

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Studium nekovalentních interakcí protein-ligand pomocí
hmotnostní spektrometrie**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Petra Zapletalová
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Oždian
Termín odevzdání práce:	2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Petra Zapletalová
Název práce	Studium nekovalentních interakcí protein-ligand pomocí hmotnostní spektrometrie
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Oždian
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	<p>Předložená diplomová práce se věnuje studiu interakcí proteinů s ligandy pomocí hmotnostní spektrometrie. V teoretické části je zpracována literární rešerše na téma hmotnostní spektrometrie a protein-ligandových interakcí. Experimentální část práce se zabývá stanovením optimálního koncentračního rozsahu cytochromu c a hovězího sérového albuminu a následně měřením interakcí obou proteinů s ligandy. Pro měření byly použity dva hmotnostní spektrometry ESI/QqTOF a MALDI-TOF. Jako ligandy byly zvoleny Triterpen, karboran, tryptofan a cisplatina. Vyvinutá metoda byla použita ke studiu interakce avidinu s modifikovaným biotinem.</p>
Klíčová slova	interakce protein-ligand, hmotnostní spektrometrie, proteomika
Počet stran	56
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Petra Zapletalová
Title of thesis	The study of non-covalent interactions of protein-ligand by mass spectrometry
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Tomáš Oždian
The year of presentation	2016
Abstract	<p>The thesis is devoted to the study of interactions between proteins and ligands using mass spectrometry. The theoretical part includes the literature review of mass spectrometry and protein-ligand interactions. The experimental part deals with the determination of the optimum concentration range of cytochrome c and bovine serum albumin and analysis of the interaction of above mentioned proteins with ligands. Two mass spectrometers ESI/QqTOF and MALDI-TOF were used in this analysis. Triterpene, carborane, tryptophan and cisplatin were chosen as ligands. Developed method was used for verification of interaction of avidin and modified biotin.</p>
Keywords	protein-ligand interactions, mass spectrometry, proteomics
Number of pages	56
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Tomáše Oždiana a za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce Mgr. Tomáši Oždianovi za poskytnutí odborných konzultací, cenných rad a informací potřebných pro vypracování této práce, také za ochotu a trpělivost. Poděkování patří také kolektivu proteomiky při ÚMTM za ochotu pomoci při zpracovávání experimentální části této práce.

1 Obsah

1	Obsah	6
2	Úvod a cíle práce	8
3	Hmotnostní spektrometrie.....	9
3.1	Iontové zdroje.....	10
3.1.1	Elektrosprej	11
3.1.2	Ionizace laserem za účasti matrice.....	12
3.2	Hmotnostní analyzátory	14
3.2.1	Kvadrupól	14
3.2.2	Iontová past.....	15
3.2.3	Analyzátor doby letu.....	17
3.3	Tandemová hmotnostní spektrometrie	18
3.3.1	Trojité kvadrupól	18
3.3.2	Kvadrupól - TOF analyzátor	19
3.4	Detektory.....	20
4	Přístupy k proteomickému studiu	21
5	Interakce protein-ligand.....	22
5.1	Struktura proteinů.....	22
5.2	Interakce proteinů s nízkomolekulárními ligandy.....	24
5.3	Metody studia interakce proteinů s ligandy	25
5.3.1	Afinitní purifikace.....	25
5.3.2	DARTS	26
5.3.3	Studium interakcí pomocí hmotnostní spektrometrie	28
6	Experimentální část.....	29
6.1	Materiál a metody	29
6.1.1	Chemikálie	29
6.1.2	Přístrojové vybavení	29
6.1.3	Software	29

6.2	Metody	30
6.2.1	Příprava vzorků.....	30
6.2.2	Analýza na ESI/QqTOF	31
6.2.3	Příprava MALDI matrice.....	32
6.2.4	Analýza na MALDI-TOF	32
7	Výsledky	33
7.1	Linearita a senzitivita MS analýzy cytochromu c a hovězího sérového albuminu ...	33
7.1.1	Analýza pomocí ESI-QqTOF	33
7.1.2	Analýza pomocí MALDI-TOF	35
7.2	Interakce proteinů s ligandy	38
7.2.1	Triterpen.....	38
7.2.2	Karboran	40
7.2.3	Cisplatina	40
7.2.4	Tryptofan	43
7.3	Vazba modifikovaného biotinu na avidin	45
8	Diskuze	47
9	Závěr	50
10	Seznam literatury	51
11	Seznam použitých zkratk	56

2 Úvod a cíle práce

Tématem této diplomové práce je studium interakcí celých proteinů s ligandy pomocí hmotnostní spektrometrie. V teoretické části diplomové práce je zpracována literární rešerše na téma hmotnostní spektrometrie se zaměřením na ESI a MALDI, což jsou ionizační techniky vhodné pro ionizaci proteinů. Součástí teoretické části práce je také popis interakcí proteinů s ligandy z hlediska jejich významu a detekce.

V experimentální části se věnuji optimalizaci měřené koncentrace cytochromu c a BSA a vazbě těchto proteinů s protinádorovými léčivy jako triterpen, karboran a cisplatin s použitím dvou hmotnostních spektrometrů ESI/QqTOF a MALDI-TOF.

Cílem práce bylo zjistit koncentrační rozsah proteinů, ve kterých je možná analýza a sledovat interakci cytochromu a BSA ve zvoleném koncentračním rozsahu s triterpenem, karboranem a cisplatinou.

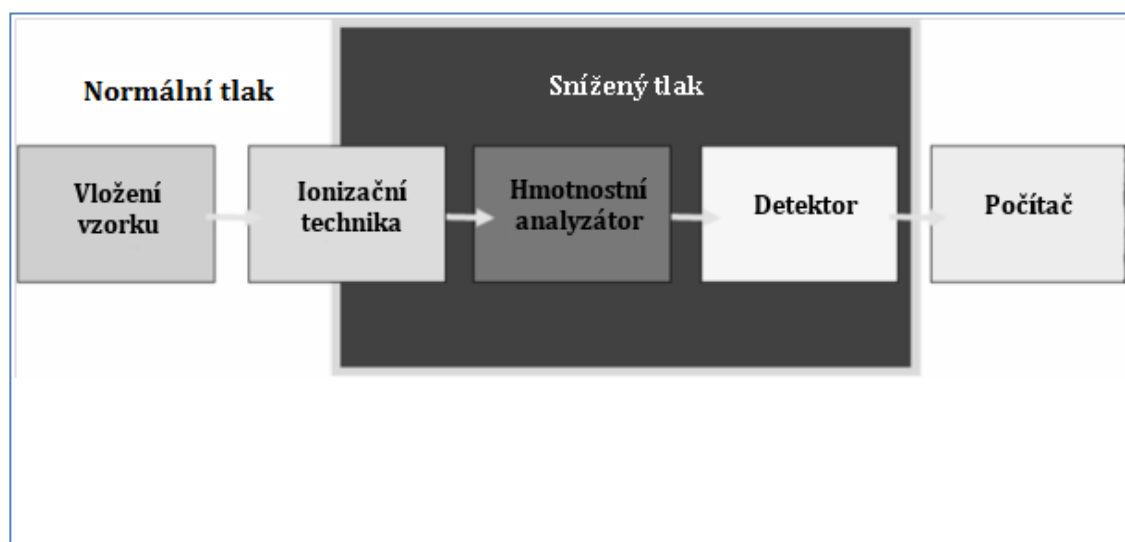
I. Teoretická část

3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika, která může poskytovat jak kvalitativní (molekulová hmotnost), tak kvantitativní informaci (koncentrace) o molekulách analytu po jejich přeměně na ionty. Analyzované molekuly jsou nejprve zavedeny do iontového zdroje hmotnostního spektrometru, kde jsou ionizovány z elektricky neutrálních atomů nebo molekul na kladné nebo záporné ionty. Poté ionty směřují do hmotnostního analyzátoru, v němž jsou rozděleny v závislosti na jejich poměru hmotnost/náboj (m/z) a následně putují k detektoru. Ionty zachycené na detektoru generují signál, který je zaznamenáván počítačovým systémem. Počítač zobrazuje signály v podobě hmotnostního spektra, které ukazuje relativní četnost iontů podle jejich m/z poměru (Ho et al., 2003).

Prostor analyzátoru, detektoru a případně i iontového zdroje je hluboce vakuován, aby nedocházelo ke srážkám molekul plynu s analyzovanými ionty. Hodnoty vakua se pohybují od 10^{-3} až do 10^{-9} torrů podle typu hmotnostního analyzátoru. Vakuum je vytvářeno pomocí kombinace rotační olejové pumpy a turbomolekulární pumpy (Dastyh et al., 2012).

K vlastnostem hmotnostní spektrometrie patří vysoký detekční limit, rychlost a rozmanitost použití (Hoffmann a Stroobant, 2007).



Obr. 1: Základní schéma hmotnostního spektrometru
(Převzato a upraveno podle (Vidová et al., 2008))

3.1 Iontové zdroje

V iontovém zdroji jsou vzorky před analýzou ionizovány. Používají se různé ionizační techniky, které se volí podle fyzikálně - chemických vlastností analytu. Techniky ionizace můžeme rozdělit na tvrdé a měkké. Tvrdé ionizační techniky jsou velmi energické a způsobují rozsáhlou fragmentaci. Tvrdou technikou je elektronová ionizace (EI) založená na principu předání energie molekulám analytu od proudu letících elektronů. Nejčastěji vznikají kladně nabitě radikály, u kterých následně dochází k fragmentaci (de Hoffmann and Stroobant, 2007; Friedecký and Lemr, 2012).

Šetrnější metodou, která se již řadí k měkkým ionizačním technikám je chemická ionizace (CI), kde rychle letící elektrony ionizují nejprve molekuly reakčního plynu a ty potom předávají energii molekulám analytu (Dastych et al., 2012). U EI, CI a ionizace polem jsou látky ionizovány v plynné fázi. Jejich použití je omezeno jen pro sloučeniny dostatečně těkavé a tepelně stabilní. Velké množství sloučenin je však teplotně labilních a u nich se používají jiné ionizační techniky.

U tepelně labilních sloučenin používáme dva typy zdrojů: iontové zdroje kapalné fáze (rozprašovací ionizace) a zdroje iontů pevné fáze (desorpční ionizace). U iontového zdroje kapalné fáze je analyt v roztoku. Tento roztok je ve formě kapiček rozprašen do zdroje, kde jsou při atmosférickém tlaku produkovány ionty. Tomuto typu iontových zdrojů odpovídá elektrosprej (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) (Busch, 1995, de Hoffmann and Stroobant, 2007).

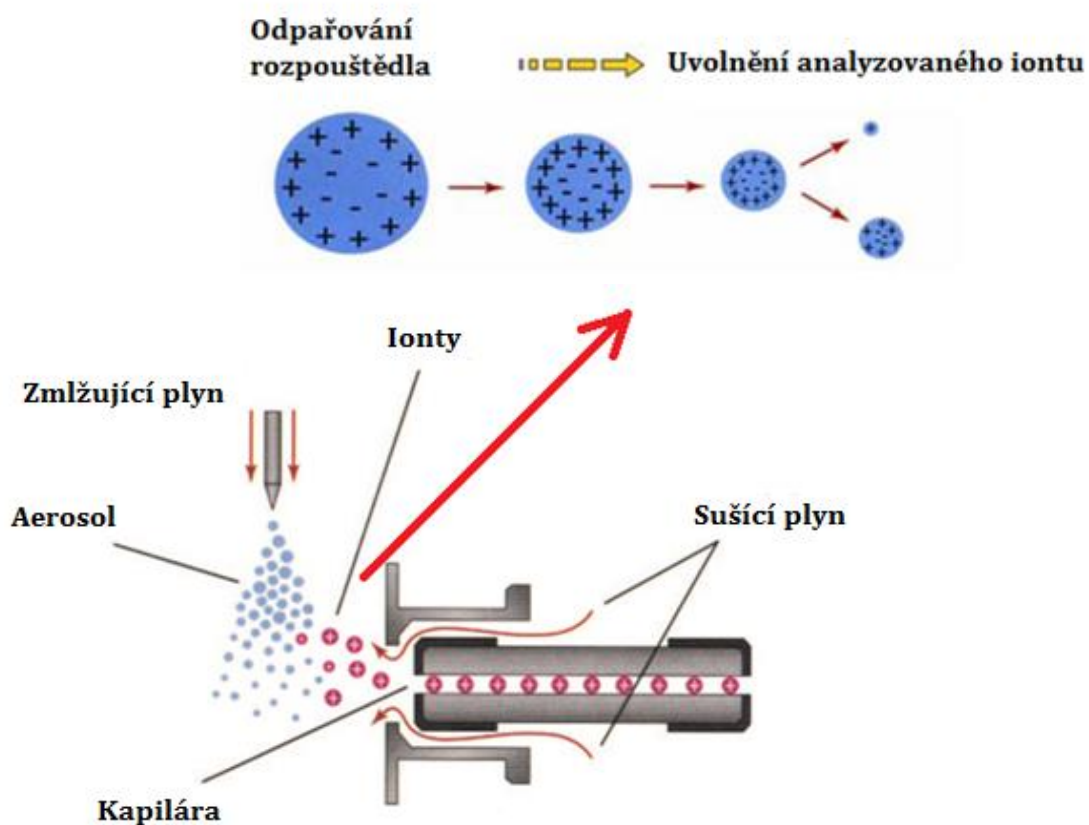
V iontových zdrojích druhého typu je analyt v netěkavé pevné fázi. Analyzovaný vzorek v pevné fázi se připravuje různými způsoby, které často zahrnují použití matrice. Matrice může být buď pevná látka, nebo viskózní kapalina, která se smíchá se vzorkem. Takto připravený vzorek je pak ozářen energetickými částicemi nebo fotony, které způsobí desorpci iontů z povrchu. Ionty jsou poté pomocí elektrického pole nasměrovány do analyzátoru. Tato strategie k produkci iontů je používána u ionizace/desorpce laserem za účasti matrice (MALDI), desorpce plazmou a desorpce polem (de Hoffmann and Stroobant, 2007).

Výše zmíněné ionizační techniky ESI a MALDI umožňují s vysokou citlivostí ionizovat peptidy a proteiny bez nadměrné fragmentace. Jejich objev v 80. letech 20. století byl klíčový pro rozvoj MS (Patterson and Aebersold, 2003). Těmto metodám se budu blíže věnovat v následující kapitole.

3.1.1 Elektrosprej

V roce 1984 John Fenn poprvé popsal využití elektrospreje při analýze proteinů (Yamashita and Fenn, 1984). Za tento objev mu byla v roce 2002 udělena Nobelova cena za chemii (Fenn, 2003).

Ionizace elektrosprejem probíhá při atmosférickém tlaku. Kapalný vzorek prochází sprejovací kapilárou, kde jsou díky rozdílu elektrických potenciálů mezi kapilárou a vstupem do hmotnostního analyzátoru tvořeny nabité kapičky (Ho et al., 2003; Yates, 2004). Kapičky se odpařováním rozpouštědla neustále zmenšují, což vede ke zvyšování hustoty povrchového náboje. Rozpouštědlo je odpařováno díky proudění sušícího plynu (např. dusíku) a zvýšené teplotě ve zdroji (Ho et al., 2003). Jakmile kapičky dosáhnou tzv. Rayleighova limitu, při kterém odpudivá síla mezi stejnými náboji překročí sílu povrchového napětí kapky, dojde ke Coulombické explozi a ionty jsou uvolněny z povrchu kapky (Hilton and Benesch, 2012; Yates, 2004).



Obr. 2: Schematické znázornění elektrospreje

(Převzato z: http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf, staženo 20. 4. 2015)

ESI je schopno produkovat vícenásobně nabité ionty, které mají za následek snížení hodnoty m/z , při níž je molekula detekována (např. molekula o hmotnosti 20 000 nesoucí 20 nábojů může být detekována už při hodnotě $m/z = 1000$). Díky vícenásobně nabitým iontům se zvyšuje rozsah měřitelných hmot přístroje a je umožněno použití mnoha různých typů analyzátorů. U měření pomocí ESI lze vypočítat skutečnou molekulovou hmotnost iontu (Dastych et al., 2012; Yates, 1998).

Elektrosprej je citlivý na přítomnost solí, detergentů či pufrů ve vzorku. Tyto látky mohou reakcí s analytem tvořit adukty, které ztěžují určení molekulové hmotnosti analytu nebo mohou potlačovat tvorbu iontů analyzované molekuly. Proto je důležité soli, pufrů a detergenty před ionizací pomocí ESI ze vzorku odstranit (např. separací pomocí kapalinové chromatografie).

Mezi přednosti elektrospreje patří snadné připojení k separačním technikám a šetrná ionizace bez následné fragmentace molekulových iontů. Je vhodný pro měření netěkavých, polárních a vysokomolekulárních látek, kromě proteinů a peptidů také nukleových kyselin a sacharidů (Dastych et al., 2012; Yates, 1998).

3.1.2 Ionizace laserem za účasti matrice

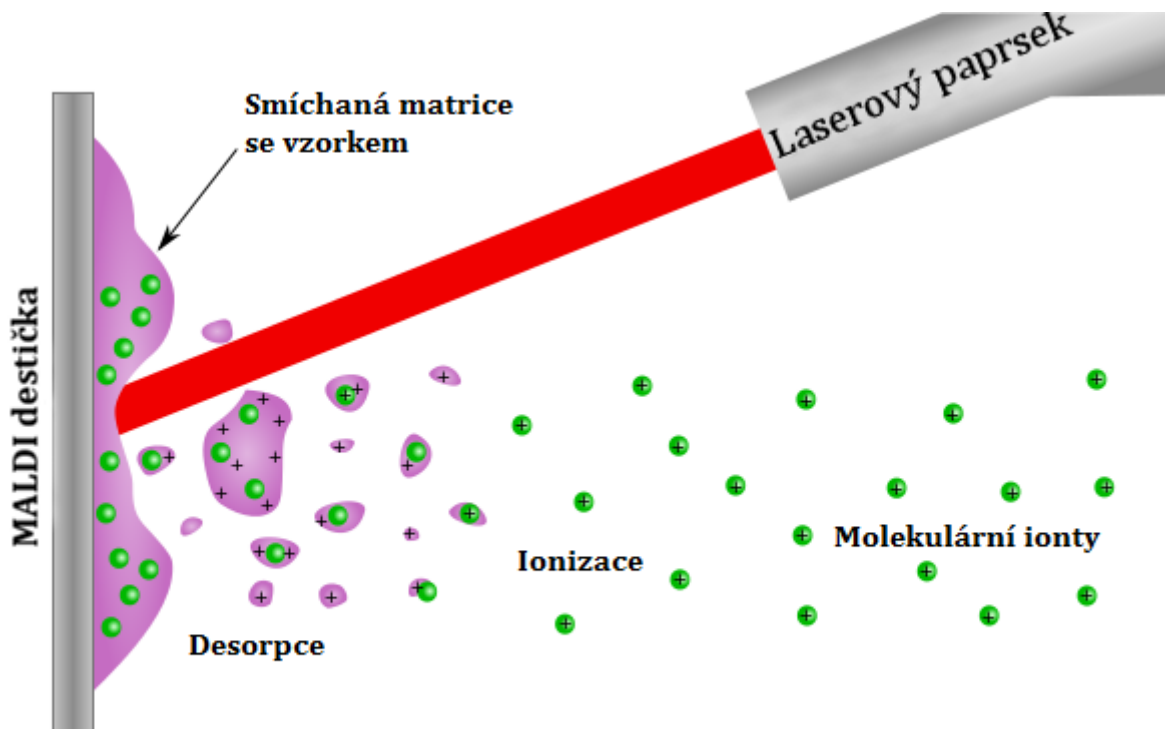
Princip MALDI byl poprvé představen v roce 1985 vědci Michaelem Karasem a Franzem Hillenkampem (Karas et al., 1985). Ionizaci proteinů použitím laseru a kapalné matrice prvně uskutečnil vědec Koichi Tanaka (Tanaka et al., 1988). Za vývoj MALDI byl v roce 2002 stejně jako John Fenn oceněn Nobelovou cenou za chemii (Tanaka, 2003).

MALDI je stejně jako ESI měkká ionizační technika, která generuje ionty ozářením pevné směsi laserovým paprskem. Tato metoda ionizace se stala rozšířenou pro produkci intaktních plynných iontů z látek, jako jsou proteiny, oligonukleotidy a syntetické polymery. MALDI se vyznačuje snadnou přípravou vzorku a větší tolerancí ke kontaminaci solemi, pufrů a detergenty oproti ESI (de Hoffmann and Stroobant, 2007; Veenstra and Yates, 2006).

Ionizace laserem za účasti matrice probíhá ve dvou krocích. Nejprve se analyzovaný vzorek smíchá s nasyceným roztokem matrice. Nasycený roztok je připraven rozpuštěním matrice například ve vodě, acetonitrilu, acetonu nebo v tetrahydrofuranu. Matrice je malá organická molekula s konjugovanými vazbami, která silně absorbuje energii při vlnové délce laseru. Vzniklá směs je nanášena na MALDI destičku ve formě spotu a nechá se zaschnout. Analyt s matricí po zaschnutí vytvoří krystalickou strukturu (de Hoffmann and Stroobant, 2007; Veenstra and Yates, 2006).

Druhý krok probíhá za podmínek vakua uvnitř zdroje hmotnostního spektrometru. Vykrytalizovaná směs na MALDI destičce je ozářena krátkými laserovými pulzy (Busch,

1995). Laser slouží k excitaci matrice, která způsobí rychlé zahřátí molekul matrice, jejich desorpci a převedení do plynné fáze. Odpařená matrice s sebou strhává molekuly analytu. Dojde k ion-molekulárním reakcím mezi analytem a ionizovanou matricí. Matrice přenesením protonu ionizuje molekuly analytu. Ionty v plynné fázi jsou pak urychlovány pomocí elektrostatického pole směrem k analyzátoru (de Hoffmann and Stroobant, 2007). MALDI je pulzní technika a proto je nejčastěji spojována s TOF analyzátozem, který je schopný separovat pulzně produkované ionty. (Dastych et al., 2012).



Obr. 3: Schéma MALDI

(převzato a upraveno podle: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maldi.svg>, staženo 7. 4. 2016)

Podobně jako u ESI, může MALDI produkovat jak pozitivní tak negativní ionty. Pozitivní ionty jsou tvořeny přijetím protonu. U MALDI většina analytů přijme jediný proton a proto jsou peptidové a velké bimolekulární ionty nejčastěji jednonásobně nabitě (Veenstra and Yates, 2006).

Klíčovým bodem pro úspěšnou MALDI analýzu s nejvyšší možnou citlivostí a přesností je správná volba matrice. K nejoblíbenějším matricím používaným v proteomice patří kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA), kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (kyselina sinapová, SA) a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) (Tab. 1). Obecně můžeme říci, že CHCA je vhodná pro peptidové mapování, SA se hodí nejlépe

pro studium větších proteinů a DHB se obvykle používá pro hydrofóbní glyko- a fosfopeptidy (Bodzon-Kulakowska et al., 2007).

Tab. 1: Nejčastěji používané matrice pro MALDI a jejich užití pro různé typy vzorků (upraveno podle Hoffmann a Stroobant, 2007)

Matrice	Zkratka	Vzorek
α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina	CHCA	peptidy, proteiny, sacharidy
2,5 - dihydroxybenzoová kyselina	DHB	peptidy, proteiny, sacharidy, syntetické polymery, organické molekuly
3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina (sinapová)	SA	peptidy, proteiny
3-hydroxypikolinová kyselina	HPA	oligonukleotidy

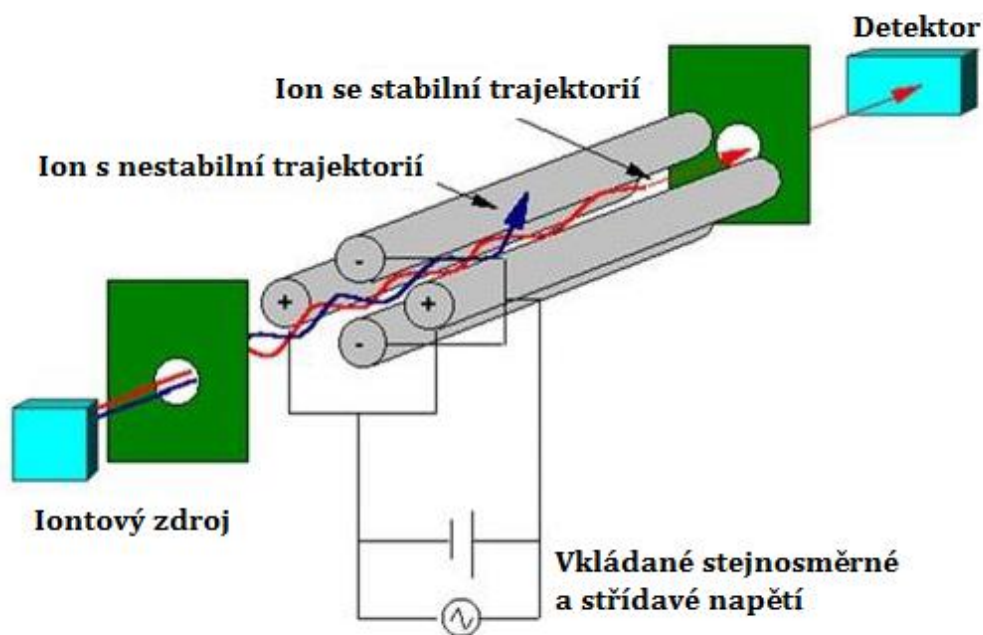
3.2 Hmotnostní analyzátoary

Jak již bylo zmíněno, hmotnostní analyzátoar je součástí hmotnostního spektrometru, kde dochází k separaci iontů na základě poměru hmotnosti k náboji (m/z). Dělení iontů je založeno na různých fyzikálních principech. Analyzátoary používají elektrické (statické či dynamické) nebo magnetické pole, případně jejich kombinace. Rozlišujeme několik typů hmotnostních analyzátoarů. První zahrnuje skenující analyzátoary, které souvisle v čase separují a propouští ionty s určitou hodnotou m/z (kvadrupól - Q, iontová past). Ke druhému typu řadíme analyzátoary s přesunem všech iontů současně do letové trubice, kde se pro jejich separaci využívá rozdílného času letu k detektoru (analyzátoar doby letu - TOF). Orbitrap a iontová cyklotrónová rezonance (ICR) tvoří třetí typ analyzátoarů, které rozdělují ionty podle jejich m/z rezonanční frekvence (Dvořáková et al., 2014; Friedecký and Lemr, 2012).

3.2.1 Kvadrupól

Velmi rozšířeným hmotnostním analyzátoarem je v současné době kvadrupól. Je složen ze 4 rovnoběžných kovových tyčí kruhového průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a střídavého napětí (elektrody naproti sobě mají vždy stejnou polaritu, (Obr. 4). Ionty jsou přivedeny do středu kvadrupólu a začnou oscilovat. Na základě velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí v daném časovém okamžiku se ionty s určitým poměrem m/z pohybují po stabilní trajektorii, projdou kvadrupólem a dopadnou na detektor. Ostatní ionty, které mají nestabilní trajektorii, jsou vychýleny, zachyceny na tyči a k detektoru se nedostanou.

Kvadrupól může pracovat ve dvou režimech (módech). Prvním je skenovací, kdy se plynule mění vkládané napětí, což umožňuje v krátkém časovém intervalu (např. 1 s) proměřit všechny hodnoty m/z . U druhého režimu - tzv. SIM (single ion monitoring) se nastaví elektrické pole kvadrupólu tak, aby procházel pouze jeden nebo několik příslušných iontů. První mód má nižší citlivost, ale umožňuje sledování všech iontů vzniklých v iontovém zdroji. SIM režim se naopak využívá pro citlivou kvantifikaci předem vybraných látek (Friedecký and Lemr, 2012).



Obr. 4: Schéma kvadrupólu

(převzato a upraveno podle: <https://www.chromservis.eu/g/time-of-flight-gc-ms>,
staženo 1. 12. 2015)

3.2.2 Iontová past

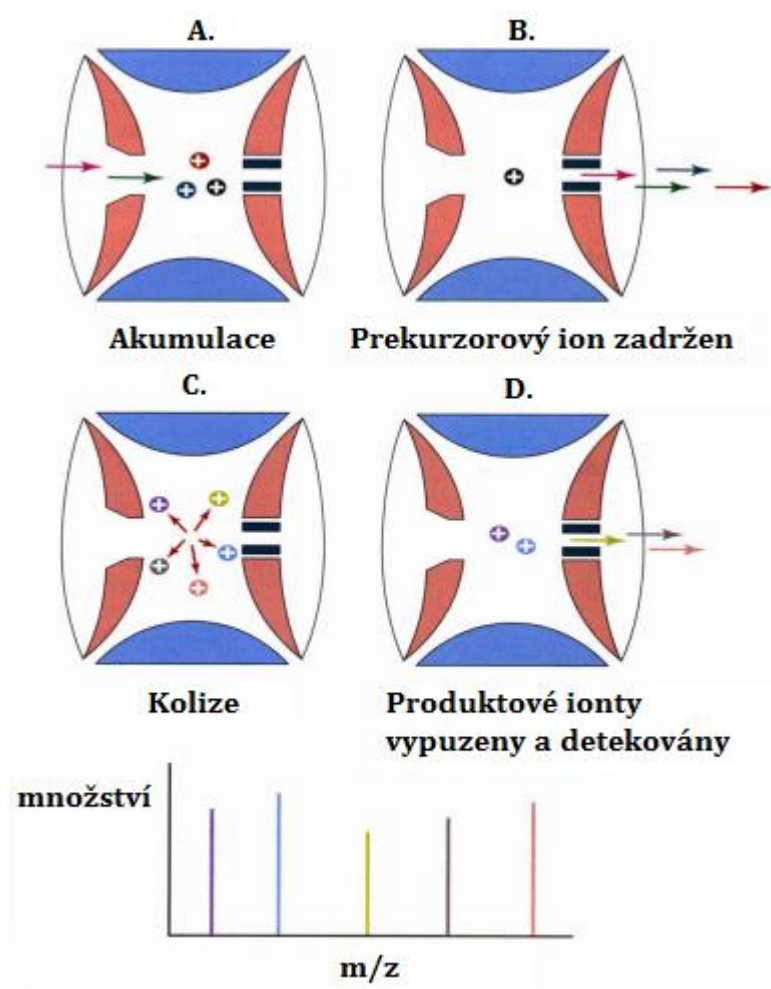
Tyto hmotnostní analyzátoři fungují stejně jako kvadrupól na principu zachycování iontů v elektrickém poli. Rozlišujeme sférickou (3D) iontovou past a lineární (2D) iontovou past.

Sférickou iontovou past tvoří středová prstencová elektroda a dvě krajní elektrody, na které je vkládáno vysokofrekvenční napětí (trojrozměrná obdoba kvadrupólu). Na rozdíl od kvadrupólu (2 směry pohybu iontů) je zde pohyb iontů regulován ve třech směrech. Ionty se uvnitř 3D iontové pasti pohybují po určitou dobu po kruhových drahách a podle jejich poměru m/z jsou z pasti selektivně vypuzovány.

Lineární iontová past tvarově připomíná kvadrupól, na jehož koncích jsou elektrody s vloženým elektrostatickým polem, které zabraňuje iontům opustit prostor pasti (Dastych et

al., 2012). Výhodou 2D pasti oproti pasti 3D je větší dynamický rozsah a vyšší citlivost, díky kterým lze identifikovat i nízké koncentrace proteinů v proteomu. Dalšími pozitivy 2D pastí je vyšší rozlišení (u vícenásobně nabitých iontů lze určit počet nábojů) a možnost akumulovat větší množství iontů na rozdíl od sférické pasti.

Iontové pasti jsou relativně levné a umožňují také rychlou a citlivou tandemovou hmotnostní spektrometrii (Obr. 5) (Verner, 2005).



Obr. 5: Schematické znázornění 3D iontové pasti při měření MS/MS

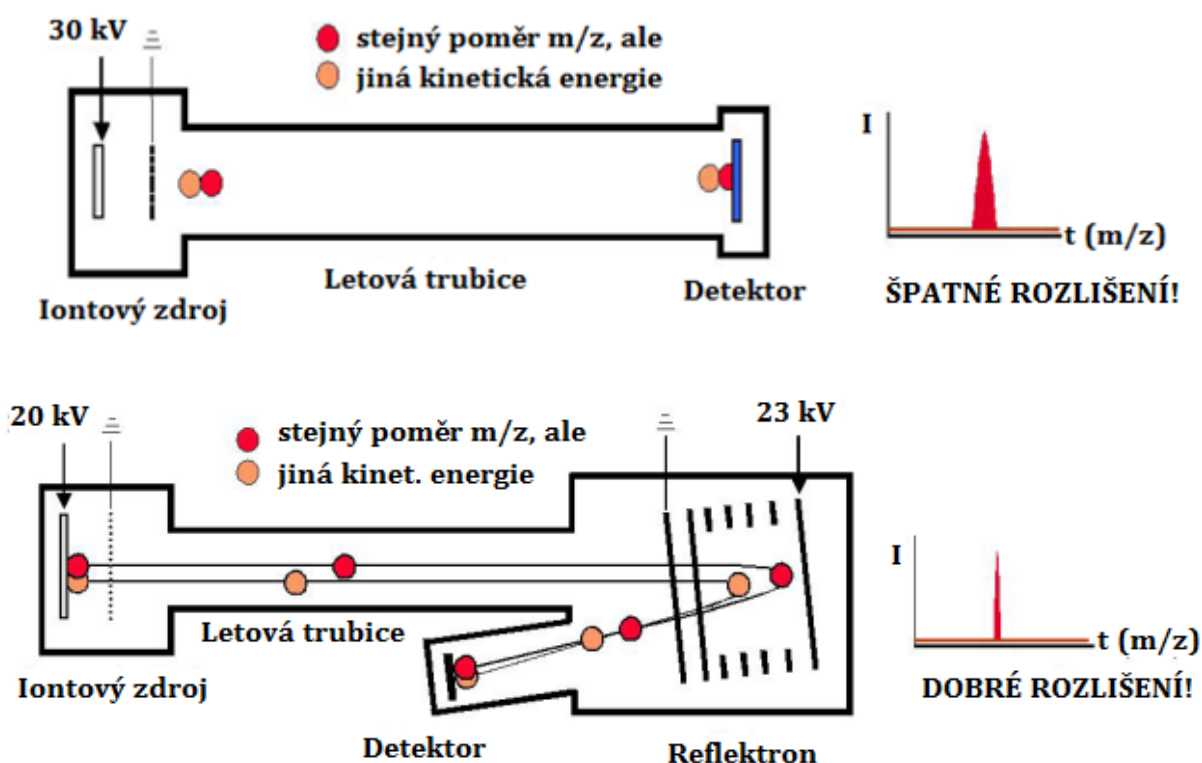
(převzato a upraveno podle Hmotnostní spektrometrie, Michal Holčapek:

http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf, staženo 20. 4. 2015)

3.2.3 Analyzátor doby letu

Analyzátoři doby letu (z angl. Time-of-Flight - TOF) patří k nejjednodušším hmotnostním analyzátořům. Poměr m/z stanovují měřením doby, za kterou ionty přeletí vakuovanou trubicí až k detektoru.

Letová dráha iontů může být prodloužena pomocí iontového zrcadla - tzv. reflektoru, které se zabuduje na konec průletové trubice (Obr. 6). Reflektor odráží ionty zpět do letové trubice a otáčí jejich směr letu do takového úhlu, aby se nekřížily s ionty vstupujícími do letové trubice. Kromě prodloužení dráhy letu dochází také ke korekci rozdílů kinetické energie mezi ionty se stejnou hodnotou m/z vystupujícími ze zdroje. Ionty s větší kinetickou energií a tedy i větší rychlostí proniknou do reflektoru hlouběji než ionty s kinetickou energií nižší. V důsledku toho dojde ke zdržení iontů s větší kinetickou energií v reflektoru a jejich současnému zachytu na detektoru s pomalejšími ionty, které mají stejný poměr m/z . (de Hoffmann and Stroobant, 2007; Yates, 1998).



Obr. 6: Schéma analyzátoru doby letu bez reflektoru a se zabudovaným reflektorem

(převzato a upraveno podle J. Cvačka:

http://www.mu-j-web.cz/MC230P43/files/03_MC230P43_2014.pdf; staženo 9. 12. 2014)

3.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) je velmi citlivá metoda umožňující rychlou analýzu bez nebo ve spojení se separační metodou (např. GC, LC). U MS/MS jsou za sebou zapojeny dva hmotnostní analyzátoři a mezi ně je vložena kolizní cela. V prvním analyzátoru probíhá výběr iontů s určitou hodnotou m/z , které pak vstupují do kolizní cely, kde dochází k jejich fragmentaci. Fragmentové (produktové) ionty jsou po vstupu do druhého analyzátoru zaznamenány jako hmotnostní spektrum (Dastych et al., 2012).

3.3.1 Trojitý kvadrupól

Trojitý kvadrupól (QqQ) je velmi oblíbený díky jeho cenové dostupnosti, robustnosti a vysoké citlivosti při studiu složitých biologických vzorků.

První (Q1) a třetí kvadrupól (Q3) pracují jako hmotnostní analyzátoři. Druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela, do které je pod tlakem několika desetin Pascalů přiváděn kolizní plyn (dusík, argon, xenon, helium). Elektricky urychlené ionty putující z prvního kvadrupólu se zde sráží s molekulami kolizního plynu. Srážkami dochází k tzv. kolizně indukované disociaci (CID), kdy zvýšená vnitřní energie iontů vede k jejich fragmentaci.

Trojitý kvadrupól může pracovat ve čtyřech režimech skenování.

Sledování rozpadu vybraného iontu (Selected reaction monitoring, SRM)

Q1 vybere ion prekurzoru a ten je v kolizní cele fragmentován při podmínkách optimální kolizní energie pro nejintenzivnější fragment, který je vybrán pomocí Q3. Takto jsou postupně proměřeny všechny látky ze vzorku. SRM se používá pro kvantifikaci a pro stanovení více analytů ve vzorku, když každý z nich vytváří fragmenty jiným způsobem. Prakticky tedy můžeme pomocí tohoto módu měřit až stovky analytů během jedné analýzy, což se označuje jako „Multiple reaction monitoring“ (MRM).

Sken produktových (dceřiných) iontů

První kvadrupól propouští ion s určenou hodnotou m/z . Po fragmentaci v kolizní cele pracuje Q3 v režimu skenování definovaného rozsahu m/z . Detektor zaznamenává všechny vzniklé fragmenty. Sken produktových iontů se používá pro identifikaci látek nebo při vývoji metody, protože přináší informace o struktuře látky a její kompletní fragmentaci.

Sken prekurzorových (mateřských) iontů

Zde naopak Q1 pracuje ve skenovacím režimu, tedy postupně propouští do Q2 ionty se zvyšující se hodnotou m/z . Q3 propouští k detektoru pouze jeden určitý fragment. Tento režim je vhodný pro sledování molekul analytu se stejnou funkční skupinou, které mají typickou fragmentaci (např. fosfát u nukleotidů).

Sken neutrální ztráty

Q1 skenuje ionty z určitého rozsahu m/z a Q3 skenuje interval m/z , který je nižší o určitou neměnnou hodnotu. Konstantní hodnota představuje neutrální fragment, který vznikl v kolizní cele ztrátou ze struktury prekurzorového iontu.

Podobně jako u skenu prekurzorů se i sken neutrální ztráty používá pro molekuly se stejnou strukturní částí. Další využití najdeme v případě derivatizace aminokyselin, u kterých navázaná funkční skupina zvyšuje ionizaci a při fragmentaci poskytuje neutrální fragment (Friedecký and Lemr, 2012; Fryčák et al., 2003).

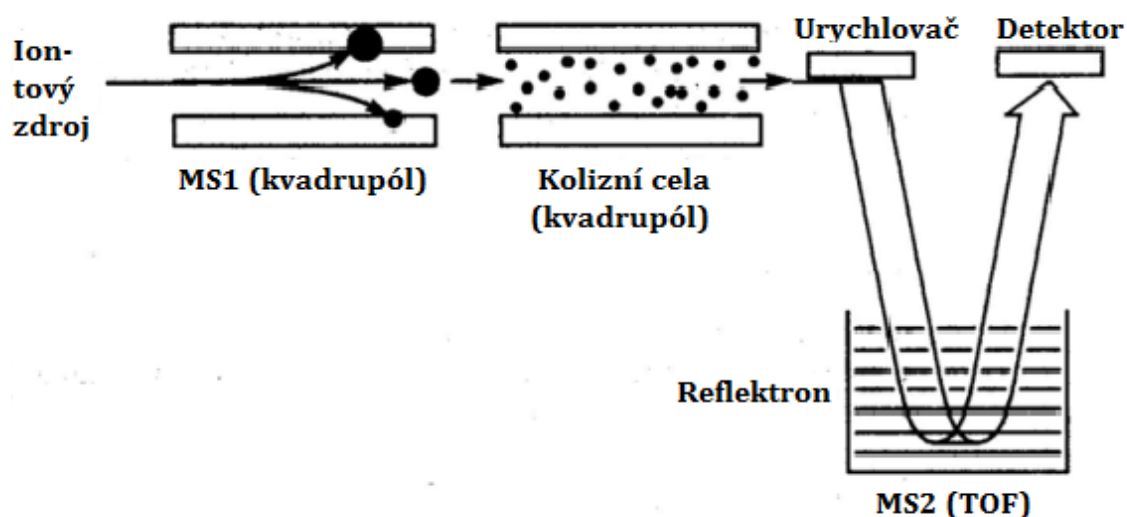
3.3.2 Kvadrupól - TOF analyzátor

Hybridní hmotnostní spektrometr QqTOF se skládá obdobně jako trojitý kvadrupól z počátečního kvadrupólového analyzátoru, druhého kvadrupólu, který funguje jako kolizní cela a třetí kvadrupól je u QqTOFu nahrazen analyzátozem doby letu (Obr. 7).

Tento přístroj kombinuje výhody obou typů hmotnostních analyzátorů: iontovou selektivitu a citlivost kvadrupólu a vysoké rozlišení a přesné určení hmotnosti u TOF analyzátoru.

Při klasickém MS měření kvadrupól (někdy také hmotnostní filtr) pracuje pouze ve skenovacím režimu, což umožňuje všem iontům procházet přímo do analyzátoru TOF. U MS/MS analýzy projde z kvadrupólu do kolizní cely pouze příslušný ion (či ionty), který v cele podstoupí fragmentaci prostřednictvím srážek s neutrálním plynem. Vzhledem k výsledné vysoké energii se pak fragmentové ionty ochladí (vzájemnými srážkami) a následně urychlením nasměrují do letového analyzátoru, kde jsou detekovány podle jejich poměru m/z (Veenstra and Yates, 2006).

QqTOF bývá nejčastěji spojen s iontovým zdrojem ESI (Guerrera and Kleiner, 2005).



Obr. 7: Schéma hybridního hmotnostního spektrometru QqTOF
 (převzato a upraveno podle: http://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf)

3.4 Detektory

Poslední částí hmotnostního spektrofotometru je detektor, který zaznamenává ionty letící z analyzátoru a jejich signál převádí do digitálního formátu. Obvyklým detektorem je elektronový násobič, který obsahuje sadu dynod. Při nárazu iontu do první dynody dojde k emisi elektronu, který dopadem na další dynodu vyrazí další elektrony. Vzniká elektrický proud, který je sérií dynod postupně zesilován.

Zvláštní skupinou detektorů je orbitrap a iontová cyklotronová rezonance. U nich jsou všechny ionty detekovány díky indukci proudu v důsledku oscilace iontů v analyzátoru. Frekvence iontů o různé velikosti m/z je zpracována Fourierovou transformací a převedena na hmotnostní spektrum (Dastyh et al., 2012; Friedecký and Lemr, 2012).

4 Přístupy k proteomickému studiu

Pro studium proteinů pomocí MS se v dnešní době využívají dva hlavní přístupy. Prvním je bottom-up (enzymatické štěpení proteinů na peptidy) a druhým přístupem je top-down (bez enzymatického štěpení proteinů).

Bottom-up je postup, kdy je nejprve daný protein separován ze směsi a poté enzymově štěpen na peptidy. Směs peptidů je následně charakterizována hmotnostní spektrometrií. Proteiny lze štěpit v gelu (in-gel digestion/ štěpení) nebo v roztoku (in-solution).

U in-gel štěpení se z gelu vyříznou proužky, které obsahují proteiny. Přidáním redukčního činidla je rozrušena 3D struktura proteinu a tím dojde k zpřístupnění většího počtu sférických míst a k efektivnějšímu proteolytickému štěpení. Aby nedošlo k opětovné tvorbě disulfidických můstků (3D struktury) vlivem vzdušné oxidace, je nutné přidat alkylační činidlo. K samotnému štěpení se nejčastěji používá enzym trypsin, který štěpí proteinový řetězec za argininem a lysinem (pokud za nimi nenásleduje prolin) směrem k C-konci. Nevýhodou této metody může být nedokonalá extrakce peptidů z gelu a obtížná automatizovatelnost, naopak výhodou je částečné odstranění nečistot při nanesení na gel.

Při štěpení in-solution dochází ke štěpení proteinů přímo v roztoku. Oproti štěpení v gelu je u této metody snadnější robotická příprava vzorku.

Top-down přístup je založen na analýze proteinu izolovaného z komplexního vzorku, kdy nedochází k proteolytickému štěpení proteinu. Analýza intaktního proteinu je méně účinná než měření peptidů, poskytuje však informace o kompletní sekvenci aminokyselin a posttranslačních modifikacích. Další výhodou této techniky je stanovení přesné molekulové hmotnosti (Chmelík, 2005; Dvořáková et al., 2014).

Ve své diplomové práci využívám tohoto přístupu ke studiu proteinů a jejich vazby s ligandy.

5 Interakce protein-ligand

5.1 Struktura proteinů

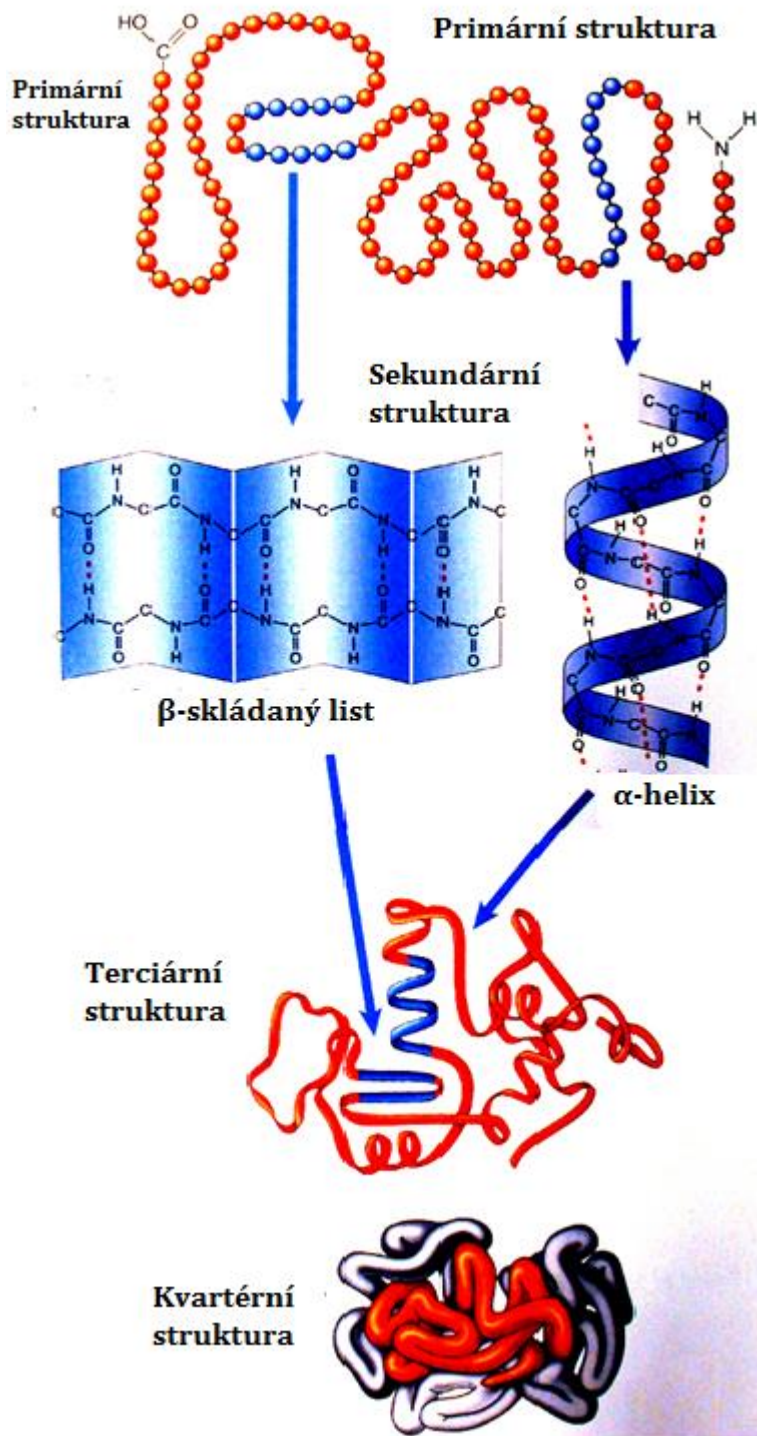
Proteiny jsou složeny z aminokyselin, které tvoří peptidové řetězce. Molekuly proteinů mají složité prostorové uspořádání, které je rozdělováno do čtyř úrovní, a to na primární, sekundární, terciární a kvartérní strukturu proteinů (Obr. 8).

Zastoupení jednotlivých aminokyselin a jejich sekvence (pořadí) představuje primární strukturu proteinů. Aminokyseliny jsou v peptidovém řetězci navzájem pospojovány peptidovou vazbou -CO-NH-. Složení a sekvence aminokyselin je pro každý druh proteinu charakteristická, sekvence určuje konformaci celé molekuly a tím i její vlastnosti.

Sekundární strukturu tvoří prostorová orientace polypeptidového řetězce, který je v prostoru stabilizován pomocí vodíkových můstků mezi peptidovými vazbami v řetězci. Polypeptidový řetězec může mít konformaci označovanou jako α -helix nebo β -skládaný list. α -helix je šroubovicové uspořádání, které je stabilizováno vodíkovými můstky mezi nad sebou ležícími peptidovými vazbami (aminokyseliny téhož řetězce). U β -struktury skládaného listu probíhají úseky řetězce vedle sebe. Vodíkové můstky propojují dva sousedící řetězce.

Jako terciární strukturu označujeme trojrozměrné uspořádání celého peptidového řetězce, tedy konečnou strukturu molekuly proteinu. Na stabilizaci postranního řetězce aminokyselin se zde uplatňují vazby: vodíkové můstky, disulfidické můstky, hydrofobní interakce a iontové vazby.

Některé bílkoviny jsou složeny z více polypeptidových řetězců (podjednotek) spojených nekovalentními vazbami. Podjednotky mají stejnou nebo rozdílnou strukturu. Příkladem podjednotkových (polymerních) proteinů jsou některé enzymy, hemoglobin, myoglobin, feritin, protilátky a jiné. Biologická aktivita polymerních proteinů je dána jejich kvartérní konformací (Fellnerová et al., 2014; Nečas et al., 1989).



Obr. 8: *Struktura proteinů* (převzato a upraveno podle: http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/prot_struct-4143.JPG, staženo 6. 4. 2016)

5.2 Interakce proteinů s nízkomolekulárními ligandy

Živé organismy jsou schopny reagovat na podněty a zachovávat si svou homeostázu díky existenci nekovalentních interakcí, na kterých se podílí z velké části proteiny. Proteiny komunikují přes fyzické interakce a pro předání informace je třeba specificky rozpoznat jejich interagující partnery. Vazba látek na proteiny je uskutečněna pomocí nekovalentních interakcí jako jsou van der Waalsovy síly, vodíkové vazby a hydrofobní interakce (Boeri Erba, 2014). Prostřednictvím těchto interakcí proteiny vážou ligandy, jako jsou jiné proteiny, ionty, substráty, kofaktory, malé molekuly nebo léčiva, sacharidy, DNA a RNA (Boeri Erba, 2014; Held et al., 2011)

Schopnost proteinů vázat ligandy je důležitá pro všechny životní procesy v organismu. Protein-ligandové interakce například zprostředkovávají vylučování a skladování molekuly (např. u vazby kyslíku na hemoglobin), molekulární rozpoznávání vedoucí k přenosu informací (neurotransmitery nebo růstové hormony), tvorbu biologických struktur (například v RNA-ribozomových interakcích) (Held et al., 2011).

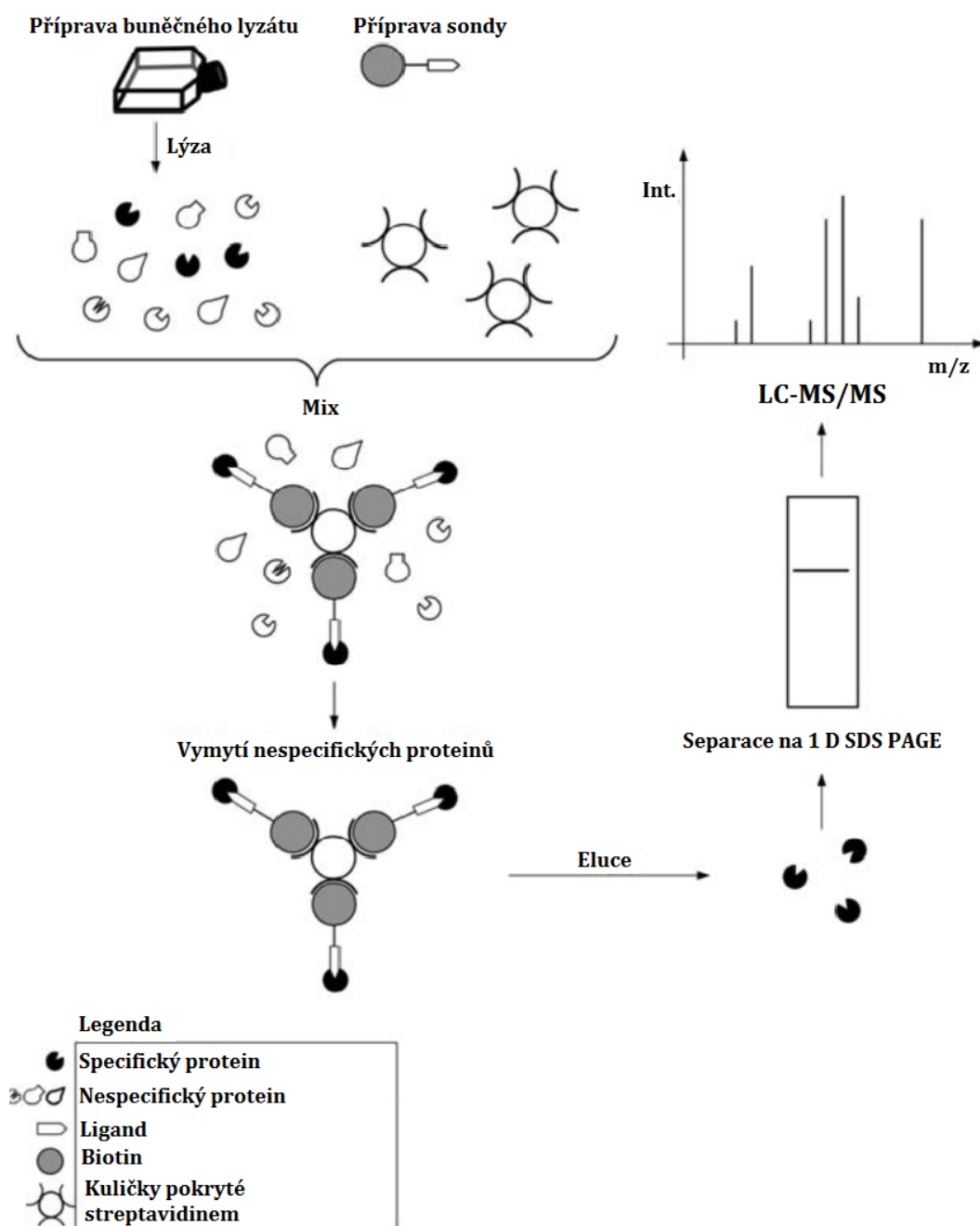
Rozvoj bližšího pochopení strukturně funkčních vztahů proteinů ve vazbě s ligandy je základem molekulárních věd. Interakce proteinů s malými molekulami jsou zásadní jak pro činnost mnoha farmaceutických látek, tak pro široké spektrum biologických procesů (Olsson et al., 2008). Navázaný ligand mění stav a funkci proteinu (Protein- Ligand Interaction (Theory): Bioinformatics Virtual Lab III: Biotechnology and Biomedical Engineering). Funkční aktivita je ovlivněna například vyvoláním (nebo blokováním) posttranslační modifikace (např. fosforylace), která následně změní konformaci proteinu.

Vazebné místo lze definovat jako dutinu na povrchu proteinu tvořenou konkrétním uspořádáním aminokyselin. Vazba závisí na tvorbě kontaktů mezi chemickými skupinami vazebné látky a skupinami, které jsou ve vazebném místě cílového proteinu (Han and Hwan Kim, 2007).

5.3 Metody studia interakce proteinů s ligandy

5.3.1 Afinitní purifikace

Afinitní purifikace je technika založená na interakci mezi ligandem (sonda) a proteinem (cílová molekula; Obr. 9). Tato technika byla vyvinuta na počátku roku 1950 a je úspěšně používána ke studiu řady proteinových interakcí a při identifikaci molekulárních (lékových) cílů.



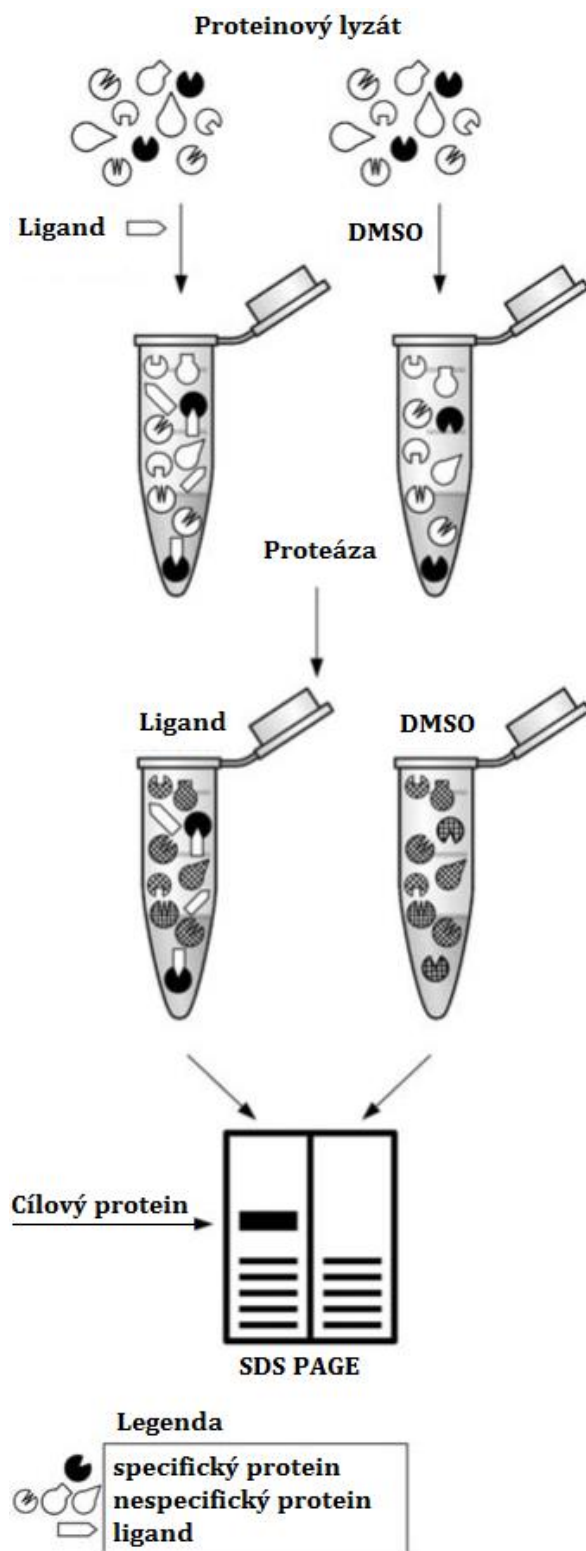
Obr. 9: Schéma afinitní purifikace (upraveno podle (Rylova et al., 2015))

Nejprve se provede modifikace a imobilizace sondy na pevnou matici. Poté je imobilizovaná sonda inkubována s daným vzorkem obsahujícím proteiny (obvykle buněčný lyzát). Během inkubace dojde k navázání interagujících proteinů na sondy. Nespecificky navázané proteiny a jiné (kontaminující) molekuly jsou následně odmyty. Zachycené proteiny jsou eluovány pomocí pufru, který přeruší ligand-proteinové interakce. Vyeluované proteiny jsou analyzovány a identifikovány technikami jako je 1D nebo 2D gelová elektroforéza, western blotting nebo hmotnostní spektrometrie (Rylova et al., 2015).

5.3.2 DARTS

DARTS (z angl. Drug Affinity Responsive Target Stability) je technika založená na relativní konformační stabilitě proteinu po navázání malé molekuly (ligandu). Vazba ligandu může stabilizovat konformační strukturu proteinu tak, že se protein stane odolnějším proti denaturaci a méně náchylným k proteolýze. Navázáním ligandu na protein se ochrání štěpící místo proteázy.

Nejprve se buněčný lyzát inkubuje s požadovaným ligandem (malou molekulou) a s neaktivním strukturním analogem ligandu (např. DMSO) (Rylova et al., 2015). Dalším krokem metody DARTS je separace ligandem ošetřeného proteinového vzorku a neošetřeného (kontrolního) vzorku po štěpení proteázou pomocí SDS-PAGE. Po obarvení gelu modří Coomassie Sypro Ruby nebo stříbrem vyhledáváme jednotlivé elektroforetické bandy, které jsou intenzivnější u jednoho vzorku než u druhého proteinového vzorku (Obr. 10). Band, který se svou intenzitou liší mezi ošetřeným a neošetřeným vzorkem, odpovídá proteinu ošetřenému léčivem. Bandy mohou být následně vyříznuty z gelu, štěpeny trypsinem a analyzovány kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) (Lomenick et al., 2011).



Obr. 10: Schéma metody DARTS (upraveno podle (Rylova et al., 2015))

5.3.3 Studium interakcí pomocí hmotnostní spektrometrie

Během posledních dvou desetiletí se stala MS cenným přístupem k vyšetřování nekovalentně vázaných komplexů. Hmotnostní spektrometrie je nástrojem nejen pro studium kovalentních komplexů, u kterých je její užívání dobře známo, ale také především pro interakce proteinů s ligandy, které jsou nekovalentní (Schmidt and Robinson, 2014). MS má pro studium interakcí ve srovnání s jinými technikami několik výhod, a to zejména citlivost a rychlost analýzy (Boeri Erba, 2014).

Předpokladem pro udržení nekovalentních interakcí během přenosu do plynné fáze je zachování proteinu v jeho nativním stavu, tedy nerozvinutí jeho jednotek. V časovém horizontu hmotnostně spektrometrické analýzy je však nativní konformace proteinu zachována (Ruotolo and Robinson, 2006). V porovnání s jinými typy MS analýz, se nepoužívá ani kyselé prostředí, ani organická rozpouštědla (Boeri Erba, 2014; Schmidt and Robinson, 2014)

Nedenaturující neboli nativní hmotnostní spektrometrie intaktních komplexů protein-ligand může odhalit jejich složení, heterogenitu, stechiometrii, topologii a interakce podjednotek. Hmotnostní rozsah může zahrnovat malé ligandy až po velké sestavy proteinů, často ve stejném hmotnostním spektru (Schmidt and Robinson, 2014).

Obecně platí, že ke studiu nekovalentních interakcí je nutné nejen dodržovat odpovídající podmínky ionizace, ale také používat přístroje, které jsou speciálně upraveny pro rozdělení a detekci těchto velkých komplexů.

Dnes jsou široce používány hmotnostní spektrometry QqTOF, které vykazují vysokou citlivost při velkém poměru m/z (Boeri Erba, 2014).

Použití hmotnostní spektrometrie pro studium bílkovin a bílkovinných komplexů má využití ve strukturní biologii a biomedicíně výzkumu. Farmaceutický průmysl závisí na nástrojích pro screening milionu sloučenin k identifikaci molekul, které se specificky váží na cílové proteiny. Stechiometrie vazby ligandu může být u ESI-MS měřena dobře, zatímco stabilita a afinita se pomocí ESI stanovuje poměrně obtížněji (A. Loo et al., 2013)

6 Experimentální část

6.1 Materiál a metody

6.1.1 Chemikálie

- Voda pro MS (Direct-Q 3 System, Millipore, Francie);
- Acetonitril pro LC-MS (ACN, Sigma-Aldrich, Německo)
- Triterpen odvozený od kyseliny betulínové, koncentrace 1 mmol/l (chemická knihovna ÚMTM)
- Cisplatina o koncentraci 0,5 mg/ml (EBEWE, Rakousko)
- Karboran o koncentraci 10 mmol/l (chemická knihovna ÚMTM)
- Hovězí sérový albumin (BSA, Sigma Aldrich, USA)
- Cytochrom c (Sigma-Aldrich)
- L-Tryptofan (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina sinapová (3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzová kyselina, Bruker, Německo)
- Citrát amonný (Sigma-Aldrich)
- Hydroxid amonný (Sigma-Aldrich)

6.1.2 Přístrojové vybavení

- hmotnostní spektrometr TripleTOF[®] 5600+ System (AB SCIEX, Německo)
- hmotnostní spektrometr Bruker Ultraflexreme (Bruker Daltonics, Německo)
- analytické váhy (SCALTEC)
- třepačka Vortex (HEIDOLPH REAX Control)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf, Německo)

6.1.3 Software

- flexControl verze 3.3 (Bruker Daltonics, Německo)
- FlexAnalysis software verze 3.3 (Bruker Daltonics, Německo)
- Analyst TF 1.6 (AB Sciex, USA)
- ESIprot verze 1.0

6.2 Metody

V experimentální části práce se zabývám měřením hmoty intaktních proteinů (bez enzymatického štěpení a bez fragmentace) a měřením interakcí těchto proteinů s nízkomolekulárními ligandy. Pro studium interakcí byly použity dva typy hmotnostních spektrometrů: QqTOF s iontovým zdrojem ESI a MALDI-TOF.

6.2.1 Příprava vzorků

Příprava roztoků cytochromu c

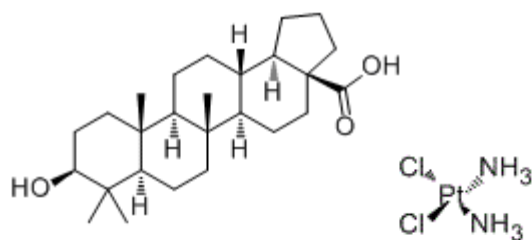
Na analytických vahách byl navážen 1 mg cytochromu c. Ten se pomocí MS vody naředil na požadovanou koncentraci 1 mg/ml. Cytochrom c o této koncentraci byl dále ředěn dvojkovou koncentrační řadou. Ředěním byly získány tyto koncentrace: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95 $\mu\text{g/ml}$.

Příprava roztoků hovězího sérového albuminu

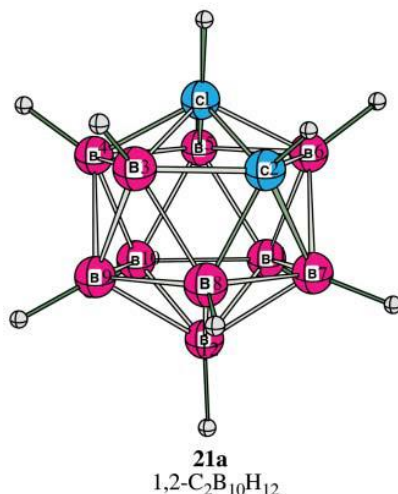
Stejným způsobem jako u cytochromu c byla připravena dvojková koncentrační řada hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentracích: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95 $\mu\text{g/ml}$.

Příprava směsných vzorků s ligandy

Podle intenzity hmotnostního spektra cytochromu c a BSA byla pro vazbu s ligandy zvolena jako optimální koncentrace 15,63 $\mu\text{g/ml}$. K těmto koncentracím byly spočítány ekvimolární objemy ligandů. Pro triterpen o koncentraci 1000 $\mu\text{mol/l}$ byl vypočítán ekvimolární objem 0,69 μl , pro karboran o $c = 100 \mu\text{mol/l}$ byl použit objem 7 μl a u cisplatině o $c = 1700 \mu\text{mol/l}$ byl vypočítán objem 0,40 μl . Byly připraveny 3 proteinové vzorky o koncentraci 15,63 $\mu\text{g/ml}$ a ke každému připipetováno ekvimolární množství jednoho z ligandů. Chemické struktury triterpenu a cisplatině jsou znázorněny na Obrázku 11 a chemická struktura karboranu na obrázku 12. Triterpen je odvozený od kyseliny betulinové.



Obr. 11: Struktura kyseliny betulinové (triterpen) a cisplatině



Obr. 12: Polyhedrální struktura karboranu - C₂B₁₀H₁₂ (převzato od Jemmis et al., 2006)

Pro měření vzorků na MALDI-TOF přípravu směsného vzorku BSA s tryptofanem byla použita koncentrace BSA 10 mg/ml a koncentrace tryptofanu 10 mg/ml.

Příprava vzorku avidinu s biotinem byla záležitostí chemické syntézy a je popsána v publikaci Jedinákové a kolektivu (Jedináková et al., 2016). Ve stručnosti, 1 μl avidinu, avidinu s meziproductem a avidinu s finálním produktem byly smíchány s 1 μl sinapové kyseliny (MALDI matrice), nanесeny na terčík a analyzovány pomocí MALDI-TOF.

6.2.2 Analýza na ESI/QqTOF

Hmotnostní spektrometr ESI/QqTOF byl nastaven pro přímý nástřik vzorku. Před použitím a po každém měření vzorku byl přístroj promyt pomocí 50 % ACN. Po připojení stříkačky obsahující roztok standardu k iontovému zdroji proběhla kalibrace. Vzorky byly do iontového zdroje aplikovány pomocí stříkačky (500 μl) připojené k pumpě s krokovým motorem a nastaveným průtokem 10 μl/min. Na iontovém zdroji byly nastaveny tyto podmínky: průtok dusíku 50 l/min, průtok plynu „Curtain gas“ 20 l/min, teplota 300°C a napětí na sprejovací jehle 5000 V.

Pro získání MS spektra studované látky byl hmotnostní spektrometr nastaven na režim TOF MS v pozitivním módu a v rozsahu hmot od 500 do 3000 Da. Hodnota deklasterizačního potenciálu (DP) byla 200 V a kolizní energie (CE) 10 V. Po ustálení signálu byla změřena a uložena MS spektra. Doba sbírání spekter byla 1 minuta.

6.2.3 Příprava MALDI matrice

Na analytických vahách bylo naváženo 25 mg kyseliny sinapové a 50 mg citrátu amonného. Kyselina sinapová a citrát amonný byly smíchány, rozpuštěny v 0,5 ml deionizované vody a vytitrovány na pH 7 pomocí koncentrovaného hydroxidu amonného (postupným přidáváním 7 μ l hydroxidu).

Pro měření na MALDI-TOF byly vzorky připraveny metodou dried droplet, tj. smíchány s připravenou matricí v poměru 1:1 (1 μ l vzorku + 1 μ l matrice), promíchány a v objemu 1 μ l nanесeny na MALDI destičku a nechaly se zaschnout. Po vytvoření krystalků směsi byla MALDI destička vložena do přístroje.

6.2.4 Analýza na MALDI-TOF

Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF byl nastaven na tyto podmínky: rozsah m/z 20 000 - 150 000, napětí na detektoru 2913 V, relativní síla laseru 100 %. Napětí na iontovém zdroji byla následující: Ion source (IS) 1 25,5 kV; IS 2 23,59 kV; Lens 6,96 kV. Bylo nasbíráno a sečteno 2000 spekter.

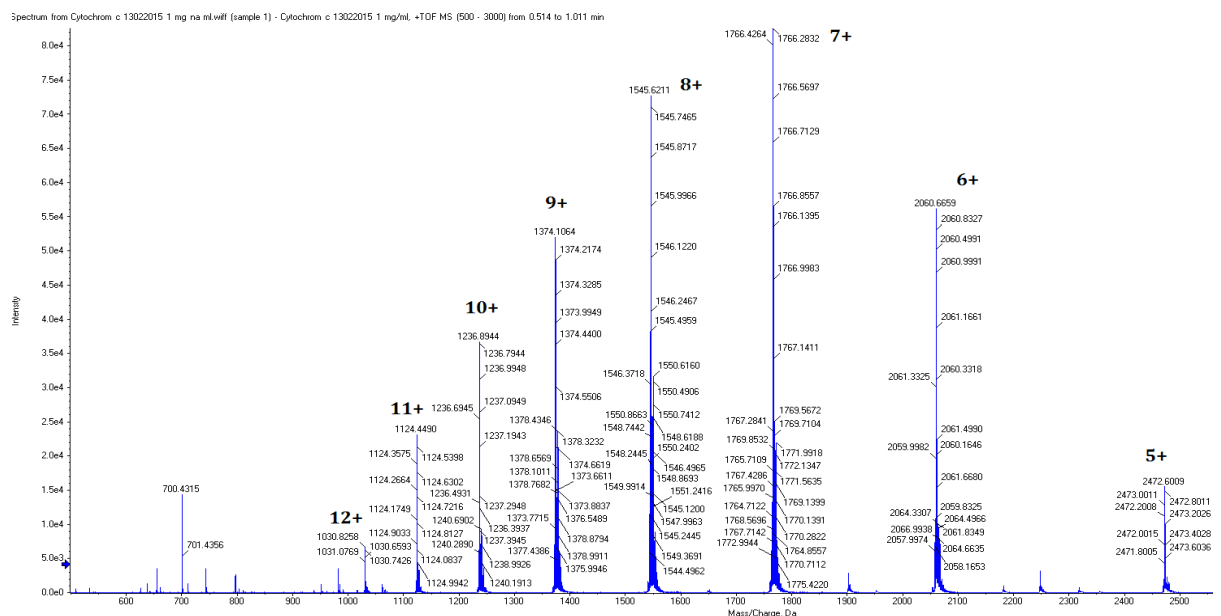
7 Výsledky

7.1 Linearita a senzitivita MS analýzy cytochromu c a hovězího sérového albuminu

Tento experiment měl za úkol odhalit lineární rozsah a citlivost dvou hmotnostně spektrometrických přístupů – ESI-QqTOF a MALDI-TOF. K tomuto účelu jsme si vybrali jeden protein s nízkou molekulovou hmotností (cytochrom c) a jeden protein se střední molekulovou hmotností (BSA).

7.1.1 Analýza pomocí ESI-QqTOF

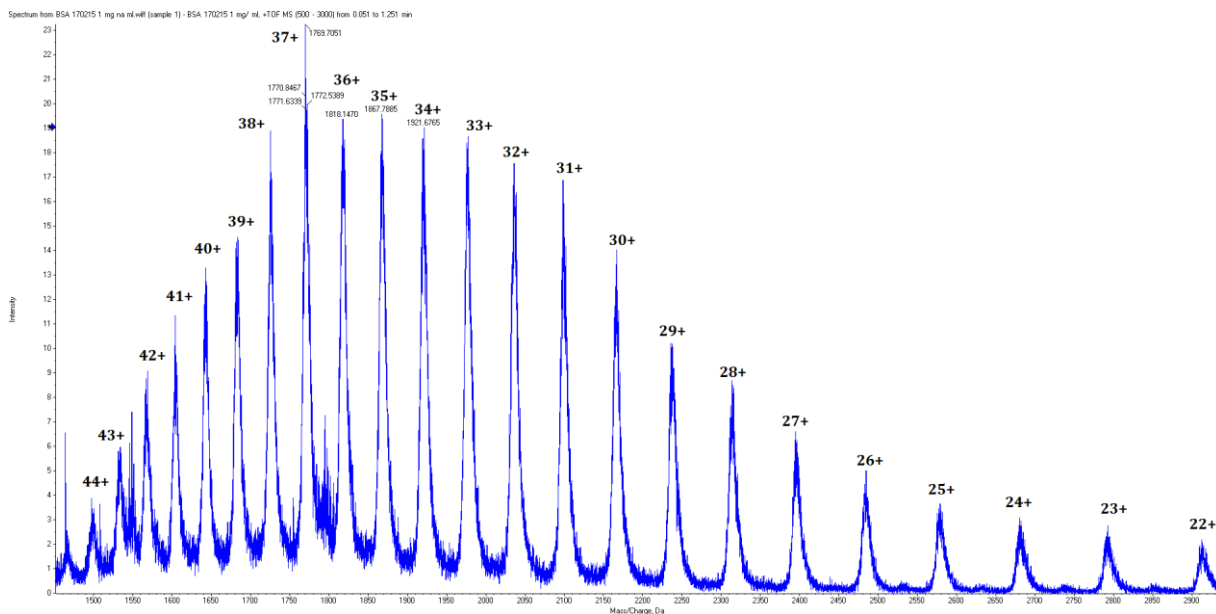
Měřením na hmotnostním spektrometru QqTOF byla pro koncentrace 1000; 500; 250; 125; 62,50; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91 a 1,95 $\mu\text{g/ml}$ získána hmotnostní spektra cytochromu c a BSA. Na Obrázku 13 můžeme vidět MS spektrum cytochromu c při koncentraci 1000 $\mu\text{g/ml}$. U jednotlivých píků jsou vyznačeny nábojové stavy detekovaných iontů. Molekulární ionty cytochromu byly naměřeny od 1030 do 2472 m/z a zaznamenáno bylo 8 nábojových stavů.



Obr. 13: Hmotnostní spektrum cytochromu c získané ionizací elektrosprejem

Hmotnostní spektrum proteinu BSA v rozsahu 1500 - 2900 m/z je na Obrázku 14. U BSA došlo k vytvoření molekulárních iontů s 22 až 44 kladnými náboji.

U MS spekter obou proteinů můžeme vidět, že pomocí ionizace elektrosprejem se vytvořily vícenásobně nabitě ionty.

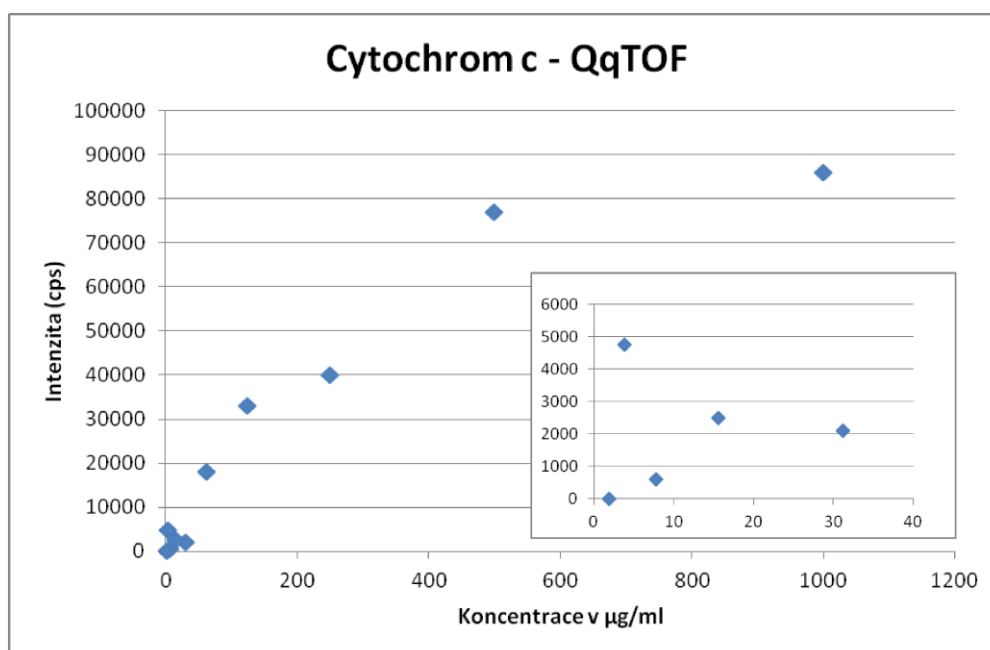


Obr. 14: Hmotnostní spektrum BSA získané ionizací elektrosprejem

U naměřených spekter byl zvolen nejintenzivnější ion o poměru m/z 1766,43 a hodnoty intenzit tohoto iontu v jednotkách cps (counts per second - počet dopadu iontů za sekundu) u každé příslušné koncentrace byly vyneseny do grafu (Graf 1). Byla vytvořena kalibrační křivka pro cytochrom c udávající závislost intenzity (cps) na koncentraci ($\mu\text{g/ml}$). V pravém dolním rohu Grafu 1 je vložený graf pro hodnoty koncentrací od 1,95 do 31,25.

Koncentrace od hodnoty 7,81 $\mu\text{g/ml}$ (intenzita 594 cps) do hodnoty 500 $\mu\text{g/ml}$ (intenzita 77 000 cps) jsou lineární. Od koncentrace 1000 $\mu\text{g/ml}$ dochází k postupné saturaci. Pro měření cytochromu c je tedy optimální používat koncentrace z oblasti linearitu měření a to: 7,81 - 500 $\mu\text{g/ml}$.

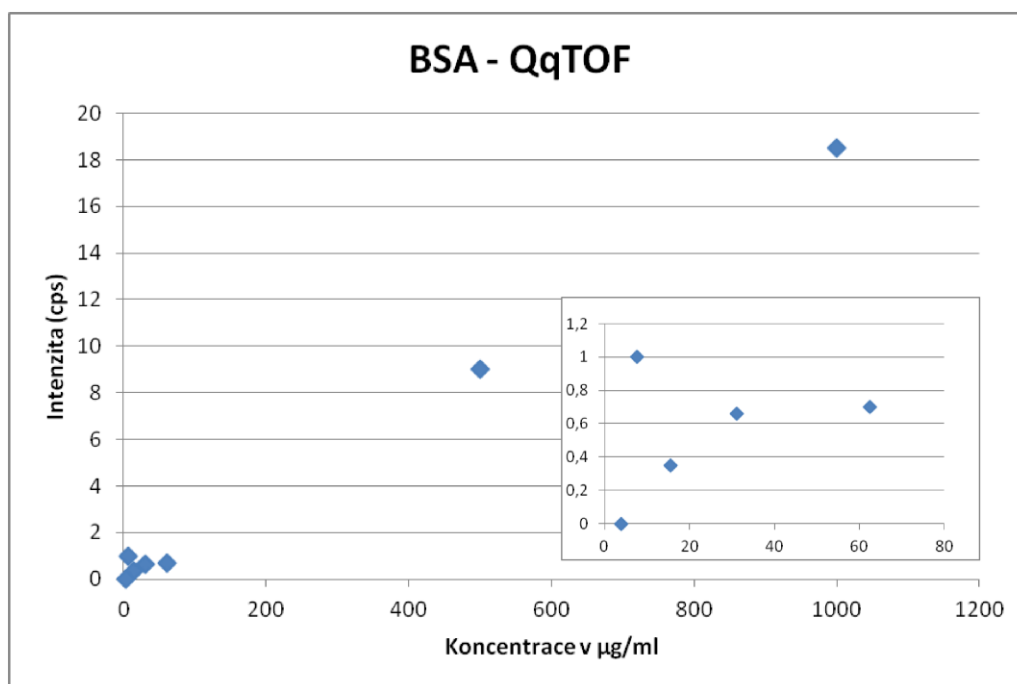
Graf 1 Kalibrační křivka závislosti intenzity na koncentraci cytochromu c měřená pomocí ESI



U hovězího albuminu byl taktéž sestaven graf závislosti intenzity na koncentraci (Graf 2). V Grafu 2 je vložen graf se stejnými veličinami jako Graf 2 pro lepší rozlišení koncentrací od 3,91 $\mu\text{g/ml}$ do 62,50 $\mu\text{g/ml}$. Hodnoty intenzit u všech měřených koncentrací byly zjištěny u molekulárních iontů s poměrem m/z 1919.

Od koncentrace 15,63 $\mu\text{g/ml}$ až do 1000 $\mu\text{g/ml}$ lze měření považovat za lineární. V tomto případě ještě nedochází k saturaci, a proto můžeme pro práci s BSA zvolit koncentraci 1000 $\mu\text{g/ml}$ a vyšší.

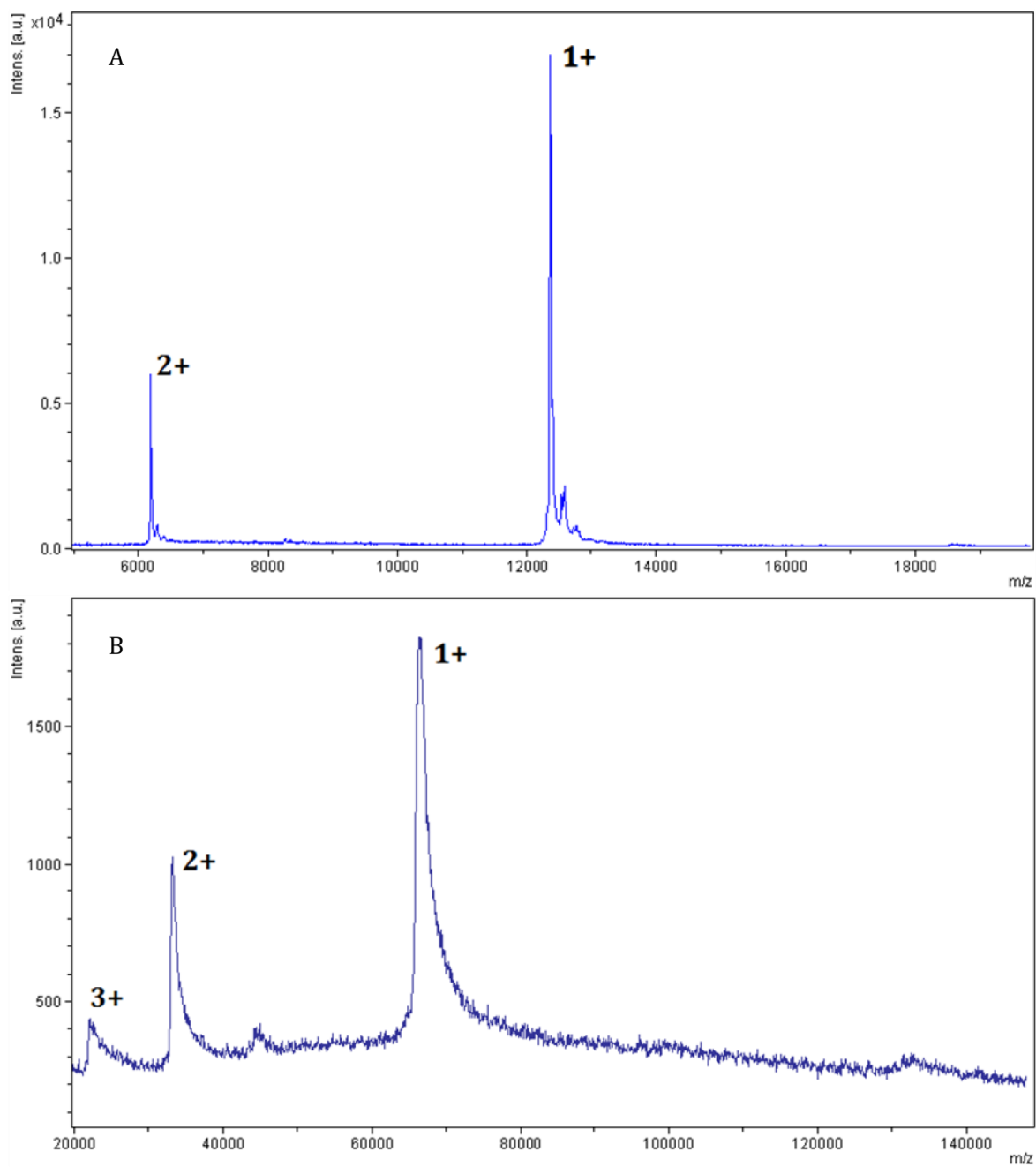
Graf 2 Kalibrační křivka závislosti intenzity na koncentraci měření BSA měřená pomocí ESI



7.1.2 Analýza pomocí MALDI-TOF

Hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF byla stejně jako v případě QqTOF naměřena m/z spektra koncentrací 1000 - 1,95 $\mu\text{g/ml}$ pro proteiny cytochrom c a BSA. Na Obrázku 18 jsou zachycena MS spektra cytochromu c (Obr. 18 A) a BSA (Obr. 18 B) naměřená při koncentracích 1000 $\mu\text{g/ml}$. U cytochromu c vznikl 1x a 2x nabitý ion a u BSA došlo ke vzniku 3 nábojových stavů. Pík cytochromu s jedním nábojem odpovídá m/z 12 373. Dvojnásobně nabitý pík má poměr m/z 6 188. U BSA má jednonásobně nabitý pík hodnotu m/z 66 471, dvojnásobně nabitý pík 33 259 m/z a trojnásobně nabitý pík odpovídá hodnotě 22 123 m/z .

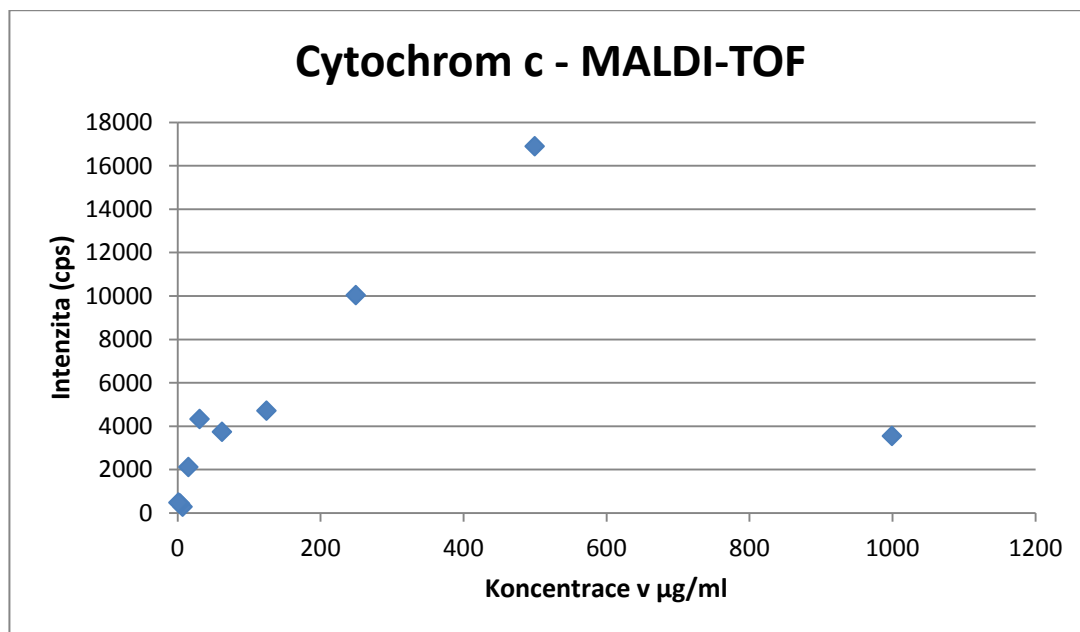
Oproti ESI nedošlo u MALDI ke vzniku tolika nábojových stavů iontů.



Obr. 18: Hmotnostní spektra cytochromu c (A) a BSA (B) získaná ionizací MALDI

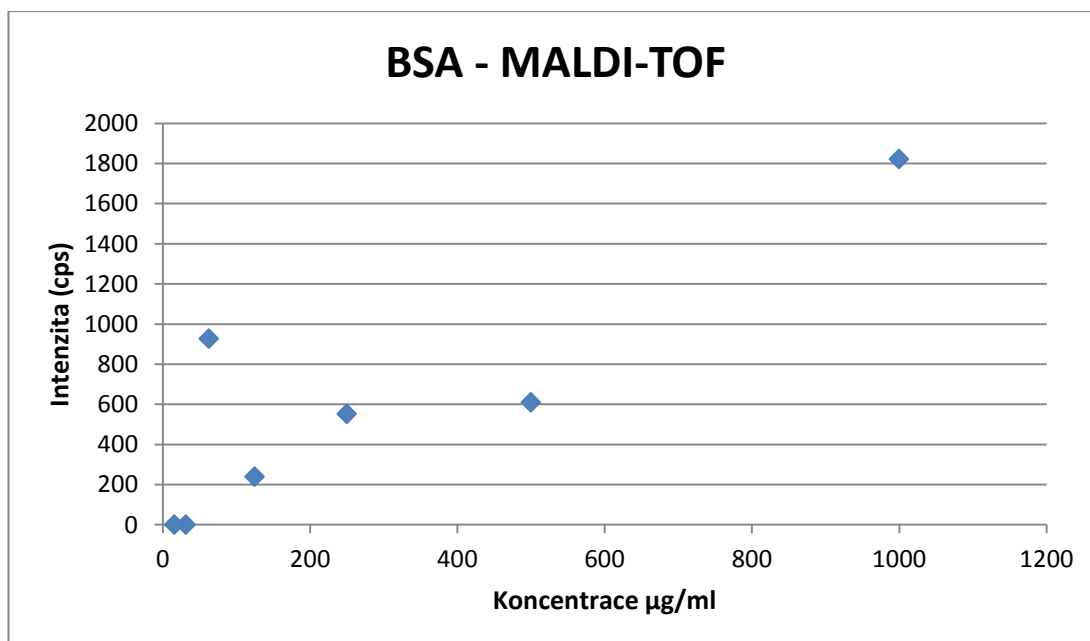
Pro dvojkovou koncentrační řadu cytochromu c byl sestrojen graf (Graf 3) s rozsahem intenzit od 0 do 17 000 cps. Závislost koncentrace na intenzitě má přibližně lineární charakter.

Graf 3 Kalibrační křivka závislosti intenzity na koncentraci cytochromu c měřená pomocí MALDI



V Grafu 4 jsou zaneseny hodnoty intenzit pro všechny naměřené koncentrace BSA (od 15,63 - 1000 $\mu\text{g/ml}$). Závislost intenzity na koncentraci není úplně lineární ani v tomto případě.

Graf 4: Kalibrační křivka závislosti intenzity na koncentraci BSA měřená pomocí MALDI

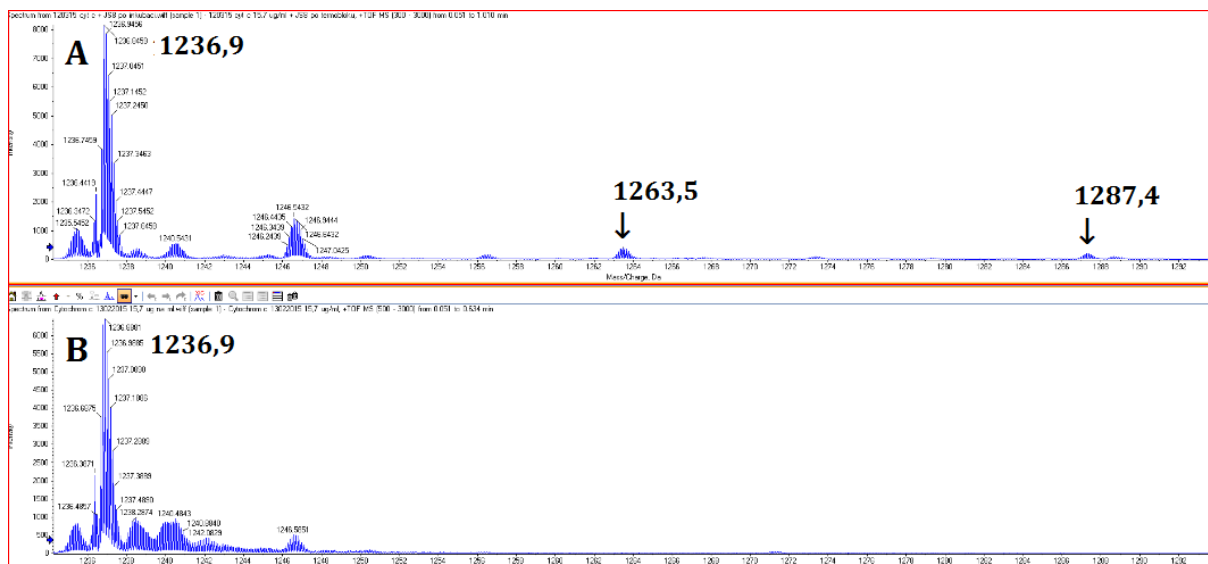


7.2 Interakce proteinů s ligandy

V další části experimentální části se zabývám interakcí proteinů cytochromu c a BSA s 3 protinádorovými léčivy: triterpenem, karboranem a cisplatinou. Studována byla také interakce BSA s aminokyselinou tryptofanem. Pro studium interakcí s ligandy byla pro cytochrom c jako nejvhodnější zvolena koncentrace 15,63 $\mu\text{g/ml}$. Cytochrom c o koncentraci 15,63 $\mu\text{g/ml}$ byl rozdělen na 4 vzorky. U prvního vzorku bylo naměřeno spektrum samotného proteinu. K druhému vzorku byl přidán triterpen, k třetímu karboran a ke čtvrtému cisplatin. U BSA jsem pracovala s koncentrací 10 mg/ml .

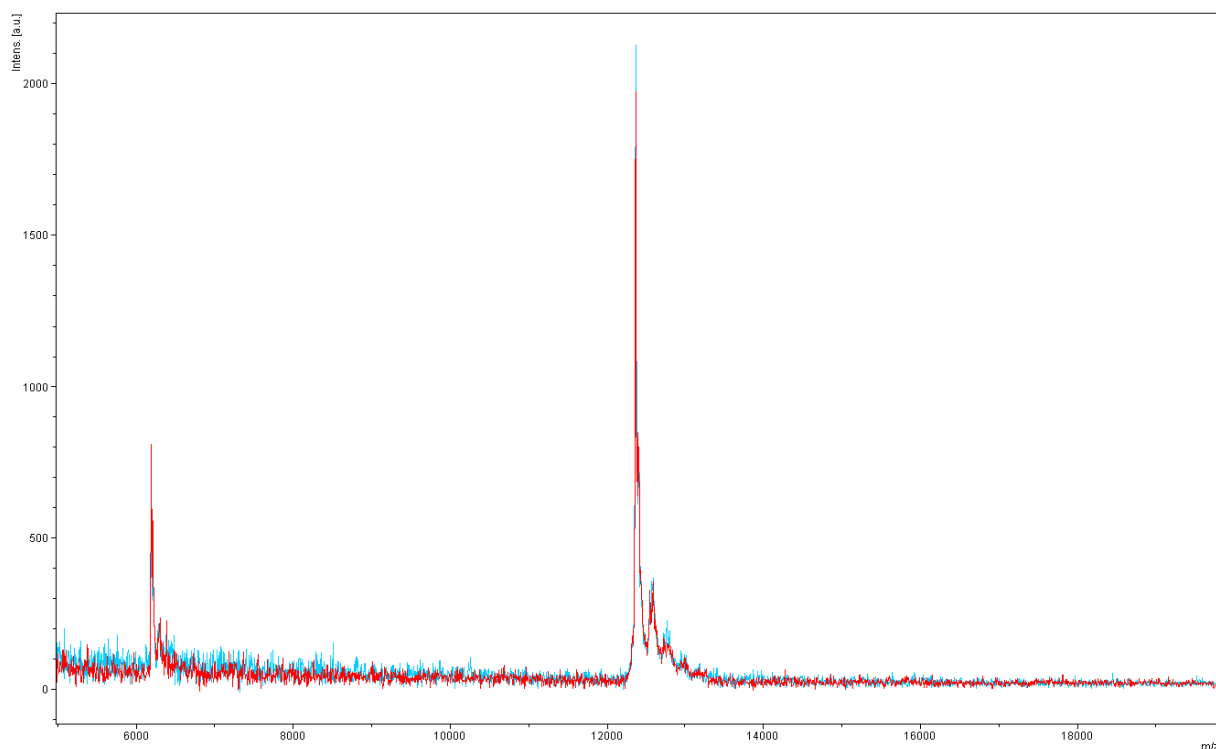
7.2.1 Triterpen

Ke koncentraci 15,63 $\mu\text{g/ml}$ cytochromu c bylo přidáno ekvimolární množství ligandu triterpenu (0,69 μl), inkubováno 2 hodiny při teplotě 37° C a měřeno pomocí ESI/QqTOF. Na Obrázku 15 je MS spektrum cytochromu c po interakci s triterpenem (na Obr. 15 A) a spektrum samotného cytochromu c (Obr. 15 B). U spektra představujícího interakci proteinu s triterpenem můžeme vidět šipkou označené 2 píky (A), které se u spektra samotného cytochromu c (B) nevyskytují. Šipkou označené píky odpovídají ligandu triterpenu, který se na cytochrom c navázal. Molekulární pík cytochromu c má hodnotu 1236,9 m/z . První označený pík určující vazbu triterpenu s cytochromem má m/z 1263,5 a druhý pík 1287,4. Rozdíly v hmotnosti mezi píkem cytochromu a píky zachycujícími interakci jsou 26,6 m/z pro první pík a 50,5 m/z v případě druhého píku. Jelikož je pozorovaný molekulární ion 10 krát nabitý, odpovídá pík (1287,4 m/z) s hmotnostním posunem 50,5 m/z vazbě proteinu s triterpenem, který má molekulovou hmotnost 504 Da.



Obr. 15 Porovnání spekter cytochromu *c* po vazbě triterpenu (A) a cytochromu bez vazby triterpenu (B), šipkou označený pík představuje spektrum cytochromu s navázaným triterpenem

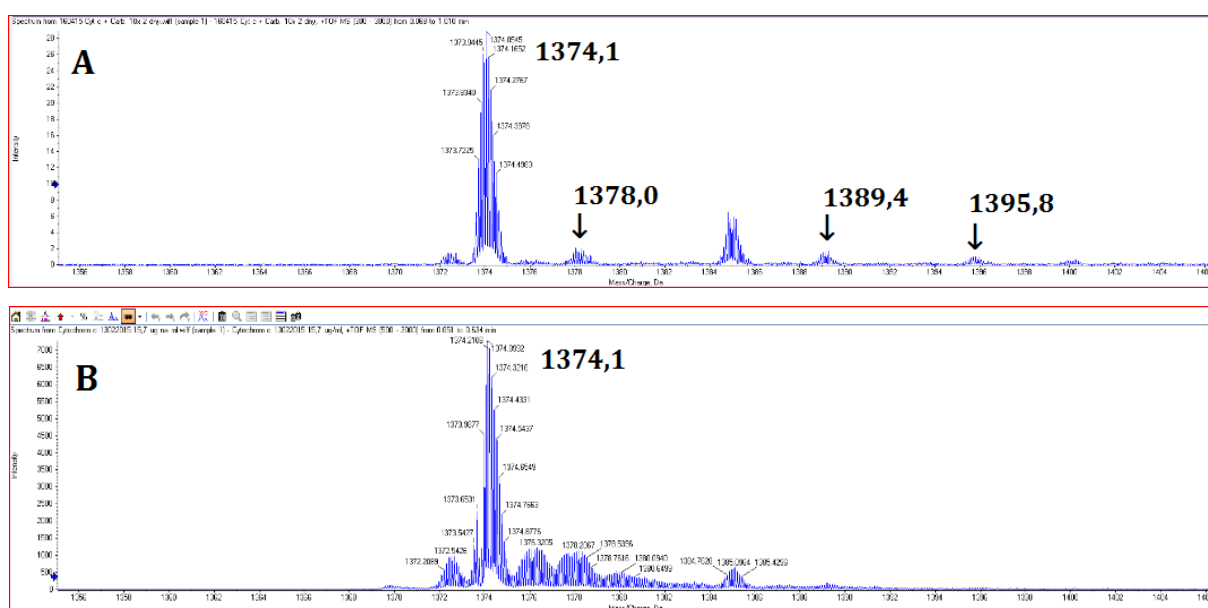
Interakce cytochromu *c* s triterpenem byla měřena také na MALDI při stejných koncentracích vzorků jako u měření na ESI/QqTOF. Červené spektrum na Obr. 16 odpovídá samotnému cytochromu a modře zbarvené spektrum vzorku proteinu, ke kterému byl přidán triterpen. Spektra se překrývají a nedochází k hmotnostnímu posunu k vyšším hodnotám *m/z*, ke kterému by mělo dojít v případě navázání triterpenu na cytochrom *c*.



Obr. 16: Spektrum cytochromu *c* (červeně) a směšného vzorku cytochromu *c* s triterpenem (modře)

7.2.2 Karboran

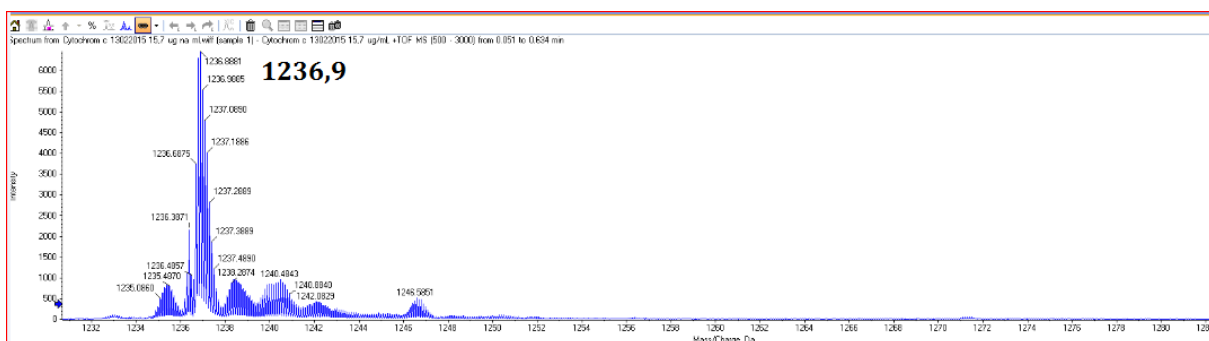
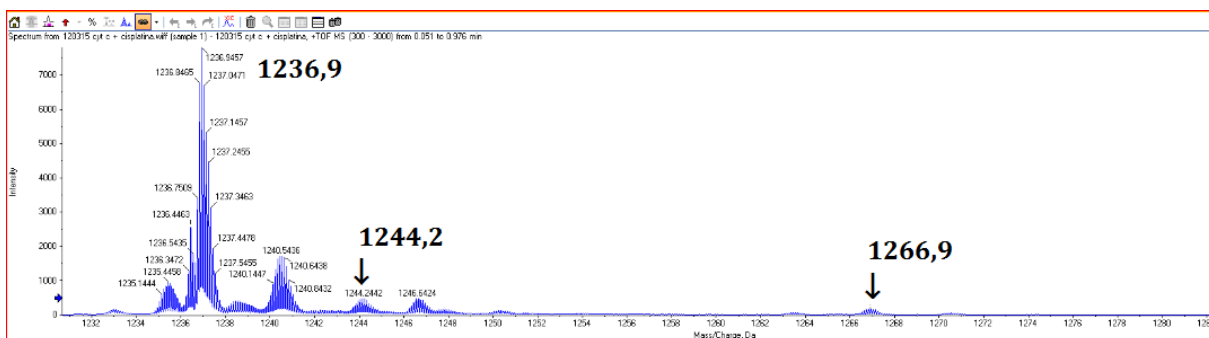
K 15,63 mikromolárnímu cytochromu c bylo přidáno desetinasobné množství ekvimolárního objemu karboranu, tj. 6,9 μl , inkubace probíhala 2 hodiny při 37° C a následně byla směs měřena pomocí ESI/QqTOF. Výsledek měření byl porovnán se spektrem samotného cytochromu. Na Obrázku 17 je zaznamenáno spektrum cytochromu po vazbě karboranu (A) a cytochromu c (B). Na Obr. 17 A jsou šipkami znázorněny píky, které jsou u spektra směsného vzorku proteinu s karboranem navíc oproti spektru cytochromu c. Rozdíl molekulové hmotnosti je 3,9 Da u prvního píku; 15,3 Da u druhého a 21,7 Da u třetího píku. Ion 1374,1 je 9 krát nabitý. Ve spektru nebyl nalezen pík odpovídající interakci proteinu s karboranem, jehož molekulová hmotnost je 485,26 Da.



Obr. 17: Porovnání spekter cytochromu c po vazbě karboranu (A) a cytochromu c bez navázaného karboranu (B), šipky označují ionty proteinu s navázaným karboranem

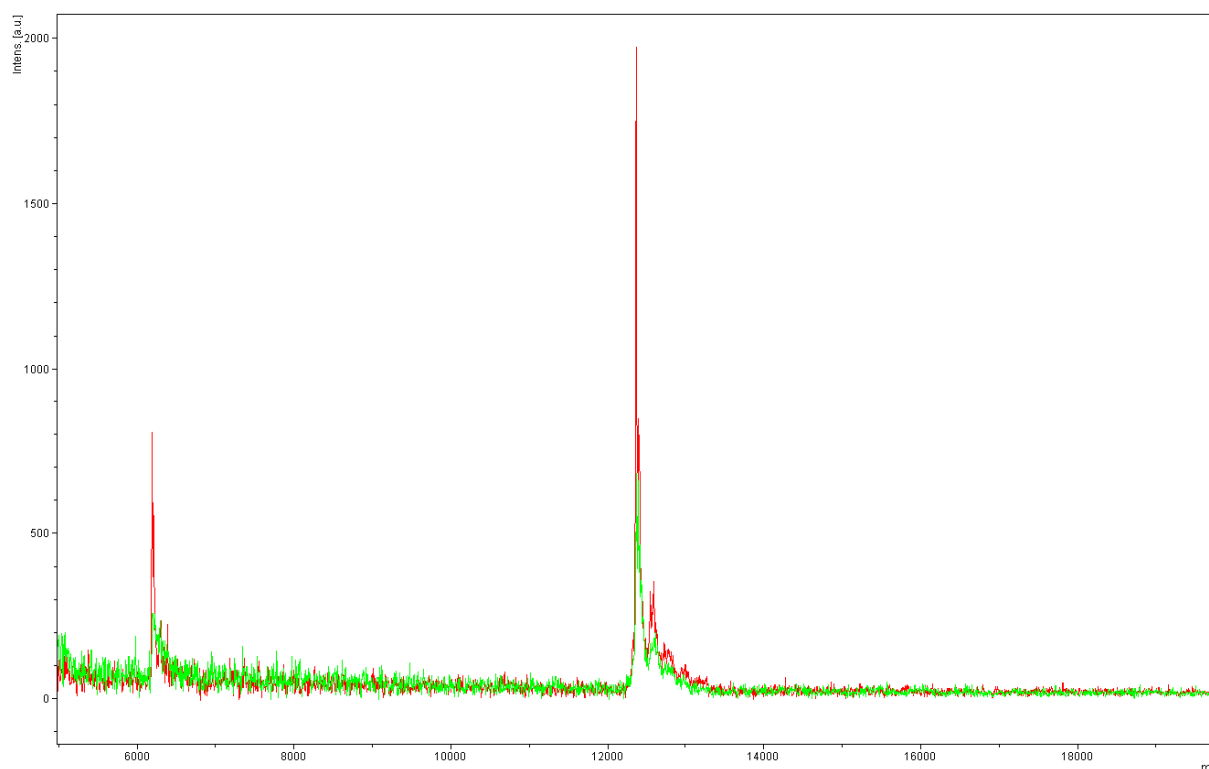
7.2.3 Cisplatin

K proteinovému vzorku bylo přidáno 0,40 μl cisplatinu a proběhla dvouhodinová inkubace při teplotě 37° C. Spektrum cytochromu c s navázanou cisplatinou je zobrazeno na Obrázku 18 A a spektrum cytochromu c na Obr. 18 B. Molekulární ion cytochromu c (na Obr. 18 A) má hodnotu 1236,9 m/z. Pík určující vazbu cisplatinu s cytochromem má m/z 1266,9. Po navázání cisplatinu došlo k nárůstu molekulové hmotnosti cytochromu c o 30 m/z. Pozorovaný pík je desetinasobně nabitý, zjištěný rozdíl tedy odpovídá molekulární hmotnosti cisplatinu (300,05 Da). Pík 1244,2 s posunem o 7,3 Da neodpovídá vazbě cisplatinu.



Obr. 18: Porovnání spekter cytochromu c po vazbě cisplatiny (A) a cytochromu c bez navázané cisplatiny (B)

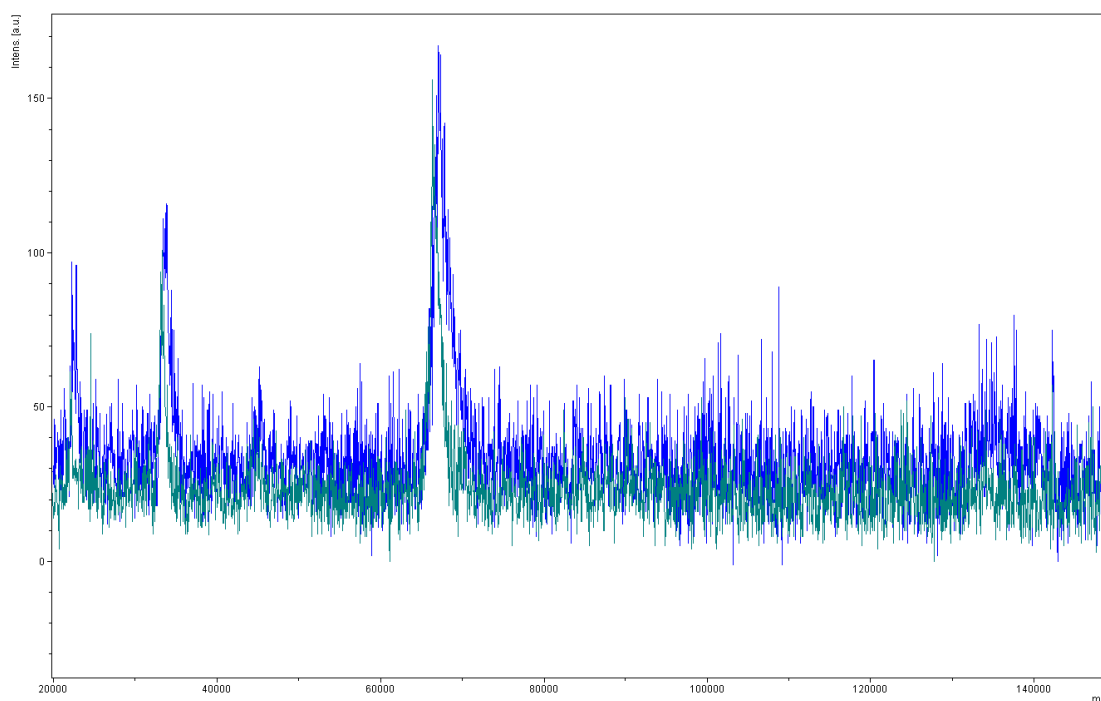
Vazba cisplatiny na cytochrom c byla současně studována na MALDI-TOF. Vzorek s cytochromem a vzorek s cisplatinou a cytochromem byly připraveny smícháním matrice (1 μ l vzorku a 1 μ l kyseliny sinapové). Oba vzorky byly změřeny a jejich spektra porovnána. Výsledné spektrum je na obrázku 19. Bohužel v tomto případě nebyl pozorován hmotnostní posun.



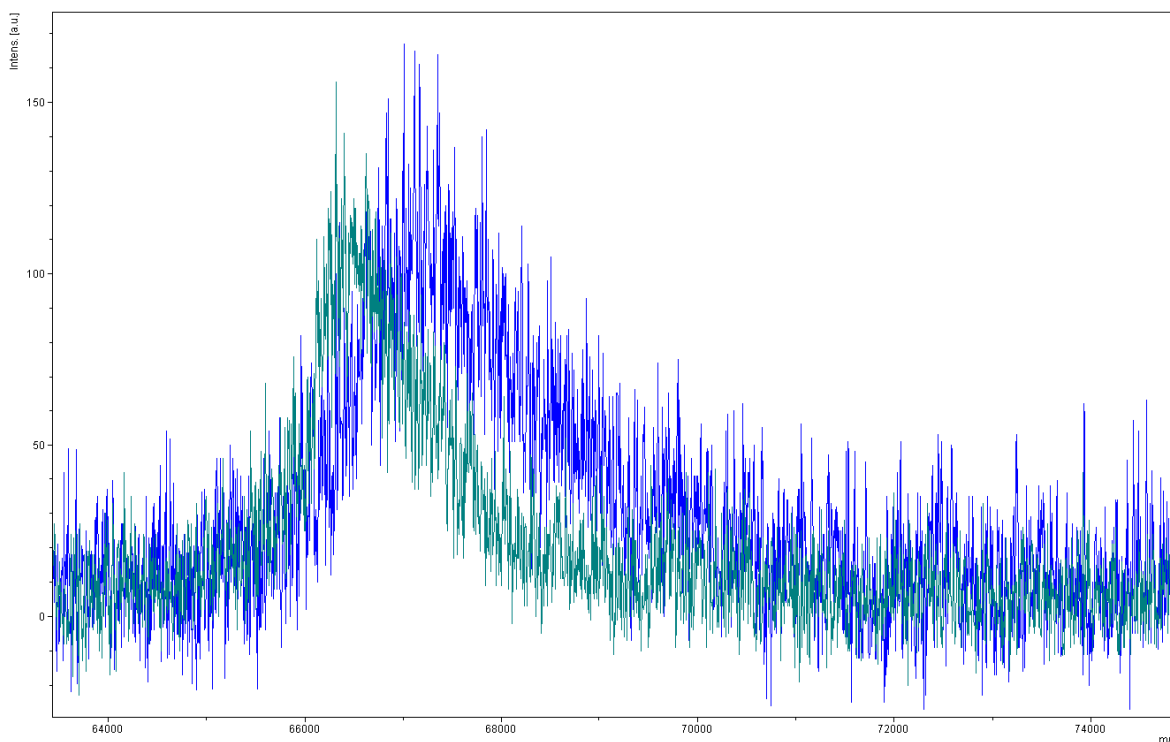
Obr. 19: Spektrum cytochromu c (červeně) a cytochromu c cisplatinou (zeleně)

U analýzy interakce proteinu BSA s ligandy na QqTOFu se nepodařilo získat dostatečně silný signál. Pro studium albuminových interakcí s ligandy jsme přešli na měření pomocí MALDI-TOF, kde bylo získáno spektrum určující vazbu cisplatinu na BSA. Na Obr. 20 je hmotnostní spektrum BSA (zeleně) a BSA s navázanou cisplatinou (modře). Na tomto obrázku je zachycen hmotnostní posun modrého píku oproti zelenému, což představuje nárůst hodnoty m/z ve spektru proteinu BSA s cisplatinou. Tímto bylo potvrzeno, že došlo k vazbě cisplatinu na BSA.

Na Obr. 21 je přibližena oblast od 66 000 do 69 000 m/z , kde dochází k hmotnostnímu posunu ve spektru BSA navázanou s cisplatinou.



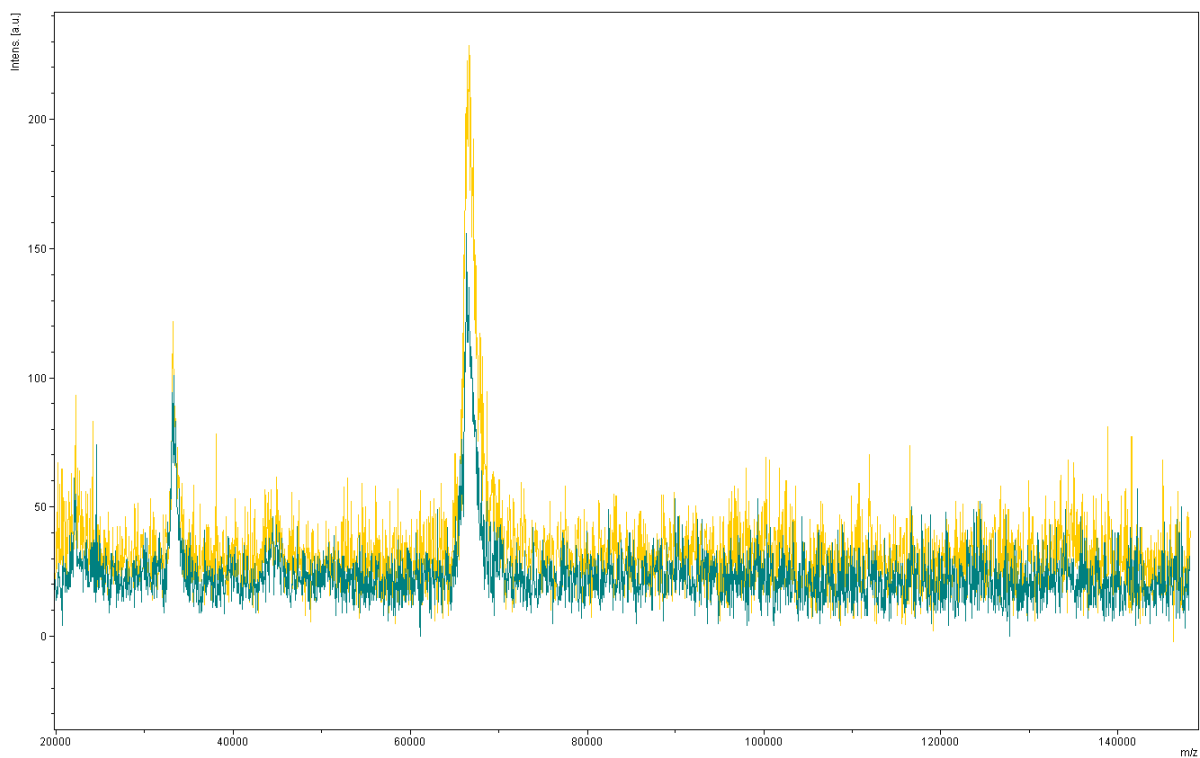
Obr. 20: Hmotnostní spektrum hovězího albuminu a albuminu s navázanou cisplatinou, zelený pík = albumin, modrý pík = BSA s navázanou cisplatinou



Obr. 21: Hmotnostní spektrum hovězího albuminu a albuminu s navázanou cisplatinou zaostřené na molekulární ionty o m/z 66 000, zelený pík = albumin, modrý pík = BSA s navázanou cisplatinou

7.2.4 Tryptofan

Kromě protinádorových ligandů byla pro studium interakcí použita také aminokyselina tryptofan. Ke koncentraci 10 mg/ml BSA byl přidán tryptofan také o koncentraci 10 mg/ml a proběhla inkubace přes noc. Vzorek obsahující samotné BSA a vzorek BSA s přidáním tryptofanem byly měřeny na MALDI-TOF. Po změření obou vzorků byla získána spektra, která jsou na Obr. 20. Zelenou barvou je zaznamenáno spektrum pro BSA a žlutou barvou BSA ve vazbě s tryptofanem. Z Obr. 20 je patrné, že došlo k mírnému posunu hodnoty m/z u vzorku BSA s přidáním tryptofanem, tedy k navázání tryptofanu na hovězí albumin. Molekulová hmotnost tryptofanu je 204,23 Da.

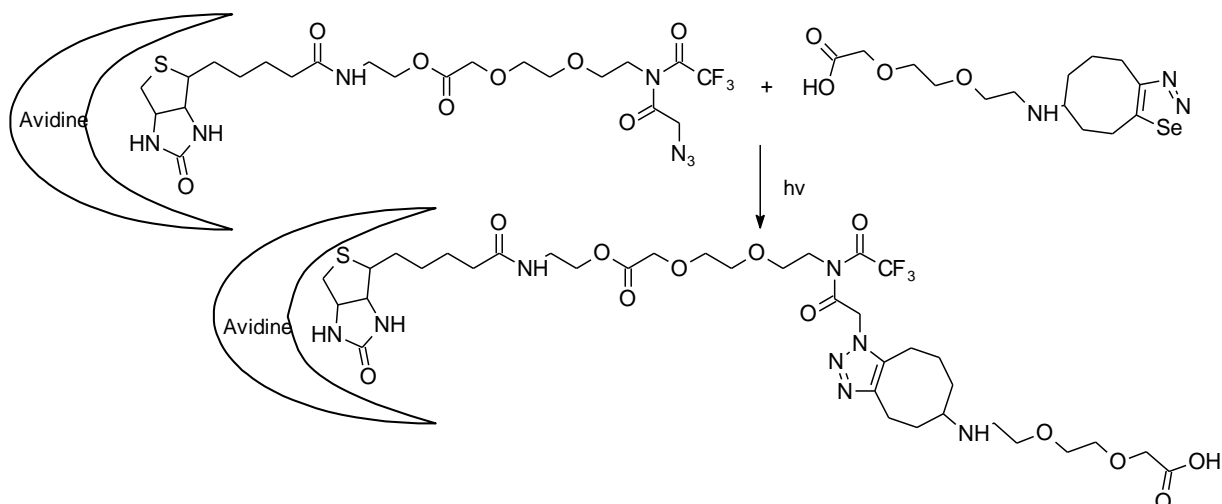


Obr. 22: *Spektrum BSA a BSA při vazbě s tryptofanem, zelené spektrum = protein BSA, žluté spektrum = BSA s navázaným tryptofanem*

7.3 Vazba modifikovaného biotinu na avidin

V rámci experimentální části práce jsem se také zabývala interakcí avidinu s modifikovaným biotinem. Na oddělení organické chemie při ÚMTM byl modifikován biotin pomocí azidu. Takto modifikovaný biotin byl navázán na avidin a vznikl komplex avidin-azidobiotin (tzv. meziprodukt). Vzniklý komplex byl dále podroben konjugační reakci s cykloocta-1,2,3-selenadiazolem, čímž byl vytvořen výsledný konjugát: 6-(3-(2-azidoacetyl)-1,1,1-trifluoro-2,11,16-trioxo-6,9,12-trioxa-3,15-diazaicosan-20-yl)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4d]imidazol-4-ylum (Obr. 23). Konjugací byla provedena konečná modifikace biotinu.

Mým cílem bylo ověřit vazbu azidem modifikovaného biotinu na avidin a následně proběhnout konjugace s cykloocta-1,2,3-selenadiazolem pomocí analýzy na MALDI-TOF.

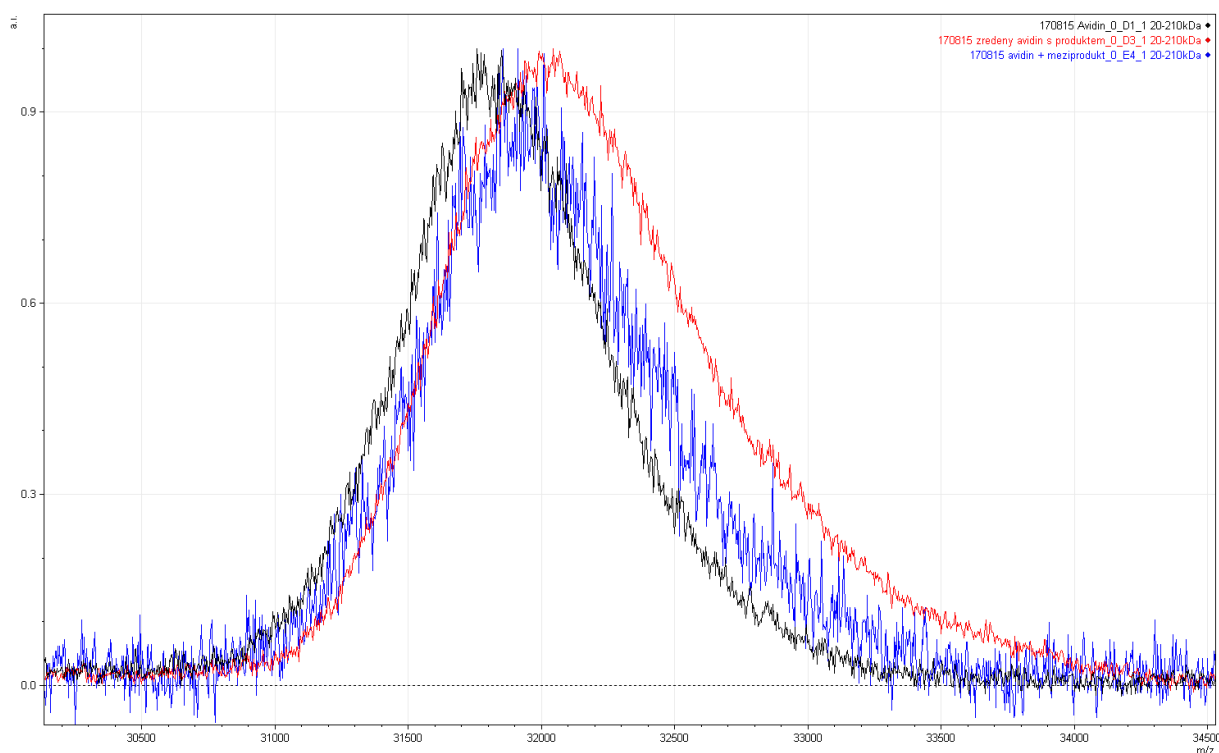


Obr. 23: Konjugační reakce komplexu avidin-modifikovaný biotin s cykloocta-1,2,3-selenadiazolem a vznik 6-(3-(2-azidoacetyl)-1,1,1-trifluoro-2,11,16-trioxo-6,9,12-trioxa-3,15-diazaicosan-20-yl)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-ylum

Výsledek měření je zachycen na Obrázku 24, kde černý pík hmotnostního spektra představuje samotný avidin, modrý pík zachycuje komplex avidin-azidobiotin a červený pík výsledný produkt konjugační reakce. Na Obr. 24 je vidět, že došlo jak k nárůstu hodnoty m/z po navázání azidobiotinu, tak po konjugaci s cykloocta-1,2,3-selenadiazolem.

Výsledek analýzy na MALDI-TOF potvrdil úspěšnost experimentu a byl zahrnut v publikovaném článku (Jedináková et al., 2016).

Reakce byla úspěšně testována pro značení komplexu avidin-biotin. Tato reakce proběhla za téměř ambientních podmínek, je tedy možné využít deriváty cyklooctaselenadiazolu v molekulární biologii.



Obr. 24: Hmotnostní spektrum avidinu, avidinu s meziproduktem a avidinu s produktem, černý pík = avidin, modrý pík = avidin s meziproduktem, červený pík = avidin s výsledným produktem

8 Diskuze

V experimentální části diplomové práce byly nejprve nastaveny vhodné parametry u ESI/QqTOF a MALDI-TOF pro měření hmoty celých proteinů cytochromu c a BSA a těchto proteinů ve vazbě s ligandy. Po optimalizaci podmínek obou přístrojů byly postupně změřeny vzorky obou proteinů s těmito koncentracemi: 1000; 500; 250; 125; 62,50; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91 a 1,95 $\mu\text{g/ml}$.

Z hodnot intenzit získaných spekter byly sestrojeny kalibrační křivky, kde jsme se u pozorovaného cytochromu c dostali i do oblasti saturace, zatímco u albuminu jsme této hladiny nedosáhli. To může být způsobeno dvěma důvody. Hovězí sérový albumin je přibližně šestkrát těžší než cytochrom c, analyzované množství bylo tedy úměrně nižší než v případě cytochromu. Druhým možným důvodem dosažení saturace pouze v případě cytochromu c je fakt, že lehčí proteiny se lépe ionizují a jsou snadněji zachyceny na detektoru.

Rovněž jsme porovnali dva hmotnostně spektrometrické přístupy ESI/QqTOF a MALDI-TOF z hlediska jejich citlivosti a linearity. Zatímco ESI produkuje vícenásobně nabitě ionty, MALDI produkuje ionty s mnohem nižším nábojovým stavem. Odečet molekulové hmotnosti je tak mnohem snažší oproti ESI, kde je nutno používat specializovaný software k dekonvoluci proteinových píků. Na druhou stranu, ionizace elektrosprejem je více reprodukovatelná a má lineárnější odezvu v závislosti na koncentraci vzorku. Nízká linearita MALDI-TOF byla způsobena nehomogenní krystalizací proteinů s matricí. U nerovnoměrné distribuce analytu v matrici je pro měření nutné najít tzv. „sweet spots“, tedy místa, která jsou důležitá k získání intenzivních hmotnostních píků (Fujita and Fujino, 2013). Nehomogenost krystalizace je vážnou překážkou kvantitativního měření pomocí MALDI-TOF (Cramer, 2015).

V rámci diplomové práce jsme se snažili vytvořit vhodný modelový systém pro vazbu protein-ligand. V rámci optimalizace jsme sledovali vazbu 4 ligandů s dobrou afinitou k proteinům na cytochrom c a hovězí albumin. Interakce cisplatiny s cytochromem c (Zhang et al., 2012) a BSA již byla sledována a popsána (Korkmaz et al., 2015). Karboran jsme si zvolili díky úspěšnému pokusu vazby karboranu na proteiny v lidské krevní plazmě, který provedl vedoucí práce Tomáš Oždian.

U měření na QqTOFu byla získána spektra, která zaznamenávají navázání triterpenu i cisplatiny na cytochrom c. Píky ve spektru vzorku cytochromu s ligandy byly srovnávány s píky hmotnostního spektra cytochromu. V případě karboranu nebyla detekována interakce s cytochromem, i když jsme zkoušeli různé inkubační podmínky (od půl hodiny při pokojové

teplotě až po inkubaci při 37° C po dobu 48 hodin). Důvodem může být to, že se karboran na cytochrom c neváže, nebo se váže pouze slabě. Dalším důvodem mohla být také nedostatečná optimalizace metody. Interakci BSA s ligandy se nepodařilo na QqTOFu detekovat, zejména z důvodů nábojové kompetice proteinů, volného ligandu a kontaminantních píků.

Při analýze vazby ligandů na cytochrom c na MALDI jsme bohužel neviděli žádnou vazbu. Příčina tohoto jevu bude předmětem dalšího výzkumu, neboť jsme vznik vazby nepozorovali ani po delší inkubaci za zvýšené teploty (24 hodin při 37°C). Na MALDI jsme nedetekovali ani vazbu albuminu s triterpenem a s karboranem. Příčina mohla být v absorpci laserové energie karboranem a triterpenem a následném rozpadu vazeb. Obě látky totiž absorbují v UV oblasti (Jin et al., 2015; Srivastava and Chaturvedi, 2010).

U BSA byly úspěšně potvrzeny vazby s cisplatinou a tryptofanem, kdy při porovnání hmotnostních spekter samotného BSA a vzorku BSA s přidanou cisplatinou či tryptofanem byl zaznamenán pík s hmotnostním posunem a došlo tedy k nárůstu m/z. Byla prokázána vazebná afinita cisplatin k cytochromu c (pomocí QqTOF) a k BSA (detekováno na MALDI-TOF). Albumin je nejhojnější protein přítomný v krevní plazmě a je zodpovědný za přenos a distribuci široké škály endogenních a exogenních látek. Cisplatin, jako protinádorové léčivo, se v krvi váže na albumin a proto je studium její interakce s albuminem důležité. Počet vazebných míst léčiv a jejich příslušné vazebné afinity má vliv na koncentraci volné (účinné) látky v plazmě. Silná vazba na albumin může snížit účinnost, distribuci a vylučování léku, slabší vazba může být užitečná pro transport léčiva. Dříve se předpokládalo, že kovalentní komplex cisplatin-albumin nebude schopen doručit cisplatinu k cílové molekule. Existuje však řada zpráv o příznivějších klinických účincích pozorovaných při podávání komplexu albumin-cisplatin, ve srovnání s podáváním cisplatin samotné. Kromě toho, se u pacientů léčených cisplatinou, u kterých dojde k poklesu koncentrace albuminu v plazmě, zvyšuje míra toxicity a zhoršuje odpověď nádoru na léčbu. Role albuminu při transportu léčiv na bázi platiny není zatím úplně jasná. V našem případě jsme pro experimenty použili hovězí sérový albumin, který s lidským sérovým albuminem sdílí 76% sekvenční homologii. BSA mající i podobnou trojrozměrnou strukturu jako lidský albumin, se často používá pro spektroskopické studie (Krause-Heuer et al., 2012).

Součástí experimentální části práce bylo také ověřit interakci avidinu s biotinem u něhož proběhla modifikace. Podařilo se změřit vazbu avidinu s azidobiotinem (meziproduktem) a avidin po konjugaci meziproduktu s cyklooctaselenadiazolem. Výsledný produkt, 6-(3-(2-azidoacetyl)-1,1,1-trifluoro-2,11,16-trioxo-6,9,12-trioxa-3,15-diazaicosan-20-yl)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-ylum, byl syntetizován přímo na avidinu, čímž se potvrdila vhodnost reakce pro molekulární biologii.

9 Závěr

V experimentální části práce byl stanoven koncentrační rozsah cytochromu c a hovězího sérového albuminu. Porovnali jsme dva hmotnostně spektrometrické přístupy ESI/QqTOF a MALDI-TOF pro měření celých proteinů a protein-ligandových interakcí. Z použitých ligandů se nám podařilo detekovat vazbu triterpenu s cytochromem c, vazbu cisplatinu s cytochromem c a BSA a vazbu tryptofanu s BSA.

Naše metoda byla úspěšně použita pro detekci vazby avidinu a modifikovaného biotinu. Tyto výsledky byly publikovány v práci: Study and application of noncatalyzed photoinduced conjugation of azides and cycloocta-1,2,3-selenadiazoles (Jedináková et al., 2016).

10 Seznam literatury

- A. Loo, J., A. Benchaar, S., Zhang, J., 2013. Integrating Native Mass Spectrometry and Top-Down MS for Defining Protein Interactions Important in Biology and Medicine. *Mass Spectrom (Tokyo)* 2. doi:10.5702/massspectrometry.S0013
- Bodzon-Kulakowska, A., Bierczynska-Krzysik, A., Dylag, T., Drabik, A., Suder, P., Noga, M., Jarzebinska, J., Silberring, J., 2007. Methods for samples preparation in proteomic research. *Journal of Chromatography B, Analytical Tools for Proteomics* 849, 1–31. doi:10.1016/j.jchromb.2006.10.040
- Boeri Erba, E., 2014. Investigating macromolecular complexes using top-down mass spectrometry. *Proteomics* 14, 1259–1270. doi:10.1002/pmic.201300333
- Busch, K.L., 1995. Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry - J MASS SPECTROMETRY* 30, 233–240. doi:10.1002/jms.1190300202
- Chmelík, J., 2005. Proteomický průvodce. *Chemické listy* 99, 883–885.
- Cramer, R., 2015. *Advances in MALDI and Laser-Induced Soft Ionization Mass Spectrometry*. Springer.
- Dastyh, M., Beňovská, M., Breinek, P., Bučková, D., Gottwaldová, J., Mikušková, A., 2012. *Aplikované analytické a instrumentální techniky v laboratorní medicíně*. Brno.
- de Hoffmann, E., Stroobant, V., 2007. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Third Edition. John Wiley & Sons Ltd.,
- Dvořáková, P., Hernychová, L., Vojtěšek, B., 2014. Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. *Klin Onkol* 2014, 104–109.
- Fellnerová, I., Hlaváček, L., Čelechovský, A., 2014. *Obecná fyziologie I: chemické a buněčné základy*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

- Fenn, J.B., 2003. Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* 42, 3871–3894. doi:10.1002/anie.200300605
- Friedecký, B., Lemr, K., 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus: časopis České společnosti klinické biochemie* 20, 152–157.
- Fryčák, P., Lemr, K., Adam, T., Hušková, R., 2003. Diagnostika vybraných dědičných metabolických poruch tandemovou hmotnostní spektrometrií s využitím moderních ionizačních technik. *Chemické listy* 97, 93–100.
- Fujita, T., Fujino, T., 2013. Settlement of the Sweet-spot Problem of MALDI Crystals Using Cyclodextrin-supported Matrix. *Chemistry Letters* 42, 350–351. doi:10.1246/cl.121232
- Guerrera, I.C., Kleiner, O., 2005. Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci. Rep.* 25, 71–93. doi:10.1007/s10540-005-2849-x
- Han, S.-Y., Hwan Kim, S., 2007. Introduction to chemical proteomics for drug discovery and development. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 340, 169–177. doi:10.1002/ardp.200600153
- Held, M., Metzner, P., Prinz, J.-H., Noé, F., 2011. Mechanisms of Protein-Ligand Association and Its Modulation by Protein Mutations. *Biophys J* 100, 701–710. doi:10.1016/j.bpj.2010.12.3699
- Hilton, G.R., Benesch, J.L.P., 2012. Two decades of studying non-covalent biomolecular assemblies by means of electrospray ionization mass spectrometry. *J R Soc Interface* 9, 801–816. doi:10.1098/rsif.2011.0823
- Ho, C.S., Lam, C.W.K., Chan, M.H.M., Cheung, R.C.K., Law, L.K., Lit, L.C.W., Ng, K.F., Suen, M.W.M., Tai, H.L., 2003. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* 24, 3–12.

- Jedináková, P., Šebej, P., Slanina, T., Klán, P., Hlaváč, J., 2016. Study and application of noncatalyzed photoinduced conjugation of azides and cycloocta-1,2,3-selenadiazoles. *Chem. Commun. (Camb.)* 52, 4792–4795. doi:10.1039/c6cc01789d
- Jemmis, E.D., Jayasree, E.G., Parameswaran, P., 2006. Hypercarbons in polyhedral structures. *Chem. Soc. Rev.* 35, 157–168. doi:10.1039/B310618G
- Jin, G.F., Cho, Y.-J., Wee, K.-R., Hong, S.A., Suh, I.-H., Son, H.-J., Lee, J.-D., Han, W.-S., Cho, D.W., Kang, S.O., 2015. BODIPY functionalized o-carborane dyads for low-energy photosensitization. *Dalton Trans* 44, 2780–2787. doi:10.1039/c4dt03123g
- Karas, M., Bachmann, D., Hillenkamp, F., 1985. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.* 57, 2935–2939. doi:10.1021/ac00291a042
- Korkmaz, F., Erdogan, D.A., Özalp-Yaman, Ş., 2015. Interaction of a novel platinum drug with bovine serum albumin: FTIR and UV-Vis spectroscopy analysis. *New J. Chem.* 39, 5676–5685. doi:10.1039/C5NJ00785B
- Krause-Heuer, A.M., Price, W.S., Aldrich-Wright, J.R., 2012. Spectroscopic investigations on the interactions of potent platinum(II) anticancer agents with bovine serum albumin. *J Chem Biol* 5, 105–113. doi:10.1007/s12154-012-0074-1
- Lomenick, B., Olsen, R.W., Huang, J., 2011. Identification of Direct Protein Targets of Small Molecules. *ACS Chem Biol* 6, 34–46. doi:10.1021/cb100294v
- Nečas, O., Hejtmánek, M., Šmarda, J., Štark, O., 1989. *BIOLOGIE Učebnice pro lékařské fakulty*. Avicenum.
- Olsson, T.S.G., Williams, M.A., Pitt, W.R., Ladbury, J.E., 2008. The Thermodynamics of Protein–Ligand Interaction and Solvation: Insights for Ligand Design. *Journal of Molecular Biology* 384, 1002–1017. doi:10.1016/j.jmb.2008.09.073

- Patterson, S.D., Aebersold, R.H., 2003. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet* 33, 311–323. doi:10.1038/ng1106
- Protein- Ligand Interaction (Theory): Bioinformatics Virtual Lab III : Biotechnology and Biomedical Engineering : Amrita Vishwa Vidyapeetham Virtual Lab [WWW Document], n.d. URL <http://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=275&sim=1495&cnt=1> (staženo 4.23.16).
- Ruotolo, B.T., Robinson, C.V., 2006. Aspects of native proteins are retained in vacuum. *Curr Opin Chem Biol* 10, 402–408. doi:10.1016/j.cbpa.2006.08.020
- Rylova, G., Ozdian, T., Varanasi, L., Soural, M., Hlavac, J., Holub, D., Dzubak, P., Hajduch, M., 2015. Affinity-based methods in drug-target discovery. *Curr Drug Targets* 16, 60–76.
- Schmidt, C., Robinson, C.V., 2014. Dynamic protein ligand interactions--insights from MS. *FEBS J.* 281, 1950–1964. doi:10.1111/febs.12707
- Srivastava, P., Chaturvedi, R., 2010. Simultaneous determination and quantification of three pentacyclic triterpenoids—betulinic acid, oleanolic acid, and ursolic acid—in cell cultures of *Lantana camara* L. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 46, 549–557. doi:10.1007/s11627-010-9298-3
- Tanaka, K., 2003. The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 42, 3860–70. doi:10.1002/anie.200300585
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T., 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2, 151–153. doi:10.1002/rcm.1290020802
- Veenstra, T.D., Yates, J.R., 2006. *Proteomics for Biological Discovery*. John Wiley.

- Verner, P., 2005. Lineární iontová past a její aplikace v proteomické analýze. *Chemické listy* 99, 937–942.
- Vidová, V., Lemr, K., Havlíček, V., 2008. Současné trendy hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy* 102, 957–959.
- Yamashita, M., Fenn, J.B., 1984. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* 88, 4451–4459. doi:10.1021/j150664a002
- Yates, J.R., 2004. Mass spectral analysis in proteomics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33, 297–316. doi:10.1146/annurev.biophys.33.111502.082538
- Yates, J.R., 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J Mass Spectrom* 33, 1–19. doi:10.1002/(SICI)1096-9888(199801)33:1<1::AID-JMS624>3.0.CO;2-9
- Zhang, N., Du, Y., Cui, M., Xing, J., Liu, Z., Liu, S., 2012. Probing the interaction of cisplatin with cytochrome C by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.* 84, 6206–6212. doi:10.1021/ac301122w

11 Seznam použitých zkratek

2D	dvourozměrný
3D	trojrozměrný
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization)
BSA	hovězí sérový albumin
CI	chemická ionizace (chemical ionization)
CID	kolizně indukovaná disociace (collision-induced dissociation)
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
EI	elektronová ionizace (electron ionization)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
CHCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
ICR	iontová cyklotronová rezonance
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
m/z	poměr hmotnosti a náboje (mass-to-charge)
MALDI	laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (matrix assisted laser desorption/ionization)
MRM	multiple reaction monitoring
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MS	hmotnostní spektrometrie
Q	kvadrupól (quadrupole)
QqQ	trojitý kvadrupól (triple quadrupole)
QqTOF	kvadrupól s analyzátozem doby letu (quadrupole-time of flight)
SA	sinapová kyselina (sinapinic acid)
SDS-PAGE	polykakyramidová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným
SIM	sledování jednoho vybraného iontu (single ion monitoring)
SRM	sledování rozpadu vybraného iontu (selected ion monitoring)
TOF	analyzátor doby letu (time of flight)