

Abstrakt

Proteiny a enzymy, které ke své aktivitě vyžadují přítomnost specifického ligandu, kofaktoru, popřípadě prostetické skupiny, podléhají po navázání příslušných molekul konformačním změnám, umožňujících efektivně vykonat jejich funkci. V některých případech jsou tyto změny běžnými strukturními metodami těžko postižitelné. Využitím metody chemického zesílení s analýzou produktů pomocí hmotnostní spektrometrie lze konformační změny takovýchto proteinů zaznamenat a s nízkým rozlišením i vizualizovat.

Tato práce se zabývá studiem konformačních změn indukovaných vazbou ligandu, kationtu vápníku, na molekulu modelového proteinu kalmodulinu. Kalmodulin plní funkci druhého posla v několika odlišných buněčných signalizačních drahách. Tato funkce je úzce spjata s dostatečným dynamickým rozsahem molekuly kalmodulinu. Díky této vlastnosti je kalmodulin vhodným proteinem pro identifikaci konformačních změn. Využitím činidel chemického zesílení DSG a DSS, reagujících selektivně s primárními aminy lysinů, s různou délkou spojovacího raménka, bylo po štěpení trypsinem a separaci produktů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s následnou hmotnostně spektrometrickou analýzou nalezeno sedm unikátních intraproteinových spojení. Použitím izotopově neznačených činidel v reakční směsi v přítomnosti vápenatých kationtů a naopak izotopově značených činidel v reakční směsi, kde koncentrace vápenatých iontů byla nulová, bylo možné vzniklé lysin-lysinové interakce pro dané podmínky kvantifikovat.