

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Strukturní analýza s použitím činidel pro vytváření
příčné vazby**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Petr Voňka
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok:	2014

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 7. 5. 2014

Petr Voňka

Poděkování

Děkuji panu profesorovi Marku Šebelovi za vedení a poskytnuté cenné rady při tvorbě této práce.

Také děkuji Michaele Balášové za izolaci isoenzymu 2 aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu (*Pisum sativum*).

Mé poděkování patří též všem pracovníkům Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum a Katedry biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Mé díky patří i Mgr. Daně Pfeffrové za korekci anglického textu.

Zvláštní poděkování potom náleží mé rodině a kamarádům za trpělivost a podporu ve vypjatých situacích.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Petr Voňka
Název práce	Strukturní analýza s použitím činidel pro vytváření příčné vazby
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	<p>Určování prostorových struktur proteinů je velmi důležité pro správné pochopení jejich funkce a mechanismu, jakým pracují. V této oblasti jsou dnes hlavními metodami výzkumu rentgenová krystalografie a spektroskopie nukleární magnetické rezonance. Dnes se ale do popředí vědeckého zájmu dostávají i jiné metody. Jednou z nich je vytváření příčných vazeb a následná analýza fragmentů vzniklých rozštěpením vzorku proteasami pomocí hmotnostního spektrometru.</p> <p>Tato bakalářská práce se zabývá analýzou enzymů pomocí činidel pro tvorbu příčných vazeb a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Za tímto účelem byly vybrány 2 látky: bis(N-sukcinimid)glutarát (DSG) a bis(N-hydroxysukcinimid)suberát (DSS). Jako proteasy byly zvoleny trypsin a chymotrypsin. Podmínky reakce byly optimalizovány na enzymu alkoholdehydrogenasa z kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Po úspěšném provedení této reakce byly vytvářeny příčné vazby ještě u aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu (<i>Pisum sativum</i>). K předpovědi aminokyselinové sekvence byl použit software MSX-3D. Správnost predikovaných dat byla ověřována analýzou sekvencí pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie.</p>
Klíčová slova	Aminoaldehyddehydrogenasa, příčná vazba
Počet stran	96
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Petr Voňka
Title	Structure Analysis with Using Crosslinkers
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2014
Abstract	<p>Determining spatial structures of proteins is very important for correct understanding to their function and mechanism of work. X-ray structural analysis and nuclear magnetic resonance spectroscopy are main methods in this area today. But nowadays also other methods are getting to the front of science interest. Crosslinking and consequential analysis of fragments created by a digestion of a sample by proteases by using a mass spectrometer is one of them.</p> <p>This bachelor's thesis pursues an analysis of enzymes by using crosslinkers and MALDI-TOF mass spectrometry. Two compounds were selected for this purpose: di(N-succinimidyl) suberate (DSG) and suberic acid bis(N-hydroxysuccinimide ester) (DSS). Trypsin and chymotrypsin were selected as proteases. Reaction conditions were optimized on enzyme alcohol dehydrogenase from yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Crosslinks were created yet on aminoaldehyde dehydrogenase from pea (<i>Pisum sativum</i>) after a successful creation of previous reaction. Software MSX-3D was used to predict aminoacids sequences of modified peptides. Correctness of predicted dates checked by analysis of sequences by using tandem mass spectrometry.</p>
Keywords	Aminoaldehyde dehydrogenase, crosslinking
Number of pages	96
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Studium struktury proteinů	2
2.1.1 Metody studia primární struktury	2
2.1.1.1. Edmanova degradace (Edmanovo odbourávání)	2
2.1.1.2 Hmotnostní spektrometrie	4
2.1.2 Metody studia sekundární struktury	6
2.1.2.1 Cirkulární dichroismus	6
2.1.3 Metody studia terciální struktury	7
2.1.3.1 Rentgenová krystalografie	7
2.1.3.2 Spektroskopie nukleární magnetické rezonance	8
2.1.3.3 Vytváření příčných vazeb	9
2.1.3.4.1 Postupy pro vytváření příčných vazeb	9
2.1.3.4.2 Činidla pro tvorbu příčných vazeb	10
2.1.3.4 Výměna vodíku za deuterium	13
2.2 Studované enzymy	14
2.2.1 Alkoholdehydrogenasy	14
2.2.1.1 Alkoholdehydrogenasa ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2.2.2 Aminoaldehyddehydrogenasy	15
2.2.2.1 Aminoaldehyddehydrogenasa z hrachu setého (<i>Pisum sativum</i>)	17
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1 Chemikálie	19
3.2 Přístroje	20
3.3 Metody	21
3.3.1 Příprava vzorků pro pokus	22
3.3.1.1 Rozpouštění alkoholdehydrogenasy	22
3.3.1.2 Výměna pufru ultrafiltrací u aminoaldehyddehydrogenasy	22

3.3.2 Měření koncentrace aminoaldehyddehydrogenasy spektrofotometrií s bicinchoninovou kyselinou	22
3.3.3 Vytváření příčných vazeb	24
3.3.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného	25
3.3.5 Štěpení proteinů v gelu rozdělených elektroforézou v polyakrylamidovém gelu	25
3.3.5.1 Zpracování gelových kousků barvených barvivem Coomassie	26
3.3.5.2 Redukce a alkylace proteinů	26
3.3.5.3 Štěpení proteinů v gelových kouscích	26
3.3.6 Odsolení peptidů v digestech pro měření na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF/TOF	27
3.3.6.1 Izolace peptidů z gelových kousků	27
3.3.6.2 Odpaření roztoků ve vakuové odparce	27
3.3.6.3 První rozpuštění peptidů v kyselině trifluoroctové	27
3.3.6.4 Odsolení vzorků	27
3.3.6.5 Druhé rozpuštění vzorků v kyselině trifluoroctové	28
3.3.7 Měření vzorků pomocí hmotnostního spektrometru	28
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	31
4.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného	31
4.2 Modifikace alkoholdehydrogenasy ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
4.2.1 Štěpení modifikovaných vzorků trypsinem	34
4.2.2 Štěpení modifikovaných vzorků chymotrypsinem	46
4.3 Modifikace izoenzymu 2 aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu	53
4.3.1 Štěpení trypsinem	55
4.3.2 Štěpení chymotrypsinem	69
4.3.3 Fragmentace peptidů	83
4.3.3.1 Fragmentace peptidu s <i>m/z</i> 1 084,650	83
4.3.3.2 Fragmentace peptidu s <i>m/z</i> 1 559,837	85
4.3.3.3 Fragmentace peptidu s <i>m/z</i> 2 192,086	87

5 ZÁVĚR	89
6 LITERATURA	91
7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	94

CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na téma studium struktury proteinů
- Experimenty s vytvořením příčných vazeb u enzymu aminoaldehyddehydrogenasy
- Analyzování aminokyselinových sekvencí fragmentů, které vzniknou proteolytickým štěpením modifikované aminoaldehyddehydrogenasy na hmotnostním spektrometru a s pomocí software MSX-3D

1 ÚVOD

Znalost struktury proteinu je nezbytná pro správné a úplné pochopení jeho biologické funkce. Znalostí struktury proteinu není myšleno jen jeho aminokyselinové složení, ale také prostorové uspořádání jeho řetězce či řetězců. Jak jsou v prostoru zohýbané, jaký celkový tvar daná struktura má, jestli vznikají nějaké dutiny, apod. Tradičně se tyto otázky řeší pomocí rentgenové krystalografie popřípadě pomocí spektroskopie nukleární magnetické rezonance. Obě tyto metody ale mají své nedostatky (Rozbesky *et al.*, 2012).

Rentgenovou krystalografii je možno využít jen u proteinů, které tvoří kvalitní krystaly, což někdy vůbec není jednoduché docílit. Dalším úskalím této metody je, že nám řekne, jak protein vypadá v krystalu. Ale už neřekne nic o tom, jaký tvar zaujímá ve skutečnosti roztoku, tedy u většiny proteinů v přirozeném prostředí (Rozbesky *et al.*, 2012).

Když by se prostorová struktura proteinu řešila pomocí spektroskopie nukleární magnetické rezonance, tak by se sice odstranil problém měření krystalu (u této metody se měří rozpuštěné vzorky), ale i tato metoda má svá omezení. Tím hlavním je, že ji můžeme aplikovat pouze pro proteiny splňující určitý limit molekulové hmotnosti. Tato hranice se dnes pohybuje kolem 50 kDa. Navíc společným problémem výše uvedených metod je, že potřebují relativně velké množství čistého proteinu (jedná se o miligramy) (Rozbesky *et al.*, 2012).

Alternativou k těmto metodám se dnes stává hmotnostní spektrometrie spojená s vytvářením příčných vazeb mezi úseky polypeptidového řetězce pomocí činidel k tomu určených. Takto upravený protein je posléze štěpen proteasami, čímž vzniknou peptidové fragmenty obsahující modifikaci, nejlépe interpeptidovou příčnou vazbu. Tyto fragmenty jsou následně analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru. Způsob určování struktur proteinů, který byl právě nastíněn, se dnes velice dynamicky rozvíjí (Rozbesky *et al.*, 2012).

Posledně jmenovanou metodou se zabývá i tato bakalářská práce. Tato metoda může pomoci řešit prostorové uspořádání rekombinantních proteinů produkovaných Oddělením biochemie proteinů a proteomiky Centru regionu Haná v Olomouci.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Studium struktury proteinů

Proteiny jsou z chemického pohledu nejsložitější známé molekuly (Alberts *et al.*, 2001). Jsou tvořeny L- α -aminokyselinami, které jsou navzájem spojené peptidovou vazbou a tvoří polypeptidové řetězce. Na stavbě proteinů se podílí 20 proteinogenních aminokyselin (Šípal *et al.*, 1992).

U proteinů rozeznáváme čtyři úrovně struktury – primární, sekundární, terciární a kvartérní. Primární struktura je tvořena sekvencí aminokyselin. Sekundární struktura vyplývá z toho, jaký tvar zaujímají polypeptidové řetězce. Jejimi základními prvky jsou α -šroubovice (α -helix) a β -skládaný list. Oba motivy stabilizovány pomocí vodíkových můstků. Terciární struktura popisuje celkové uspořádání řetězce v prostoru. Kvartérní struktura u oligomerních proteinů ukazuje vzájemné rozmístění polypeptidových řetězců v kompletní molekule (Pingoud *et al.*, 2002).

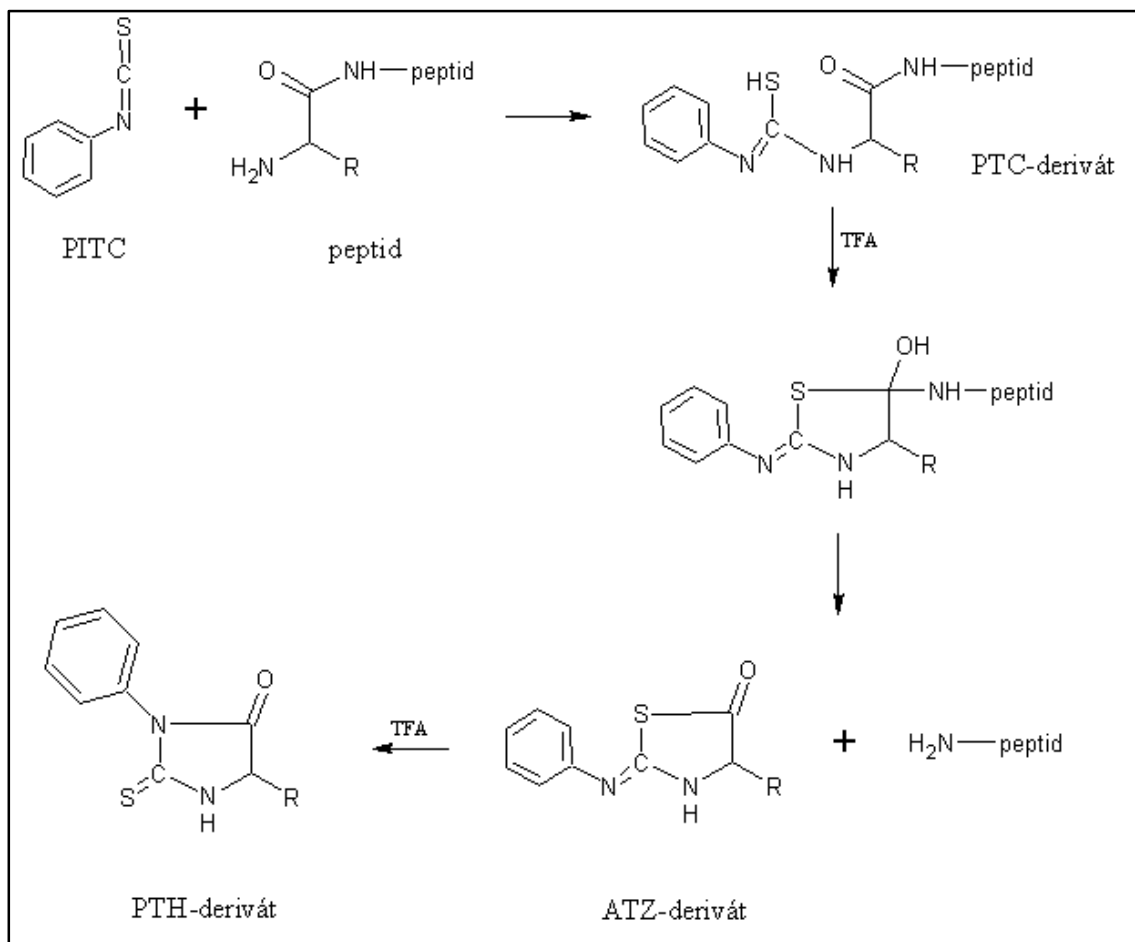
2.1.1 Metody studia primární struktury

Nejvýznamnějšími postupy pro sekvenční analýzu aminokyselin jsou dnes Edmanova degradace a hmotnostní spektrometrie. Edmanova degradace je starší z těchto dvou metod. Je také časově náročnější a méně citlivá (vyžaduje 2 - 5 pmol čistého proteinu, zatímco hmotnostní spektrometrie potřebuje jen 100 fmol nebo i méně) (Deutzmann, 2004).

2.1.1.1. Edmanova degradace (Edmanovo odbourávání)

Zjišťování pořadí aminokyselin v proteinech je zde založeno na jejich postupném odbourávání z *N*-konce proteinu či peptidu (Pingoud *et al.*, 2002).

Princip této metody byl objeven v roce 1927 Maxem Bergmannem a jeho spolupracovníky. K označení *N*-konce dipeptidu použili fenylisothiokyanát. Touto reakcí vznikl fenylkarbamylpeptid, z jehož *N*-konce se následnou hydrolýzou odštěpil fenylhydantoin (Blombäck, 2003). V 50. letech tuto metodu vylepšil Pehr Edman (Edman, 1950) a automatizoval ji spolu s Geoffrey Beggem v roce 1967 (Edman a Begg, 1967).



Obr. 1: Princip **EDMANOVY DEGRADACE**. Degradace začíná reakcí fenyliothiokyanátu (PITC) s peptidem, čímž vzniká fenylothiokarbamylpeptid (PTC-derivát). Z něj v prostředí bezvodé kyseliny trifluoroctové (TFA) vzniká derivát anilinothiazolinonu (ATZ-derivát), z kterého v prostředí vodné kyseliny trifluoroctové (TFA) vzniká derivát N-fenylothiohydantoinu (PTH-derivát) (McMurry, 2007).

Edmanova degradace (Obr. 1) začíná nukleofilní adicí *N*-koncové aminoskupiny peptidu na fenyliothiokyanát (PITC). Produktem této reakce je fenylothiokarbamylpeptid (PTC-peptid, PTC-derivát). Dalším krokem odbourání je reakce amidové skupiny thiokarbamoylového rezidua s karbonylovou skupinou *N*-koncové aminokyseliny, která probíhá za kyselé katalýzy bezvodé kyseliny trifluoroctové (TFA). Vzniká derivát anilinothiazolinonu (ATZ-derivát), jehož součástí je *N*-koncová aminokyselina peptidu, a peptid, který je zkrácený o jednu aminokyselinu. V prostředí vodné kyseliny trifluoroctové dochází k přesmyku derivátu anilinothiazolinu na derivát *N*-fenylothiohydantoinu (PTH), který je konečným produktem Edmanovy degradace (Pingoud *et al.*, 2002). Určení, o jaký PTH derivát se jedná, je děláno chromatograficky. Porovnává se jeho eluční čas s elučními časy PTH derivátů všech 20 proteinogenních aminokyselin (McMurry, 2007).

Tato metoda má samozřejmě i svá omezení. Jedním z nich je, že dlouhé proteiny nelze analyzovat najednou, protože postupně vznikají nežádoucí PTH deriváty, které omezují jednoznačnou identifikaci správných PTH derivátů. Jsme takto schopni stanovit jen 30 - 40 aminokyselin (Pingoud *et al.*, 2002). Tento nedostatek je řešen hydrolýzou proteinu, která se děje buď chemicky (působením žředěné kyseliny), nebo enzymově (působením vhodné proteasy, např. trypsinu, chymotrypsinu). Výsledkem hydrolýzy je směs malých fragmentů, které už mohou být analyzovány. Pořadí jednotlivých fragmentů se potom určí porovnáním překrývajících se konců (McMurry, 2007).

Dalším omezením je, že *N*-konec peptidu musí být volný. Velké množství proteinů ho má však blokováný posttranslačními modifikacemi (např. *O*- a *N*-glykosylace, acetylace) nebo modifikovanými aminokyselinami (jedná se například o kyselinu pyroglutamovou). Tento problém se opět řeší použitím vhodného enzymu, např. na odstranění kyseliny pyroglutamové se použije enzym pyroglutaminpeptidasa (Pingoud *et al.*, 2002).

2.1.1.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda, která umožňuje separaci jednotlivých molekul ve vakuu na základě rozdílného poměru hmotnosti a náboje (m/z) pomocí elektrického a magnetického pole. Výjimku tvoří TOF analyzátoři. (Pingoud *et al.*, 2002).

Tato metoda byla původně určena pro analýzu malých těkavých molekul, ale rozvoj nových ionizačních technik jako ionizace elektrosprejem (Fenn *et al.*, 1989) a maticí asistovaná laserová desorpce / ionizace (Tanaka *et al.*, 1988) umožnily analýzu velkých netěkavých molekul, jako jsou například proteiny.

Technika ionizace elektrosprejem (ESI) vytvořil roku 1989 John Bennett Fenn se svými spolupracovníky (Fenn *et al.*, 1989). Jedná se o měkký druh ionizace, při kterém nedochází k fragmentaci molekul. Pro tuto ionizaci se proteiny musí rozpustit v těkavém rozpouštědle. Při vlastní analýze je potom vzorek rozprášen na malé kapičky, které jsou vysušeny v proudu suchého plynu (Pingoud *et al.*, 2002).

Technika maticí asistovaná laserová desorpce / ionizace (MALDI) byla ve stejné době popsána hned dvěma výzkumnými skupinami roku 1988. První byla vedena Franzem Hillenkampem, Michaelem Karasem (Karas a Hillenkamp, 1988), druhá potom Koichi Tanakou (Tanaka *et al.*, 1988). MALDI se postupně stalo rozšířeným nástrojem pro studium peptidů, proteinů a mnoha dalších biomolekul. Při této ionizaci dochází k vypaření vzorku. Nejprve vzorek zkrystalizuje s maticí, která je obvykle tvořena slabou organickou kyselinou absorbující v UV oblasti. Po ozáření laserem se směs matrice se

vzorkem vypaří. Matrice přitom hraje klíčovou roli, protože nese vzorek. Matrice také slouží jako donor protonů pro vzorek, který tak získává kladný náboj (Karas a Hillenkamp, 1988).

Ionizační zdroje ESI a MALDI, které byly výše popsány, v pozitivním módu ionizace uvolní ionty. Ty je však ještě potřeba rozdělit podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Může k tomu být použito několik typů hmotnostních analyzátorů, např. kvadrupólový hmotnostní analyzátor nebo průletový analyzátor.

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor se skládá ze čtyř stejných kruhových tyčí, mezi kterými prolétávají ionty. Na tyče se vkládá různé napětí, podle kterého dopadají na detektor částice s různým poměrem m/z (Pingoud *et al.*, 2002).

U průletových analyzátorů (Time of Flight - TOF) jsou ionty urychleny a potom proletí rovnou dlouhou trubicí. Čas, který potřebuje daný ion pro překonání vzdálenosti ze zdroje k detektoru, se měří a z něj se posléze určuje poměr m/z (Pingoud *et al.*, 2002).

Pro analýzu peptidové směsi se často používá dvou spojených hmotnostních spektrometrů (tandemová spektrometrie - MS/MS) nebo propojení hmotnostního spektrometru s nějakou jinou separační technikou, např. kapalinovou chromatografií (LC), kapilární elektroforézou (CE), vysokoúčinné kapalinové chromatografii na reverzní fázi (RP-HPLC) nebo dvoudimenzionální HPLC (2D-HPLC) (Pingoud *et al.*, 2002).

Hmotnostní spektrometrie nám umožňuje určit sekvenci celého proteinu. Využívá se k tomu např. peptidového mapování nebo *de novo* sekvenování.

Peptidové mapování je separace peptidů, které vznikly enzymatickou nebo chemickou hydrolýzou zkoumaného proteinu. Vlastní separace se potom nejčastěji provádí pomocí SDS-PAGE, RP-HPLC nebo kapilární elektroforézou. Pro enzymatické štěpení se nejčastěji používá trypsin díky své velké specifitě (štěpí pouze na karboxylovém konci basických aminokyselin argininu a lysinu, pokud za nimi nenásleduje prolin). Z chemických činidel je nejpoužívanější kyanobromid, který štěpí za methioninem. Následně je protein identifikován (Pingoud *et al.*, 2002).

Při *de novo* sekvenování je postup stejný jako u peptidového mapování. Opět je protein rozštěpen na peptidy, které jsou následně separovány. Tento postup je ale určen pro proteiny, jejichž sekvence zatím není známa. Proto jsou vzniklé peptidy na závěr fragmentovány na hmotnostním spektrometru (Yergay *et al.*, 2002).

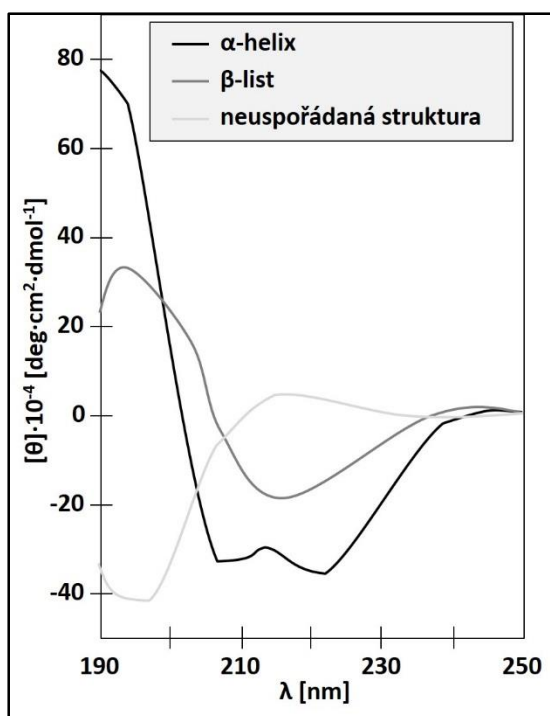
2.1.2 Metody studia sekundární struktury

Sekundární struktura je velmi snadno popsitelná pomocí spektroskopických metod, např. cirkulárním dichroismem (CD) nebo infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací (FTIR) (Pingoud *et al.*, 2002).

2.1.2.1 Cirkulární dichroismus

Cirkulární dichroismus (CD) vychází z rozdílu v absorpci levotočivého cirkulárně polarizovaného světla a pravotočivého cirkulárně polarizovaného světla. Tento rozdíl vzniká, když je molekula asymetrická. Asymetrická molekula např. obsahuje alespoň jeden chirální uhlík, tj. uhlík, na který jsou navázány čtyři různé atomy nebo skupina atomů. Typickými molekulami s chirálními atomy jsou biomolekuly, např. proteiny (Alliance Protein Laboratories: http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm; 23. 3. 2014).

Cirkulární dichroismus můžeme využít ke studiu sekundární a terciární struktury proteinů, sacharidů, nukleových kyselin a tekutých krystalů (Pingoud *et al.*, 2002). Tato metoda se také využívá ke zjišťování stability struktury při stresových podmínkách, např. termostabilita, pH stabilita, stabilita při denaturaci (Alliance Protein Laboratories: http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm; 23. 3. 2014).



Obr. 2: CD SPEKTRUM nejčastějších motivů sekundární struktury (Alliance Protein Laboratories: http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm; 23. 3. 2014).

Převažující sekundární strukturu proteinů můžeme určit CD spektrometrií ze signálů ve vzdálené UV oblasti (190 - 250 nm). Při těchto vlnových délkách se chromofory stávají peptidové vazby (Kelly a Price, 2000).

Záznamem z CD spektrometru je CD spektrum (Obr. 2). Tvar křivky v CD spektru a také její maxima a minima jsou charakteristickou pro jednotlivé prvky sekundární struktury. Křivka charakteristická pro α -helix tvoří v rozmezí 200 - 250 nm tvar písmene „w“. Minima této křivky jsou kolem 208 nm a 222 nm. Křivka ve tvaru písmene „v“ je typická pro β -skládaný list. Své minimum má mezi 217 - 220 nm (Manavalan a Johnson, 1987).

Vzorek pro CD spektrometrii ve vzdálené UV oblasti nesmí být rozpuštěn v pufru či v přítomnosti aditiv, které absorbují v této oblasti světelného spektra, např. histidin nebo imidazol tedy nemohou být použity (Kelly a Price, 2000).

2.1.3 Metody studia terciální struktury

Prostorovou strukturu proteinů tradičně studujeme pomocí rentgenové krystalografie a spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR spektroskopie). Informace o doménové struktuře proteinů můžeme získat rozštěpením vzorku specifickými proteasami a následnou analýzou pomocí SDS-PAGE (Pingoud *et al.*, 2002).

Dalšími metodami získáváme informace o vzdálenosti mezi rezidui. Mezi ně patří i hmotnostní spektrometrie, která se běžně využívá k analýze vzorků po izotopové výměně vodíku a deuteria nebo vytvoření příčných vazeb (Rozbesky *et al.*, 2012).

2.1.3.1 Rentgenová krystalografie

Rentgenová krystalografie nebo též rentgenová strukturní analýza je analytická metoda zabývající se interakcí krystalů s monochromatickým rentgenovým zářením (The Official Web Site of the Nobel Prize: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1915/wl-bragg-lecture.pdf; 27. 3. 2014).

Základním předpokladem pro použití této techniky ke strukturní analýze je, že zkoumaná látka tvoří krystaly. Vytvořit takový krystal ovšem často není nic jednoduchého, což lze uvést na příkladu proteinů a nukleových kyselin, kdy většina látek řadících se mezi tyto biomolekuly má pro krystalizaci své specifické podmínky. Ať už ale krystal vzniká za jakýchkoli podmínek, musí být velký 0,1 - 0,5 mm, aby byl vhodný pro difrakci (Pingoud *et al.*, 2002).

Ideální krystal má zcela pravidelnou strukturu, která je tvořena opakujícím se základním motivem (základní buňkou). Ten je tvořen pravidelně uspořádanými atomy. Reálné krystaly pochopitelně nejsou takto dokonalé (mají více či méně poruch), ale toto základní uspořádání dodržují (Pingoud *et al.*, 2002).

Když na krystal dopadne paprsek monochromatického rentgenového záření, tak na jednotlivých atomech dojde k rozdílnému rozptylu světla. To na základě Huygensova principu tvoří různé vlnoplochy, které na sebe narážejí. Pokud se potkají vlnoplochy se stejnou fází, tak dojde k zesílení vlny. Jestliže na sebe narazí dvě vlnoplochy s opačnou fází, tak dojde k zeslabení vlny. Výstupem z této analýzy je potom difraktogram. Ten je převeden Fourierovou transformací do mapy elektronové hustoty (Pingoud *et al.*, 2002).

Tato metody má v praxi velké uplatnění, např. se využívá k výzkumu nových léků a kontrole jejich kvality. Rentgenová krystalografie zde slouží ke zkoumání tvaru molekuly léčebné složky přípravku. Tvar této molekuly je pro výsledný léčebný efekt velice důležitý. Jako příklad lze uvést vývoj léčiva proti viru HIV. Ten obsahuje proteasu, která je nezbytná pro jeho množení. Je složena ze dvou makromolekul a hledá se látka, která by svým tvarem zapadla do zářezu mezi oběma makromolekulami, takže virus HIV by se dále nemohl množit (Weber *et al.*, 2013).

2.1.3.2 Spektroskopie nukleární magnetické rezonance

Nukleární (jaderná) magnetická rezonance (NMR) je technika, kterou můžeme určit uhlíkatý skelet organické sloučeniny (McMurry, 2007).

Atomová jádra spousty prvků mají nenulový jaderný spin (rotují kolem své osy). Jádra prvků mají také kladný náboj, takže se mohou chovat jako malé magnety a reagovat tedy na vnější magnetické pole. Tyto magnetické vlastnosti nemají jádra všech atomů, ale pouze těch s lichým počtem protonů (např. ^1H , ^2H , ^{14}N , ^{19}F , ^{31}P) nebo s lichým počtem neutronů (např. ^{13}C) (McMurry, 2007).

Nepůsobí-li na jádra vnější magnetické pole, jejich spiny jsou orientovány nahodile. Dostanou-li se tato jádra mezi silné magnety, natočí se jaderné spiny buď ve směru (paralelně), nebo proti směru (antiparalelně) vloženého magnetického pole. Působí-li potom na tyto jádra elektromagnetické záření o vhodné frekvenci, absorbují energii a spin se přemění. Jádra jsou potom v rezonanci s použitým zářením, od čehož je odvozen název nukleární magnetické rezonance (McMurry, 2007).

Výstupem z této metody je NMR spektrum, v kterém jsou zaznamenány signály jednotlivých jader (McMurry, 2007). Jaký daný signál je, nezávisí pouze na jádru

samotném, ale také na jeho chemickém okolí. Atomy, které mají odlišné chemické okolí, se liší rozložením elektronů a také tedy intenzitou jejich stínění. Nejvíce stíněná jádra jsou v NMR spektru posunuta zcela vpravo (Pingoud *et al.*, 2002).

Přestože pomocí NMR byla už úspěšně určena řada prostorových struktur proteinů, není tato technika běžnou součástí biochemické laboratoře, což je způsobeno především tím, že můžeme zkoumat jen proteiny do určité velikosti. Další nevýhodou je vysoká cena jednotlivých analýz (Pingoud *et al.*, 2002).

2.1.3.3 Vytváření příčných vazeb

Prostorová struktura proteinů se tradičně zkoumá pomocí rentgenové krystalografie a spektroskopie nukleární magnetické rezonance. Tyto techniky sice poskytují velmi detailní informace o molekule, ale mají jistá omezení. Rentgenovou krystalografií lze zkoumat pouze látky, které tvoří kvalitní krystaly. Ne všechny proteiny je ale tvoří. Některé také krystalizují špatně a některé dokonce vůbec. Navíc takto získané informace jsou statické, nevypovídají nic o struktuře za fyziologických podmínek v roztoku, kdy je protein aktivní. NMR spektroskopie naproti tomu sice popisuje dynamickou strukturu proteinu za fyziologických podmínek, ale její použití je omezeno velikostí proteinu. V současnosti se běžně určují pouze struktury proteinů, jejichž molekulová hmotnost nepřesahuje 50 kDa. Navíc obě metody vyžadují relativně velké množství čistého proteinu. Kdybychom chtěli použít těchto metod k analýze vzorku, potřebovali bychom řádově miligramy čisté látky (Rozbesky *et al.*, 2012).

Oproti tomu pro studium látky pomocí hmotnostního spektrometru, kterým se analyzují vzorky modifikované činidly pro vytváření příčných vazeb i vzorky po izotopové výměny vodíku za deuterium, která je popsána dále, nám stačí pouze femtomoly nebo i méně čisté látky (Thomas *et al.*, 2004). Další nespornou výhodou této metody oproti předchozím je, že výsledky jsou velmi rychle (Rozbesky *et al.*, 2012).

2.1.3.4.1 Postupy pro vytváření příčných vazeb

Tato metoda může být v praxi provedena třemi různými způsoby. Prvním je postup Bottom-Up, druhým Top-Down a třetím vytváření příčných vazeb v živých systémech (Sinz, 2006).

Jako první byl zmíněn postup s názvem Bottom-Up. Zde je reakční směs po vytvoření příčných vazeb enzymově štěpena. Vzniklé peptidy jsou rozděleny pomocí SDS-PAGE

nebo kapalinové chromatografie. Analýza vzorků je potom provedena pomocí hmotnostního spektrometru s ionizací MALDI, popřípadě ESI. Protein je následně identifikován porovnáním seznamu molekulových hmotností peptidů z naměřeného hmotnostního spektra s již existující databází (Young *et al.*, 2000). Tento postup má samozřejmě i svá úskalí. Jedním problémem je, že produkty štěpení při ionizaci ESI často ztrácejí náboj ϵ -aminoskupiny lysinu, takže nemohou být detekovány. Obecným problémem hmotnostní spektrometrie (zvláště u fragmentů s velkou molekulovou hmotností) potom je, že stejný poměr m/z může mít více fragmentů s různými aminokyselinovými sekvencemi (Sinz, 2006).

Další možný postup se nazývá Top-Down. Zde jsou proteiny s příčnými vazbami analyzovány intaktně před štěpením, po kterém následuje analýza pomocí hmotnostního spektrometru. Je tedy vynecháno enzymatické štěpení vzorku (Kelleher *et al.*, 1999). Hmotnostní spektrometr, který se nejčastěji používá pro tento postup je typu ESI-FTICR (hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem a s Fourierovou transformací). Své omezení má i tento postup. Velmi těžko se totiž provádí analýza velkých proteinů. Řešením může být postup, který zvolil Petr Novák se svými spolupracovníky. Při charakterizaci byl hovězí rhodopsin nejdříve štěpen pomocí bromkyan, který štěpí na C-konci methioninu. Potom následovala analýza vzniklých fragmentů pomocí ESI-FTICR-MS/MS. Tento postup ve své podstatě kombinací obou výše jmenovaných (Novák *et al.*, 2005).

Posledním postupem, který byl zmíněn v prvním odstavci, bylo vytváření příčných vazeb přímo v živých systémech. Tyto vazby se zde tvoří mezi interagujícími proteiny přímo v jejich přirozeném prostředí, což nám umožňuje sledovat buněčné procesy. Jednou z cest, jak tohoto dosáhnout, je ošetření buněk glutaraldehydem. Tato látka rychle proniká buněčnou stěnou a vytváří příčné vazby mezi proteiny interagujícími v buňce. Protein, který zkoumáme, se potom přečistí pomocí imunoafinitní chromatografie a nakonec stanoví pomocí tandemového hmotnostního spektrometru (Vasilescu *et al.*, 2004).

2.1.3.4.2 Činidla pro tvorbu příčných vazeb

Podle vzhledu dělíme činidla pro tvorbu příčné vazby na homobifunkční, heterobifunkční, činidla s nulovou délkou vazby a trifunkční. Homobifunkční činidla mají stejné funkční skupiny a naopak heterobifunkční činidla mají rozdílné funkční skupiny. Činidla s nulovou délkou vazby propojí dva řetězce tak, že mezi nimi nevzniká spojovací

linie - vazba je propojením mezi dvěma atomy z původních řetězců (Sinz, 2006). Trifunkční činidla spojují řetězce stejně jako bifunkční činidla, ale mají navíc ještě třetí funkční skupinu, která slouží buď k připojení k třetímu řetězci, nebo se při přečištění produktu využije afinity této skupiny k biotinu (Trester-Zedlitz *et al.*, 2003).

Tato činidla samozřejmě můžeme dělit i podle funkčních skupin, se kterými reagují. Nejběžnější činidla reagují s aminoskupinami, sulfhydrylovými skupinami nebo karboxyskupinami. Zvláštním typem činidel jsou činidla aktivovaná světlem (Sinz, 2006).

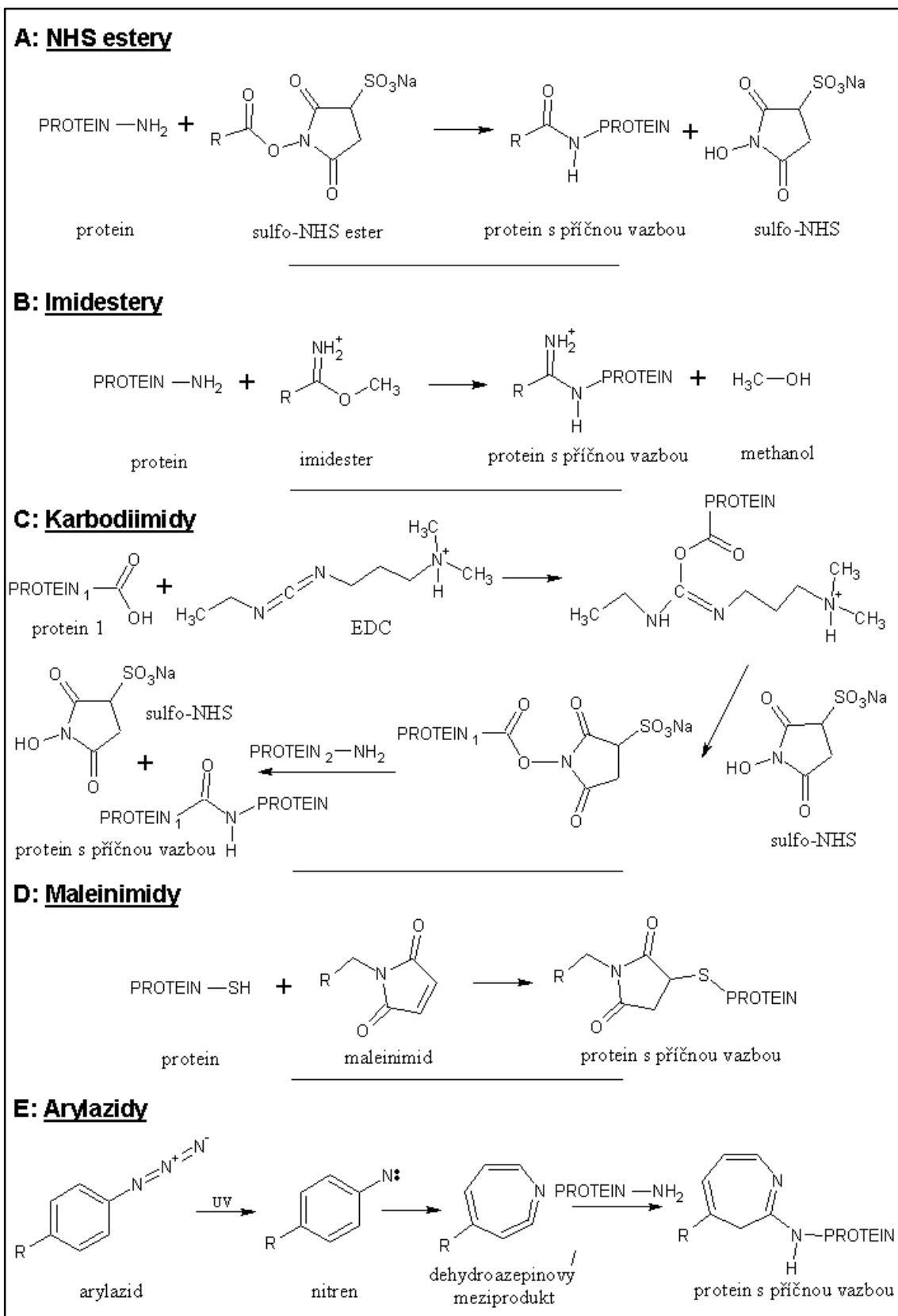
Mezi činidla reagující s aminoskupinami, např. volnými N-konci peptidů či ϵ -aminoskupinami lysinů, se řadí N-hydroxysukcinimidestery (NHS estery), imidoestery a karbodiimidy.

NHS estery (Obr. 3 - A) jsou asi nejrozšířenější skupinou činidel reagujících s aminoskupinami. V průběhu reakce s nukleofilem se uvolní NHS (popřípadě sulfo-NHS - viz dále) skupina. Reakce těchto činidel probíhá za fyziologického pH (7,0 - 7,5). Velkým problémem těchto činidel ale je, že nejsou rozpustné ve vodném roztoku, takže jejich použití vyžaduje nejdříve rozpuštění v organickém rozpouštědle. Z tohoto důvodu se místo nich používají sulfo-NHS estery, což jsou jejich analoga, která už ale jsou ve vodě rozpustná (Sinz, 2006).

Imidoestery (Obr. 3 - B) mají menší aktivitu pro tvorbu příčné vazby směrem k nukleofilu než ostatní činidla. Tyto estery jsou na rozdíl od NHS esterů ve vodě rozpustné, což ale zvyšuje jejich odbourání hydrolyzou na méně než půl hodiny (Hunter a Ludwig, 1962). V porovnání s NHS estery mají tato činidla menší účinek při vytváření příčných vazeb mezi aminoskupinami (Dihazi a Sinz, 2003).

Karbodiimidy (Obr. 3 - C) se řadí mezi činidla s nulovou délkou vazby. Vytváří vazbu mezi prostorově blízkými skupinami. Jejich nejznámějším zástupcem je EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid), který vytváří vazbu mezi karboxylovou skupinou a aminoskupinou. Do reakční směsi se přidává ještě sulfo-NHS, který stabilizuje meziproduct. (Hoare a Koshland, 1966).

Mezi činidla reagující se sulfhydrylovými skupinami se řadí především maleinimidy (Obr. 3 - D). Tyto činidla vytvářejí příčné vazby mezi SH skupinami cysteinů. Problém ale nastává ve chvíli, kdy dojde k redukci disulfidových vazeb mezi peptidy, čímž vzniknou další sulfhydrylové skupiny, s kterými je možno reagovat. Z tohoto důvodu může dojít při použití těchto činidel ke zkreslení prostorové struktury proteinu (Sinz, 2006).



Obr. 3: REAKČNÍ SCHÉMATA nejběžnějších skupin **ČINIDEL** pro vytváření příčných vazeb (Sinz, 2006).

Fotoreaktivní činidla (Obr. 3 - E) reagují se zkoumanou molekulou až po vystavení

UV světlu. Ideální činidlo tohoto typu by mělo mít vysokou reaktivitu, mělo by být stabilní ve tmě a vysoce citlivé ke světlu o vlnové délce, která nezničí biologický vzorek. Také by reakcí s proteiny měl vznikat stabilní a specifický produkt, který bychom byli schopni izolovat, přečistit a analyzovat na hmotnostním spektrometru. Aryl azidy jsou činidla, s kterými se z této skupina setkáváme nejčastěji. Dále sem patří diaziriny a diazo sloučeniny (Sinz, 2006).

2.1.3.4 Výměna vodíku za deuterium

Je to metoda, při které je atom vodíku, který se nachází třeba na aminoskupině zapojené do peptidové vazby ale i jinde, vyměněn za deuterium. Kombinací této metody s hmotnostní spektrometrií můžeme zkoumat aminokyselinovou sekvenci proteinu, prostorový tvar molekuly i dynamiku proteinu. Znalost všech těchto informací je nezbytná pro úplné pochopení funkce dané bílkoviny (Rozbesky *et al.*, 2012).

Metoda samotná začíná rozpuštěním proteinu ve vhodném vodném (H_2O) pufru, který neobsahuje těžkou vodu (D_2O). Dalším krokem je ředění tohoto roztoku pufrém, který obsahuje stejné složky jako první pufr, ale místo běžné vody (H_2O) obsahuje těžkou (deuterovanou) vodu (D_2O). Tato izotopová výměna je acidobazicky katalyzovaná, a proto ji významně ovlivňuje pH roztoku. To obvykle bývá zhruba 7 (fyziologické pH), kdy protein zaujímá konformaci nejvíce se blížící té, v které se nachází v jeho přirozeném prostředí. Reakce potom probíhá po definovanou dobu. Na konci tohoto časového intervalu je výměna ukončena prudkým poklesem pH na 2,5 a snížením teploty na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Engen, 2009).

Výměně ale nemusí podléhat všechny vodíky v proteinu. To, jestli se jí budou účastnit či nikoli, záleží především na dvou skutečnostech. Za prvé záleží na tom, jestli je daný atom vodíku v kontaktu s rozpouštědlem, a za druhé na tom, jestli se daný atom podílí na vodíkové vazbě. Z toho vyplývá, že u různých proteinů je rychlost této reakce různá. Na základě rychlosti reakce potom můžeme vyvozovat určité předpoklady pro jednotlivé molekuly. Pomalá reakce napovídá, že vodíky nejsou pro rozpouštědlo snadno dostupné a / nebo molekula obsahuje vodíkové vazby. Naopak rychlá reakce napovídá, že vodíky jsou v kontaktu s rozpouštědlem a / nebo molekula neobsahuje vodíkové vazby (Engen, 2009).

Detekce izotopových výměn, které proběhly je možná několika způsoby. Nejčastěji se tato metoda používá ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Englander *et al.*, 2003). Je tomu tak, protože výměna každého atomu vodíku ^1H za deuterium ^2D (^2H) představuje

nárůst hmotnosti molekuly o 1 Da. Dochází tedy ke změně hmotnosti molekuly, kterou lze snadno detekovat pomocí hmotnostního spektrometru. H/D výměnu je ale možno spojit i s jinými technikami, např. s nukleární magnetickou rezonancí (Wand a Englander, 1996), nebo s Ramanovou spektroskopií (Hildebrandt *et al.*, 1993).

Při studiu prostorové struktury proteinů lze tuto techniku kombinovat s vytvářením příčných vazeb. V takovém případě se jedna část vzorku postupně nechá reagovat s několika činidly pro vytváření příčné vazby a další část vzorku podstoupí izotopovou výměnu vodíku za deuterium. Obě frakce jsou potom samostatně analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru a porovnáním dat z obou měření se usuzuje na prostorovou strukturu molekuly. Tohoto postupu užil například Daniel Rozbesky se svými spolupracovníky k zpřesnění struktury myšního receptoru NKR-P1A, který se nachází na povrchu zabíjíčkových buněk, jenž bojují proti virálním infekcím a tumorovým buňkám (Rozbesky *et al.*, 2012).

2.2 Studované enzymy

2.2.1 Alkoholdehydrogenasy

Alkoholdehydrogenasy (ADH, EC 1.1.1.1) tvoří rozsáhlou skupinu enzymů, které jsou odpovědné za vratnou oxidaci alkoholů na odpovídající aldehydy nebo ketony. K této oxidaci využívají současné redukce NAD(P)⁺ na NAD(P)H (de Smidt *et al.*, 2008).

ADH jsou v enzymovém systému zařazeny mezi oxidoreduktasy. Vlastní skupina ADH se potom ještě dále dělí do tří rozdílných nadrodin - dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem a železem aktivované ADH (de Smidt *et al.*, 2008).

Tyto enzymy byly identifikovány jak v prokaryotních, tak v eukaryotních organismech. Nejvíce je ovšem prostudována ADH z mikroorganismu *Saccharomyces cerevisiae* (de Smidt *et al.*, 2008).

2.2.1.1 Alkoholdehydrogenasa ze *Saccharomyces cerevisiae*

ADH se hlavně podílí na dvou důležitých energetických drahách *S. cerevisiae*, kterými jsou glykolýza a aerobní respirace. Ethanol, který je tímto enzymem využíván, je totiž koncovým produktem alkoholové fermentace navazující na glykolýzu. Ethanol také může sloužit i jako zdroj uhlíku během aerobní respirace, kdy ADH katalyzuje vzájemnou přeměnu acetaldehydu na ethanol (de Smidt *et al.*, 2008).

Postupným bádáním se zjistilo, že *S. cerevisiae* nemá pouze jednu ADH ale hned sedm (ADH1 - ADH7). Každá z nich je kódována jiným genem, takže každá má trochu jinou sekvenci aminokyselin a trochu jinou funkci (Larroy *et al.*, 2002).

ADH má tetramerní strukturu. Každý monomer je složen ze tří domén - z domény vázající koenzym, oligomerizační domény a z katalytické domény (de Smidt *et al.*, 2008).

Každý řetězec obsahuje jednu reaktivní sulfhydrylovou skupinu (cysteinový zbytek). Díky tomu se může vazbou jednoho atomu zinku a jednoho molu $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ vytvořit aktivní místo při poskládání tetrameru (Kägi a Vallee, 1960). Aktivní místo jednotlivých isoenzymů ADH je stejné, liší pouze v drobnostech, například jednou aminokyselinou, kdy je u ADH1 v pozici 294 methionin, zatímco u ADH2 a ADH3 je to leucin (Ganzhorn *et al.*, 1987).

Výzkum postupně ukázal, že aktivní enzym (tetramer) váže čtyři molekuly NAD^+ a čtyři atomy zinku (Karlović *et al.*, 1976). Atomy zinku jsou důležité, protože pomáhají držet pohromadě kvartérní strukturu enzymu (Kägi a Vallee, 1960). Navíc mají nenahraditelnou roli i v oxidaci alkoholů. Zde se podílí na stabilizaci alkoholátového iontu v kroku, kdy dochází k přenosu vodíku. Zinek tady působí jako akceptor elektronů, čímž zvyšuje elektrofilní charakter aldehydů. To následně usnadňuje přenos vodíkového atomu na aldehyd (Klinman, 1975).

2.2.2 Aminoaldehyddehydrogenasy

Aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) jsou enzymy, které katalyzují oxidaci ω -aminoaldehydů na odpovídající ω -aminokyseliny. Tato reakce je také spojena s redukcí NAD(P)^+ na NAD(P)H (Brauner *et al.*, 2003).

AMADH patří do nadrodiny aldehyddehydrogenas (ALDH). Zde se řadí buď do rodiny ALDH9, nebo do rodiny ALDH10. Toto rozdělení do několika rodin je způsobeno kritérii, která jsou stanovena pro zařazování jednotlivých enzymů do systému. Podle nich tvoří jednu rodinu enzymy, které mají alespoň 40 % aminokyselinové sekvence totožné. Protože ale u AMADH se tato shoda pohybuje jen mezi 35 - 39 %, tak jsou tyto enzymy řazeny do různých rodin, i když katalyzují stejný typ reakce (Kopečný *et al.*, 2013).

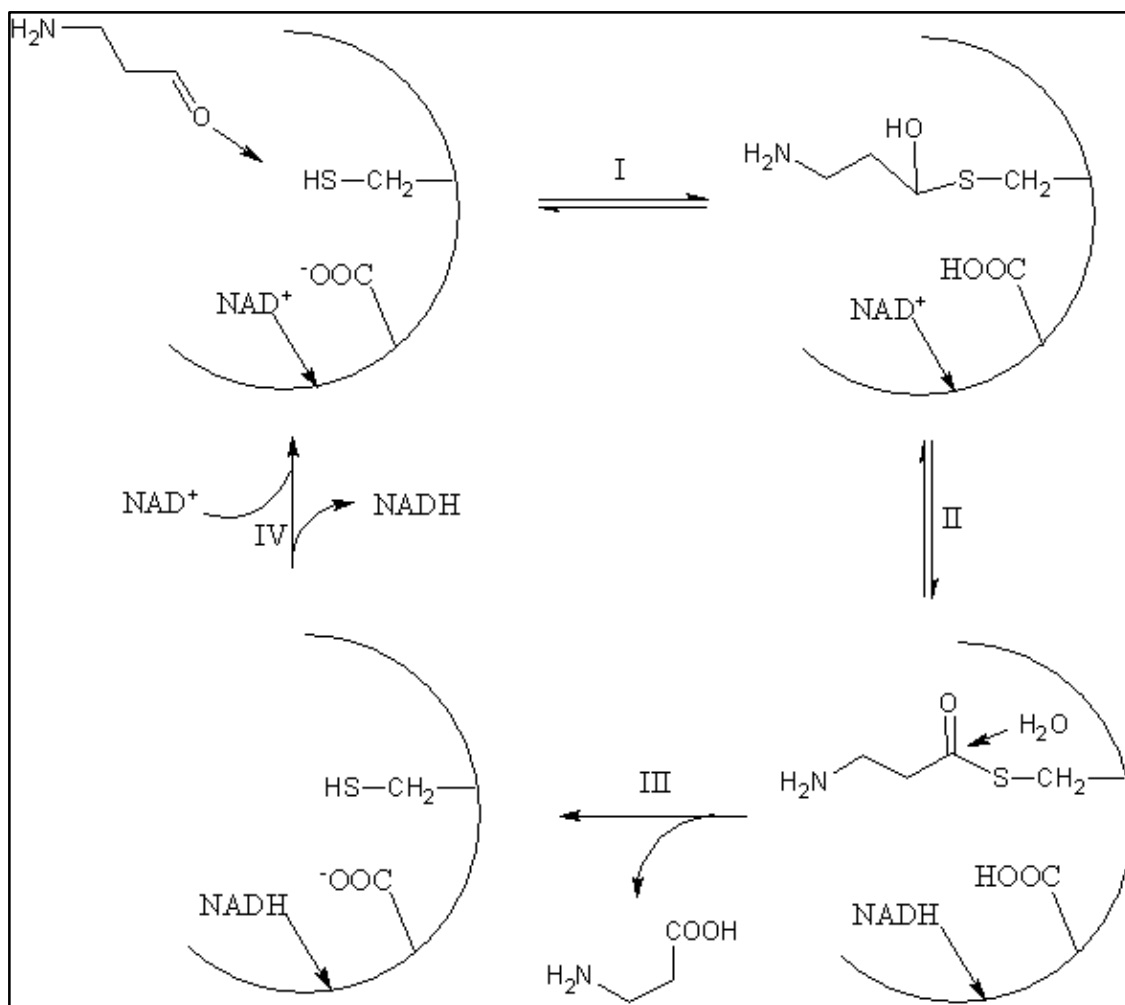
Rodina ALDH9 a několik členů rodiny ALDH10 představuje enzymy tří metabolických drah, které spolu vzájemně nesouvisí. Je to metabolismus polyaminů, cholinu a lysinu. Klasifikace založená na základě substrátové specifčnosti rozděluje členy této rodiny do čtyř různých skupin. Jsou to 4-aminobutyraldehyddehydrogenasy

(ABALDH, EC 1.2.1.19), 4-guanidinobutyraldehyddehydrogenasy (GBALDH, EC 1.2.1.54), betainaldehyddehydrogenasy (BADH, EC 1.2.1.8) a 4-trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasy (TMABALDH, EC 1.2.1.47). Polyaminy jsou oxidovány na ω -aminoaldehydy a peroxid vodíku. Cholin je oxidován cholinoxidasou popřípadě cholinmonooxygenasou na betainaldehyd (BAL). Metabolismus lysinu vede k *N,N,N*-trimethyl-4-aminobutyraldehydu (TMABAL). Všechny tyto dráhy končí aldehydovými sloučeninami, které jsou oxidovány členy rodin ALDH9 a ALDH10. Tvoří se netoxické metabolity jako je β -alanin nebo γ -aminomáselná kyselina (GABA) (Tylichová *et al.*, 2010).

Enzymy z nadrodiny aldehyddehydrogenas se vyskytují buď jako dimery, nebo jako tetramery. Každý monomer je potom složen z oligomerní domény, domény vázající NAD(P)⁺ a z katalytické domény (Tylichová *et al.*, 2010). V aktivním místě aminoaldehyddehydrogenas má katalytickou funkci cysteinové residuum (Brauner *et al.*, 2003). Proto na ně inhibičně působí sulhydrilová činidla jako 4-chloromerkuribenzoan nebo *N*-methylmaleinimid (Šebela *et al.*, 2000). Dále se v katalytickém místě AMADH nachází ještě asparagin, kyselina glutamová a celá řada dalších aminokyselin, které usnadňují vazbu substrátu (Kopečný *et al.*, 2013).

Reakční mechanismus katalýzy AMADH (Obr. 4) je typický pro zástupce nadrodiny ALDH. I zde se tvoří z aminoaldehydových substrátů kovalentní meziproduct, který je později přeměněn na příslušnou aminokyselinu. Samotná katalýza začíná nukleofilním atakem substrátu (aminoaldehydu) na cystein v katalytickém místě. Tento atak vede ke vzniku kovalentně vázaného thiohemiacetalu (kovalentního meziproductu). Z něj potom putuje atom vodíku na C4 atom nikotinamidového kruhu NAD⁺. Tento přenos spotřebovává energii. Důvodem je, že karbonylová skupina má bipolární charakter. V posledním katalytickém kroku se ke slovu dostane glutamát, jehož funkcí zde je aktivovat molekulu vody. Ta provede nukleofilní atak na thioester. Tato hydrolyza vede k rozštěpení thioesterové vazby, čímž dojde k uvolnění příslušné aminokyseliny. NADH nakonec oddisociuje z vazebného místa (Perez-Miller a Hurley, 2003).

Výzkumná činnost Oddělení biochemie proteinů a proteomiky zřízeného v rámci Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum se zaměřuje především na izoenzymy z hrachu setého (*Pisum sativum*) - PsAMADH1 a PsAMADH2 - kukuřice seté (*Zea mays*) - ZmAMADH1a, ZmAMADH1b a ZmAMADH2 - a rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*) - SlAMADH1 a SlAMADH2 (Kopečný *et al.*, 2013).



Obr. 4: Reakční **MECHANISMUS KATALÝZY AMADH**. Katalytické místo enzymu je znázorněno s residuem cysteinu, které vykonává katalytickou činnost. REAKCE I: Je zde znázorněn nukleofilní atak substrátu na cystein, vzniká thiohemiacetalový meziprodukt. REAKCE II: Zde proton putuje z meziproductu na NAD⁺ a vzniká NADH a thioester. REAKCE III: Hydrolyzou Thioesteru se uvolňuje aminokyselina (zde je to β-alanin). REAKCE IV: Dochází k uvolnění NADH a navázání dalšího NAD⁺ (Tylichová *et al.*, 2007).

2.2.2.1 Aminoaldehyddehydrogenasa z hrachu setého (*Pisum sativum*)

Pro rostliny je typické, že mají více izoenzymů. V hrachu setém se vyskytují dva (PsAMADH1 a PsAMADH2). Elementární jednotka krystalu PsAMADH1 obsahuje 6 velmi podobných dimerů, zatímco elementární jednotka krystalu PsAMADH2 obsahuje pouze 1 dimer. Gelovou chromatografií bylo potom prokázáno, že aktivní formou v roztoku je dimer (Tylichová *et al.*, 2010).

Všechny monomery obou isoenzymů jsou složeny ze tří domén jako všechny aldehyddehydrogenasy. Každý monomer má doménu vázající koenzym, katalytickou doménu a oligomerní doménu (Tylichová *et al.*, 2010).

Každý isoenzym obsahuje jeden kation, který je vázán blízko místa vázajícího koenzymu. Je zde vázán v dutině. Zjistilo se to pomocí atomové absorpční spektrometrie krystalu enzymu, která ukázala přítomnost 2,5 mol Na⁺ na mol dimerního enzymu, což zhruba dává jeden Na⁺ na jeden monomer. Role tohoto monovalentního iontu v AMADH zatím není zcela objasněna. Snad stabilizuje enzym skrze koordinační vazby, nebo je důležitý pro navázání NAD⁺ (Tylichová *et al.*, 2010).

Nejdůležitějším místem celého enzymu je pochopitelně substrátový kanál. U PsAMADH1 je asi 5 - 8 Å široký a 14 Å hluboký. Substrátový kanál PsAMADH2 je tvarem i velikostí podobný tomu v isoenzymu 1. Na jeho počátku jsou umístěny aminokyseliny, které zachytí substrát. Oba izoenzymy zde mají téměř stejné aminokyselinové složení, které se liší pouze na třech místech. Dvě z těchto změn se týkají hned vstupu do kanálu. Ala 109 u PsAMADH1 je u PsAMADH2 nahrazen Trp 109 a Ser 453 je nahrazen Cys 453. Poslední změnou je, že místo Phe 288 u PsAMADH1 je u PsAMADH2 Trp 288. Substrát se postupně pohybuje dovnitř kanálku, až dojde ke katalytickému místu, kde je umístěn Cys 294. Pokud je substrát vhodný, tak je zde přeměněn na produkty, které vycházejí ven opačnou stranou kanálu (Tylichová *et al.*, 2010).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

2-iodacetamid (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Spolková republika Německo)

2-merkapt ethanol (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Spolková republika Německo)

α -chymotrypsin (MP Biomedicals, LLC, Francie)

α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (Bruker Daltonik GmbH, Spolková republika Německo)

acetonitril (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Spolková republika Německo)

akrylamid (Bio-Rad Laboratories, Inc., Spojené státy americké)

bis(*N*-hydroxysukcinimid)suberát (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Spojené státy americké)

bis(*N*-sukcinimid)glutarát (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Spojené státy americké)

Coomassie Brilliant Blue G 250 (SERVA Electrophoresis GmbH, Spolková republika Německo)

dihydrogenfosforečnan amonný (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Švýcarsko)

dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Spolková republika Německo)

dimethyl sulfoxid (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Francie)

dithiothreitol (Bio-Rad Laboratories, Inc., Spojené státy americké)

dodecylsulfát sodný (SERVA Electrophoresis GmbH, Spolková republika Německo)

glycin (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Spojené státy americké)

hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich Co. LLC, Spojené státy americké)

hydrogenfosforečnan draselný (Fluka™ Analytical, Spolková republika Německo)

hydrogenuhlíčan amonný (Fluka™ Analytical, Spolková republika Německo)

hydroxid sodný (Fluka™ Analytical, Spolková republika Německo)

hydroxid draselný (Sigma-Aldrich Co. LLC, Spolková republika Německo)

chlorid sodný (Sigma-Aldrich Co. LLC, Spojené státy americké)

kyselina bichinoninová (Sigma-Aldrich Co. LLC, Spojené státy americké)

kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Spolková republika Německo)

kyselina mravenčí (Merck KGaA, Spolková republika Německo)

kyselina octová (Merck KGaA, Spolková republika Německo)

kyselina trifluoroctová (Merck KGaA, Spolková republika Německo)
Laemmliho vzorkový pufr (Bio-Rad Laboratories, Inc., Spojené státy americké)
methanol (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Spolková republika Německo)
N-[2-hydroxyethyl]piperazin-*N'*-ethansulfonová kyselina (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Spolková republika Německo)
n-butylalkohol (Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o., Česká republika)
N,N'-methylen-bis(akrylamid) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Spojené státy americké)
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (Bio-Rad Laboratories, Inc., Spojené státy americké)
pentahydrát síranu měďnatého (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Spolková republika Německo)
peroxidisíran amonný (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Spolková republika Německo)
pufr pro separační gel (Bio-Rad Laboratories, Inc., Spojené státy americké)
pufr pro zaostřovací gel (Bio-Rad Laboratories, Inc., Spojené státy americké)
standarty obarvené pro SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Inc., Spojené státy americké)
peptidové standarty pro MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Spolková republika Německo)
tris(hydroxymethyl)aminomethan (MP Biomedicals, LLC, Francie)
trypsin (MP Biomedicals, LLC, Francie)

3.2 Přístroje

box laminární biohazard CytoFAST Elite 212 (Faster S.r.l., Itálie)
centrifuga IEC CL31/CL31R Multispeed (Thermo Fisher Scientific Inc., Spojené státy americké)
centrifuga SPECTRAFUGE MINI (Labnet International, Inc., Korea)
čistička ultrazvuková K-5LM (Kraintek s.r.o., Slovenská republika)
digestoř MERCI M 1500 (MERCİ, s.r.o., Česká republika)
filtrační souprava pro centrifugaci Amicon® Ultra 0,5 mL Centrifugal Filters (Merck Millipore Ltd., Irsko)
hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF Ultraflex extreme (Bruker s.r.o., Spolková republika Německo)
hmotnostní spektrometr MALDI-TOF Microflex LRF20 (Bruker s.r.o., Spolková republika Německo)

koncentrátor vakuový Concentrator plus / Vacufuge[®] plus (Eppendorf AG, Spolková republika Německo)

MALDI destička μ Focus 384 circles 900 μ m s držákem Magnetic Holder (Hudson Surface Technology, Spojené státy americké)

MALDI destička MSP BigAnchor 96 (Bruker Daltonik GmbH, Spolková republika Německo)

míchačka magnetická IKA[®] Big Squid (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Spolková republika Německo)

odstředivka MiniSpin[®] Plus (Eppendorf AG, Spolková republika Německo)

pH metr pH50 (LABOSERV s.r.o., Česká republika)

skener UMAX PowerLook 1120 USG (Umax BINUSCAN, Spojené státy americké)

souprava pro elektroforézu Mini-PROTEAN[®] 3 Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Spojené státy americké)

spektrofotometr Lightwave II (Biochrom Ltd., Anglie)

špičky ZipTip_{C18} (Merck Millipore Ltd., Irsko)

termoblok MD-01 (Major Science, Spojené státy americké)

Thermomixer comfort 1,5 ml (Eppendorf AG, Spolková republika Německo)

třepačka KS 130 basic (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Spolková republika Německo)

třepačka „VORTEX“ SA8-regulované otáčky s nastavcem SA8/1 (Stuart[™] Scientific, Anglie)

váhy analytické RADWAG X (RADWAG, Polsko)

vývěva M35 (KNF Neuberger GmbH, Spolková republika Německo)

3.3 Metody

Pokusy dále popsané byly prováděny se dvěma enzymy. Prvním byla alkoholdehydrogenasa z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a druhým byl isoenzym PsAMADH2 aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu (*Pisum sativum*). Pokus s alkoholdehydrogenasou byl určen pro optimalizaci podmínek reakce druhého výše jmenovaného enzymu.

3.3.1 Příprava vzorků pro pokus

3.3.1.1 Rozpuštění alkoholdehydrogenasy

Alkoholdehydrogenasa byla rozpuštěna v 50 mmol.l⁻¹ HEPES (*N*-[2-hydroxyethyl]piperazin-*N'*-ethansulfonová kyselina) pufru o pH 7,5. Ústojný roztok ještě obsahoval NaCl o koncentraci 1 mol.l⁻¹ a EDTA (kyselinu ethylendiamintetraoctovou) o koncentraci 1 mmol.l⁻¹. pH bylo upraveno přikapáváním NaOH. V pokusu byl použit zásobní roztok enzymu o koncentraci 5 mg/ml.

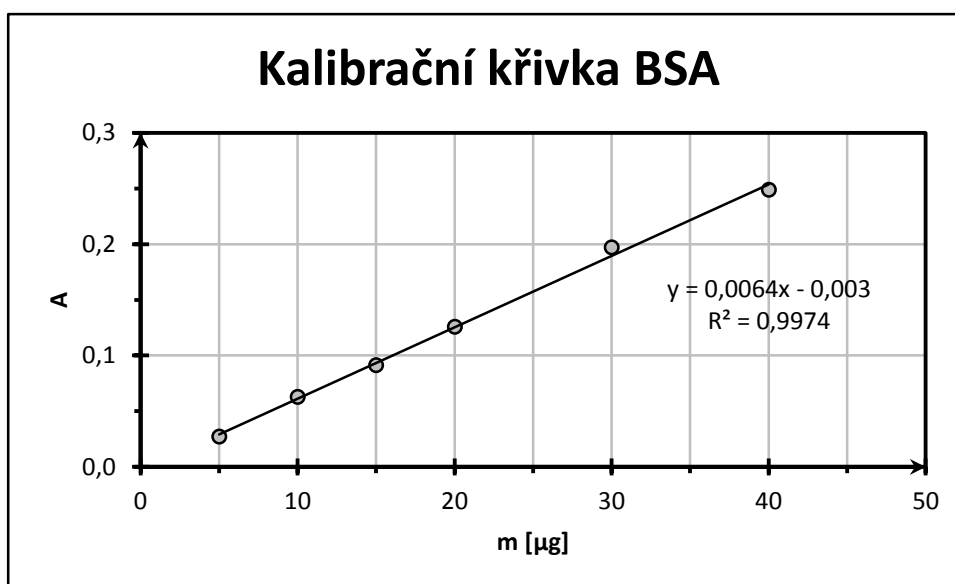
3.3.1.2 Výměna pufru ultrafiltrací u aminoaldehyddehydrogenasy

Vzorek rekombinantní PsAMADH2, který izolovala Michaela Balášová z *Escherichia coli*, byl získán rozpuštěný v Tris pufru. Tento pufr ale bohužel není vhodný pro optimální průběh reakce enzymu s činidly pro tvorbu příčné vazby, protože jeho složka sama o sobě reaguje. Z tohoto důvodu bylo nejdříve nutné enzym převést do vhodného pufru.

Pufr byl vyměněn ultrafiltrací na chlazené centrifuze IEC CL31/CL31R Multispeed. Ta byla před začátkem pokusu vychlazena na 4 °C. Mezitím se do patron s ultrafiltrem (30 kDa) v plastových 1.5 ml mikrozkušavkách napipetoval roztok PsAMADH2. Centrifugační zkumavky se vložily do centrifugaci. Operace trvala 15 minut, relativní centrifugační síla byla 10 000 g a teplota 4 °C. Po zastavení centrifugy zbylo nad ultrafiltrem méně než 40 µl původního roztoku. K němu byl přidán 300 µl 20 mmol.l⁻¹ K-fosfátového pufru o pH 7, který byl připraven z K₂HPO₄ a KH₂PO₄, pH bylo upraveno pomocí roztoku KOH. Centrifugační zkumavky s patronami byly opět vloženy do chlazené centrifugy, kde probíhala po dobu dalších 15 minut ultrafiltrace za stejných podmínek jako předtím. Tento krok byl proveden celkem třikrát. Enzym byl následně získán v 20 mmol.l⁻¹ K-fosfátovém pufru, pH 7.

3.3.2 Měření koncentrace aminoaldehyddehydrogenasy spektrofotometrií s bicinchoninovou kyselinou

Reakční roztok pro měření koncentrace touto metodou se připravuje smícháním činidel A a B v objemovém poměru 50:1. Činidlo A je roztok bicinchoninové kyseliny. Ten se skládá z 1% roztoku sodné soli kyseliny bicinchoninové, 2% Na₂CO₃·H₂O, 0,16% roztoku sodné soli kyseliny vinné, 0,4% NaOH a 0,95% NaHCO₃. Činidlo B je 4% roztok



Obr. 5: KALIBREČNÍ KŘIVKA BSA, s jejíž pomocí byla určena koncentrace vzorku PsAMADH2.

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 2 ml reakčního roztoku se pak pipetují do každé zkumavky, která je použita v pokusu.

Koncentrace enzymu je zde stanovena pomocí kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla připravena z pipetovaných dávek různého množství hovězího sérového albuminu (BSA) (Obr. 5). Při přípravě této kalibrační řady se vycházelo ze zásobního roztoku BSA, který měl koncentraci 1 mg/ml. Do různých zkumavek, v kterých byl reakční roztok, se postupně napipetovalo 5, 10, 15, 20, 30 a 40 μl zásobního roztoku, čímž vznikla kalibrační řada, která byla složena z roztoků o obsahu 5, 10, 15, 20, 30 a 40 μg BSA. Každý roztok BSA byl připraven třikrát. Jako blank byl použit reakční roztok.

Vzorek pro měření koncentrace enzymu byl připraven přidáním 2 μl jeho roztoku do 2 ml reakčního roztoku. Taktéž byl připraven třikrát.

Koncentrace enzymu byla stanovena spektrofotometricky při 562 nm (Smith *et al.*, 1985). Z naměřených absorbancí byla pomocí rovnice přímky lineární regrese z kalibrační křivky BSA (Obr. 5) vypočítána koncentrace. Ta byla $3,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Tab. 1). Při znalosti objemu vzorku pro určení koncentrace enzymu, který byl 144 μl , bylo stanoveno, že v něm je rozpuštěno 480 μg PsAMADH2.

Tab. 1: Tabulka obsahuje naměřené **ABSORBANCE VZORKU** pro určení **KONCENTRACE PsAMADH2** a také z něj vypočítané koncentrace. V dolní části tabulky je uvedena průměrná koncentrace a směrodatná a relativní odchylka.

A	c [$\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	c [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]
0,038	3,203	3,203
0,040	3,359	3,359
0,041	3,438	3,438
c_{průměr} [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]:		3,3
Směrodatná odchylka [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]:		0,119
Relativní odchylka [%]:		3,580

3.3.3 Vytváření příčných vazeb

Pro vytváření příčných vazeb byla použita činidla bis(*N*-hydroxysukcinimid)suberát (DSG) a bis(*N*-sukcinimid)glutarát (DSS). Obě slouží k propojování primárních aminoskupin, které jsou obsaženy v lysinových zbytcích. Reakce mezi činidly a enzymy byla provedena při 37 °C. Doba trvání pokusu byla 30 minut. Reakce byla zastavena zamrazením (Jacobsen *et al.*, 2006).

Nejdříve ale bylo nutné tento krok optimalizovat (určit, v jakém poměru se mají enzym a činidlo nechat reagovat). K tomu byl zvolen enzym alkoholdehydrogenasa ze *Saccharomyces cerevisiae*, protože má podobnou prostorovou strukturu jako hlavní objekt zájmu, tedy aminoaldehyddehydrogenasa z *Pisum sativum*.

Alkoholdehydrogenasa byla rozpuštěna v 50 mmol.l⁻¹ HEPES pufru o pH 7,5 (viz kapitola 3.3.1.1). V pokusu byl použit zásobní roztok enzymu o koncentraci 5 mg/ml. Činidla byla rozpuštěna v dimethylsulfoxidu. Koncentrace činidel byla 300 mmol.l⁻¹. Reakce byla zkoumána ve dvou variántách. Činidlo bylo použito buď v 50-ti molárním nadbytku, nebo v 200 molárním nadbytku.

Pokus s aminoaldehyddehydrogenasou byl už proveden pouze s 200 molárním nadbytkem činidel, protože předchozí test ukázal, že v obou případech došlo k vytvoření příčných vazeb. Lišila se pouze svým množstvím (u vyššího poměru bylo příčných vazeb více). Zásobní roztoky byly o koncentraci 100 mmol.l⁻¹, aby mohly být pipetovány vhodné objemy, protože enzymu bylo méně než v předchozím případě.

3.3.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

Pro vlastní rozdělení proteinů byl připraven 10% separační gel. Skládal se z 3,4 ml AA/BIS (akrylamid/*N,N'*-metylenbisakrylamid; 30% T/0,8% C (w/w)); 2,5 ml Tris-HCl pufru ($1,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH = 8,8) ; 3,8 ml H₂O; 0,1 ml 10% (w/w) SDS (dodecylsírán sodný) ; 0,01 ml TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin) a 0,05 ml 10% (w/w) APS (peroxodisírán amonný).

K zaostření separovaných proteinů procesem isotachoforézy byl použit 4% zaostřovací gel. Byl připraven z 0,65 ml AA/BIS (30% T/0,8% C (w/w)) ; 1,25 ml Tris-HCl pufru ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH = 6,8) ; 2,95 ml H₂O; 0,1 ml 10% (w/w) SDS; 0,01 ml TEMED a 0,06 ml 10% (w/w) APS. Rozměry hotového diskontinuálního systému gelů byly 8 x 10 cm, tloušťka 1 mm.

Elektroforéza probíhala za konstantního napětí 130 V, počáteční proud byl 52 mA, časem se tento snižoval až k 20 mA a separace trvala 1 hodinu a 15 minut.

Proteiny v gelech byly následně obarveny barvivem Coomassie Brilliant Blue R-250 v standardním roztoku obsahují 5% (v/v) methanol a 7% (v/v) kyselinu octovou.

Proteinové standardy o známé molekulové hmotnosti byly od firmy Bio Rad. Obsahovaly myosin ($M_r = 205 \text{ kDa}$), β -galaktosidasu ($M_r = 116 \text{ kDa}$), hovězího sérový albumin ($M_r = 66 \text{ kDa}$), ovalbumin ze slepičího vejce ($M_r = 45 \text{ kDa}$), karboanhydrasu ($M_r = 29 \text{ kDa}$), inhibitoru trypsinu ze sóji ($M_r = 20 \text{ kDa}$), lysozym ($M_r = 14,3 \text{ kDa}$) a aprotinin ($M_r = 6,5 \text{ kDa}$).

Z každého výše popsaného vzorku bylo odebráno 50 μl do nových mikrozkupek.. Ke každému alikvotu pak bylo napipetováno 50 μl Laemmliho vzorkového pufru (poměr míchání vzorku k pufru je 1:1 (v/v)). Vzorky byly potom nechány po dobu 5 minut v termobloku při 100 °C. (Rozbesky *et al.*, 2012). Zahřátím v přítomnosti detergentu dojde k vytvoření záporně nabitých proteinových micel, o jejichž migraci v podmínkách SDS-PAGE rozhoduje pouze velikost a tvar (ve vztahu k molekulové hmotnosti).

3.3.5 Štěpení proteinů v gelu rozdělených elektroforézou v polyakrylamidovém gelu

Barvením proteinů v gelu po elektroforéze se objeví proteinové pásy. Pro získání jednotlivých proteinů a jejich další zpracování se tyto pásy vyřezou z gelu skalpelem a rozkrájí na malé kousky, které se přemístí do mikrozkupek.

3.3.5.1 Zpracování gelových kousků barvených barvivem Coomassie

Gelové kousky se převrství 100 μl 0,1 mol.l⁻¹ NH₄HCO₃. Po 15 minutách se přidá rovněž 100 μl , ale tentokrát směsi mol.l⁻¹ NH₄HCO₃ a acetonitrilu, 1:1 (v/v). Po dalších 15 minutách se veškerá kapalina z mikrozkušavky odstraní (došlo k odbarvení gelu) a nahradí se 150 μl acetonitrilu. Tím dojde k vysušení a zblednutí kousků polyakrylamidového gelu. Acetonitril se po 15ti minutách odpipetuje a vysušené gelové kousky jsou připravené pro další zpracování. Krok, ve kterém se k gelovým kouskům přidává roztok 0,1 mol.l⁻¹ NH₄HCO₃ a acetonitrilu smíchaných v poměru 1:1 (v/v), je možné opakovat vícekrát, pokud by se gelové kousky neodbarvily (Shevchenko *et al.*, 1996). Je ale vždy nutné jako mezikrok zařadit inkubaci v samotném 0,1 mol.l⁻¹ NH₄HCO₃.

3.3.5.2 Redukce a alkylace proteinů

K redukci proteinů v gelu je použit 10 mmol.l⁻¹ roztok dithiotreitolu v 0,1 mol.l⁻¹ NH₄HCO₃. Ke gelovým kouskům se přidá 100 μl tohoto roztoku. Gelové kousky s dithiotreitem se nechají 30 minut inkubovat při 56 °C. Po uplynutí dané doby se odstraní veškerá kapalina z mikrozkušavky a ke gelovým kouskům se opět přidá 100 μl acetonitrilu.

Dalším krokem je alkylace peptidů. Ta se provádí pomocí jodacetamidu. Po odstranění acetonitrilu se ke gelovým kouskům napipetuje 100 μl 55 mmol.l⁻¹ roztoku jodacetamidu v 0,1 mol.l⁻¹ NH₄HCO₃. Jodacetamid se nechá působit po dobu 20 minut při pokojové teplotě ve tmě. Potom se roztok odstraní pipetou a místo něj se pro promytí do mikrozkušavky napipetuje 150 μl 0,1 mol.l⁻¹ NH₄HCO₃, který se po 15 minutách odstraní.

Na závěr se ke gelovým kouskům opět přidá 100 μl acetonitrilu, který se po 15ti minutách odstraní (Shevchenko *et al.*, 1996).

3.3.5.3 Štěpení proteinů v gelových kouscích

Vzorky proteinů v gelu byly štěpeny dvěma enzymy. Prvním z nich byl trypsin, který byl modifikován rafinosou (Šebela *et al.*, 2006), a druhým chymotrypsin. Zásobní roztok trypsinu v 0.1% (v/v) kyselině mravenčí měl koncentraci 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Zásobní roztok chymotrypsinu měl stejnou koncentraci jako zásobní roztok trypsinu a byl připraven stejně. Oba enzymy byly rozpuštěny v 50 mmol.l⁻¹ NH₄HCO₃, který byl vychlazen

na 4 °C. Výsledná koncentrace enzymů v roztocích byla 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ke gelovým kouskům vysušeným acetonitrem bylo napipetováno 50 μl roztoku enzymu. Enzymy byly ponechány, aby difundovaly do gelových kousků, jednu hodinu při 4 °C. Nízká teplota byla použita, aby nedošlo k jeho autolýze. Vlastní štěpení probíhalo přes noc v termostatu při 37 °C (Shevchenko *et al.*, 1996).

3.3.6 Odsolení peptidů v digestech pro měření na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF/TOF

3.3.6.1 Izolace peptidů z gelových kousků

Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 100 μl směsi 5% kyseliny mravenčí a acetonitrilu smíchaných v poměru 1:2 (v/v). Gelové kousky se směsí se potom nechaly inkubovat po dobu 15 minut při 37 °C za třepání na termostatované třepačce. Během této doby došlo ke kompletnímu uvolnění peptidů z gelových kousků do roztoku, který byl přepipetován do nových mikrozkušavek. Ty byly následně umístěny do vakuové odparky pro odpaření rozpouštědla (Shevchenko *et al.*, 2007).

3.3.6.2 Odpaření roztoků ve vakuové odparce

Vzorky zůstaly ve vakuové centrifugační odparce po dobu 90 minut při 45 °C. Během této doby se veškerý roztok odpařil a peptidy zůstaly usazené na dně mikrozkušavky. Přístroj byl v modu V-AL, který je naprogramován pro odpařování alkoholových rozpouštědel.

3.3.6.3 První rozpuštění peptidů v kyselině trifluoroctové

Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 15 μl 0,1% (v/v) kyseliny trifluoroctové (TFA). Vzorky byly potom zcentrifugovány na minicentrifuze. Potom byly umístěny na 15 minut do ultrazvukové lázně. Důvodem byla snaha získat co největší množství rozpuštěných peptidů. Následovala opakovaná centrifugace.

3.3.6.4 Odsolení vzorků

Nejdříve byly připraveny nové mikrozkušavky, do kterých bylo napipetováno 15 μl tzv. nepřímého elučního roztoku. Ten se skládá z 750 μl acetonitrilu, 40 μl TFA (2,5% (v/v) vodný roztok) a 210 μl deionizované vody.

K samotnému odsolení byly použity ZipTip špičky s C18 chromatografickým materiálem. Nejdříve bylo nutné každou špičku navlhčit. To bylo uděláno tak, že se přes sorbent dvakrát nasál pipetou vlhčící roztok. Od tohoto kroku až do konce procedury se do špičky nesmí dostat vzduch, aby bylo dosaženo optimální separace. Vlhčící roztok se skládá z 50% acetonitrilu a 0,1% TFA. Připravuje se z 400 μl TFA (2,5% (v/v) vodný roztok), 5 000 μl acetonitrilu a 4 600 μl destilované vody.

Po navlhčení se musí sorbent ve špičce ekvilibrovat. Postup je stejný jako u vlhčení, pouze se do špičky nasává jiný roztok a to ekvilibrační. Ten je tvořen 0,1% TFA. Opět je důležité nenasát do špičky vzduch.

Pro nanesení vzorku se špičkou opakovaně pipetováním (až 10 x) nasává a vypouští rozpuštěný vzorek peptidů, přičemž dojde k jejich zachycení na obrácené fázi. I zde, stejně jako v předchozích krocích, se do špičky nesmí dostat vzduch.

Dále se postupuje tak, že do špičky se pipetováním nasaje ekvilibrační roztok, který se následně napipetuje do odpadu. Opět je důležité nenasát do špičky vzduch. Tento krok se opakuje pětkrát.

Odsolené peptidy se uvolní do nepřímého elučního roztoku, který byl na začátku odsolování napipetován do nových mikrozkušavek, jeho desetinasobným nasáváním do špičky a následným vypouštěním.

3.3.6.5 Druhé rozpuštění vzorků v kyselině trifluoroctové

Nepřímý eluční roztok byl ze všech zkumavek odpařen. Další postup byl stejný jako v kapitole 3.3.6.2. Posléze byly peptidy rozpuštěny v 0,1% TFA. Postup zde byl stejný jako v kapitole 3.3.6.3.

3.3.7 Měření vzorků pomocí hmotnostního spektrometru

Analýza peptidů z digestů modifikovaných enzymů byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru typu MALDI-TOF nebo MALDI-TOF/TOF. Jako matrice byl použit roztok HCCA (kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová) o koncentraci 0,7 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. HCCA byla rozpuštěna ve směsi 85% acetonitrilu, 15% vody, 0,1% TFA a 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Pro MALDI-TOF přístroj byla použita 2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ HCCA ve směsi 2% (v/v) TFA: acetonitril, 1:2, v/v.

Jako kalibrační standardy byly použity peptidy bradykinin (1-7), angiotensin II, angiotensin I, substance P, bombesin, renin adrenokortikoidní hormon (štěp 1-17), adrenokortikoidní hormon (štěp 18-39) a somatostatin 28, a to podle návodu dodavatele.

Hmotnostní spektra byla změřena na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Microflex LRF20 (Bruker Daltonik, Spolková republika Německo). Byl použit pozitivní ionizační mód, kdy byly produkovány kladné ionty $[M + H]^+$. Měření probíhala za následujících napětí: akcelerační napětí bylo 18,00 kV, extrakční napětí bylo 15,40 kV, napětí na čočce bylo 9,30 kV a reflektorové napětí bylo 19,00 kV. Kompletní hmotnostní spektra byla pořizována v rozsahu m/z 0 - 6 000. Jedno výsledné (sumární) spektrum se vždy skládalo z 600 naměřených spekter. Fingerprintová peptidová spektra byla získána pomocí software flexControl 3.4 a zpracována pomocí flexAnalysis 3.4. Vyhledávání v proteinové databázi (NCBIInr) probíhalo pomocí software Biotoools a Mascot (Matrix Science: <http://matrixscience.com>). Chyba, s kterou byly touto metodou přiřazovány peptidy ze spektra k teoretickým peptidům, byla 100 ppm. Počítalo se karbamidomethylací cysteinů jako globální modifikací, oxidovaný methionin byl zvolen jako variabilní modifikace, dalším ze zvolených parametrů bylo jedno zapomenuté štěpení („missed cleavage“).

Seznam molekulových hmotností peptidů ($[M+H]^+$), které byly naměřeny, byl posléze počítačově zpracován internetovým softwarem MSX-3D, který vytipoval hmoty pravděpodobných peptidů s příčnými vazbami a jinými modifikacemi – „slepý konec“ (Heymann *et al.*, 2008).

MS/MS hmotnostní spektra byla naměřena na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF/TOF Ultraflex extreme (Bruker Daltonik, Spolková republika Německo). Byl použit pozitivní ionizační mód, kdy byly produkovány kladné ionty $[M + H]^+$. Počáteční měření MS spekter probíhala za následujících podmínek: akcelerační napětí bylo 25,04 kV, extrakční napětí bylo 22,35 kV, napětí na čočce bylo 7,71 kV, reflektorové napětí 1 bylo 26,42 kV a reflektorové napětí 2 bylo 13,55 kV. Z naměřeného spektra byly vybrány prekurzory pomocí software flexAnalysis 3.4. MS/MS spektra byla měřena s použitím software flexControl a metody pro aktivní funkci LIFT cely přístroje. Byla využita přednastavená metoda výrobce. Po ověření správného výběru prekurzorového peptidu byla naměřena spektra fragmentů, bylo akumulováno 16 000 jednotlivých spekter. Při fragmentaci PSD („post source decay“) vznikají imoniové ionty (informace o obsažených aminokyselinách), dále ionty sérií *b* a *a*, ale převážně ionty série *y*

(C-koncové fragmenty). Z iontů řady y byla pomocí software Biotoools (nástroj RapiDeNovo) určena peptidová sekvence.

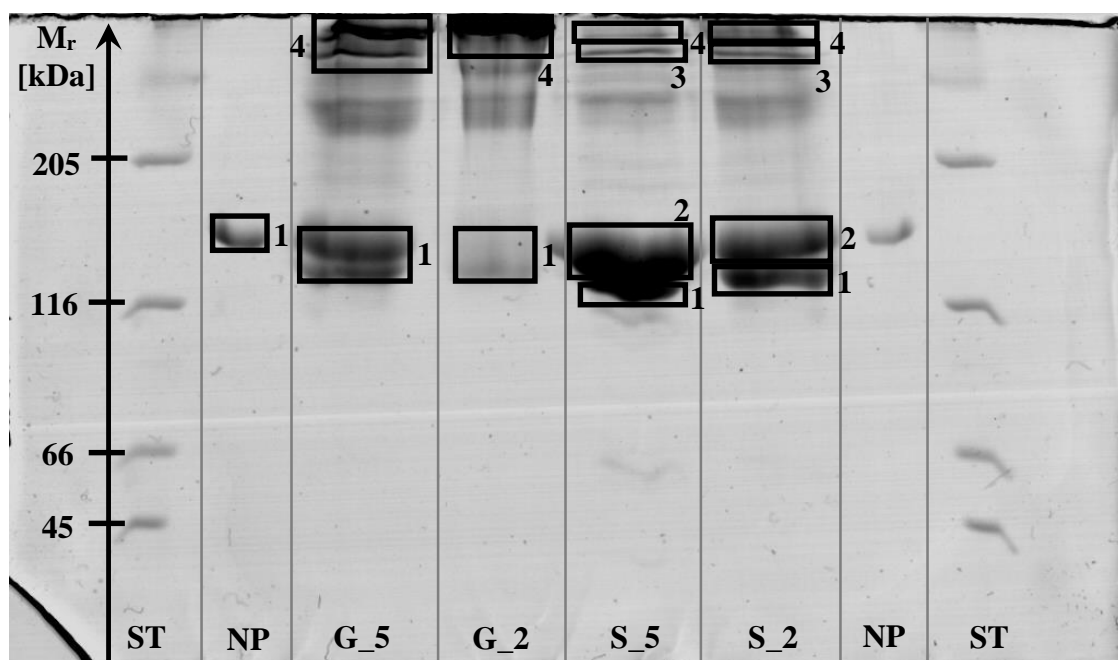
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

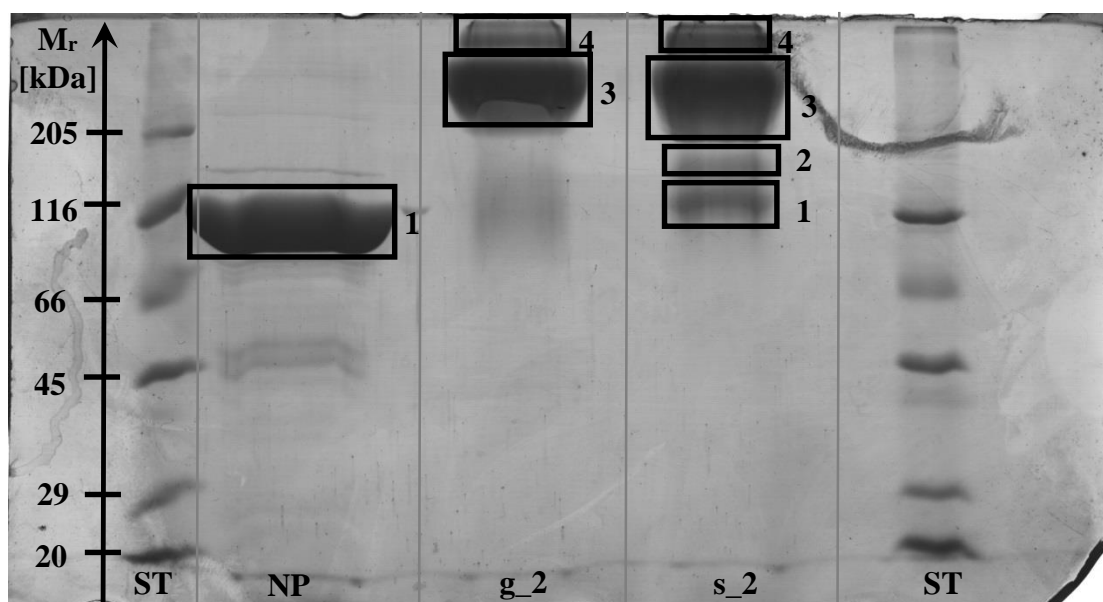
Pomocí elektroforézy byly rozděleny jednotlivé proteiny před reakcí a po ní na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli.

V pokusu s alkoholdehydrogenasou bylo elektroforézou rozděleno celkem 5 vzorků (Obr. 6). Byl to nemodifikovaný protein (NP), dva vzorky enzymu modifikovaného činidlem DSG lišící se pouze použitým molárním poměrem enzymu k činidlu (1:50 je značen G_5, 1:200 je značen G_2) a dále vzorky enzymu modifikovaného činidlem DSS taktéž s rozdílným vzájemným molárním poměrem enzymu a činidla (při 1:50 je označení S_5, při 1:200 pak G_2).

V pokusu s PsAMADH2 byly vzorky tři (Obr. 7). Elektroforeticky byl rozdělován vzorek nemodifikovaného proteinu (NP) a dva zorky modifikované činidly v molárním poměru enzymu k činidlu 1:200 (vzorek s DSG je označen g_2 a vzorek s DSS je označen s_2).



Obr. 6: POLYAKRYLAMIDOVÝ GEL po visualizaci proteinů, který dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU**. Po obou stranách gelu jsou standardy (ST), vedle nich je nemodifikovaný protein (NP). Uprostřed gelu jsou rozděleny vzorky enzymu, který byl modifikován činidly. Zleva to byla modifikace činidlem DSG (molární poměr enzymu k činidlu 1:50 je označen jako G_5, molární poměr enzymu k činidlu 1:200 je označen jako G_2) a činidlem DSS (molární poměr enzymu k činidlu 1:50 je označen jako S_5, molární poměr enzymu k činidlu 1:200 je označen jako S_2). Obdélníky označují jednotlivé proteinové pásy, které byly následně z gelu vyřezány. Jsou označeny čísly 1 až 4 přičemž platí, že čím vyšší číslo, tím vyšší odpovídající molekulová hmotnost.



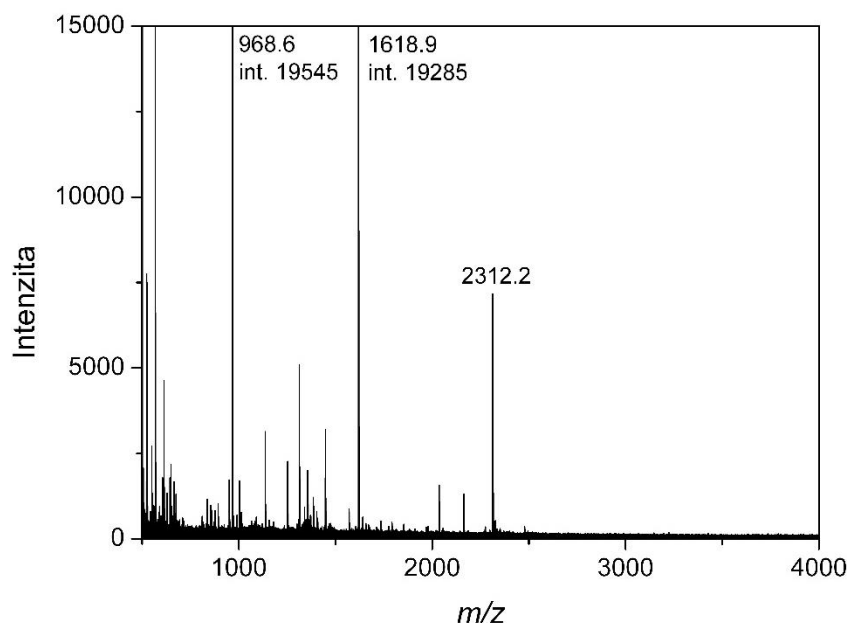
Obr. 7: POLYAKRYLAMIDOVÝ GEL pro vizualizaci proteinů, který dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU**. Po obou stranách gelu jsou standardy (ST), vedle levého standardu je nemodifikovaný protein (NP). Uprostřed gelu jsou rozděleny vzorky enzymu, který byl modifikován činidly. Zleva to byla modifikace činidlem DSG (molární poměr enzymu k činidlu 1:200 je označen jako g_2) a činidlem DSS (molární poměr enzymu k činidlu 1:200 je označen jako s_2). Obdélníky označují jednotlivé proteinové pásy, které byly následně z gelu vyřezány. Jsou označeny čísly 1 až 4 přičemž platí, že čím vyšší číslo, tím vyšší odpovídající molekulová hmotnost.

4.2 Modifikace alkoholdehydrogenasy ze *Saccharomyces cerevisiae*

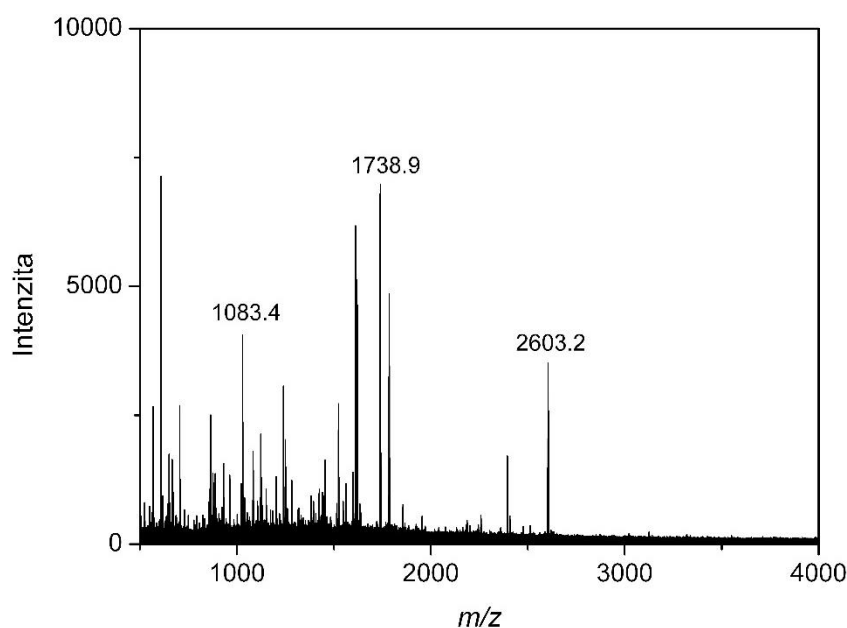
Cílem pokusu s alkoholdehydrogenasou ze *S. cerevisiae* bylo optimalizovat podmínky reakce s činidly DSG a DSS tak, aby následně byla provedena modifikace isoenzymu 2 aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu (PsAMADH2). Alkoholdehydrogenasa byla k tomuto účelu vybrána z toho důvodu, že má s PsAMADH2 podobnou prostorovou strukturu. K provedení pokusu byly zvoleny podmínky, které byly dříve publikovány v článku Jacobsen *et. al* (2006). Jediným rozdílem byla větší koncentrace solí v použitém pufru. Podle předpokladu vedl zvolený postup k tvorbě příčných vazeb v proteinu, které bylo možné lokalizovat hmotnostně spektrometrickou analýzou peptidů vzniklých proteolytickým štěpením (digescí).

Ke štěpení byly vybrány dvě proteasy - trypsin a chymotrypsin. Trypsin má z těchto dvou enzymů větší specifickou štěpení. Štěpí totiž pouze na karboxylovém konci basických aminokyselin argininu a lysinu, pokud ale za nimi v sekvenci nenásleduje prolin. Chymotrypsin je z tohoto pohledu méně specifický, protože štěpí na karboxylové straně velkých hydrofobních aminokyselin, jako jsou fenylalanin, tryptofan a tyrosin (Šípál *et al.*, 1992). Už jen tato základní fakta o funkci obou proteas napovídají, že hmotnostní spektra peptidů naměřená s příslušnými digesty se budou značně lišit. Lze

to ukázat na porovnání hmotnostních spekter nemodifikované alkoholdehydrogenasy štěpené trypsinem (Obr. 8) nebo chymotrypsinem (Obr. 9). Při jejich vzájemném srovnání je totiž spektrum získané u nemodifikované alkoholdehydrogenasy štěpené chymotrypsinem daleko bohatší na peptidy, než je tomu u spektra vycházejícího z trypsinového štěpení.



Obr. 8: Hmotnostní spektrum **NEMODIFIKOVANÉ ALKOHOLDEHYDROGENASY**, která byla štěpena **TRYPsinEM**. Bylo pořízeno na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF při pozitivní ionizaci.



Obr. 9: Hmotnostní spektrum **NEMODIFIKOVANÉ** isoenzymu **2 ALKOHOLDEHYDROGENASY**, která byla štěpena **TRYPsinEM**. Bylo pořízeno na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF při pozitivní ionizaci.

4.2.1 Štěpení modifikovaných vzorků trypsinem

Už při prvním pohledu je zřejmé, že hmotnostní spektra modifikovaných enzymů se liší od spekter nemodifikovaného proteinu (Obr. 10, Obr. 11). Vzájemným porovnáním potom lze vidět, že v hmotnostních spektrech modifikovaných proteinů některé původně pozorovatelné peptidové píky zanikají (v odpovídajících peptidech tak zjevně došlo k reakci činidel s aminokyselinovými zbytky, např. k jednoduché modifikaci – „dead end“, nebo k tvorbě příčné vazby s jiným peptidem), anebo naopak vznikají (objevují se logicky v důsledku modifikačních reakcí, jak již bylo zmíněno). Tato skutečnost je tedy potvrzením, že reakční podmínky byly zvoleny správně.

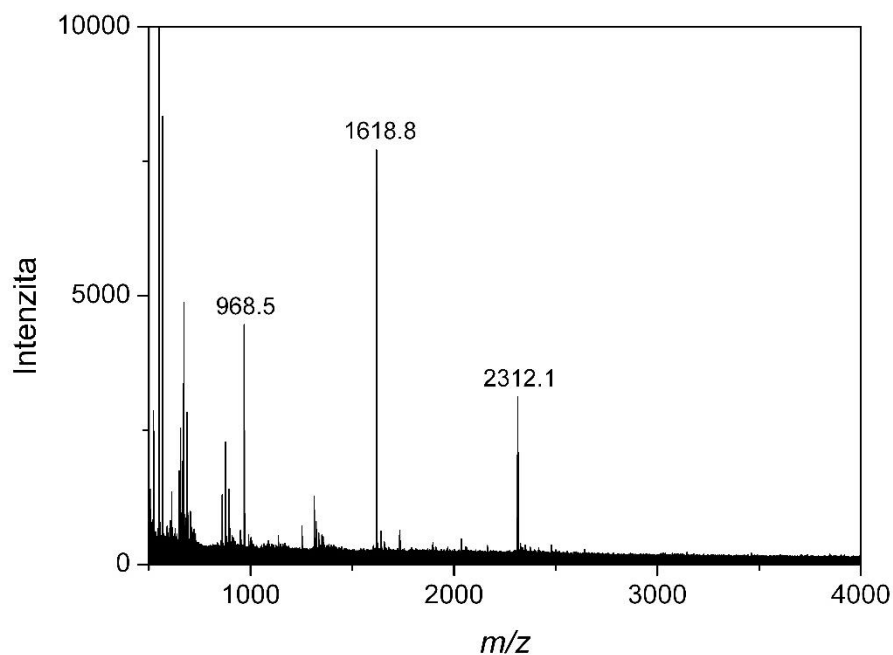
Zpracováním hmotnostních spekter (anotace píků) byl získán seznam molekulových hmotností peptidů, který byl následně vložen do internetové softwarové aplikace MSX-3D (Heymann *et al.*, 2008). Použití tohoto software umožňuje identifikovat všechny možnosti modifikačních reakcí včetně intrapeptidových a interpeptidových propojení, která mohou vzniknout. Program MSX-3D umožňuje pracovat nejen se sekvencemi, ale i s prostorovými strukturami získanými z databáze PDB (Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb>). V tom případě se u navržených propojení ukazuje i údaj o vzdálenosti propojovaných peptidů vycházející z dat krystalové struktury, který by měl odpovídat s určitou tolerancí délce činidla. Tak lze posoudit správnost návrhu.

Použité látky (DSG a DSS) patří mezi bifunkční činidla, což znamená, že mají dva reaktivní konce. Může tedy vznikat více typů peptidů modifikovaných těmito činidly.

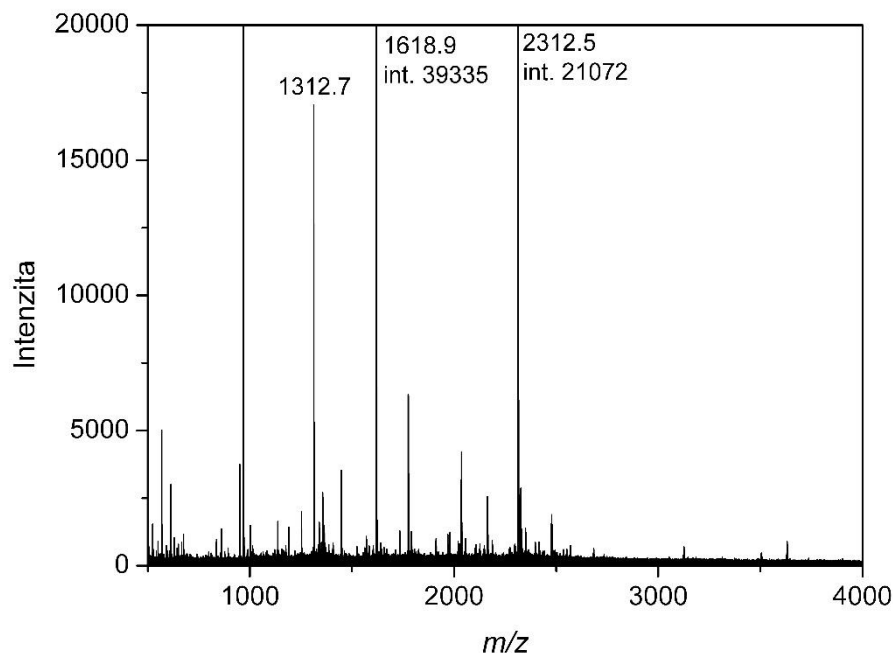
První možností je, že činidlo při reakci využije pouze jednu svou funkční skupinu pro reakci s aminokyselinovým zbytkem a druhá funkční skupina reaguje pouze s vodou. Vznikne tak modifikace, které se říká „dead end“, tedy tvorba mrtvého nebo slepého konce či zakončení. Tato varianta se vyskytuje v tom případě, že není v odpovídající vzdálenosti k dispozici další aminokyselinový zbytek pro vytvoření příčné vazby. Byla tak ve většině případů nejhojněji zastoupenou možností. Seznam peptidových molekulových hmotností, které pravděpodobně ukazují na tvorbu slepého konce, je shrnut v tabulce jak pro činidlo DSG (Tab. 2), tak pro činidlo DSS (Tab. 4).

Druhou možností, jak mohou reagovat činidla, je, že propojí dvě aminokyseliny (v případě DSG a DSS jsou to lysiny) v rámci jednoho peptidu, pokud to umožní vzdálenost blízkých lysinových zbytků. Vzniká intrapeptidová příčná vazba. Při následném štěpení modifikovaného proteinu jsou pak již lysinové zbytky na řadě míst zreagované a tudíž pro trypsinové štěpení nepřístupné. Program MSX-3D počítá i s touto

variantou, odpovídající výsledky jsou ukázány v tabulce jak pro DSG (Tab. 3), tak pro DSS (Tab. 5).



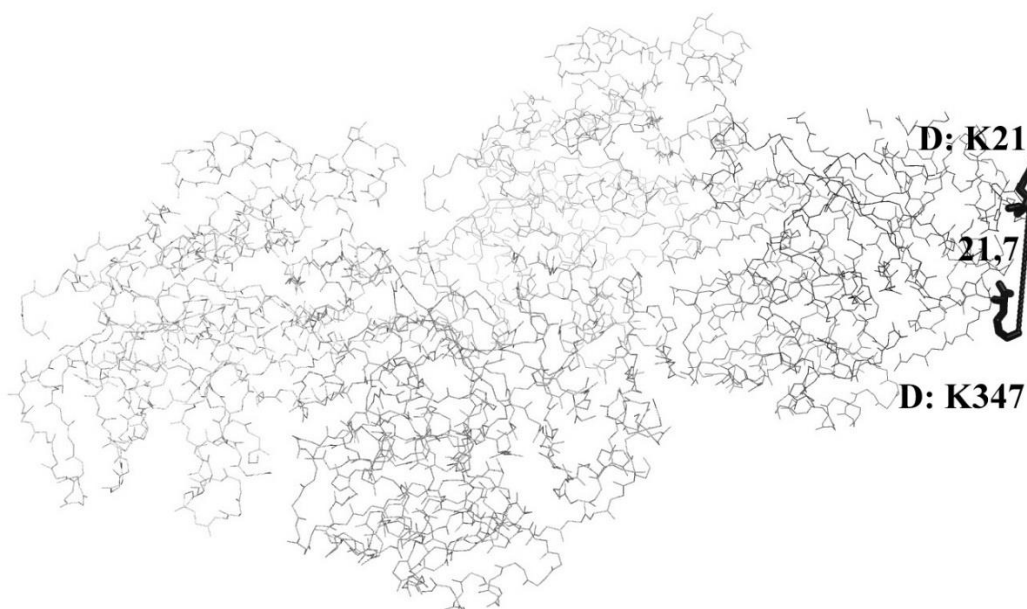
Obr. 10: Hmotnostní spektrum, které pochází z pokusu s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** modifikovanou činidlem **DSG** (vzorek G_5.1). Protein byl štěpen **TRYPsinEM**. Hmotnostní spektrum bylo pořízeno na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF při pozitivní ionizaci.



Obr. 11: Hmotnostní spektrum, které dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** modifikovanou činidlem **DSS** (vzorek S_5.1). Protein byl štěpen **TRYPsinEM**. Hmotnostní spektrum bylo pořízeno na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF při pozitivní ionizaci.

Poslední možností vytvoření příčné vazby je propojení dvou aminokyselin z jiných částí polypeptidového řetězce. Vznikají interpeptidové příčné vazby. Ve vzorku proteinu modifikovaného činidlem DSG nebyly žádné takové možnosti softwarem MSX-3D předpovězeny. Po použití činidla DSS však k takovým reakcím pravděpodobně došlo, výsledky jsou shrnuty v tabulce (Tab. 6). Jejich příkladem je peptid s m/z 3369,892, jejíž pravděpodobná příčná vazba je znázorněna na obrázku (Obr. 12).

Jelikož obě činidla (jak DSG, tak DSS) reagují s primárními aminy, mohla by teoreticky reagovat se stejnými lysinovými zbytky a vytvořit tak modifikované peptidy, které se budou navzájem lišit svou molekulovou hmotností s diferencí danou rozdílem molekulových hmotností těchto činidel. Molekulová hmotnost DSG je 326,3 Da a DSS 368,3 Da. Hmotnostní rozdíl tedy činí 42 Da. Z porovnání molekulových hmotností obou činidel rovněž vyplývá, že větší molekulovou hmotnost bude mít peptid modifikovaný činidlem DSS. Takové výsledky byly v naměřených spektrech zaznamenány. Jako příklad lze uvést m/z hodnoty 2 373,220 (Tab. 3) a 2 415,260 (Tab. 5), které obě představují stejný peptid, na který jsou ale napojena dvě různá činidla. Toto bylo pozorováno ve dvou případech u peptidů, které vážou činidlo se slepým koncem, a ve třech případech, kde pravděpodobně mohlo dojít k vytvoření příčné vazby v rámci jednoho peptidu.



Obr. 12: Obrázek ukazuje příčnou vazbu u PEPTIDU s m/z 3 369,892. Propojení Lys21 a Lys347, které se oba nacházejí v řetězci D ALKOHOLDEHYDROGENASY, je tvořeno činidlem DSS. Délka příčné vazby je vyjádřena v Å. Alkoholdehydrogenasa je tvořena čtyřmi řetězci (A, B, C, D). Ty jsou od sebe v abecedním pořadí odlišeny čtyřmi stupni šedé (nejsvětlejší je řetězec A, nejtmaší řetězec D).

Tab. 2: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Saccharomyces cerevisiae*, **DSG** a **TRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSG SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSG.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSG
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
1321,650	A	81	91	GWKIGDYAGIK	x	x	K83
	B	81	91	GWKIGDYAGIK	x	x	K83
	C	81	91	GWKIGDYAGIK	x	x	K83
	D	81	91	GWKIGDYAGIK	x	x	K83
1783,860	A	8	21	GVIFYESHGKLEYK	x	x	K17
	B	8	21	GVIFYESHGKLEYK	x	x	K17
	C	8	21	GVIFYESHGKLEYK	x	x	K17
	D	8	21	GVIFYESHGKLEYK	x	x	K17

Tab. 3: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Saccharomya cerevisiae*, **DSG** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých mělo podle softwaru MSX-3D **ČINIDLO DSG PROPOJIT LYSINY V RÁMCI JEDNOHO ŘETĚZCE**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSG (např. K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 daného řetězce), a délka příčné vazby.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSG		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
2357,220	C	315	334	SPIKVVGLSTLPEIYEKMEK	×	×	×	K318	K331	5,55
	A	315	334	SPIKVVGLSTLPEIYEKMEK	×	×	×	K318	K331	5,73
	B	315	334	SPIKVVGLSTLPEIYEKMEK	×	×	×	K318	K331	9,03
	D	315	334	SPIKVVGLSTLPEIYEKMEK	×	×	×	K318	K331	11,21
2373,220	C	315	334	SPIKVVGLSTLPEIYEKMEK	×	M332	×	K318	K331	5,55
	A	315	334	SPIKVVGLSTLPEIYEKMEK	×	M332	×	K318	K331	5,73
	B	315	334	SPIKVVGLSTLPEIYEKMEK	×	M332	×	K318	K331	9,03
	D	315	334	SPIKVVGLSTLPEIYEKMEK	×	M332	×	K318	K331	11,21
2461,280	C	212	233	SIGGEVFIDFTKEKDIVGAVLK	×	×	×	K223	K225	15,08
	A	212	233	SIGGEVFIDFTKEKDIVGAVLK	×	×	×	K223	K225	15,11
2640,360	B	8	29	GVIFYESHGKLEYKDIPVPPKPK	×	×	×	K17	K21	7,87
	A	8	29	GVIFYESHGKLEYKDIPVPPKPK	×	×	×	K17	K21	8,28
	C	8	29	GVIFYESHGKLEYKDIPVPPKPK	×	×	×	K17	K21	11,78
	D	8	29	GVIFYESHGKLEYKDIPVPPKPK	×	×	×	K17	K21	13,68

Tab. 3: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Saccharomyces cerevisiae*, **DSG** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých mělo podle softwaru MSX-3D **ČINIDLO DSG PROPOJIT LYSINY V RÁMCI JEDNOHO ŘETĚZCE**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSG (např. K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 daného řetězce), a délka příčné vazby. (**POKRÁČOVÁNÍ**)

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence		Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSG		Vzdálenost [Å]	
		Začátek	Konec				Aminokyseliny	K ₁		K ₂
3460,740	C	224	257	EKDIVGAVLKATDGGAHGVINVS SEAAIEASTR	×	×	×	K225	K233	8,60
	B	224	257	EKDIVGAVLKATDGGAHGVINVS SEAAIEASTR	×	×	×	K225	K233	11,48
	A	224	257	EKDIVGAVLKATDGGAHGVINVS SEAAIEASTR	×	×	×	K225	K233	13,57
	D	224	257	EKDIVGAVLKATDGGAHGVINVS SEAAIEASTR	×	×	×	K225	K233	13,72

Tab. 4: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Saccharomyces cerevisiae*, **DSS** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSS SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSS.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSS
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
1363,710	A	81	91	GWKIGDYAGIK	x	x	K83
	B	81	91	GWKIGDYAGIK	x	x	K83
	C	81	91	GWKIGDYAGIK	x	x	K83
	D	81	91	GWKIGDYAGIK	x	x	K83
1582,870	A	18	29	LEYKDIPVPPKPK	x	x	K21 K27
	B	18	29	LEYKDIPVPPKPK	x	x	K21 K27
	C	18	29	LEYKDIPVPPKPK	x	x	K21 K27
	D	18	29	LEYKDIPVPPKPK	x	x	K21 K27
1774,880	A	197	211	VLGIDGGEGKEELFR	x	x	K206
	B	197	211	VLGIDGGEGKEELFR	x	x	K206
	C	197	211	VLGIDGGEGKEELFR	x	x	K206
	D	197	211	VLGIDGGEGKEELFR	x	x	K206

Tab. 4: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Saccharomyces cerevisiae*, **DSS** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSS SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSS. **(POKRAČOVÁNÍ)**

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSS
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
1825,900	A	8	21	GVIFYESHGKLEYK	×	×	K17
	B	8	21	GVIFYESHGKLEYK	×	×	K17
	C	8	21	GVIFYESHGKLEYK	×	×	K17
	D	8	21	GVIFYESHGKLEYK	×	×	K17
2369,120	A	192	211	AMGYRVLGIDGGEGKEELFR	×	M193	K206
	B	192	211	AMGYRVLGIDGGEGKEELFR	×	M193	K206
	C	192	211	AMGYRVLGIDGGEGKEELFR	×	M193	K206
	D	192	211	AMGYRVLGIDGGEGKEELFR	×	M193	K206

Tab. 5: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Saccharomyces cerevisiae*, **DSS** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých mělo podle softwaru MSX-3D **ČINIDLO DSS PROPOJIT LYSINY V RÁMCI JEDNOHO ŘETĚZCE**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSS (např. K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 daného řetězce), a délka příčné vazby.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSS		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
2415,260	C	315	334	SPIKVVGLSTLPEIYEKMEK	×	M332	×	K318	K331	5,55
	A	315	334	SPIKVVGLSTLPEIYEKMEK	×	M332	×	K318	K331	5,73
	B	315	334	SPIKVVGLSTLPEIYEKMEK	×	M332	×	K318	K331	9,03
	D	315	334	SPIKVVGLSTLPEIYEKMEK	×	M332	×	K318	K331	11,21
2682,400	B	8	29	GVIFYESHGKLEYKDIPVPKPK	×	×	×	K17	K21	7,87
								K21	K27	17,09
	A	8	29	GVIFYESHGKLEYKDIPVPKPK	×	×	×	K17	K21	8,28
								K21	K27	22,95
	C	8	29	GVIFYESHGKLEYKDIPVPKPK	×	×	×	K17	K21	11,78
								K21	K27	18,04
	D	8	29	GVIFYESHGKLEYKDIPVPKPK	×	×	×	K17	K21	13,68
								K21	K27	19,98

Tab. 5: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Saccharomyces cerevisiae*, **DSS** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých mělo podle softwaru MSX-3D **ČINIDLO DSS PROPOJIT LYSINY V RÁMCI JEDNOHO ŘETĚZCE**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSS (např. K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 daného řetězce), a délka příčné vazby. (**POKRÁČOVÁNÍ**)

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence		Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSS		Vzdálenost [Å]	
		Začátek	Konec				Aminokyseliny	K ₁		K ₂
3502,690	C	224	257	EKDIVGAVLKATDGGAHGVINVS SEAAIEASTR	×	×	×	K225	K233	8,60
	B	224	257	EKDIVGAVLKATDGGAHGVINVS SEAAIEASTR	×	×	×	K225	K233	11,48
	A	224	257	EKDIVGAVLKATDGGAHGVINVS SEAAIEASTR	×	×	×	K225	K233	13,57
	D	224	257	EKDIVGAVLKATDGGAHGVINVS SEAAIEASTR	×	×	×	K225	K233	1372

Tab. 6: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Saccharomyces cerevisiae*, **DSS** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých podle softwaru MSX-3D pravděpodobně došlo k **VYTVORENÍ PŘÍČNÉ VAZBY ČINIDLEM DSS**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSS (např. A: K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 řetězce A), a délka příčné vazby.

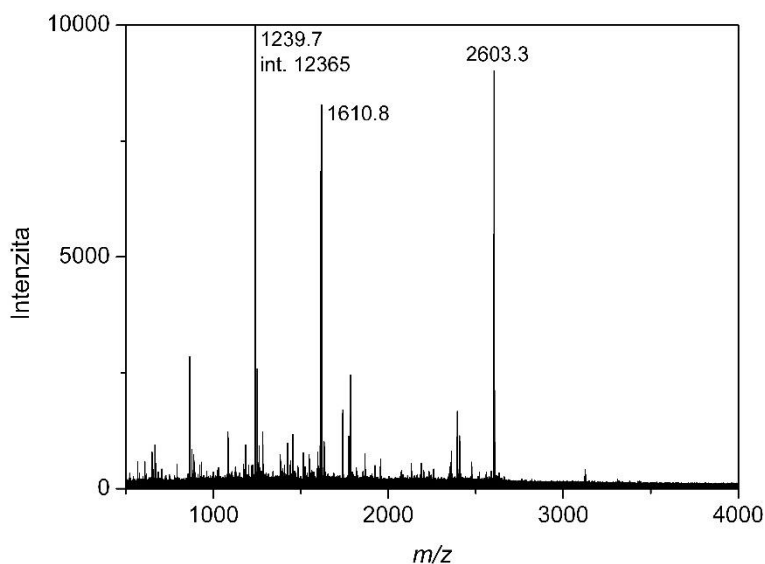
<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSS		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
2597,400	C	197	211	VLGIDGGEGKEELFR	x	x	x			
	C	311	318	GLVKSPIK	x	x	x	C: K206	C: K314	18,11
	B	197	211	VLGIDGGEGKEELFR	x	x	x			
	B	311	318	GLVKSPIK	x	x	x	B: K206	B: K314	18,44
	D	197	211	VLGIDGGEGKEELFR	x	x	x			
	D	311	318	GLVKSPIK	x	x	x	D: K206	D: K314	19,17
	A	197	211	VLGIDGGEGKEELFR	x	x	x			
	A	311	318	GLVKSPIK	x	x	x	A: K206	A: K314	20,78
3369,892	D	18	38	LEYKDIPVPKPKANELLINVK	x	x	x			
	D	341	347	YVVDTSK	x	x	x	D: K21	D: K347	21,73
3628,800	C	197	211	VLGIDGGEGKEELFR	x	x	x			
	C	315	331	SPIKVVGLSTLPEIYEK	x	x	x	C: K206	C: K318	11,25
	A	197	211	VLGIDGGEGKEELFR	x	x	x			
	A	315	331	SPIKVVGLSTLPEIYEK	x	x	x	A: K206	A: K318	11,62

Tab. 6: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Saccharomyces cerevisiae*, **DSS** a **TRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých podle softwaru MSX-3D pravděpodobně došlo k **VYTVORENÍ PŘÍČNÉ VAZBY ČINIDLEM DSS**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSS (např. A: K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 řetězce A), a délka příčné vazby. **(POKRAČOVÁNÍ)**

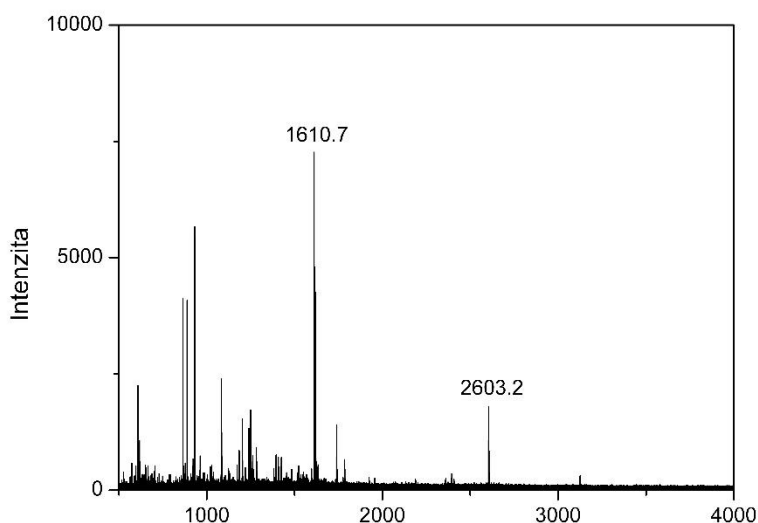
<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSS		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
3628,800	D	197	211	VLGIDGGEGKEELFR	×	×	×			
	D	315	331	SPIKVVGLSTLPEIYEK	×	×	×	D: K206	D: K318	12,51
	B	197	211	VLGIDGGEGKEELFR	×	×	×			
	B	315	331	SPIKVVGLSTLPEIYEK	×	×	×	D: K206	D: K318	13,53

4.2.2 Štěpení modifikovaných vzorků chymotrypsinem

I při porovnání hmotnostních spekter peptidů z enzymu modifikovaného činidly DSG (Obr. 14) a DSS (Obr. 13) a štěpeného chymotrypsinem jsou vidět rozdíly na první pohled. I zde, stejně jako u vzorků získaných trypsinovým štěpením, některé hmotnostní signály zanikají, nebo naopak vznikají.



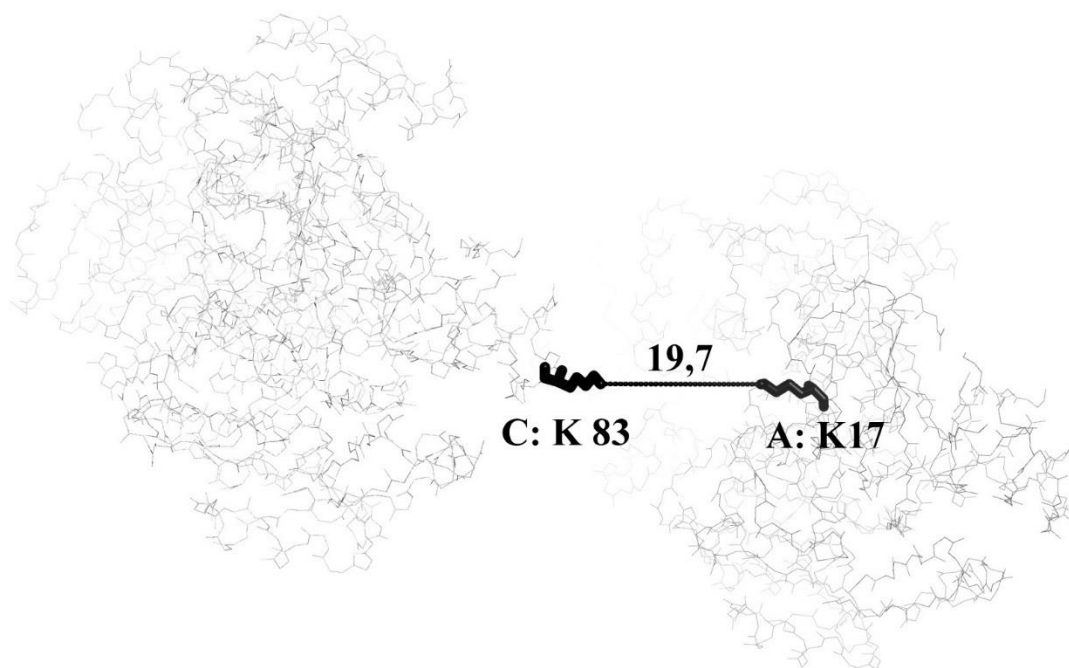
Obr. 14: Hmotnostní spektrum, které je výsledkem pokusu s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** modifikovanou činidlem **DSS** (vzorek S_5.2). Protein byl štěpen **CHYMOTRYPSINEM**. Hmotnostní spektrum bylo pořízeno na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF při pozitivní ionizaci.



Obr. 13: Hmotnostní spektrum dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** modifikovanou činidlem **DSG** (vzorek G_5.4). Protein byl štěpen **CHYMOTRYPSINEM**. Hmotnostní spektrum bylo pořízeno na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF při pozitivní ionizaci.

I když bylo softwarem MSX-3D předpovězeno mnohem méně modifikovaných peptidů, než tomu bylo u vzorků štěpených trypsinem, tak i zde bylo možné najít všechny varianty modifikace. Peptidy s navázanými činidly se slepým koncem byly nalezeny u vzorků modifikovaných oběma činidly a jsou opět shrnuty v tabulkách (Tab. 7, Tab. 9). Peptidy s činidlem navázaným v rámci jednoho řetězce bohužel nebyly zjištěny u vzorku modifikovaného pomocí DSS, ale jen u vzorku modifikovaného pomocí DSG (Tab. 8). U interpeptidových příčných vazeb se tato situace zase obrátila, protože tentokrát nebyly předpovězeny žádné u proteinu modifikovaného pomocí DSG. Hodnoty m/z peptidů, které zřejmě obsahují tento typ příčných vazeb, jsou shrnuty v tabulce (Tab. 10). Interpeptid potom znázorňuje i obrázek níže (Obr. 15). Je to peptid o m/z 2 406,290, což je mezi detekovanými peptidy nejvyšší m/z .

Stejně jako u enzymu štěpeného trypsinem, i u enzymu štěpeného chymotrypsinem bylo v hmotnostních spektrech pozorováno, že obě činidla reagují se stejným postranním zbytkem.. Jedná se o peptidy, na kterých je napojeno činidlo se slepým koncem, a poskytující signály s m/z 1 732,790 u DSG (Tab. 7) a 1 775,010 u DSS (Tab. 9).



Obr. 15: Obrázek ukazuje příčnou vazbu u PEPTIDU s m/z 2 406,290. Zde jsou činidlem DSS propojeny Lys17 z řetězce A a Lys83 z řetězce C ALKOHOLDEHYDROGENASY. Délka příčné vazby je vyjádřena v Å. Alkoholdehydrogenasa je tvořena čtyřmi řetězci (A, B, C, D). Ty jsou od sebe v abecedním pořadí odlišeny čtyřmi stupni šedé (nejsvětlejší je řetězec A, nejtmavší řetězec D).

Tab. 7: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Saccharomyces cerevisiae*, **DSG** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSG SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSG.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSG
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
1264,610	A	83	92	KIGDYAGIKW	×	×	K83 K91
	B	83	92	KIGDYAGIKW	×	×	K83 K91
	C	83	92	KIGDYAGIKW	×	×	K83 K91
	D	83	92	KIGDYAGIKW	×	×	K83 K91
1567,710	A	330	341	EKMEKGQIVGRY	×	M332	K331 K334
	B	330	341	EKMEKGQIVGRY	×	M332	K331 K334
	C	330	341	EKMEKGQIVGRY	×	M332	K331 K334
	D	330	341	EKMEKGQIVGRY	×	M332	K331 K334

Tab. 7: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Saccharomyces cerevisiae*, **DSG** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSG SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSG. **(POKRAČOVÁNÍ)**

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSG
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
1732,790	A	196	210	RVLGIDGGEGKEELF	×	×	K206
	A	196	210	RVLGIDGGEGKEELF	×	×	K206
	A	196	210	RVLGIDGGEGKEELF	×	×	K206
	A	196	210	RVLGIDGGEGKEELF	×	×	K206

Tab. 8: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Saccharomyces cerevisiae*, **DSG** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých mělo podle softwaru MSX-3D **ČINIDLO DSG PROPOJIT LYSINY V RÁMCI JEDNOHO ŘETĚZCE**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSG (např. K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 daného řetězce), a délka příčné vazby.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSG		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
1549,680	C	330	341	EKMEKGQIVGRY	×	M332	×	K331	K334	8,68
	A	330	341	EKMEKGQIVGRY	×	M332	×	K331	K334	9,05
	D	330	341	EKMEKGQIVGRY	×	M332	×	K331	K334	10,47
	B	330	341	EKMEKGQIVGRY	×	M332	×	K331	K334	11,07

Tab. 9: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Saccharomyces cerevisiae*, **DSS** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSS SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSS.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSS
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
1775,010	A	196	210	RVLGIDGGEGKEELF	×	×	K206
	B	196	210	RVLGIDGGEGKEELF	×	×	K206
	C	196	210	RVLGIDGGEGKEELF	×	×	K206
	D	196	210	RVLGIDGGEGKEELF	×	×	K206

Tab. 10: Tabulka dokumentuje pokus s **ALKOHOLDEHYDROGENASOU** ze *Sacharomyces cerevisiae*, **DSS** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých podle softwaru MSX-3D pravděpodobně došlo k **VYTVOŘENÍ PŘÍČNÉ VAZBY ČINIDLEM DSS**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSS (např. A: K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 řetězce A), a délka příčné vazby.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSS		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
2186,060	B	330	341	EKMEKGQIVGRY	×	M332	×			
	D	83	87	KIGDY	×	×	×	B: K334	D: K83	22,21
2406,290	A	13	20	ESHGKLEY	×	×	×			
	C	83	92	KIGDYAGIKW	×	×	T0: K91	A: K17	C: K83	19,68

* T0 - na lysinu, který je uveden za dvojtečkou, je připojeno činidlo DSS se slepým koncem

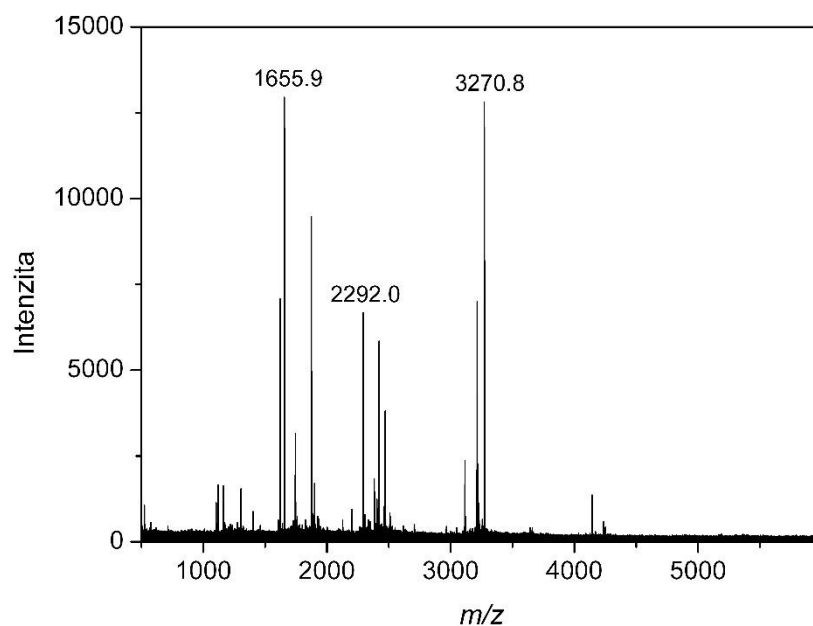
4.3 Modifikace izoenzymu 2 aminoaldehyddehydrogenasy z hrachu

Z optimalizace podmínek tedy vyplynulo, že při takto vysokých molárních poměrech enzymu a činidla (1:50, 1:200), jako byly použity u alkoholdehydrogenasy ze *S. cerevisiae*, vždy dojde k vytvoření určitého počtu příčných vazeb. Na základě této úvahy byl pro pokusy s PsAMADH2 zvolen vyšší z poměrů (1:200), aby příčných vazeb vzniklo co možná nejvíce.

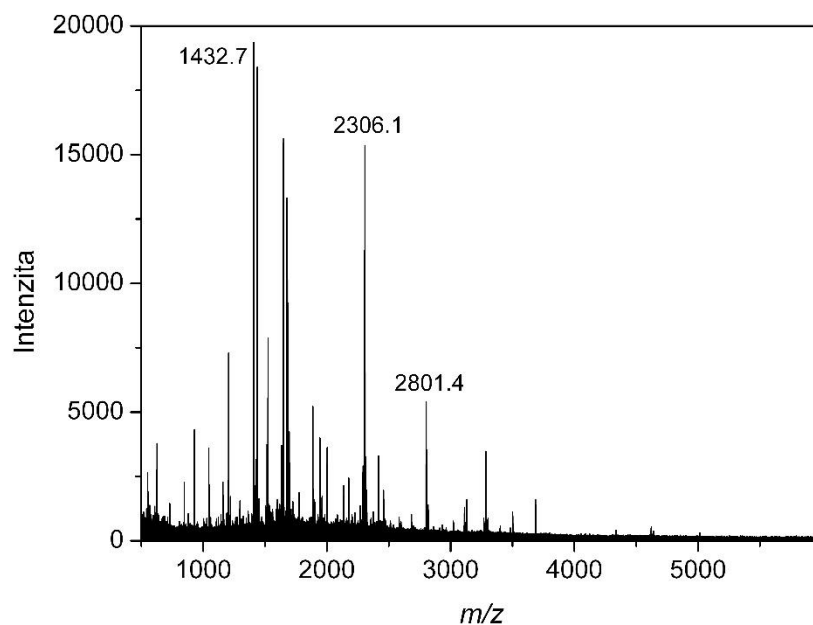
Kdybychom opět srovnali hmotnostní spektra nemodifikovaného proteinu štěpeného trypsinem (Obr. 16) a chymotrypsinem (Obr. 17), zjistili bychom, že stejně jako u alkoholdehydrogenasy je hmotnostní spektrum po chymotrypsinovém štěpení mnohem bohatší na peptidy než spektrum znázorňující štěpení trypsinem.

Naprostá většina příčných vazeb, které byly detekovány, se nachází na povrchu enzymu nebo na rozhraní jeho podjednotek. Tento efekt je dán tím, že tato místa jsou pro činidla mnohem lépe přístupná než místa uvnitř struktury.

Hmotnostní spektra peptidů vzniklých štěpením modifikované PsAMADH2 po reakci s DSS (Obr. 19, Obr. 22) použitím obou proteas jsou při vzájemném porovnání bohatší na množství signálů než v případě výsledků s DSG (Obr. 18, Obr. 21).

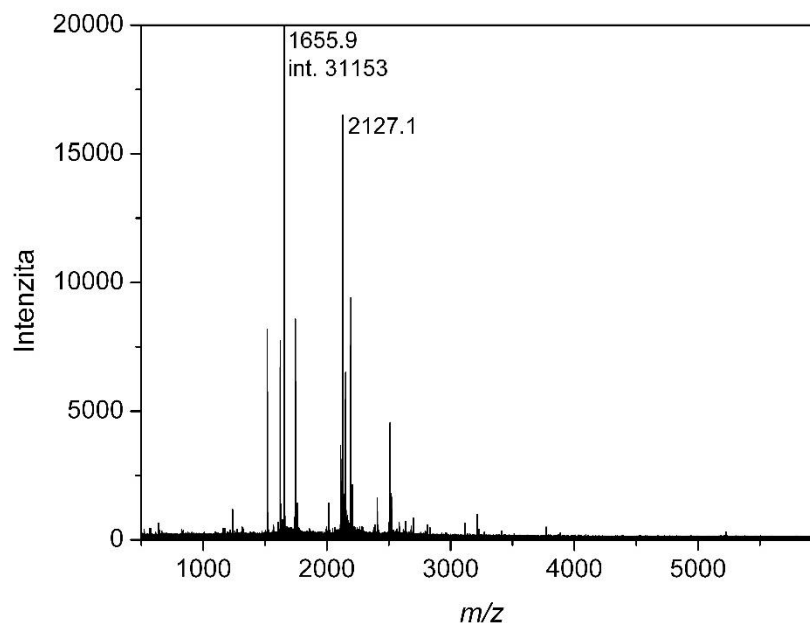


Obr. 16: Hmotnostní spektrum **NEMODIFIKOVANÉHO** isoenzymu 2 **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASY** z *Pisum sativum*, který byla štěpen **TRYPsinEM**. Bylo pořízeno na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF při pozitivní ionizaci.

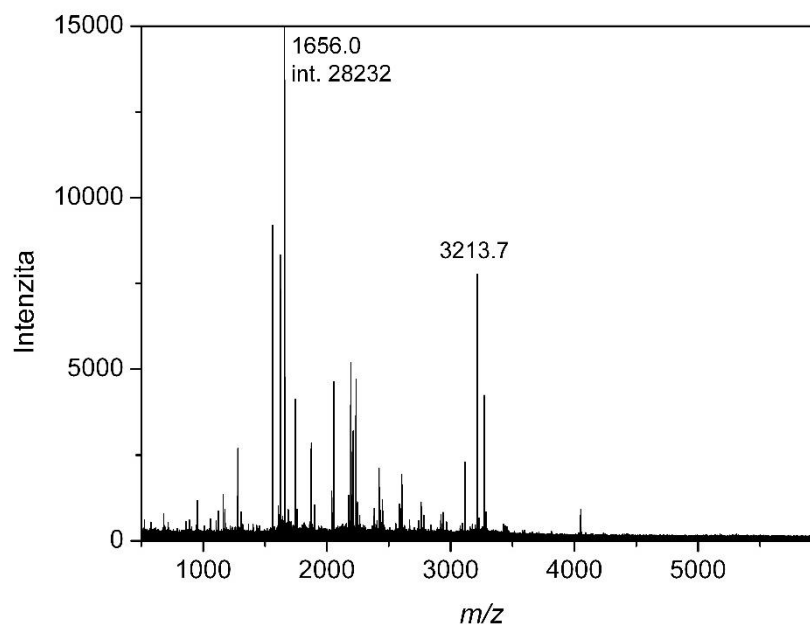


Obr. 17: Hmotnostní spektrum **NEMODIFIKOVANÉHO** isoenzymu 2 **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASY** z *Pisum sativum*, který byla štěpen **CHYMOTRYPsinEM**. Bylo pořízeno na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF při pozitivní ionizaci.

4.3.1 Štěpení trypsinem



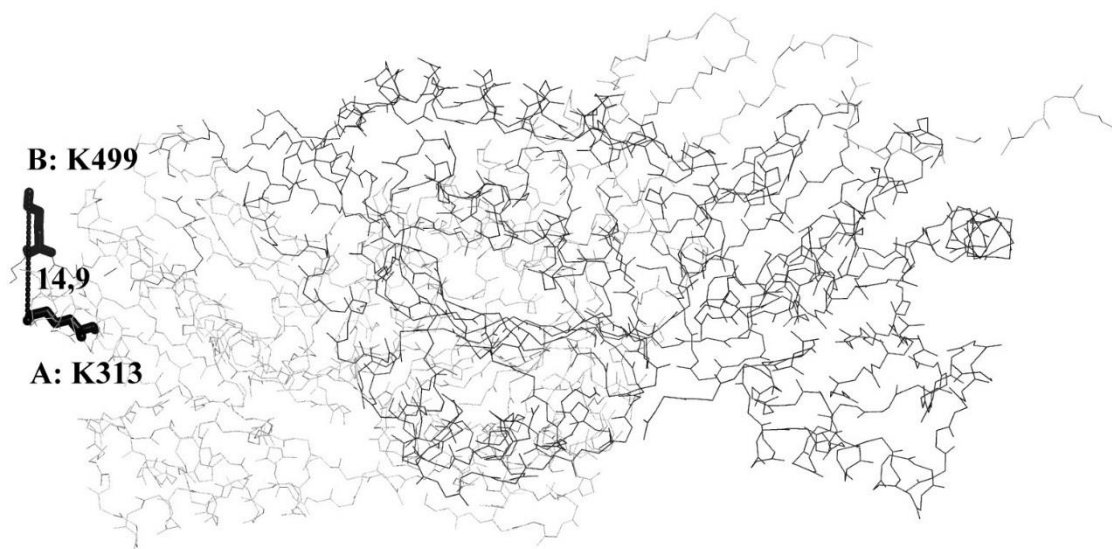
Obr. 18: Hmotnostní spektrum, které dokumentuje pokus s AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU modifikovanou činidlem DSG (vzorek g_2.3). Protein byl štěpen TRYPSINEM. Hmotnostní spektrum bylo pořízeno na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF při pozitivní ionizaci.



Obr. 19: Hmotnostní spektrum, které dokumentuje pokus s AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU modifikovanou činidlem DSS (vzorek s_2.3). Protein byl štěpen TRYPSINEM. Hmotnostní spektrum bylo pořízeno na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF při pozitivní ionizaci.

V tomto pokusu byly detekovány všechny typy reakce činidel, jak byly popsány u alkoholdehydrogenasy. Nejvíce bylo zastoupeno navázání činidla na jednu reakční místo a vytvoření slepého konce. U DSG bylo takových peptidů 10 (Tab. 11) a u DSS 19 (Tab. 14). Ostatních případů navázání činidel už bylo podstatně méně. Případy, kdy činidlo propojovalo lysinové zbytky v jednom peptidu, byly nalezeny vždy 4 pro obě činidla (Tab. 12, Tab. 15). Interpeptidové příčné vazby se vyskytovaly ve stejné četnosti. Tyto výsledky jsou rovněž shrnuty v tabulkách (Tab. 13, Tab. 16). Jako grafická ukázka interpeptidu byl zvolen peptid o nejvyšším poměru m/z : 3 771,150 (Obr. 20).

Rovněž zde lze porovnáním spekter zjistit, že obě činidla mají stejný cíl, kterým je primární aminoskupina lysinu. Jak už bylo popsáno u štěpení modifikované alkoholdehydrogenasy, činidla se vážou na lysinové zbytky v identických peptidech. Porovnáním spekter byly identifikovány hned dva takové případy. Prvním je peptid, který nese činidlo se slepým koncem. Ve spektru enzymu modifikovaného pomocí DSG ho představuje signál s m/z 2 012,993 (Tab. 11) a ve spektru enzymu modifikovaného pomocí DSS zase signál s m/z 2 055,193 (Tab. 14). Druhým zjištěným případem jsou peptidové signály s m/z 1 237,687 u vzorku s DSG (Tab. 12) a 1 279,820 u vzorku s DSS (Tab. 15), které oba představují jeden peptid s činidlem, které je na něm navázáno oběma svými konci.



Obr. 20: Obrázek znázorňuje příčnou vazbu u peptidu s m/z **3 771,150**. Činidlo **DSG** v tomto interpeptidu spojuje Lys313 v řetězci A a Lys499 v řetězci B **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASY**. Hmota byla detekována při štěpení **TRYPSINEM**. Délka příčné vazby je vyjádřena v Å. Řetězec A je světle šedý a řetězec B tmavě šedý.

Tab. 11: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSG** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSG SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSG.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSG
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
1517,694	A	58	71	NKGADWATASGAVR	×	×	K59
	B	58	71	NKGADWATASGAVR	×	×	K59
1644,715	A	317	329	NIKISDPLEEGCR	C328	×	K319
	B	317	329	NIKISDPLEEGCR	C328	×	K319
1744,705	A	58	73	NKGADWATASGAVRAR	×	×	K59
	B	58	73	NKGADWATASGAVRAR	×	×	K59
1856,869	A	6	20	QLFINGDWKAPVLNK	×	×	K14
	B	6	20	QLFINGDWKAPVLNK	×	×	K14
2012,993	A	6	21	QLFINGDWKAPVLNKR	×	×	K14
							K20
	B	6	21	QLFINGDWKAPVLNKR	×	×	K14
							K20
2127,052	A	6	21	QLFINGDWKAPVLNKR	×	×	K14, K20
	B	6	21	QLFINGDWKAPVLNKR	×	×	K14, K20

Tab. 11: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSG** a **TRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSG SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSG. **(POKRAČOVÁNÍ)**

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSG
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
2176,858	A	58	76	NKGADWATASGAVRARYLR	×	×	K59
	B	58	76	NKGADWATASGAVRARYLR	×	×	K59
2282,142	A	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	K130, K141
	B	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	K130, K141
3771,150	A	22	57	IPVINPATQNIIGDIPAATKEDVDVAVAAKTALTR	×	×	K41 K52
	B	22	57	IPVINPATQNIIGDIPAATKEDVDVAVAAKTALTR	×	×	K41 K52
3885,231	A	22	57	IPVINPATQNIIGDIPAATKEDVDVAVAAKTALTR	×	×	K41, K52
	B	22	57	IPVINPATQNIIGDIPAATKEDVDVAVAAKTALTR	×	×	K41, K52

Tab. 12: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSG** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých mělo podle softwaru MSX-3D **ČINIDLO DSG PROPOJIT LYSINY V RÁMCI JEDNOHO ŘETĚZCE**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSG (např. K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 daného řetězce), a délka příčné vazby.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny *	DSG		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
1237,687	A	311	319	IVKWKIKNIK	×	×	×	K313	K316	10,52
	B	311	319	IVKWKIKNIK	×	×	×	K313	K316	9,90
2150,085	A	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	×	K130	K141	7,93
	B	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	×	K130	K141	11,01
2166,027	A	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	M137	×	K130	K141	7,93
	B	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	M137	×	K130	K141	11,01
2508,257	A	311	329	IVKWKIKNIKISDPLEEGCR	C328	×	T0: K319	K313	K316	10,52
	B	311	329	IVKWKIKNIKISDPLEEGCR	C328	×	T0: K319	K313	K316	9,90

* T0 - na lysinu, který je uveden za dvojtečkou, je připojeno činidlo DSS se slepým koncem

Tab. 13: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSG** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých podle softwaru MSX-3D pravděpodobně došlo k **VYTVOŘENÍ PŘÍČNÉ VAZBY ČINIDLEM DSG**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSG (např. A: K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 řetězce A), a délka příčné vazby.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny*	DSG		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
2192,086	A	433	438	VTKAFK	×	×	×			
	B	58	71	NKGADWATASGAVR	×	×	×	A: K435	B: K59	11,91
	A	58	71	NKGADWATASGAVR	×	×	×			
	B	433	438	VTKAFK	×	×	×	A: K59	B: K435	12,36
2956,423	A	433	438	VTKAFK	×	×	×			
	B	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	T0: K141	A: K435	B: K130	8,89
	A	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	T0: K141			
	B	433	438	VTKAFK	×	×	×	A: K130	B: K435	8,82
						T0: K130	A: K141	B: K435	14,41	
3411,848	A	433	438	VTKAFK	×	×	×			
	B	125	146	LDARQKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	T0: K141	A: K435	B: K130	8,89
	A	125	146	LDARQKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	T0: K141			
	B	433	438	VTKAFK	×	×	×	A: K130	B: K435	8,82
						T0: K130	A: K141	B: K435	14,41	

Tab. 13: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSG** a **TRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých podle softwaru MSX-3D pravděpodobně došlo k **VYTVOŘENÍ PŘÍČNÉ VAZBY ČINIDLEM DSG**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSG (např. A: K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 řetězce A), a délka příčné vazby. **(POKRAČOVÁNÍ)**

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny*	DSG		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
3771,150	A	311	319	IVKWKIKNIK	×	×	T0: K316			
	B	481	500	QVTQYISEEPWGWYQPPAKL	×	×	×	A: K313	B: K499	14,90
	A	481	500	QVTQYISEEPWGWYQPPAKL	×	×	×			
	B	311	319	IVKWKIKNIK	×	×	T0: K316	A: K499	B: K313	12,63

* T0 - na lysinu, který je uveden za dvojtečkou, je připojeno činidlo DSS se slepým koncem

Tab. 14: Tabulka dokumentuje pokus s **AMMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSS SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSS.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSS
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
942,553	A	311	316	IVKWIK	×	×	K313
	B	311	316	IVKWIK	×	×	K313
953,576	A	15	21	APVLNKR	×	×	K20
	B	15	21	APVLNKR	×	×	K20
1175,571	A	342	350	ILKFVSNK	×	×	K344
	B	342	350	ILKFVSNK	×	×	K344
1453,773	A	311	319	IVKWIKNIK	×	×	K313, K316
	B	311	319	IVKWIKNIK	×	×	K313, K316
1559,837	A	58	71	NKGADWATASGAVR	×	×	K59
	B	58	71	NKGADWATASGAVR	×	×	K59
1686,873	A	317	329	NIKISDPLEEGCR	C328	×	K319
	B	317	329	NIKISDPLEEGCR	C328	×	K319
1815,981	A	330	344	LGPVVSEGQYEKILK	×	×	K341
	B	330	344	LGPVVSEGQYEKILK	×	×	K341

Tab. 14: Tabulka dokumentuje pokus s **AMMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSS SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSS. **(POKRAČOVÁNÍ)**

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSS
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
1899,026	A	6	20	QLFINGDWKAPVLNK	×	×	K14
	B	6	20	QLFINGDWKAPVLNK	×	×	K14
2037,148	A	351	368	SEGATILTGGSRPEHLKK	×	×	K367
	B	351	368	SEGATILTGGSRPEHLKK	×	×	K367
2055,193	A	6	21	QLFINGDWKAPVLNKR	×	×	K14 K20
	B	6	21	QLFINGDWKAPVLNKR	×	×	K14 K20
2211,280	A	6	21	QLFINGDWKAPVLNKR	×	×	K14, K20
	B	6	21	QLFINGDWKAPVLNKR	×	×	K14, K20
2366,364	A	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	K130, K141
	B	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	K130, K141
2382,300	A	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	M137	K130, K141
	B	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	M137	K130, K141

Tab. 14: Tabulka dokumentuje pokus s **AMMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSS SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSS. **(POKRAČOVÁNÍ)**

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSS
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
2462,278	A	330	350	LGPVVSEGGQYKILKLFVSNK	×	×	K341 K344
	B	330	350	LGPVVSEGGQYKILKLFVSNK	×	×	K341 K344
2555,420	A	345	367	FVSNKSEGATILTGGSRPEHLK	×	×	K350
	B	345	367	FVSNKSEGATILTGGSRPEHLK	×	×	K350
2666,473	A	368	388	KGFFIEPTIITDVTTNMQIWR	×	×	K368
	B	368	388	KGFFIEPTIITDVTTNMQIWR	×	×	K368
2839,638	A	345	368	FVSNKSEGATILTGGSRPEHLKK	×	×	K350, K367
	B	345	368	FVSNKSEGATILTGGSRPEHLKK	×	×	K350, K367
3270,990	A	22	52	IPVINPATQNIIGDIPAATKEDVDVAVAAAK	×	×	K41
	B	22	52	IPVINPATQNIIGDIPAATKEDVDVAVAAAK	×	×	K41

Tab. 14: Tabulka dokumentuje pokus s **AMMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **TRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSS SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSS. **(POKRAČOVÁNÍ)**

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSS
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
4049,721	A	15	52	APVLNKRIPVINPATQNIIGDIPAATKEDVDVAVAA AK	×	×	K20 K41
	B	15	52	APVLNKRIPVINPATQNIIGDIPAATKEDVDVAVAA AK	×	×	K20 K41

Tab. 15: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **TRYPsinEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých mělo podle softwaru MSX-3D **ČINIDLO DSS PROPOJIT LYSINY V RÁMCI JEDNOHO ŘETĚZCE**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSS (např. K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 daného řetězce), a délka příčné vazby.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny *	DSS		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
1279,820	A	311	319	IVKWKIKNIK	×	×	×	K313	K316	10,52
	B	311	319	IVKWKIKNIK	×	×	×	K313	K316	9,90
2037,148	A	6	21	QLFINGDWKAPVLNKR	×	×	×	K14	K20	16,76
	B	6	21	QLFINGDWKAPVLNKR	×	×	×	K14	K20	17,19
2192,257	A	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	×	K130	K141	7,93
	B	129	146	QKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	×	K130	K141	11,01
2592,497	A	311	329	IVKWKIKNIKISDPLEEGCR	C328	×	T0: 319	K313	K316	10,52
							T0: 313	K316	K319	17,05
							T0: 316	K313	K319	22,78
	B	311	329	IVKWKIKNIKISDPLEEGCR	C328	×	T0: 319	K313	K316	9,90
							T0: 313	K316	K319	17,19
							T0: 316	K313	K319	22,48

* T0 - na lysinu, který je uveden za dvojtečkou, je připojeno činidlo DSS se slepým koncem

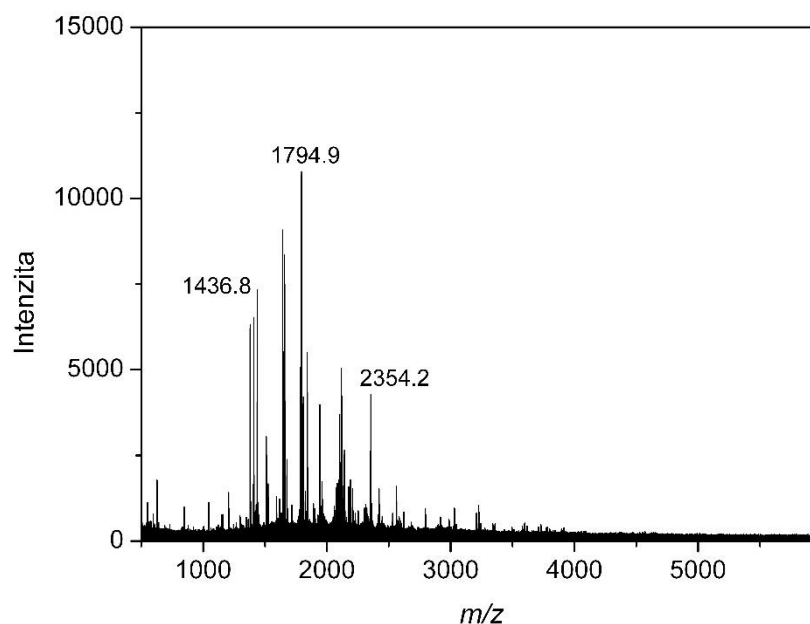
Tab. 16: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **TRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých podle softwaru MSX-3D pravděpodobně došlo k **VYTVORENÍ PŘÍČNÉ VAZBY ČINIDLEM DSS**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSS (např. A: K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 řetězce A), a délka příčné vazby.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSS		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
2234,261	A	433	438	VTKAFK	x	x	x			
	B	58	71	NKGADWATASGAVR	x	x	x	A: K435	B: K59	11,91
	A	58	71	NKGADWATASGAVR	x	x	x			
	B	433	438	VTKAFK	x	x	x	A: K59	B: K435	12,36
2292,261	A	433	438	VTKAFK	x	x	x			
	B	129	141	QKAPVSLPMDTFK	x	x	x	A: K435	B: K130	8,89
	A	129	141	QKAPVSLPMDTFK	x	x	x			
	B	433	438	VTKAFK	x	x	x	A: K130	A: K435	8,82
3458,109	A	58	71	NKGADWATASGAVR	x	x	x			
	A	125	141	LDARQKAPVSLPMDTFK	x	x	x	A: K59	A: K130	19,62
	B	58	71	NKGADWATASGAVR	x	x	x			
	B	125	141	LDARQKAPVSLPMDTFK	x	x	x	B: K59	B: K130	18,82

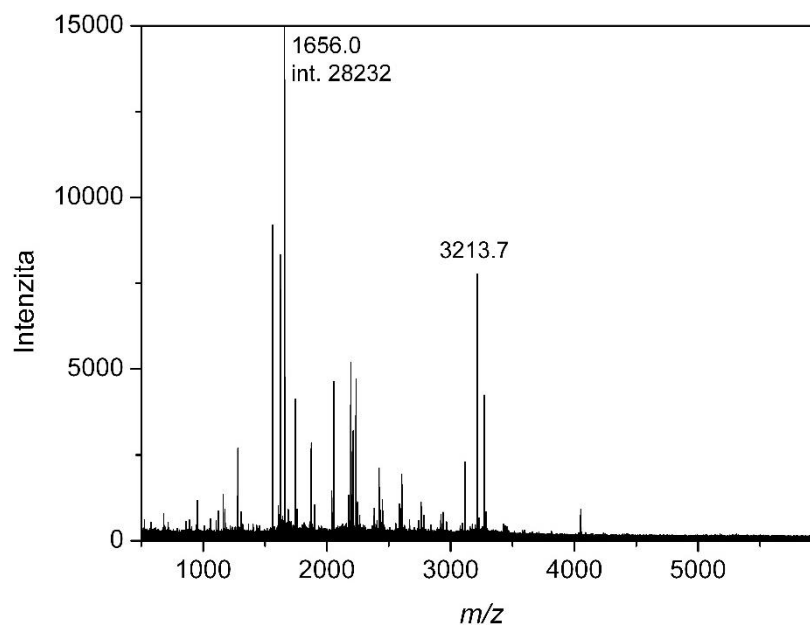
Tab. 16: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **TRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých podle softwaru MSX-3D pravděpodobně došlo k **VYTVORENÍ PŘÍČNÉ VAZBY ČINIDLEM DSS**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSS (např. A: K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 řetězce A), a délka příčné vazby. **(POKRAČOVÁNÍ)**

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSS		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
4049,721	A	15	21	APVLNKR	×	×	×			
	A	22	52	IPVINPATQNIIGDIPAATKEDVD VAVAAAK	×	×	×	A: K20	A: K41	15,82
	B	15	21	APVLNKR	×	×	×			
	B	22	52	IPVINPATQNIIGDIPAATKEDVD VAVAAAK	×	×	×	B: K20	B: K41	13,72
	A	58	71	NKGADWATASGAVR	×	×	×			
	A	125	146	LDARQKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	×	A: K59	A: K130	19,62
	B	58	71	NKGADWATASGAVR	×	×	×			
	B	125	146	LDARQKAPVSLPMDTFKSHVLR	×	×	×	B: K59	B: K130	18,82

4.3.2 Štěpení chymotrypsinem



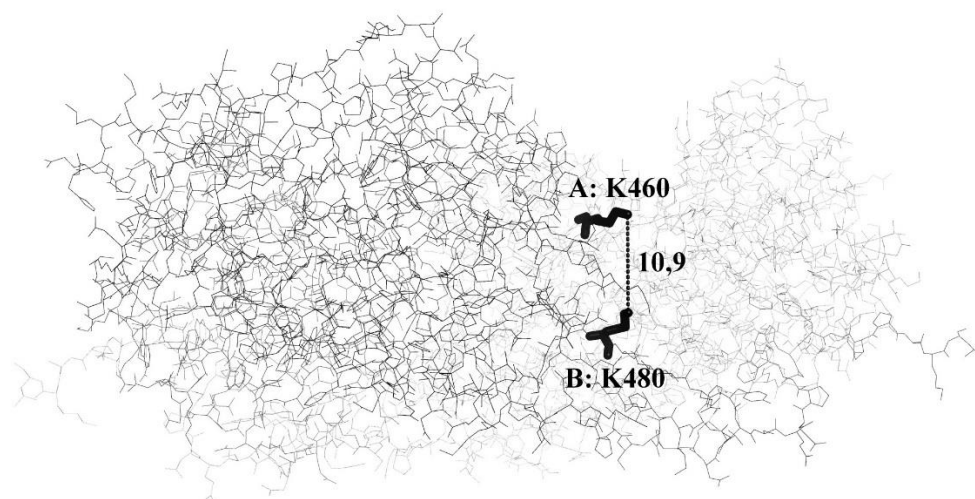
Obr. 21: Hmotnostní spektrum, které dokumentuje pokus s AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU modifikovanou činidlem DSG (vzorek g_2.3). Protein byl štěpen CHYMOTRYPSINEM. Hmotnostní spektrum bylo pořízeno na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF při pozitivní ionizaci.



Obr. 22: Hmotnostní spektrum, které dokumentuje pokus s AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU modifikovanou činidlem DSS (vzorek s_2.3). Protein byl štěpen CHYMOTRYPSINEM. Hmotnostní spektrum bylo pořízeno na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF při pozitivní ionizaci.

Tento pokus využít chymotrypsinu dopadl mnohem lépe než u alkoholdehydrogenasy, alespoň co se týče množství peptidů s příčnou vazbou předpovězených programem MSX-3D. Nejvíce opět bylo těch, které mají pouze jednoduše připojené činidlo se slepým koncem. U DSG jich bylo 11 (Tab. 17), u DSS dokonce 12 (Tab. 19). Intrapeptidové příčné nebyly bohužel u vzorku modifikovaného DSG zjištěny. U vzorku modifikovaného pomocí DSS sice ano, ale jen v omezené míře - byly pouze 2 (Tab. 20). Interpeptidové příčné vazby byly nalezeny u enzymu modifikovaného oběma činidly. Více, přesněji 12, jich vzniklo po použití činidla DSS (Tab. 21), zatímco po reakci s DSG jich bylo z naměřených hmotnostních dat předpovězeno jen 5 (Tab. 18). Peptid, který z nich má nejvyšší hodnotu m/z , je 2 795,352 (Obr. 23).

I zde byly při porovnání molekulových hmotností peptidů nalezeny případy, kdy se m/z hodnoty signálů ve spektrech peptidů z proteinu modifikovaného pomocí DSG a DSS lišily o hmotnostní rozdíl 42 Da. Z toho vyplývá, jak už bylo zmíněno, že se velmi pravděpodobně jedná o stejné peptidy, jejichž rozdílné molekulové hmotnosti jsou dány vazbou příslušných činidel. Takovýchto dvojic se zde vyskytlo hned 6. Všechno jsou to však peptidy, které nesou činidlo navázané s tvorbou slepého konce. Jako příklad lze uvést peptidy m/z 2 985,489 (Tab. 17) při použití DSG a m/z 3 027,587 při použití DSS (Tab. 19).



Obr. 23: Obrázek znázorňuje příčnou vazbu u peptidu s m/z 2 795,352. Činidlo **DSG** zde tvoří příčnou vazbu mezi Lys460 v řetězci A a Lys480 v řetězci B **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASY**. Hmotnost byla detekována při štěpení **CHYMOTRYPSINEM**. Délka příčné vazby je vyjádřena v Å. Řetězec A je světle šedý a řetězec B tmavě šedý.

Tab. 17: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSG** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSG SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSG.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSG
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
921,522	A	457	464	GGVKRSGF	×	×	K460
	B	457	464	GGVKRSGF	×	×	K460
1042,634	A	308	314	LNRIWKV	×	×	K313
	B	308	314	LNRIWKV	×	×	K313
1779,888	A	438	451	KAGIVWVNCSPQCF	C446, C450	×	K438
	B	438	451	KAGIVWVNCSPQCF	C446, C450	×	K438
1794,923	A	388	401	REEVFGPVLCKVTF	C397	×	K399
	B	388	401	REEVFGPVLCKVTF	C397	×	K399
2115,206	A	141	158	KSHVLRPIGVVGLITPW	×	×	K141
	B	141	158	KSHVLRPIGVVGLITPW	×	×	K141
2420,230	A	417	437	GLGAAVISNDLERCERVTKAF	C430	×	K435
	B	417	437	GLGAAVISNDLERCERVTKAF	C430	×	K435
2530,300	A	119	140	ADLAEKLDARQKAPVSLPMDTF	×	×	K124 K130

Tab. 17: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSG** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSG SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSG. **(POKRAČOVÁNÍ)**

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSG
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
2530,300	B	119	140	ADLAEKLDARQKAPVSLPMDTF	x	x	K124
							K130
2915,473	A	315	339	IKNIKISDPLEEGCRLGPPVSEGGY	C328	x	K316
	B	315	339	IKNIKISDPLEEGCRLGPPVSEGGY	C328	x	K316
2985,489	A	116	140	EYYADLAEKLDARQKAPVSLPMDTF	x	x	K124
	B	116	140	EYYADLAEKLDARQKAPVSLPMDTF	x	x	K124
3029,538	A	315	339	IKNIKISDPLEEGCRLGPPVSEGGY	C328	x	K316
	B	315	339	IKNIKISDPLEEGCRLGPPVSEGGY	C328	x	K316
							K319

Tab. 18: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSG** a **TRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých podle softwaru MSX-3D pravděpodobně došlo k **VYTVOŘENÍ PŘÍČNÉ VAZBY ČINIDLEM DSG**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSG (např. A: K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 řetězce A), a délka příčné vazby.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSG		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
1676,976	A	495	500	QPPAKL	x	x	x			
	B	308	314	LNRIKWK	x	x	x	A: K499	B: K313	12,63
	A	308	314	LNRIKWK	x	x	x			
	B	495	500	QPPAKL	x	x	x	A: K313	B: K499	14,90
1840,045	A	494	500	YQPPAKL	x	x	x			
	B	308	314	LNRIKWK	x	x	x	A: K499	B: K313	12,63
	A	308	314	LNRIKWK	x	x	x			
	B	494	500	YQPPAKL	x	x	x	A: K313	B: K499	14,90
2370,183	A	495	500	QPPAKL	x	x	x			
	B	268	281	EDVDLDKAAEWAI F	x	x	x	A: K499	B: K274	11,10
	A	268	281	EDVDLDKAAEWAI F	x	x	x			
	B	495	500	QPPAKL	x	x	x	A: K274	B: K499	14,98

Tab. 18: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSG** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých podle softwaru MSX-3D pravděpodobně došlo k **VYTVOŘENÍ PŘÍČNÉ VAZBY ČINIDLEM DSG**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSG (např. A: K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 řetězce A), a délka příčné vazby. **(POKRÁČOVÁNÍ)**

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSG		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
2530,300	A	457	464	GGVKRSGF	×	×	×			
	B	472	485	GLDNYLSVKQVTQY	×	×	×	A: K460	B: K480	10,89
	A	472	485	GLDNYLSVKQVTQY	×	×	×			
	B	457	464	GGVKRSGF	×	×	×	A: K480	B: K460	10,73
2795,352	A	457	471	GGVKRSGFGRELGEW	×	×	×			
	B	477	485	LSVKQVTQY	×	×	×	A: K460	B: K480	10,89
	A	477	485	LSVKQVTQY	×	×	×			
	B	457	471	GGVKRSGFGRELGEW	×	×	×	A: K480	B: K460	10,73

Tab. 19: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSS SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSS.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSS
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
963,526	A	457	464	GGVKRSGF	×	×	K460
	B	457	464	GGVKRSGF	×	×	K460
1084,650	A	308	314	LNRIWK	×	×	K313
	B	308	314	LNRIWK	×	×	K313
1790,880	A	457	471	GGVKRSGFGRELGEW	×	×	K460
	B	457	471	GGVKRSGFGRELGEW	×	×	K460
1836,949	A	388	401	REEVFGPVLCKTF	C397	×	K399
	B	388	401	REEVFGPVLCKTF	C397	×	K399
2157,217	A	141	158	KSHVLRPIGVVGLITPW	×	×	K141
	B	141	158	KSHVLRPIGVVGLITPW	×	×	K141
2353,144	A	457	476	GGVKRSGFGRELGEWGLDNY	×	×	K460
	B	457	476	GGVKRSGFGRELGEWGLDNY	×	×	K460
2462,246	A	417	437	GLGAAVISNDLERCERVTKAF	C430	×	K435
	B	417	437	GLGAAVISNDLERCERVTKAF	C430	×	K435

Tab. 19: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSS SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSS. **(POKRAČOVÁNÍ)**

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSS
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
2572,310	A	119	140	ADLAEKLDARQKAPVSLPMDTF	×	×	K124 K130
	B	119	140	ADLAEKLDARQKAPVSLPMDTF	×	×	K124 K130
2957,609	A	315	339	IKNIKISDPLEEGCRLGPVVSEGQY	C328	×	K316 K319
	B	315	339	IKNIKISDPLEEGCRLGPVVSEGQY	C328	×	K316 K319
3027,587	A	116	140	EYYADLAEKLDARQKAPVSLPMDTF	×	×	K124 K130
	B	116	140	EYYADLAEKLDARQKAPVSLPMDTF	×	×	K124 K130

Tab. 19: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, na kterých by podle softwaru MSX-3D mělo být napojeno **ČINIDLO DSS SE SLEPÝM KONCEM**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua a označení lysinu, na který je napojeno činidlo DSS. **(POKRAČOVÁNÍ)**

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	DSS
		Začátek	Konec	Aminokyseliny			
3399,865	A	457	485	GGVKRSGFGRELGEWGLDNYLSVKQVTQY	×	×	K460 K480
	B	457	485	GGVKRSGFGRELGEWGLDNYLSVKQVTQY	×	×	K460 K480
3501,020	A	234	267	TGSSATGSKIMTAAAQLVKPVSLELGGKSPLVVF	×	×	K242 K252 K261
	B	234	267	TGSSATGSKIMTAAAQLVKPVSLELGGKSPLVVF	×	×	K242 K252 K261

Tab. 20: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDEDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých mělo podle softwaru MSX-3D **ČINIDLO DSS PROPOJIT LYSINY V RÁMCI JEDNOHO ŘETĚZCE**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSS (např. K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 daného řetězce), a délka příčné vazby.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny *	DSS		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
2554,315	A	119	140	ADLAEKLDARQKAPVSLPMDTF	×	×	×	K124	K130	20,82
	B	119	140	ADLAEKLDARQKAPVSLPMDTF	×	×	×	K124	K130	22,43
3639,159	A	234	267	TGSSATGSKIMTAAQLVKPVSLE LGGKSPLVVF	×	×	T0: K261	K242	K252	18,35
	B	234	267	TGSSATGSKIMTAAQLVKPVSLE LGGKSPLVVF	×	×	T0: K261	K242	K252	16,72

* T0 - na lysinu, který je uveden za dvojtečkou, je připojeno činidlo DSS se slepým koncem

Tab. 21: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých podle softwaru MSX-3D pravděpodobně došlo k **VYTVOŘENÍ PŘÍČNÉ VAZBY ČINIDLEM DSS**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSS (např. A: K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 řetězce A), a délka příčné vazby.

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSS		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
1718,997	A	495	500	QPPAKL	x	x	x			
	B	308	314	LNRIKWK	x	x	x	A: K499	B: K313	12,63
	A	308	314	LNRIKWK	x	x	x			
	B	495	500	QPPAKL	x	x	x	A: K313	B: K499	14,90
1882,064	A	494	500	YQPPAKL	x	x	x			
	B	308	314	LNRIKWK	x	x	x	A: K499	B: K313	12,63
	A	308	314	LNRIKWK	x	x	x			
	B	494	500	YQPPAKL	x	x	x	A: K313	B: K499	14,90
2125,155	A	492	500	GWYQPPAKL	x	x	x			
	B	308	314	LNRIKWK	x	x	x	A: K499	B: K313	12,63
	A	308	314	LNRIKWK	x	x	x			
	B	492	500	GWYQPPAKL	x	x	x	A: K313	B: K499	14,90
2572,310	A	457	464	GGVKRSGF	x	x	x			
	B	472	485	GLDNYLSVKQVTQY	x	x	x	A: K460	B: K480	10,89

Tab. 21: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých podle softwaru MSX-3D pravděpodobně došlo k **VYTVOŘENÍ PŘÍČNÉ VAZBY ČINIDLEM DSS**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSS (např. A: K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 řetězce A), a délka příčné vazby. (**POKRÁČOVÁNÍ**)

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence			Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSS		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec	Aminokyseliny				K ₁	K ₂	
2572,310	A	472	485	GLDNYLSVKQVTQY	x	x	x			
	B	457	464	GGVKRSGF	x	x	x	A: K480	B: K460	10,73
3482,056	A	393	416	GPVLCVKTFSTEEEAIDLANDTVY	C397	x	x			
	A	438	443	KAGIVW	x	x	x	A: K399	A: K438	20,64
	B	393	416	GPVLCVKTFSTEEEAIDLANDTVY	C397	x	x			
	B	438	443	KAGIVW	x	x	x	B: K399	B: K438	21,06
4446,805	A	457	485	GGVKRSGFGRELGEWGLDNYLSVK QVTQY	x	x	x			
	B	477	485	LSVKQVTQY	x	x	x	A: K460	B: K480	10,89
	A	477	485	LSVKQVTQY	x	x	x			
	B	457	485	GGVKRSGFGRELGEWGLDNYLSVK QVTQY	x	x	x	A: K480	B: K460	10,73
4619,830	B	119	140	ADLAEKLDARQKAPVSLPMDTF	x	M137	x			
	B	477	493	LSVKQVTQYISEEPGW	x	x	x	B: K130	B: K480	12,62
	A	119	140	ADLAEKLDARQKAPVSLPMDTF	x	M137	x			
	A	477	493	LSVKQVTQYISEEPGW	x	x	x	A: K130	A: K480	14,10

Tab. 21: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých podle softwaru MSX-3D pravděpodobně došlo k **VYTVOŘENÍ PŘÍČNÉ VAZBY ČINIDLEM DSS**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSS (např. A: K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 řetězce A), a délka příčné vazby. (**POKRÁČOVÁNÍ**)

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence		Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSS		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec				Aminokyseliny	K ₁	
4619,830	B	315	339	IKNIKISDPLEEGCRLGPPVSEGO Y	C328	×	×		
	B	388	401	REEVFGPVLCVKTF	C397	×	×	B: K316 B: K399	22,26
5725,653	A	64	106	ATASGAVRARYLRAIAAKVTEKKP ELAKLESIDCGKPLDEAAW	C97	×	T0: K81		
	A	340	345	EKILKF	×	×	×	A: K99 A: K341	18,65
							T0: K85	A: K99 A: K341	18,65
							T0: K86	A: K99 A: K341	18,65
						T0: K91	A: K99 A: K341	18,65	
5725,653	A	64	106	ATASGAVRARYLRAIAAKVTEKKP ELAKLESIDCGKPLDEAAW	C97	×	×		
	A	340	345	EKILKF	×	×	T0: K344	A: K99 A: K341	18,65

Tab. 21: Tabulka dokumentuje pokus s **AMINOALDEHYDDEHYDROGENASOU** z *Pisum sativum*, **DSS** a **CHYMOTRYPSINEM**. Jsou v ní uvedeny peptidy, u kterých podle softwaru MSX-3D pravděpodobně došlo k **VYTVOŘENÍ PŘÍČNÉ VAZBY ČINIDLEM DSS**. K jednotlivým peptidům je v tabulce uvedeno *m/z*, řetězec enzymu, z kterého pochází, počátek a konec peptidu vzhledem k původnímu umístění v řetězci, sekvence peptidu, případná alkylace peptidu na cysteinu s označením alkylovaného residua, případná oxidace methioninu s označením oxidovaného residua, případné jiné změny na řetězci oproti původnímu stavu, označení lysinů, na které je napojeno činidlo DSS (např. A: K274 znamená, že činidlo je napojeno na lysin 274 řetězce A), a délka příčné vazby. (**POKRÁČOVÁNÍ**)

<i>m/z</i>	Řetězec	Sekvence		Alkylace C	Oxidace M	Jiné změny	DSS		Vzdálenost [Å]
		Začátek	Konec				Aminokyseliny	K ₁	
	B	64	106	ATASGAVRARYLRAIAAKVTEKKP ELAKLESIDCGKPLDEAAW	C97	×	T0: K81	B: K341	18,65
							T0: K86	B: K99 B: K341	18,65
							T0: K91	B: K99 B: K341	18,65
	B	64	106	ATASGAVRARYLRAIAAKVTEKKP ELAKLESIDCGKPLDEAAW	C97	×	×		
	B	340	345	EKILKF	×	×	T0: K344	B: K99 B: K341	18,65
	A	494	500	YQPPAKL	×	×	×		
	B	234	278	TGSSATGSKIMTAAAQLVKPVSLE LGGKSPLVVFEDVDLDKAAEW	×	×	T0: K242	A: K499 B: K274	11,10
							T0: K252	A: K499 B: K274	11,10
							T0: K261	A: K499 B: K274	11,10
5725,653	A	234	278	TGSSATGSKIMTAAAQLVKPVSLE LGGKSPLVVFEDVDLDKAAEW	×	×	T0: K242		
	B	494	500	YQPPAKL	×	×	×	A: K274 B: K499	14,98
							T0: K252	A: K274 B: K499	14,98
						T0: K261	A: K274 B: K499	14,98	

* T0 - na lysinu, který je uveden za dvojtečkou, je připojeno činidlo DSS se slepým koncem

4.3.3 Fragmentace peptidů

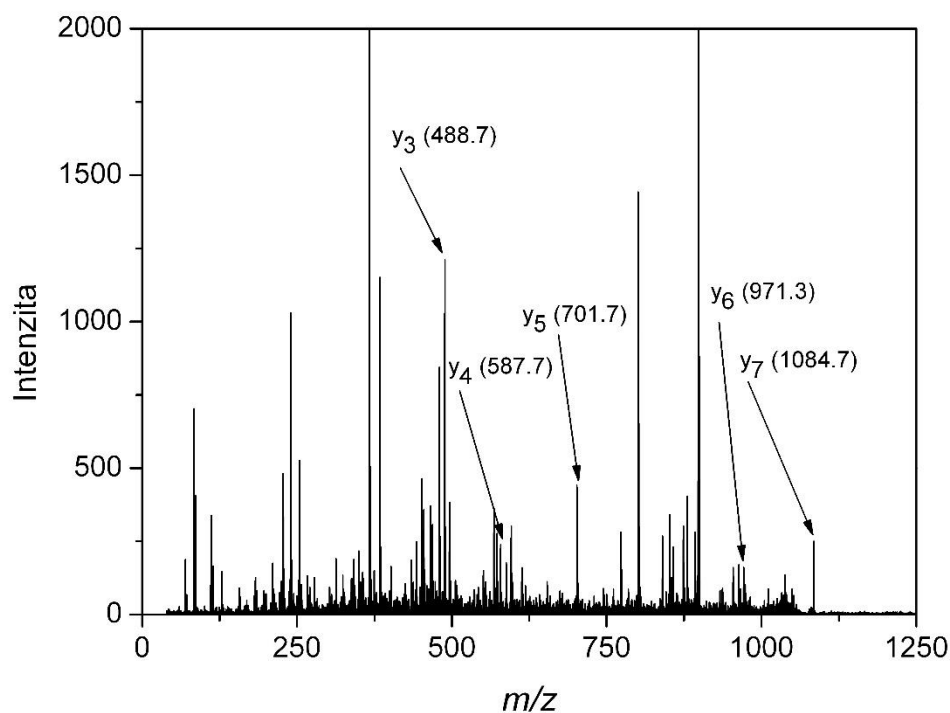
K ověření sekvencí vybraných modifikovaných peptidů bylo využito jejich fragmentace a měření MS/MS spekter.

Pro fragmentaci byly zvoleny celkem tři peptidy. Dva z nich měly představovat peptid, na kterém je napojeno činidlo se slepým koncem. Poslední vybraný peptid byl předpokládaným zástupcem té varianty modifikace, kdy jsou vlastně dva různé peptidy propojeny příčnou vazbou. Důvodem, proč byly vybrány zrovna tyto peptidy a nikoli jiné, je, že ve spektru se příslušné signály nacházely v izolovaném postavení, a proto bylo možné dané peptidové ionty v hmotnostním spektrometru snadno izolovat jako prekurzory pro fragmentaci. Použitá fragmentace na přístroji TOF/TOF je výsledkem rozpadu prekurzorového iontu za iontovým zdrojem („post-source decay“, PSD). Takto vzniklé fragmenty mají v TOF1 analyzátoru stejnou rychlost jako prekurzor. Aby bylo možné je detekovat, musí dojít k jejich akceleraci v tzv. LIFT cele přístroje. Po této „reakceleraci“ putují fragmenty v TOF2 analyzátoru s různou rychlostí a je možné je detekovat na základě měřené doby letu.

4.3.3.1 Fragmentace peptidu s m/z 1 084,650

Tento peptid byl zjištěn ve spektru z pokusu s PsAMADH2, kdy byl enzym modifikován pomocí činidla DSS a následně štěpen chymotrypsinem (Tab. 19). Molekulová hmotnost odpovídá peptidu s navázaným činidlem, které má slepý konec. Předpovězená sekvence byla LNRIVKW.

V MS/MS spektru bylo nejdříve potvrzeno zastoupení aminokyselin na základě nalezených imoniových iontů, které jsou pro ně charakteristické. Sekvence pak byla určena na základě čtení hmotnostních rozdílů v sérii y -iontů, které vznikají rozbitím peptidových vazeb a obsahují C-konec peptidu. Takto bylo také možné číst, že lysinový zbytek je modifikován navázaným činidlem DSS (Tab. 22). Zde vznikla v sérii y -iontů hmotnostní vzdálenost, která představuje právě lysin s činidlem DSS (Obr. 24). Takto byla potvrzena sekvence předpovězená v programu MSX-3D.



Obr. 24: Je to MS/MS spektrum peptidu o m/z **1 084,650**, který je tvořen **PEPTIDEM** s navázaným činidlem **DSS MAJÍCÍ SLEPÝ KONEC**. Peptid vznikl **CHYMOTRYPSINOVÝM** štěpením. Jeho sekvence je **LNRIWK**. V hmotnostním spektru jsou zvýrazněny **IONTY ŘADY y**, podle kterých byla potvrzena sekvence tohoto peptidu. V levé části hmotnostního spektra je vidět mezera, ve které není detekovaný žádný y ion. Tato mezera představuje první aminokyselinu sekvence a lysin s navázaným činidlem DSS.

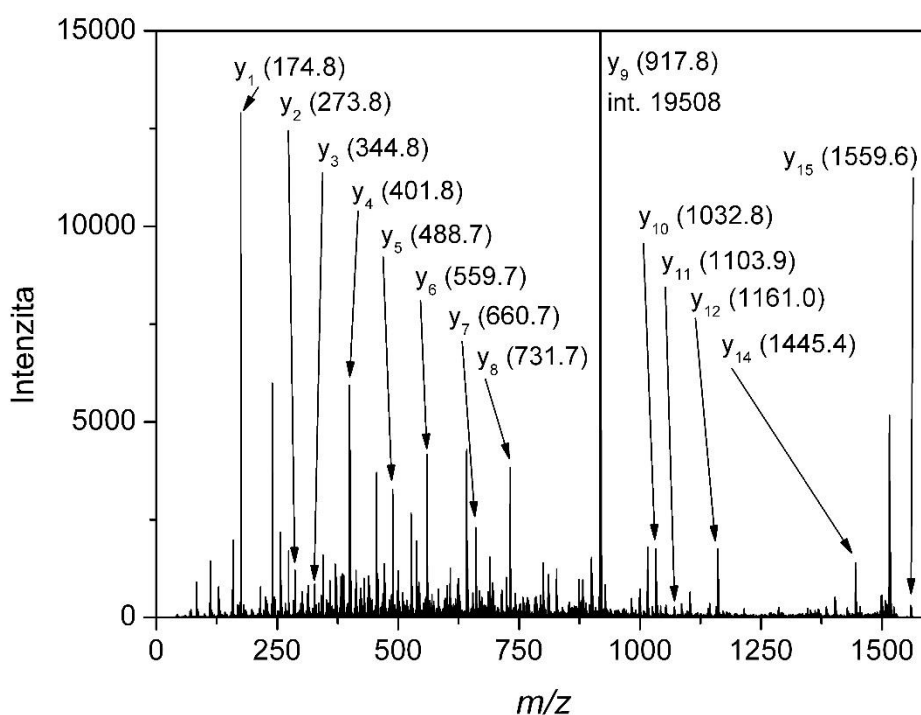
Tab. 22: Tabulka ukazuje jednotlivé detekované **y- IONTY** vzniklé fragmentací prekurzorového peptidu o m/z **1 084,650**, odpovídající sekvence a m/z hodnoty.

y ion	Sekvence	m/z
y ₃	DSS + VKW	488,713
y ₄	IVKW	587,733
y ₅	RIVKW	701,714
y ₆	NRIVKW	971,322
y ₇	LNRIWKW	1084,687

4.3.3.2 Fragmentace peptidu s m/z 1 559,837

Peptid byl detekován v pokusu, kdy byl enzym modifikován pomocí činidla DSS a následně štěpen trypsinem (Tab. 14). Šlo opět o zástupce peptidu, kdy software MSX-3D naznačoval existenci peptidu nesoucího činidlo se slepým koncem. Předpokládaná sekvence byla NKGADWATASGAVR.

Její potvrzení bylo stejné jako u předchozího případu, tedy ze série iontů řady y v MS/MS spektru (Tab. 23). A stejně jako v předchozím případě i zde vznikl y ion s lysinem, na kterém je navázáno činidlo (Obr. 25).



Obr. 25: Je to MS/MS spektrum peptidu o m/z 1 559,837, která je tvořena **PEPTIDEM** s navázaným činidlem **DSS MAJÍCÍ SLEPÝ KONEC**. Peptid vznikl **TRYPSINOVÝM** štěpením. Jeho sekvence je NKGADWATASGAVR. V hmotnostním spektru jsou zvýrazněny **IONTY ŘADY y**, podle kterých byla potvrzena sekvence tohoto peptidu. V pravé části hmotnostního spektra je vidět mezera, ve které není detekovaný žádný y ion. Tato mezera představuje lysin s navázaným činidlem DSS.

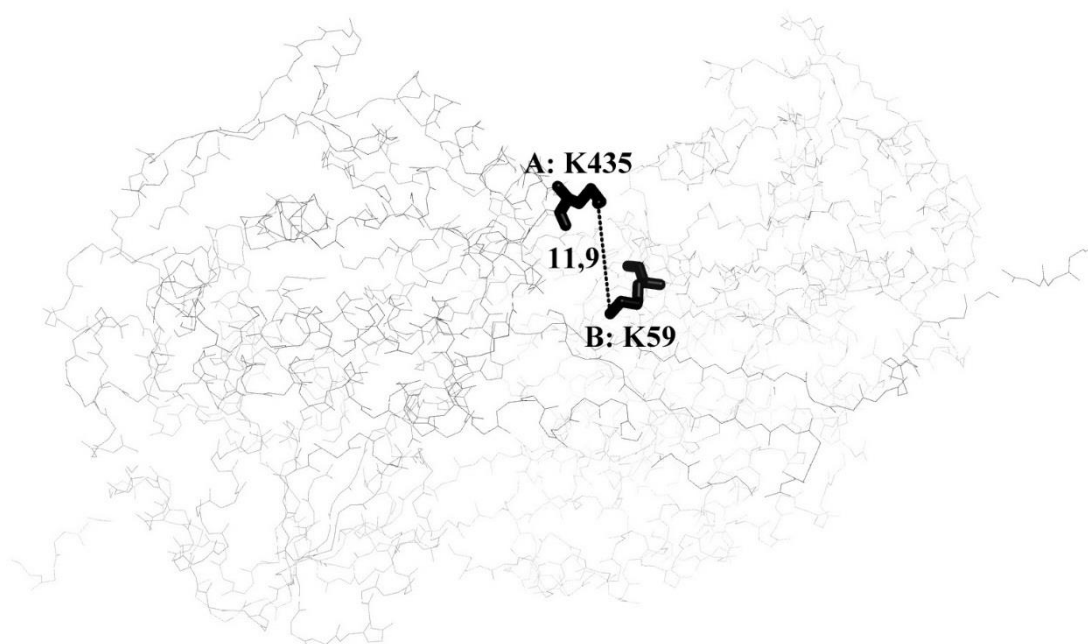
Tab. 23: Tabulka ukazuje jednotlivé detekované **y-IONTY** vzniklé fragmentací prekurzorového peptidu o m/z **1 559,837**, odpovídající sekvence a m/z hodnoty.

y ion	Sekvence	m/z
y ₁	R	174,821
y ₂	VR	273,796
y ₃	AVR	344,785
y ₄	GAVR	401,756
y ₅	SGAVR	488,732
y ₆	ASGAVR	559,725
y ₇	TASGAVR	660,725
y ₈	ATASGAVR	731,736
y ₉	WATASGAVR	917,785
y ₁₀	DWATASGAVR	1032,839
y ₁₁	ADWATASGAVR	1103,897
y ₁₂	GADWATASGAVR	1160,957
y ₁₄	DSS + KGADVATASGAVR	1445,417
y ₁₅	NKGADVATASGAVR	1559,628

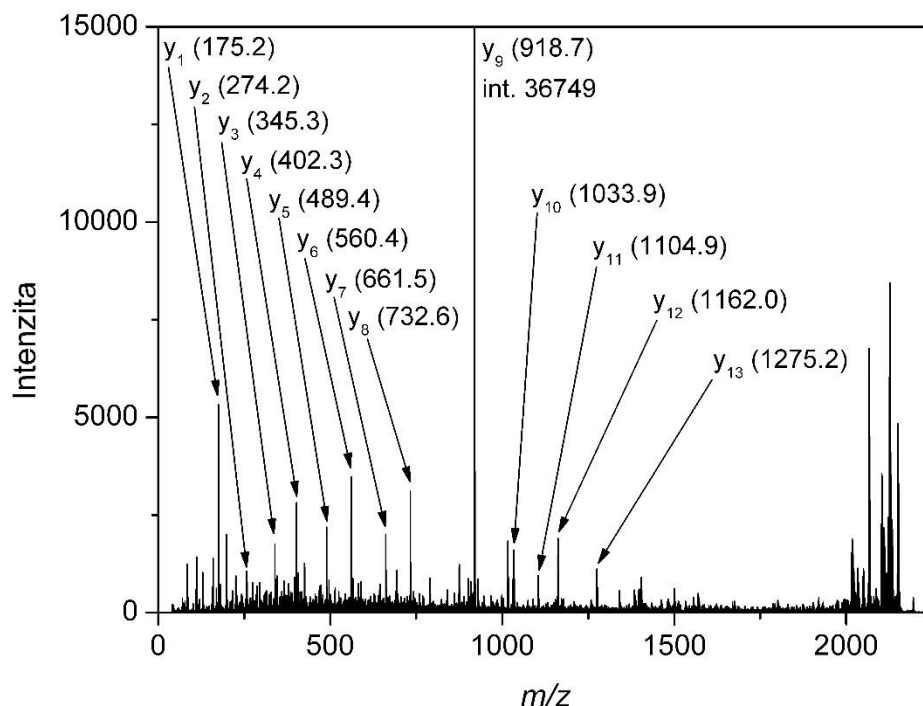
4.3.3.3 Fragmentace peptidu s m/z 2 192,086

Peptid s m/z 2 192,086 na základě výstupu z programu MSX-3D pravděpodobně představoval dva menší peptidy spojené příčnou vazbou (Obr. 26). Objevil se při měření s trypsinovým digestem PsAMADH2 modifikované činidlem DSG (Tab. 13). První ze spojených peptidů měl mít sekvenci VTKAFK a druhý sekvenci NKGADWATASGAVR. Propojení činidlem se předpokládalo přes lysin 435 u menšího peptidu a lysin 59 delšího peptidu.

Při potvrzování sekvence se postupovalo stejně jako v obou předchozích případech. Opět zde vznikaly imoniové ionty a ionty řady y , v případě delšího peptidu bylo možné y -ionty jednoduše přiřadit až do místa, kde je navázáno činidlo. Příslušný lysinový zbytek byl nalezen ve velkém iontu, který svou molekulovou hmotností odpovídal součtu molekulových hmotností části aminokyselin z delšího řetězce, všech aminokyselin z kratšího řetězce a činidla DSG (Tab. 24). Tato skutečnost opět znamenala značný hmotnostní rozdíl, který bylo možné vidět v MS/MS spektru (Obr. 27). V MS/MS spektru bylo možné vidět i fragmentační řadu y -iontů odpovídajících menšímu z obou propojených peptidů.



Obr. 26: Obrázek ukazuje propojení Lys435 z řetězce A a Lys59 z řetězce B AMINOALDEHYDDEHYDROGENASY (PsAMADH2) pomocí činidla **DSG**, čímž vznikl **INTERPEPTID** o m/z 2 192,086. Podjednotka A PsAMADH2 je světle šedá a podjednotka B PsAMADH2 je tmavě šedá. Délka příčné vazby je vyjádřena v Å.



Obr. 27: Je to MS/MS spektrum peptidu s m/z 2 192,086, který je tvořen **DVĚMA PEPTIDY PROPOJENÝMI ČINIDLEM DSG**. Peptid vznikl **TRYPSINOVÝM** štěpením. Sekvence prvního peptidu je VTKAFK a druhého NKGADWATASGAVR. V hmotnostním spektru jsou zvýrazněny **IONTY ŘADY y**, podle kterých byla potvrzena sekvence tohoto peptidu. Ionty, které jsou vidět, pocházejí z delšího peptidu.

Tab. 24: Tabulka ukazuje jednotlivé detekované **y-IONTY** vzniklé fragmentací prekurzorového peptidu m/z 2 192,086, odpovídající sekvence a m/z hodnoty.

y ion	Sekvence	m/z
y ₁	R	175,178
y ₂	VR	274,229
y ₃	AVR	345,264
y ₄	GAVR	402,287
y ₅	SGAVR	489,339
y ₆	ASGAVR	560,394
y ₇	TASGAVR	661,473
y ₈	ATASGAVR	732,548
y ₉	WATASGAVR	918,716
y ₁₀	DWATASGAVR	1033,846
y ₁₁	ADWATASGAVR	1104,885
y ₁₂	GADWATASGAVR	1161,976
y ₁₃	NGADVATASGAVR	1275,172

5 ZÁVĚR

Při reakcích s činidly pro tvorbu příčných vazeb došlo k modifikaci jak u alkoholdehydrogenasy ze *Saccharomyces cerevisiae*, tak u isoenzymu 2 aminoaldehyddehydrogenasy z *Pisum sativum*.

Pokus s alkoholdehydrogenasou sloužil k optimalizaci podmínek reakce. Při obou zkoušených reakčních molárních poměrech enzymu a činidla (1:50, 1:200) došlo k tvorbě příčných vazeb. Nicméně u vyššího poměru byla míra tvorby příčných vazeb znatelnější. U aminoaldehyddehydrogenasy byl tedy použit molární reakční poměr enzymu k činidlu 1:200.

Pro vytvoření příčných vazeb byla zvolena činidla bis(N-sukcinimid)glutarát (DSG) a bis(N-hydroxysukcinimid)suberát (DSS). Lepších výsledků bylo přitom dosaženo s DSS. Toto činidlo je rozměrově delší ze zvolené dvojice a může proto vytvářet příčné vazby na větší vzdálenost (délka DSG je 7,7 Å; délka DSS je 11,4 Å). Tato jeho vlastnost byla zřejmě rozhodující pro jeho větší úspěšnost, protože daná velikost lépe vyhovuje lysinovým zbytkům, se kterými obě činidla reagují.

Pro štěpení enzymů s vytvořenými příčnými vazbami byly zvoleny proteasy trypsin a chymotrypsin. Obě hydrolasy úspěšně a správně štěpily. Více peptidů poskytoval chymotrypsin, protože má menší specifčnost štěpení než druhý jmenovaný.

Seznam molekulových hmotností (m/z hodnot) peptidů vzešlý z měření na hmotnostním spektrometru byl počítačově analyzován pomocí softwaru MSX-3D, který vybral m/z hodnoty, jež pravděpodobně odpovídají peptidům s modifikací „dead end“ (slepý konec) případně s intrapeptidovou či interpeptidovou příčnou vazbou. Tento software také navrhnul sekvenci daných peptidů a délku vazby, kterou by tvořilo činidlo. Na základě porovnání délky činidla a vzdáleností z dostupné krystalové struktury pak mohla být vyloučena nereálná propojení. Predikované sekvence byly pro kontrolu ve třech zvolených případech u PsAMADH2 potvrzeny měření tandemových hmotnostních spekter (MS/MS) a analýzou sérii y -iontů ve fragmentační řadě. Ve dvou případech se jednalo o peptid, který nesl připojené činidlo DSS ve variantě slepého konce. Byly to peptidy s m/z 1 084,650 a 1 559,837. V posledním případě šlo o peptid tvořený dvěma menšími peptidy, které byly propojeny činidlem DSG. Peptid poskytoval v hmotnostním spektru signál s m/z 2192,086.

Metoda, kterou popisuje tato bakalářská práce, byla optimalizována k běžnému určování informací o prostorových strukturách proteinů v roztoku pro potřeby Oddělení

biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum na PřF UP v Olomouci.

6 LITERATURA

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2001): *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 1. vydání, Espero Publishing, Ústí nad Labem, Česká republika, 630 stran.
- Blombäck B. (2003): Pehr Victor Edman: The Solitary Genius. In: *History of Biochemistry: Selected Topics in the History of Biochemistry. Personal Recollections. VII.* vol. 42, 1. vydání, (Semenza G., Turner A. J.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, Nizozemsko, 103-136.
- Brauner F., Šebela M., Snégaroff J., Peč P., Meunier J.-C. (2003): Pea seedling aminoaldehyde dehydrogenase: primary structure and active site residues. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**, 1-10.
- de Smidt O., du Preez J.C., Albertyn J. (2008): The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *Federation of European Microbiological Societies*, **8**, 967-978.
- Deutzmann R. (2004): Structural characterization of proteins and peptides. *Methods in Molecular Medicine*, **94**, 269-297.
- Dihazi G.H., Sinz A. (2003): Mapping low-resolution three-dimensional protein structures using chemical and Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17**, 2005-2014.
- Edman P. (1950): Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *Acta Chemica Scandinavica*, **4**, 283-293.
- Edman P., Begg G. (1967): A Protein Sequenator. *European Journal of Biochemistry*, **1**, 80-91.
- Engen J.R. (2009): Analysis of Protein Conformation and Dynamics by Hydrogen/Deuterium Exchange MS. *Analytical Chemistry*, **81**, 7870-7875.
- Englander J.J., Del Mar Ch., Li W., Englander S.W., Kim J.S., Stranz D.D., Hamuro Y., Woods V.L. Jr. (2003): Protein structure change studied by hydrogen-deuterium Exchange, functional labeling, and mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 7057-7062.
- Fenn J. B., Mann M., Menq C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M. (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**, 64-71.
- Ganzhorn A.J., Green D.W., Hershey A.D., Gould R.M., Plapp B.V. (1987): Kinetic characterization of Yeast Alcohol Dehydrogenases: AMINO ACID RESIDUE 294 AND SUBSTRATE SPECIFICITY. *The Journal of Biological Chemistry*, **262**, 3754-3761.
- Heymann M., Paramelle D., Subra G., Forest E., Martinez J., Geourjon C., Deléage G. (2008): MSX-3D: a tool to validate 3D protein models using mass spectrometry. *Bioinformatics*, **24**, 2782-2783.
- Hildebrandt P., Vanhecke F., Heibel G., Mauk A.G. (1993): Structural changes in cytochrome c upon hydrogen-deuterium Exchange. *Biochemistry*, **32**, 14158-14164.
- Hoare D.G., Koshland D.E.Jr. (1966): A Procedure for the Selective Modification of Carboxyl Groups in Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, **88**, 2057-2058.
- Hunter M.J., Ludwig M.L. (1962): The Reaction of Imidoesters with Proteins and Related Small Molecules. *Journal of the American Chemical Society*, **84**, 3491-3504.
- Jacobsen R.B., Sale K.L., Ayson M.J., Novák P., Hong J., Lane P., Wood N.L., Kruppa G.H., Young M.M., Schoeniger J.S. (2006): Structure and dynamics of dark-bovine rhodopsin revealed by chemical cross-linking and high-resolution mass spectrometry. *Protein Science*, **15**, 1303-1317.
- Kägi J.H.R., Vallee B.L. (1960): The Role of Zinc in Alcohol Dehydrogenase: V. THE EFFECT OF METAL-BINDING AGENTS ON THE STRUCTURE OF THE YEAST ALCOHOL DEHYDROGENASE MOLECULE. *The Journal of Biological Chemistry*, **235**, 3188-3192.
- Karas M., Hillenkamp F. (1988): Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Analytical Chemistry*, **60**, 2299-2301.
- Karlović D., Amiguet P., Bonner F.J., Luisi P.L. (1976): Spectroscopic Investigation of Binary and Ternary Coenzyme Complexes of Yeast Alcohol Dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, **66**, 277-284.

- Kelleher N.L., Lin H.Y., Valaskovic G.A., Aaserud D.J., Fridriksson E.K., McLafferty F.W. (1999): Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, **121**, 806-812.
- Kelly S. M., Price N. C. (2000): The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein and Peptide Science*, **1**, 349-384.
- Klinman J.P. (1975): Acid-Base Catalysis in the Yeast Alcohol Dehydrogenase Reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, **250**, 2569-2573.
- Kopečný D., Končítíková R., Tylichová M., Vigouroux A., Moskalíková H., Sural M., Šebela M., Morera S. (2013): Plant ALADH10 Family: Identifying Critical Residues for Substrate Specificity and Trapping a Thiohemiacetal Intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, **288**, 9491-9507.
- Larroy C., Parés X., Biosca J.A. (2002): Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 5738-5745.
- Manavalan P., Johnson W. C. Jr. (1987): Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Analytical Biochemistry*, **167**, 76-85.
- McMurry J. (2007): *Organická chemie*. 1. vydání, VUTIUM, Brno, Česká republika, 1294 stran.
- Novák P., Haskins W.E., Ayson M.J., Jacobsen R.B., Schoeniger J.S., Leavell M.D., Young M.M., Kruppa G.H. (2005): Unambiguous Assignment of Intramolecular Chemical CrossLinks in Modified Mammalian Membrane Proteins by Fourier Transform-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **77**, 5101-5106.
- Perez-Miller S. J., Hurley T. D. (2003): Coenzyme Isomerization Is Integral to Catalysis in Aldehyde Dehydrogenase. *Biochemistry*, **42**, 7100-7109.
- Pingoud A., Urbanke C., Hoggett J., Jeltsch A. (2002): *Biochemical Methods: A Concise Guide for Students and Researchers*. 1. vydání, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Spolková republika Německo, 360 stran.
- Rozbesky D., Man P., Kavan D., Chmelik J., Cerny J., Bezouska K., Novak P. (2012): Chemical Cross-Linking and H/D Exchange for Fast Refinement of Protein Crystal Structure. *Analytical Chemistry*, **84**, 867-870.
- Sinz A. (2006): CHEMICAL CROSS-LINKING AND MASS SPECTROMETRY TO MAP THREE-DIMENSIONAL PROTEIN STRUCTURES AND PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS. *Mass Spectrometry Reviews*, **25**, 663-682.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996): Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry*, **68**, 850-858.
- Shevchenko A., Thomas H., Havliš J., Olsen J.V., Mann M. (2007): In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Publishing Group*, **6**, 2856-2860.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985): Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, **150**, 76-85.
- Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000): Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1480**, 329-341.
- Šebela M., Štosová T., Havliš J., Wielsch N., Thomas H., Zdráhal Z., Shevchenko A. (2006): Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and permance evaluation. *Proteomics*, **6**, 2959-2963.
- Šípál Z., Anzenbacher P., Peč P., Pospíšil J., Růžička I. (1992): *Biochemie*. 1. vydání, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, Česká republika, 480 stran.
- Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T. (1988): Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2**, 151-153.
- Thomas H., Havliš J., Pechl J., Shevchenko A. (2004): Dried-droplet probe preparation on AnchorChipTM targets for navigating the acquisition of matrix-assisted laser

- desorption/ionization time-of-flight spectra by fluorescence of matrix/analyte crystals. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18**, 923-930.
- Trester-Zedlitz M., Kamada K., Burley S.K., Fenyö D., Chait B.T., Muir T.W. (2003): A Modular Cross-Linking Approach for Exploring Protein Interactions. *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 2416-2425.
- Tylichová M., Kopečný D., Snégaroff J., Šebela M. (2007): Plant aminoaldehyde dehydrogenases: Has the time now come for new interesting discoveries? *Current Topics in Plant Biology*, **8**, 45-70.
- Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozzo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela M. (2010): Structural and Functional Characterization of Plant Aminoaldehyde Dehydrogenase from *Pisum sativum* with a Broad Specificity for Natural and Synthetic Aminoaldehydes. *Journal of Molecular Biology*, **396**, 870-882.
- Vasilescu J., Guo X., Kast J. (2004): Identification of protein-protein interactions using *in vivo* cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics*, **4**, 3845-3854.
- Wand A.J., Englander S.W. (1996): Protein complexes studied by NMR spectroscopy. *Current Opinion in Biotechnology*, **7**, 403-408.
- Weber I.T., Waltman M.J., Mustyakimov M., Blakeley M.P., Keen D.A., Ghosh A.K., Langan P., Kovalevsky A.Y. (2013): Joint X-ray/Neutron Crystallographic Study of HIV-1 Protease with Clinical Inhibitor Amprenavir: Insights for Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, **56**, 5631-5635.
- Yergey A.L., Coorseu J.R., Backlund P.S. Jr., Blank P.S., Humprey G.A., Zimmerberg J., Campbell J.M., Vestal M.L. (2002): De Novo Sequencing of Peptides Using MALDI/TOF-TOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **13**, 784-791.
- Young M.M., Tang N., Hempel J.C., Oshiro C.M., Taylor E.W., Kuntz I.D., Gibson B.W., Dollinger G. (2000): High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 5802-5806.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2D-HPLC	dvoudimenzionální vysokoúčinná kapalinová chromatografie
AA/BIS	akrylamid/ <i>N,N'</i> -methylenbisakrylamid
ABALDH	4-aminobutyraldehdehydrogenasy
ADH	alkoholdehydrogenasa
ALDH	aldehyddehydrogenasy
AMADH	aminoaldehyddehydrogenasy
APS	peroxodisíran amonný
ATZ-derivát	derivát anilinothiazolinonu
BADH	betainaldehyddehydrogenasy
BAL	betainaldehyd
BSA	hovězí sérový albumin
CD	cirkulární dichroismus
CE	kapilární elektroforéza
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	ionizace elektrosprejem
ESI-FTICR-MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem a Fourierovou transformací-iontová cyklotronová rezonance
G_2, g_2	vzorek alkoholdehydrogenasy respektive aminoaldehyddehydrogenasy modifikovaný činidlem DSG v molárním poměru 1:200
G_5, g_5	vzorek alkoholdehydrogenasy respektive aminoaldehyddehydrogenasy modifikovaný činidlem DSG v molárním poměru 1:50
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GBALDH	4-guanidinobutyraldehdehydrogenasy
H/D výměna	výměna vodíku za deuterium
HCCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová

HEPES	<i>N</i> -[2-hydroxyethyl]piperazin- <i>N'</i> -ethansulfonová kyselina
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce / ionizace
MDR	dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MSX-3D	internetová aplikace určená k vytypování hmot z hmotnostního spektra, které pravděpodobně představují peptidy s příčnými vazbami
NAD(P) ⁺	nikotinamidadenindinukleotid(fosfát) v oxidované formě
NAD(P)H	nikotinamidadenindinukleotid(fosfát) v redukované formě
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NKR-P1A	receptor (protein), který aktivuje odezvu na virovou infekci
NMR	nukleární magnetická rezonance
NP	nemodifikovaný protein
pH	záporný logaritmus aktivity iontů H ⁺
PITC	fenyliothiokyanát
PsAMADH1, PsAMADH2	isoenzymy aminoaldehyddehydrogenasy z <i>Pisum sativum</i>
PSD	rozpad prekurzorového iontu za iontovým zdrojem
PTC-peptid, PTC-derivát	fenylthiokarbamylpeptid
PTH	<i>N</i> -fenylthiohydantoin
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

S_2, s_2	vzorek alkoholdehydrogenasy respektive aminoaldehyddehydrogenasy modifikovaný činidlem DSS v molárním poměru 1:200
S_5, s_5	vzorek alkoholdehydrogenasy respektive aminoaldehyddehydrogenasy modifikovaný činidlem DSS v molárním poměru 1:50
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
SIAMADH1, SIAMADH2	isoenzymy aminoaldehyddehydrogenasy ze <i>Solanum lycopersicum</i>
ST	standardy
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethyldiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
TMABAL	<i>N,N,N</i> -trimethyl-4-aminobutyraldehydu
TMABALDH	4-trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasy
TOF	průletový analyzátor
UV	ultrafialové světlo
v/v	objemový zlomek
w/w	hmotnostní zlomek
ZmAMADH1a, ZmAMADH1b, ZmAMADH2	isoenzymy aminoaldehyddehydrogenasy ze <i>Zea mays</i>