

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Studium konformačních změn proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

Study on conformational changes in proteins using
mass spectrometry



Michal Rosůlek

Vedoucí práce: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Petra Nováka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne:

.....
Michal Rosůlek

Poděkování

Mé poděkování patří kolektivu pracovníků Laboratoře charakterizace molekulární struktury Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. za možnost vypracovat v jejich prostorách tuto bakalářskou práci a za poskytnutí přátelského pracovního prostředí. Dále bych rád poděkoval vedoucímu této práce RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Zdeňkovi Kukačkovi za ochotu, čas a cenné rady, potřebné ke zdárnému dokončení této práce.

V neposlední řadě patří díky i mé rodině za poskytnutí nemalé podpory směřované k mým studiím.

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 signálních 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 vysokouúčinnou 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.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, konformační změna, kvantifikace chemického zesílení, kalmodulin

Abstract

Some proteins and enzymes require presence of their specific ligand, cofactor or prosthetic group for their activity. Binding of this specific molecule causes conformational changes, which permits to perform their function. In some occasions the identification of conformational changes is difficult. Using chemical cross-linking coupled with mass spectrometry perform complex tool for searching and low resolution visualization of this changes.

The aim of this thesis is study of conformational changes induced by binding of calcium ion to calmodulin protein molecule. Calmodulin is a secondary intermediate messenger, which can interact with various proteins. This feature associates with wide dynamical range of calmodulin. Thus calmodulin is the suitable target for identifying conformational changes. After reaction of protein with chemical cross-linkers with different arm length (DSG and DSS) were products of reaction digested by trypsin. Formed linked peptides were separated by high-performance liquid chromatography and analysed followed mass spectrometry. Seven unique intramolecular cross-links were identified. Using isotope unlabeled cross-link reagents in the presence of Ca^{2+} in combination with using isotope labeled reagents in calcium free conditions we quantified formed lysine-lysine cross-links. (in Czech)

Key words: mass spectrometry, conformational changes, quantitative cross-linking, calmodulin

Obsah

1.	Seznam zkratk	8
2.	Teoretický úvod	9
2.1	Hmotnostní spektrometrie	9
2.1.1	Ionizační techniky	9
2.1.1.1	MALDI	10
2.1.1.2	Ionizace elektrosprejem	10
2.1.2	Analyzátory v hmotnostní spektrometrii	10
2.1.2.1	Kvadrupól	10
2.1.2.2	Iontová past	11
2.1.2.3	Analyzátor doby letu	12
2.1.2.4	Orbitrap	12
2.1.2.5	Iontově cyklotronová rezonance (ICR)	13
2.1.2.6	Využití chromatografických metod k separaci směsí analytů před aplikací na hmotnostní spektrometr	13
2.2	Modifikace činidly pro chemické zesílení	14
2.2.1	Obecné rozdělení síťovacích činidel proteinů	14
2.2.2	Dělení síťovacích činidel proteinů podle cílové aminokyseliny	15
2.2.3	NHS estery	16
2.3	Distální geometrie	17
2.4	Kalmodulin	17
2.5	Určení struktury proteinů pomocí síťovací reakce a hmotnostní spektrometrie	18
3.	Cíl práce	19
4.	Materiál	20
4.1	Seznam chemikálií	20
4.2	Seznam přístrojů a materiálu	21
4.3	Seznam roztoků	22
4.4	Software	22

5.	Metody	23
5.1	Dialýza přes semipermeabilní membránu	23
5.2	Reakce s činidly chemického zesílení	23
5.2.1	Reakce síťovacích činidel s proteinem	24
5.2.2	Zastavení reakce síťovacích činidel	24
5.3	Elektroforetická separace produktů síťovací reakce	25
5.4	Štěpení proteinu proteasou	25
5.5	Analýza produktů síťovací reakce pomocí LC-MS	26
5.6	Vyhodnocení LC-MS spekter	27
6.	Výsledky	29
6.1	Elektroforetická separace produktů síťovací reakce	29
6.2	Produkty síťovací reakce identifikované programem MSlinks	29
6.3	Kvantifikace lysin-lysinových interakcí v přítomnosti a nepřítomnosti ligandu ..	30
7.	Diskuze	35
8.	Závěr	37
9.	Reference	38

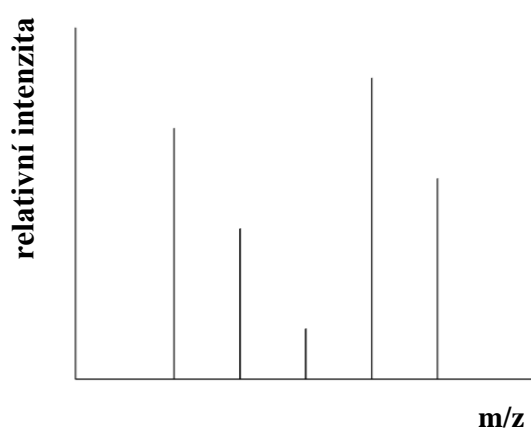
1. Seznam zkratek

ACN	Acetonitril
APG	<i>p</i> -azidofenylglyoxal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSGd0	Disukcinimidyl glutarát
DSGd4	Disukcinimidyl glutarát, 4x deuterovaný
DSSd0	Disukcinimidyl suberát
DSSd4	Disukcinimidyl suberát, 4x deuterovaný
DTT	1,4-dithiothreitol
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	Ethylenglykoltetraoctová kyselina
ESI	Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization)
FAB	Ionizace kolizí s urychlenými atomy (Fast atom bombardment)
FT-ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)
IT	Iontová past (Ion trap)
LC-MS	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem (Liquid chromatography-mass spectrometry)
LDS	Dodecylsulfát lithný
MALDI	Ionizace laserem v přítomnosti matrice (matrix assisted laser desorption/ionization)
MES	2-(<i>N</i> -morfolino)ethansulfonová kyselina
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PDB-ID	Identifikační kód struktury v Protein Data Bank ¹
rpm	Počet otáček za 1 minutu
SAXS	Maloúhlový rentgenový rozptyl (Small-angle X-ray scattering)
SDS	Dodecylsulfát sodný
TOF	Analyzátor doby letu (Time of flight)

2. Teoretický úvod

2.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je již více než 100 let známá analytická metoda. V posledních desetiletích zažívá velký rozmach převážně ve spojitosti s analýzou biologického materiálu. Hmotnostní spektrometr se obecně skládá z části, na kterou je přiváděn nebo aplikován vzorek, dále pak z iontového zdroje a hmotnostního analyzátoru opatřeného detektorem. Nezbytnou součástí každého hmotnostního spektrometru jsou vakuové pumpy, udržující výstup z iontového zdroje, analyzátor a detektor ve vakuu. V neposlední řadě



Obrázek č. 1 – Hmotnostní spektrum

jsou současné hmotnostní spektrometry vybaveny výpočetní technikou, která naměřené veličiny převádí na hmotnostní spektrum (Obrázek č. 1).

Na ose x hmotnostního spektra jsou vyneseny poměry hmotností analyzovaných iontů a jejich náboje (m/z), zatímco osa y popisuje relativní intenzitu signálu jednotlivých iontů.

2.1.1 Ionizační techniky

Tradiční ionizační techniky jako například ionizace proudem elektronů (EI z angl. Electron Impact) nelze kvůli destruktivnímu účinku urychlených elektronů využít pro studium biologického materiálu. Ke studiu biologických makromolekul pomocí hmotnostní spektrometrie je nutné použít nedestruktivní ionizační techniky. První takzvaně „měkkou“ ionizační technikou byla metoda bombardování matrice obsahující vzorek urychlenými atomy argonu (FAB z angl. Fast Atom Bombardment)².

Tato technika je však v dnešní době překonána velmi jemnými technikami ionizace za přítomnosti matrice (MALDI z angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) a ionizace elektrosprejem (ESI).

2.1.1.1 MALDI

Technika ionizace analytu laserem v přítomnosti matrice se používá od konce 80. let minulého století, kdy byla představena pány K. Tanakou, F. Hillenkampem a M. Karasem.^{3,4} Analyt se při použití této techniky nechá zkrystalovat s nadbytkem nosné matrice. Při využití UV laserů bývají maticí aromatické kyseliny (například deriváty kyseliny benzoové), které jsou netěkavé a mají vysokou stabilitu ve vakuu. Zároveň tato nosná matrice musí vysoce absorbovat záření vlnových délek použitého laseru. Krátkým pulsem laserového záření analyt sublimuje do plynné fáze, přičemž dojde k přenosu H^+ z matrice na analyt. Ionizací pomocí MALDI vznikají převážně jedenkrát nabití ionty, čímž lze získat snadno interpretovatelná hmotnostní spektra.

2.1.1.2 Ionizace elektrosprejem

Ionizace biologických makromolekul pomocí elektrospreje byla poprvé popsána Johnem Fennem v roce 1985.⁵ Ionizace elektrosprejem je postavena na fyzikálních základech. Vysokým napětím v řádech kilovoltů mezi špičkou duté sprejovací jehly a vstupním otvorem do hmotnostního spektrometru dochází k tvorbě nabitých kapiček, vzniklých průtokem roztoku vzorku úzkým otvorem sprejovacího hrotu. Průchodem kapiček vzorku vyhřívaným prostorem o teplotě přibližně 200°C dochází k odpaření rozpouštědla a snížení objemu mnohonásobně nabitých kapének. Jakmile se velikost kapének sníží pod Rayleighův limit stability, dochází k repulzi povrchových nábojů a kapénky roztoku analytu podléhají takzvané Coulombické explozi. Tím se zvýší počet kapének a náboj se rozloží na větším povrchu, čímž se repulze sníží. Po odpaření veškerého rozpouštědla se v prostoru iontového zdroje vyskytují pouze molekuly analytu, zpravidla vícenásobně nabité.

2.1.2 Analyzátoři v hmotnostní spektrometrii

Ke zjištění poměru m/z měřené molekuly lze využít různých analyzátorů. Analyzátoři se od sebe liší rychlostí a přesností měření, rozlišením, hmotnostním rozsahem nebo měřenou fyzikální veličinou. Níže je uveden přehled dnes nejběžněji používaných typů analyzátorů.

2.1.2.1 Kvadrupól

Pomocí kvadrupólu je možné filtrovat ionty analytu podle poměru m/z . Tento analyzátor byl sestaven v 50. letech minulého století německým fyzikem Wolfgangem Paulem.^{6,7} Kvadrupól je sestaven ze čtyř paralelně orientovaných vodivých tyčí. Na dvě protilehlé tyče je přiváděno stejnosměrné napětí (U) polarity kladné, na zbývající dvě napětí polarity

záporné. Na všechny tyče je přiváděno i napětí střídavé (V). Vhodnou kombinací stejnosměrného a střídavého napětí přiváděného na vodivé tyče lze ze směsi iontů propustit do prostoru detektoru pouze ionty splňující požadovaný parametr hodnoty m/z . Plynulou současnou změnou složek U a V lze analyzátozem postupně propouštět všechny ionty v určeném rozsahu m/z .

Kvadrupól lze pro analýzu iontů použít samostatně nebo v kombinaci tří kvadrupólů v řadě, čímž lze provádět takzvané tandemové (MS/MS) experimenty.⁸ Tato kombinace kvadrupólů se označuje TSQ (z anglického Triple Stage Quadrupole) nebo QqQ (malým q se označuje kvadrupól, v němž dochází k fragmentaci iontů s kolizním plynem). První kvadrupól plní funkci separační, pouze ionty o určitém m/z podléhají v druhém kvadrupólu fragmentaci po srážkách s kolizním plynem. Jako kolizní plyn se využívají inertní plyny jako například dusík nebo argon. Třetí analyzátozem opět separuje vzniklé fragmenty podle poměru m/z a přivádí je na detektor.

Mezi výhody kvadrupólového analyzátozem patří nízké pořizovací i provozní náklady, relativně malé rozměry a rychlá analýza celého spektra. Hodnota poměru m/z 4000 je horní limitou hmotnostního rozsahu tohoto analyzátozem.

2.1.2.2 Iontová past

Stejně jako kvadrupól, i iontová past (IT, z anglického Ion Trap) jako analyzátozem iontů v hmotnostní spektrometrii byla popsána v 50. letech 20. století W. Paulem.⁹ Iontová past se skládá ze tří elektrod. Prstencová elektroda je z obou stran uzavřena kruhovými elektrodami, v nichž jsou otvory pro vstup a výstup iontů. Vhodnou kombinací střídavého a stejnosměrného napětí, přiváděného na elektrody lze požadované ionty zadržet v prostoru mezi elektrodami. Postupnou změnou kombinovaného napětí je možné kontinuálně přivádět na detektor ionty o různém poměru m/z . Prostor iontové cely je vyplněn heliem o nízkém tlaku, které zmírňuje oscilace zadržovaných iontů, čímž dochází k nižším ztrátám analytu a tím je dosaženo lepšího rozlišení.

Iontová past může sloužit jako kolizní cela, v níž lze opakovaně provádět fragmentaci a selekci produktů fragmentace (MS^n experimenty). Dalšími výhodami iontové pasti jsou její malé rozměry, rychlost analýzy a vysoká citlivost. Nevýhodami jsou omezený hmotnostní rozsah poměru m/z omezený hodnotou 6000, nižší dosažené rozlišení i přesnost.

2.1.2.3 Analyzátor doby letu

Analyzátor doby letu (TOF z angl. Time Of Flight) je založen na principu rozdělení nabitých částic v prostoru důsledkem jejich různých rychlostí. V druhé polovině 40. let byl tento analyzátor představen W. Stephensem¹⁰, k jeho rozvoji však došlo až s příchodem ionizační techniky MALDI.¹¹ Nabitým částicím získaných iontovým zdrojem je v prostoru pulzních elektrod prudkým nárůstem potenciálu v řádech desítek kilovoltů dodána kinetická energie, díky níž přecházejí do evakuované trubice analyzátoru. Ionty o stejném náboji, získají stejnou kinetickou energii. Částice s hmotností nižší se budou pohybovat vyšší rychlostí než částice o hmotnosti vyšší. Podle doby, za kterou ionty dosáhnou detektoru na konci této trubice, lze stanovit poměr m/z těchto částic.

TOF analyzátor lze použít buď v lineárním módu, popsaném výše, nebo s využitím iontového zrcadla, neboli reflektoru.^{12,6} Reflektor je prostor konce letové trubice analyzátoru osazený elektrodami, na něž je vložen gradient napětí stejné polarity, jakou má náboj analyzovaných částic. Tento gradient má vzrůstající hodnoty ve směru vektoru rychlosti částic. Částice o stejné molekulové hmotnosti s vyšší kinetickou energií penetrují do těla potenciálové bariéry hlouběji a tím jsou oproti částicím o stejné molekulové hmotnosti, avšak s nižší kinetickou energií, pozdrženy na výstupu z iontového zrcadla. Tím dochází k fokusaci iontového svazku částic se stejným poměrem m/z .

Stanovení poměru m/z částic analyzátozem doby letu poskytuje výsledky s vysokým rozlišením i přesností. V lineárním uspořádání analyzátoru není teoreticky stanoven hmotnostní rozsah analyzovaných molekul. Uspořádání s využitím reflektoru poskytuje větší rozlišení spektra důsledkem delší dráhy letu částice. Společným rysem obou uspořádání je vysoká rychlost analýzy.

2.1.2.4 Orbitrap

Orbitrap je nejnovějším typem hmotnostního analyzátoru a svou konstrukcí vychází z iontové pasti. Tento analyzátor byl zkonstruován ruským fyzikem Alexandrem Makarovem v roce 2005.^{13,14} Nabité částice jsou zadržovány v prostoru mezi vnitřní vřetenovitou a vnější elektrodou. Napětí přiváděné na vnitřní elektrodu, vytváří v mezielektrodovém prostoru elektrické pole, které zadržuje ionty v okolí vnitřní elektrody. Ionty, jejichž frekvence rotace kolem středové elektrody je závislá na poměru m/z , indukují svým pohybem proud na vnější elektrodě. Záznam těchto indukčních iontů je z časové domény převeden do domény frekvenční využitím Fourierovy transformace.

2.1.2.5 Iontově cyklotronová rezonance (ICR)

Za rozvojem iontově cyklotronové rezonance jako hmotnostního analyzátoru stojí B. Komisarov a A. Marshall.¹⁵ Iontově cyklotronová rezonance poskytuje ze všech používaných analyzátorů nejlepší rozlišení a nejvyšší přesnost měření. Po průchodu analytu iontovým zdrojem jsou nabitě částice zadrženy v cele, která je vystavena působení silného magnetického pole o intenzitě až 18 Tesla. V takto silném magnetickém poli se ionty pohybují po cykloidních drahách s frekvencí

$$f = \frac{qB}{2\pi m},$$

kde q je náboj iontu, B intenzita magnetického pole a m je hmotnost iontu. Působením proměnného střídavého napětí jsou ionty excitovány ze svých cykloidních drah na dráhy s větším poloměrem pohybu. Excitované ionty mají pak v závislosti na jejich m/z různé cyklotronové frekvence. Ty jsou zaznamenávány v podobě elektrického proudu, indukovaného pohybujícími se nabitými ionty kolem detekčních elektrod na povrchu cely.¹⁶

Primárním výstupem ICR analyzátoru je spektrum závislosti intenzity superpozice signálu všech iontů na čase. Aplikací Fourierovy transformace lze převést spektrum z časové domény do domény frekvenční, čímž získáme hmotnostní spektrum, tedy spektrum závislosti relativní intenzity na m/z .¹⁵

2.1.2.6 Využití chromatografických metod k separaci směsí analytů před aplikací na hmotnostní spektrometr

K separaci směsí analytů se již dlouhou dobu používají techniky plynové chromatografie, vysokoúčinné kapalinové chromatografie nebo kapilání elektroforézy. Tyto separační systémy lze přímo předřadit před iontový zdroj hmotnostního spektrometru, kde ihned dochází k ionizaci separovaného analytu.

Separace látek bílkovinné povahy rozpuštěných v kapalném mediu lze provést vysokotlakou kapalinovou chromatografií na obrácené fázi. V tomto uspořádání je stacionární fáze chromatografické kolony tvořena nepolárními látkami, na kterých se zachytávají peptidy unášené polární mobilní fází. Peptidy jsou v takovýchto kolonách děleny podle míry interakce jejich hydrofobních částí se stacionární fází. Eluce zadržovaných peptidů je prováděna vzrůstajícím podílem organického rozpouštědla v mobilní fází.

2.2 Modifikace činidla pro chemické zesíťení

Stanovení proteinové struktury se tradičně provádí metodami rentgenostrukturní analýzy nebo NMR spektroskopie. Rentgenostrukturní analýza je limitována možností připravit krystaly daného proteinu v pokud možno nejvyšší čistotě. Další nevýhodou je, že proteiny v krystalech nejsou ve svých nativních stavech. Analýza pomocí NMR je sice prováděna v roztoku, je však nutné připravit velké množství čisté izotopově značené formy proteinu, která bude obsahovat jádra atomů s nenulovým jaderným spinem.

V poslední době se proto stále častěji využívají alternativní přístupy k řešení proteinové struktury, například SAXS, kryo-elektronová mikroskopie, Ramanova spektroskopie nebo strukturní hmotnostně spektrometrická analýza. Jedním z přístupů hmotnostně spektrometrické analýzy je její kombinace s chemickým zesíťením proteinů. Ta napomáhá k objasnění především terciárních a kvarterních struktur proteinů v podmínkách simulujících jejich přirozené prostředí. Nesmírnou výhodou jsou díky vysoké přesnosti hmotnostních analyzátorů nízké požadavky na množství analytu. Chemickým zesíťením proteinů lze například určit maximální nebo minimální vzdálenost určitých aminokyselin v prostoru a tím upřesnit krystalovou strukturu proteinu¹⁷, sledovat místa protein-proteinové interakce^{18,19,20} či rozdílné produkty chemického zesíťení v závislosti na sekundární struktuře.²¹

V současnosti je popsáno nepřehledné množství činidel, které kovalentně modifikují nejrůznější funkční skupiny biologických molekul. Činidla pro chemické zesíťení lze kromě proteinů modifikovat také nukleové kyseliny, lipidy nebo sacharidy.²² K modifikacím postranních řetězců proteinů se využívají činidla, reagující selektivně s funkční skupinou vybrané aminokyseliny.

2.2.1 Obecné rozdělení síťovacích činidel proteinů

Síťovací činidla lze dělit podle počtu funkčních skupin na mono-, di- nebo trifunkční. Monofunkční činidla, obsahující pouze jednu reaktivní skupinu, se využívají především ke studiu reaktivity postranních řetězců proteinů, čímž lze získat představu o uspořádání, interakcích a solubilizaci periferních aminokyselin. Pro snadnější identifikaci modifikovaných aminokyselin se využívá fluorescenčně aktivních činidel, nejčastěji derivátů fluoresceinu.²²

Difunkční a trifunkční činidla se používají ke kovalentnímu spojení prostorově vzdálených aminokyselinových zbytků. Vícefunkční činidla lze dále rozdělit na homofunkční a heterofunkční. Jako homofunkční se činidla označují v případě, kdy jsou

všechny koncové reaktivní skupiny molekuly identické. Naopak heterofunkční činidla obsahují v rámci jedné molekuly více funkčních skupin.

Dále mohou být síťovací činidla rozdělena na neštěpitelná, kdy spojení funkčních skupin činidla (tzv. raménko) je nejčastěji zajištěno uhlovodíkovým řetězcem, nebo štěpitelná. Vazba mezi atomy v určité části štěpitelného raménka je chemicky či mechanicky méně stabilní, a lze ji přerušit například indukovanou kolizí v cele hmotnostního analyzátoru²³ nebo změnou reakčních podmínek, nejčastěji pH.²²

Síťovací činidla mohou být izotopově značena. Izotopově značená činidla se využívají pro snadnější identifikaci modifikovaných proteinů v hmotnostních spektrech.²⁴

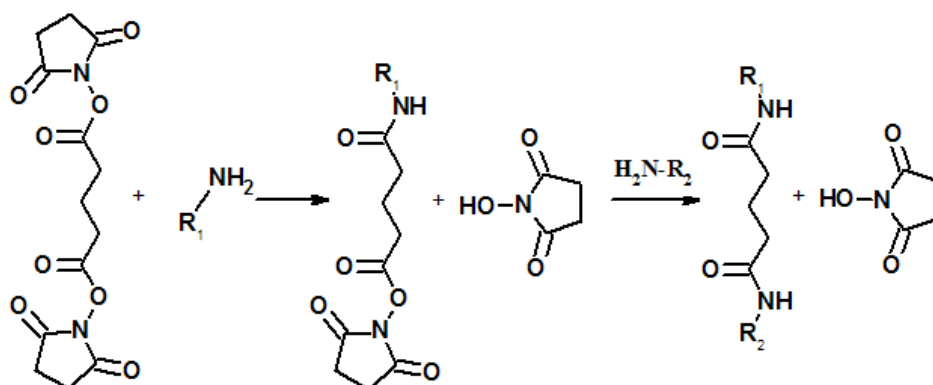
2.2.2 Dělení síťovacích činidel proteinů podle cílové aminokyseliny

Podle cílové aminokyseliny rozlišujeme činidla modifikující:

- **cystein** – Činidla reagují s thiolovou skupinou za vzniku sulfidové nebo disulfidové vazby. Příkladem takového činidla může být thiopyridyl disulfid.
- **arginin** – Pomocí APG (*p*-azidofenyglyoxal) může být značena guanidylová skupina argininu.
- **asparagovou** nebo **glutamovou** kyselinu – Činidlo zprostředkovává vznik amidové vazby mezi karboxylovou skupinou aminokyselin a primárním aminem lysinu nebo N-koncem proteinového řetězce. Vzhledem k tomu, že v kovalentním spojení aminu a karboxylové skupiny žádná část molekuly činidla neparticipuje, se tato činidla označují jako tzv. „zero-length reagents“, do češtiny překládané jako „činidla nulové vzdálenosti“. Z chemického hlediska se jedná o substituovaný karbodiimid. Nejpoužívanějším činidlem nulové vzdálenosti je EDC.²² EDC může taktéž fungovat jako aktivátor kyselých aminoskupin pro reakci s dihydrazidy, deriváty vyšších organických dikyselin (například dihydrazid kyseliny adipové nebo pimenové).²⁵
- **lysin** – Primární aminy lysinu nebo N-konce proteinu jsou častou cílovou funkční skupinou síťovacích reakcí. Polární ϵ -aminoskupiny jsou většinou lokalizovány na povrchu proteinu a jsou tedy dobře přístupné pro rozpuštěné činidlo. K modifikaci primárních aminů se používají deriváty fenolu a především imidoestery, konkrétně N-hydroxysukcinimid (NHS) estery.²⁶
- **ostatní** – V současné době již existují činidla, která mohou modifikovat další aminokyseliny, jako například tyrosin nebo methionin. Využití těchto činidel v praxi však není příliš časté.

2.2.3 NHS estery

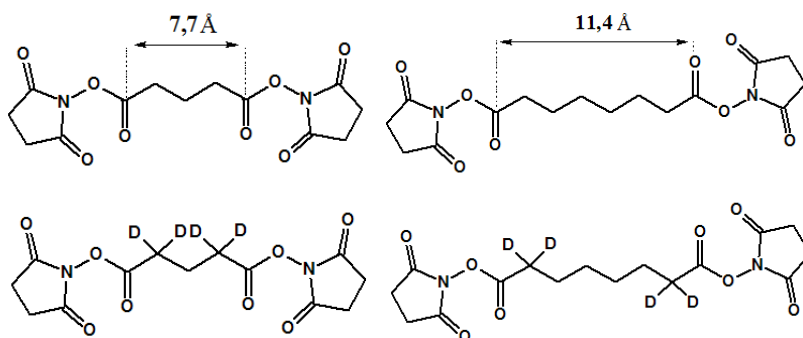
Homobifunkční N-hydroxysukcinimid estery patří k nejvyžívanějším síťovacím činidlům. Činidla tohoto typu se k síťování proteinů používají již od 70. let minulého století.²⁷ NHS estery jsou obtížně rozpustné ve vodě, ve vodném prostředí navíc dochází k jejich hydrolyze za vzniku karboxykyselin, které jsou již nereaktivní. Při fyziologickém pH jsou tato činidla hydrolyzována během několika hodin, se stoupajícím pH se jejich degradace zrychluje. pH optimum síťovací reakce je mezi hodnotami 7-9, které je udržováno pufrý neobsahujícími primární aminy.²² Reakce homobifunkčního NHS esteru disukcinimidyl glutarátu (DSG) s primárními aminy je znázorněna na obrázku č. 3.



Obrázek č. 2 - Schéma reakce NHS esteru DSG s primárními aminy

Disukcinimidyl glutarát (Obrázek č. 3) umožňuje zesíťování primárních aminů, jejichž vzdálenosti se pohybují v rozmezí 3,1–7,7 Å.²⁸ Dalším hojně využívaným síťovacím činidlem je disukcinimidyl suberát (Obrázek č. 3), jenž umožňuje kovalentní spojení primárních aminů ve vzdálenosti 5,6–11,4 Å.²⁸

Izotopově značená činidla se používají z důvodů snadnější interpretace produktů chemického zesíťování.²⁹ Ve výsledném spektru závislosti relativní intenzity signálu na m/z jsou produkty síťovací reakce izotopově značeným činidlem posunuty od signálů činidla neznačeného o hodnotu 4,025/z.



Obrázek č. 3

Homobifunkční NHS estery

DSS (vlevo) a DSS (vpravo),
deuterované (dole) i nedeuterované
formy

2.3 Distální geometrie

Homologní modelování struktur proteinů, které není možné analyzovat rentgenovou difrakcí nebo NMR, je limitováno existencí sekvenčně podobného proteinu nebo proteinové domény s již vyřešenou trojrozměrnou strukturou. V případech, kdy není možné nalézt dostatečně shodnou rozřešenou strukturu, lze k modelování využít výpočetních systémů, založených na využití distální geometrie.³⁰ Distální geometrie je výpočetní technika, sestavená G. Crippenem and T. Havelem, využívající poznatků limitních vzdáleností atomů, získaných porovnáním mnoha trojrozměrných struktur.³¹ Distální geometrie se taktéž využívá při interpretaci NMR dat.

Data získaná síťovými reakcemi, tj. vzdálenosti dvou atomů v prostoru, informace o povrchovém uspořádání aminokyselin nebo různé vzájemné orientaci proteinových podjednotek lze díky těmto modelujícím výpočetním systémům vizualizovat homologním modelem.

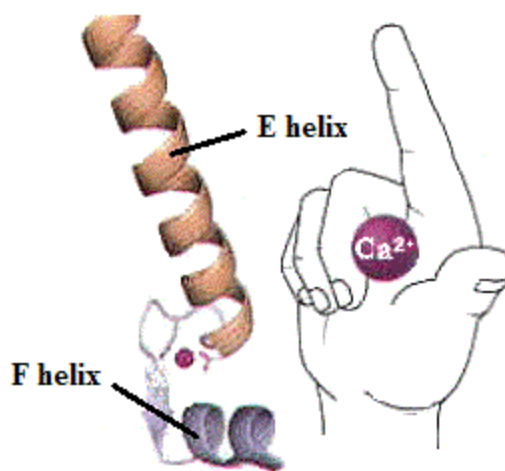
2.4 Kalmodulin

Kalmodulin je vápník-vázající protein, vyskytující se v buňkách organismů říší živočichů, rostlin, hub i prvků, kde je jedním z nejrozšířenějších mediátorů signalizačních drah.³² Sekvence kalmodulinu obsahuje 148 aminokyselin, z nichž je sedm lysinů schopných interagovat s NHS estery. Lysin 115 je primárně modifikován trimethylací ϵ -aminoskupiny a N-konec proteinu je modifikován acetylací. Takto blokové primární aminy nezasahují do reakce s činidly pro chemické zesílení.

Molekulová hmotnost proteinu je přibližně 17 kDa. Jeho sekvence je ve všech organismech velmi konzervovaná, u některých zástupců živočišného druhu je dokonce totožná.³³

Aminokyselinový řetězec kalmodulinu je tvořen N-koncovou a C-koncovou strukturální doménou, jež jsou spojené flexibilním centrálním α -helixem. Každá z domén obsahuje dva strukturální ligan vázající motivy helix-smyčka-helix, umožňující vazbu vápenatých kationtů (Obrázek č. 4, str. 18). Tento motiv se v anglo-saské literatuře označuje jako „E-F hand“.³⁴ Právě kalmodulin je typickým zástupcem rodiny těchto proteinů.³⁵ Při obsazení ligan vázajících motivů vápenatými kationty dochází ke změně struktury obou koncových domén, ovšem flexibilita centrálního α -helixu zůstává zachována.³⁶

Terciární struktury kalmodulinu, ať již s navázaným ligandem či bez něj, jsou již několik let známy. Vzhledem k velké flexibilitě centrálního α -helixu je popsáno mnoho odlišných konformací. Rentgenostrukturní analýzou krystalu kalmodulinu s navázanými ligandy byly popsány dvě krajní konformace: kompaktní uzavřená (PDB-ID 1PRW) a otevřená (PDB-ID 1EXR).^{37,38} Trojrozměrná struktura kalmodulinu bez navázaných ligandů byla získána pomocí NMR (PDB-ID 1CFD).⁴⁰



**Obrázek č. 4 - E-F hand
strukturní motiv³⁹**

2.5 Určení struktury proteinů pomocí síťovací reakce a hmotnostní spektrometrie

Kombinací síťovací reakce proteinu v roztoku, odpovídajícímu jeho nativním podmínkám, následným štěpením produktů reakce proteasou a analýzou vzniklých peptidů pomocí citlivých analyzátorů hmotnostního spektrometru lze získat cenné informace o struktuře použitého proteinu. Kombinace těchto metod byla do praxe zavedena na přelomu tisíciletí prací kolektivu M. Youngové.⁴¹ Na tuto práci navazovaly další projekty řešení nové nebo upřesnění stávající trojrozměrné struktury proteinových komplexů⁴² či protein-proteinových interakcí.⁴³

Zavedením kolizních analyzátorů při analýze produktů síťovací reakce, je možné s jistotou určit, která konkrétní aminokyselina v sekvenci proteinu byla činidlem modifikována, čímž došlo k dalšímu zpřesnění dat pro homologní modelování.⁴⁴

Použitím reakcí směsí činidel s různou délkou síťovacího raménka lze určit, jaké minimální nebo maximální vzdálenosti mohou nabývat funkční skupiny aminokyselinových zbytků modifikovaných činidlem.⁴⁵ Tento přístup umožňuje sledovat dynamiku proteinů, zejména membránových, které jsou obtížně izolovatelné pro standardní techniky stanovení struktury proteinů.⁴⁶ Využitím činidel s různou délkou síťovacího raménka je u proteinů vázajících ligand možné postihnout nejen změnu jejich konformace, v závislosti na vazbě ligandu, ale i tuto změnu za účasti izotopově značených činidel kvantifikovat.

3. Cíl práce

Cílem této práce bylo reakcemi s činidly chemického zesílení, následným hydrolytickým štěpením a analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie zaznamenat a kvantifikovat konformační změny modelového proteinu kalmodulinu v přítomnosti a nepřítomnosti jeho ligandu, tj. kationtu vápníku. Tento úkol bylo možné rozdělit do následujících kroků:

- příprava proteinu před experimenty chemického zesílení
- reakce proteinu s nedeuterovaným a deuterovanými činidly, optimalizace digesce a následná LC-MS analýza
- interpretace dat LC-MS analýzy s následnou kvantifikací konformačních změn proteinu indukovaných přítomností, respektive nepřítomností ligandu

4. Materiál

4.1 Seznam chemikálií

1,4-dithiothreitol	Fluka, Švýcarsko
4-ethylmorfolin	Sigma-Aldrich, USA
Acetonitril (LC-MS čistota)	Merck, Německo
Coomassie Brilliant Blue R 250	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid	Merck, Německo
Disukcinimidyl glutarát	ThermoScientific, USA
Disukcinimidyl glutarát 4x deuterovaný	ThermoScientific, USA
Disukcinimidyl suberát	ThermoScientific, USA
Disukcinimidyl suberát 4x deuterovaný	ThermoScientific, USA
Dodecylsulfát lithný	ThermoScientific, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Merck, Německo
Ethanolamin	Sigma-Aldrich, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
Hydroxid sodný	Lachema, ČR
Chlorid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid vápenatý	Sigma-Aldrich, USA
Isopropylalkohol (LC-MS čistota)	Merck, Německo
Kalmodulin	Merck, Německo
Methanol (LC-MS čistota)	Merck, Německo
Mravenčí kyselina (LC-MS čistota)	Fluka, Švýcarsko
NuPAGE® LDS vzorkový pufr	Invitrogen, USA
NuPAGE® MES SDS 20x koncentrovaný pufr	Invitrogen, USA
Octová kyselina	Fluka, Švýcarsko
Trifluoroctová kyselina	Fluka, Švýcarsko
Trypsin	Promega, USA
Voda (LC-MS čistota)	Merck, Německo

4.2 Seznam přístrojů a materiálu

Analytické váhy	Mettler Toledo, Švýcarsko
Automatické pipety	Eppendorf, Německo
Centrifuga stolní, Minispin	Eppendorf, Německo
Dialyzační zkumavky, záchyt 3500 Da	ThermoScientific, USA
Elektroda pH metro Biotrode	Hamilton, Švýcarsko
Elektroforetická souprava	BioRad, USA
Hmotnostní spektrometr Apex-Ultra	Bruker Daltonics, USA
Chladnička	Zanussi, Itálie
Chromatografická kolona	
Magic C18AQ (0,2 x 150 mm)	
částice o průměru 5 μm a velikosti pórů 200 Å	Michrom Bioresources, USA
NuPAGE® Novex® 4–12% Bis-Tris gel	Invitrogen, USA
pH metr Orion 2D star	ThermoScientific, USA
pH metr Φ200	Beckman, USA
Předvážky HF1200G	AND, USA
Sonikační lázeň	Bandellin, Německo
Termostat stolní	Grant, Velká Británie
Vakuová odparka Savant SPD 121P	Thermo Fisher, USA
Vakuová odparka Speedvac	Jouan, Francie
Vialky se septem	Agilent, USA
Vodní lázeň	Memert, Německo
Vortex VELP	Scientifica, Itálie
Zdroj napětí PowerPac	BioRad, USA
μHPLC systém Agilent 1200	Agilent, USA

4.3 Seznam roztoků

Barvicí roztok (100 ml)

0,25 g Coomassie Brilliant blue R250; 45 ml methanolu; 45 ml vody a 10 ml kyseliny octové

Dialyzační pufr (1 l)

5,84 g NaCl; 2,38 g HEPES; 0,38 g EGTA; 1 vody, pH 7,5

Elektrodový pufr (800 ml)

40 ml NuPAGE® MES SDS 20x koncentrovaného elektrodového pufru (50 mM MES, 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.3), 760 ml vody

Mobilní fáze pro LC-MS analýzu (1l)

Fáze A – 10 ml isopropylalkohol, 10 ml acetonitril, 2 ml kyseliny mravenčí, dolněno do 1 l vodou

Fáze B – 50 ml isopropylalkohol, 50 ml voda, 1,6 ml kyseliny mravenčí, doplněno do 1 l acetonitrilem

Odbarvovací roztok (100 ml)

35 ml ethanolu; 55 ml vody a 10 ml kyseliny octové

Štěpící pufr

100mM ethylmorfolinový pufr, 10% ACN ve vodě, pH 8,4

Vzorkový pufr

100mM dithiothreitol v NuPAGE® LDS vzorkovém pufru

4.4 Software

Data Analysis 4.0

MSLinks

mMass 5.4.1

PyMol 1.4.1

Bruker Daltonics, USA

ms3d.org, USA ⁴⁷

mMass.org, ČR ⁴⁸

Schrödinger, USA

5. Metody

5.1 Dialýza přes semipermeabilní membránu

Dialýzou přes semipermeabilní membránu lze snížit koncentraci nežádoucích solí, obsažených v roztoku makromolekulární látky. Dialyzační membránou difundují nízkomolekulární látky z místa o vyšší koncentraci do míst s koncentrací nižší, zatímco makromolekulární látky přes membránu neprocházejí. Dialýza probíhá do stavu, kdy jsou koncentrace látek, které jsou schopny difundovat, na obou stranách membrány totožné. Velkým nadbytkem čistého rozpouštědla, do kterého nízkomolekulární látky difundují, či jeho výměnou lze dosáhnout stavu, kdy koncentrace nízkomolekulárních látek v retenátu bude prakticky zanedbatelná.

Rozpuštěním kalmodulinu ve vodě byl vytvořen roztok o koncentraci proteinu 1 mg/ml. Pro zjištění změny konformace kalmodulinu v přítomnosti a nepřítomnosti jeho ligandu, kterým byl v této práci kationt vápníku Ca^{2+} , bylo nejprve nutné eliminovat výskyt jakýchkoli nežádoucích vápenatých kationtů v roztoku proteinu. Roztok kalmodulinu byl rovnoměrně rozdělen do mikrozkušavek s dialyzační membránou, zadržující molekuly o relativní molekulové hmotnosti vyšší než 3500. Dialyzační zkumavky byly umístěny na dialyzační plovák. Dialýza probíhala v chladové místnosti za stálého míchání na magnetické míchačce do 0,5 l dialyzačního pufru. Po 6 hodinách byl dialyzační pufr vyměněn a dialýza pokračovala přes noc. Obsah dialyzačních zkumavek byl následně kvantitativně převeden do mikrozkušavek. Celková koncentrace proteinu se po dialýze snížila z 1 mg/ml na hodnotu 0,375 mg/ml.

5.2 Reakce s činidly chemického zesílení

Před samotnou reakcí se síťovacími činidly bylo nutné rozdělit roztok kalmodulinu na dvě části. V první z nich byl rozpuštěním chloridu vápenatého vytvořen 12mM roztok Ca^{2+} iontů. Tento roztok představoval reakční podmínky pro kalmodulin s navázaným ligandem.

V druhé z mikrozkušavek byl rozpuštěním NaCl navýšena koncentrace sodných iontů z původních 100mM na 120mM. V tomto roztoku se žádné vápenaté ionty nevyskytovaly, roztok tedy obsahoval kalmodulin bez navázaného ligandu.

5.2.1 Reakce síťovacích činidel s proteinem

Nejprve byly rozpuštěním v DMSO připraveny roztoky DSGd0 a DSGd4, DSSd0 a DSSd4 o koncentracích 5 mg/ml. Z takto připravených roztoků byly vytvořeny směsi roztoků deuterovaných a nedeuterovaných činidel (d0/d4) v molárním poměru 1:1. Množství proteinu, použitého na reakci, bylo stanoveno na 10 μg , což odpovídá látkovému množství $6 \cdot 10^{-10}$ mol. Činidla chemického zesíťení byla k proteinu přidávána v deseti nebo třicetinásobném molárním nadbytku. Složení jednotlivých vzorků na příkladu činidla DSG popisují Tabulky č. 1 a 2.

Tabulka č. 1 - Složení reakčních směsí v přítomnosti Ca^{2+} iontů síťovaných DSG

označení	činidlo	molární nadbytek činidla
Ca10d0/d4	DSGd0/d4	10x
Ca30d0/d4	DSGd0/d4	30x
Ca10d0	DSGd0	10x
Ca30d0	DSGd0	30x

Tabulka č. 2 - Složení reakčních směsí v nepřítomnosti Ca^{2+} iontů síťovaných DSG

označení	činidlo	molární nadbytek činidla
Na10d0/d4	DSGd0/d4	10x
Na30d0/d4	DSGd0/d4	30x
Na10d4	DSGd4	10x
Na30d4	DSGd4	30x

Po přidání činidla do roztoku kalmodulinu byly vzorky zamíchány a ponechány dvě hodiny reagovat při laboratorní teplotě. Vzorky, obsahují směs značeného a neznačeného činidla v molárním poměru 1:1, byly připraveny pro určení účinnosti činidla, tj. zda poměr značených a neznačených komponent produktů bude odpovídat molárnímu poměru obou forem činidla ve vzorku. Navíc byl připraven kontrolní vzorek každé skupiny, který obsahoval pouze roztok kalmodulinu.

5.2.2 Zastavení reakce síťovacích činidel

Vzniku nežádoucích interakcí nezreagovaných či částečně zreagovaných činidel s N-konci peptidů, vzniklých štěpením proteinu proteasou v roztoku, bylo zamezeno přidávkem ethanolaminu do reakční směsi. Molární koncentrace ethanolaminu byla vždy dvojnásobná oproti koncentraci síťovacích činidel v dané reakci. Ethanolamin byl 1000x vyředěn

v 100 mM ethylmorfolinovém pufru, pH 8,4. Po zamíchání byly vzorky ponechány reagovat 30 minut při laboratorní teplotě.

Aby bylo možné dalším postupem kvantifikovat změnu struktury v nepřítomnosti a přítomnosti ligandu, byl v této fázi smísen vzorek Ca10d0 (protein s navázaným ligandem síťovaný nedeuterovaným činidlem) se vzorkem Na10d4 (protein bez navázaného ligandu síťovaný deuterovaným činidlem). Tento krok byl proveden se vzorky s 30ti násobným molárním nadbytkem činidla i se vzorky, k jejichž síťování bylo použito činidlo DSS. Následující postup byl prováděn pouze se vzorky obsahující směsi deuterovaných a nedeuterovaných činidel.

5.3 Elektroforetická separace produktů síťovací reakce

Čistota proteinu a charakterizace vzniklých produktů byla zjištěna elektroforetickou separací v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu lithného (LDS). Současně byl touto metodou vyvrácen vznik nežádoucích zesílení dvou a více molekul.

Ze všech vzorků byla odebrána polovina objemu, ke které byl přidán čtyřikrát koncentrovaný vzorkový pufr, obsahující 100mM DTT v komerčním LDS vzorkovém pufru. Vzorky byly zamíchány a vystaveny 5 minutové inkubaci v termostatu při teplotě 90°C. Po centrifugaci (12 000 × g, 15 s) bylo do jamek komerčně dodávaného polyakrylamidového gelu s gradientem zesílení 4-12 % pipetováno 25 µl vzorků.

Jako elektrodotový pufr byl použit vodou 20x zředěný komerční MES SDS elektrodotový pufr. Separace proteinů probíhala za konstantního napětí 200 V a horní limitní hodnota proudu byla nastavena na hodnotu 250 mA. Proteiny v gelu byly vizualizovány barvicím roztokem. Přebytečné barvivo bylo následně několik hodin odmyváno roztokem odbarvovacím.

5.4 Štěpení proteinu proteasou

K určení aminokyselin, které jsou vzájemně spojeny síťovacím činidlem, je nutné rozštěpit protein na nejkratší možné peptidy. K rozštěpení kalmodulinu, modifikovaného síťovacím činidlem, na kratší peptidy byl v této práci využit trypsin. Trypsin se řadí mezi proteasy štěpící peptidový řetězec za bazickými aminokyselinami lysinem a argininem. pH optimum této proteasy je 7,5 - 8,5.

K druhé polovině vzorků, nevyužité pro kontrolu a charakterizaci produktů síťovací reakce elektroforetickou separací v polyakrylamidovém gelu, byl přidán roztok proteasy.

Množství proteasy odpovídalo molárnímu poměru proteasa:protein 1:20. Roztok proteasy vznikl 100násobným naředěním zásobního roztoku trypsinu o koncentraci 1 mg/ml štěpicím puforem. Po zamíchání a následné centrifugaci ($12\ 000 \times g$, 15 s) probíhalo štěpení při teplotě 55°C. Po čtyřhodinové inkubaci byl přídavek proteasy opakován. Podmínky štěpení zůstaly rovněž zachovány. Celkový molární poměr použité proteasy k proteinu dosáhl hodnoty 1:10. Poté byly vzorky centrifugovány ($12\ 000 \times g$, 15 s) a uchovány přes noc při teplotě 4°C.

5.5 Analýza produktů síťovací reakce pomocí LC-MS

K separaci různých peptidů lze využít chromatografie na obrácené fázi. V tomto uspořádání je stacionární náplň chromatografické kolony tvořena nepolárními látkami, na nichž jsou peptidy zachycovány. Dělení v takovýchto kolonách probíhá podle míry interakce hydrofobních částí peptidu se stacionární fází. Mobilní fázi tvoří polární a nepolární rozpouštědla. Eluce zadržených peptidů je prováděna mobilní fází se zvyšující se koncentrací nepolární složky.

Separace probíhala na koloně Magic C18AQ, instalované v μ HPLC systému Agilent 1200. Na kolonu bylo nanášeno 5 μ l vzorků, které byly před analýzou 5 minut sonikovány a následně přeneseny do vialek se septem. Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 5 μ l/min, kolona byla vyhřívána na 30°C. Složení mobilní fáze v čase popisuje tabulka č. 3.

Tabulka č. 3 – Gradient mobilních fází v průběhu separace na koloně s obrácenou fází

čas/min	zastoupení mobilní fáze A /%	zastoupení mobilní fáze B /%
0→5	99	1
5→6	99→90	1→10
6→40	90→55	10→45
40→43	55→1	45→99
43→49	1	99

HPLC systém byl propojen s hmotnostním spektrometrem Apex-Ultra. Ionizace peptidů probíhala technikou elektrospreje. Detekce nabitých peptidů probíhala pomocí iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR). Hmotnostní rozsah byl

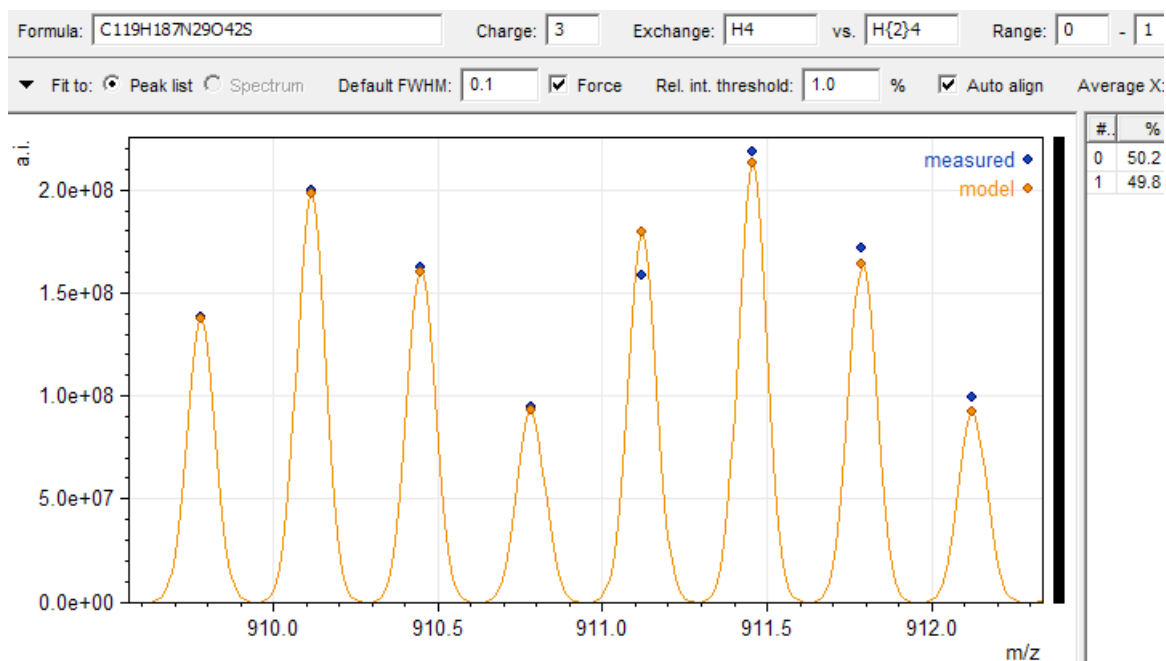
zvolen mezi hodnotami m/z 250 a 1800. Sběr dat probíhal 40 minut se zpožděním osm minut od aplikace vzorku na kolonu.

5.6 Vyhodnocení LC-MS spekter

Výstupem LC-MS analýzy jednoho vzorku je chromatografický záznam závislosti intenzity na m/z nabitých molekul. Spektra jednotlivých vzorků byla programem Data Analysis 4.0 převedena na jednotkový náboj a exportována do souborů kompatibilních s programem MSlinks.⁴⁷

Program MSlinks vytváří virtuální knihovnu teoretických hmotností zesítěných peptidů, které je možné získat z proteinu štěpením použitou proteasou. Teoretické hmotnosti z takto vytvořené knihovny jsou porovnávány s experimentálně zjištěnými hodnotami. V případě shody, tj. stavu, kdy relativní odchylka experimentální hmotnosti od hmotnosti teoretické nepřesahuje hodnotu 5 ppm, jsou k experimentálně získaným hodnotám přiřazeny konkrétní peptidy, jejichž lysiny jsou propojeny síťovacím činidlem.

Kvantifikace těchto lysin-lysinových interakcí v přítomnosti a nepřítomnosti vápenatých kationtů byla provedena v programu mMass 5.4.1.⁴⁸ Funkce *Envelope fit* porovnává plochy píků izotopové obálky peptidů spojených deuterovaným a nedeuterovaným činidlem. V případě, kdy jsou stejné peptidy zesítěvány činidlem značeným i neznačeným, přispívají k plochám píků deuterované izotopové obálky i minoritní těžší izotopy obálky analytu nedeuterovaného. Tyto příspěvky jsou od ploch píků deuterované komponenty odečteny. Výstupem analýzy konkrétních zesítěných peptidů je poměr zastoupení nedeuterovaného a deuterovaného činidla tvořícího mezi těmito peptidy kovalentní spojení. Případ, kdy je poměr neznačeného a značeného zesítěvaného peptidu přibližně roven 50 % je uveden na Obrázku č. 5, str. 28.

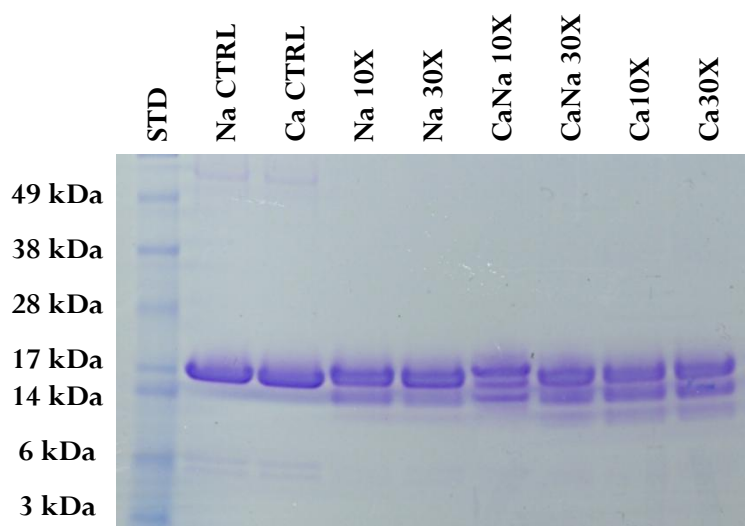


Obrázek č. 5 – Příklad zastoupení nedeuterovaného a deuterovaného činidla v poměru přibližně 50:50 v zesíleném peptidu nalezeném v kontrolním vzorku

6. Výsledky

6.1 Elektroforetická separace produktů síťovací reakce

Čistota proteinu a charakterizace produktů síťovací reakce byly ověřeny elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (Obrázek č. 6). Chemické zesítnění zvyšuje elektroforetickou mobilitu proteinu v gelu, což dokládají proužky ve větších vzdálenostech od startu elektroforézy v porovnání s kontrolními vzorky. Současně je patrné, že i mobilita různě nebo mnohonásobně zesítněných proteinů se liší. Dále lze konstatovat, že produkty reakce činidel chemického zesítnění jsou odlišné v přítomnosti a nepřítomnosti ligandu. Současně byl vyvrácen vznik dimerů či vyšších agregátů proteinu. Tím bylo umožněno štěpit a analyzovat vzorky přímo v roztoku, aniž bylo nutné předem provádět elektroforetickou separaci.



Obrázek č. 6 - Produkty síťovací reakce činidlem DSG v polyakrylamidovém gelu

STD – proteinový standard, CTRL – kontrolní vzorky, Ca – přítomnost ligandu, Na – nepřítomnost ligandu, CaNa – směs, 10x a 30x – molární nadbytky činidla

6.2 Produkty síťovací reakce identifikované programem

MSlinks

Zesítněné či modifikované peptidy, identifikované programem MSlinks, byly manuálně dohledány v hmotnostních spektrech. Tímto krokem jsme eliminovali chybně identifikované produkty síťovací reakce. Celkem jsme našli čtyři interpeptidová a tři intrapeptidová zesítnění. Výčet produktů chemického zesítnění je shrnut v Tabulce č. 4 na straně 30.

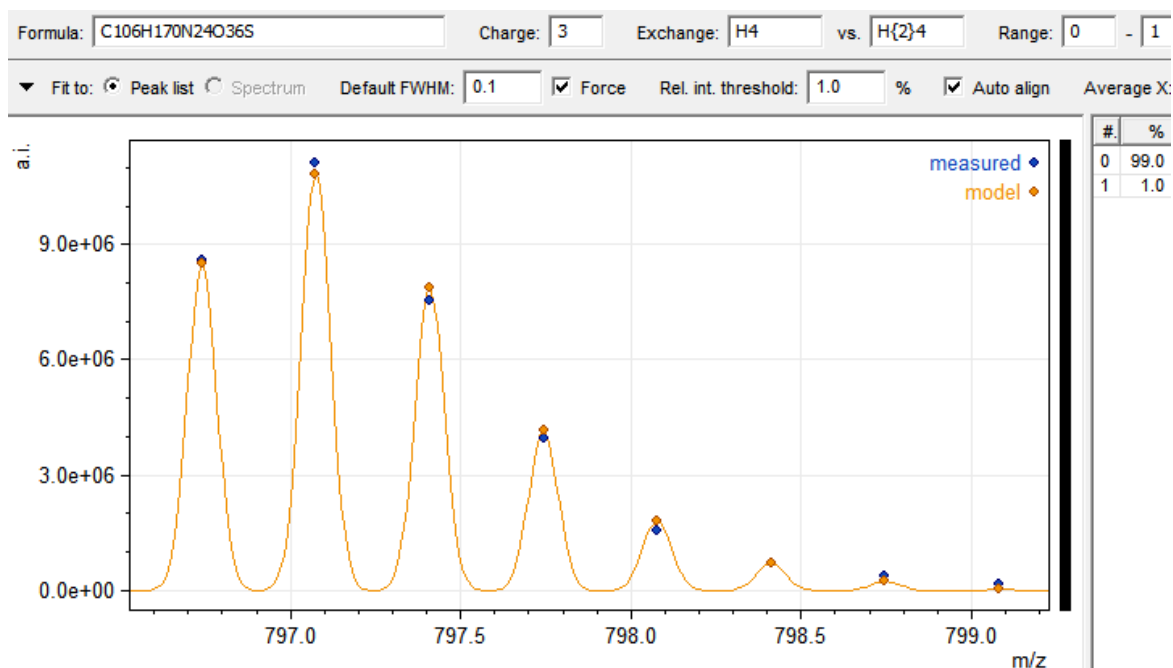
Tabulka č. 4- Identifikované zesítěné peptidy

modifikované peptidy	modifikované aminokyseliny	DSG		DSS	
		Ca ²⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Na ⁺
14-30,91-106	K21-K94	-	-	+	+
14-30,75-77	K21-K75	-	-	+	+
75-86,91-106	K77-K94	+	+	+	+
75-77,91-106	K75-K94	+	+	+	+
75-90	K75-K77	+	+	+	+
75-86	K75-K77	+	+	+	+
14-37	K21-K30	+	+	+	+

Poznámka: pozitivní výskyt identifikovaného zesítění jednotlivým činidlem a v přítomnosti určitého kationtu je označen znaménkem +

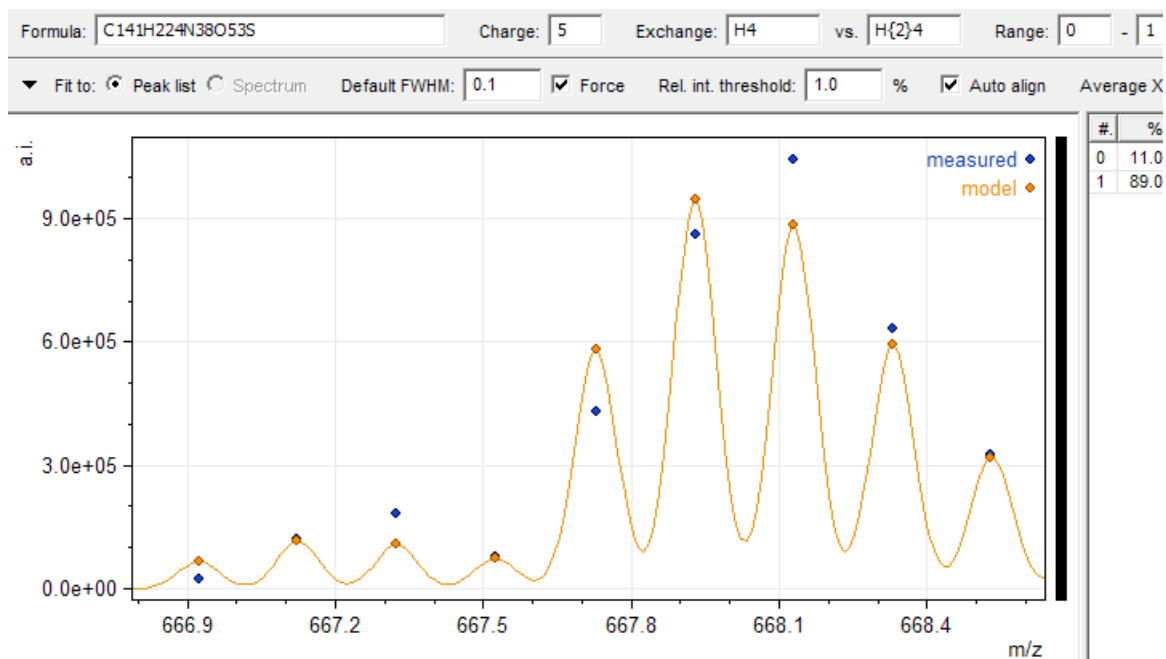
6.3 Kvantifikace lysin-lysinových interakcí v přítomnosti a nepřítomnosti ligandu

Produkty chemického zesítění získané ze směsí roztoků Ca10d0 s Na10d4 a Ca30d0 s Na30d4 v poměru 1:1 umožňují kvantifikovat procentuální zastoupení výskytu dvou konkrétních aminokyselin, jež jsou spojeny síťovacím činidlem. Složky označené d0 obsahovaly pouze činidlo s nedeuterovaným síťovacím raménkem, kdežto k reakci proteinu se složkami označenými d4 bylo využito činidla deuterovaného. Na následujících obrázcích jsou zachyceny oba limitní stavy. Obrázek č. 7, na straně 31 popisuje izotopovou obálku peptidů 75-77 a 14-30 spojených činidlem DSS.



Obrázek č. 7 – Izotopová obálka zesíťovaných peptidů 75-77 s 14-30 (K75-K21) činidlem DSS

Z procentuálního zastoupení 99 % ve prospěch nedeuterovaného činidla předpokládáme, že lysiny K75 a K21 podléhají reakci se síťovacím činidlem pouze v případě, že kalmodulin obsahuje navázané vápenaté ionty. Zcela odlišnou situaci vystihuje Obrázek č. 8.



Obrázek č. 8 – Izotopová obálka zesíťovaných peptidů 75-86 s 91-106 (K77-K94) činidlem DSG

Zde je na příkladu peptidů 75-86 a 91-106, zesíťených činidlem DSG, demonstrován nadbytek spojení, jež jsou tvořeny deuterovaným činidlem. Z poměru 11:89 procentuálního zastoupení DSGd0:DSGd4 lze konstatovat, že lysiny K77 a K94 mohou být činidlem svázány téměř výhradně v takové konformaci kalmodulinu, které protein dosahuje v nepřítomnosti jeho ligandu.

Hodnoty procentuálního zastoupení zesíťení lysinů v závislosti na typu činidla a přítomnosti ligandu shrnuje Tabulka č. 5.






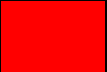
Tabulka č. 5 – Kvantifikace lysin-lysinových interakcí v různých reakčních podmínkách

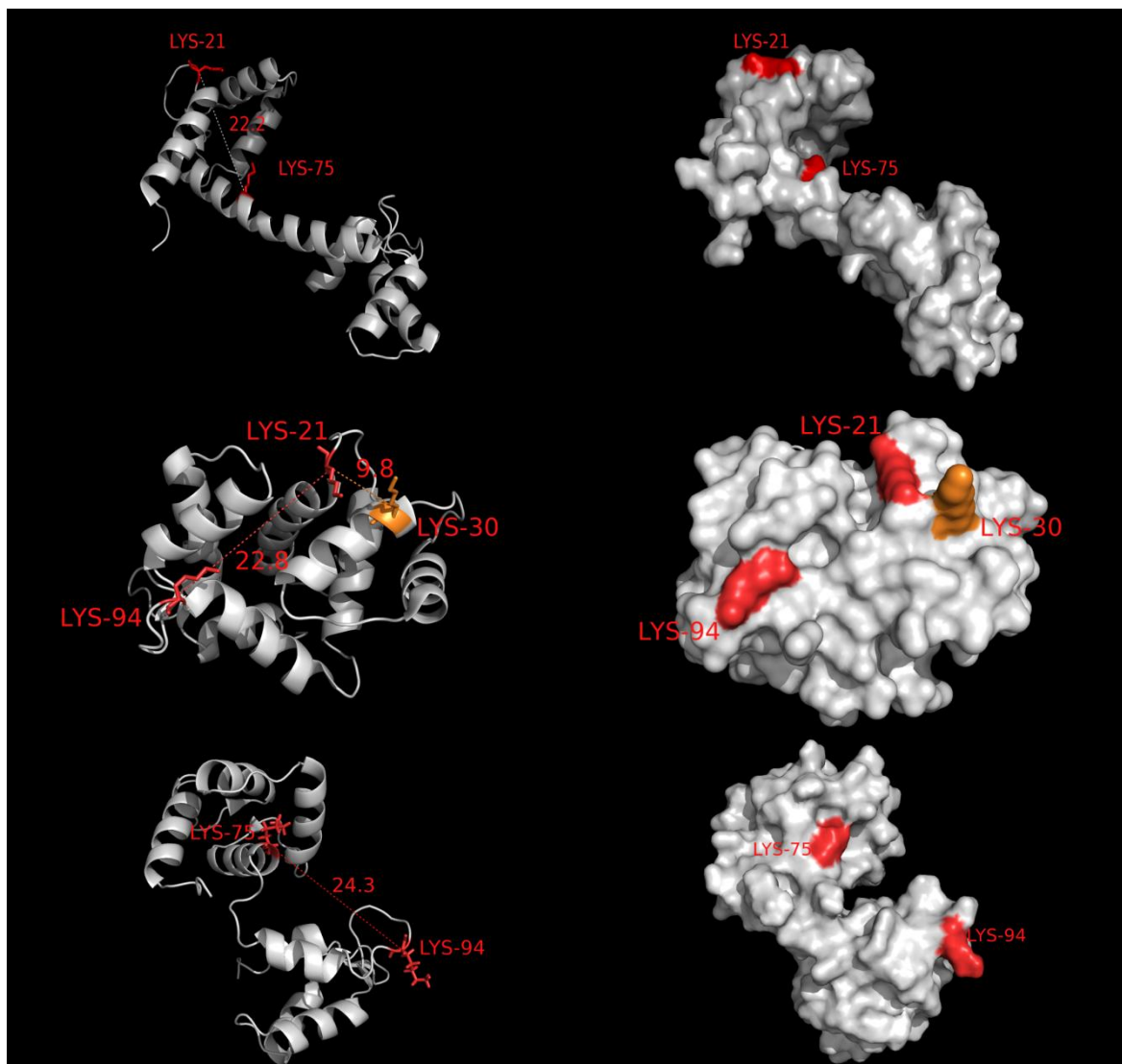
modifikované peptidy	modifikované aminokyseliny	DSG		DSS	
		Ca ²⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Na ⁺
14-30,91-106	K21-K94	-	-	92,1	7,9
14-30,75-77	K21-K75	-	-	99,0	1,0
75-86,91-106	K77-K94	11,0	89,0	25,0	75,0
75-77,91-106	K75-K94	93,5	6,5	97,9	2,1
75-90	K75-K77	77,4	22,6	98,0	2,0
75-86	K75-K77	54,2	45,8	91,4	8,6
14-37	K21-K30	42,6	57,4	86,3	13,7

Poznámka: Ca²⁺ - vznik chemického zesíťení v přítomnosti ligandu, Na⁺ v nepřítomnosti ligandu

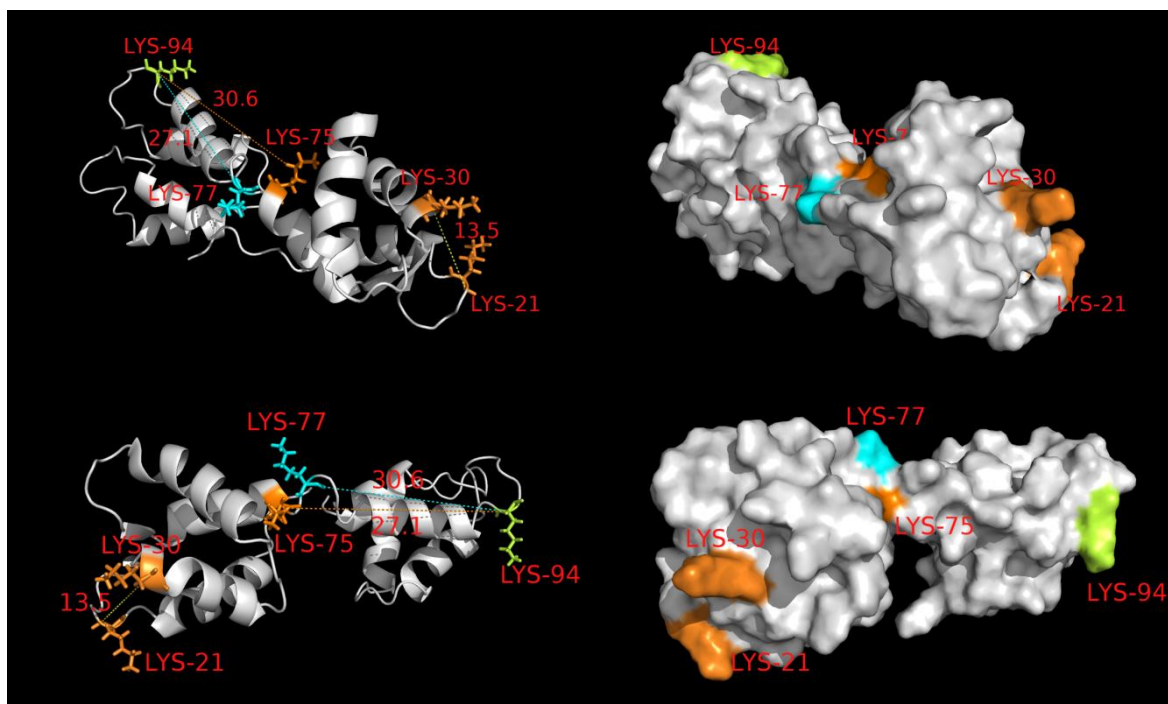
Výsledné hodnoty kvantifikace lysin-lysinových interakcí, shrnuté v Tabulce č. 5, jsou vizualizovány (Obrázek č. 9 a 10, str. 33 a 34) na trojrozměrných strukturách získaných rentgenostrukturní analýzou nebo NMR spektroskopii.

Tabulka č. 6 – Legenda k obrázkům č. 9 a 10

Poměr nedeuterovaného/deuterovaného činidla (v procentech)	0	20	40	60	80	100
Barva						



Obrázek č. 9 – Vizualizace chemických zesílení proteinu činidlem DSS v přítomnosti ligandu (nahore – otevřená konformace, model 1EXR; uprostřed – uzavřená konformace, model 1PRW; dole přechodná konformace – model 1DMO)



**Obrázek č. 10 – Vizualizace chemických zesílení proteinu číidlem DSS
v nepřítomnosti ligandu (model 1CFD, různé pohledy)**

7. Diskuze

Protein kalmodulin, který jako sekundární posel figuruje v mnoha signalizačních drahách, byl k této studii vybrán pro jeho očekávanou flexibilitu. Změna koncentrace vápenatých iontů v buňce indukuje po navázání těchto iontů do vazných míst proteinu konformační změnu, díky které je kalmodulin schopen vázat se na široké spektrum cílových enzymů či proteinů. Toto tvrzení potvrzují různé konformace kalmodulinu získané ať už rentgenovou difrakcí nebo NMR spektroskopii.

Pro stanovení konformačních změn tohoto proteinu v přítomnosti a nepřítomnosti jeho ligandu bylo nejprve nutné převést kalmodulin do prostředí neobsahující žádné vápenaté, ani jiné dvojmocné kationty. Kalmodulin je schopen vázat i jiné ligandy, například kationty hořečnaté,⁴⁹ nebo olovnaté, jejichž vazby se využívají při strukturních analýzách.⁵⁰ Dialýzou roztoku proteinu do pufru, obsahujícího pouze jednomocné kationty sodíku, byl rozpuštěný protein zbaven veškerých dvoumocných nežádoucích kationtů. Dialyzační pufr navíc obsahoval podíl ethylenglykoltetraoctové kyseliny, která jakožto chelatační činidlo má vysokou afinitu pro dvojmocné kationty. Rozdělením roztoku kalmodulinu na dvě poloviny a přidáním definovaného množství vápenatých kationtů k jedné z nich byla připravena reakční prostředí pro síťovací reakce. V reakčních směsích, neobsahující vápenaté kationty byla navýšena koncentrace kationtů sodných z důvodu zachování přibližně stejné iontové síly v obou reakčních podmínkách.

Reakce s činidly pro chemické zesíťování probíhala v roztoku o pH 7,5. Tato hodnota je kompromisem mezi pH fyziologického roztoku a hodnotami pH optimálními pro rychlou, selektivní reakci použitých činidel s primárními aminy lysinů. Se zvyšujícími se hodnotami pH sice roste reaktivita činidel, ale protein by byl síťován v podmínkách ne zcela odpovídajícím jeho přirozenému prostředí.

Pro určení přesné pozice činidlem modifikované aminokyseliny v sekvenci je nutné, především v případech, kdy v procesu analýzy produktů neprobíhá v hmotnostním spektrometru fragmentace iontů, dokonale chemicky nebo proteolyticky rozštěpit protein na co nejmenší peptidy. Protože síťovací reakce poskytuje v různých reakčních prostředích odlišné produkty, je tento krok jeden z klíčových v celé kvantifikační analýze. Běžně využívaná technika štěpení produktů síťovací reakce po elektroforetické separaci, kdy se proteasa přidává k proteinům fixovaným v gelu, dostatečně nespĺňuje výše popsany požadavek. Proteolytickým štěpením proteinu v gelu totiž nelze vždy dosáhnout, především ze sterických důvodů, uspokojivých výtěžků. Navíc extrakci rozštěpených

peptidů z gelu nelze provést zcela kvantitativně, což je ovšem pro stanovení poměru deuterované a nedeuterované komponenty ve výsledné izotopové obálce příslušného produktu nezbytné. Vzhledem ke vzniku různých produktů reakce v příslušných prostředích (Obrázek č. 6, str. 29) by směs zesíťovaných proteinů obsahující složku s deuterovaným a nedeuterovaným činidlem musela být selektována z gelu jako celek, nikoli po jednotlivých prouzcích (produktech), jak je tomu běžné. Avšak díky tomu, že charakterizace produktů síťovacích reakcí neprokázala vznik žádných vyšších komplexů, mohlo být štěpení prováděno přímo v roztoku, což mělo pozitivní vliv jak na aktivitu proteasy, tak na celkový výtěžek produktů.

Nalezená zesíťení, která jsou unikátní pro činidlo o větší délce spojovacího raménka, nám poskytují cennou informaci o vzdálenosti zesíťených lysinů. Navíc lze kvantifikací spojení dvou konkrétních aminokyselin oběma použitými činidly získat cenné informace o dynamice proteinu v blízkosti modifikovaných aminokyselin.

V průběhu vypracování této práce byla zveřejněna publikace kolektivu J. Rappsilbera⁵¹, která se zabývá obdobnou problematikou. Práce tohoto kolektivu se taktéž zabývá využitím izotopově značených činidel s následnou kvantifikací vzniklých produktů, jejím cílem však nebylo studium konformačních změn, nýbrž rozdíl v počtu unikátních zesíťení a zastoupení obou forem činidla ve výsledné izotopové obálce při různém počátečním reakčním molárním poměru značeného a neznačeného činidla. Jejich výsledky potvrzují i námi pozorovaný jev, kdy poměr deuterované a nedeuterované komponenty analytu odpovídá molárnímu poměru těchto činidel v počáteční reakční směsi. Obě práce však vykazují velký potenciál pro další rozvoj této techniky

8. Závěr

- Protein kalmodulin byl před reakcemi s činidly chemického zesíťení převeden do prostředí s jasně definovanými koncentracemi jeho ligandu a hodnotami pH přibližně odpovídajícím fyziologickému roztoku.
- Opakovaným štěpením produktů síťovací reakce proteasou trypsinem byla získána směs nejmenších možných zesíťených peptidů, na které je proteasa schopna protein rozštěpit.
- Směs peptidů byla separována pomocí HPLC a analyzována pomocí FT-ICR MS.
- S pomocí softwarového vybavení byly identifikovány tři intrapeptidová spojení, vznikající v přítomnosti činidla DSS i DSG.
- Identifikována byla rovněž čtyři zesíťení interpeptidová. Z nichž dvě vznikala pouze reakcí s činidlem DSS.
- S využitím izotopově značených činidel a výpočetních algoritmů programu mMass byly kvantifikovány konformační změny indukované vazbou kationtu vápníku do ligand vázajících míst proteinu kalmodulinu.

9. Reference

1. RCSB, Mezinárodně uznávaná internetová databáze biologických makromolekulárních struktur, <http://www.rcsb.org>, **10.3.2013**
2. Barber, M.; Bordoli, R.; Elliott, G.; Sedgwick, D.; Tyler, A., *Analytical chemistry* **1982**, 54 (4), 645-657
3. Karas, M.; Hillenkamp, F., *Analytical Chemistry* **1988**, 60 (20), 2299-2301.
4. Tanaka, K.; Waki, Y.; Ido, Y.; Yoshida, Y.; Akita, S., *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, 2 (8), 151-153
5. Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B., *Analytical Chemistry* **1985**, 57 (3), 675-679;
Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., *Science* **1989**, 246 (4926), 64-71.
6. El-Aneed, A.; Cohen, A.; Banoub, J., *Applied Spectroscopy Reviews* **2009**, 44 (3), 210-230.
7. Paul, W.; Reinhard, H. P.; Vonzahn, U., *Zeitschrift Fur Physik* **1958**, 152 (2), 143-182.
8. Johnson, R. S.; Martin, S. A.; Biemann, K., *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1988**, 86, 137-154.
9. Cooks, R. G.; Kaiser, R. E., *Accounts of Chemical Research* **1990**, 23 (7), 213-219.
10. Stephens, W. E., *Physical Review* **1946**, 69 (11-1), 691-691.
11. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F., *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1987**, 78, 53-68.
12. Mamyrin, B. A.; Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A., *Zhurnal Eksperimentalnoi I Teoreticheskoi Fiziki* **1973**, 64 (1), 82-89.
13. Makarov, A., *Analytical Chemistry* **2000**, 72 (6), 1156-1162
14. Hu, Q. Z.; Noll, R. J.; Li, H. Y.; Makarov, A.; Hardman, M.; Cooks, R. G., *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, 40 (4), 430-443
15. Comisarow, M. B.; Marshall, A. G., *Chemical Physics Letters* **1974**, 25 (2), 282-283.
16. Boháč, M.; Ingendoh, A.; Fusher, J.; Witt, M., *Chemické listy* **2005**, 99, 943-951
17. Rozbesky, D.; Man, P.; Kavan, D.; Chmelik, J.; Cerny, J.; Bezouska, K.; Novak, P., *Analytical Chemistry* **2012**, 84 (2), 867-870.
18. Sinz, A., *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 38 (12), 1225-1237.

19. Chen, Z. A.; Jawhari, A.; Fischer, L.; Buchen, C.; Tahir, S.; Kamenski, T.; Rasmussen, M.; Lariviere, L.; Bukowski-Wills, J. C.; Nilges, M.; Cramer, P.; Rappsilber, J., *Embo Journal* **2010**, *29* (4), 717-726.
20. Rappsilber, J.; Siniosoglou, S.; Hurt, E. C.; Mann, M., *Analytical Chemistry* **2000**, *72* (2), 267-275.
21. Fioramonte, M.; dos Santos, A. M.; McIlwain, S.; Noble, W. S.; Franchini, K. G.; Gozzo, F. C., *Proteomics* **2012**, *12* (17), 2746-2752.
22. Hermanson, G. T., *Bioconjugate techniques*, *Elsevier Science* **1996**.
23. Back, J. W.; Hartog, A. F.; Dekker, H. L.; Muijsers, A. O.; de Koning, L. J.; de Jong, L., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2001**, *12* (2), 222-227.
24. Muller, D. R.; Schindler, P.; Towbin, H.; Wirth, U.; Voshol, H.; Hoving, S.; Steinmetz, M. O., *Analytical Chemistry* **2001**, *73* (9), 1927-1934.
25. Novak, P.; Kruppa, G. H., *European Journal of Mass Spectrometry* **2008**, *14* (6), 355-365.
26. Paramelle, D.; Miralles, G.; Subra, G.; Martinez, J., *Proteomics* **2013**, *13* (3-4), 438-456.
27. Hill, M.; Bechet, J. J.; Dalbis, A., *Febs Letters* **1979**, *102* (2), 282-286.
28. Green, N. S.; Reisler, E.; Houk, K. N., *Protein Science* **2001**, *10* (7), 1293-1304.
29. Seebacher, J.; Mallick, P.; Zhang, N.; Eddes, J. S.; Aebersold, R.; Gelb, M. H., *Journal of Proteome Research* **2006**, *5* (9), 2270-2282.
30. Aszodi, A.; Munro, R. E. J.; Taylor, W. R., *Proteins-Structure Function and Genetics* **1997**, 38-42.
31. Havel, T. F.; Crippen, G. M.; Kuntz, I. D.; Blaney, J. M., *Journal of Theoretical Biology* **1983**, *104* (3), 383-400.
32. Kalkhof, S.; Ihling, C.; Mechtler, K.; Sinz, A., *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (2), 495-503; Beckingham, K.; Lu, A. Q.; Andruss, B. F., *Biometals* **1998**, *11* (4), 359-373.
33. UniProt, Internetový katalog proteinů spravovaný švýcarským institutem bioinformatiky, <http://www.uniprot.org>, **20.5.2013**.
34. Kretsinger, R. H., *Crc Critical Reviews in Biochemistry* **1980**, *8* (2), 119-174.
35. Chin, D.; Means, A. R., *Trends in Cell Biology* **2000**, *10* (8), 322-328.

36. Yang, C.; Jas, G. S.; Kuczera, K., *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **2001**, *19* (2), 247-271.
37. Fallon, J. L.; Quioco, F. A., *Structure* **2003**, *11* (10), 1303-U7.
38. Wilson, M. A.; Brunger, A. T., *Journal of Molecular Biology* **2000**, *301* (5), 1237-1256.
39. Nelson, D. L.; Cox, M. M., *Lehninger Principle of biochemistry*, fifth edition, *W. H. Freeman a Company* **2008**.
40. Kuboniwa, H.; Tjandra, N.; Grzesiek, S.; Ren, H.; Klee, C. B.; Bax, A., *Nature Structural Biology* **1995**, *2* (9), 768-776.
41. Young, M. M.; Tang, N.; Hempel, J. C.; Oshiro, C. M.; Taylor, E. W.; Kuntz, I. D.; Gibson, B. W.; Dollinger, G., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97* (11), 5802-5806.
42. Back, J. W.; Sanz, M. A.; De Jong, L.; De Koning, L. J.; Nijtmans, L. G. J.; De Koster, C. G.; Grivell, L. A.; Van der Spek, H.; Muijsers, A. O., *Protein Science* **2002**, *11* (10), 2471-2478.
43. Vasilescu, J.; Guo, X. C.; Kast, J., *Proteomics* **2004**, *4* (12), 3845-3854.
44. Novak, P.; Haskins, W. E.; Ayson, M. J.; Jacobsen, R. B.; Schoeniger, J. S.; Leavell, M. D.; Young, M. M.; Kruppa, G. H., *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (16), 5101-5106.
45. Novak, P.; Young, M. M.; Schoeniger, J. S.; Kruppa, G. H., *European Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *9* (6), 623-631.
46. Jacobsen, R. B.; Sale, K. L.; Ayson, M. J.; Novak, P.; Hong, J. H.; Lane, P.; Wood, N. L.; Kruppa, G. H.; Young, M. M.; Schoeniger, J. S., *Protein Science* **2006**, *15* (6), 1303-1317.
47. Yu, E. T.; Hawkins, A.; Kuntz, I. D.; Rahn, L. A.; Rothfuss, A.; Sale, K.; Young, M. M.; Yang, C. L.; Pancerella, C. M.; Fabris, D., *Journal of Proteome Research* **2008**, *7* (11), 4848-4857.
48. Strohm, M.; Hassman, M.; Kosata, B.; Kodicek, M., *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, *22* (6), 905-908.
49. Ohashi, W.; Hirota, H.; Yamazaki, T., *Protein Science* **2011**, *20* (4), 690-701.
50. Wilson, M. A.; Brunger, A. T., *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2003**, *59*, 1782-1792.
51. Rappsilber, J.; Fisher, L.; Chen, Z. A., *Journal of proteomics* **2013**.

