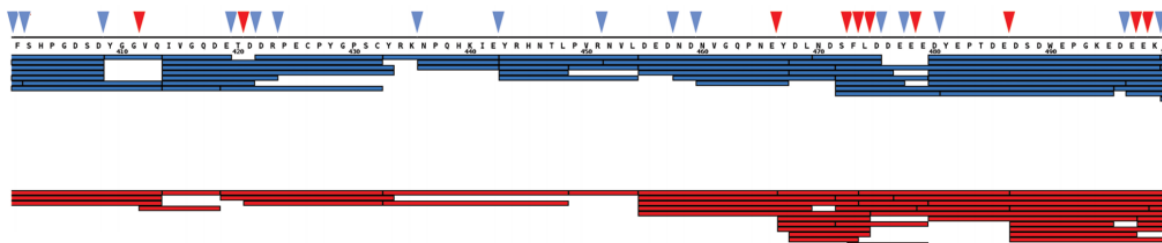


**Obr. 5: Mechanismus imobilizace rNep-1 na nosič (převzato a upraveno z ref.<sup>64</sup>). Aldehydová skupina nosiče selektivně reaguje s aminoskupinou enzymu za tvorby Schiffovy báze, která je následně redukována za vzniku vysoce stabilní kovalentní vazby.**

Oproti přírodnímu izolátu vykazuje r-Nep-1 nižší teplotní stabilitu, pravděpodobně kvůli chybějící N-glykosylaci. Rekombinantní Nep-1 má jiné štěpné preference a produkuje odlišné a kratší peptidy než pepsin<sup>54</sup>.

Ve snaze o kompletní rekonstituci proteolytické aktivity tekutiny z láček se Yang et. al rozhodli produkovat také rNep-2 a zjistit, jestli doplňuje štěpné preference rNep-1 a eliminuje jeho nedostatky. Tyto dvě proteázy mají společné vlastnosti jako je rychlé štěpení za nízké teploty a pH (kompatibilní s HDX-MS) a širokou specifitu, s tím že rNep-2 ještě více štěpí za tryptofanem. Rekombinantní Nep-2 má oproti rNep-1 výhodu ve výrazně vyšší odolnosti vůči působení chemických denaturantů a redukčních činidel. Díky zvýšené

stabilitě, širší specifitě a substrátové selektivitě blízké přírodnímu extraktu z láčkovky předčí rNep-2 svými vlastnostmi rNep-1<sup>56</sup>. Vzhledem k tomu, že je rekombinantní forma enzymu praktičtějším zdrojem proteolytické aktivity, je rNep-2 doposud nejschůdnější variantou pro HDX-MS aplikace. **Obr. 6** ukazuje rozdílnost ve štěpných preferencích rNep-2 a pepsinu<sup>56</sup>. Vyplývá z něj, že může rNep-2 v HDX-MS experimentech nahradit nebo doplnit pepsin.



**Obr. 6:** Peptidová mapa Aprataxinu and PNKP-like faktoru po štěpení rNep-2 (modře) a pepsinem (červeně). Modré trojúhelníky ukazují štěpná místa charakteristická pro rNep-2 a červené pro pepsin. Štěpení bylo provedeno při pH 2,5 a 10 °C a ukazuje odlišné štěpné preference rNep-2 a pepsinu (převzato a upraveno z ref.<sup>56</sup>).

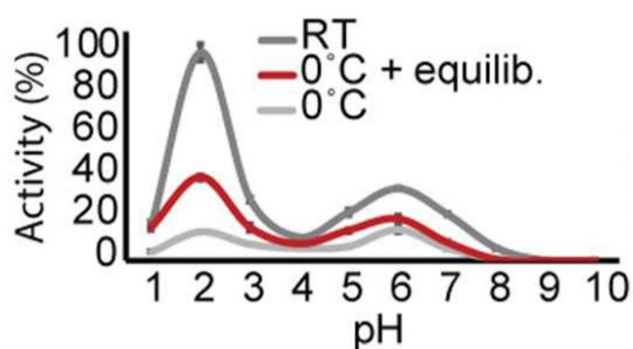
### 1.3 Prolyl endoproteáza z *Aspergillus niger* (AnPEP)

AnPEP (**Obr. 7**) patří mezi serinové proteázy rodiny S28<sup>65,66</sup> a má vlastnosti, které jí dávají potenciál pro využití při strukturní analýze a identifikaci proteinů<sup>32,32,48</sup>, při výrobě piva<sup>67–69</sup> a terapii celiakie<sup>65,70</sup>.

1	MRSFSVVAAASLALS <del>WASLAQAAR</del> PRLV <del>PKPISR</del> PASSKSAATTGEAYFEQLLDHHNPEK	60
61	GTFSQRYWWSTEYWGPGSPVVLFPNGEVSADGYEGYLTNDTLTGVYAQEIQGAVILIEH	120
121	RYWGDSSPYEVLNAETLQYLTLQDQSILDMTYFAETVKLQFDNSSRSNAQNAPWVMVGGSY	180
181	SGALTAWTESIAPGTFWAYHATSAPVEAIDFWQYFYPIQQGMAQNCSDKVSLVAEYVDK	240
241	IGKNGTAKEQQELKELFGLGAVEHYDDFAAVLPNGPYLWQDNDNFVTGYSSFFQFCDAVEG	300
301	VEAGAAVTPGPEGVGLKALANYANWFNSTILPNYCASYGYWTDEWSVACFDSYNASSPI	360
361	FTDTSVGNPVDRQWEWFLCNEPFFWWQDGAPEGTSTIVPRLVLSASYWQRQCPLYFPEVNG	420
421	YTYGSARGKNSATVNSWTGGWDMTRNTTRLIWTNGQYDPWRDSGVSSTFRPGGPLVSTAN	480
481	EPVQIIPGGFHCSDLYMEDYYANEGVRKVVNDNEVKQIKEWVEEYVA	526

**Obr. 7: Sekvence AnPEPu.** Oranžově je na N-konci označen signální peptid. Rezidua serin, glutamát a histidin (179, 458 a 491) představují aktivní centrum této serinové proteázy. Sekvence pochází z UniProt databáze, přístupový kód G3YH60.

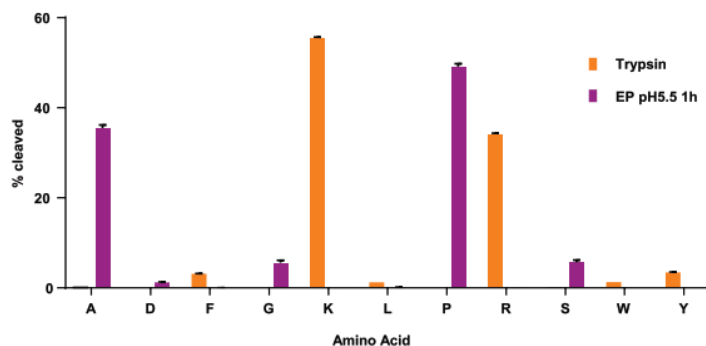
Tato proteáza pochází z vláknité plísně *Aspergillus niger* (kropidlák černý) a je dnes dostupná v komerčních preparátech Brewers Clarex® nebo Swanson Gluten Rid with Tolerase G. Brewers Clarex® se využívá ke stabilizaci piva a Swanson Gluten Rid with Tolerase G jako doplněk stravy pro celiaky. AnPEP je specifická proteáza štěpící preferenčně na C-konci peptidů za prolinem a alaninem a minoritně za glycinem, leucinem, argininem, serinem a tyrosinem<sup>32</sup>. Zůstává aktivní při širokém rozsahu teplot a pH. AnPEP se vyznačuje neobvyklým dvojitým pH optimem (**Obr. 8**) o hodnotách 2-2,5 a 4-5,5<sup>32,33,48,65</sup>.



**Obr. 8: Dvojité pH optimum AnPEP proteázy<sup>48</sup>.** Aktivita byla stanovena pomocí fluorescenčně značeného kaseinu při laboratorní teplotě, 0 °C bez ekvilibrace a s 10min ekvilibrací při laboratorní teplotě. Taková závislost aktivity na pH není pro proteázy obvyklá.

Toho je možné využít při vodík/deuteriové výměně, kdy se enzymatické štěpení provádí za pH 2,3 a snížené teploty. Tsiatsiani et. al. studovali použitelnost AnPEPu v HDX-MS experimentech. Za použití substrátů hemoglobinu a IgG4 generoval AnPEP v porovnání s pepsinem rozdílné peptidy s kratšími sekvencemi. Kombinace AnPEPu a pepsinu by mohla poskytnout detailnější pohled na strukturu proteinů, obzvláště těch obsahujících na prolin bohaté regiony<sup>48</sup>. AnPEP má mimo jiné potenciál pro využití v bottom-up proteomice. Van der Laarse et. al. porovnávali digesci HeLa lyzátů AnPEPem za pH 2 a 5,5 s digescí trypsinem za pH 8,5. AnPEP poskytl peptidy, které nebyly pozorovány při štěpení trypsinem. AnPEP neštěpil ve chvíli, kdy byl v pozici P1' prolin a také neštěpil za

kladně nabitými aminokyselinami, když byl v pozici P3 nebo P3' prolin. Specifita *AnPEP* se měnila v závislosti na pH. Se zvyšujícím se pH se příspěvek štěpení za alaninem a prolinem snížil, zatímco za negativně nabitým aspartátem a glutamátem došlo k častějšímu štěpení. Vzhledem k tomu, že má *AnPEP* jiný aktivní profil a specifitu než trypsin (**Obr. 9**), může být vhodným adeptem pro jeho doplnění v proteomických experimentech<sup>32,33</sup>.



**Obr. 9:** Štěpné preference *AnPEP* proteázy v porovnání s trypsinem (pozice P1)<sup>32</sup>. Štěpení bylo provedeno na HeLa lyzátu. *AnPEP* byl inkubován 1 h při 37 °C a pH 5,5 a trypsin přes noc při 37 °C a pH 8,5. *AnPEP* má odlišný specifitní profil a může tak představovat alternativu trypsinu v bottom-up proteomice.

*AnPEP* má také využití v pivovarnictví. Při výrobě piva je většina proteinů z obilí odstraněna během vaření a chlazení mladiny, ale část proteinu v pivu zůstává. Jedná se konkrétně o hydrofobní hordeinovou frakci sladu, která asociací s polyfenoly (ze sladu nebo chmelu) vytvoří nerozpustné agregáty. Jejich utvořením vznikne zákal. Aby se zamezilo jeho vzniku, přidává se do piva polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) nebo se využije silikagelu, avšak tímto způsobem se neodstraní všechny (na prolin bohaté) peptidy z lepku. Navíc PVPP snižuje antioxidační potenciál piva. Proto se v pivovarnictví využívá přípravek Brewers Clarex®, ve kterém je obsažena *AnPEP* proteáza. *AnPEP* má pH optimum 4,5, což souhlasí s pH, při kterém probíhá fermentační fáze výroby piva. Přidáním *AnPEP* během fermentace se efektivně zabráňuje tvorbě zákalu (koloidních částic) tím, že tato proteáza hydrolyzuje na prolin bohaté proteiny, zachovává se stabilita pěny a chuť piva je nezměněná<sup>67,68</sup>.



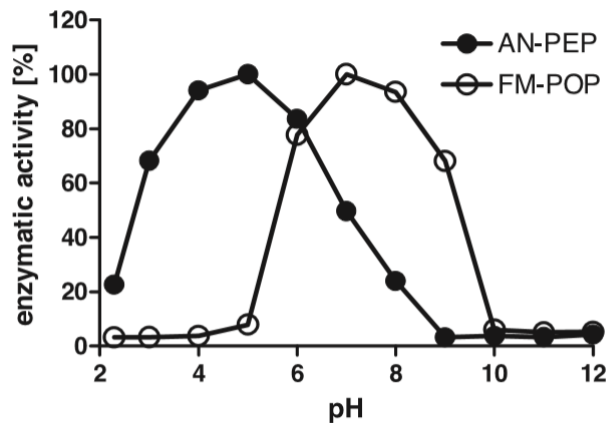
Kromě toho, že je AnPEP proteáza vhodným stabilizátorem v pivovarnictví, má potenciál při výrobě piva vhodného pro celiaky, protože je schopna degradovat všechny známé glutenové epitopy<sup>65,67</sup>.

### 1.3.1 Celiakie a její alternativní terapie

Celiakie je autoimunitní onemocnění charakterizované intolerancí lepku. Lepek (gluten) je směs proteinů obsažených v pšenici, žitě a ječmenu<sup>71</sup>, jejichž majoritně zastoupenými frakcemi jsou v alkoholu rozpustné prolaminy a nerozpustné gluteniny. Obě z těchto frakcí mají velké zastoupení glutaminu a prolinu<sup>72</sup>. Žaludeční a pankreatické proteázy štěpí proteiny lepku na peptidy, mezi nimiž jsou i imunogenní 33-aminokyselinové fragmenty. Za fyziologického stavu je bariéra střevního epitelu nepropustná pro makromolekuly jako je gliadin. U lidí s genetickou predispozicí pro celiakii interaguje gliadin se střevními buňkami, ruší těsná mezibuněčná spojení<sup>71</sup> a zvyšuje se permeabilita střeva. Gliadinové peptidy se dostanou skrz epiteliální bariéru a aktivují T-lymfocyty v *lamina propria*. Imunitní odpověď je zesílena aktivitou tkáňové transglutaminázy, která katalyzuje přeměnu glutaminu na glutamát v glutenových peptidech<sup>73</sup>. Deamidované peptidy se vážou na specifické MHC II (hlavní histokompatibilní komplex) a vyvolávají imunitní odpověď, která může způsobit malabsorpci a v závažných případech až atrofii střeva. Tyto změny jsou charakterizovány typickými projevy celiakie jako je průjem, nevolnost a zvracení<sup>65,73</sup>.

Donedávna byla terapie celiakie založena hlavně na dietě spočívající ve vysazení produktů obsahujících lepek ze stravy. Existují však i alternativní způsoby terapie, charakterizované perorálním podáním enzymových preparátů<sup>65,70,74,75</sup>, které u celiaků degradují na prolin bohaté imunogenní peptidy (30-40 aminokyselin)<sup>63</sup>.

Zpočátku se zdálo, že budou pro degradaci těchto imunogenních peptidů vhodné prolyl oligopeptidázy jako je prolyl oligopeptidáza z *Flavobacterium meningosepticum* (FM-POP)<sup>74</sup>, prolyl oligopeptidáza z *Sphingomonas capsulate* a *Myxococcus xanthus*<sup>76</sup>. Tyto proteázy sice efektivně štěpí za prolinem, ale mají pH optimum 6-8 (**Obr. 10**, str. 26), což znamená, že nebudou aktivní v při nízkém pH v žaludku a budou inaktivovány pepsinem.



**Obr. 10:** Závislost enzymové aktivity *Aspergillus niger* prolyl endoproteázy (*AnPEP*) a *Flavobacterium meningosepticum* prolyl oligopeptidázy (*FM-POP*) na pH<sup>65</sup>. *FM-POP* má pH optimum mezi 6 a 8 a bude v žaludku inaktivována pepsinem, zatímco *AnPEP* má pH optimum mezi 4 a 6 a zůstane tak aktivní.

Posun nastal při objevu prolyl endoproteázy z plísně *Aspergillus niger* (*AnPEP*), která štěpí optimálně při pH 4-6 a zůstává stabilní při pH 2 (**Obr. 10**, str. 26). *AnPEP* štěpí preferenčně za prolinem převážně endopeptidicky a deamidace tkáňovou transglutaminázou nemá významný vliv na štěpení glutenových epitopů touto proteázou<sup>65</sup>. Použití *AnPEP*u při terapii celiakie má svá úskalí. Pro efektivní degradaci imunogenních peptidů je potřeba pacientovi podat takové množství *AnPEP*u, které je přibližně ekvivalentní množství glutenu přijatého z potravy. Při konzumaci mléčných produktů, červeného masa a ryb obsahujících velké množství prolinu se zvýší substrátové zatížení prolyl endoproteáz a léčba tak není efektivní. Z tohoto důvodu se při suplementaci enzymy doporučuje kombinace prolyl endoproteázy a proteázy s širší specifitou, která je také schopna štěpit za prolinem. Rey et. al zjistili, že proteolytické enzymy (nepenthesiny a neprosin) z rostliny *Nepenthes* efektivně štěpí antigenní peptidy i při velmi nízkém poměru enzym:substrát a předčily tak doposud popsané enzymové suplementy. Například v porovnání s *AnPEP*em jsou schopny degradovat gliadin až s 25× vyšší účinností<sup>63</sup>.

## 2 Cíle práce

- analyzovat obsah tablety Gluten Rid with Tolerase G, která je zdrojem *AnPEP* proteázy
- vytvořit knihovnu pro program mMass pro usnadnění testování pomocí hmotnostní spektrometrie
- zjistit aplikovatelnost *AnPEP* proteázy v metodách strukturní biologie jako je vodík/deuteriová výměna, chemické sítění a rychlá fotochemická oxidace a v proteomice
- sledovat aktivitu imobilizovaného *AnPEP*u z hlediska různých podmínek (vliv teploty, pH, průtokové rychlosti, denzity proteázy na koloně)
- zjistit štěpné preference *AnPEP* proteázy za jiných než HDX-MS podmínek
- otestovat aktivitu a štěpné preference při digesci v roztoku za různých teplot a poměrů *AnPEP* a modelového substrátu – bovinní karbanické anhydrázy 2
- zjistit charakter štěpení fosforylovaného proteinu translokáza 34 vnější mitochondriální membrány (TOMM34) a z toho posoudit aplikovatelnost *AnPEP* proteázy ve fosfoproteomice za vybraných podmínek

## 3 Experimentální část

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy ML104/01	Mettler Toledo, Švýcarsko
Automatické pipety	Mettler Toledo, Švýcarsko
Centrifuga 5415 R	Eppendorf, SRN
Fotodokumentační systém ChemiDoc MP	Bio-Rad, USA
HPLC předkolona, Luna Omega Polar C18 (5 µm, 100 Å, 20×0,3 mm)	Phenomenex, USA
HPLC systém LC-20AD	Shimadzu, Japonsko
Hmotnostní spektrometr MALDI TOF/TOF AutoFlex	Bruker Daltonics, SRN
Multimetr Fluke 179 s teplotní sondou	Fluke, USA
pH metr Orion 2 Star	Thermo, USA
Předvážky EMB 1000-2	Kern, SRN
Sonikační lázeň Elmasonic S 30 H	Elma, SRN
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, USA
Stolní centrifuga MiniSpin	Eppendorf, SRN
Termostat CH-100	Biosan, Lotyšsko
Termostat s třepačkou Thermomixer comfort	Eppendorf, SRN
Vakuový koncentrátor Speedvac	Jouan, Francie
Vortex	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj napětí PowerPac Universal	Bio-Rad, USA

### 3.1.2 Chemikálie

2-merkapt ethanol	Sigma-Aldrich, USA
Acetonitril (LC/MS čistota)	Merck, SRN
Amoniak, 25% vodný roztok	Lach-ner, ČR
Bovinní karbonická anhydrasa (bCA2)	Sigma-Aldrich, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	VWR Chemicals, UK
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová (CCA)	Bruker Daltonics, SRN
Kyselina chlorovodíková (LC/MS čistota)	Merck, Německo
Kyselina mravenčí (LC/MS čistota)	Merck, Německo
Kyselina sinapová (SA)	Bruker Daltonics, SRN
Kyselina octová	VWR Chemicals, UK
Methanol (LC/MS čistota)	Merck, Německo
Peptidový kalibrační standard 206195 (MALDI)	Bruker Daltonics, SRN
Standard pro SDS-PAGE Precision Plus Unstained	Bio-Rad, USA
TEMED	Bio-Rad, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	VWR Chemicals, UK
10% dodecylsírán sodný	Bio-Rad, USA
10% peroxodisírán amonný	Bio-Rad, USA
30% (v/v) akrylamid:N,N'-methylen-bis-akrylamid mix	Bio-Rad, USA
1,5M Tris pH 8,8	Bio-Rad, USA
1,0M Tris pH 6,8	Bio-Rad, USA

### 3.1.3 Pufry a roztoky

**20mM octan amonný pH 5,0**

**20mM glycin-HCl pufr pH 2,3**

**4× koncentrovaný vzorkový pufr Laemmli (Bio-Rad, USA):** 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glycerol, 1% dodecylsírán sodný (SDS), 0.005% bromfenolová modř

**10× koncentrovaný TGS elektrodový pufr (Bio-Rad, USA):** 25mM Tris, 192mM glycin, 0,1% SDS, pH 8,3

**Barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue pro SDS-PAGE gely:** 45% (v/v) methanol; 10% (v/v) kys. octová; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

**MALDI matrice CCA:** kyselina 4-hydroxy-3,5-kyanoskořicová, nasycený roztok v methanolu

**MALDI matrice SA:** kyselina sinapová, nasycený roztok v 50% acetonitrilu

**Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE gely:** 35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová

**Vzorkový pufr Laemmli (Bio-Rad, USA):** 62.5 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromfenolová modř

### 3.1.4 Ostatní

Gluten Rid with Tolerase G (zdroj *AnPEPu*)

Swanson, USA

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava roztoku *AnPEP* proteázy z tablety **Gluten Rid with Tolerance G**

Obsah tablety **Gluten Rid with Tolerance G** byl vysypán do mikrozkušavky vhodné pro centrifugaci. Poté byl přidán 1 ml destilované vody LC-MS čistoty. Vzniklá suspenze byla intenzivně míchána a následně sonikována po dobu 3 min. Po sonikaci byl roztok 10 min centrifugován při 16 000×g. Poté byla odebrána čirá část roztoku a přenesena do několika zkumavek s filtrem. Následně byl roztok centrifugován 2 min při 12 000×g. Koncentraci celkového proteinu v tabletě stanovil Mgr. František Filandr pomocí kyseliny bicinchoninové na 100 mg·ml<sup>-1</sup>.

### 3.2.2 Zjištění obsahu tablety **Gluten Rid with Tolerance G**

Vzhledem k tomu, že byl jako zdroj *AnPEP* proteázy použit komerčně dodávaný doplněk stravy **Gluten Rid with Tolerance G**, bylo vhodné zjistit, jaké další proteiny, především proteázy obsahuje. Obsah tablety byl štěpen trypsinem a poté analyzován pomocí LC-MS/MS. Data byla prohledána programem MASCOT. Analýza a následné prohledání byly provedeny RNDr. Petrem Manem, Ph.D.

### 3.2.3 Vytvoření knihovny *AnPEP:bCA2* v programu **mMass**

Za účelem lepšího porozumění charakteru štěpení *AnPEP* proteázou byla v programu **mMass** vytvořena knihovna pro štěpení proteinu bovinní karbonická anhydráza (*bCA2*). Při následném vyhodnocování dat jsme tak získali možnost, kromě specifického charakteru štěpení na základě štěpení *in-silico* za Pro a Ala s větším počtem opomenutých zásahových míst (>10), zohlednit na základě naměřených dat i jeho nespecifický charakter. Bylo využito několik souborů dat štěpení proteinu *bCA2* *AnPEP* proteázou naměřených dříve v Laboratoři strukturní biologie a buněčné signalizace za různých podmínek. Po odstranění redundantních peptidů byly z těchto dat využity jejich *m/z* hodnoty a pozice v sekvenci *bCA2* (hraná závorčka). Tyto informace byly převedeny do xml formátu podobě uvedené na **Obr. 11** (str. 32) a vloženy do knihovny programu **mMass**.

```
<reference name="[141 - 184]"mass="4611.5073"/>
```

*Obr. 11: Formát dat vkládaný do mMass za účelem vytvoření knihovny bCA2:AnPEP.*

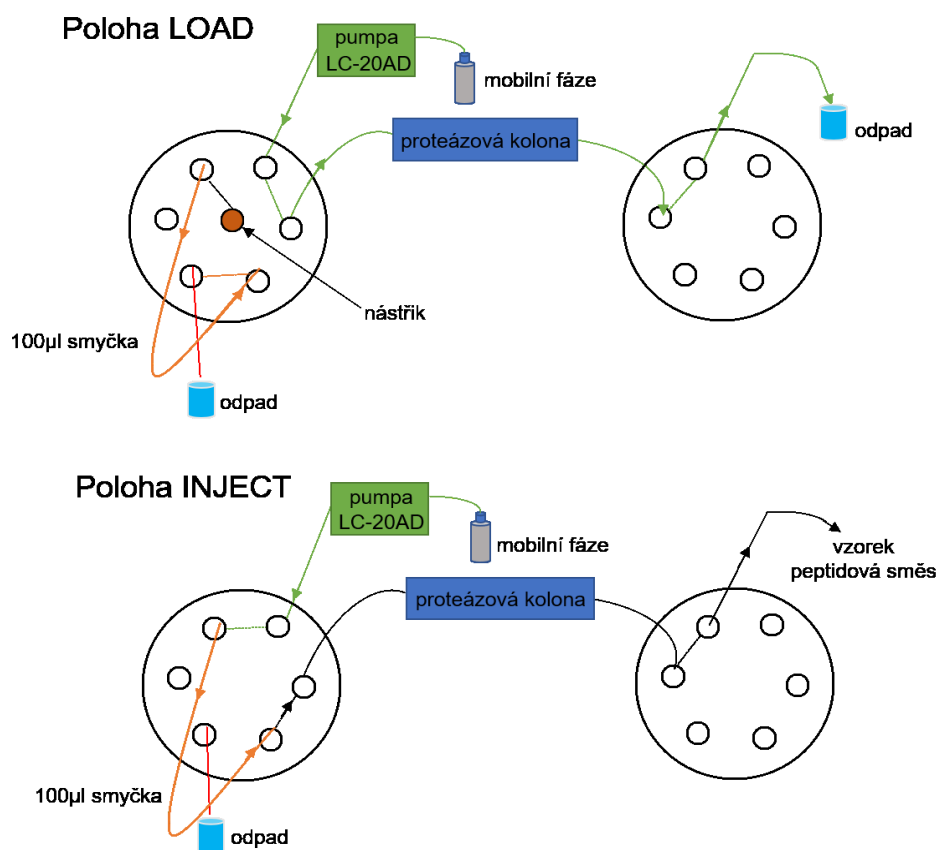
### 3.2.4 Imobilizace AnPEP proteázy a plnění kolony

Imobilizace AnPEP proteázy na nosič POROS 20 AL byla provedena Bc. Markem Polákem z Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace (BIOCEV) dle publikovaných protokolů<sup>53,54</sup>. Smísením volného inaktivovaného nosiče a nosiče s AnPEP proteázou v určitém poměru byly taktéž Bc. Markem Polákem vytvořeny 5×, 20× a 200× „ředěné“ směsi pro plnění kolon. Aby mohly být kolony naplněny nosičem, byly nejprve všechny jejich součástky sonikovány 15 min v methanolu. Prázdna kolona byla následně na jednom konci uzavřena fritou a druhým koncem byla pomocí mikrostříkačky a připojené hadičky naplněna suspenzí nosiče POROS 20 AL s AnPEP proteázou o různém ředění. Byla tak připravena 5×, 20× a 200× „ředěná“ kolona. Po naplnění byla z obou stran uzavřena fritou a následně připojena na LC systém. Nakonec byla po dobu 30 min promývána 0,4% kyselinou mravenčí a poté uchována v lednici při 4 °C.

### 3.2.5 Online štěpení bCA2 pomocí imobilizované AnPEP proteázy

Protein bCA2 (19 prolinů v primární struktuře) byl štěpen pomocí proteázy AnPEP imobilizované na koloně na nosiči POROS 20 AL a zapojené do LC systému (LC-20AD, Shimadzu) a byly použity kolony s různým zastoupením proteázy na nosiči (viz kap 3.2.4). Nástřik vzorku byl proveden manuálně přes nástřikový ventil pomocí mikrostříkačky Hamilton, **Obr. 12** (str. 33) ukazuje schéma zapojení HPLC systému a ventilu. Při poloze LOAD byl protein dávkován do 100μl dávkovací smyčky a kolona byla promývána pouze vhodnou mobilní fází (0,4% kyselina mravenčí nebo 20mM octan amonný, pH 5,0). Zatímco při poloze INJECT začal být protein z dávkovací smyčky unášen mobilní fází na kolonu s AnPEP proteázou. Bylo jímáno 200 μl vzniklé peptidové směsi. Při změně mobilní fáze byl vždy před dávkováním proteinu systém danou mobilní fází důkladně promyt.





**Obr. 12: Schéma zapojení HPLC systému.** Poloha ventilu LOAD: protein je dávkován do 100 µl dávkovací smyčky a kolona je promývána mobilní fází (0,4% kyselina mravenčí nebo 20mM octan amonný pH 5,0), poloha ventilu INJECT: protein je unášen mobilní fází z dávkovací smyčky do kolony s proteázou, kde je štěpen.

Pro optimalizaci štěpení *AnPEP* proteázou bylo zvoleno několik podmínek, kdy byl sledován vliv kyseliny mravenčí, vliv průtokové rychlosti, vliv zastoupení proteázy na nosiči, vliv pH a teploty. Do LC systému s *AnPEP* kolonou byl dávkován protein bCA2 o koncentraci 6 µM. Pro potřeby kontrolního vzorku (neštěpený protein bCA2) byla použita místo kolony kovová spojka. Nasbíraná směs peptidů byla rozdělena na dvě poloviny. První polovina byla ponechána jako rezerva a druhá byla po zakoncentrování na vakuové odparce použita pro polyakrylamidovou elektroforézu v prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Všechny vzorky byly připraveny tímto způsobem a podrobnosti jsou uvedeny v jednotlivých podkapitolách 3.2.5.1-3.2.5.4.

### 3.2.5.1 Vliv kyseliny mravenčí

Pro sledování vlivu kyseliny mravenčí (FA) na štěpení bCA2 *AnPEP* proteázou byly připraveny vzorky za podmínek uvedených v **Tab. 2**.

*Tab. 2: Vzorky pro sledování vlivu kyseliny mravenčí na štěpení bCA2 imobilizovanou AnPEP proteázou.*

Vzorek	Rozpouštědlo	Mobilní fáze	Ředění kolony	Průtok [ $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]
Kontrola			–	40	
1			200×	20	
2			200×	40	
3	0,1% FA	0,4% FA	20×	20	20
4			20×	40	
5			5×	20	
6			5×	40	

### 3.2.5.2 Vliv průtoku a ředění kolony

Dále byl sledován vlivu průtoku a ředění kolony na štěpení bCA2 *AnPEP* proteázou. Štěpení bylo provedeno za stejných podmínek jako v kap. 3.2.5.1 (**Tab. 2**). Výjimkou bylo rozpouštědlo, kterým byl 20mM glycin-HCl, pH 2,3.

### 3.2.5.3 Vliv pH

Poté byl sledován vliv pH na štěpení bCA2 *AnPEP* proteázou. Podmínky štěpení jsou uvedeny v **Tab. 3**.

*Tab. 3: Vzorky pro sledování vlivu pH na štěpení bCA2 imobilizovanou AnPEP proteázou.*

Vzorek	Rozpouštědlo	Mobilní fáze	Ředění kolony	Průtok [ $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]
Kontrola	20mM glycín-HCl pH 2,3	0,4% FA	–		
1	20mM glycín-HCl pH 2,3	0,4% FA	200×		
2	20mM glycín-HCl pH 2,3	0,4% FA	200×	20	20
3	20mM glycín-HCl pH 2,3	0,4% FA	20×		
4	20mM octan amonný, pH 5,0		20×		
5	20mM octan amonný, pH 5,0		5×		
6	20mM octan amonný, pH 5,0		5×		

### 3.2.5.4 Vliv teploty

Při sledování vlivu teploty na štěpení bCA2 *AnPEP* proteázou bylo před samotným nástřikem vzorku nutné kolonu temperovat na požadovanou teplotu. Žádaná teplota kolony byla kontrolována pomocí multimetru Fluke 179 s teplotní sondou. Za účelem zamezení úniku tepla byla kolona izolována polystyrenovým boxem. Byl porovnáván vliv teploty na štěpení při pH 2,3 a 5,0. **Tab. 4** (str. 36) uvádí podmínky štěpení při pH 2,3.

Tab. 4: Vzorčky pro sledování vlivu teploty na štěpení bCA2 AnPEP proteázou při pH 2,3.

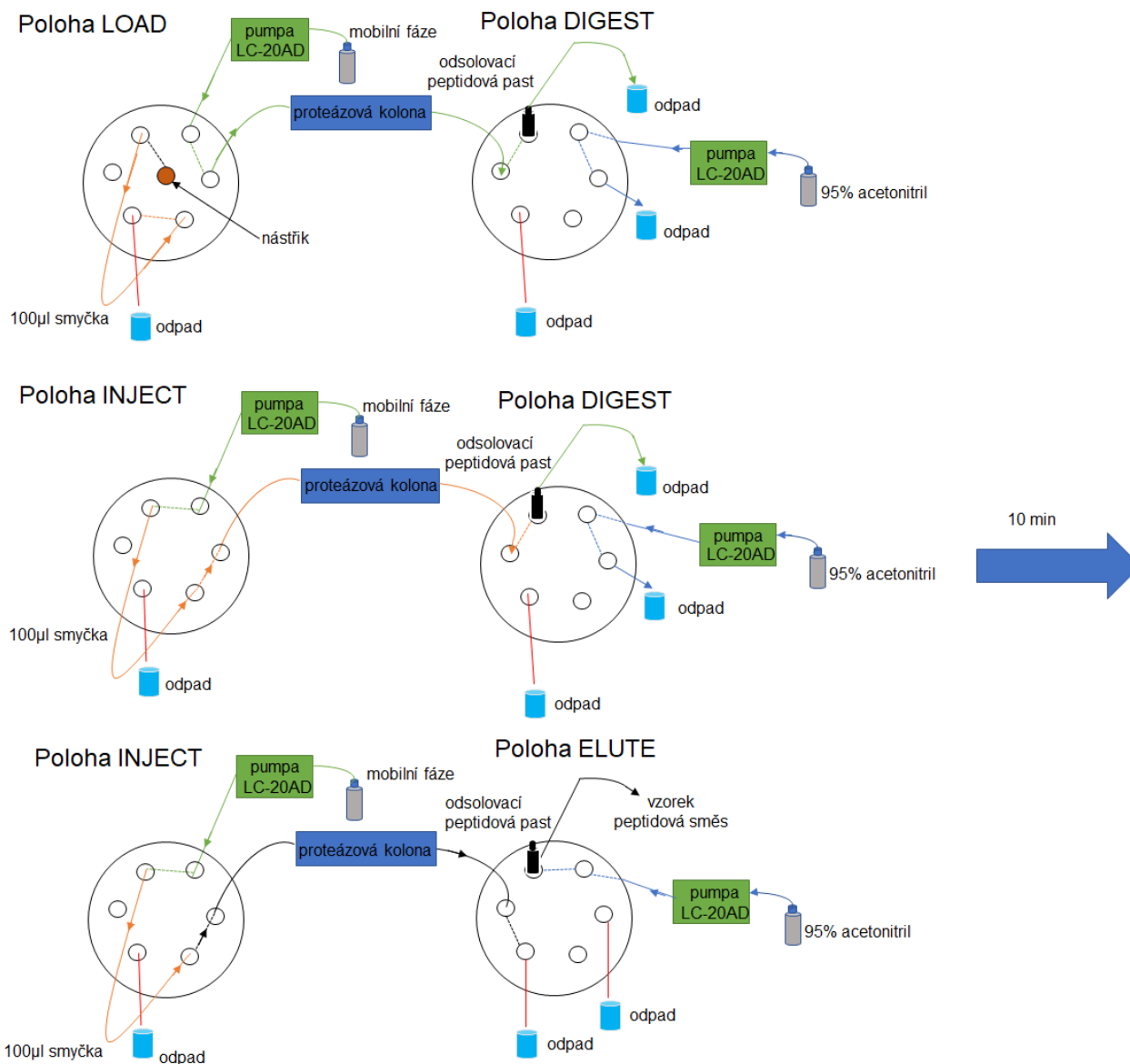
Vzorek	Rozpouštědlo	Mobilní fáze	Ředění kolony	Průtok [ $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]
Kontrola			–		20
1			200×		20
2			200×		30
3			200×		40
4			200×		50
5	20mM	0,4% FA	20×	20	20
6	glycin-HCl		20×		30
7	pH 2,3		20×		40
8			20×		50
9			5×		20
10			5×		30
11			5×		40
12			5×		50

Štěpení při pH 5,0 bylo provedeno za stejných podmínek jako při pH 2,3 (Tab. 4). Výjimku tvořilo rozpouštědlo a mobilní fáze, kterými byl v obou případech 20mM octan amonný.

### 3.2.6 Online štěpení fosforylovaného proteinu TOMM34 imobilizovanou AnPEP proteázou

Rekombinantní protein TOMM34 byl štěpen pomocí imobilizované AnPEP proteázy na LC systému popsaném výše v kap. 3.2.5. Odlišnosti popisuje Obr. 13 (str. 37). Protein o koncentraci 3  $\mu\text{M}$  byl dávkován do 100 $\mu\text{l}$  dávkovací smyčky a kolona byla promývána mobilní fází (0,4% kyselina mravenčí nebo 20mM octan amonný pH 5,0). Za proteázovou kolonou byla navíc za účelem odsolení vzorku zapojena odsolovací peptidová kolona (HPLC předkolona, Luna Omega Polar C18).

Při přepnutí druhého ventilu z výchozí polohy DIGEST na polohu ELUTE začal přes odsolovací peptidovou kolonu proudit pomocí druhé pumpy 95% acetonitril o průtoku  $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , který odtud peptidy eluoval.



**Obr. 13: Schéma zapojení HPLC systému. Nástřik proteinu – POLOHA LOAD + DIGEST, vpuštění vzorku do systému – POLOHA INJECT + DIGEST, enzymatické štěpení a zachycení peptidů na odsolovací peptidové koloně – 10 min – POLOHA INJECT + DIGEST, eluce peptidů z peptidové kolony 95% acetonitrilem – POLOHA INJECT + ELUTE.**

**Tab. 5** shrnuje zvolené podmínky štěpení fosforylovaného proteinu TOMM34 *AnPEP* proteázou.

*Tab. 5: Vzorky pro sledování vlivu pH a efektivity štěpení fosforylovaného proteinu TOMM34 imobilizovanou AnPEP proteázou.*

Vzorek	Rozpouštědlo	Mobilní fáze	Ředění kolony	Průtok [ $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ]	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]
1	20mM glycin-HCl pH 2,3	0,4% FA	20×	20	40
2	20mM octan amonný pH 5,0				

### 3.2.7 Offline štěpení bCA2 pomocí *AnPEP* proteázy

Štěpení bCA2 v roztoku (offline) bylo provedeno pro možnost srovnání aktivity a štěpných preferencí s imobilizovanou proteázou. **Tab. 6** (str. 39) ukazuje přehled testovaných podmínek. V případě reakcí při 4 °C byly nejprve proteáza i protein v příslušných pufrech samostatně inkubovány na ledu, zatímco při 40 °C byly proteáza i protein samostatně inkubovány v termostatu, v obou případech po dobu 5 min. Při všech zvolených podmínkách byla proteáza vždy inkubována ve stejném pufru jako substrát, ke kterému byla po inkubaci přenesena. Z reakcí při 40 °C byly odebírány vzorky na MS analýzu po 10 min, 1 h a po štěpení přes noc. U reakce při 4 °C byly odebrány vzorky pouze po štěpení přes noc.

*Tab. 6: Přehled reakčních podmínek testovaných při štěpení v proteinu bCA2 v roztoku pomocí AnPEP proteázy.*

Reakční směs	Rozpouštědlo	Poměr AnPEP:bCA2	Teplota [°C]
1	20mM	1:5	4
2	glycin-HCl	1:100	4
3		1:5	40
4		1:100	40
5	20mM	1:5	4
6	octan amonný	1:100	4
7		1:5	40
8		1:100	40

### 3.2.8 Hmotnostně spektrometrická analýza

Pro analýzu peptidů vzniklých štěpením AnPEP proteázou byla použita hmotnostní spektrometrie, konkrétně metoda ionizace/desorpce laserem za přítomnosti matrice spojená s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF). V porovnání s běžným spektrofotometrickým stanovením enzymatické aktivity však MALDI-TOF poskytuje pouze semikvantitativní informaci. Abychom mohli různé vzorky porovnávat, je nutné při měření dodržet stejné podmínky (např. energie laseru, počet skenů, místa ostřelování MALDI terčíku laserem).

MALDI-TOF analýza byla zvolena proto, že je to jednoduchá a levná metoda a analýzy jsou rychlé. Dalším důvodem bylo, že jsme si byli vědomi toho, že řada podmínek povede k tomu, že zůstane velká část proteinu neštěpena. To by mohlo způsobit nežádoucí zadržení větších peptidů, nebo celého proteinu na C18 peptidové koloně v LC-MS/MS systému, která by pak musel být vyměněna.

Před samotným měřením byly připraveny MALDI matrice. Matrice SA pro měření proteinů byla připravena z nasyceného roztoku kyseliny sinapové v 50% acetonitrilu (MS čistota), který byl promíchán a centrifugován 2 min na stolní centrifuze při 6000×g. Matrice CCA pro měření peptidů byla připravena z nasyceného roztoku kyseliny α-kyano-4-hydroxyskořicové v methanolu (MS čistota), který byl promíchán a centrifugován 2 min na stolní centrifuze při 6000×g. Poté bylo z čirého roztoku do mikrozkušavky odebráno 10 µl a smícháno s 10 µl vody a 10 µl acetonitrilu LC-MS čistoty

(H<sub>2</sub>O:acetonitril:CCA - 1:1:1). Při měření peptidů byl 1 µl vzorku z online nebo offline digestu nanesen na MALDI terčik a ihned smíchán s 1 µl CCA. Při měření intaktního proteinu byl 1 µl vzorku nanesen na MALDI terčik a po jeho zaschnutí byl přidán 1 µl připravené SA matrice. Po zaschnutí matric byl MALDI terčik vložen do iontového zdroje hmotnostního spektrometru.

Analýza byla provedena na přístroji AutoFlex (Bruker). Při měření intaktního proteinu byl použit lineární mód a rozsah 3-35 kilodaltonů (kDa). Pro měření peptidů byl zvolen rozsah 0,5-5 kDa a byl použit pouze reflexní mód detektoru. Kalibrace peptidů byla provedena pomocí peptidového kalibračního standardu (Bruker). Všechna měření byla prováděna v pozitivním módu. Je však důležité mít na paměti, že MALDI-TOF v pozitivním módu upřednostňuje především ionizaci peptidů obsahujících velké množství Arg a Lys (pozitivně nabitě).

Získaná data byla zpracována pomocí programu mMass<sup>77</sup>. Přiřazení vzniklých peptidů bylo provedeno na základě teoretického štěpení za Pro a/nebo knihovny vytvořené z experimentálně získaných MS spekter při štěpení bCA2 *AnPEP*em.

### **3.2.9 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného**

Pro doplnění MS dat byla provedena SDS-PAGE elektroforéza. Cílem bylo na gelu vizualizovat trendy ve štěpení *AnPEP* proteázy za různých podmínek. To znamená sledovat, jestli a jakou měrou ubývá proteinu bCA2. Z každého vzorku získaného štěpením proteinu bCA2 imobilizovanou *AnPEP* proteázou bylo odebráno 100 µl a koncentrováno na vakuové odparce. V závislosti na množství a kyselosti výsledné peptidové směsi byl použit odlišný postup rozpuštění vzorku ve vzorkovém pufru pro SDS-PAGE.

Při sledování vlivu kyseliny mravenčí na štěpení *AnPEP* proteázou byly odpařené vzorky rozpuštěny ve 40 µl vzorkového pufru (950 µl pufru Laemmli, 50 µl 2-merkapethanolu a 500 µl H<sub>2</sub>O). Při sledování vlivu pH na štěpení *AnPEP* proteázou bylo po přidání vzorkového pufru zjištěno, že jsou vzorky příliš kyselé na SDS-PAGE (žluté zabarvení bromfenolové modři) a bylo tak ke 40 µl vzorkového pufru přidáno 25 µl 0,5M Tris-HCl pH 6,8 (do modrého zabarvení). Ostatní vzorky byly po odpaření rozpuštěny pomocí 42 µl 0,5M Tris-HCl pH 6,8.



Poté byl připraven vzorkový pufr tak, že bylo 100  $\mu$ l 2-merkptoethanolu přidáno k 900  $\mu$ l 4 $\times$  koncentrovaného vzorkového pufru Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glycerol, 1% SDS, 0,005% bromfenolová modř). Takto připravený vzorkový pufr byl v poměru 1:3 (vzorkový pufr:vzorek) smísen se vzorkem rozpuštěným v 0,5M Tris-HCl pH 6,8. Vzorky byly poté 3 min sonikovány, 5 min centrifugovány na stolní centrifuze při 6000 $\times$ g, 5 min povařeny (95 °C) a nakonec opět za stejných podmínek centrifugovány. Následně byl podle **Tab. 7** připraven 15% separační a 5% zaostřovací gel.

*Tab. 7: Složení roztoků při přípravě 15% separačního a 5% zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE.*

Složka směsi	V [ml]	
	15% separační gel (5 ml)	5% zaostřovací gel (2 ml)
H <sub>2</sub> O	1,1	1,4
30% akrylamid mix	2,5	0,33
1,5M Tris pH 8,8	1,3	–
1,0M Tris pH 6,8	–	0,25
10% SDS	0,05	0,02
10% APS	0,05	0,02
TEMED	0,002	0,002

Připravený gel byl umístěn do elektroforetické aparatury s TGS (Tris-Glycin-SDS) elektrodoým pufrem. Na deseti jamkový gel bylo dávkováno 20  $\mu$ l vzorku a 10  $\mu$ l proteinového standardu molekulových hmotností (Precision Plus Unstained, Bio-Rad) a na patnácti jamkový gel bylo dávkováno 12  $\mu$ l vzorku a 5  $\mu$ l proteinového standardu molekulových hmotností. Nakonec byla elektroforetická aparatura připojena ke zdroji napětí. Než bromfenolová modř doputovala k rozhraní zaostřovacího a separačního gelu, bylo nastaveno napětí na 120 V a poté bylo zvýšeno na 160 V (na jeden gel). Elektroforéza byla zastavena ve chvíli, kdy bromfenolová modř doputovala ke spodnímu okraji skel. Gel byl po vyjmutí ze skel do dobu 5 min barven pomocí barvicího roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250. Poté byl gel promýván v odbarvovacím roztoku do odbarvení pozadí a nakonec přes noc nechán v 1% kyselině octové. Gely byly vyfoceny

pomocí fotodokumentačního systému ChemiDoc MP.

### **3.2.10 LC-MS/MS – štěpné preference *AnPEP* proteázy a peptidové mapy**

Za účelem zjištění štěpných preferencí *AnPEP* proteázy byly vybrány vzorky z online a offline štěpení proteinů bCA2 a TOMM34 podrobeny LC-MS/MS analýze. Data byla poté prohledána programem MASCOT proti databázi obsahující sekvenci testovaných proteinů. Analýza a následné prohledání byly provedeny RNDr. Petrem Manem, Ph.D. a RNDr. Zdeňkem Kukačkou, Ph.D. Pro přehledné zobrazení sekvenčního pokrytí a redundance vzniklých peptidů byl použit nástroj DrawMap dostupný na stránkách laboratoře (<http://peterslab.org/MSTools/>)<sup>78</sup>. Po vložení textového souboru sekvence štěpeného proteinu a textového souboru s hodnotami m/z vzniklých peptidů byla generována peptidová mapa. Výsledky byly také zpracovány v programu MS Excel s pomocí makra vytvořeného RNDr. Alanem Kádkem, Ph.D. pro výpočet statistiky štěpení. Protein TOMM34 byl kromě proteázy *AnPEP* štěpen také imobilizovaným pepsinem za účelem porovnání charakteru vzniklých peptidů a štěpení v pozici P1 v blízkosti fosforylovaných míst na tomto proteinu.

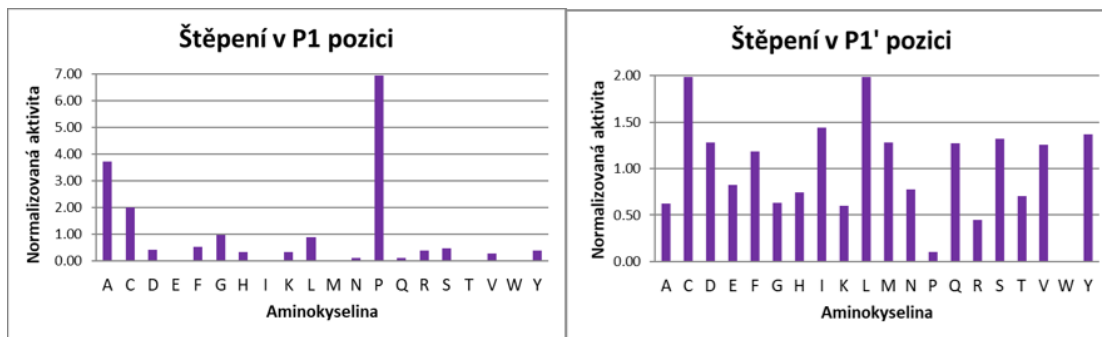
#### **3.2.10.1 Různé způsoby prohledání databázemi**

Při zpracování surových dat v této práci byl nejprve zvolen méně striktní způsob prohledání databázemi; iontové skóre (MASCOT skóre) větší než 1, žádné maskovací prohledávání (tzv. decoy search), chyba přiřazení menší než 3 ppm na prekurzorovém iontu a 0,05 Da na fragmentovém. Za účelem ověření, zda nejsou pozorované štěpné preference *AnPEP* ovlivněny tímto uvolněným přístupem prohledávání databázemi, byl při prohledávání použit alternativní způsob tzv. scoring metodou. Dle zmíněné metody musely mít identifikované peptidy iontové skóre vyšší než 20 a při prohledání v maskovací databázi bylo tolerováno méně než 1 % falešně pozitivních nálezů (tzv. FDR = False Discovery Rate). Poté byly porovnávány grafy štěpných preferencí generované při striktnějším a méně striktním způsobu prohledávání databázemi.

## 4 Výsledky

### 4.1 Štěpení *AnPEP* proteázou za HDX-MS podmínek

Dosud nepublikovaná pozorování z Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace doteď ukazovala, že je štěpení *AnPEP* proteázou za nízké teploty a pH (HDX-MS podmínky) relativně specifické. **Obr. 14** ukazuje, že *AnPEP* štěpí za těchto podmínek preferenčně za Pro a Ala (pozice P1).



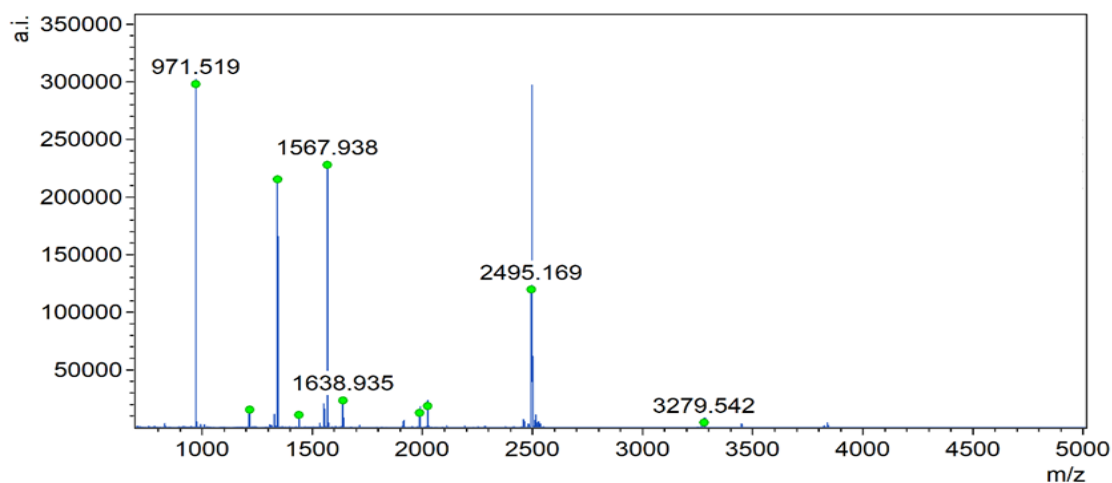
**Obr. 14:** Štěpné preference imobilizované *AnPEP* proteázy za HDX-MS podmínek (nízká teplota, pH 2,3). Substráty: myoglobin, bCA2, CHIP wt, CHIP S149A, Tomm34 wt a Tomm34 optiS. Výsledky jsou normalizovány na celkový počet aminokyselin v těchto proteinech.

Pro konstrukci grafů štěpných preferencí byly zahrnuty analýzy provedené na několika proteinech (myoglobin, bCA2, CHIP wt, CHIP S149A, Tomm34 wt a Tomm34 optiS). Myoglobin je zásobárnou kyslíku ve svalech<sup>79</sup>. Bovinní karbonická anhydráza (bCA2) je metaloproteáza katalyzující vratnou přeměnu hydrogenuhličitanových iontů na vodu a oxid uhličitý<sup>80</sup>. CHIP wt je ubikvitin ligáza, která se nachází v lidském těle a je zahrnuta v procesu ubikvitinace proteinu, konkrétně směřuje nesprávně sbalené substráty chaperonů k degradaci<sup>81</sup>. CHIP S149A je rekombinantní forma proteinu CHIP a má mutaci na serinu v pozici 149 za alaninem. TOMM34 wt je zapojen do transportu proteinů do mitochondrie<sup>82</sup>. TOMM34 OptiS je rekombinantní forma TOMM34 a má mutaci okolo serinu 160, kde jsou aminokyseliny lysin, arginin a tryptofan nahrazeny dvěma argininy.

V návaznosti na tato pozorování jsme se rozhodli zjistit, jestli *AnPEP* kopíruje tyto štěpné preference i za jiných než HDX-MS podmínek.

## 4.2 Knihovna pro mMass

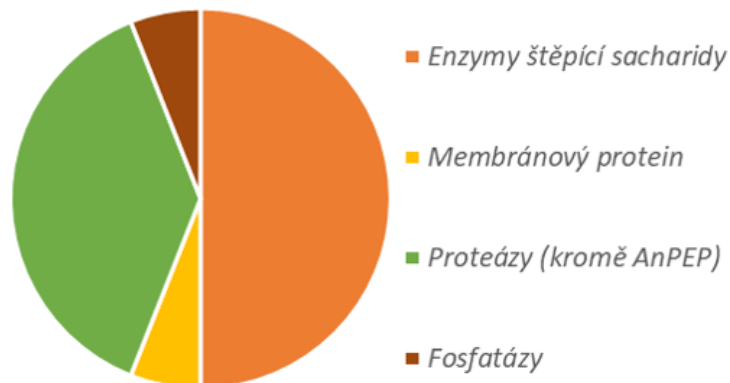
Na základě dat poskytnutých RNDr. Petrem Manem, Ph.D. byla úspěšně vytvořena knihovna peptidů pro mMass pro usnadnění testování štěpení AnPEPem pomocí MALDI-TOF MS. **Obr. 15** ukazuje MS spektrum v programu mMass s přiřazenými peptidy.



*Obr. 15: MS spektrum v programu mMass (CCA matrice). Online štěpení proteinu bCA2 AnPEP proteázou: 5× ředěná kolona, pH 2,3, průtok 20  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , 20 °C. Zelené tečky ukazují přiřazené signály peptidů odpovídajících štěpení za prolinem.*

## 4.3 Obsah tablety Gluten Rid with Tolerase G

Za účelem zjištění čistoty AnPEP izolovaného z tablet Gluten Rid with Tolerase G byla školitelem provedena LC - MS/MS analýza tryptického hydrolyzátu. Data byla prohledána programem MASCOT proti databázi NCBI nr a mým úkolem bylo zpracovat list identifikovaných proteinů. Do zpracování dat byly zahrnuty proteiny, které byly identifikovány na minimálně 10 peptidů. Výjimku tvořily proteiny, které byly identifikované jako „protease“ nebo „peptidase“. Proteiny pak byly rozděleny do tříd podle jejich funkce a **Obr. 16** (str. 45) ukazuje procentuální zastoupení.



**Obr. 16: Poměrné zastoupení proteinů v tabletě *Gluten Rid with Tolerance G*, která byla použita jako zdroj *AnPEP* proteázy. Štěpení trypsinem, LC-MS/MS analýza.**

Vidíme, že podstatnou část zaujímají jiné proteázy než *AnPEP*, jejichž přítomnost v tabletě může významně ovlivnit výslednou aktivitu a štěpné preference *AnPEP*u.

Proteázy byly klasifikovány pomocí nástroje BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a databázemi MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) a BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/index.php>). Takto bylo také zjišťováno, jakým mechanismem daná proteáza štěpí, do jaké třídy se řadí a jaké má pH a teplotní optimum. **Tab. 8** (str. 46) ukazuje charakteristiky identifikovaných podtříd proteáz. Štěpné preference reprezentují obecnou charakteristiku podtřídy.

**Tab. 8: Charakteristiky identifikovaných tříd proteáz.** U některých proteáz v jednotlivých podtřídách bylo nalezeno teplotní a pH optimum – zde je uvedeno rámcové rozmezí. Štěpné preference jsou charakteristické pro danou podtřídou proteáz. Vysvětlivky: \*některé proteázy v této podtřídě štěpí v P1 pozici za Pro (tripeptidylpeptidázy), \*\*v některých případech kyselé aminokyseliny.

<b>Třída proteáz</b>	<b>Podtřída proteáz</b>	<b>pH optimum</b>	<b>Teplotní optimum [°C]</b>	<b>Štěpné preference (aminokyseliny, P1 pozice)</b>
serinová	S10	4-6	45-60	hydrofóbní/ bazické
serinová	S8/S53	4-5	45-65	hydrofóbní*
aspartátová	A1A	4-5	40-50	hydrofóbní**

Na **Tab. 8** bude odkázáno v následujících kapitolách, protože ukazuje, že při podmínkách zvolených v experimentech této práce (teplotách 40 a 50 °C a pH 5,0) mohou mít vliv na aktivitu a štěpné preference *AnPEP*u kontaminující proteázy obsažené v tabletě Gluten Rid with Tolerance G.

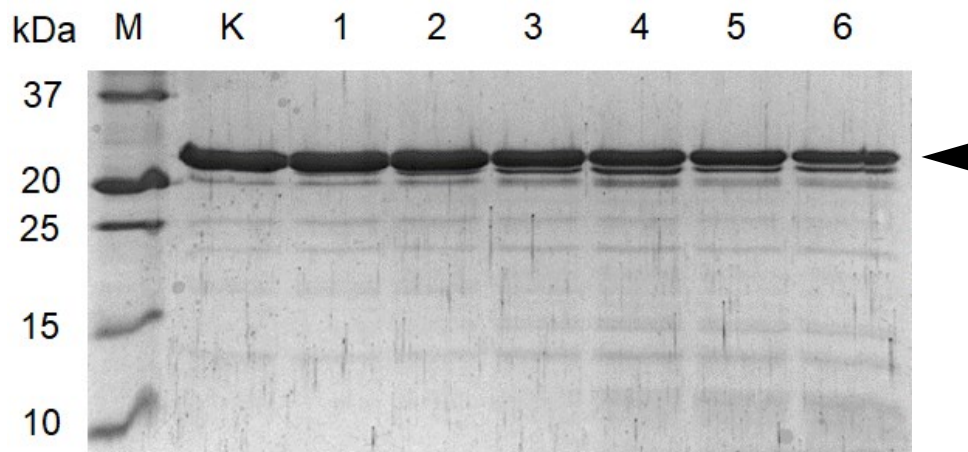
#### **4.4 Trendy ve štěpení proteinu bCA2 imobilizovanou *AnPEP* proteázou za různých podmínek**

Při vyhodnocování, s jakou účinností *AnPEP* proteáza za daných podmínek štěpí, byla současně porovnávána MS data s SDS-PAGE gely. Metoda MALDI-TOF-MS byla použita pro analýzu peptidů vzniklých po štěpení *AnPEP* proteázou. Zároveň sloužila jako potvrzení úspěšného průběhu proteolytické reakce před podrobením vzorků časově náročnější LC-MS/MS analýze. SDS-PAGE elektroforéza byla provedena za účelem vizualizace míry degradace substrátu *AnPEP* proteázou, která se projevuje na gelu jako mizející pruh proteinu bCA2.

##### **4.4.1 Vliv kyseliny mravenčí**

Při plánování experimentů bylo snahou mít pro přípravu vzorků jednotný systém. Pro experimenty štěpení při vyšším pH byl zvolen jako rozpouštědlo proteinu 20 mM octan amonný, pH 5,0 a pro experimenty při nižším pH 0,1% kyselina mravenčí.

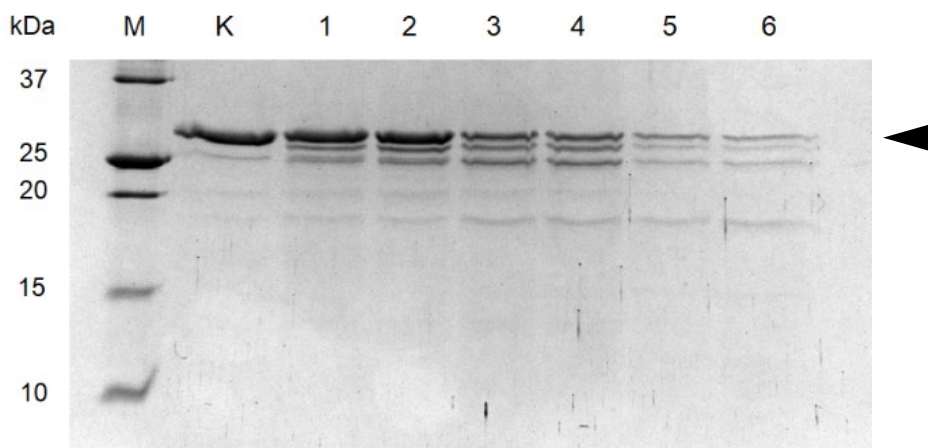
Z MS a SDS - PAGE analýz ale vyplynulo, že má ředění bCA2 do 0,1% kyseliny mravenčí nepříznivý vliv na efektivitu štěpení *AnPEP* proteázou. **Obr. 17** ukazuje, že intenzita pruhu neštěpeného bCA2 zůstává téměř neměnná. Z toho důvodu již nebyla kyselina mravenčí v dalších experimentech použita pro rozpuštění proteinu. Pro další experimenty při kyselém pH byl používán systém glycin-kyselina mravenčí. Na **Obr. 17** je možné také pozorovat trend mírného zvyšování efektivitu štěpení při zvyšování koncentrace proteázy na koloně.



**Obr. 17:** Vliv 0,1% kyseliny mravenčí na štěpení  $6\mu\text{M}$  bCA2 imobilizovanou *AnPEP* proteázou. Štěpení bylo provedeno při  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dráha **M** – proteinový standard molekulových hmotností; **K** – neštěpený bCA2 (29 kDa); **1** –  $200\times$  ředěná kolona, průtok  $40\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ; **2** –  $200\times$  ředěná kolona, průtok  $20\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ; **3** –  $20\times$  ředěná kolona, průtok  $40\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ; **4** –  $20\times$  ředěná kolona, průtok  $20\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ; **5** –  $5\times$  ředěná kolona, průtok  $40\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ; **6** –  $5\times$  ředěná kolona, průtok  $20\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . 15% SDS-PAGE gel. Pozice intaktní bCA2 je na pravé straně naznačena černým hrotem šipky.

#### 4.4.2 Vliv průtoku a denzity proteázy

Dále byl studován vliv průtoku a množství *AnPEP* proteázy na nosiči na štěpení proteinu bCA2. Experimenty byly provedeny dle podmínek uvedených v kap. 3.2.5.2. Na **Obr. 18** (str. 48) vidíme, že je efektivita štěpení proteázy vyšší při nižším průtoku ( $20\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ) a nejvyšší koncentraci proteázy na koloně ( $5\times$  ředěná).

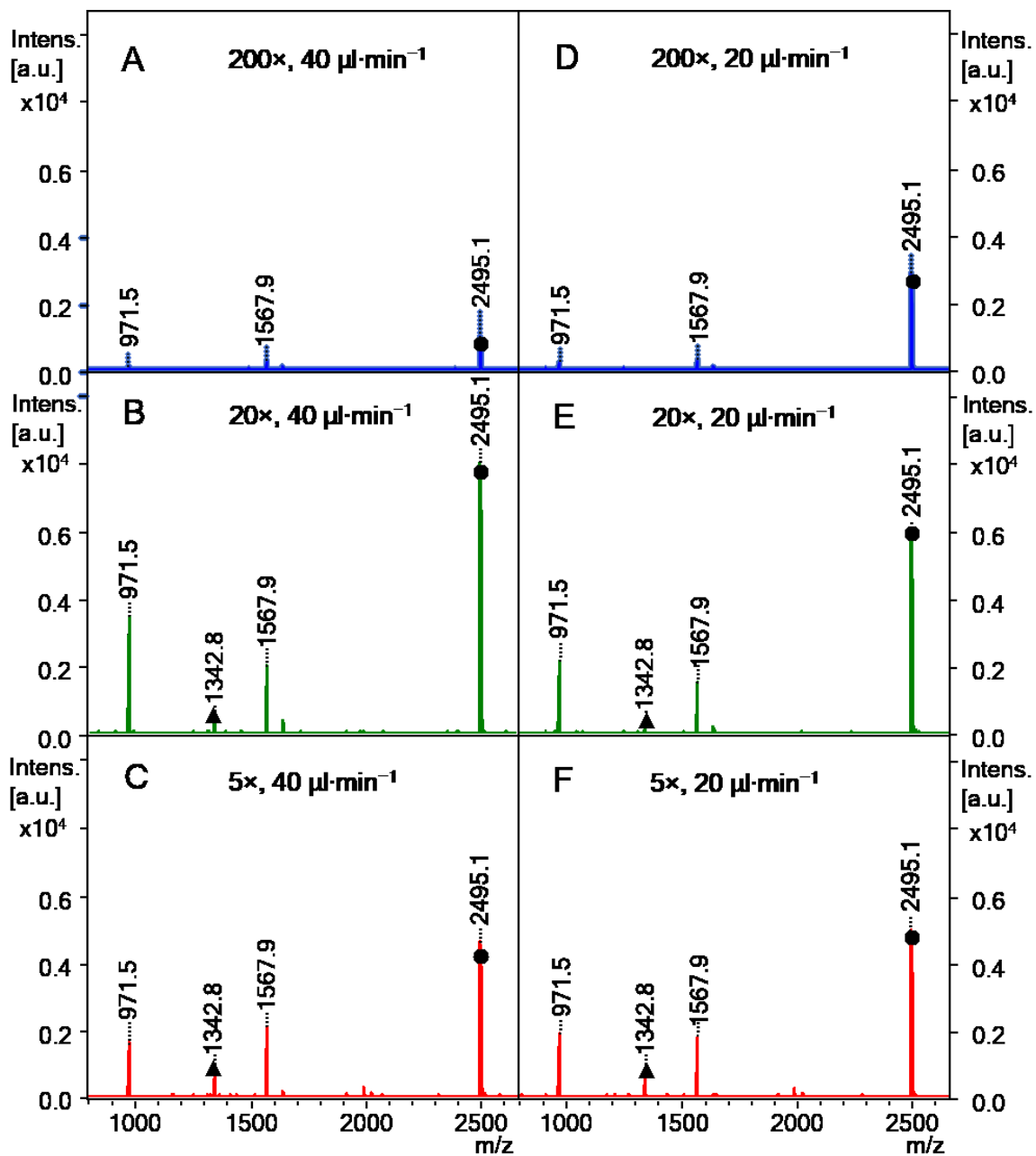


**Obr. 18:** Vliv průtoku a denzity proteázy na štěpení  $6\mu\text{M}$  bCA2 imobilizovanou AnPEP proteázou. Štěpení bylo provedeno při  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . Dráha **M** – proteinový standard molekulových hmotností; **K** - neštěpený bCA2 (29 kDa); **1** –  $200\times$  ředěná kolona, průtok  $40\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ; **2** –  $200\times$  ředěná kolona, průtok  $20\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ; **3** –  $20\times$  ředěná kolona, průtok  $40\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ; **4** –  $20\times$  ředěná kolona, průtok  $20\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ; **5** –  $5\times$  ředěná kolona; **6** –  $5\times$  ředěná kolona, průtok  $20\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . 15% SDS-PAGE gel. Pozice intaktní bCA2 je na pravé straně naznačena černým hrotem šipky.

V dráze kontroly (neštěpený protein bCA2) pozorujeme pouze pruh při 29 k Da, jež odpovídá molekulové hmotnosti bCA2. Z postupného snižování intenzity pruhu bCA2 při zvyšování koncentrace proteázy na koloně můžeme vyvodit zvýšení efektivity štěpení.

Z MS dat na **Obr. 19** (str. 49) plyne, že rozdílné průtoky ( $40$  a  $20\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ) nemají vliv na charakter vzniklých peptidů, ale pouze na změnu jejich intenzity. Vyšší průtok ( $40\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ) způsobí především snížení intenzity peptidů s nižším poměrem m/z, protože čas, který protein stráví na proteázové koloně je nižší, a v důsledku toho vznikají ve větší míře peptidy o vyšším poměru m/z. U  $5\times$  ředěné kolony již není rozdíl mezi průtoky příliš viditelný. Peptid [1-20] (Ac-SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP.i, m/z 2495,1) označený na **Obr. 19** (str. 49) černou tečkou vzniká i při vyšší koncentraci proteázy na koloně. Má acetylovaný serin, který posouvá hodnotu m/z o 42. Je zde štěpena P-E vazba. Tento peptid se vyskytoval u všech zbývajících experimentů uvedených níže, především u pH 2,3, a bude dále diskutován v kap. 5.

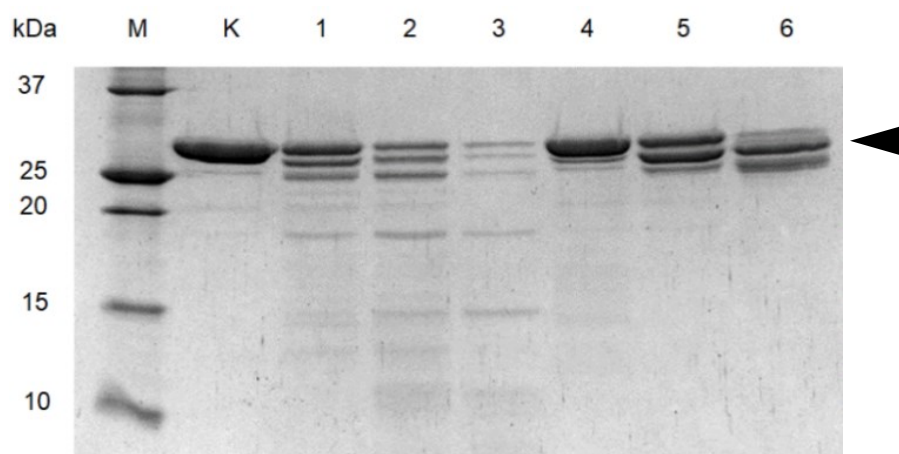




*Obr. 19: Vliv průtoku a denzity na štěpení 6µM bCA2 imobilizovanou AnPEP proteázou. MS spektra (CCA matrice). Štěpení bylo provedeno při 20 °C a průtoku 40 µl·min<sup>-1</sup>: **A** – 200×, **B** – 20× a **C** – 5× ředěná kolona a při průtoku 20 µl·min<sup>-1</sup>: **D** – 200×, **E** – 20× a **F** – 5× ředěná kolona. Trojúhelníkem je označen peptid [249-259] p.LKNRQVRGFPK. a tečkou peptid [1-20] Ac-SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP.i., Normalizováno na spektrum s nejvyšší intenzitou.*

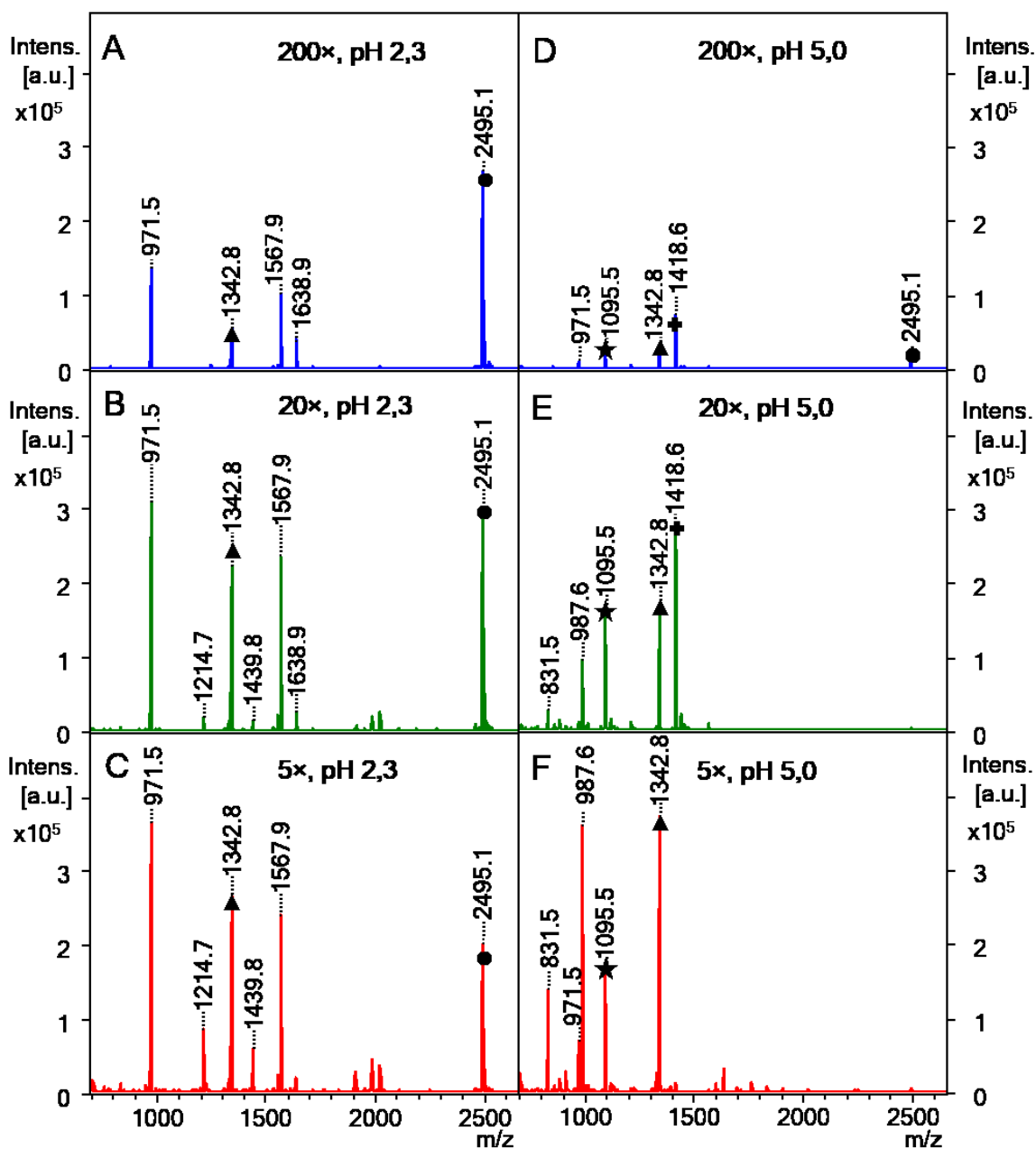
### 4.4.3 Vliv pH

Na základě článku Tsiatsiani et. al<sup>48</sup> uvádějícího dvojité pH optimum *AnPEP*u, byl proveden test štěpení při pH 2,3 a pH 5,0. Na **Obr. 20** můžeme při pH 2,3 i 5,0 pozorovat trend snižování intenzity pruhu neštěpeného bCA2 (kontrola) při zvyšování koncentrace proteázy na koloně, který naznačuje zlepšení aktivity proteázy. Zároveň je možné vidět rozdíl v efektivitě štěpení mezi pH 2,3 a pH 5,0. Při pH 2,3 se zdá, že je efektivita štěpení vyšší (dráha 1,2 a 3), protože na rozdíl od pH 5,0 (dráha 4,5, a 6) vznikají malé fragmenty (peptidy).



**Obr. 20:** Vliv pH na štěpení 6 $\mu$ M bCA2 imobilizovanou AnPEP proteázou. Štěpení bylo provedeno při 20 °C a průtoku 20  $\mu$ l $\cdot$ min<sup>-1</sup>. Dráha M – proteinový standard molekulových hmotností, K - neštěpený bCA2 (29 kDa); štěpení při pH 2,3: 1 – 200 $\times$ , 2 – 20 $\times$ , 3 – 5 $\times$  ředěná kolona; štěpení při pH 5,0: 4 – 200 $\times$ , 5 – 20 $\times$ , 6 – 5 $\times$  ředěná kolona. 15% SDS-PAGE gel. Pozice intaktní bCA2 je na pravé straně naznačena černým hrotem šipky.

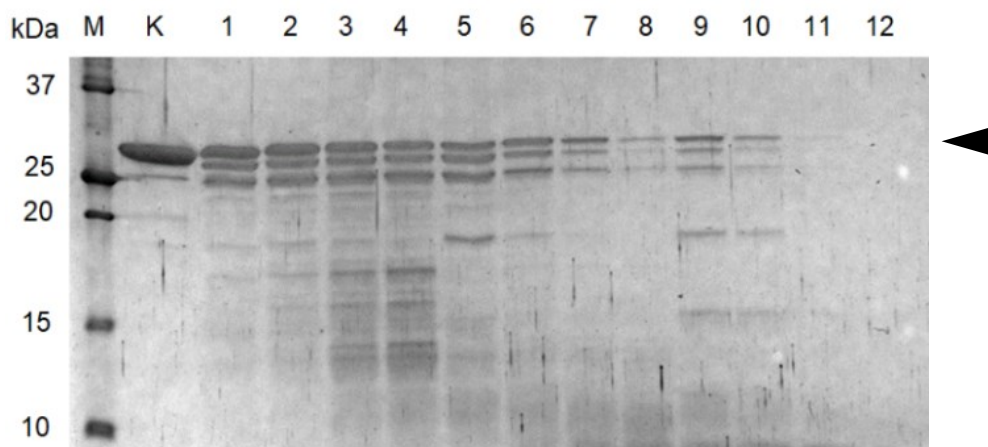
Na MS spektrech na **Obr. 21** (str. 51) vidíme, že při pH 2,3 a 5,0 vznikají odlišné peptidy. Při pH 5,0 vzniká více peptidů s nižšími hodnotami m/z. Například pík odpovídající peptidu [1-20] (Ac-SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP.i, m/z 2495,1) má při pH 5,0 v porovnání s pH 2,3 ve spektru velmi malou intenzitu. Na druhou stranu peptidy [1-12] (Ac-SHHWGYGKHNGP.e, m/z 1418,6) a [13-20] (p.EHWHKDFP.i, m/z 1095,5), které vzniknou z peptidu [1-20] štěpením P-E vazby se vyskytují pouze při pH 5,0. Tyto peptidy budou diskutovány v kap. 5.



**Obr. 21:** Vliv pH na štěpení  $6\mu\text{M}$  bCA2 imobilizovanou AnPEP proteázou. MS spektra (CCA matrice). Štěpení bylo provedeno při  $20^\circ\text{C}$  a průtoku  $20\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ , pH 2,3: **A** - 200 $\times$ , **B** - 20 $\times$  a **C** - 5 $\times$  ředěná kolona, pH 5,0: **D** - 200 $\times$ , **E** - 20 $\times$  a **F** - 5 $\times$  ředěná kolona. Hvězdičkou je označen peptid [13-20] p.EHWHKDFP.i, trojúhelníkem peptid [249-259] p.LKNRQVRGFPK., křížem peptid [1-12] Ac-SHHWGYGKHNGP.e a tečkou peptid [1-20] Ac-SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP.i. Normalizováno na spektrum s nejvyšší intenzitou.

#### 4.4.4 Vliv teploty při pH 2,3

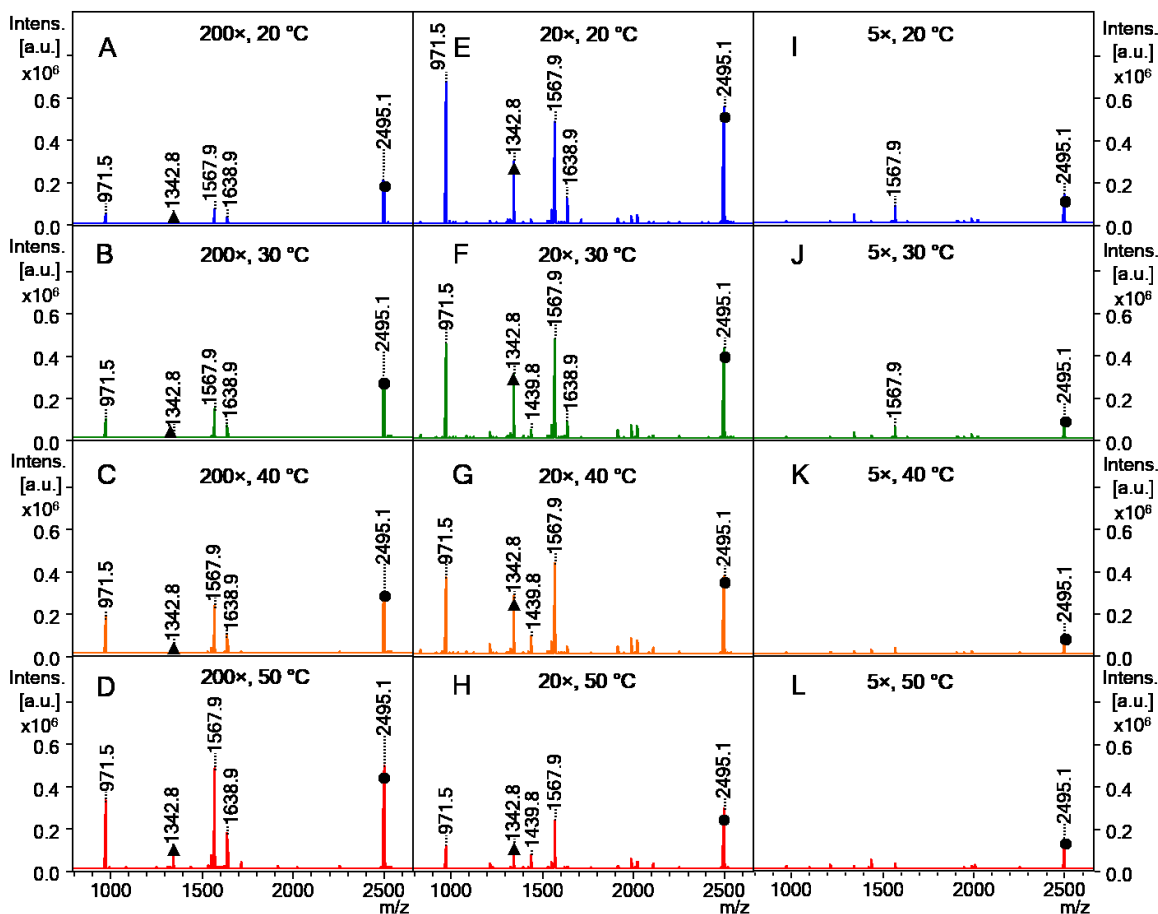
Pro kompletnější charakterizaci chování *AnPEP* proteázy při pH 2,3 byly provedeny experimenty s touto imobilizovanou proteázou vyhřívanou při teplotách 20, 30, 40 a 50 °C. Při teplotě nad 50 °C již aktivita, na základě předem provedených orientačních experimentů, klesala. Na **Obr. 22** vidíme, že pruh neštěpeného bCA2 postupně mizí se zvyšující se teplotou a koncentrací proteázy na koloně. Z tohoto výsledku můžeme usoudit, že je aktivita *AnPEP* proteázy při pH 2,3 a rozsahu teplot 20-50 °C nejvyšší při 50 °C a při použití 5× ředěné kolony.



**Obr. 22:** Vliv teploty na štěpení 6 $\mu$ M bCA2 imobilizovanou *AnPEP* proteázou při pH 2,3. Štěpení bylo provedeno při průtoku 20  $\mu$ l $\cdot$ min $^{-1}$ . Dráha M – proteinový standard molekulových hmotností, K – neštěpený bCA2 (29 kDa); štěpení na 200× ředěné koloně: 1 – 20 °C, 2 – 30 °C, 3 – 40 °C, 4 – 50 °C; štěpení na 20× ředěné koloně: 5 – 20 °C, 6 – 30 °C, 7 – 40 °C, 8 – 50 °C; štěpení na 5× ředěné koloně: 9 – 20 °C, 10 – 30 °C, 11 – 40 °C, 12 – 50 °C. 15% SDS-PAGE gel. Pozice intaktní bCA2 je na pravé straně naznačena černým hrotem šípky.

Na MS spektru na **Obr. 23** (str.53) u 200× ředěné kolony vidíme, že se zvyšuje intenzita vznikajících peptidů se zvyšující se teplotou. U 20× ředěné kolony naopak vidíme při zvyšující se teplotě postupné snižování intenzity vznikajících peptidů dané tím, že při tomto ředění již vznikají tak krátké peptidy, že už není možné je efektivně identifikovat pomocí MALDI-TOF MS.

U 5× ředěné kolony pozorujeme, že oproti 200× a 20× ředěné koloně *AnPEP* proteáza štěpila bCA2 na peptidy o podstatně nižší než detekovatelné hmotnosti, tudíž intenzita většiny peptidů ve spektru se zvyšující se teplotou klesá.

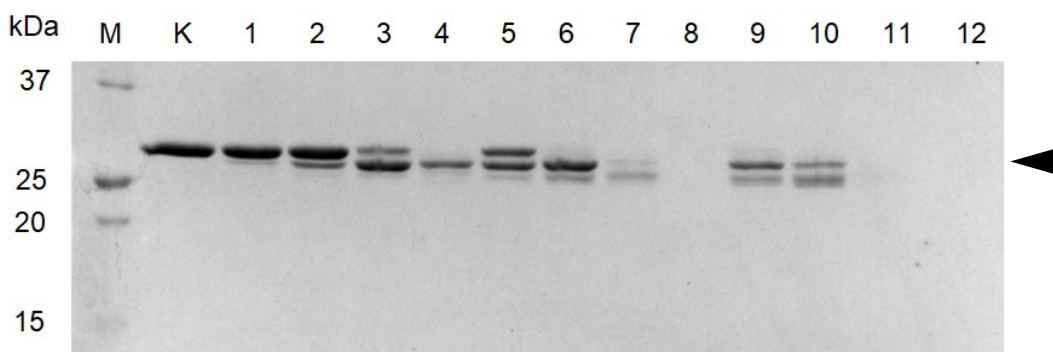


**Obr. 23:** Vliv teploty na štěpení 6 $\mu$ M bCA2 imobilizovanou *AnPEP* proteázou při pH 2,3. MS spektra (CCA matrice). Štěpení bylo provedeno při průtoku 20  $\mu$ l·min<sup>-1</sup>. štěpení na 200× ředěné koloně: **A** – 20 °C, **B** – 30 °C, **C** – 40 °C, **D** – 50 °C; štěpení na 20× ředěné koloně: **E** – 20 °C, **F** – 30 °C, **G** – 40 °C, **H** – 50 °C; štěpení na 5× ředěné koloně: **I** – 20 °C, **J** – 30 °C, **K** – 40 °C, **L** – 50 °C. Trojúhelníkem je označen peptid [249-259] p.LKNRQVRGFPK. a tečkou peptid [1-20] Ac-SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP.i. Normalizováno na spektrum s nejvyšší intenzitou.

#### 4.4.5 Vliv teploty při pH 5,0

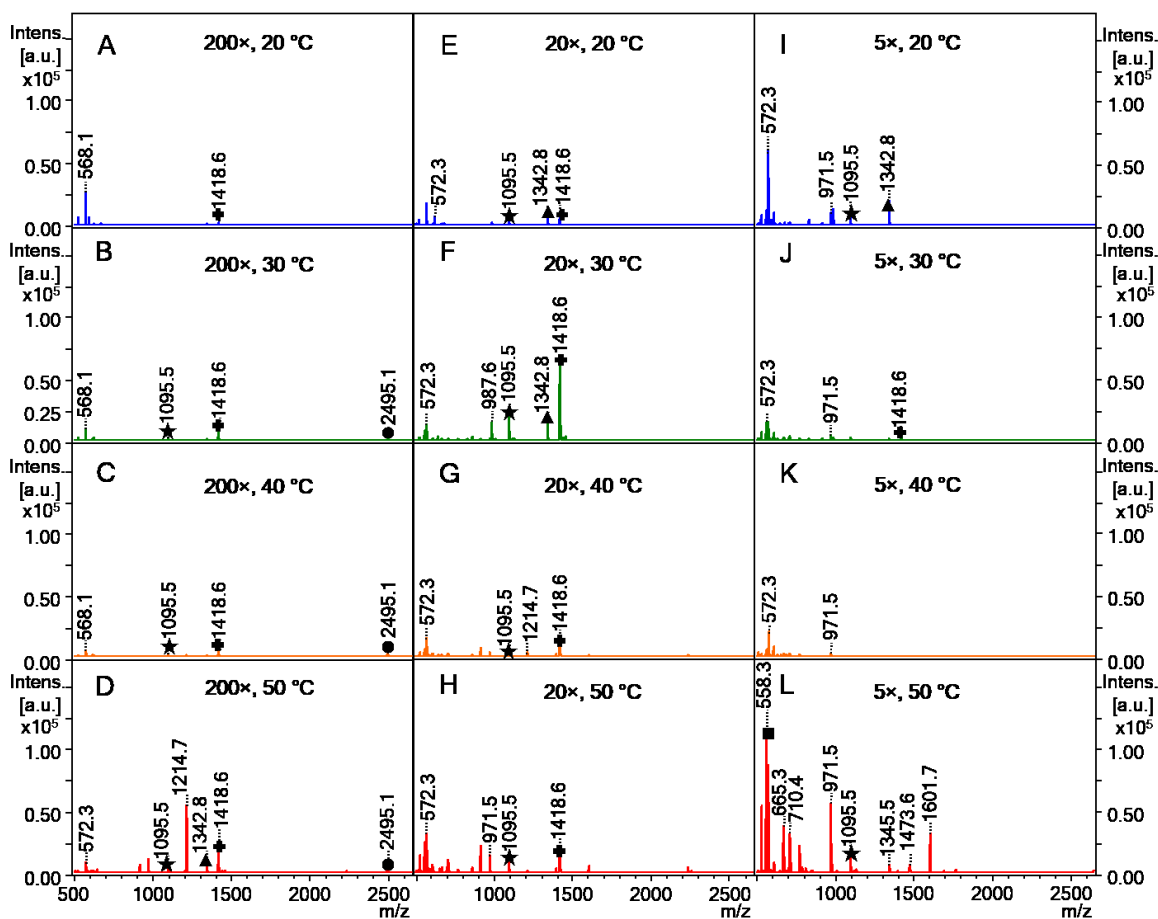
Pro kompletnější charakterizaci chování *AnPEP* proteázy při pH 5,0 a porovnání s pH 2,3 byly provedeny experimenty s touto imobilizovanou proteázou vyhřívanou na teploty 20, 30, 40 a 50 °C.

Na **Obr. 24** vidíme, že pruh neštěpeného bCA2 postupně mizí se zvyšující se teplotou a koncentrací proteázy na nosiči.



**Obr. 24:** Vliv teploty na štěpení  $6\mu\text{M}$  bCA2 imobilizovanou AnPEP proteázou při pH 5,0. Štěpení bylo provedeno za průtoku  $20\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Dráha **M** – proteinový standard molekulových hmotností, **K** – neštěpený bCA2 (29 kDa); štěpení na  $200\times$  ředěné koloně: **1** – 20 °C, **2** – 30 °C, **3** – 40 °C, **4** – 50 °C; štěpení na  $20\times$  ředěné koloně: **5** – 20 °C, **6** – 30 °C, **7** – 40 °C, **8** – 50 °C; štěpení na  $5\times$  ředěné koloně: **9** – 20 °C, **10** – 30 °C, **11** – 40 °C, **12** – 50 °C. 15% SDS-PAGE gel. Pozice intaktní bCA2 je na pravé straně naznačena černým hrotem šipky.

Na MS spektrech na **Obr. 25** (str. 55) vidíme, že u  $200\times$  ředěné kolony nejsou až do 50 °C identifikovány téměř žádné peptidy, až při 50 °C se intenzita peptidů zvýší. U  $20\times$  ředěné kolony se mezi 20 a 30 °C zvýší intenzita peptidů. Mezi 30 a 40 °C se výrazně snižuje intenzita peptidů o vyšší hodnotě  $m/z$ . U  $5\times$  ředěné kolony je při 50 °C vidět intenzivní pík peptidu [154-158],  $m/z$  558,3, složeného pouze z pěti aminokyselin. To naznačuje vysoce efektivní štěpení AnPEPem za těchto podmínek. Při porovnání vzniklých peptidů u různě ředěných kolon vidíme, že u  $5\times$  ředění (obsahuje nejvíce proteázy) vznikají odlišné peptidy v porovnání s ředěním  $200\times$  a  $20\times$ , kde se objevují téměř stejné peptidy.



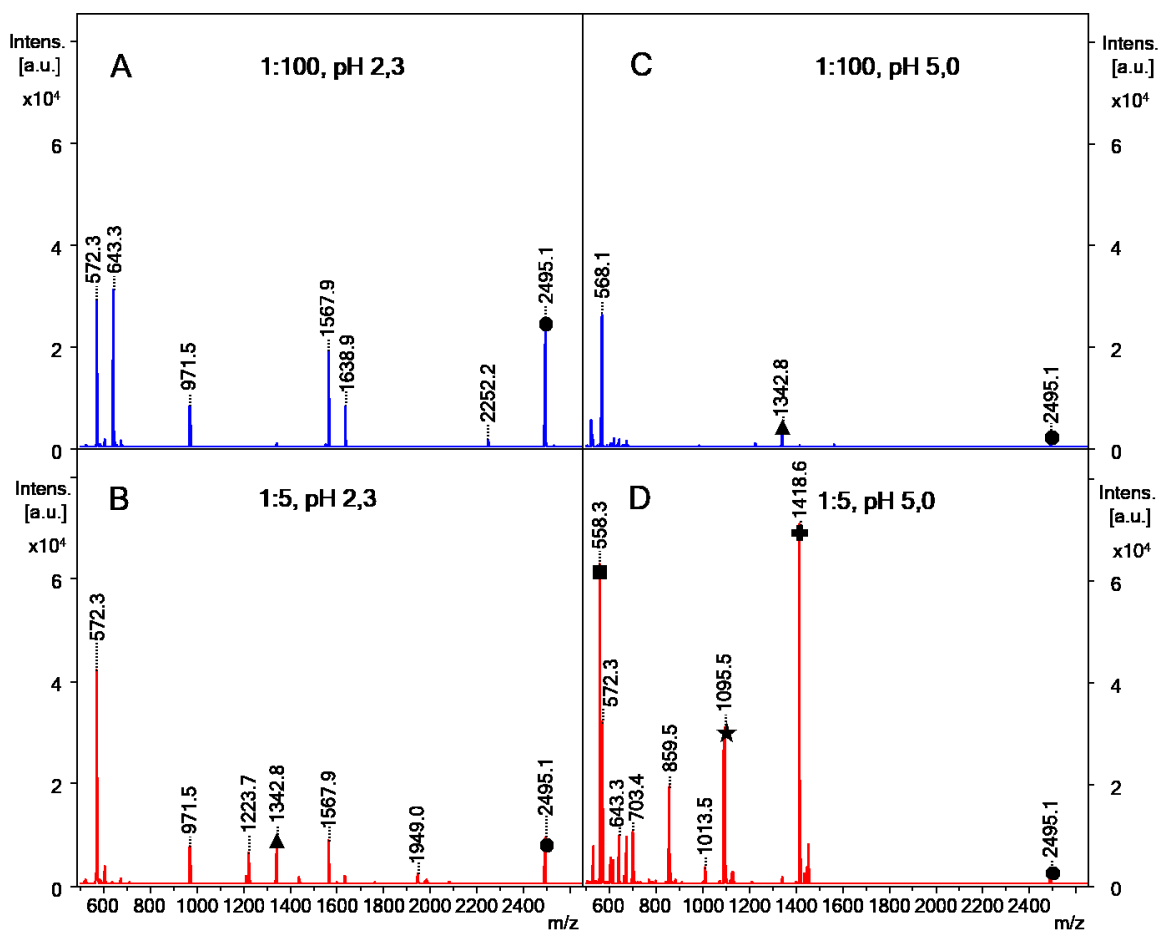
**Obr. 25:** Vliv teploty na štěpení 6 $\mu$ M bCA2 imobilizovanou AnPEP proteázou při pH 5,0. MS spektra (CCA matrice). Štěpení bylo provedeno při průtoku 20  $\mu$ l $\cdot$ min $^{-1}$ . štěpení na 200 $\times$  ředěné koloně: **A** – 20 °C, **B** – 30 °C, **C** – 40 °C, **D** – 50 °C; štěpení na 20 $\times$  ředěné koloně: **E** – 20 °C, **F** – 30 °C, **G** – 40 °C, **H** – 50 °C; štěpení na 5 $\times$  ředěné koloně: **I** – 20 °C, **J** – 30 °C, **K** – 40 °C, **L** – 50 °C. Čtvercem je označen peptid [154-158] p.ALQKV.l, hvězdičkou peptid [13-20] p.EHWHKDFP.i, trojúhelníkem peptid [249-259] p.LKNRQVRGFPK., křížem peptid [1-12] Ac-SHHWGYGKHNGP.e a tečkou peptid [1-20] Ac-SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP.i. Normalizováno na spektrum s nejvyšší intenzitou.

## 4.5 Trendy ve štěpení proteinu bCA2 AnPEP proteázou v roztoku za různých podmínek

Vzhledem k tomu, že je AnPEP proteáza navázána na nosič skrz amin (N-konec a/nebo funkční skupina lysinu), může imobilizace ovlivnit její aktivitu. Za účelem porovnání štěpení v roztoku a na koloně bylo provedeno i štěpení v roztoku (offline).

## 4.5.1 Štěpení v při 4 °C

Nejprve bylo provedeno štěpení proteinu bCA2 AnPEP proteázou v roztoku při 4 °C. Z MS spekter na **Obr. 26** vidíme, že při pH 2,3 a 5,0 vznikají odlišné peptidy a že u pH 5,0 má koncentrace proteázy větší vliv na vzniklé peptidy. Některé peptidy jsou charakteristické pouze pro jedno pH. Při vyšší koncentraci proteázy v roztoku vzniká při obou pH více peptidů s nižší molekulovou hmotností.

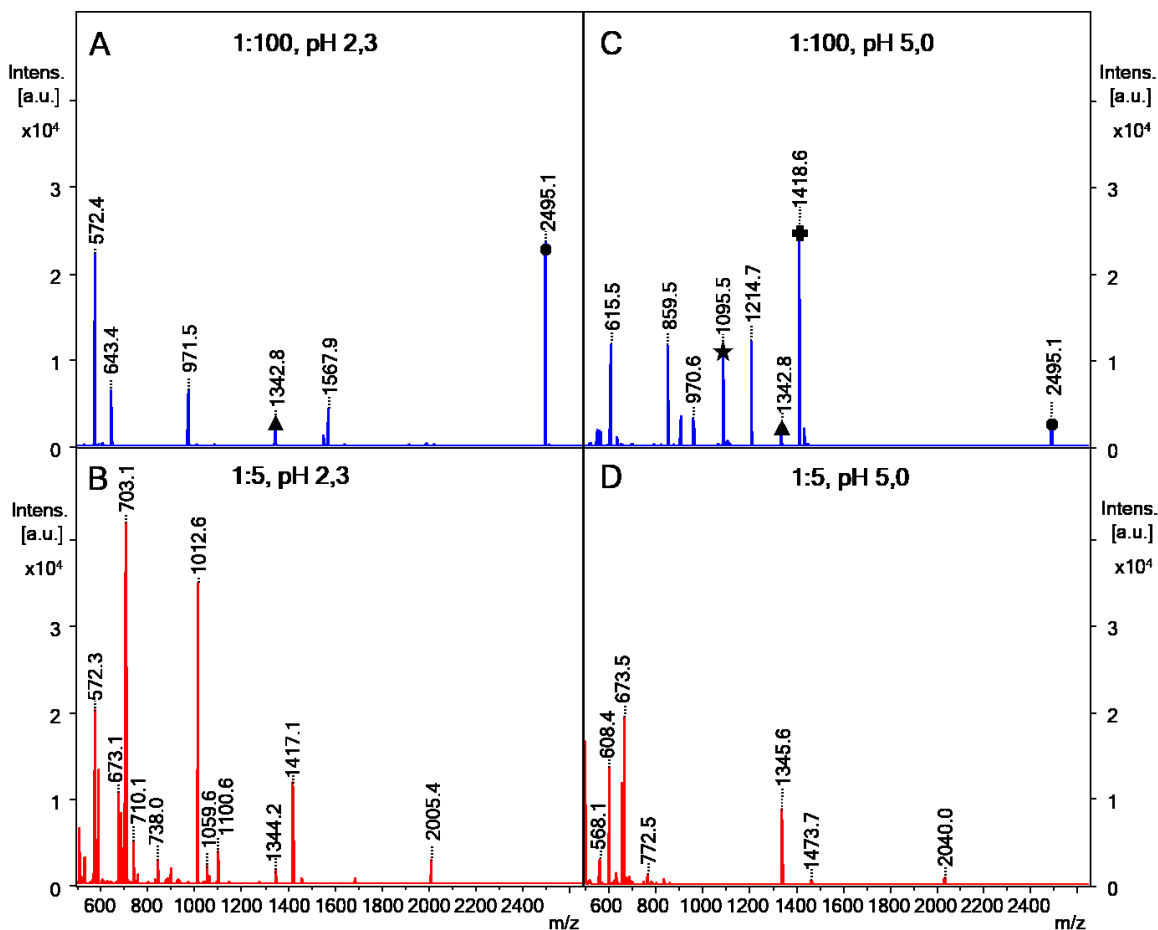


**Obr. 26:** Štěpení bCA2 AnPEP proteázou v roztoku. MS spektra (CCA matrice). Štěpení bylo provedeno přes noc při 4 °C; pH 2,3: **A** – AnPEP:bCA2, 1:100, **B** – 1:5; pH 5,0: **C** – 1:100, **D** – 1:5. Čtvercem je označen peptid [154-158] p.ALQKV.l, hvězdičkou peptid [13-20] p.EHWHKDFP.i, trojúhelníkem peptid [249-259] p.LKNRQVRGFPK, křížem peptid [1-12] Ac-SHHWGYGKHNGP.e a tečkou peptid [1-20] (Ac-SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP.i). Normalizováno na spektrum s nejvyšší intenzitou.



## 4.5.2 Štěpení při 40 °C

Z důvodu porovnání různých teplot štěpení *AnPEP* proteázou v roztoku byly provedeny experimenty ještě při 40 °C. Z MS dat na **Obr. 27** vyplývá, že oproti 4 °C **Obr. 26** (str. 56) vzniká při 40 °C více peptidů o nižší molekulové hmotnosti, což vypovídá o efektivnějším štěpení *AnPEP* proteázou.



**Obr. 27: Štěpení bCA2 *AnPEP* proteázou v roztoku. MS spektra (CCA matrice). Štěpení bylo provedeno přes noc při 4 °C; pH 2,3: **A** – *AnPEP*:*bCA2*, 1:100, **B** – 1:5; pH 5,0: **C** – 1:100, **D** – 1:5. Trojúhelníkem je označen peptid [249-259] *p.LKNRQVRGFPK*, hvězdičkou peptid [13-20] *p.EHWHKDFP.i*, křížem peptid [1-12] *Ac-SHHWGYGKHNGP.e* a tečkou peptid [1-20] (*Ac-SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP.i*). Normalizováno na spektrum s nejvyšší intenzitou.**

Při štěpení proteinu bCA2 *AnPEP* proteázou (poměr proteáza:substrát - 1:5) přes noc při 40 °C a pH 5,0 nebyly, na rozdíl od ostatních experimentů, v programu mMass anotovány žádné peptidy. Při pohledu na MS spektra na **Obr. 27** (str. 57) se zdá, že se při 40 °C výrazně projeví změna koncentrace proteázy na vzniklých peptidech. Je zde znatelný rozdíl mezi vznikajícími peptidy v rámci jednoho pH a rozdílné koncentraci proteázy. Při zvýšení koncentrace proteázy se objevují peptidy, které při nižší koncentraci proteázy nejsou pozorovány. Větší koncentrace *AnPEP* proteázy však znamená i více kontaminujících proteáz. **Tab. 8** (str. 46) ukazuje rozmezí optimální teploty a pH pro jednotlivé třídy kontaminujících proteáz v tabletě Gluten Rid with Tolerance G. Z **Tab. 8** (str. 46) zjistíme, že tato optima se pohybují v rozmezí 40-60 °C a pH 4-6.

#### **4.6 Různé přístupy při prohledávání databázemi**

Při prohledávání byl kromě uvolněného přístupu použit alternativní způsob tzv. scoring metodou, která je striktnější (viz kap. 3.2.10.1). Důvodem bylo ověření zda nejsou pozorované štěpné preference *AnPEP*u ovlivněny primárně zvoleným uvolněným přístupem. Po porovnání grafů štěpných preferencí generovaných při striktnějším a méně striktním způsobu prohledávání databázemi bylo pozorováno, že ani striktní způsob prohledávání databázemi neovlivní výsledné štěpné preference *AnPEP*u při štěpení proteinu bCA2. Z tohoto důvodu jsou v práci uváděny pouze grafy štěpných preferencí vzniklé na základě uvolněnějšího přístupu prohledávání.

#### **4.7 Štěpné preference a peptidové mapy *AnPEP* proteázy**

Pomocí metody LC-MS/MS byly analyzovány proteiny bCA2 a TOMM34 po štěpení *AnPEP* proteázou za různých podmínek. Na základě provedených LC-MS/MS analýz byly vytvořeny grafy štěpných preferencí *AnPEP* proteázy v pozici P1 a P1'.

Výsledné hodnoty byly normalizovány na počet aminokyselin v analyzovaných proteinech a byly získány pomocí následujícího vzorce<sup>54</sup>:

$$CS_{norm} = \frac{\left( \frac{\sum P1_{AA}}{\sum P1_{TOTAL}} \right)}{\left( \frac{\sum sekvence_{AA}}{\sum sekvence_{TOTAL}} \right)}$$

kde  $CS_{norm}$  je normalizovaná specifita štěpení,  $P1_{AA}$  počet jednotlivých aminokyselin v P1 pozici vzniklých peptidů,  $P1_{TOTAL}$  celkový počet štěpení,  $sekvence_{AA}$  celkový počet jednotlivých aminokyselin v analyzovaném substrátu/substrátech,  $sekvence_{TOTAL}$  celkový počet aminokyselin v analyzovaném substrátu/substrátech.

#### 4.7.1 Protein bCA2

Pro LC-MS/MS experimenty byly vybrány vzorky po štěpení *AnPEP* proteázou v roztoku při 4 °C a 40 °C a vzorky po štěpení imobilizovanou *AnPEP* proteázou při 40 °C na 20× a 5× ředěné koloně, v obou případech při pH 2,3 a pH 5,0. LC-MS/MS analýza proteinu bCA2 po štěpení *AnPEP* proteázou ukázala, že se výsledek štěpení především za různých teplot liší. Při zpracování LC-MS/MS směřovala pozornost především k porovnání průměrné délky vzniklých peptidů, redundance a štěpných preferencí mezi jednotlivými podmínkami. Z **Tab. 9** vyplývá, že při štěpení imobilizovaným *AnPEP*em se zvýší efektivita štěpení při zvyšující se koncentraci proteázy na nosiči, která se projeví snížením hodnoty průměrné délky peptidu. Zároveň se ukazuje, že je hodnota průměrné délky peptidu je nižší při pH 5,0 než při pH 2,3. Ve všech experimentech v **Tab. 9** byla pozorována redundance štěpení *AnPEP*em.

**Tab. 9 :** Přehled charakteristik štěpení imobilizovanou *AnPEP* proteázou zjištěných z LC-MS/MS analýz. Substrát bCA2.

Ředění kolony	pH	Teplota [°C]	Průměrná délka peptidu	Sekvenční pokrytí
5×	2,3	40	13,7	98,07
20×	2,3	40	15,3	99,61
5×	5,0	40	11,5	93,44
20×	5,0	40	12,3	100,00

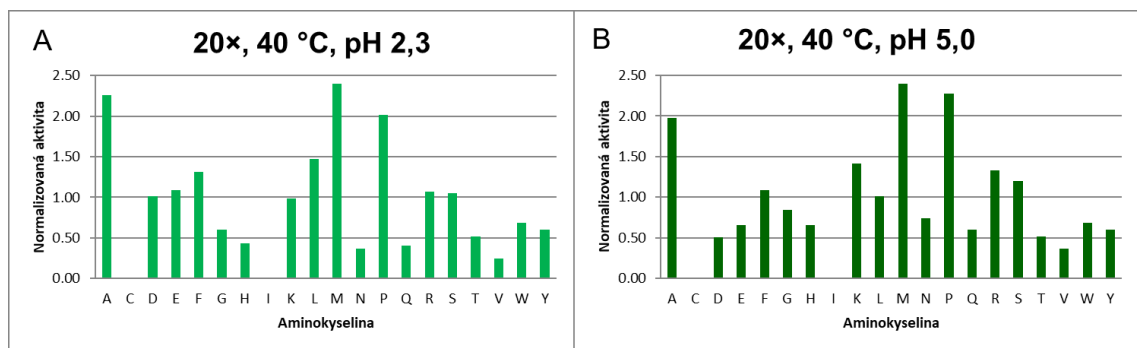
**Tab. 10** demonstruje vliv teploty a koncentrace proteázy na charakter vzniklých peptidů při štěpení v roztoku.

*Tab. 10: Přehled charakteristik štěpení AnPEP proteázou v roztoku zjištěných z LC-MS/MS analýz. Substrát bCA2.*

Poměr proteáza:substrát	pH	Teplota [°C]	Průměrná délka peptidu	Sekvenční pokrytí	Redundance
1:5	2,3	4	14,7	94,21	6,4
1:5	5,0	4	26,7	100,00	9,5
1:5	2,3	40	9,0	73,75	5,6
1:5	5,0	40	18,4	80,69	5,5
1:100	2,3	4	32,0	100,00	10,9
1:100	5,0	4	29,7	46,72	1,5
1:100	2,3	40	16,4	96,53	7,7
1:100	5,0	40	16,8	93,44	4,7

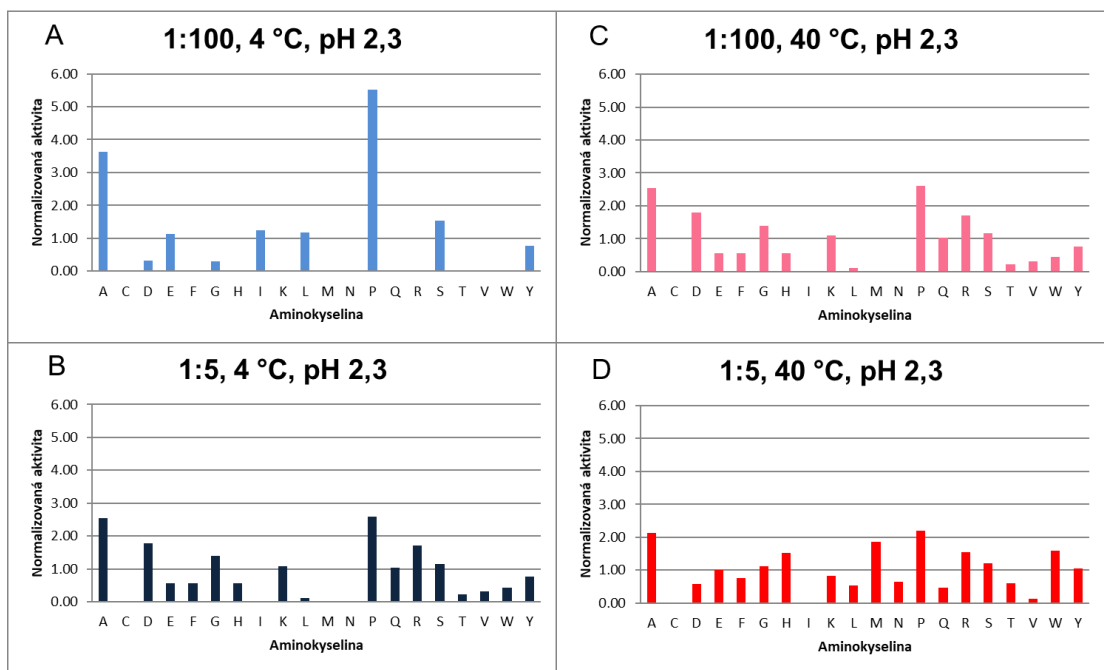
Nejnižší hodnota průměrné délky peptidu naznačující v rámci provedených experimentů nejefektivnější štěpení se objevila při 40 °C u pH 2 a vyšším poměru proteáza:substrát. Opět můžeme u téměř všech experimentů z **Tab. 10** pozorovat trend zvyšování efektivity štěpení při zvýšené koncentraci proteázy v reakční směsi. U štěpení při pH 5,0 a 40 °C se zdá, že zvyšování koncentrace proteázy již dále významně neovlivní průměrnou délku peptidu. Stejně jako při štěpení imobilizovaným AnPEPem se při štěpení v roztoku objevují redundantní peptidy. Výjimkou je redundance 1,5 (pH 5, 4 °C, poměr proteáza:substrát – 1:100).

**Obr. 28** (str. 61) srovnává štěpné preference imobilizované AnPEP proteázy při pH 2,3 a 5,0. Aminokyselinové preference v P1 pozici se z hlediska různých pH významně neliší. V případě obou pH vidíme, že štěpení AnPEP proteázou při 40 °C není specifické.



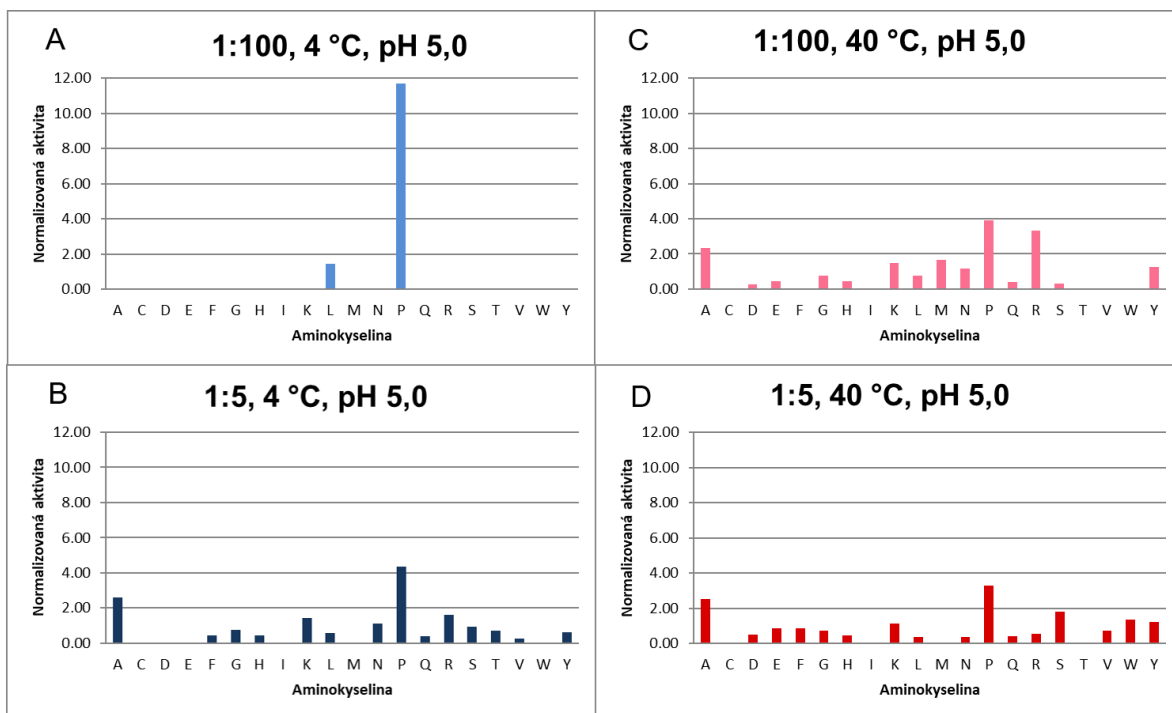
**Obr. 28:** Štěpné preference AnPEP proteázy v P1 pozici, pH 2,3 (A) a pH 5,0 (B), 40 °C, 20× ředěná kolona. Výsledky jsou normalizovány na celkový počet aminokyselin v analyzovaném proteinu (bCA2).

**Obr. 29** srovnává štěpné preference AnPEP proteázy v roztoku z hlediska různých teplot a koncentrací proteázy při pH 2,3. Při nižší teplotě (4 °C) je štěpení více specifické, projeví se více preference prolinu v P1 pozici. Zároveň zde můžeme vidět trend zvyšování specifity při nižším poměru proteáza substrát (1:100).



**Obr. 29:** Štěpné preference AnPEP proteázy v P1 pozici při pH 2,3 za různých teplot a koncentrací proteázy. Štěpení v roztoku, substrát bCA2. 4 °C: A – poměr AnPEP:bCA2 1:100, B – 1:5, 40 °C: C – 1:100 a D – 1:5. Výsledky jsou normalizovány na celkový počet aminokyselin v analyzovaném proteinu (bCA2).

**Obr. 30** srovnává štěpné preference *AnPEP* proteázy v roztoku z hlediska různých teplot a koncentrací proteázy při pH 5,0. Trendy ve štěpných preferencích jsou totožné s těmi u pH 2,3 s tím rozdílem, že v případě pH 5,0 neštěpí *AnPEP* za nízké teploty (4 °C) za Glu a Asp.



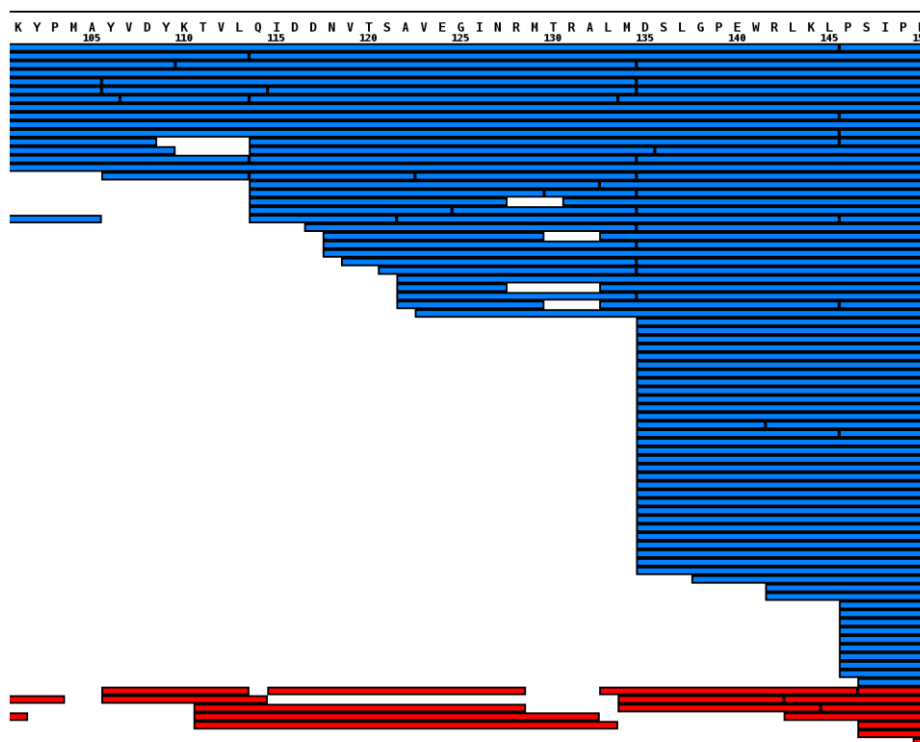
**Obr. 30:** Štěpné preference *AnPEP* proteázy v P1 pozici při pH 5,0 za různých teplot a koncentrací proteázy. Štěpení v roztoku, Substrát *bCA2*. 4 °C: A – poměr *AnPEP*:*bCA2* 1:100, B – 1:5, 40 °C: C – 1:100 a D – 1:5. Výsledky jsou normalizovány na celkový počet aminokyselin v analyzovaném proteinu (*bCA2*).

Z **Obr. 29** (str. 61) a **Obr. 30** je zřejmé, že *AnPEP* štěpí v pozici P1 za prolinem ve větší míře při pH 5,0 než při pH 2,3.

**Příloha P1** (str.77) ukazuje peptidovou mapu *bCA2* po štěpení *AnPEP* proteázou v roztoku při pH 5, poměru proteáza: substrát - 1:5 a teplotě 4 °C a 40 °C. Je ze vidět, že je charakter peptidů při různých teplotách odlišný a že při 40 °C vznikají kratší peptidy. Při 4 °C pozorujeme větší míru štěpení za prolinem. U obou teplot vidíme redundanci danou počtem peptidů pokrývajících daný úsek. **Příloha P2** (str. 78) ukazuje peptidovou mapu *bCA2* po štěpení *AnPEP* proteázou v roztoku při pH 2,3 a 5,0, poměru proteáza: substrát - 1:5 a teplotě 40 °C. Charakter peptidů při pH 2,3 a pH 5,0 je odlišný při pH 2,3 vznikají kratší peptidy. I zde lze pozorovat redundanci štěpení *AnPEP*em.

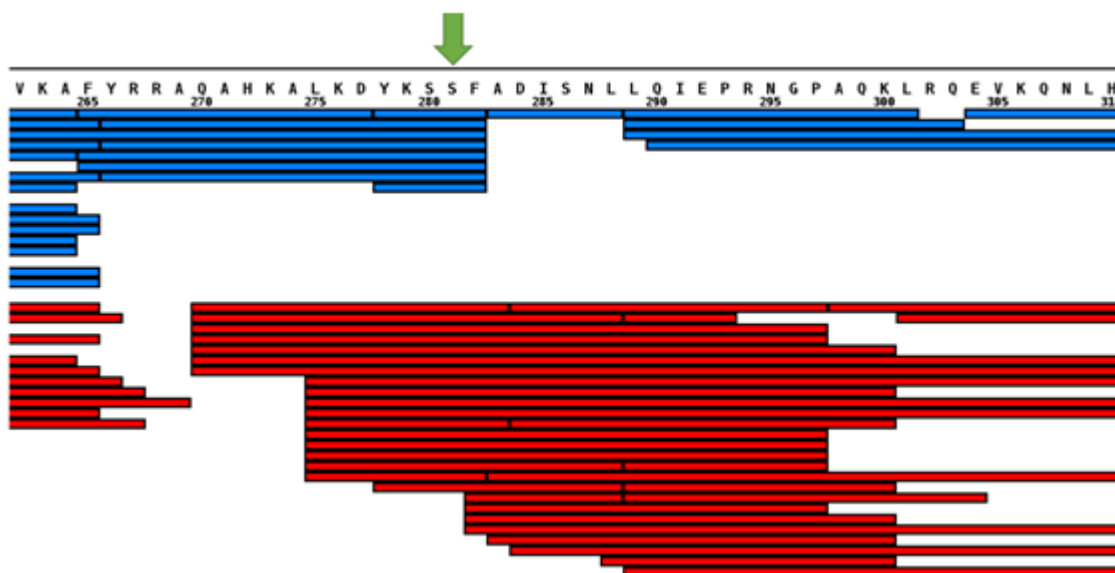
#### 4.7.2 Protein TOMM34 – aplikace *AnPEP* proteázy při identifikaci fosforylovaných míst v proteinu

Nepublikovaná pozorování v Laboratoři strukturní biologie a buněčné signalizace směřují k tomu, že pro analýzu fosforylací je výhodné mít k dispozici různé proteázy a případně enzym štěpící s nižší mírou redundance. Při testování pepsinu se zjistilo, že náboj fosfátu v blízkosti jinak preferovaného místa štěpení má negativní vliv na fragmentaci dané peptidové vazby. Z toho důvodu nedochází ke kvantitativnímu štěpení blízko fosforylace a zhoršuje to schopnost určit míru modifikace proteinu. Použití alternativních proteáz štěpících na odlišných místech (v dostatečné vzdálenosti od místa fosforylace) by tento problém vyřešilo. Zároveň, pokud je míra fosforylace nízká a dochází ke štěpení s vysokou redundancí, je informace o fosforylaci rozdělena mezi velký počet peptidů a může se dostat pod limit detekce. Na **Obr. 31** jsou peptidy z proteinu TOMM34 po štěpení pepsinem a *AnPEP*em. U pepsinu vidíme v porovnání s *AnPEP*em výrazně redundantní styl štěpení.



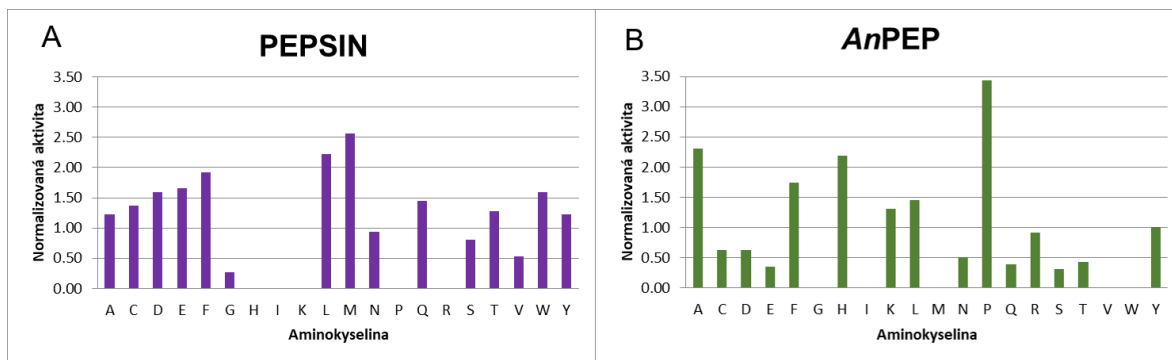
**Obr. 31:** Peptidy TOMM34 po štěpení imobilizovaným pepsinem (modře) a *AnPEP* proteázou (červeně). Pepsin má pro identifikaci a kvantifikaci fosforylací nevýhodu v redundanci štěpení.

Vliv negativního náboje fosfátu na štěpení konkrétní peptidové vazby se ukázal na jiné části proteinu, konkrétně kolem místa Ser 281 (**Obr. 32**). Zde je Phe 282 velmi preferovaným místem štěpení u nefosforylované verze proteinu, ale toto štěpné místo se po fosforylaci prakticky vytrácí a fosforylaci tak není možné kvantifikovat. Na druhou stranu *AnPEP* má jiná zásahová místa a štěpí dále od Ser 281.



**Obr. 32:** Peptidy na C-konci TOMM34 po štěpení imobilizovaným pepsinem (modře) a *AnPEP* proteázou (červeně). Zelená šipka ukazuje na fosforylovaný S281.

**Obr. 33** demonstruje rozdílné štěpné preference *AnPEP* proteázy a pepsinu odvozené z LC-MS/MS analýz proteinu TOMM34. Vidíme, že pepsin oproti *AnPEP*u neštěpí za lysinem, prolinem a argininem.



**Obr. 33:** Štěpení fosforylovaného proteinu TOMM34 imobilizovaným pepsinem (A) a *AnPEP* proteázou (B) v PI pozici. Výsledky jsou normalizovány na celkový počet aminokyselin v analyzovaném proteinu (TOMM34).



## 5 Diskuze

Proteiny jsou významnou součástí všech živých organismů a virů. Identifikace a charakterizace proteinů je proto klíčová pro kompletní porozumění jejich fungování. To umožňují stále se rozvíjející metody založené na hmotnostní spektrometrii. Pro takzvaný bottom-up přístup je zásadní proteolytický krok, který ovlivňuje úspěšnost a relevanci identifikace a charakterizace proteinu. Konvenčně používané proteázy mají ale své limity. Z tohoto důvodu je snahou najít jejich alternativy, které mají především jiné štěpné preference a aktivní profil.

*AnPEP* proteáza (prolyl endoproteáza z *Aspergillus niger*), se vyznačuje se štěpením za prolinem, v jehož okolí mnohé proteázy neštěpí. Její výhodou je i to, že je možné ji získat komerčně ve velkém množství (např. Gluten Rid with Tolerase G, Brewers Clarex). *AnPEP* proteáza byla již otestována v roztoku za HDX-MS podmínek skupinou prof. Hecka<sup>48</sup>.

Cílem této práce bylo ověřit, zda je *AnPEP* proteáza použitelná pro různé oblasti výzkumu proteinů jako je vodík/deuteriová výměna, chemické sítě, rychlá fotochemická oxidace a proteomika. Práce se odvíjela od grafu štěpných preferencí vytvořeného na základě analýz z Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace (**Obr. 14**, str. 43), který za HDX-MS podmínek (pH 2,3 a nízká teplota) ukazoval poměrně vysokou specifitu štěpení za prolinem a alaninem. V této práci byly provedeny experimenty štěpení *AnPEP* proteázou na modelovém proteinu bCA2 za různých podmínek a snahou bylo zjistit, jak se při změně podmínek (teploty, pH, koncentrace proteázy) mění efektivita štěpení a štěpné preference. Vzhledem k tomu, že byl jako zdroj *AnPEP*u v experimentech použit komerčně dodávaný doplněk stravy Gluten Rid with Tolerase G, bylo také vhodné zjistit, jestli/jaké další proteiny kromě *AnPEP*u tento přípravek obsahuje. Po LC-MS/MS analýze obsahu tablety Gluten Rid with Tolerase G bylo identifikováno několik dalších proteáz (**Obr. 16**, str. 45). Článek skupiny prof. Hecka poukazoval na dvě pH optima *AnPEP*u (**Obr. 8**, str. 23)<sup>48</sup>. Takový aktivní profil není pro proteázy běžný. Vzhledem ke zjištěné přítomnosti kontaminujících proteáz je pravděpodobné, že jsou zodpovědné za dvojité pH optimum *AnPEP* preparátu.

Za účelem optimalizace podmínek štěpení *AnPEPu* byla digesce modelového proteinu sledována pomocí MALDI-TOF MS a SDS-PAGE. Nejprve byly prováděny experimenty s imobilizovaným *AnPEP*em. Ukázalo se, že ředění proteinu (bCA2) do kyseliny mravenčí nemá příznivý vliv na štěpení (kap. 4.4.1). Proto byl protein při dalších experimentech ředěn do 20mM glycinu pH 2,3 a octanu amonného pH 5,0, u kterých podobné vlivy nebyly v laboratoři pozorovány. Tím se sice odlišoval roztok pro rozpuštění a následnou digesti proteinu za nižšího pH, ale protože zde peptidy byly jímány ihned po průchodu proteázovou kolonou, nemělo by to mít zásadní vliv.

Dvojnásobný rozdíl průtoků (20 a 40  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ) neovlivnil charakter vzniklých peptidů, měnila se pouze jejich intenzita (kap. 4.4.2). Vyšší průtok (40  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ) především negativně ovlivnil intenzity peptidů s nižším poměrem m/z, protože čas, který protein stráví na koloně je nižší, a v důsledku toho vznikají ve větší míře peptidy o vyšším poměru m/z. Z tohoto důvodu se ukázal jako vhodnější průtok 20  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  a ten byl poté používán ve zbývajících experimentech.

U všech experimentů s imobilizovaným *AnPEP*em byla porovnávána efektivita štěpení při použití různých ředění proteázy na nosiči (200 $\times$ , 20 $\times$  a 5 $\times$ ). Logicky byl sledován trend zvyšování efektivitu štěpení při zvyšování koncentrace proteázy na koloně. Stejně logickou závislost měla i závislost efektivitu štěpení na teplotě (v rozmezí 20-40  $^{\circ}\text{C}$ ) a to jak při pH 2,3, tak při pH 5,0 (kap. 4.4.4 a 4.4.5).

Při pH 2,3 vznikaly obecně v porovnání s pH 5,0 odlišné peptidy. Na základě peptidů, které byly přiřazeny pomocí knihovny vytvořené v programu mMass, lze předpokládat, že je jejich vznik při různých pH ovlivněn protonací aminokyselin okolo štěpené vazby. Například peptidy (Ac-SHHWGYGKHNGP.e, m/z 1418,6) a [13-20] (p.EHWHKDFP.i, m/z 1095,5), které vznikly z peptidu [1-20] (Ac-SHHWGYGKHNGPEHWHKDFP.i, m/z 2495,1) štěpením P-E vazby vznikaly pouze při pH 5,0 možným vlivem deprotonace glutamátu ( $\text{pK}_{\text{COOH}}\sim 4$ ).

Při 20  $^{\circ}\text{C}$  se zdálo, že je efektivnější štěpení při pH 2,3, ale při zvýšení teploty na 40  $^{\circ}\text{C}$  se ukázalo jako efektivnější pH 5,0. Pravděpodobným důvodem odlišnosti efektivitu štěpení pro pH 2,3 a pH 5,0 za různých teplot může být příspěvek kontaminujících proteáz, u kterých bylo dohledáno teplotní optimum v přibližném rozmezí 40-60  $^{\circ}\text{C}$  (**Tab. 8**, str. 46).

Dalším možným příspěvkem může být změna konformace substrátu při vyšší teplotě (40 °C), která změní jeho přístupnost proteáze.

Štěpení *AnPEP* proteázou v roztoku při teplotách 4, 20 a 40 °C bylo efektivnější při vyšší poměru enzym:substrát (1:5) než při nižším (1:100). Na MS spektrech ukazujících štěpení *AnPEP* proteázou v roztoku byl při porovnání pH 2,3 a pH 5,0 viditelný rozdíl mezi vznikajícími peptidy (kap. 4.5). Vliv opět může mít pravděpodobně protonace aminokyseliny v sousedství štěpené vazby, nebo kontaminující proteázy v tabletě Gluten Rid with Tolerase G. Při 40 °C, pH 5 a poměru enzym:substrát 1:5 se pomocí knihovny vytvořené v programu mMass nepodařilo, ani při velké toleranci na správnost měření (300 ppm), přiřadit žádné peptidy (kap. 4.5.2). Možným důvodem může být převládající vliv kontaminujících proteáz, jejichž teoretické peptidy nejsou zařazeny v knihovně.

Za účelem získání detailnějších informací o štěpení *AnPEP*em za různých podmínek byly vybrané vzorky podrobeny LC-MS/MS analýze. V případě imobilizovaného *AnPEP*u byla zvolena 20× a 5× ředěná kolona při 40 °C a pH 2,3 a 5,0 (kap. 4.7.1). U obou pH tvořil *AnPEP* kratší peptidy štěpením na 5× ředěné koloně (více proteázy). Ukázalo se, že kratší peptidy vznikají také preferenčně při pH 5,0 v porovnání s pH 2,3, což naznačuje efektivnější štěpení za tohoto pH. Příčinou může být opět příspěvek kontaminujících proteáz, u nichž bylo nalezeno pH optimum v rozmezí 4-6 (**Tab. 8**, str. 46). Při teplotě 40 °C vykazoval *AnPEP* vysokou redundanci štěpení. Ta u některých metod strukturní biologie a v proteomice, kde není modifikace proteinu kvantitativní, způsobí nemožnost identifikace v důsledku snížených intenzit peptidů, protože se tato informace o možné modifikaci proteinu ještě distribuuje mezi více peptidů. Z grafů štěpných preferencí vidíme, že *AnPEP* při 40 °C nemá vyhraněnou štěpnou preferenci pro žádnou z aminokyselin. Peptidová směs se tak stává komplexnější. Z výše uvedeného lze usoudit, že *AnPEP* z tablety není bez další purifikace vhodný pro metody výzkumu proteinů jako je proteomika, chemické sítěni či rychlá fotochemická oxidace.

V případě štěpení v roztoku byla LC-MS/MS analýza provedena pro vzorky štěpené přes noc při 4, 20 a 40 °C a poměrech proteáza:substrát 1:100 a 1:5 (kap. 4.7.1). Nejkratší peptidy, naznačující nejefektivnější štěpení, byly pozorovány při 40 °C, pH 2,3 a větším

množství proteázy (poměr 1:5). Důvodem pro vznik delších peptidů při 4 °C je nižší aktivita enzymu a potlačení aktivity i kontaminujících proteáz.

Při štěpení imobilizovaným *AnPEP*em se ale jako efektivnější ukázalo pH 5,0. Možným vysvětlením může být fakt, že se při imobilizaci (mechanismus viz **Obr. 5**, str. 21) vytvoří Schiffova báze (amin z enzymu a karbonyl z nosiče) a blokování některých aminokyselin může vést k inaktivaci enzymu, což ve výsledku způsobí snížení aktivity, a to může být důsledkem jiné preference z hlediska pH. Vzhledem k tomu, že *AnPEP* má bazickou aminokyselinu lysin distribuovanu po celé své sekvenci (**Obr. 7**, str. 22), může imobilizace negativně ovlivňovat jeho aktivitu.

Vysoká redundance štěpení byla pozorována i u experimentů v roztoku při teplotách 4 a 40 °C. Výjimkou byla nízká redundance u vzorku štěpeného při pH 5, 4 °C a nižším poměru proteáza:substrát. To je pravděpodobně způsobeno tím, že byl protein štěpen menším množstvím proteázy a za nižší teploty, a tak byla menší šance, že se objeví peptidy pocházející z kontaminujících proteáz. Dalším možným důvodem může být snížení aktivity *AnPEP*u při nízké teplotě, v důsledku čehož vzniká méně překrývajících se peptidů. Vliv může mít i protonace aminokyselin okolo štěpené vazby při pH 5,0 a nízké teplotě, která způsobí štěpení téměř výhradně za prolinem. Změna konformace proteázy a substrátu za těchto podmínek může způsobit nepřístupnost některých štěpných míst.

Štěpné preference se měnily v závislosti na teplotě a koncentraci proteázy v reakční směsi. Při nižší teplotě (4 °C) bylo štěpení oproti 40 °C více specifické a projevila se preference prolinu v P1 pozici. Takovéto pozorování je pravděpodobně způsobeno tím, že kontaminující proteázy nejsou při 4 °C tolik aktivní. Zároveň bylo možné pozorovat trend zvyšování specifity při nižším poměru proteáza substrát (1:100). Důvodem může být, vzhledem majoritnímu procentuálnímu zastoupení *AnPEP*u v preparátu, menší příspěvek kontaminujících proteáz.

Štěpné preference *AnPEP*u při štěpení v roztoku při 40 °C byly v rozporu s výsledky publikovanými skupinou prof. Hecka (**Obr. 9**, str. 24)<sup>32</sup>, podle kterých tato proteáza štěpila specificky za prolinem na alaninem. Z jejich publikace však není jasné jaké čistoty *AnPEP* byl a zda nebyl preparát z tablety dále purifikován. Skupina prof. Hecka provedla štěpení na buněčném lyzátu, v této práci byl pro testování použit pouze jeden modelový protein

o vysoké čistotě. Bylo tak možné použít méně přísná kritéria při prohledání databázemi a manuálně ověřit případné chybné identifikace. Zavedení méně přísných kritérií při prohledávání může ale způsobit, že se přiřadí nesprávné peptidy. Na druhou stranu proteomici provádí proteolýzu buněčných lyzátů, pracují s obrovským objemem dat a musí se tak při jejich zpracování spolehnout na statistické přístupy. Při prohledávání databázemi proteinů používají striktní hraniční hodnoty pro skóre a provádí tzv. maskovací prohledání. Iontové skóre vypovídá o tom, kolik fragmentových iontů daného peptidu bylo přiřazeno. Maskovací prohledání spočívá v tom, že jsou peptidy v databázi různě proházeny, jsou tak irelevantní a při tomto přístupu bychom jich měli identifikovat co nejmenší procento. Při použití takto striktního přístupu však může dojít k tomu, že se některé relevantní peptidy do výsledku nezařadí. Z porovnání grafů štěpných preferencí vytvořených na základě uvolněnějšího a striktnějšího způsobu prohledání vyplynulo, že ani striktního způsob prohledávání databázemi neovlivní výsledné štěpné preference *AnPEP*u při štěpení proteinu bCA2. I při striktnějším způsobu prohledání se vyskytovaly nespecifity ve štěpení, což potvrzuje vliv kontaminujících proteáz.

Nepublikovaná pozorování v Laboratoři strukturní biologie a buněčné signalizace směřovala k tomu, že je mírné redundantní štěpení výhodné pro identifikaci a kvantifikaci fosforylací. Proto byl otestován *AnPEP* na fosforylovaném proteinu TOMM34 jako možná alternativa pepsinu ve fosfoproteomice (kap. 4.7.2). V porovnání s pepsinem, který měl v některých oblastech příliš vysokou redundanci, byla redundance peptidů vzniklých po štěpení *AnPEP*em přiměřená (**Obr. 31**, str. 63). Když je redundance příliš vysoká, informace o fosforylaci ztrácí, protože je distribuována mezi více peptidy. *AnPEP* se ukázal jako výhodný i z hlediska toho, kde v sekvenci proteinu TOMM34 štěpil. Vzhledem k negativnímu náboji fosfátu je běžné, že proteázy v blízkosti fosforylovaného serinu neštěpí, vznikají opomenutá místa štěpení a příliš dlouhé peptidy, které se mohou hůře fragmentovat a identifikovat. Také nelze vůči sobě vztahovat nefosforylovanou a fosforylovanou verzi určitého peptidu, protože vznikají fragmenty odlišné délky/sekvence. V případě štěpení TOMM34 pepsinem se ukázalo, že je S281 komplikované identifikovat, protože se nachází v blízkosti zásahového místa proteázy (Phe), přičemž negativně ovlivňuje míru štěpení na tomto místě. Fosforylaci tak není možné kvantifikovat.

Oproti tomu *AnPEP*, díky jiné specifitě štěpení, štěpí dále od S281 a vliv negativního náboje fosfátu na štěpení se tím eliminuje (**Obr. 32**, str. 64).

Z výše uvedeného vyplývá, že v závislosti na tom, pro jaké oblasti výzkumu proteinů chceme *AnPEP* použít, volíme různé podmínky štěpení. *AnPEP* je na základě experimentů provedených v roztoku na modelovém proteinu bCA2 vhodný pro HDX-MS při teplotě 4 °C a pH 2,3. Tato proteáza je naopak nevhodná pro metody výzkumu proteinů jako je chemické sítění, rychlá fotochemické oxidace či proteomika. Ve specifických případech zahrnujících identifikaci a kvantifikaci fosforylací je ale *AnPEP* pro proteomiku vhodný. Zjišťování štěpných preferencí na dvou proteinech (bCA2, TOMM34) samozřejmě neposkytuje kompletní obrázek a pro získání informace o štěpných preferencích se statisticky vypovídající hodnotou by bylo nutné provést analýzu štěpení na více proteinech. Na druhou stranu je i z této orientační analýzy možné udělat závěr, že použití komerčního zdroje *AnPEP* proteázy (Gluten Rid with Tolerase G) způsobuje vzhledem k výskytu kontaminujících proteáz výraznou míru nesespecifického štěpení. Tyto nesespecifity je možné eliminovat snížením teploty štěpení na 4 °C (pH 2,3), nebo by je bylo možné odstranit purifikací preparátu či rekombinantní expresí *AnPEP*u.

## 6 Závěr

Po provedené LC-MS/MS analýze bylo zjištěno, že tableta Gluten Rid with Tolerase G obsahuje i jiné proteázy než *AnPEP*. Poté byla úspěšně vytvořena knihovna pro program mMass, která usnadnila vyhodnocování MS spekter.

Ze sestrojených grafů štěpných preferencí a z peptidových map vytvořených na základě LC-MS/MS analýz štěpení proteinu bca2 a TOMM34 vyplynulo, že je *AnPEP* proteázou použitelnou pro HDX-MS v roztoku a v imobilizované formě a pro detailní analýzu fosforylací izolovaných proteinů. Na druhou stranu je kvůli nespecifickému stylu štěpení za vyšších teplot (20-50 °C) méně vhodná pro metody výzkumu proteinů jako je chemické sítění, rychlá fotochemická oxidace a proteomika.

Z MALDI-TOF MS analýz a SDS-PAGE elektroforézy provedených na modelovém proteinu bCA2 byl zjištěn trend zvyšování efektivity štěpení při zvyšující se teplotě a koncentraci proteázy a při snižujícím se průtoku. Po imobilizaci bylo efektivnější štěpení při pH 5,0 a při štěpení v roztoku bylo efektivnější pH 2,3.

Z LC-MS/MS analýz po štěpení proteinu TOMM34 *AnPEP* proteázou je zřejmé, že *AnPEP* tvoří kratší peptidy s menší redundancí a má jiné štěpné preference než pepsin.

## 7 Literatura

- (1) Gurumallesh, P.; Alagu, K.; Ramakrishnan, B.; Muthusamy, S. A Systematic Reconsideration on Proteases. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *128*, 254–267.
- (2) López-Otín, C.; Bond, J. S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283* (45), 30433–30437.
- (3) Kučerová Z. Úloha Proteolýzy v Lidském Těle. *Klinická biochemie a metabolismus* **2017**, *4*, 182–185.
- (4) Khan, A. R.; James, M. N. G. Molecular Mechanisms for the Conversion of Zymogens to Active Proteolytic Enzymes. *Protein Science* **1998**, *7* (4), 815–836.
- (5) Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and molecular biology reviews* **1998**, *62* (3), 597–635.
- (6) Hedstrom, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews* **2002**, *102* (12), 4501–4524.
- (7) Di Cera, E. Serine Proteases. *IUBMB Life* **2009**, *61* (5), 510–515.
- (8) Neitzel, J. J. Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. *Nature Education* **2010**, *3* (9), 21.
- (9) Giansanti, P.; Tsiatsiani, L.; Low, T. Y.; Heck, A. J. R. Six Alternative Proteases for Mass Spectrometry–Based Proteomics beyond Trypsin. *Nature Protocols* **2016**, *11* (5), 993–1006.
- (10) Sulniute, R.; Shen, Y.; Guo, Y.-Z.; Fallah, M.; Ahlskog, N.; Ny, L.; Rakhimova, O.; Broden, J.; Boija, H.; Moghaddam, A.; Li, J.; Wilczynska, M.; Ny, T. Plasminogen Is a Critical Regulator of Cutaneous Wound Healing. *Thrombosis and Haemostasis* **2016**, *115* (5), 1001–1009.
- (11) Polgár, L. The Mechanism of Action of Aspartic Proteases Involves “push-Pull” Catalysis. *FEBS letters* **1987**, *219* (1), 1–4.
- (12) Suguna, K.; Padlan, E. A.; Smith, C. W.; Carlson, W. D.; Davies, D. R. Binding of a Reduced Peptide Inhibitor to the Aspartic Proteinase from *Rhizopus Chinensis*: Implications for a Mechanism of Action. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1987**, *84* (20), 7009–7013.
- (13) James, M. N. G.; Sielecki, A. R. Stereochemical Analysis of Peptide Bond Hydrolysis Catalyzed by the Aspartic Proteinase Penicillopepsin. *Biochemistry* **1985**, *24* (14), 3701–3713.
- (14) Beneš, P.; Větvicka, V.; Fusek, M. Cathepsin D - Many Functions of One Aspartic Protease. *Critical reviews in oncology/hematology* **2008**, *68* (1), 12–28.
- (15) Fricker, S. P. Cysteine Proteases as Targets for Metal-Based Drugs. *Metallomics* **2010**, *2* (6), 366.
- (16) Rawlings, N. D.; Barrett, A. J. Introduction: Metallopeptidases and Their Clans. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*; Elsevier, 2004; pp 231–267.
- (17) Holmes, M. A.; Matthews, B. W. Binding of Hydroxamic Acid Inhibitors to Crystalline Thermolysin Suggests a Pentacoordinate Zinc Intermediate in Catalysis. *Biochemistry* **1981**, *20* (24), 6912–6920.
- (18) Adekoya, O. A.; Sylte, I. The Thermolysin Family (M4) of Enzymes: Therapeutic and Biotechnological Potential. *Chemical Biology & Drug Design* **2009**, *73* (1), 7–16.
- (19) Switzar, L.; Giera, M.; Niessen, W. M. A. Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments. *Journal of Proteome Research* **2013**, *12* (3), 1067–1077.
- (20) Tsiatsiani, L.; Heck, A. J. R. Proteomics beyond Trypsin. *FEBS Journal* **2015**, *282* (14), 2612–2626.
- (21) Zhang, Y.; Fonslow, B. R.; Shan, B.; Baek, M.-C.; Yates, J. R. Protein Analysis by



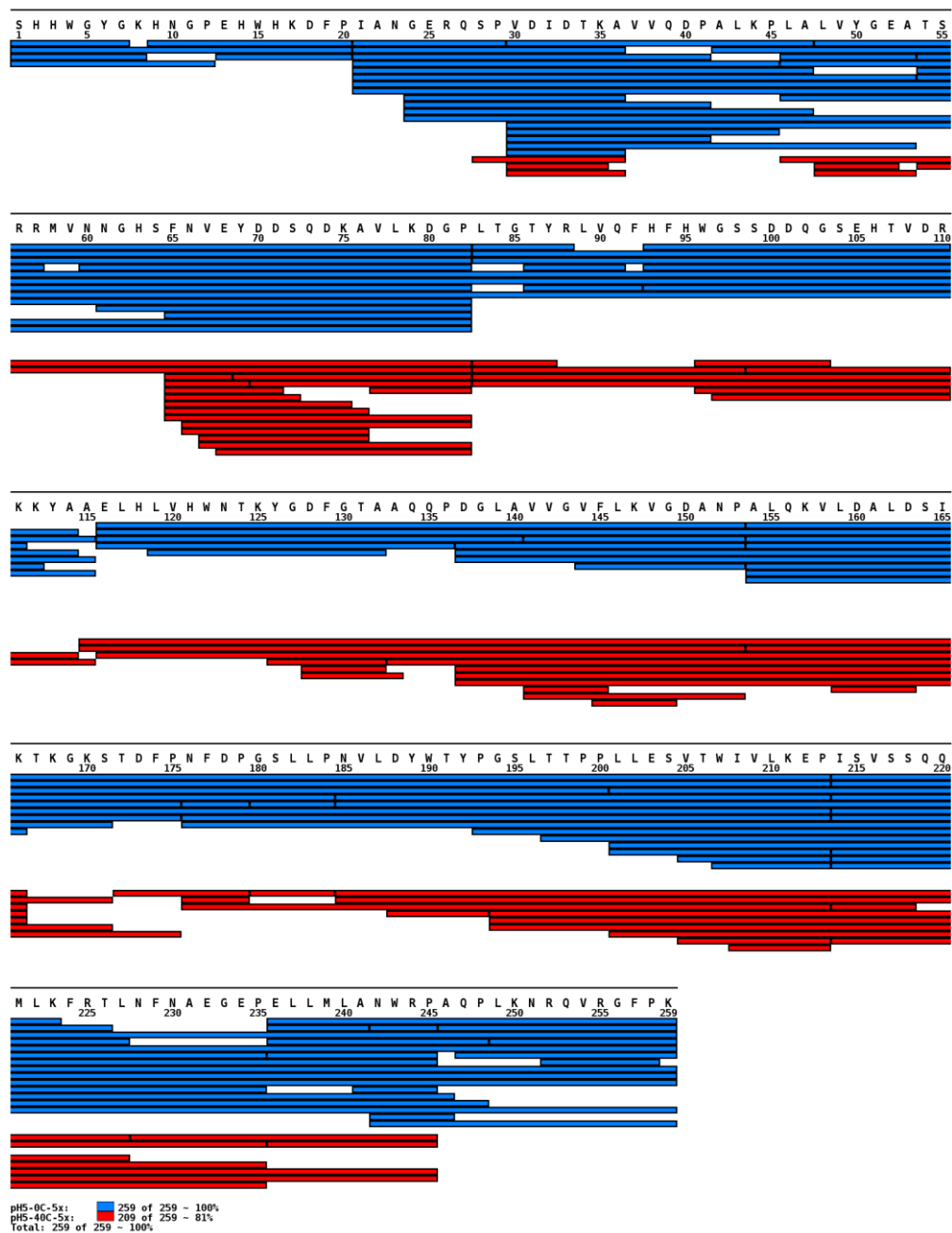
- Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews* **2013**, *113* (4), 2343–2394.
- (22) El Kennani, S.; Crespo, M.; Govin, J.; Pflieger, D. Proteomic Analysis of Histone Variants and Their PTMs: Strategies and Pitfalls. *Proteomes* **2018**, *6* (3), 29.
- (23) Smith, L. M.; Kelleher, N. L. Proteoforms as the next Proteomics Currency. *Science* **2018**, *359* (6380), 1106–1107.
- (24) Han, X.; Aslanian, A.; Yates, J. R. Mass Spectrometry for Proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, *12* (5), 483–490.
- (25) Moradian, A.; Kalli, A.; Sweredoski, M. J.; Hess, S. The Top-down, Middle-down, and Bottom-up Mass Spectrometry Approaches for Characterization of Histone Variants and Their Post-Translational Modifications. *Proteomics* **2014**, *14* (4–5), 489–497.
- (26) Wu, C. C.; Yates, J. R. The Application of Mass Spectrometry to Membrane Proteomics. *Nature Biotechnology* **2003**, *21* (3), 262–267.
- (27) Olsen, J. V.; Ong, S.-E.; Mann, M. Trypsin Cleaves Exclusively C-Terminal to Arginine and Lysine Residues. *Molecular & Cellular Proteomics* **2004**, *3* (6), 608–614.
- (28) Swaney, D. L.; Wenger, C. D.; Coon, J. J. Value of Using Multiple Proteases for Large-Scale Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Journal of Proteome Research* **2010**, *9* (3), 1323–1329.
- (29) Guo, X.; Trudgian, D. C.; Lemoff, A.; Yadavalli, S.; Mirzaei, H. A Multiprotease Map of the *HeLa* Proteome for Comprehensive Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* **2014**, *13* (6), 1573–1584.
- (30) GluC - Sequencing grade protocol <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/n/9piv165-glu-c-sequencing-grade-protocol.pdf?la=en>, [cit. 2020-04-18].
- (31) Schröder, C. U.; Lee, L.; Rey, M.; Sarpe, V.; Man, P.; Sharma, S.; Zabrouskov, V.; Larsen, B.; Schriemer, D. C. Neprosin, a Selective Prolyl Endoprotease for Bottom-up Proteomics and Histone Mapping. *Molecular & Cellular Proteomics* **2017**, *16* (6), 1162–1171.
- (32) Laarse, S. A. M.; Gelder, C. A. G. H.; Bern, M.; Akeroyd, M.; Olsthoorn, M. M. A.; Heck, A. J. R. Targeting Proline in (Phospho)Proteomics. *The FEBS Journal* **2020**, febs.15190.
- (33) Šebela, M.; Řehulka, P.; Kábrt, J.; Řehulková, H.; Oždian, T.; Raus, M.; Franc, V.; Chmelík, J. Identification of N-Glycosylation in Prolyl Endoprotease from *Aspergillus Niger* and Evaluation of the Enzyme for Its Possible Application in Proteomics: Prolyl Endoprotease from *Aspergillus Niger*. *Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *44* (11), 1587–1595.
- (34) Gauci, S.; Helbig, A. O.; Slijper, M.; Krijgsveld, J.; Heck, A. J. R.; Mohammed, S. Lys-N and Trypsin Cover Complementary Parts of the Phosphoproteome in a Refined SCX-Based Approach. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (11), 4493–4501.
- (35) Young, M. M.; Tang, N.; Hempel, J. C.; Oshiro, C. M.; Taylor, E. W.; Kuntz, I. D.; Gibson, B. W.; Dollinger, G. High Throughput Protein Fold Identification by Using Experimental Constraints Derived from Intramolecular Cross-Links and Mass Spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97* (11), 5802–5806.
- (36) Hambly, D. M.; Gross, M. L. Laser Flash Photolysis of Hydrogen Peroxide to Oxidize Protein Solvent-Accessible Residues on the Microsecond Timescale. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16* (12), 2057–2063.
- (37) Katta, V.; Chait, B. T.; Carr, S. Conformational Changes in Proteins Probed by Hydrogen-Exchange Electrospray-Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1991**, *5* (4), 214–217. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290050415>.
- (38) Engen, J. R. Analysis of Protein Conformation and Dynamics by Hydrogen/Deuterium Exchange MS. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (19), 7870–7875.
- (39) Marcisisin, S. R.; Engen, J. R. Hydrogen Exchange Mass Spectrometry: What Is It and What Can It Tell Us? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397* (3), 967–972.
- (40) Filandr, F.; Kavan, D.; Kracher, D.; Laurent, C. V. F. P.; Ludwig, R.; Man, P.; Halada, P.

- Structural Dynamics of Lytic Polysaccharide Monooxygenase during Catalysis. *Biomolecules* **2020**, *10* (2), 242.
- (41) Englander, S. W.; Kallenbach, N. R. Hydrogen Exchange and Structural Dynamics of Proteins and Nucleic Acids. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1983**, *16* (4), 521–655.
- (42) Rosa, J. J.; Richards, F. M. An Experimental Procedure for Increasing the Structural Resolution of Chemical Hydrogen-Exchange Measurements on Proteins: Application to Ribonuclease S Peptide. *Journal of Molecular Biology* **1979**, *133* (3), 399–416.
- (43) Zhang, Z.; Smith, D. L. Determination of Amide Hydrogen Exchange by Mass Spectrometry: A New Tool for Protein Structure Elucidation. *Protein Science* **1993**, *2* (4), 522–531.
- (44) Wales, T. E.; Engen, J. R. Hydrogen Exchange Mass Spectrometry for the Analysis of Protein Dynamics. *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, *25* (1), 158–170.
- (45) Deng, Y.; Zhang, Z.; Smith, D. L. Comparison of Continuous and Pulsed Labeling Amide Hydrogen Exchange/Mass Spectrometry for Studies of Protein Dynamics. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10* (8), 675–684.
- (46) Powers, J. C.; Harley, A. D.; Myers, D. V. Subsite Specificity of Porcine Pepsin. In *Acid Proteases: Structure, Function, and Biology*; Tang, J., Ed.; Springer US: New York, NY, 1977; Vol. 95, pp 141–157.
- (47) Hamuro, Y.; Coales, S. J.; Molnar, K. S.; Tuske, S. J.; Morrow, J. A. Specificity of Immobilized Porcine Pepsin in H/D Exchange Compatible Conditions. *Rapid communications in mass spectrometry* **2008**, *22* (7), 1041–1046.
- (48) Tsiatsiani, L.; Akeroyd, M.; Olsthoorn, M.; Heck, A. J. R. Aspergillus Niger Prolyl Endoprotease for Hydrogen–Deuterium Exchange Mass Spectrometry and Protein Structural Studies. *Analytical Chemistry* **2017**, *89* (15), 7966–7973.
- (49) Rey, M.; Yang, M.; Burns, K. M.; Yu, Y.; Lees-Miller, S. P.; Schriemer, D. C. Nepenthesin from Monkey Cups for Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* **2013**, *12* (2), 464–472.
- (50) Marcoux, J.; Thierry, E.; Vivès, C.; Signor, L.; Fieschi, F.; Forest, E. Investigating Alternative Acidic Proteases for H/D Exchange Coupled to Mass Spectrometry: Plasmepsin 2 but Not Plasmepsin 4 Is Active under Quenching Conditions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, *21* (1), 76–79.
- (51) Zhang, H.-M.; Kazazic, S.; Schaub, T. M.; Tipton, J. D.; Emmett, M. R.; Marshall, A. G. Enhanced Digestion Efficiency, Peptide Ionization Efficiency, and Sequence Resolution for Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (23), 9034–9041.
- (52) Zhang, H.-M.; McLoughlin, S. M.; Frausto, S. D.; Tang, H.; Emmett, M. R.; Marshall, A. G. Simultaneous Reduction and Digestion of Proteins with Disulfide Bonds for Hydrogen/Deuterium Exchange Monitored by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (4), 1450–1454.
- (53) Rey, M.; Man, P.; Brandolin, G.; Forest, E.; Pelosi, L. Recombinant Immobilized Rhizopuspepsin as a New Tool for Protein Digestion in Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, *23* (21), 3431–3438.
- (54) Kádek, A.; Mrázek, H.; Halada, P.; Rey, M.; Schriemer, D. C.; Man, P. Aspartic Protease Nepenthesin-1 as a Tool for Digestion in Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2014**, *86* (9), 4287–4294.
- (55) Kádek, A.; Tretyachenko, V.; Mrázek, H.; Ivanová, L.; Halada, P.; Rey, M.; Schriemer, D. C.; Man, P. Expression and Characterization of Plant Aspartic Protease Nepenthesin-1 from *Nepenthes Gracilis*. *Protein Expression and Purification* **2014**, *95*, 121–128.
- (56) Yang, M.; Hoepfner, M.; Rey, M.; Kádek, A.; Man, P.; Schriemer, D. C. Recombinant Nepenthesin II for Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*

- 2015**, 87 (13), 6681–6687.
- (57) Ahn, J.; Cao, M.-J.; Yu, Y. Q.; Engen, J. R. Accessing the Reproducibility and Specificity of Pepsin and Other Aspartic Proteases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2013**, 1834 (6), 1222–1229.
- (58) Wang, L.; Pan, H.; Smith, D. L. Hydrogen Exchange-Mass Spectrometry: Optimization of Digestion Conditions. *Molecular & Cellular Proteomics* **2002**, 1 (2), 132–138.
- (59) Englander, S. W.; Downer, N. W.; Teitelbaum, H. Hydrogen Exchange. *Annual Review of Biochemistry* **1972**, 41 (1), 903–924.
- (60) Cravello, L.; Lascoux, D.; Forest, E. Use of Different Proteases Working in Acidic Conditions to Improve Sequence Coverage and Resolution in Hydrogen/Deuterium Exchange of Large Proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, 17 (21), 2387–2393.
- (61) Man, P.; Montagner, C.; Vernier, G.; Dublet, B.; Chenal, A.; Forest, E.; Forge, V. Defining the Interacting Regions between Apomyoglobin and Lipid Membrane by Hydrogen/Deuterium Exchange Coupled to Mass Spectrometry. *Journal of Molecular Biology* **2007**, 368 (2), 464–472.
- (62) Brier, S.; Maria, G.; Carginale, V.; Capasso, A.; Wu, Y.; Taylor, R. M.; Borotto, N. B.; Capasso, C.; Engen, J. R. Purification and Characterization of Pepsins A1 and A2 from the Antarctic Rock Cod *Trematomus Bernacchii*: Characterizing Pepsins from Antarctic Fish. *FEBS Journal* **2007**, 274 (23), 6152–6166.
- (63) Rey, M.; Yang, M.; Lee, L.; Zhang, Y.; Sheff, J. G.; Sensen, C. W.; Mrazek, H.; Halada, P.; Man, P.; McCarville, J. L.; Verdu, E. F.; Schriemer, D. C. Addressing Proteolytic Efficiency in Enzymatic Degradation Therapy for Celiac Disease. *Scientific Reports* **2016**, 6 (1), 30980.
- (64) ThermoFisher. POROS™ 20 AL, EP and OH Perfusion Chromatography Bulk Media for Activated Affinity Chromatography [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/80031400993\\_20AL\\_EPBulkMedia\\_PI.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/80031400993_20AL_EPBulkMedia_PI.pdf), [cit. 2020-04-11].
- (65) Stepniak, D.; Spaenij-Dekking, L.; Mitea, C.; Moester, M.; de Ru, A.; Baak-Pablo, R.; van Veelen, P.; Edens, L.; Koning, F. Highly Efficient Gluten Degradation with a Newly Identified Prolyl Endoprotease: Implications for Celiac Disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **2006**, 291 (4), G621–G629.
- (66) Edens, L.; Dekker, P.; van der Hoeven, R.; Deen, F.; de Roos, A.; Floris, R. Extracellular Prolyl Endoprotease from *Aspergillus Niger* and Its Use in the Debittering of Protein Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53 (20), 7950–7957.
- (67) Akeroyd, M.; van Zandycke, S.; den Hartog, J.; Mutsaers, J.; Edens, L.; van den Berg, M.; Christis, C. AN-PEP, Proline-Specific Endopeptidase, Degrades All Known Immunostimulatory Gluten Peptides in Beer Made from Barley Malt. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2016**, 74 (2), 91–99.
- (68) Lopez, M.; Edens, L. Effective Prevention of Chill-Haze in Beer Using an Acid Proline-Specific Endoprotease from *Aspergillus Niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53 (20), 7944–7949.
- (69) Di Ghionno, L.; Marconi, O.; Sileoni, V.; De Francesco, G.; Perretti, G. Brewing with Prolyl Endopeptidase from *Aspergillus Niger*: The Impact of Enzymatic Treatment on Gluten Levels, Quality Attributes and Sensory Profile. *International Journal of Food Science & Technology* **2017**, 52 (6), 1367–1374.
- (70) Mitea, C.; Havenaar, R.; Drijfhout, J. W.; Edens, L.; Dekking, L.; Koning, F. Efficient Degradation of Gluten by a Prolyl Endoprotease in a Gastrointestinal Model: Implications for Coeliac Disease. *Gut* **2007**, 57 (1), 25–32.
- (71) Rohini, R. V.; Ciaran, P. K. Novel Therapeutic Approaches for Celiac Disease. *Discovery Medicine* **2014**, 17 (95), 285–293.
- (72) Wieser, H. Chemistry of Gluten Proteins. *Food Microbiology* **2007**, 24 (2), 115–119.

- (73) Parzanese, I.; Qehajaj, D.; Patrinicola, F.; Aralica, M.; Chiriva-Internati, M.; Stifter, S.; Elli, L.; Grizzi, F. Celiac Disease: From Pathophysiology to Treatment. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* **2017**, *8* (2), 27.
- (74) Shan, L. Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue. *Science* **2002**, *297* (5590), 2275–2279.
- (75) Janssen, G.; Christis, C.; Kooy-Winkelaar, Y.; Edens, L.; Smith, D.; van Veelen, P.; Koning, F. Ineffective Degradation of Immunogenic Gluten Epitopes by Currently Available Digestive Enzyme Supplements. *Public Library of Science ONE* **2015**, *10* (6), e0128065.
- (76) Shan, L.; Marti, T.; Sollid, L. M.; Gray, G. M.; Khosla, C. Comparative Biochemical Analysis of Three Bacterial Prolyl Endopeptidases: Implications for Coeliac Sprue. *Biochemical Journal* **2004**, *383* (2), 311–318.
- (77) Strohal, M.; Kavan, D.; Novák, P.; Volný, M.; Havlíček, V. MMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (11), 4648–4651.
- (78) Kavan, D.; Man, P. MSTools—Web Based Application for Visualization and Presentation of HXMS Data. *International Journal of Mass Spectrometry* **2011**, *302* (1–3), 53–58.
- (79) Horse Myoglobin <https://www.uniprot.org/uniprot/P68082> [cit. 2020-06-40].
- (80) Carbonic Anhydrase 2 <https://www.uniprot.org/uniprot/P00921> [cit. 2020-06-40].
- (81) Human E3 ubiquitin-protein ligase CHIP <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UNE7> [cit. 2020-06-40].
- (82) Human TOMM34 <https://www.uniprot.org/uniprot/Q15785> [cit. 2020-06-40].

# Přílohy



**Příloha 1: Peptidy bCA2 vzniklé štěpením AnPEP proteázy v roztoku při pH 5, poměru proteáza: substrát - 1:5 a teplotě 4 °C (modře) a 40 °C (červeně).**

S H H W G Y G K H N G P E H W H K D F P I A N G E R Q S P V D I D T K A V V Q D P A L K P L A L V Y G E A T S  
 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55

R R M V H N G H S F N V E Y D D S Q D K A V L K D G P L T G Y R L V Q F H F H W G S S D D D G S E H T V D R  
 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110

K K Y A A E L H L V H W N T K Y G D F G T A A Q G P D G L A V V G V F L K V G D A N P A L Q K V L D A L D S I  
 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165

K T K G K S T D F P N F D P G S L L P N V L D Y W T Y P G S L T T P P L L E S V T W I V L K E P I S V S S Q  
 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220

M L K F R T L N F N A E G E P E L L M L A N W R P A Q P L K N R Q V R G F P K  
 225 230 235 240 245 250 255 259

pH2-40C-5x: 191 of 259 - 74%  
 pH5-40C-5x: 209 of 259 - 81%  
 Total: 247 of 259 - 95%

**Příloha 2: Peptidy bCA2 vzniklé štěpením AnPEP proteázy v roztoku při pH 2,3 (modře) a pH 5,0 (červeně), poměru proteáza: substrát - 1:5 a teplotě 40 °C.**