

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Jasmína Mária Portašiková

**Studium struktury a interakcí proteinů pomocí strukturní hmotnostní
spektrometrie**

Studying protein structure and interactions by structural mass spectrometry

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Petr Man, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Lukáš Fojtík

Praha 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. 5. 2024

Bc. Jasmína Mária Portašiková

Abstrakt

Transmembránové kanály a přenašeče z CIC proteinové rodiny se vyskytují napříč všemi živými organismy. Nacházejí se na cytoplasmatických a lysosomálních membránách buněk, kde se podílí na udržování homeostázy iontů. Narušení jejich funkce vede k vážným zdravotním komplikacím. Pro vývoj efektivní léčby těchto onemocnění je potřeba objasnit transportní mechanismus CIC proteinů. Antiporter CIC-*ec1* z *E.coli* je modelovým proteinem celé CIC proteinové rodiny. Tento homodimerní protein, který transportuje proton proti dvěma chloridovým iontům, má transportní dráhu v každé z podjednotek. Na základě krystalové struktury se předpokládá, že během transportu se protein střídavě otevírá na obě strany membrány. Otevření proteinu směrem ven je umožněno protonací tří glutamátů, které se nacházejí v transportní dráze a jsou pro transport iontů klíčové. Pro studium tohoto stavu byl navržen QQQ mutant, který má tyto glutamáty nahrazeny za glutaminy. Dosud se studium transportního mechanismu CIC-*ec1* opíralo převážně o studie založené na rentgenové krystalografii. Krystalografie poskytla statické obrázky, které neobsahovaly dostatečné informace o dynamice proteinu. Proto jsme pro studium transportního mechanismu CIC-*ec1* zvolili dynamickou metodu – vodík-deuteriovou výměnu spojenou s hmotnostní spektrometrií. Součástí práce byla exprese proteinů CIC-*ec1* a jeho QQQ mutantu v buňkách *E.coli*, jejich izolace pomocí detergentové solubilizace a purifikace pomocí afinitní a gelové permeační chromatografie. Dále bylo optimalizováno proteolytické štěpení proteinu, za účelem zisku nejvyššího možného prostorového rozlišení a sekvenčního pokrytí. Nakonec byly provedeny samotné HDX-MS experimenty. V prvním experimentu byly porovnány konformace CIC-*ec1* a jeho QQQ mutantu v pH škále 4,4 až 7,4. Jelikož CIC-*ec1* při pH 4,4 nebyl plně protonován, další experiment byl proveden při nižším pH – 3,0. Poslední HDX-MS experiment sleduje změny konformace vlivem postupné protonace v rozsahu pH 3,0-4,5 a srovnává je s pH 6,5.

Klíčová slova: H/D výměna, hmotnostní spektrometrie, struktura proteinu, membránové proteiny, proton-chloridový antiporter

Abstract

Transmembrane channels and transporters of the ClC protein family are present across all living organisms. They are found on the cytoplasmic and lysosomal membranes of the cells, where they participate in maintaining ion homeostasis. When dysfunctional, they lead to serious health complications. To develop treatment for these diseases, it is essential to describe transport mechanism of ClC proteins. The antiporter ClC-*ec1* from *E.coli* is used as a model protein for the entire ClC protein family. This homodimeric protein, which transports one proton against two chloride ions, has a separate transport path in each monomer. Based on the crystal structure, it is believed that during transport the protein alternates between outward and inward-facing conformations. Conversion to the outward-facing conformation of the protein is accompanied by the protonation of three glutamates located in the transport path. To study these conditions, a QQQ mutant was designed that has these glutamates replaced by glutamines. Until now, the study of the transport mechanism of ClC-*ec1* has mainly relied on studies based on X-ray crystallography. Crystallography provided static images, which did not contain sufficient information about protein dynamics. Therefore, to study transport mechanism of ClC-*ec1*, we chose a dynamic method – hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry. In this thesis, ClC-*ec1* and its QQQ mutant were over-expressed in bacteria, isolated *via* detergent solubilization and purified by affinity chromatography and gel filtration. Next, the proteolytic step of the analysis was optimized to obtain sufficient spatial resolution and sequence coverage. Finally, the HDX-MS experiments were performed. In the first experiment, the conformations of ClC-*ec1* and its QQQ mutant were compared in the pH range 4.4 to 7.4. Since ClC-*ec1* was not fully protonated at pH 4.4, another experiment was performed at an even lower pH – 3.0. The last HDX-MS experiment followed changes in conformation during stepwise protonation within the pH range of 3.0-4.5 and compared them with pH 6.5.

[IN CZECH]

Keywords: H/D exchange, mass spectrometry, protein structure, membrane proteins, proton-chloride antiporter

[IN CZECH]

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Manovi, Ph.D. a konzultu Mgr. Lukáši Fojtíkovi za trpělivost a pomoc při experimentální části a při sepsování práce. Dále děkuji kolektivu laboratoře za vytvoření příjemné pracovní atmosféry a rodině za podporu během celého vysokoškolského studia.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod	9
1.1 Proteiny – membránové proteiny	9
1.2 ClC proteinová rodina	10
1.2.1 Savčí ClC proteiny a onemocnění s nimi spojené	10
1.2.2 Bakteriální chloridový antiporter ClC-ec1 z <i>Escherichia coli</i>	13
1.3 Studium integrálních membránových proteinů	19
1.3.1 Metody studia struktury a biologického mechanismu membránových proteinů	20
1.3.2 Vodík-deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS)	22
1.3.2.1 Faktory ovlivňující rychlost vodík-deuteriové výměny	24
1.3.2.2 Experiment vodík-deuteriové výměny spojené s hmotnostní spektrometrií	26
2 Cíle práce	30
3 Materiál a metody	31
3.1 Použité chemikálie	31
3.2 Použité přístroje a pomůcky	32
3.3 Použité roztoky, média a pufry	33
3.4 Použité plasmidy a bakteriální buňky	36
3.5 Metody	37
3.5.1 Příprava misek agaru LB médií	37
3.5.2 Transformace plasmidu ClC-ec1 a jeho QQQ mutantu	37
3.5.3 Příprava noční kultury	37
3.5.4 Expresce ClC-ec1 a jeho QQQ mutantu v buňkách <i>E. coli</i>	37
3.5.5 Purifikace ClC-ec1 a jeho QQQ mutantu	38
3.5.5.1 Solubilizace ClC-ec1 a jeho QQQ mutantu	38
3.5.5.2 Afinitní chromatografie	38
3.5.5.3 Diskontinuální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS elektroforéza)	38
3.5.5.4 Štěpení histidinové kotvy	39
3.5.5.5 Gelová permeační chromatografie	39
3.5.5.6 Reverzní afinitní chromatografie a gelová permeační chromatografie	39
3.5.6 Výměna pufrů pomocí gelové permeační chromatografie	40
3.5.7 Vodík-deuteriová výměna	40
3.5.8 Analýza vzorků vodík-deuteriové výměny	41
3.5.8.1 Optimalizace proteolytického štěpení	41
3.5.8.2 LC-MS analýza HDX vzorků a zpracování dat	43

4 Výsledky	44
4.1 Purifikace CIC proteinů.....	44
4.2 Optimalizace proteolytického štěpení	44
4.3 Vodík-deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií.....	47
4.3.1 Porovnání konformace CIC- <i>ec1</i> a jeho QQQ mutantu.....	47
4.3.2 Vliv velmi nízkého pH na konformaci CIC- <i>ec1</i>	49
4.3.3 Vliv postupné protonace CIC- <i>ec1</i> na jeho konformaci v rozsahu velmi nízkých pH	51
5 Diskuze.....	55
6 Závěr	61
Seznam použité literatury.....	62

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
ATP	adenosintrifosfát
APS	peroxodisíran amonný
CBS	cystationin β -synthasa
CID	kolizně indukovaná disociace
CIC	chloridové kanály
CMC	kritická micelární koncentrace
cryo-EM	kryo-elektronová mikroskopie
DMF	N,N-dimethylformamid
DTT	dithiotreitol
ECD/ETD	disociace metodou elektronového záchytu/transferu
FDR	míra falešných identifikací
GC	gelová permeační chromatografie
Gln	glutamin
Glu	glutamát
HDX	vodík-deuteriová výměna
IMAC	afinitní chromatografie
LB	Luria Broth
LC	kapalinová chromatografie
MD	molekulární dynamika
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
RTG	rentgenové záření
Q-TOF	kvadrupól spojený s analyzátozem doby letu
SDS	dodecylsulfát sodný
SMALP	lipidové částice s kostrou z polymeru kyseliny styren maleinové
TB	Terrific Broth
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)ethan
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPLC	kapalinová chromatografie při ultravysokém tlaku

1 Úvod

1.1 Proteiny – membránové proteiny

Proteiny jsou makromolekuly, přítomné v přírodě, seskládané ze stavebních jednotek zvaných aminokyseliny.¹ V organismech se podílí na velkém množství fyziologických procesů, a proto není překvapením, že více než 50 % buněčné sušiny organismů tvoří právě proteiny. Hrají důležitou roli v buněčné signalizaci, hormonální regulaci, transportu látek, obraně organismů, svalové kontrakci, a nelze opomenout jejich enzymatickou funkci.

Proteiny lze dělit na jednoduché a složené, které obsahují i neproteinovou složku.¹ Dalším kritériem dělení může být lokalizace v organismu, na základě kterého rozlišujeme proteiny intracelulární a extracelulární. Můžeme je odlišovat i podle jejich tvaru na fibrilární, globulární a integrální membránové proteiny. Globulární proteiny jsou rozpustné ve vodě. Do této skupiny zařazujeme periferní membránové proteiny, které jsou k povrchu membrány přichyceny nevazebnou interakcí. Naopak fibrilární proteiny rozpustné nejsou a jejich funkce je především strukturní.

Integrální membránové proteiny prostupují biologickými membránami.¹ Většinou mají hydrofobní část vnořenou do membrány a hydrofilní globulární část, která je v přímém kontaktu s okolním vodním prostředím. Mezi integrální membránové proteiny patří membránové receptory, důležité pro komunikaci buňky s okolím a některé proteiny s enzymovou funkcí. Dále jsou sem řazeny transmembránové transportní proteiny – kanály a přenašeče. Jejich úlohou je transport molekul a iontů přes biologické membrány a tím udržování rovnováhy vnitřního prostředí organismů. Transport zprostředkovaný proteiny může probíhat pasivně – usnadněnou difuzí, která je zajišťována kanály. Aktivní transport probíhá proti koncentračnímu gradientu transportované látky, přičemž energii lze získat buď chemickou reakcí, např. hydrolýzou ATP nebo kotransportem, současným přenosem jiné molekuly ve směru koncentračního gradientu. Pokud jsou obě molekuly transportovány stejným směrem jedná se o symport, v případě transportu opačným směrem hovoříme o antiportu.

1.2 ClC proteinová rodina

Transmembránové proteiny z rodiny ClC zahrnují jak Cl^-/H^+ transportéry tak Cl^- kanály² podílející se především na udržování homeostázy a také na mnoha dalších procesech v buňkách. Vyznačují se transportem Cl^- iontů přes membránu. Chloridový iont působí jako protiiont vůči Na^+ a K^+ , a tím se podílí na udržování elektroneutality. Neméně důležitá je role Cl^- iontů v osmóze, související s transepiteliální sekrecí a absorpcí vody, čímž je regulován objem buněk.³ Transportéry chloridů najdeme také v neuronech a svalech, kde umožňují elektrickou excitaci, prostřednictvím změny náboje biologické membrány.^{4,5} Transportéry z ClC rodiny byly kromě plasmatické membrány nalezeny i na membránách endosomů a lysozomů, kde se jedná o $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ přenašeče, jež se taky podílejí na změnách náboje.⁶⁻⁸

ClC proteiny vykazují strukturně mnoho společných rysů. Jsou to homodimery, jejichž podjednotky spolu silně interagují. Každý monomer obsahuje samostatnou transportní dráhu iontů a k vazbě aniontu dochází uprostřed každé z podjednotek.^{9,10} Eukaryotické ClC se od prokaryotických odlišují přítomností dvojice C-terminálních CBS domén (cystationin β -synthasa).¹¹ CBS domény zastávají různé funkce a to především regulační. Jednou z nich je regulace přestupu iontů kanálem, například u kanálu ClC-0.¹² Dále hrají roli při transportu ClC-5 do endosomů v rámci buněk a jsou místem vazby jiných molekul, např. ATP.^{13,14}

Dnes je známa široká škála ClC genové rodiny transportérů a kanálů. Prvním objeveným chloridovým kanálem byl ClC-0, získaný z elektrického orgánu mořského parejnoka (*Torpedo marmorata*), který využívá elektrický šok pro lov kořisti.¹⁵ Následně byly identifikovány ClC geny napříč všemi organismy, včetně dvou isoform bakteriálních ClC v *Escherichia coli*,¹⁶ jednoho ClC transportního proteinu v kvasince *Sacharomyces cerevisiae*¹⁷ a devíti savčích ClC genů. U savců jsou čtyři z těchto proteinů kanály umístěné na cytoplasmatické membráně a pět funguje jako Cl^-/H^+ transportéry na intracelulárních membránách organel (Obr. 1, str. 12).¹⁸

1.2.1 Savčí ClC proteiny a onemocnění s nimi spojené

Detailní studie savčích ClC proteinů odhalily nejen jejich funkci v organismech, ale také mutace, které jsou příčinou lidských genetických onemocnění. Prvním objeveným savčím

proteinem z CIC rodiny byl CIC-1, který je exprimován jen v kosterních svalech a podílí se na repolarizaci svalových vláken při práci. Mutace v jeho genu způsobují dosud neléčitelné onemocnění *myotonia congenita*, které se vyznačuje svalovou ztuhlostí zapříčiněnou opožděnou relaxací svalů.¹⁹

CIC-2 byl nalezen v mnoha tkáních včetně mozku, srdce, plic a trávicího traktu. Jednou z jeho funkcí je zprostředkování absorpce vody a solí na bazolaterální straně enterocytů.²⁰ Dále se protein nachází v některých gliových buňkách, kde se váže na molekulu GlialCAM. Vazba ovlivňuje otevírání kanálu a dysfunkce CIC-2 vede k rozvoji neurologického onemocnění, zvaného leukodystrofie (porucha růstu a obnovy bílé hmoty).²¹

CIC-Ka a CIC-Kb jsou dva příbuzné kanály, které se vyznačují odlišnou selektivitou oproti ostatním CIC kanálům – $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$.²² Pro jejich funkci je nezbytná β -podjednotka barttin, která je ko-exprimovaná s CIC-K kanály.²³ V organismech jsou v nefronech a *stria vascularis* vnitřního ucha. CIC-Kb se v Henleho kličce podílí na reabsorpci Cl^- do krevního řečiště jenž následují Na^+ , které jsou reabsorbovány přes Na^+/K^+ pumpu. Tento proces umožňuje také zpětnou reabsorpci vody.²⁴ Poškození CIC-Kb způsobuje Bartterův syndrom typu III, který se vyznačuje hypokalemií, metabolickou alkalózou a sekundárním hyperaldosteronismem.²⁵ Ve vnitřním uchu jsou exprimovány oba CIC-Ka a CIC-Kb, které zde udržují vysokou koncentraci K^+ a kladný potenciál endolymfy, důležitý pro sluch. Mutace v obou CIC-K kanálech vede k ztrátě sluchu.²⁶

Nejvíce studovaným přenašečem $2\text{Cl}^-/1\text{H}^+$ je CIC-5, který je exprimován na raných a pozdních endosomech proximálních tubulárních buněk v ledvinách a apikálních endosomech epitelu střev.^{7,8,27} Jeho vyřazení prostřednictvím mutací způsobuje Dentovu chorobu. Jedná se o vzácné genetické onemocnění vázané na X-chromozóm postihující ledviny a způsobující zejména proteinurii malých proteinů, ale také hyperkalciurii a ledvinové kameny. Přesnou funkci CIC-5 při endocytóze raných endosomů se zatím nepodařilo objasnit. Původně se předpokládalo, že transport Cl^- přes membránu prostřednictvím CIC-5 je důležitý pro neutralizaci kladného náboje protonů, které jsou dovnitř transportovány ATPázou pro okyselení endosomů. Pozdější studie ukázaly, že se ve skutečnosti jedná o antiporter, který transportuje H^+

proti protonové ATPáze. Toto zjištění vedlo k přehodnocení předešlých hypotéz o jeho funkci v procesu endocytózy.

Součástí membrány lysozomů je i $2\text{Cl}^-/1\text{H}^+$ přenašeč ClC-7, který jako jediný pro svou funkci a stabilitu potřebuje β -podjednotku, Ostm1.⁶ ClC-7 byl nalezen jednak na lysosomální membráně, ale také na záhybech nařasené membrány osteoklastů, které jsou zodpovědné za resorpci kostí. Jedinci s mutací tohoto antiporteru nebo jeho β -podjednotky trpí osteopetrózou. Osteopetróza je dědičné onemocnění, způsobené neefektivním odbouráváním osteoklastů, kvůli narušenému okyselení v resorpční oblasti osteoklastů. Další nemoci spojené s mutací v genu pro ClC-7 a poškozením dráhy lysozomů jsou retinální degenerace a neurodegenerace.

Role zbývajících tří proteinů, ClC-3, -4 a -6 v organismu je zatím nejasná. ClC-3 je spojován s neurodegenerativními onemocněními.²⁸ ClC-4 je další $2\text{Cl}^-/1\text{H}^+$ antiporter nacházející se na endosomech svalů a mozku lidí.²⁹ ClC-6 byl nalezen pouze v nervovém systému, a to na membránách endosomů a lysozomů. Jeho nepřítomnost způsobuje lehčí formu lysosomální choroby.³⁰

Přehled informací o jednotlivých savčích proteinech shrnuje Obr. 1.

	Protein	β-podjednotka	Onemocnění
plasmatická membrána kanály	ClC-1		<i>Myotonia congenita</i>
	ClC-2		leukodystrofie
	ClC-Ka	Barttin	ztráta sluchu
	ClC-Kb	Barttin	Bartterův syndrom typu III, ztráta sluchu
endosomy/lysosomy transportéry	ClC-3		neurodegenerace
	ClC-4		
	ClC-5		Dentova choroba
	ClC-6		lysosomální choroba
	ClC-7	Ostm1	osteopetróza

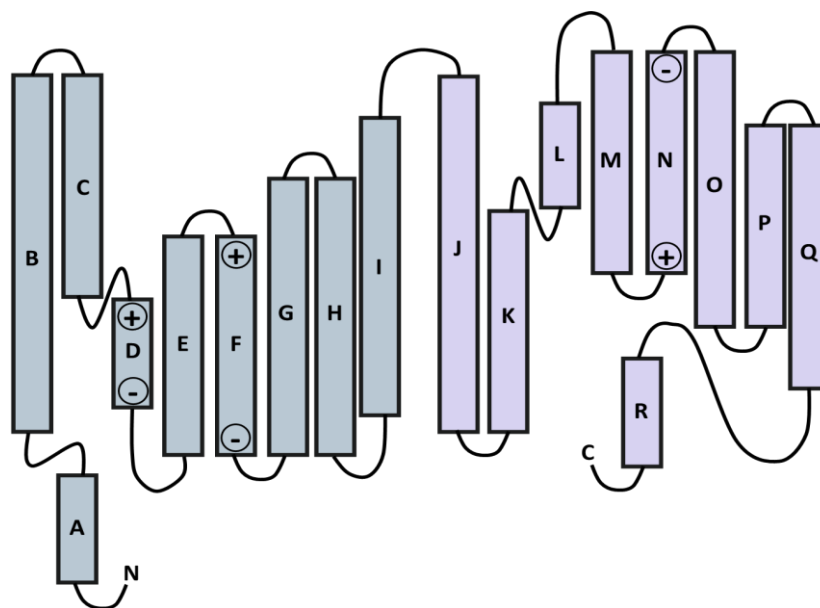
Obrázek 1 – Rozdělení savčích ClC proteinů, informace o β -podjednotkách, potřebných pro funkci a onemocněních, které dysfunkce ClC proteinů způsobují.

1.2.2 Bakteriální chloridový antiporter ClC-ec1 z *Escherichia coli*

Modelovým proteinem pro studium celé proteinové rodiny je transportér ClC-ec1 z bakterie *Escherichia coli*, jehož struktura byla objasněna roku 2002.⁹ Relevantnost ClC-ec1 jako modelu pro ostatní transportéry ClC proteinové rodiny byla dlouho zpochybňována, z důvodu nízké sekvenční homologie ClC-ec1 a ostatních proteinů této rodiny. Až pozdější studie ukázaly, že oblasti zodpovědné za transport iontů jsou od bakterií po savce konzervovány, a tudíž lze tento transportér použít jako modelový protein pro studium transportního mechanismu ClC.^{31,32}

ClC-ec1 má molekulovou hmotnost přibližně 50 kDa a je lokalizován na plazmatické membráně bakterie *E. coli*. První studie proteinu předpokládaly, že se jedná o kanál a kromě jeho homodimerní struktury odhalily i jeho iontovou selektivní řadu: Cl^- , $\text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^-, \text{F}^- \gg \text{H}_2\text{PO}_4^-$, glutamatát⁻.¹⁶ Pozdější práce však ukázaly, že se jedná o striktní 2:1 Cl^-/H^+ transportér.²

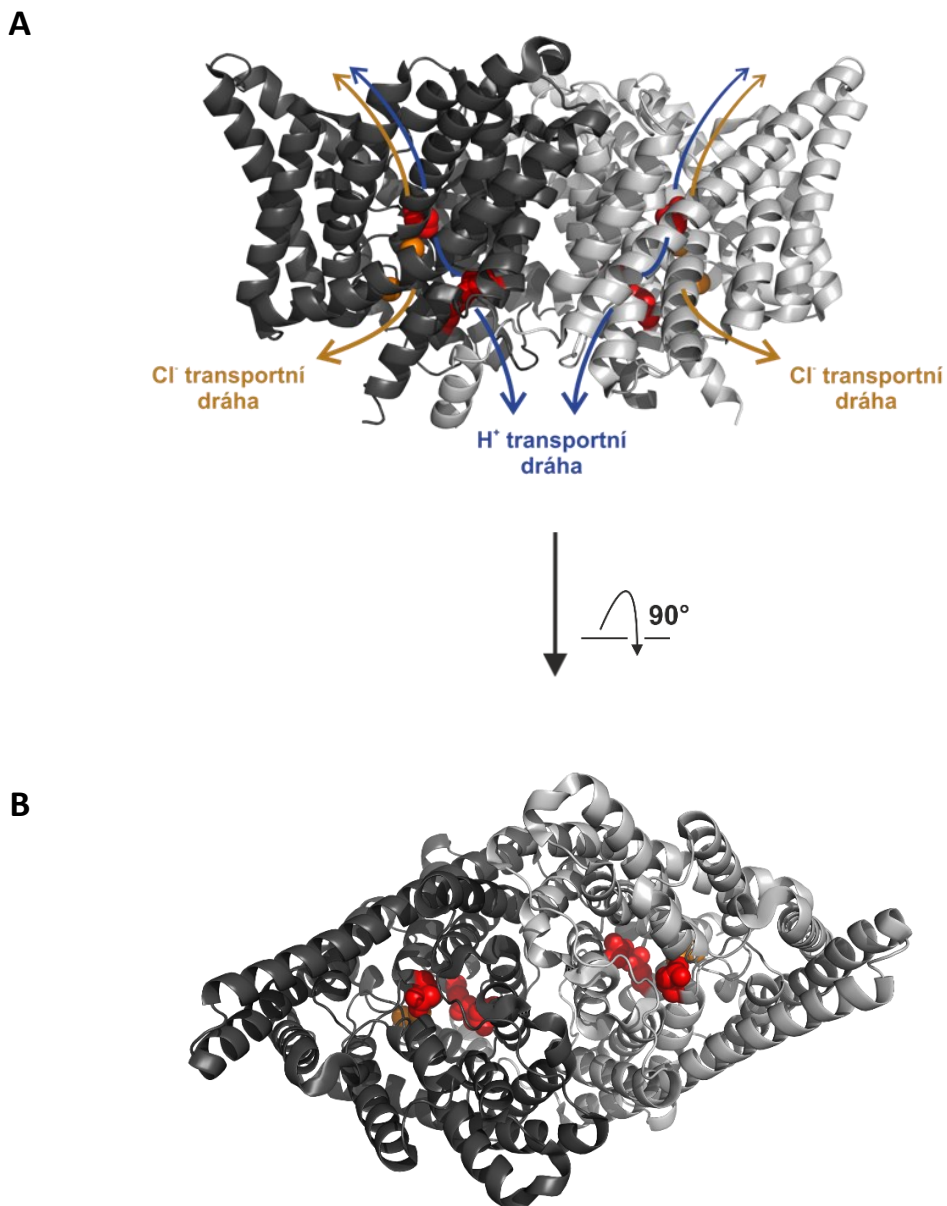
Struktura ClC-ec1 se vyznačuje základními rysy společnými pro celou ClC proteinovou rodinu. Jako již bylo zmíněno, protein je tvořen dvěma stejnými podjednotkami.¹⁶ Podjednotky tvoří 18 alfa helixů (ozn. A-R) (Obr. 2, str. 14) různých délek, z nichž 17 je alespoň částečně vnořených do membrány. Krystalová struktura ClC-ec1 odhalila pseudosymetrii uvnitř monomerů, kde helixy A-I tvoří stejný motiv jako helixy J-R, ale jejich orientace vzhledem k membráně je invertována.⁹ Mezi těmito doménami je umístěná iontová transportní dráha. Uprostřed transportní dráhy je zúžení tvořící selektivní filtr. V zúžené části najdeme tři místa pro vazbu iontů (S_{in} , S_{cen} , S_{ex}). Centrální a interní místo je obsazeno chloridovým aniontem, přičemž Cl^- v pozici S_{in} je částečně desolvatovaný a částečně v kontaktu s intracelulární kapalinou. Cl^- v pozici S_{cen} je vnořen do vnitra proteinu, kde interaguje s aminokyselinami tvořícími selektivní filtr (tzv. interní bránu pro transport) – S107 a Y445. Mutací ekvivalentních reziduí u proteinů z ClC proteinové rodiny bylo zjištěno, že S107 pravděpodobně zodpovídá za selektivitu³³ a Y445 se podílí na spřažení transportu a vazbě chloridů.³⁴ Krystalová struktura ClC-ec1⁹ je zobrazena na Obr. 3, str. 15.



Obrázek 2 – Schématické znázornění topologie jedné podjednotky ClC-ec1. Jednotlivé helixy A-R jsou zobrazeny jako válce, domény jsou odlišeny barevně. Na koncích helixů, podílejících se na interakcích s Cl⁻, jsou označeny parciální náboje.⁹

Transportní mechanismus ClC-ec1 není stále plně objasněn. Studie ukázaly, že se vymyká klasickému mechanismu tzv. střídavému přístupu (z angl. alternate access). Vazba obou substrátů probíhá simultánně. Chloridový iont se váže první, a to do míst S_{cen} a S_{in}, a tím zvýhodňuje přenos H⁺ na Glu(ex).³⁵

Transport chloridových iontů v ClC-ec1 probíhá již zmíněnou iontovou transportní dráhou. V základním stavu je pozice S_{ex} obsazena zbytkem aminokyseliny Glu(ex)(E148), která blokuje průchod Cl⁻, a také svým záporným nábojem kompenzuje kladné náboje na koncích helixů N a F, které by se jinak odpuzovaly. Cl⁻ takto uzavřenou transportní dráhou neprochází (tzv. externí brána) a pro otevření transportéru je nutná změna pozice postranního řetězce Glu(ex). Ta může být navozena protonací Glu(ex). Tuto hypotézu se podařilo ověřit pomocí dvou mutantů E148Q (Obr. 5, str. 17) a E148A, u nichž došlo k změně orientace postranního řetězce Glu(ex) směrem do extracelulárního prostoru, zprůchodnění Cl⁻ transportní dráhy a k vazbě Cl⁻ i v místě S_{ex}.^{2,10} Narušení vnitřní i vnější brány mutací reziduí Glu(ex) i Y445 způsobí značné zvýšení rychlosti průchodu Cl⁻ přes membránu a takto připravený mutant se označuje jako podobný kanálu (z angl. channel-like).³⁶

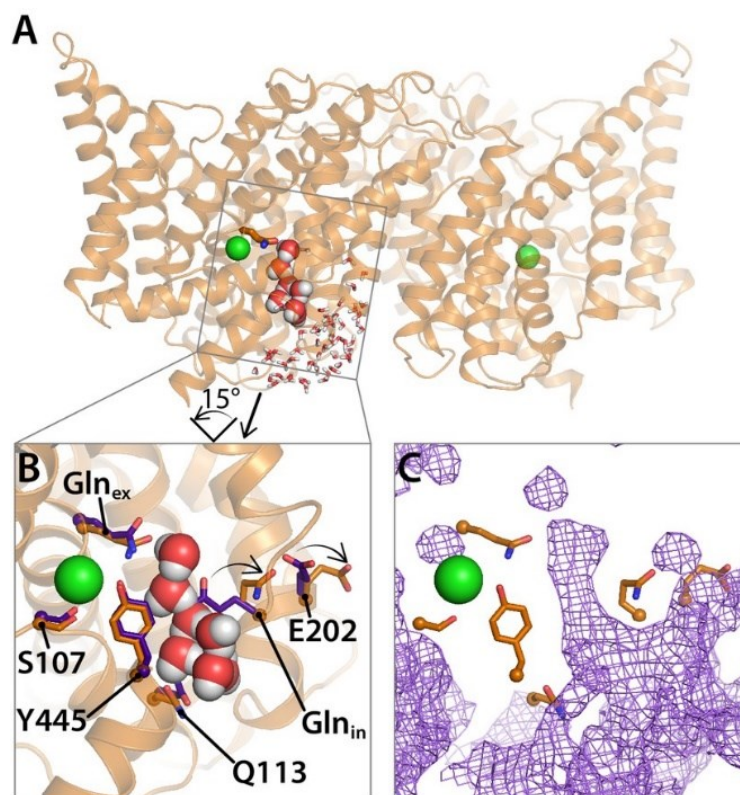


Obrázek 3 – Struktura *CIC-ec1* – pohled z boku (A) a pohled shora (B). Jednotlivé podjednotky jsou odlišeny barevně, transportní dráhy pro Cl^- ionty jsou znázorněny modrou barvou, transportní dráhy pro H^+ jsou znázorněny žlutou barvou. Červeně jsou zobrazeny glutamáty důležité pro transport protonů (E148, E203 a E113) a oranžově jsou znázorněny atomy Cl^- navázané ve vazebných místech.^{9,37} Přípraveno v Pymolu.³⁸ (PDB ID: 1OTS)

Transport chloridů je v *CIC-ec1* spřažen s přenosem protonů přes membránu. Přesný mechanismus transportu protonů dosud nebyl úplně objasněn. První hypotézy očekávaly, že do transportu protonů bude zapojen Glu(in)(E203), který je na rozdíl od Glu(ex), evolučně konzervován jen u přenašečů, transportu Cl^- se neúčastní a u CIC kanálů je nahrazen valinem. Navržená transportní dráha zahrnovala přenos protonu z Glu(in) na Glu(ex) prostřednictvím molekul vody, které se uvnitř proteinu seřazují za pomoci reziduí E202, E148 a A404. Na základě pozice těchto reziduí

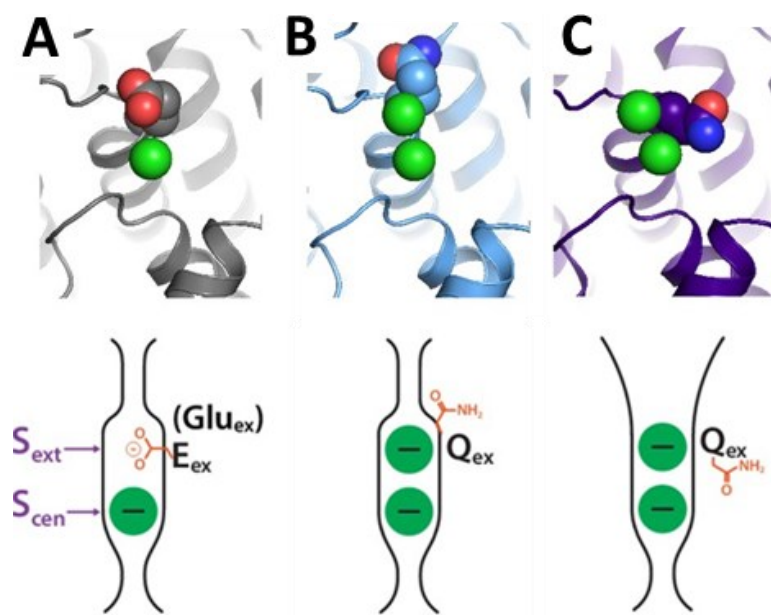
v proteinu je patrné, že transportní dráha H^+ se na intracelulární straně s Cl^- transportní dráhou rozchází.^{37,39} (Obr. 3, str. 15)

Nejnovější studie však zpochybňují roli Glu(in) jako přenašeče protonů na Glu(ex), jelikož jeho mutace na alanin (mutant E203A) nebo glutamin (mutant E203Q) nevede k zastavení transportu H^+ , ale jen ke snížení rychlosti transportu. Pomalejší transport je pravděpodobně způsoben nižší efektivitou tvorby vodních řetězců, které se nejefektivněji tvoří, když je Glu(in) protonován. Do regulace vodních řetězců se zapojuje také glutamát 113 (Obr. 4). Tyto poznatky o řetězcích vody a roli Glu(in) v transportu H^+ byly získány studiem QQQ mutantu (E148Q, E203Q a E113Q) (Obr. 5, str. 17).⁴⁰ Mutant byl navržen jako model plně protonovaného stavu proteinu na základě poznatků publikovaných v roce 2015, které naznačily, že snížením pH dochází k konformačním změnám v blízkosti Glu(ex).⁴¹ Později byla tato prostorová struktura ClC-ec1 označena za konformaci proteinu otevřeného směrem ven (z angl. outward-facing conformation).⁴²



Obrázek 4 – Znárodnění vodních řetězců v proteinu ClC-ec1, navrhnutých na základě dat z MD simulace (A). Přiblížení místa, kde vzniká řetězec vody (B). Zeleně jsou znázorněny chloridové ionty, fialově postranní řetězce reziduí, podílejících se na transportu, v jejich základní pozici a oranžově jsou znázorněny v pozici po rotaci a tvorbě řetězců vody. Molekuly vody jsou znázorněny pomocí červeno-šedých kuličkových modelů. Na obrázku C lze vidět hustotu vody (fialově) v přiblížené části proteinu.⁴⁰

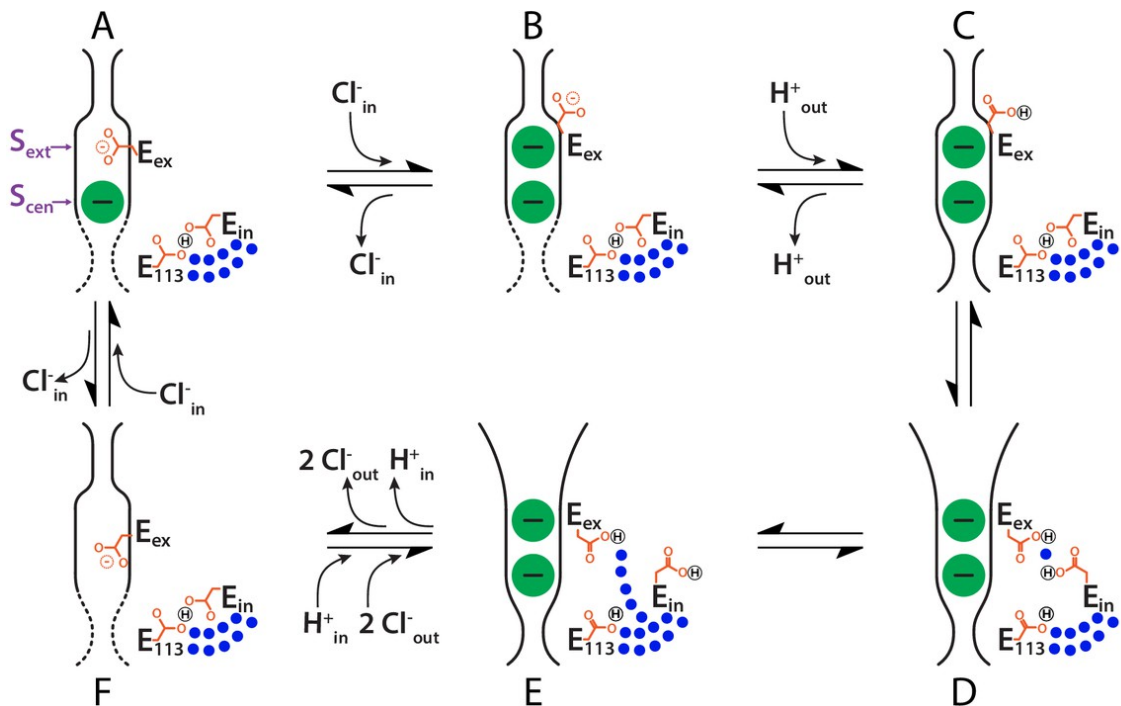
Studium QQQ mutantu ukázalo, že jeho konformace se liší od prostorového uspořádání *ClC-ec1* při neutrálním pH a zároveň se blíží konformaci *ClC-ec1* v prostředí nízkého pH. Mutovaný protein podle předpokladů transportuje ionty rychleji než *ClC-ec1* a také umožnil objev nové orientace postranního řetězce Glu(ex) a to otočení směrem do hydrofobního jádra proteinu (Obr. 5C) a přispěl k objasnění role vodních řetězců v transportu iontů. V QQQ mutantu se nacházely řetězce vody propojující Gln(ex) s intracelulárním prostředím. Většina z nich vedla kolem Q113 a to paralelně s transportní dráhou Cl^- .⁴⁰



Obrázek 5 – Konformace postranního řetězce Glu(ex)(E_{ex}) u *ClC-ec1*(A) a Gln(ex)(Q_{ex}) u mutantů E148Q(B) a QQQ (E148Q/E203Q/E113Q) (C). Chloridové ionty jsou označeny zeleně, červeně jsou označeny atomy kyslíku a modře atomy dusíku na Glu(ex)/Gln(ex).⁴⁰ (upraveno).

Od objevení *ClC-ec1* antiporteru bylo představeno více přepokládaných mechanismů transportu, které byly postupně aktualizovány v závislosti na nově získaných poznatcích.^{42–45} Chavan et al. ve svém článku představil nejnovější aktualizovaný model s inkorporovanými informacemi ze studia QQQ mutantu *ClC-ec1*. Upravený transportní mechanismus *ClC-ec1* (Obr. 6, str. 18) začíná v základním stavu proteinu *ClC-ec1*, kdy Glu(ex) se nachází v pozici S_{ext} a je deprotonován. Pozice S_{cen} je obsazena Cl^- (stav A). Následuje vazba druhého Cl^- z cytosolu buňky a rotace postranního řetězce Glu(ex) směrem do extracelulárního prostoru (stav B). Poté je protonován Glu(ex) z extracelulárního prostoru, což způsobí konformační změnu Glu(ex) (stav C) a dále změnu prostorového uspořádání celého proteinu (stav D). Tento stav je reprezentován QQQ mutantem a představuje konformaci proteinu otevřeného

směrem do extracelulárního prostoru. V tomto stavu dochází k rozšíření na extracelulární straně a tedy zpřístupnění vazebného místa S_{ex} pro vazbu Cl^- či jeho uvolnění do extracelulárního prostoru. Postranní řetězec Glu(ex) je otočen do hydrofobní části proteinu, kde se dostává do blízkosti Glu(in). Glu(in) je velice flexibilní a často mění pozici postranního řetězce. Vychýlení Glu(in) z původní pozice vede k otevření proteinu pro tvorbu vodních řetězců vedoucí až po Glu(ex) (stav E). Dochází k transportu protonu z Glu(ex) do vnitra buňky a k rotaci postranního řetězce Glu(ex) zpět do transportní dráhy, kde vytěsňuje Cl^- ionty. Hnací silou je záporný náboj deprotonovaného Glu(ex) (stav F). Pokud opět dojde k vazbě Cl^- do místa S_{cen} , Glu(ex) se posune do pozice S_{ex} , což vede k přechodu proteinu zpátky na stav A.⁴⁰ Transport může probíhat oběma směry, i když transport Cl^- dovnitř buňky spřažený s transportem H^+ do extracelulárního prostoru je silně preferován.⁴⁶



Obrázek 6 – Transportní mechanismus ClC-ec1. Jednotlivé stavy jsou označeny A-F. Modře jsou vyznačeny molekuly vody a zeleně Cl^- ionty. Přerušovanou čarou jsou znázorněny části, o kterých nemáme dostatek poznatků pro určení prostorové struktury – jedná se o konformaci proteinu otevřeného směrem dovnitř (z angl. inward-facing conformation).⁴⁰

1.3 Studium integrálních membránových proteinů

Detailní studium struktury a dynamiky integrálních membránových proteinů většinou vyžaduje jejich uvolnění z membrány.⁴⁷ Aby při solubilizaci nedošlo k narušení prostorové struktury proteinu a k následné ztrátě jeho funkce, je nutno hydrofobní prostředí membrány nahradit umělým hydrofobním prostředím. Pro experimentální účely bylo vyvinuto více způsobů solubilizace membránových proteinů.

Nejjednodušší a nejpoužívanější umělé hydrofobní prostředí lze vytvořit pomocí detergentů.⁴⁸ Detergenty jsou látky, které ve své struktuře obsahují hydrofobní i hydrofilní část, což umožňuje interakci s hydrofobními částmi proteinu, zanořenými v membráně i s molekulami vody v roztoku. Pokud je detergent ve vodném roztoku v dostatečné koncentraci (tzv. kritická micelární koncentrace, CMC) vytváří struktury micel, které jsou schopny nahradit biologickou membránu. Problémem detergentové solubilizace je rozdílnost oproti biologickým membránám. Jelikož se nejedná o lipidické molekuly, nelze sledovat interakce lipidů se strukturami studovaného proteinu. Protein v detergentovém prostředí také může zaujmout odlišnou konformaci, což vede k ovlivnění jeho funkce či stability. Detergenty jsou také často nekompatibilní s biofyzikálními metodami.

Přirozenější variantou umělé membrány jsou lipidové nanodisky.⁴⁹ Strukturálně jsou tvořeny skeletem z apolipoproteinového derivátu, který obklopuje lipidy tvořící hydrofobní prostředí. Složení lipidů a velikost nanodisků lze regulovat a je to předmětem optimalizace pro každý studovaný protein. Roli zde hrají délka použitého apolipoproteinu A1, volba typu lipidů a poměr mezi proteinovými a lipidovými složkami směsi.

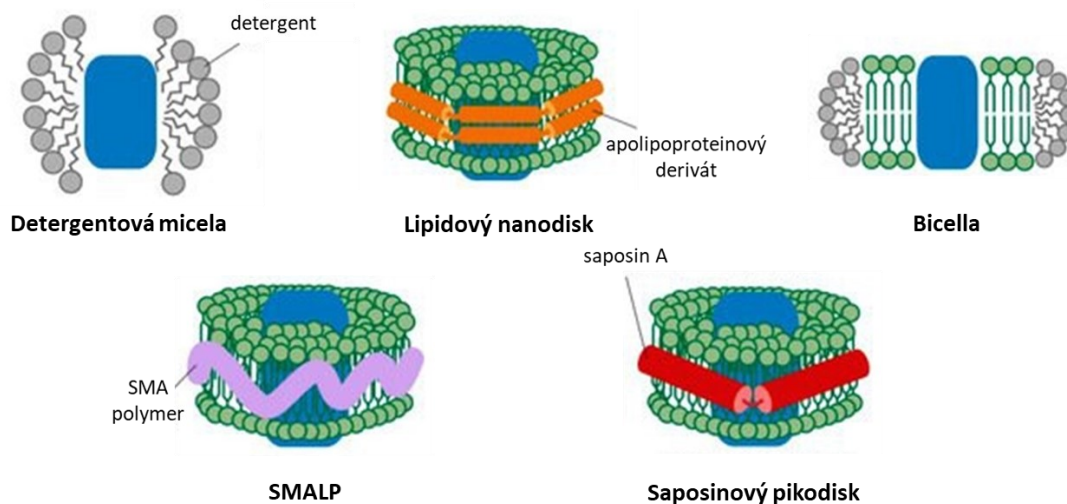
Další možností jsou lipidové bicely, vytvářené v kontrolovaných podmínkách pomocí specifického poměru fosfolipidů s krátkým a dlouhým řetězcem.⁵⁰ Strukturálně se jedná o malou lipidovou dvouvrstvu, která je na okrajích stabilizována detergentem. Před inkorporací proteinů do nanodisků či bicel je však nutná izolace proteinů pomocí detergentu.

Možností, jak se vyhnout použití klasických detergentů, je přímo solubilizovat membránu pomocí kopolymeru styrenu a anhydridu kyseliny maleinové.⁵¹ Tyto tzv. nativní SMALP (z angl. styrene maleic acid lipid particles) jsou seskládány

ze SMA polymerů a lipidů původní membrány. Velikost SMALP nanodisků je flexibilní a přizpůsobuje se velikosti proteinu, který se do nich inkorporuje.

Posledním příkladem jsou saposinové pikodisky. Skelet pikodisků tvoří segment proteinu saposinu, který lze snadno připravit heterologní expresí v baktériích a jak název napovídá, jsou menší než klasické nanodisky.⁵² Saposinové pikodisky se samovolně skládají v roztoku, který obsahuje saposin A, lipidy a membránový protein solubilizovaný v detergentu. Jiný způsob vytvoření saposinových pikodisků je přidání saposinu přímo k izolovaným membránám. V tomto případě je lipidické složení pikodisku ekvivalentní složení původní biologické membrány. Některé lipidy vytvoření saposinových pikodisků podporují, např. fosfatidylcholin a fosfatidylserin, naopak fosfatidylethanolamin není vhodný pro jejich přípravu.

Všechny výše zmíněné způsoby solubilizace membránových proteinů jsou graficky znázorněny na Obr. 7.



Obrázek 7 – Schematické znázornění různých struktur používaných pro solubilizaci integrálních membránových proteinů.⁵³ (upraveno)

1.3.1 Metody studia struktury a biologického mechanismu membránových proteinů

Objasnění struktury a dynamiky membránových proteinů je nezbytný krok k pochopení jejich biologické funkce.⁵⁴ Narušení jejich biologického mechanismu, např. vlivem mutace klíčového rezidua, často vede k poškození, které pro jedince představuje zdravotní komplikace. Objasnění mechanismu otevírá možnosti pro vývoj léčiv, cílených na konkrétní část mechanismu.

Jednou z metod používaných pro objasnění struktury proteinů je rentgenová krystalografie (RTG krystalografie). Patří mezi metody s vysokým rozlišením, protože poskytuje struktury proteinů s rozlišením na úrovni atomů. Experiment vyžaduje protein v podobě krystalu, jehož příprava může být u dynamických či heterogenních systémů obtížná. Krystal proteinu po vystavení rentgenovému záření poskytuje mapy elektronové hustoty, které reprezentují strukturu krystalizovaných molekul.⁵⁵ Pro chloridový antiporter byla krystalografie stěžejní studijní metodou, přestože byla schopná zachytit protein pouze v jednom vazebném stavu, což bylo dáno požadavky na krystalizační podmínky. Pomocí rentgenové krystalografie byla objasněna krystalová struktura ClC-*ec1* a jeho mutantů, což vedlo k objevení různých pozic Glu(ex) v rámci jeho transportního mechanismu.^{9,10,40}

Pro strukturní studie se používá také kryo-elektronová mikroskopie (Cryo-EM). Jedná se o metodu založenou na zmražení čistého proteinu v roztoku pomocí kapalného ethanu. Vznikne tenká vrstva amorfního ledu, která je následně použita pro analýzu zmraženého proteinu pomocí transmisní elektronové mikroskopie při teplotě kapalného ethanu. Metoda má široké použití pro studie velkých proteinových komplexů či celých virových částic, nicméně její využití pro nízkomolekulární proteiny je zatím obtížné.⁵⁶ V posledních letech došlo k výraznému pokroku metody z hlediska rozlišení, což umožňuje posouvat velikostní limit metody k menším proteinům.⁵⁷ Pomocí Cryo-EM byly sledovány na pH závislé konformační změny proteinů z ClC proteinové rodiny, které doprovázejí otevření transportních drah antiporterů. Tato studie z roku 2024 zachytává ClC-*ec1* ve dvou stavech – stav s otevřenými transportními drahami a uzavřenými transportními dráhami. Data ukazují, že obě transportní dráhy se otevírají vždy současně a samotné otevření je doprovázeno velkými konformačními změnami celých podjednotek.⁵⁸

Rentgenová krystalografie i Cryo-EM poskytují převážně statické obrázky, tedy neumožňují vždy kompletní sledování dynamiky proteinů. Změna konformace je však často podstatnou částí biologického mechanismu. Dynamiku proteinu lze lépe zachytit pomocí NMR spektroskopie,⁵⁹ která probíhá v roztoku, a zároveň umožňuje sledovat membránové proteiny přímo v jejich přirozených lipidových membránách.⁶⁰ Pomocí NMR lze vidět pouze jádra s nenulovým spinem, proto je před provedením experimentu nutné vzorek isotopově označit. Přejechy mezi energetickými hladinami

indukované magnetickým polem lze sledovat při specifických rezonančních frekvencích a na základě získaných dat modelovat strukturu proteinu. Jelikož je metoda schopná rozlišit atomy stejného prvku na základě změn lokálního magnetického pole vlivem stínění okolitých atomů, získané struktury mají atomární rozlišení. Pomocí NMR lze získat struktury malých až středně velkých proteinů, což je jednou z hlavních limitací metody.⁶¹ Pro NMR studie CIC proteinů byly použita jádra ^{19}F . Studie CIC-*ecI*, označeného fluorotyrosinem, zachytila konformační změny indukované různými koncentracemi Cl^- a H^+ iontů. Ty byly pozorovány na rozhraní podjednotek a v oblasti transportní dráhy Cl^- iontů.⁶²

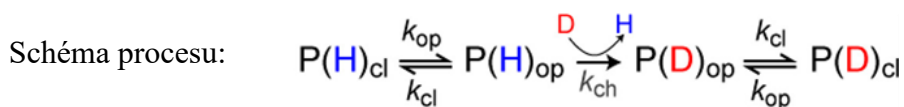
Pro studium dynamiky proteinů jsou užitečné i metody s nižším rozlišením. Sem lze řadit například vodík-deuteriovou výměnu spojenou s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS).^{63,64} HDX-MS v porovnání s výše zmíněnými metodami nedokáže určit polohu jednotlivých atomů v struktuře. Naopak umožňuje sledování dynamiky proteinů v roztoku v rozličných podmínkách (pH, iontová síla, teplota atd.) a zaměřovat se i na složité multiproteinové komplexy. Vzájemná komplementarita statických a dynamických i vysoce- a nízko-rozlišujících metod je patrná třeba z interpretace HDX-MS dat, která se často provádí pomocí dostupné krystalové struktury proteinů. V kontextu studia membránových proteinů je výhodou HDX-MS nízká spotřeba vzorku a možnost použít proteiny v nižších koncentracích, což snižuje riziko agregace proteinů.

1.3.2 Vodík-deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií (HDX-MS)

Vodík-deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií je analytická metoda, používaná pro studium konformace a dynamiky proteinů v roztoku.⁶⁵⁻⁶⁷ HDX-MS sleduje kinetiku výměny vodíků za deuteria po vložení studovaných proteinů do pufru připraveného v D_2O . K vodík-deuteriové výměně dochází na místech přístupných rozpouštědлу, přičemž přístupnost může být ovlivněna prostorovou strukturou proteinů a zapojením vodíků do vodíkových vazeb. Rychlost výměny je kromě prostorové struktury silně ovlivňována i hodnotou pH prostředí a teplotou.

V HDX-MS je sledována výměna amidických vodíků, protože jejich rychlost výměny je díky existenci proteinové struktury zpomalena na úroveň umožňující analýzu.⁶⁵ Aby k výměně došlo musí být amidový vodík v kontaktu s rozpouštědlem.

To je zabezpečeno lokálním otevřením struktury a následným sbalením. Zmíněné fluktuace v konformaci ovlivňují kinetiku výměny.^{68,69}

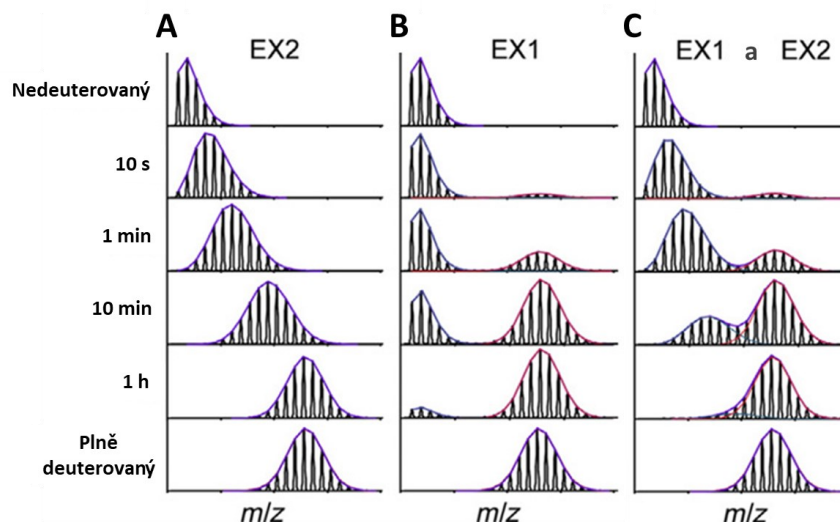


kde k_{op} – rychlostní konstanta otevření, k_{cl} – rychlostní konstanta uzavření, k_{ch} – rychlostní konstanta chemické výměny (závislá na teplotě, pH pufru a aminokyselinové sekvenci), P_{cl} – uzavřený stav proteinu, P_{op} – otevřený stav proteinu.^{68,69}

Na základě schématu lze rychlostní konstantu pozorované výměny (k_{HDX}) vyjádřit následovně:

$$k_{HDX} = \frac{k_{op} \times k_{ch}}{k_{cl} + k_{ch}} \quad (1)$$

kde k_{op} – rychlostní konstanta otevření, k_{cl} – rychlostní konstanta uzavření, k_{ch} – rychlostní konstanta chemické výměny (závislá na teplotě, pH pufru a aminokyselinové sekvenci).⁷⁰ Pokud je rychlost uzavření minimálně o deset řadů pomalejší než rychlost deuterace, amidy se deuterují před uzavřením a pozorována deuterace bude dána rychlostí otevření amidu vzhledem k rozpouštědлу. Tento typ kinetiky byl pojmenován EX1 kinetika. Pokud je tomu opačně, pozorujeme tzv. EX2 kinetiku. K uzavření dochází rychleji, než dochází k deuteraci, a proto než budeme deuteraci pozorovat, musí se struktura vícekrát otevřít. Pro proteiny řídicí se EX2 kinetikou bude celková rychlost výměny dána nejen rychlostí výměny vodíků za deuteria, ale taky poměrem rychlosti otevření a uzavření struktury. Studie ukazují, že většina proteinů v nativním stavu vykazuje EX2 kinetiku.^{71,72} V hmotnostní spektrometrii (MS) pozorujeme H/D výměnu kinetikou EX2 jako změnu tvaru isotopové obálky, která se navíc kontinuálně posouvá směrem k vyšším hodnotám m/z (Obr. 8A, str. 24). Pro EX1 kinetiku je typická bimodální distribuce. První populace je nedeuterovaná část vzorku, zatímco druhá populace je již vysoce deuterovaná. S delším časem deuterace bude docházet k růstu intenzity deuterované populace a k poklesu intenzity nedeuterované populace (Obr. 8B, str. 24). Nicméně spektra obsahující čistou EX1 kinetiku jsou poměrně vzácná a obvykle pozorujeme směsné obálky EX1 a EX2 kinetiky (Obr. 8C, str. 24). Toto chování je časté u membránových proteinů.^{73–75}



Obrázek 8 – Modelové MS spektra pro možné kinetiky HDX. EX2 kinetika (A) a EX1 kinetika (B) a kombinace EX1 a EX2 kinetiky (C).⁷⁵ (upraveno)

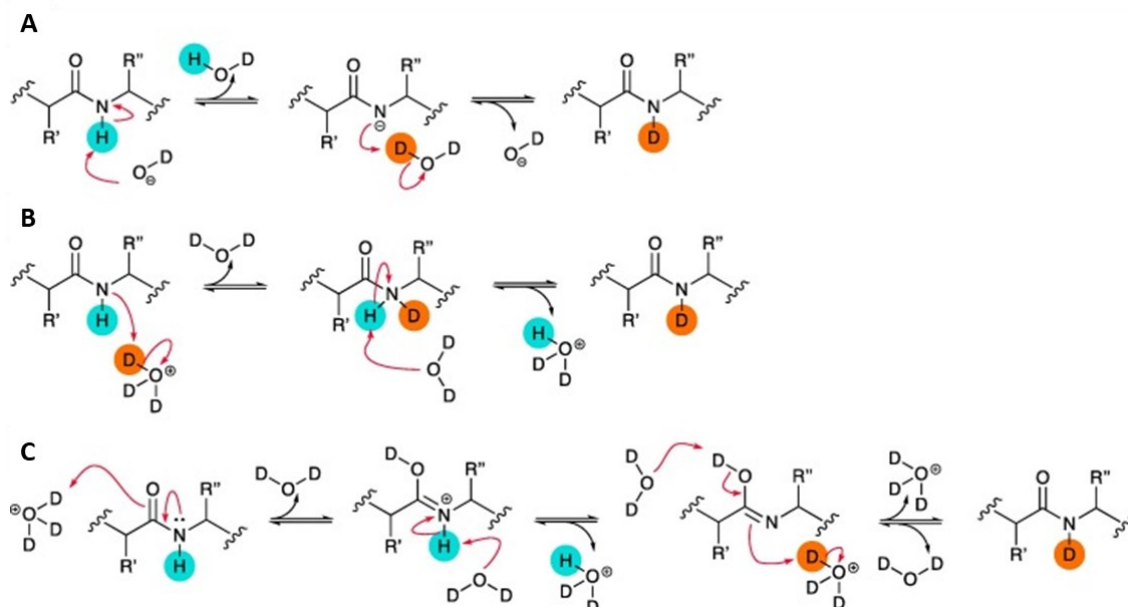
1.3.2.1 Faktory ovlivňující rychlost vodík-deuteriové výměny

Vedle přístupnosti solventu a zapojení vodíkových můstků, jsou i další faktory ovlivňující rychlost vodík-deuteriové výměny. Zásadní je hodnota pH pufru, ve kterém experiment provádíme.^{76,77} Vodík-deuteriová výměna je katalyzovaná jak kyselé, tak bazicky i pomocí vody.

Vliv jednotlivých mechanismů katalýzy na celkovou rychlostní konstantu výměny lze vyjádřit následnou rovnicí:

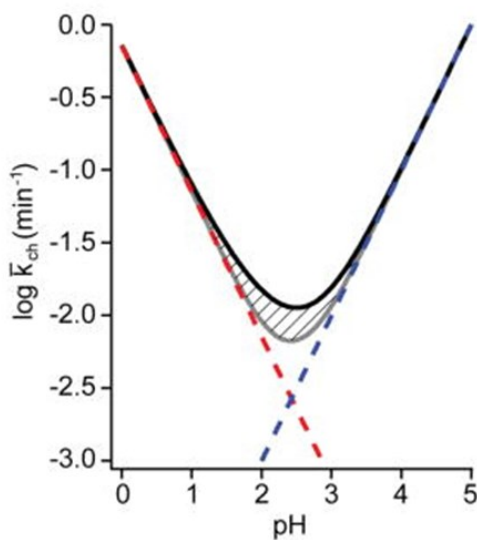
$$k_{\text{ch}} = k_{\text{int,H}}[\text{H}^+] + k_{\text{int,OH}}[\text{OH}^-] + k_{\text{H}_2\text{O}}[\text{H}_2\text{O}] \quad (2)$$

přičemž $k_{\text{int,H}}$, $k_{\text{int,OH}}$ a $k_{\text{H}_2\text{O}}$ jsou vnitřní rychlostní konstanty výměny katalyzované kyselé, bazicky a vodou. Při bazicky katalyzované výměně je vodík z amidového dusíku odstraněn pomocí OD^- aniontu a následně dochází k reprotonaci pomocí molekul D_2O v roztoku (Obr. 9A, str. 25). Při katalýze kyselinou dochází k výměně dvěma různými mechanismy. První způsob výměny sestává z protonace amidového dusíku deuteriem z D_3O^+ a následného přesunu H^+ z amidového dusíku na molekulu vody (Obr. 9B, str. 25). Jinou možností je protonace kyslíku amidu vedoucí k zvýšené kyselosti amidového dusíku. Dochází k deprotonaci amidového dusíku a následné protonaci pomocí D_3O^+ (Obr. 9C, str. 25). Katalýza vodou je zanedbatelná.



Obrázek 9 – Schémata mechanismů vodík-deuteriové výměny katalyzované bazicky (A) a kyselí (B, C).⁷⁸

Závislost rychlosti H/D výměny na pH je odlišná pro různé aminokyseliny.^{77,79} Určující je velikost i elektronegativita postranního řetězce aminokyselin tvořících danou peptidovou vazbu. Obecně se jako hodnota minimální výměny udává pH 2,5. Pod touto hodnotou pH dochází převážně ke kyselé katalyzované výměně. Při pH nad 2,5 převažuje výměna katalyzovaná bazicky. Závislost rychlosti výměny na pH byla získána experimentálně, připomíná tvar písmena V s minimem v pH 2,5 (Obr. 10). Ze získané závislosti lze pak určit, že změna pH o 1 jednotku znamená změnu rychlost H/D výměny o řád (10×).



Obrázek 10 – Závislost logaritmu rychlostní konstanty chemické výměny vodíku za deuterium na hodnotě pH roztoku.⁷⁹ (upraveno)

Dalším z faktorů ovlivňujících rychlost vodík-deuteriové výměny je teplota. Teplota ovlivňuje disociaci D_2O , a tedy i koncentraci D_3O^+ a OD^- v roztoku, což má vliv na rychlost výměny. Obecně se udává, že každá změna o $10\text{ }^\circ\text{C}$ vede zhruba k trojnásobné změně rychlosti.^{77,80} Disociační konstanta D_2O je ovlivněná i změnou tlaku. Efekt změny tlaku na rychlost výměny je však minimální.⁸¹ Popsán byl i efekt iontové síly či přídavku organického rozpouštědla na rychlostní konstantu chemické výměny k_{ch} .^{79,82} Všechny tyto parametry se však udržují během pokusu konstantní, aby byl sledován pouze vliv struktury proteinu a jeho interakcí s ligandy.

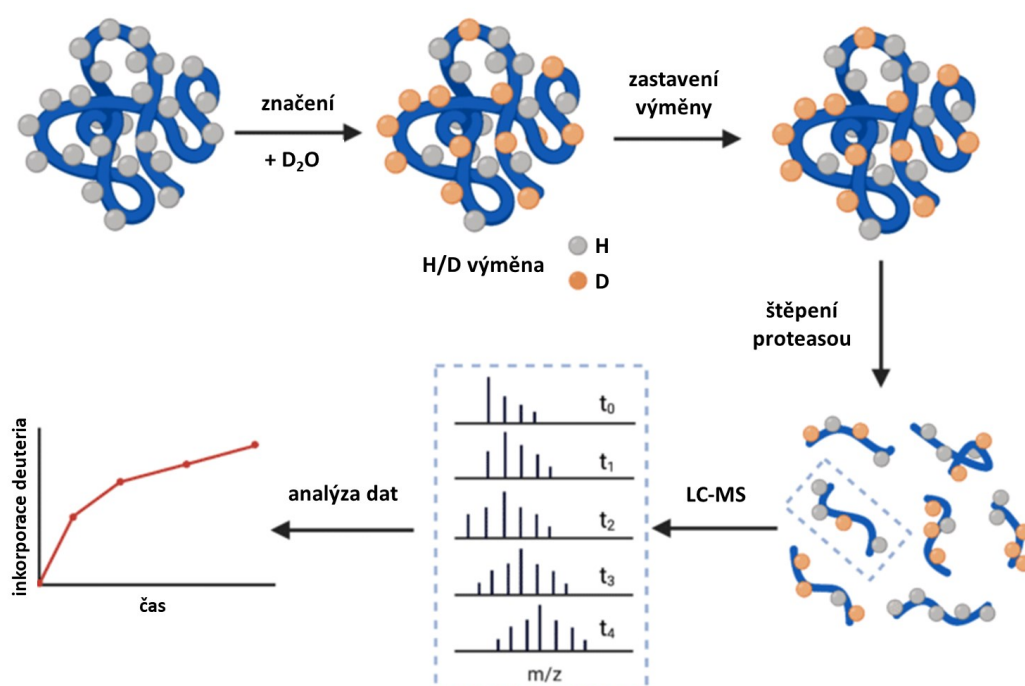
1.3.2.2 Experiment vodík-deuteriové výměny spojené s hmotnostní spektrometrií

Experiment HDX-MS sestává z několika kroků. Prvním je značení proteinů deuteriem, kdy studovaný protein v H_2O pufru ředíme identickým pufrům připraveným v D_2O . Nejčastěji se používá desetinásobné ředění, i když různé studie využívaly vyššího nebo i nižšího ředícího poměru.⁸³ Krok značení vyžaduje pečlivé naplánování časových bodů a podmínek, při kterých budeme experiment provádět. Časové body musí být vhodně zvolené tak, aby pokrývaly co nejširší škálu a umožnily zachycení velmi rychlé výměny nestrukturovaných částí i výměny silně chráněných amidových vodíků.⁸⁴ Po označení proteinu deuteriem následuje zastavení výměny okyselením vzorku na pH 2,5 a snížením teploty na $0\text{ }^\circ\text{C}$.⁸⁵

Kromě vzorků, značených po dobu předem stanovených časových intervalů, jsou součástí experimentu nedeuterované a plně deuterované kontroly. Nedeuterovaná kontrola slouží jako reference počátečního stavu proteinu, je zohledňována při výpočtu deuterace a slouží k identifikaci peptidů. Připravuje se stejně jako ostatní vzorky, kromě přídavku D_2O pufru, místo něhož se přidá H_2O pufr stejného složení.⁸⁶ Maximálně deuterovaný vzorek je důležitý pro sledování míry zpětné výměny. Maximální deuteraci lze dosáhnout inkubací proteinu delší dobu při nízkém pH v přítomnosti denaturačních činidel a následným značením deuteriem. Jiný způsob přípravy maximálně deuterovaného vzorku je štěpení proteinu vhodně zvolenou proteasou, následné vysušení a resuspendace v deuteriovém pufru. Nakonec výměnu zastavíme stejně jako u ostatních vzorků.^{85,87}

Pro analýzu vzorků se následně využívá hmotnostní spektrometrie.⁸⁷ Používají se dva přístupy – „bottom-up“⁸⁸ a „top-down“⁸⁹ V přístupu „top-down“ jsou označené

proteiny po ionizaci elektrosprejem fragmentovány pomocí techniky elektronového záchytu/transportu (ECD/ETD). Při této fragmentační technice, na rozdíl od např. kolizně indukované disociace (CID), nedochází k migraci deuterií, a tím ke ztrátě informace o značení. Množství inkorporovaných deuterií je pak spočteno z hmotnostních posunů fragmentových iontů.⁸⁹ Nejvíce používaný je však přístup „bottom-up“ (Obr. 11), kdy jsou vzorky po zastavení vodík-deuteriové výměny štěpené proteasami na peptidy, separovány pomocí kapalinové chromatografie a následně jsou analyzovány hmotnostní spektrometrií, nejčastěji s elektrosprejovou ionizací.⁸⁸



Obrázek 11 – Schéma analýzy vzorků vodík-deuteriové výměny pomocí přístupu „bottom-up“.⁹⁰ (upraveno).

Jedním ze zásadních kroků přístupu „bottom-up“ je proteolytické štěpení proteinů. Pro vzorky vodík-deuteriové výměny se používají kyselé proteasy. Jejich optimum je v kyselém pH, kdy je výměna vodíků za deuteria nejpomalejší.⁹¹ Nejběžněji používaným enzymem je nespecifická proteasa pepsin.⁹² Dále se používají i další proteasy, např. nepenthesin – proteasa se širokou specifitou⁹³ nebo semispecifická kyselá prolyl endopeptidasa z *Aspergillus niger*.⁹⁴ Zvolení vhodné proteasy pro štěpení sledovaného proteinu je klíčové pro dosažení co nejvyššího sekvenčního pokrytí, ale také lepšího prostorového rozlišení. U některých proteinů se vyplácí použití kombinace více proteas.⁹¹ Vysokou efektivitu štěpení lze dosáhnout použitím proteasy imobilizované

na koloně. Proteasové kolony umožňují štěpení za velmi krátkou dobu (desítky sekund), díky vysokému poměru proteasa:substrát. Zkrácení času štěpení umožňuje zvýšení teploty proteolýzy bez výrazného nárůstu zpětné výměny, a tím zlepšení efektivity štěpení.^{95,96}

Chromatografický krok sestává ze systému dvou kolon. První kratší kolona slouží k zachycení a odsolení peptidů získaných štěpením značených proteinů. Druhá kolona je delší a slouží k separaci peptidů.⁸⁷ K separaci dochází na kolonách s reverzní fází, nejčastěji s C18 nosičem. V případě membránových proteinů s vysokým obsahem hydrofobních částí se zařazují kolony s kratším alkylovým řetězcem.⁹⁷ Při separaci je nutné dodržet podmínky, při kterých je vodík-deuteriová výměna minimální. Potřebné pH lze dosáhnout použitím běžných mobilních fází (např. voda:acetonitril s kyselinou mravenčí) a teplota je regulována vložením kolony např. do ledové lázně.⁸⁷ Dalším opatřením pro minimalizaci zpětné výměny je zkrácení gradientu.⁹⁸ Krátký gradient a nízká teplota výrazně snižují efektivitu separace. Zlepšení separace přinesl vývoj UPLC systémů (kapalinová chromatografie při ultravysokém tlaku), které využívají kolony s malými částicemi, a díky tomu poskytují dobré rozlišení i při podmínkách minimální vodík-deuteriové výměny.⁹⁹

Peptidy z kapalinové chromatografie putují do hmotnostního spektrometru. Nejčastěji se používá ionizace elektrospřem, která je lehce propojitelná s kapalinovou chromatografií.⁸⁷ Nastavení ionizace pro analýzy HDX vzorků se odlišuje od běžných metod – snižují se napětí na čóčkách iontové dráhy a také se využívá nižší teplota vyhřívání kapiláry, aby se zabránilo přílišné aktivaci iontů.¹⁰⁰ Z analyzátorů se nejvíce uplatňují kvadrupól spojený s analyzátozem doby letu (Q-TOF) a analyzátozy založené na elektrostatické pasti – orbitrap. Oba typy analyzátozů poskytují dostatečně vysoké rozlišení, aby byla dobře patrná isotopová obálka i delších peptidů a bylo tak možné spolehlivě odečítat úroveň deuterace.¹⁰¹ Pro lepší rozlišení lze zařadit analyzátoz iontové mobility, která peptidy dělí na základě tvaru a dokáže oddělit i signály o identickém m/z, které by jinak byly nerozlišitelné.¹⁰²

Pro analýzu naměřených dat HDX-MS experimentů byla vyvinuta řada programů, obecné schéma postupu je však pro všechny programy stejné.⁸⁶ V prvním kroku je vytvořen list peptidů. Používáme k tomu nedeuterované kontroly, které jsou analyzovány pomocí MS/MS a následně je pro identifikaci peptidů použit prohledávací algoritmus,

např. MASCOT¹⁰³. Takto identifikované peptidy jsou lokalizovány v LC-MS analýze nedeuterovaného vzorku, jsou dohledány všechny nábojové stavy a zapsán retenční čas. Získaný seznam peptidů je pak programem použit pro přiřazení peptidů z deuterovaných vzorků. Stanovení úrovně deuterace konkrétních peptidů se dělá vzhledem k nedeuterované kontrole podle vztahu:

$$\%D = 100 \times \frac{M_{PD} - M_{ND}}{N} \quad (3)$$

kde $\%D$ je procento deuterace, M_{PD} je průměrná molekulová hmotnost částečně deuterovaného peptidu, M_{ND} je průměrná molekulová hmotnost nedeuterovaného peptidu a N je počet vyměnitelných amidových vodíků.⁸⁷

Data je možné také korigovat na ztrátu deuterace pomocí plně deuterované kontroly. V tomto případě jsou procenta deuterace vypočtena podle rovnice:

$$corr \%D = 100 \times \frac{M_{PD} - M_{ND}}{M_{FD} - M_{ND}} \quad (4)$$

kde $corr \%D$ je procento deuterace po korekci na zpětnou výměnu, M_{PD} je průměrná molekulová hmotnost částečně deuterovaného peptidu, M_{ND} je průměrná molekulová hmotnost nedeuterovaného peptidu a M_{FD} průměrná molekulová hmotnost plně deuterovaného peptidu.⁸⁷

Data jsou vizualizována nejčastěji pomocí grafů závislosti deuterace peptidu na čase výměny (tzv. „uptake ploty“) nebo lze HDX data zobrazit na již známe struktuře proteinu.⁸⁶ Dále lze použít vizualizační programy (např. MSTools) pro zobrazení výsledku pomocí teplotních map (z angl. „heat map“).¹⁰⁴ Pro porovnání dvou stavů proteinu se používají např. diferenční teplotní mapy.¹⁰⁴

2 Cíle práce

- exprese a purifikace H^+/Cl^- antiporteru *ClC-ec1* z *E.coli* a jeho QQQ mutantu (E148Q/E203Q/E113Q)
- optimalizace proteolytického štěpení *ClC-ec1* pomocí imobilizovaných proteas za podmínek HDX-MS
- porovnání konformace *ClC-ec1* a QQQ mutantu při různých pH použitím HDX-MS
- sledování vlivu velmi nízkého pH na konformaci *ClC-ec1* použitím HDX-MS

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

1,2-bis(dimethylamino)ethan (TEMED)	Biorad, USA
Acetonitril (LC-MS čistota)	Merck, USA
Agar	Oxoid, USA
Akrylamid	ROTH, Německo
Ampicilin	Sigma Aldrich, USA
Anhydrotetracyklin hydrochlorid	Fluka, Švýcarsko
Coomassie brilliant blue R-250	VWR, USA
D ₂ O	VWR, USA
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	Lachner, ČR
Dithiothreitol (DTT)	Molekula, Francie
DNAsa	Thermo Scientific, USA
Dodecylsulfát sodný (SDS)	J. T. Baker, USA
Ethanol	VWR, USA
Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)	Serva, Německo
Glycerol	VWR, USA
Glycin	Sigma Aldrich, USA
Hepes	ROTH, Německo
Hydrogenfosforečnan draselný (K ₂ HPO ₄)	Lachner, ČR
Hydrogenfosforečnan sodný (NaHPO ₄)	Sigma Aldrich, USA
Imidazol	Sigma Aldrich, USA
Kvasinkový extrakt	VWR, USA
Kyselina citronová	ROTH, Německo
Kyselina fosforečná (H ₃ PO ₄)	Fluka, Švýcarsko
Kyselina mravenčí (LC-MS čistota)	Merck, USA
Kyselina octová	Penta, ČR
Laemmli Sample Buffer	Biorad, USA
Leupeptin	Sigma Aldrich, USA
Lysosym	ROTH, Německo
Methanol (LC-MS čistota)	VWR, USA
N,N-dimethylformamid (DMF)	Sigma Aldrich, USA

n-decyl- β -D-maltopyranosid	Anatrace, USA
Peroxodisíran amonný (APS)	Biorad, USA
Propanol (LC-MS čistota)	Merck, USA
Proteasa rLysC	Promega, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	VWR, USA
Trypton	Oxoid, USA
Voda (LC-MS čistota)	Merck, USA

3.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy ML104/01	Mettler Toledo, Švýcarsko
Automatické pipety	Mettler Toledo, Švýcarsko
Centrifuga 5415R	Eppendorf, Německo
Centrifuga 5920R	Eppendorf, Německo
Centrifuga Avanti J-30I	Beckman Coulter, USA
Kolona ENrich™ SEC 650 10×300, 24 ml	Biorad, USA
Kolona Luna Omega POLAR C18, 1,6 μ m, 100 Å, 1×100mm	Phenomenex, USA
Koncentrátor Concentrator plus	Eppendorf, Německo
Laminární box MSC 12	Jouan, USA
Mini-PROTEAN Tetra systém	Biorad, USA
NGS chromatografický systém	Biorad, USA
pH metr Orion 2 Star	Thermo Scientific, USA
Profinity IMAC kolona (Ni) 1 ml	Biorad, USA
Profinity IMAC kolona (Ni) 5 ml	Biorad, USA
Proteolytická kolona nepenthesin 2	připravena v laboratoři
Proteolytická kolona pepsin	připravena v laboratoři
Proteolytická kolona pepsin-nepenthesin 2	připravena v laboratoři
Předkolona Security guard ULTRA Fully Porous	
Polar C18, 2,1 μ m	Phenomenex, USA
Mini-Rotator Bio RS-24	Biosan, Lotyšsko
Sonikační sonda UP200S	Hielscher, Německo
Spektrofotometr DS-11 FX PLUS	Denovix, USA

Termomixer	Eppendorf, Německo
TimsTOF Pro PASEF	Bruker Daltonics, Německo
Třepačka Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
UPLC chromatografický systém Agilent 1290	Agilent technologies, USA
Vivaspin 10k	Sartorius, Německo
Zeba Spin 7k MWCO	Thermo Scientific, USA

3.3 Použité roztoky, média a pufr

Použitá média:

Fosfátový pufr

170mM KH_2PO_4

720mM K_2HPO_4

pH 7,5

Luria Broth (LB) medium

10 g/l trypton

5 g/l kvasinkový extrakt

10 g/l NaCl

20 g/l agar (u kapalného média nebyl přidán)

pH 7,4

Terrific Broth (TB) medium

13,3 g/l trypton

26,6 g/l kvasinkový extrakt

0,44% glycerol

pH 7,5

Roztoky použité pro purifikaci:

Eluční pufr

20mM Tris

100mM NaCl

10mM n-decyl- β -D-maltopyranosid

400mM imidazol

pH 7,5

Promývací pufr

20mM Tris
100mM NaCl
10mM n-decyl- β -D-maltopyranosid
pH 7,5

Pufr pro gelovou permeační chromatografii (GC pufr)

20mM Hepes
100mM NaCl
1,8mM n-decyl- β -D-maltopyranosid
pH 7,5

Resuspendační pufr

20mM Tris
100mM NaCl
pH 7,5

Roztoky pro SDS elektroforézu:

Barvicí roztok pro SDS gely

45% methanol
10% kyselina octová
2,5 g/l Coomassie brilliant blue

Odbarvovací roztok pro SDS gely

35% ethanol
10% kyselina octová

Proteinový standard pro SDS

Pierce™ Prestained Protein MW Marker

Tris-glycinový pufr pro SDS

25mM Tris
192mM glycin
35mM SDS
pH 8,3

Vzorkový pufr pro SDS

4× ředěný Laemmli Sample Buffer (Biorad)

400mM DTT

Pufry pro HDX – McIlvainovy pufry¹⁰⁵:

Tabulka 1 – Hodnoty pH jednotlivých McIlvainových pufrů použitých pro HDX, množství použitých zásobních roztoků v μl (0,2M Na_2HPO_4 , 0,1M citrát) a koncentrace H_3PO_4 v zastavovacích pufrech.

pH výměny	0,2M Na_2HPO_4 [μl]	0,1M citrát [μl]	Zastavovací pufr c(H_3PO_4)
4,4	441	559	18mM
5,4	558	443	30mM
6,4	693	308	30mM
7,4	909	92	50mM
3,0	206	795	25mM
4,5	454	546	45mM
6,0	632	369	60mM
3,0	206	795	25mM
3,5	304	697	30mM
4,0	386	615	35mM
4,5	454	546	40mM
6,5	710	290	60mM

McIlvainovy pufry byly připraveny v H_2O a D_2O .

K 1 ml McIlvainových pufrů bylo přidáno:

4 ml $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$

100mM NaCl

1,8mM n-decyl- β -D-maltopyranosid

Roztoky pro LC-MS analýzu:

Mobilní fáze pro online štěpení proteinů

0,4% kyselina mravenčí

pH 2,5

Mobilní fáze A pro gradientovou eluci peptidů

2% ACN

0,4% kyselina mravenčí

Mobilní fáze B pro gradientovou eluci peptidů

95% ACN

0,4% kyselina mravenčí

Roztok pro oplach předkolony a analytické kolony

70% methanol

20% propanol

1% kyselina mravenčí

3.4 Použité plasmidy a bakteriální buňky

Plasmid pASK75 – *CIC-ecI* – WT

Plasmid pASK75 – *CIC-ecI* – QQQ mutant

Plasmidy byly poskytnuty prof. Merrit Maduke ze Stanford University.

Kompetentní buňky *E. coli* BL-21 (DE3) (New England BioLabs Inc.)

3.5 Metody

3.5.1 Příprava misek agaru LB médií

Sterilní LB médium s přidaným agarem bylo rozpuštěno v mikrovlnné troubě. Po ochlazení přibližně na 50 °C byl do média přidán ampicilin do finální koncentrace 0,1 mg/ml. Připravené médium bylo rozlito na Petriho misky a po ztuhnutí byl agar sušen při 37 °C dnem vzhůru. Celý postup byl proveden v laminárním boxu MSC12 (Jouan).

3.5.2 Transformace plasmidu *ClC-ec1* a jeho *QQQ* mutantu

Pro transformaci byl použit 100 µl alikvot buněk *E. coli* BL-21(DE3) k nimž byl přidán 1 µl vektoru (pASK75 – *ClC-ec1* – WT (100 ng/µl), pASK75 – *ClC-ec1* – *QQQ* mutant (75 ng/µl)). Buňky byly inkubovány 30 minut na ledu, pak byly vloženy na 45 sekund do lázně (42 °C) a poté zpátky na led. K buňkám bylo přidáno 600 µl sterilního LB média a buňky byly hodinu inkubovány na termomixeru (Eppendorf) při 37 °C a 250 RPM. Po inkubaci byly buňky centrifugovány na 3500×g při 4 °C po dobu 5 minut (centrifuga 5920R (Eppendorf)) Ze supernatantu bylo odebráno 600 µl a ve zbytku byla resuspendována peleta. Obsah zkumavky byl pipetou přenesen na připravenou agarovou misku s antibiotikem a následně byl rovnoměrně rozetřen hokejkou. Takto připravená miska byla inkubována dnem vzhůru při 37 °C po dobu 12-18 hodin. Souběžně byla připravena i negativní kontrola. Postup přípravy kontroly byl totožný s výjimkou přidání plasmidu, který u kontroly přidán nebyl. Během transformace buněk se pracovalo sterilně v laminárním boxu MSC12 (Jouan).

3.5.3 Příprava noční kultury

Do 25 ml sterilního LB média byl přidán ampicilin do finální koncentrace 0,1 mg/ml a pomocí sterilní špičky do něj byla přenesena 1 kolonie z Petriho misky. Vše bylo provedeno nad kahanem. Buňky byly inkubovány na třepačce Infors HT Multitron Pro (BioTrade) přes noc (12-18 h) při 37 °C a 200 RPM.

3.5.4 Exprese *ClC-ec1* a jeho *QQQ* mutantu v buňkách *E. coli*

Do každé ze čtyř litrových Erlenmayerových baněk bylo přidáno 900 ml TB média, které bylo následně sterilizováno. Dále bylo do každé z baněk přidáno 100 ml sterilního fosfátového pufru, 1000 µl roztoku ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml. Inokulace byla

provedena 1 ml roztoku buněk z noční kultury (1000×ředění). Vše bylo provedeno nad kahanem. Erlenmeyerovy baňky byly umístěny na třepačku Infors HT Multitron Pro (Biotrade) a byly inkubovány při 37 °C a 220 RPM. Průběžně byla měřena optická denzita při 600 nm na spektrofotometru DS-11 FX PLUS (DeNovix), dokud nedosáhla hodnoty 0,6-1,2. Následně byl přidán 1 ml roztoku induktoru anhydrotetracyklinu o koncentraci 0,2 mg/ml a buňky byly inkubovány další 3 hodiny. Po inkubaci byly buňky centrifugovány 20 minut při 4 °C a 3000×g na centrifuze Avanti J-30I (Beckman Coulter). Získaná peleta byla uskladněna při -80 °C.

3.5.5 Purifikace ClC-ec1 a jeho QQQ mutantu

3.5.5.1 Solubilizace ClC-ec1 a jeho QQQ mutantu

Peleta byla resuspendována v resuspendačním pufru (10 ml na 1 g pelety) a přenesena do zkumavek. Zkumavky byly vloženy na led a do každé zkumavky bylo přidáno 20 mg lysosymu, 1 µl DNAsy o koncentraci 1 U/µl a 100 µl roztoku inhibitorů proteas PMSF a leupeptinu o koncentraci 0,1 mg/ml. Buňky byly rozbity pomocí sonikační sondy UP200S (Hielscher) (6×1 minuta na ledu, pauza 1 minuta, amplituda 70 %, opakovací cyklus 50 %). Po sonikaci byl přidán n-decyl-β-D-maltopyranosid do finální koncentrace 50 mM a obsah zkumavek byl míchán dvě hodiny při pokojové teplotě na rotátoru Mini-Rotator Bio RS-24 (Biosan). Nakonec byly buňky centrifugovány 45 min při 4 °C, 25000×g v centrifuze Avanti J-30I (Beckman Coulter).

3.5.5.2 Afinitní chromatografie

Pro provedení afinitní chromatografie byla použita kolona Profinity IMAC Column (Ni) 5 ml (Biorad) a NGS chromatografický systém (Biorad). Kolona byla promyta 25 ml promývacího pufru, následně byl nanesen supernatant z předchozího kroku. Po nanesení supernatantu byla kolona promyta promývacím pufrům do ustálení základní linie. Protein byl eluován gradientovou elucí od 0 % do 100 % elučního pufru (rostoucí koncentrace imidazolu 0-400mM). Průtok byl nastaven na 1,6 ml/min.

3.5.5.3 Diskontinuální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS elektroforéza)

Přítomnost ClC-ec1/QQQ mutantu ClC-ec1 ve frakcích z afinitní chromatografie byla ověřena SDS elektroforézou. Vzorky pro SDS elektroforézu byly připraveny smícháním

12 μ l vzorku a 4 μ l SDS vzorkového pufru. Vzorky se nesmí zahřívát neboť to vede k nespecifické agregaci a neodpovídajícím mobilitám při elektroforetické separaci. Dále byl připraven 12% separační SDS gel s vrstvou 5% zaostřovacího SDS gelu a následně byly nanесeny vzorky jednotlivých frakcí. Pro elektroforézu byla použita aparatura Mini-PROTEAN Tetra systém (Biorad), a tris-glycinový SDS pufr. Napětí bylo nastaveno na 200 V. Pro barvení gelu byla použita barvicí lázeň a následně byly gely odbarveny odbarvovacím roztokem.

3.5.5.4 Štěpení histidinové kotvy

Koncentrace *CIC-ecI* byla vypočtena pomocí A_{280} (která byla měřena na spektrofotometru DS-11 FX PLUS (DeNovix)) a extinkčního koeficientu *CIC-ecI*. Roztok rLysC o koncentraci 1 μ l/ μ g byl 5 \times ředěn 50mM kyselinou octovou a byl přidán k purifikovanému proteinu (2,5 μ l ředěného roztoku rLysC na 1 mg proteinu). Směs byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě.

3.5.5.5 Gelová permeační chromatografie

Po odštěpení histidinové kotvy byl protein koncentrován na objem přibližně 2 ml pomocí koncentrátoru Vivaspin 10k (Sartorius) na centrifuze 5920R (Eppendorf) (6000 \times g, 4 $^{\circ}$ C) po 10-minutových cyklech. Mezi každým cyklem byl roztok proteinu promíchán, aby nedocházelo k precipitaci. Protein byl dále purifikován pomocí gelové permeační chromatografie. Kolona ENrichTM SEC 650 10 \times 300, 24 ml (Biorad) byla připojena do chromatografického systému NGC Chromatography system (Biorad). Následně byla kolona promyta 100 ml GC pufru, byl proveden nástřik přes 2 ml smyčku a eluce pomocí GC pufru. Průtok byl nastaven na 1 ml/min. Složení získaných frakcí bylo zjištěno pomocí SDS elektroforézy viz. 3.5.5.3, str. 38.

3.5.5.6 Reverzní afinitní chromatografie a gelová permeační chromatografie

Jelikož štěpení histidinové kotvy není stoprocentní, je nutno protein s neodštěpenou histidinovou kotvou odstranit reverzní afinitní chromatografií. Kolona Profinity IMAC Column (Ni) 1 ml (Biorad) byla promyta 20 ml GC pufru. Následně byly na kolonu nanесeny frakce z gelové permeační chromatografie, které obsahovaly protein odpovídající *CIC-ecI/QQQ CIC-ecI*. Pro chromatografii byl použit NGC chromatografický systém (Biorad), průtok byl nastaven na 1,6 ml/min. První frakce

z reverzní afinitní chromatografie, které obsahovaly protein *ClC-ec1/*QQQ *ClC-ec1* bez histidinové kotvy, byly koncentrovány pomocí Vivaspin 10k (Sartorius) na centrifuze 5920R (Eppendorf) ($6000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) na objem 2 ml. Následně byla provedena gelová permeační chromatografie (podle 3.5.5.5, str. 39) a SDS elektroforéza získaných frakcí (podle 3.5.5.3, str. 38). Frakce obsahující *ClC-ec1* byly zmrazeny po $100\mu\text{l}$ alikvotech v tekutém dusíku a uskladněny při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.6 Výměna pufrů pomocí gelové permeační chromatografie

Pro výměnu pufrů byly použity odsolovací kolony Zeba Spin 7k MWCO (Thermo Scientific). V prvním kroku byla centrifugačně odstraněna původní tekutina (centrifuga 5415R (Eppendorf), 1 min, $1500\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Následně byla kolona promyta $5\times 300\text{ }\mu\text{l}$ pufru, do kterého protein převádíme. Po každém přidavku byla kolona centrifugována na centrifuze 5415R (Eppendorf) po dobu 1 min, při $1500\times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po promytí byla kolona vložena do nové mikrozkušavky a bylo na ni nanášeno $100\text{ }\mu\text{l}$ vzorku. Následně byla kolona centrifugována při $1500\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po dobu 2 minut (centrifuga 5415R (Eppendorf)).

3.5.7 Vodík-deuteriová výměna

První dva experimenty vodík-deuteriové výměny byly prováděny pro všechny zvolené pH a časy výměny identicky. Proteiny ve vhodných pufrch byly zředěny na koncentraci $1,4\text{ g/l}$. Následně bylo k $5\text{ }\mu\text{l}$ proteinu o koncentraci $1,4\text{ g/l}$ přidáno $45\text{ }\mu\text{l}$ deuteriového pufru stejného pH, vzorek byl promíchán na vortexu a následně, v předem určených časech, byla výměna zastavena $50\text{ }\mu\text{l}$ zastavovacího pufru vhodné koncentrace H_3PO_4 (viz. tabulka 1, str. 35). Vzorek byl promíchán na vortexu a zmražen v tekutém dusíku. Pro experiment porovnávající konformace proteinu *ClC-ec1* a jeho QQQ mutantu byly použity pH 4,4; 5,4; 6,4 a 7,4 a časy výměny 20 s, 200 s, 2000 s a 20000 s (200s a 2000s značení bylo provedeno v triplikátu). Následně byl proveden pokus sledující změny konformace *ClC-ec1* vlivem velmi nízkého pH. Pro tento HDX experiment byly použity pH 3,0; 4,5 a 6,0 a časy výměny 10 s, 100 s, 316 s, 1000 s, 3162 s, 10000 s, 31623 s (10s, 316s, 3162s a 31623s značení bylo provedeno v triplikátu).

Na základě získaných dat byl navržen pokus sledující postupnou protonaci *ClC-ec1* při nízkých hodnotách pH. V tomto experimentu byla sledována konformace proteinu při pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 a 6,5 a časech výměny 20 s, 63 s, 200 s, 633 s, 2000 s,

6325 s, 20000 s, 63000 s (20s, 633s a 20000s značení bylo provedeno v triplikátu). Proteiny použité pro tento pokus měly koncentraci 0,8 g/l a pro H/D výměnu bylo použité pětinasobné ředění do D₂O pufru (k 10 µl proteinu o koncentraci 0,8 g/l bylo přidáno 40 µl deuteriového pufru). Ostatní kroky se shodovaly s předešlými experimenty.

Dále byly připraveny nedeuterované a maximálně deuterované kontroly. Příprava nedeuterovaných kontrol probíhala stejně jako u ostatních vzorků s rozdílem v kroku přidání deuteriového pufru, kdy byl přidán vodní pufr. Maximálně deuterovaná kontrola byla připravená jako nedeuterovaná kontrola s použitím dvojnásobného množství proteinu (10 µl 1,4 g/l roztoku (pro poslední experiment 20 µl 0,8 g/l)). Ta byla následně štěpena na koloně s ko-imobilizovanou proteasou (nepenthesinem 2-pepsinem) a vysušena v koncentrátoru Concentrator plus (Eppendorf). Vysušený protein byl rozpuštěn v 10 µl pufru (pro každý z experimentů byl použit pufr s nejvyšší hodnotou pH, z důvodu rychlejší H/D výměny) a bylo přidáno 90 µl deuteriového pufru stejného pH. Vzorky byly promíchány na vortexu a ponechány přes noc při pokojové teplotě. Po noční inkubaci byla výměna zastavena, vzorky byly promíchány pomocí vortexu a zmrazeny v tekutém dusíku.

3.5.8 Analýza vzorků vodík-deuteriové výměny

3.5.8.1 Optimalizace proteolytického štěpení

Pro optimalizaci štěpení byly připraveny vzorky stejným postupem jako nedeuterované vzorky (viz. 3.5.7, str. 40). Proteiny byly štěpeny na koloně s imobilizovaným pepsinem při dvou různých teplotách 0 °C a 20 °C. Na základě získaných informací o vhodnější teplotě štěpení byly testovány další dvě proteolytické kolony – imobilizovaný nepenthesin 2 a ko-imobilizovaný nepenthesin 2-pepsin při 20 °C. Všechny použité kolony byly připraveny v laboratoři. Jako mobilní fáze pro online štěpení byla použita 0,4% kyselina mravenčí ve vodě pH 2,5 a průtok byl nastaven na 100 µl/min při použití imobilizovaného pepsinu a 200 µl/min při ostatních použitých kolonách. Nastavení průtoků vychází z dlouhodobé optimalizace provedené v laboratoři a v naprosté většině případů je nemá smysl měnit.

Získané peptidy byly online odsoleny na předkoloně (Security guard ULTRA Fully Porous Polar C18, 2,1 µm (Phenomenex)) a separovány pomocí chromatografie na reverzní fázi (kolona Luna Omega POLAR C18, 1,6 µm, 100 Å, 1×100mm

(Phenomenex)) s použitím chromatografického systému UPLC Agilent 1290 (Agilent technologies). Pro eluci peptidů byl použit gradient voda-acetonitril (použitý gradient uveden v tabulce 2), průtok byl nastaven na 40 μ l/min a hodnota pH mobilní fáze bylo 2,5. Předkolona a analytická kolona byly následně omývány po dobu 4 minut pomocí roztoku pro oplach kolon. Chromatografický systém byl přímo spojen s hmotnostním spektrometrem timsTOF Pro PASEF (Bruker Daltonics), který operoval v data-dependentním módu. Nastavení přístroje bylo provedeno školitelem.

Tabulka 2 – Gradient roztoku B použitý pro eluci peptidů z analytické kolony při separaci před MS analýzou. Mobilní fáze A – 2% ACN, 0,4% kyselina mravenčí; mobilní fáze B - 95% ACN, 0,4% kyselina mravenčí. Průtok byl nastaven na 40 μ l/min a pH mobilní fáze bylo 2,5.

čas [min]	%B
0	10
2	10
8	45
8,1	99
16	99
16,1	10
20	10

Získaná data byla zpracována pomocí programu DataAnalysis⁹³ a následně prohledána programem MASCOT¹⁰³ proti databázi obsahující sekvence všech forem *CIC-ecI*, kyselých proteas a cRAP.fasta (<https://www.thegpm.org/crap/>). Parametry prohledávání: bez modifikací, chyba měření – 10 ppm v MS a 0,05 Da v MS/MS; bez enzymové specifity a taxonomického omezení; minimální délka peptidu 5 aminokyselin; minimální skóre 20; vytvoření a prohledání tzv. maskovací (decoy) databáze a ponechání identifikací splňujících kritérium <1 % falešných identifikací, tzv. FDR (false discovery rate). Získané výsledky byly exportovány ve formě souboru *.csv. Pro vizualizaci sekvenčního pokrytí byla vytvořena mapa štěpení programem DigDig, který byl vyvinut v laboratoři. Stejný program byl použit pro stanovení parametrů štěpení (počet získaných peptidů, průměrná délka peptidů, sekvenční pokrytí, redundance – počet peptidů pokrývajících danou aminokyselinu v příslušném peptidu).

MS/MS data byla prohledána i proti databázi Uniprot s taxonomickým omezením na proteiny *E.coli* za účelem identifikace možných kontaminací pocházejících

z produkčního systému. Ostatní parametry prohledání byly zvoleny tak jako je popsáno v minulém odstavci.

3.5.8.2 LC-MS analýza HDX vzorků a zpracování dat

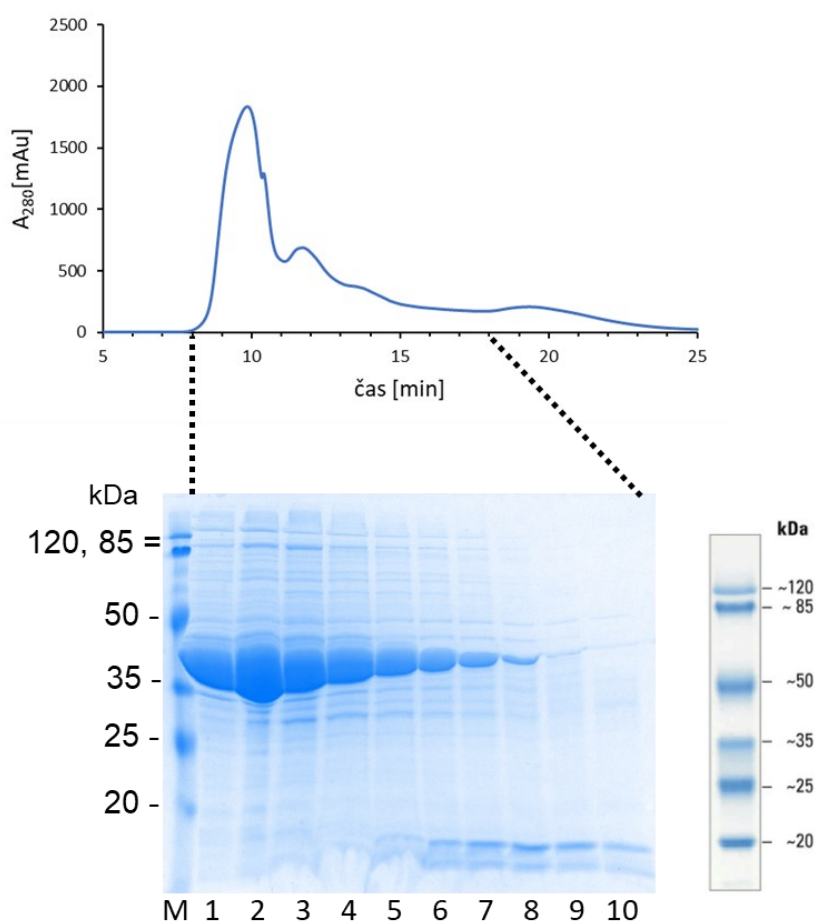
Každý vzorek vodík-deuteriové výměny byl před nástřikem do chromatografického systému UPLC Agilent 1290 (Agilent technologies) rychle rozmrazen. Po nástřiku byly vzorky podrobeny proteolytickému štěpení na koloně ko-imobilizovaného nepenthesinu 2-pepsinu při teplotě 20 °C. Jako mobilní fáze byla použita 0,4% kyselina mravenčí ve vodě, pH 2,5 a průtok byl nastaven na 200 µl/min. Získané peptidy byly odsoleny a separovány stejným postupem, jako v kapitole 3.5.8.1, str. 41. Nízkým pH a teplotou separace byly zachovány podmínky zastavení H/D výměny pro minimalizaci zpětné výměny. Kapalinová chromatografie byla přímo připojena na hmotnostní spektrometr timsTOF Pro PASEF (Bruker Daltonics), který pracoval v MS módu. Nastavení přístroje bylo provedeno školitelem.

Získaná data byla exportována pomocí programu DataAnalysis⁹³ a analyzována programem Deutex. V prvním kroku byl vytvořen list peptidů. Peptidy, které byly výsledkem prohledání dat pomocí programu MASCOT¹⁰³ byly v programu Deutex následně přiřazeny k signálům identifikovaným při LC-MS analýze nedeuterovaného vzorku. Výsledkem byl list peptidů, ke kterým byl doplněn rozsah zaznamenaných nábojových stavů a rozsah skenů v nichž byly pozorovány v LC-MS analýze. Tento list byl následně použit k analýze deuterovaných vzorků pomocí stejného programu. Získané hodnoty deuterace byly vizualizovány pomocí deuteračních grafů (z angl. „uptake plot“), které jsou vytvořeny pomocí programu Deutex. Dále byl k vizualizaci dat použit program MSTools,¹⁰⁴ v němž byly připraveny teplotní mapy a diferenční teplotní mapy. Data byla zobrazena i na známé krystalové struktuře proteinu (PDB ID: 1OTS), pomocí programu PyMol.³⁸

4 Výsledky

4.1 Purifikace CLC proteinů

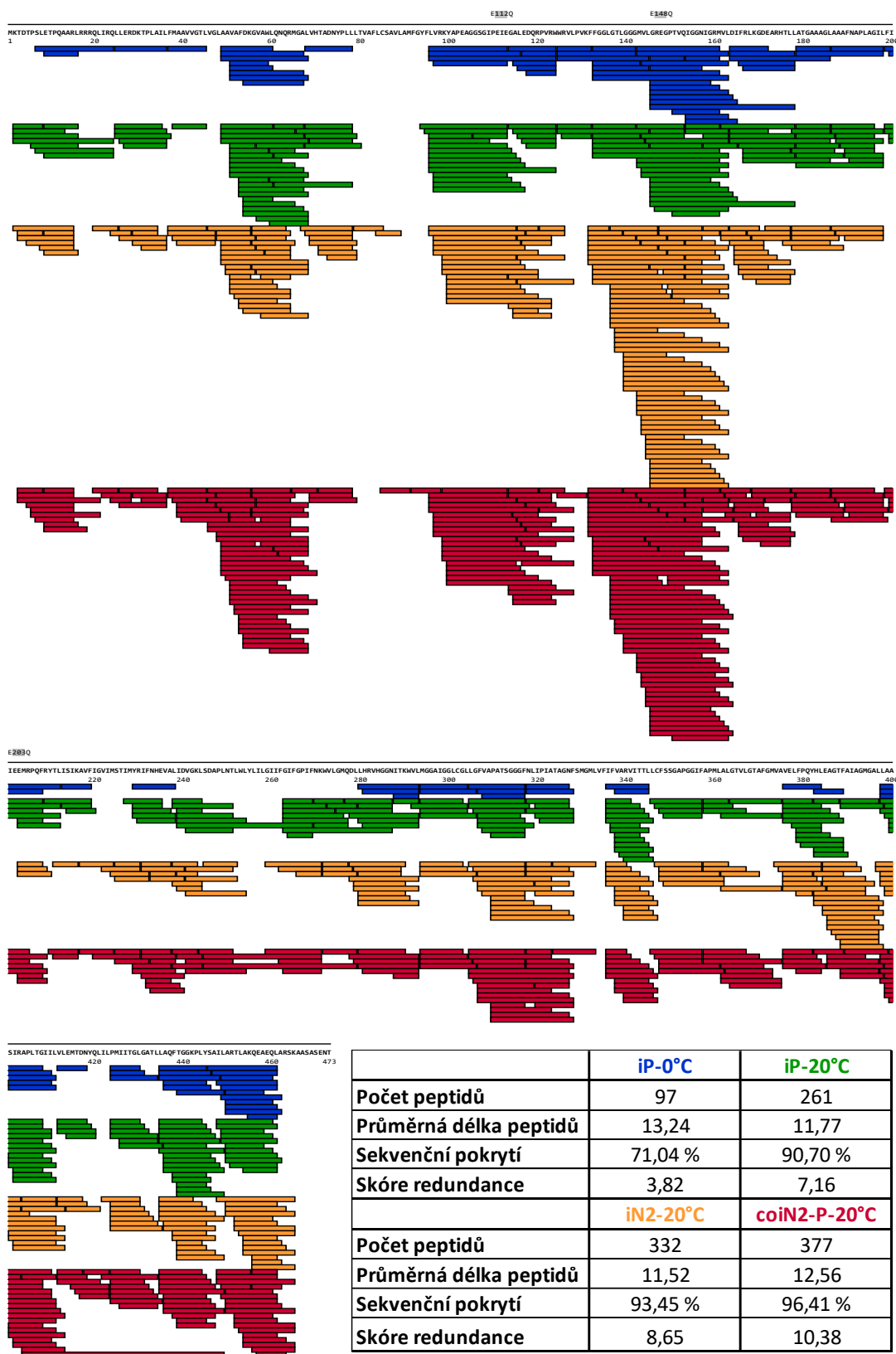
V prvním kroku byly připraveny oba proteiny pro HDX experimenty. Proteiny exprimované v buňkách *E.coli* byly úspěšně purifikovány v dostatečné čistotě viz. Obr. 12. Pro další experimenty byly použity frakce 8-10 (na elektroforéze v dráhách 1-3). Výtěžek z purifikace v případě CLC-*ec1* byl 8 mg, u QQQ mutantu byl výtěžek 6 mg (ze 4 l TB média).



Obrázek 12 – Chromatogram z poslední gelové permeační chromatografie CLC-*ec1* QQQ mutantu (kolona ENrichTM SEC 650 10×300, 24 ml (Biorad), průtok 1 ml/min, 20 °C, mobilní fáze: 20mM Hepes, 100mM NaCl, 1,8mM n-decyl- β -D-maltopyranosid, pH 7,5) a SDS elektroforéza vybraných frakcí. Do první dráhy byl nanesen standard, v dráhách 1 až 10 jsou postupně frakce 8 až 17. CLC-*ec1* QQQ mutant se nachází mezi pásy 35 a 50 kDa.

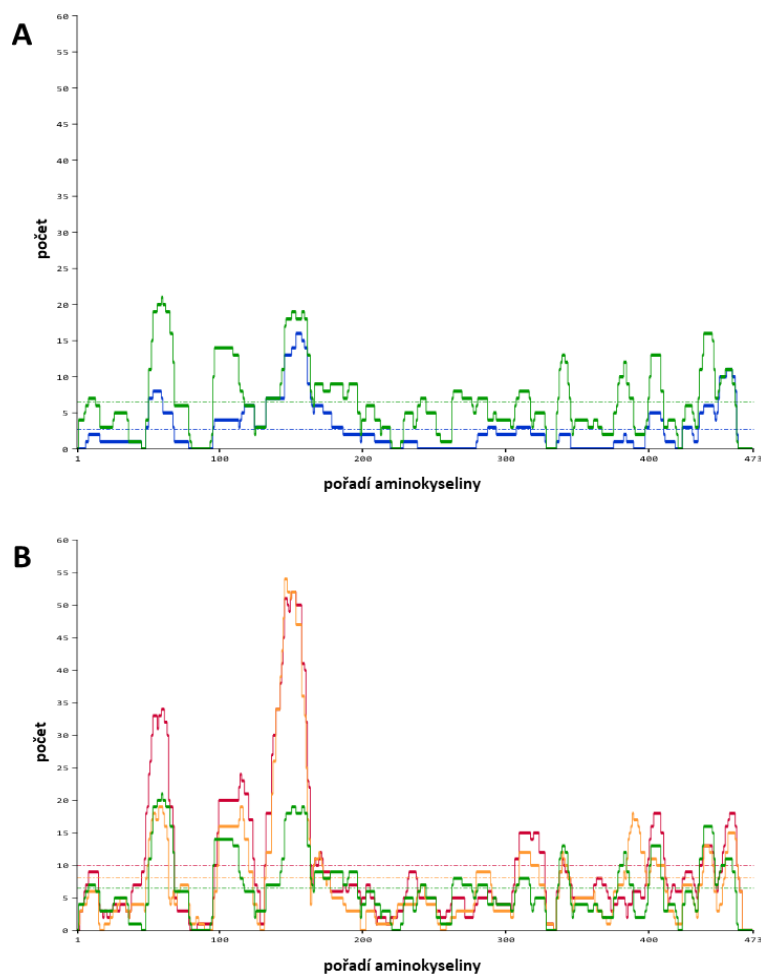
4.2 Optimalizace proteolytického štěpení

Volba vhodných podmínek štěpení a proteasy je zásadní pro získání dostatečného sekvenčního pokrytí a redundance, a proto před MS analýzou HDX vzorek CLC-*ec1* byla provedena optimalizace proteolytického štěpení. Výsledky zobrazuje Obr. 13, str. 45.



Obrázek 13 – Mapa sekvenčního pokrytí získaného štěpením *CIC-ec1* pomocí proteasových kolon **pepsinu při 0 °C (iP-0 °C) (modře)** a **20 °C (iP-20 °C) (zeleně)**, **nepenthesinu 2 při 20 °C (iN2-20 °C) (žlutě)** a **nepenthesinu 2-pepsinu při 20 °C (coiN2-20 °C) (červeně)**. Nad sekvencí jsou uvedena místa mutací v *QQQ* mutantu *CIC-ec1*. V tabulce jsou číselně vyjádřeny hodnoty vybraných parametrů štěpení pro jednotlivé podmínky štěpení. Skóre redundance – počet peptidů pokrývajících danou aminokyselinu v příslušném peptidu.

Srovnání štěpení při teplotě 0 °C a 20 °C pomocí pepsinové kolony ukázalo, že sekvenční pokrytí i redundance byly vyšší při teplotě 20 °C (sekvenční pokrytí 90,70 % a redundance 7,16) než při teplotě 0 °C (sekvenční pokrytí 71,04 % a redundance 3,82) (Obr. 13, str. 45 a Obr. 14A). Z testovaných proteasových kolon štěpila při 20 °C nejefektivněji kolona ko-imobilizovaného nepenthesinu 2-pepsinu (sekvenční pokrytí 96,41 % a redundance 10,38) a nejméně efektivně kolona pepsinu (sekvenční pokrytí 90,70 %, redundance 7,16) (viz. Obr. 13, str. 45, Obr. 14B).



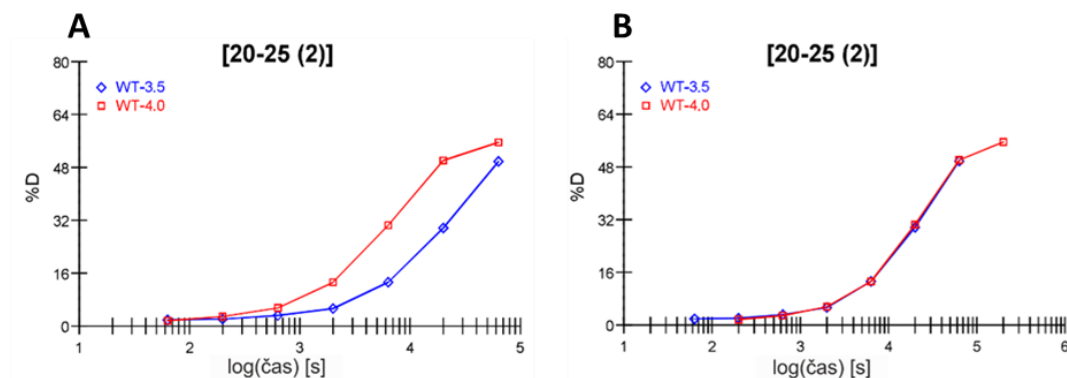
Obrázek 14 – Graf redundance pro štěpení ClC-ec1 pomocí pepsinu při dvou různých teplotách 0 °C (modrá křivka) a 20 °C (zelená křivka) (A) a pro štěpení ClC-ec1 při 20 °C pomocí pepsinu (zelená křivka), nepenthesinu 2 (žlutá křivka) a ko-imobilizovaného nepenthesinu 2-pepsinu (červená křivka) (B).

Dále byly pomocí LC-MS/MS dat stanoveny kontaminace. Výsledky prohledání dat proti všem *E.coli* sekvencím z databáze Uniprot odhalily ve vzorku několik minoritních kontaminací pocházejících z produkčního systému. Mezi nejpočetnější patřily ribozomální proteiny 50S a 30S, elongační faktory Tu1 a Tu2, ribózafosfát

pyrokinasa, hlavní vnější membránový lipoprotein Lpp, vnější membránový protein A a malý protein teplotního šoku lbpB.

4.3 Vodík-deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií

Výstupem MS analýzy vzorků vodík-deuteriové výměny byly grafy závislosti deuterace na čase. HDX experimenty byly prováděny při různých pH, aby byl simulován různý stupeň protonace. Jelikož pH výrazně ovlivňuje rychlost výměny, byla po měření provedena korekce získaných dat (normalizace na jednu hodnotu pH). Díky ní lze porovnat výsledky skrz jednotlivá pH a sledovat vliv pH na konformaci proteinu (Obr. 15). Pro korekci byl použit vzorec $\text{čas}(\text{pH}_{\text{vyšší}}) = \text{čas}(\text{pH}_{\text{nižší}}) \times 10^{\text{rozdíl}(\text{pH})}$. V případě, že vybraný segment proteinu při změně pH nepodléhá strukturní změně, budou deuterací křivky po korekci na sebe nasedat (Obr. 15B).

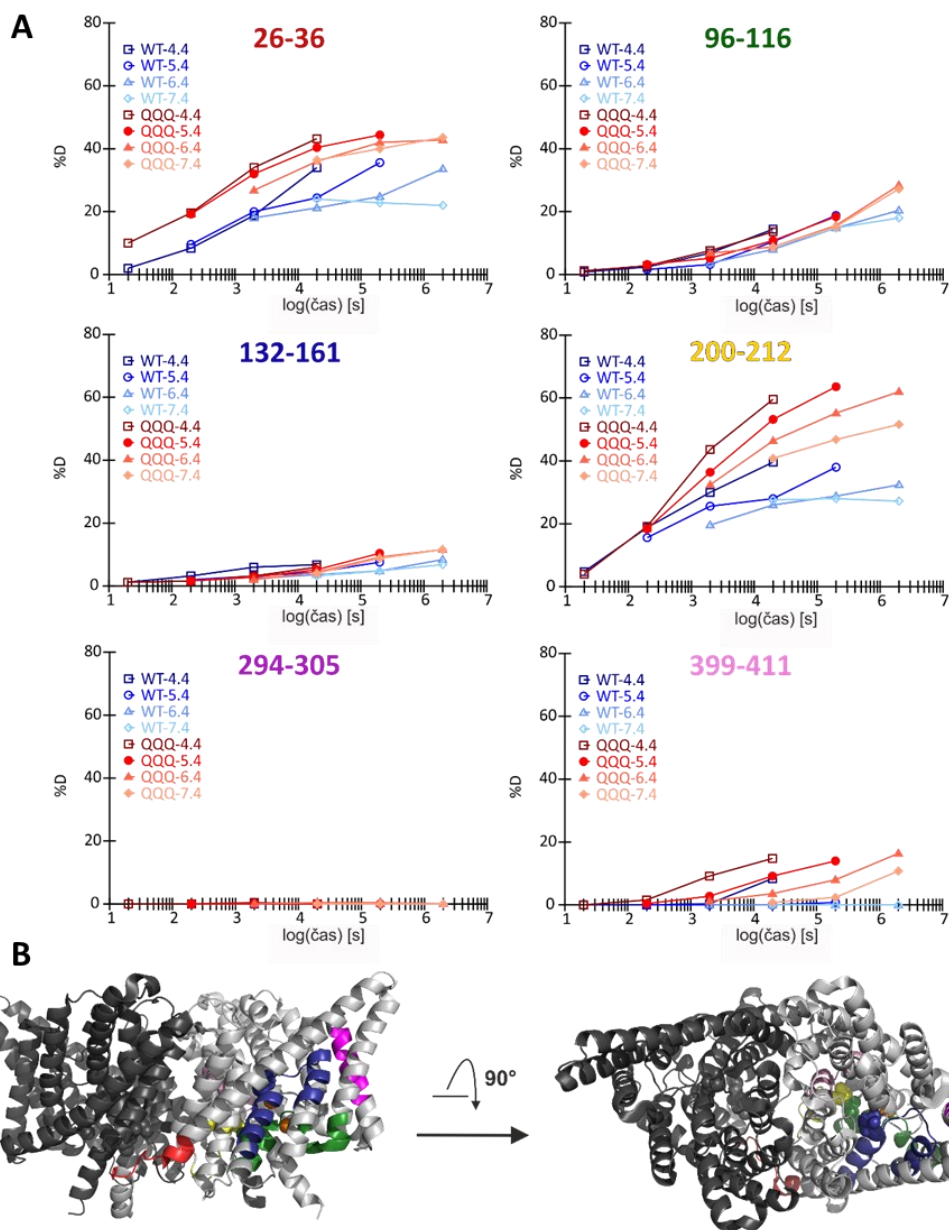


Obrázek 15 – Grafy závislosti deuterace na čase pro vybraný peptid (20-25) a dvě různá pH, číslo v závorce zobrazuje nábojový stav peptidu. Použité časy výměny byly 20 s, 63 s, 200 s, 633 s, 2000 s, 6325 s, 20000 s. Na obrázku A je deuterací graf pro dvě různé hodnoty pH před provedením korekce a na obrázku B je ten samý graf po korekci.

4.3.1 Porovnání konformace ClC-ec1 a jeho QQQ mutantu

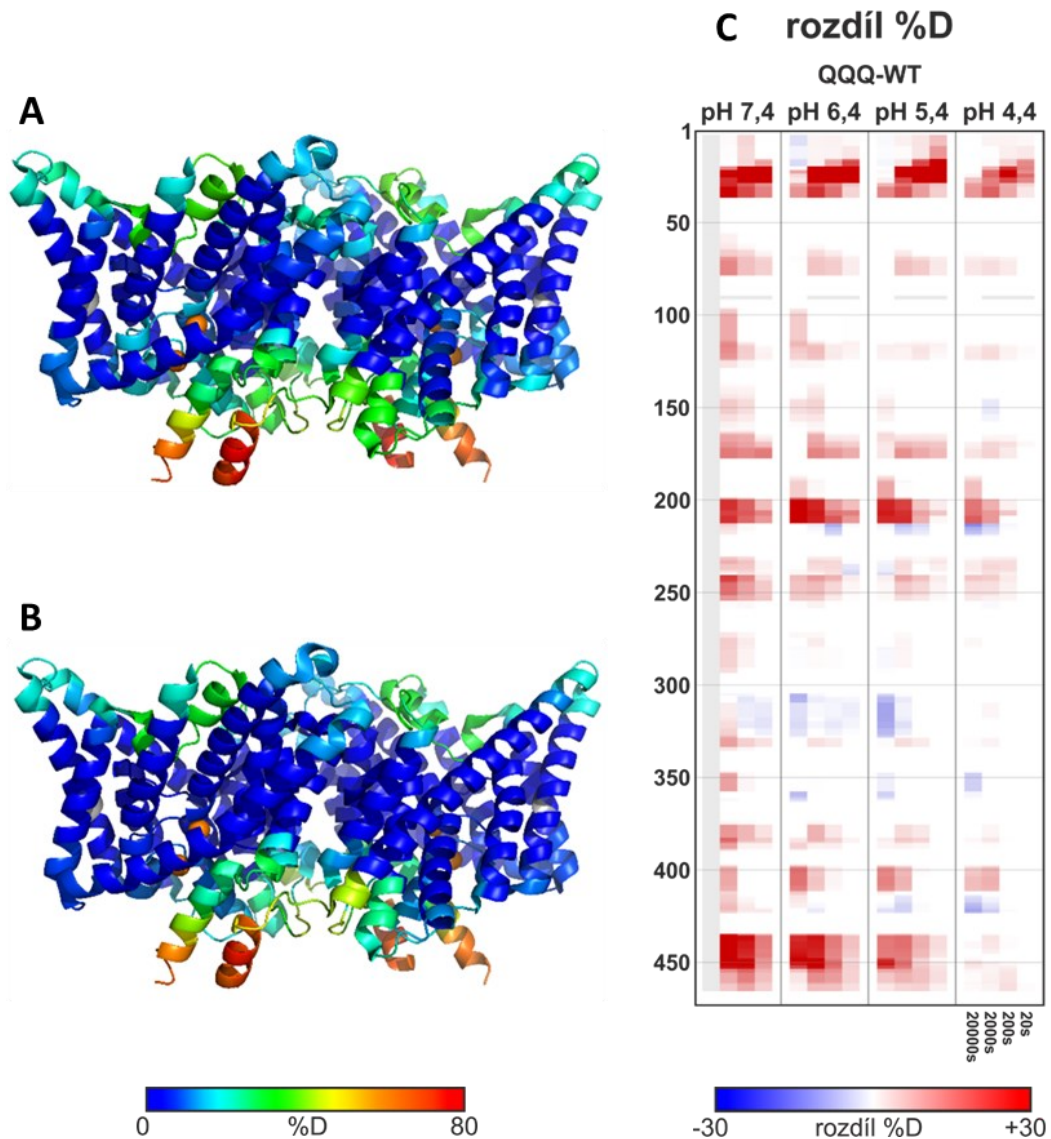
V prvním HDX experimentu byly srovnány konformace ClC-ec1 a jeho QQQ mutantu při různých pH. Rozdíly zobrazují grafy závislosti deuterace na čase (Obr. 16, str. 48). V rozsahu aminokyselin 26-36 byly pozorovány odlišnosti ve struktuře mezi sledovanými proteiny. Z hlediska pH pozorujeme u QQQ mutantu ClC-ec1 menší rozdíl v prostorové struktuře mezi pH 4,4/5,4 a pH 6,4/7,4 a u ClC-ec1 se rozdíly objevily až v nejdelším časovém bodě (20000 s). V oblasti 96-116 byly konformace obou proteinu téměř totožné, jelikož křivky ClC-ec1 a jeho QQQ mutantu se překrývají. V tomto segmentu byl pozorován i malý vliv pH na prostorové uspořádání obou proteinů. V segmentu 132-161 se nachází glutamát 148, jenž je u QQQ mutantu mutován

na glutamin. Graf ukazuje jen minimální rozdíly mezi konformacemi proteinů či různými pH použitého pufru. V oblasti 200-212, která u QQQ mutantu obsahuje mutaci E203Q, byly pozorovány změny struktury vlivem změny pH jak u *CIC-ecI*, tak i u jeho QQQ mutantu, a také rozdíly mezi samotnými proteiny. Oblast 294-305 je u obou proteinů nepřístupná rozpouštědlu a oblast 399-411 se částečně deuteruje u QQQ mutantu. U *CIC-ecI* je tato oblast prakticky nepřístupná pro H/D výměnu, což značí rozdíl v konformaci mezi sledovanými proteiny.



Obrázek 16 – Grafy závislosti deuterace na čase pro vybrané reprezentativní peptidy *CIC-ecI* a jeho QQQ mutantu při čtyřech různých hodnotách pH (A). Použité časy výměny byly 20 s, 200 s, 2000 s a 20000 s (200s a 2000s značení bylo provedeno v triplikátu). V grafech byla provedena korekce zohledňující rozdílnou rychlost výměny při různém pH. Pozice peptidů jsou zvýrazněny na struktuře *CIC-ecI* (B). Barvy segmentů odpovídají barvě aminokyselinového rozmezí v hlavičce grafů. Struktury byly barveny v programu PyMol³⁸ (PDB ID:1OTS).

Mezi *C1C-ec1* při pH 4,4 a *QQQ* mutantem při pH 7,4 byly pozorovány malé rozdíly v konformaci (Obr. 17A,B). Porovnáním prostorového uspořádání *C1C-ec1* a *QQQ* mutantu při jednotlivých pH se ukázalo, že rozdíly v konformaci se snižují s klesajícím pH. Shodná prostorová struktura *C1C-ec1* a jeho *QQQ* mutantu nebyla pozorována u žádného z testovaných pH (Obr. 17C).

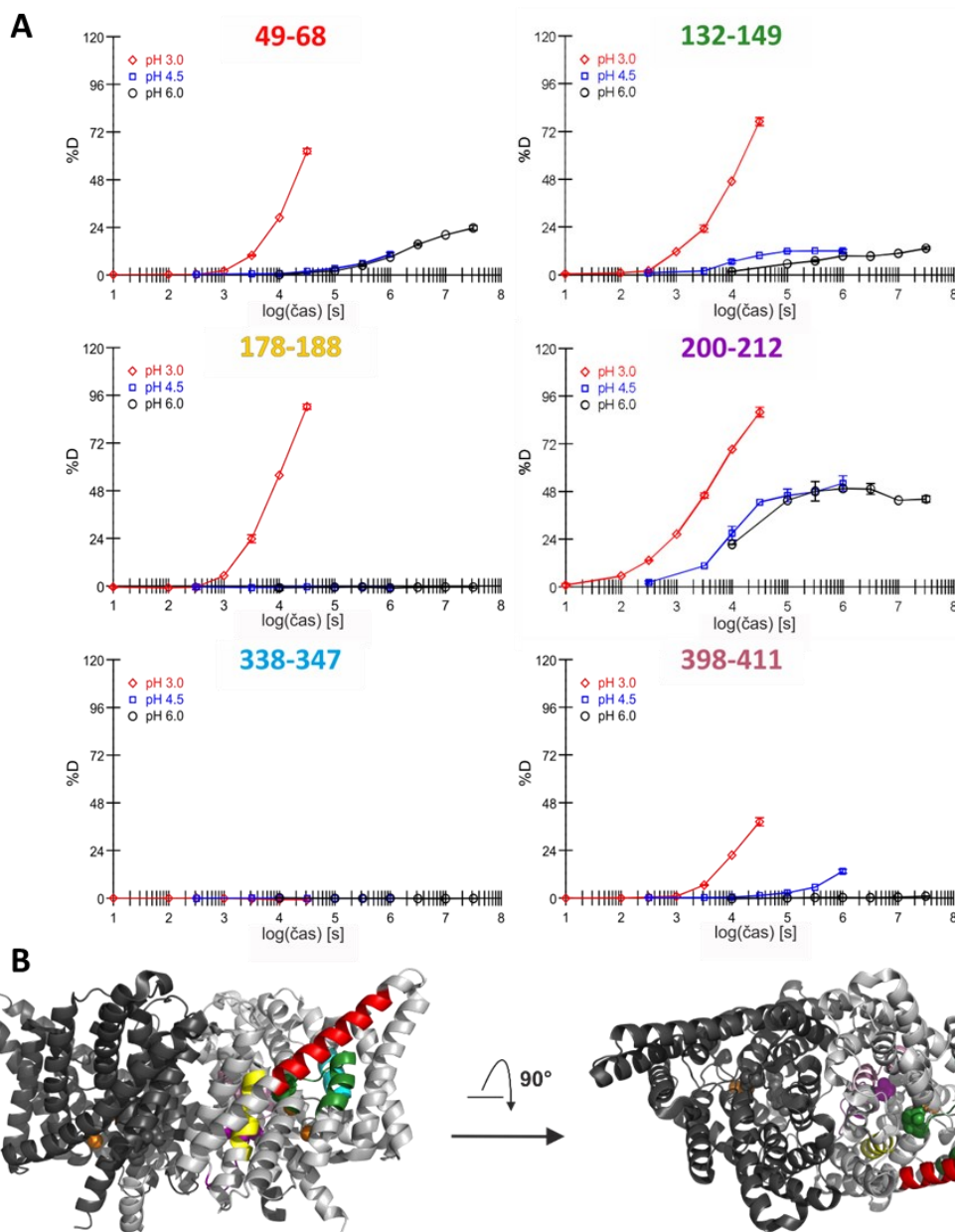


Obrázek 17 – Celková deuterace proteinu *C1C-ec1* při pH 4,4 a 20000s (A) a *QQQ* mutantu *C1C-ec1* při pH 7,4 a 20s (B) zobrazena na struktuře *C1C-ec1*. Diferenční teplotní mapa zobrazující rozdíly v deuteraci mezi *QQQ* mutantem *C1C-ec1* a *C1C-ec1*(WT) při všech studovaných pH a časech (C). Struktury byly barveny v programu PyMol³⁸ (PDB ID:1OTS).

4.3.2 Vliv velmi nízkého pH na konformaci *C1C-ec1*

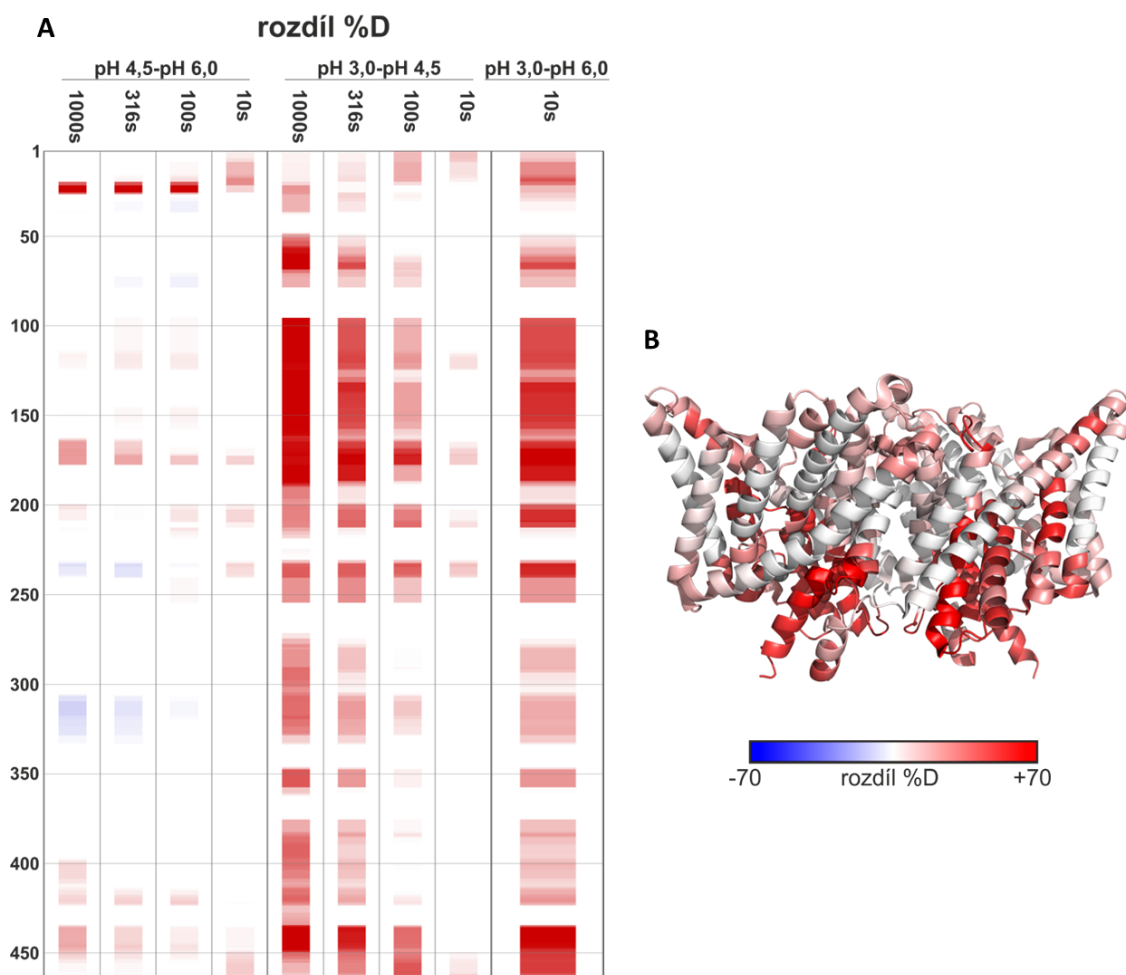
Jelikož při pH 4,4 nebyl pozorován plně protonovaný stav *C1C-ec1*, dalším krokem bylo sledování strukturních změn při nižším pH (3,0). Na Obr. 18, str. 50 jsou prezentovány grafy závislosti deuterace na čase pro vybrané peptidy z druhého HDX experimentu.

U všech grafů, kromě 338-347, lze pozorovat výrazné změny v konformaci při pH 3,0 v porovnání s pH 4,5 a 6,0. Deuterace některých peptidů *CIC-ec1* byla mírně vyšší již při pH 4,5 (např. 132-149 a 398-411). U ostatních, na obrázku zobrazených peptidů, nebyly pozorovány rozdíly v konformaci mezi pH 4,5 a 6,0. Peptid 338-347 nebyl deuterován při žádném z testovaných pH.



Obrázek 18 – Grafy závislosti deuterace na čase pro vybrané reprezentativní peptidy *CIC-ec1* při třech různých hodnotách pH (A). Použité časy výměny byly 10 s, 100 s, 316 s, 1000 s, 3162 s, 10000 s, 31623 s (10s, 316s, 3162s a 31623s značení bylo provedeno v triplikátu). V grafech byla provedena korekce zohledňující rozdílnou rychlost H/D výměny při různém pH. Pozice peptidů jsou zvýrazněny na struktuře *CIC-ec1* (B). Barvy segmentů odpovídají barvě aminokyselinového rozmezí v hlavičce grafů. Struktury byly barveny v programu PyMol³⁸ (PDB ID:1OTS).

Výrazný rozdíl v konformaci *ClC-ec1* při přechodu na pH 3,0 z pH 4,5 ilustruje i diferenční teplotní mapa na Obr. 19A. Kde je stejně jako v deuteracích grafech vidět, že rozdíl v deuteraci *ClC-ec1* při pH 4,5 a 6,0 je výrazně menší než při přechodu z pH 3,0 na 4,5. Zobrazení rozdílů deuterace mezi pH 3,0 a 6,0 na struktuře *ClC-ec1* (Obr. 19B) ukazuje, že k deprotekcii dochází především v transportních dráhách *ClC-ec1*.

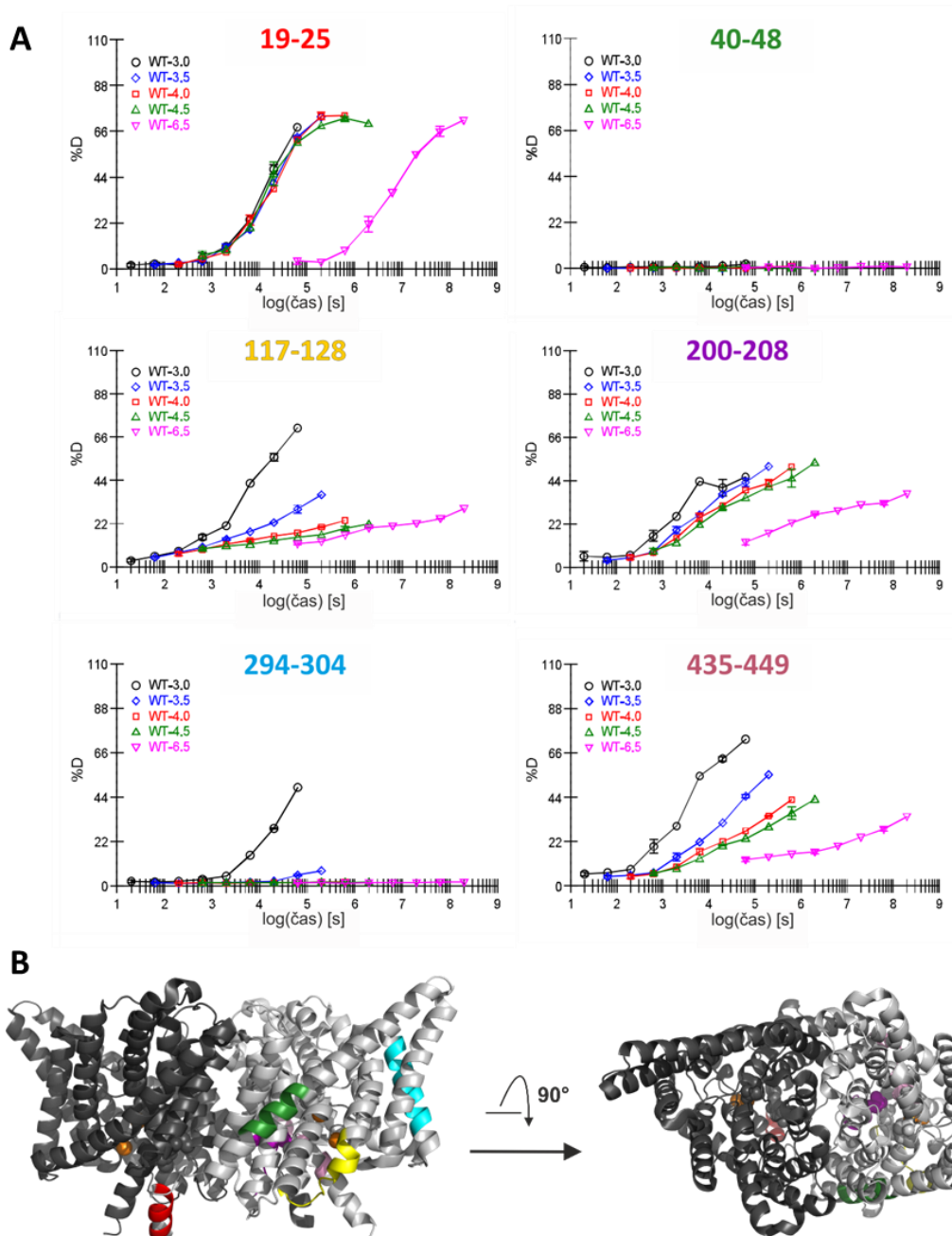


Obrázek 19 – Diferenční teplotní mapa zobrazující rozdíly v deuteraci mezi konformacemi *ClC-ec1* při pH 3,0; 4,5 a 6,0 při ekvivalentních časech (A) s přihlédnutím k rozdílné rychlosti H/D výměny při různém pH. Čas uvedený v mapě náleží vyššímu pH. Rozdíly v deuteraci *ClC-ec1* mezi pH 3,0 a pH 6,0 jsou zobrazeny na struktuře *ClC-ec1* (B). Struktury byly barveny v programu PyMol³⁸ (PDB ID:1OTS).

4.3.3 Vliv postupné protonace *ClC-ec1* na jeho konformaci v rozsahu velmi nízkých pH

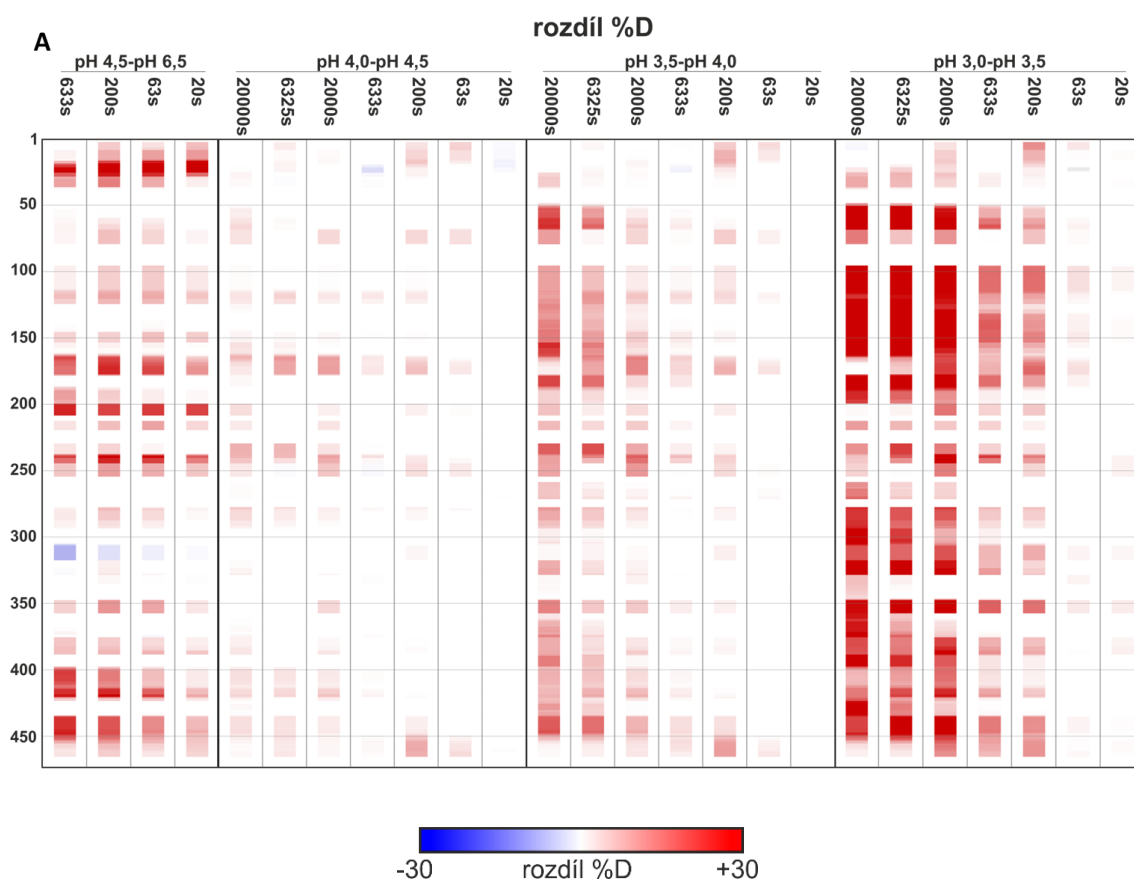
V třetím HDX experimentu byly pozorovány změny konformace způsobené postupnou protonací při velmi nízkých hodnotách pH, lišících se vždy o půl jednotky pH, a to v rozsahu pH 3,0-4,5 a dále při pH 6,5 – pro porovnání se strukturou neprotonovaného proteinu. Získané grafy závislosti deuterace na čase (Obr. 20, str. 52) ukázaly, že v oblasti 19-25 je deuterace výrazně nižší při pH 6,5 oproti všem ostatním testovaným pH. Peptid 40-48 nebyl vůbec deuterován. V oblastech 117-128 a 294-304

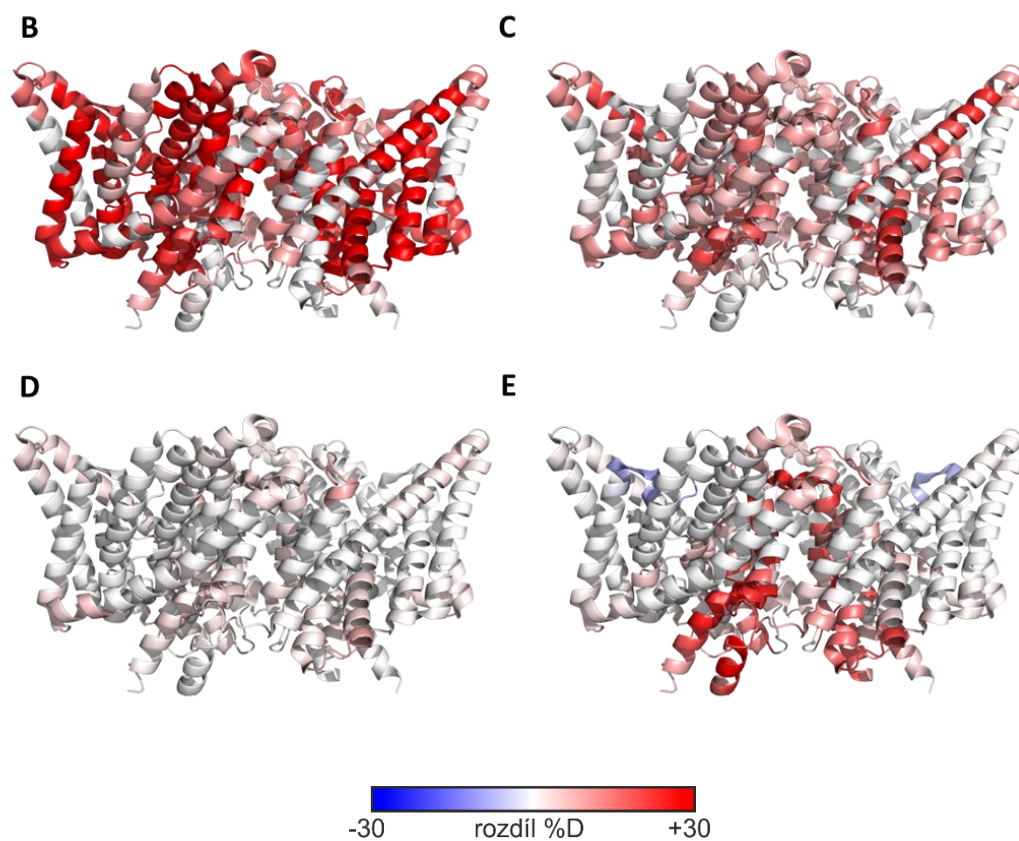
dochází k malým změnám konformace již při pH 3,5 a k výrazným změnám při pH 3,0. Malý vliv pH na prostorové uspořádání byl pozorován v oblasti 200-208, kde největší rozdíl byl při přechodu z pH 6,5 na pH 4,5. U peptidu 435-449 byly zachyceny konformační změny mezi pH 6,5 a 4,5, další malé změny při snížení pH na 3,5 a následně výrazné změny při okyselení na pH 3,0.



Obrázek 20 – Grafy závislosti deuterační na čase pro vybrané reprezentativní peptidy *ClC-ec1* při pěti různých hodnotách pH – 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 a 6,5 (A). Použité časy výměny byly 20 s, 63 s, 200 s, 633 s, 2000 s, 6325 s, 20000 s, 63000 s (20s, 633s a 20000s značení bylo provedeno v triplikátu). V grafech byla provedena korekce zohledňující rozdílnou rychlost výměny při různém pH. Pozice peptidů jsou zvýrazněny na struktuře *ClC-ec1* (B). Barvy segmentů odpovídají barvě aminokyselinového rozmezí v hlavičce grafů. Struktury byly barveny v programu PyMol³⁸ (PDB ID:1OTS).

Diferenční teplotní mapa potvrdila, že *CIC-ecI* i na úrovni celé sekvence (Obr. 21A, str. 53) podstupuje největší konformační změny mezi pH 3,0 a 3,5. Menší rozdíly pak byly zaznamenány mezi pH 3,5 a 4,0. Prostorové struktury *CIC-ecI* při pH 4,0 a 4,5 se lišily jen minimálně a změna pH z 4,5 na 6,5 byla opět doprovázena většími konformačními změnami. Rozdíly v deuteraci mezi sousedními pH zobrazené na strukturách (Obr. 21B-E, str. 54) ukázaly, že postupným snižováním pH dochází nejprve k vyšší deuteraci helixů transportních drah a následně i dalších helixů, které jsou od transportních drah vzdálené.





Obrázek 21 – Diferenční teplotní mapa zobrazující rozdíly v deuteraci mezi konformacemi CIC-*ec1* při pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 a 6,5 při ekvivalentních časech s přihlédnutím k rozdílné rychlosti H/D výměny při různém pH. Čas uvedený v mapě náleží vždy vyššímu pH. Rozdíly v deuteraci mezi konformacemi CIC-*ec1* při pH 3,0 a 3,5 (B); pH 3,5 a 4,0 (C), pH 4,0 a 4,5 (D), pH 4,5 a 6,5 (E) v nejdelších časových bodech jsou zobrazeny na struktuře CIC-*ec1*. Struktury byly barveny v programu PyMol³⁸ (PDB ID:1OTS).

5 Diskuze

Kanály a přenašeče CIC proteinové rodiny se vyskytují napříč všemi organismy včetně člověka. Podílí se na esenciálních procesech a jejich poškození vede u savců k různým onemocněním.³ Pro efektivní léčbu je nutné důkladně znát nejen jejich strukturu či lokalizaci v buňce, ale také mechanismy jakými fungují. Experimentální data ukázala, že části CIC proteinů, které se podílí na transportu, jsou napříč celou proteinovou rodinou konzervovány.^{31,32} Díky tomu lze jako modelový protein použít H^+/Cl^- antiporter CIC-*ec1* z *E.coli*, jehož krystalová struktura je známá už víc než 20 let.⁹ Mechanismus transportu iontů přes CIC-*ec1* byl dosud studován převážně pomocí proteinové krystalografie. Tato metoda poskytla částečné informace o transportním mechanismu CIC-*ec1*, nicméně neumožnila sledování konformace tohoto proteinu při vyšší koncentraci H^+ , jelikož krystalizace při nízkém pH zatím nebyla úspěšná.^{10,40} Proto jsme v této práci pro studium dynamiky CIC-*ec1* a jeho QQQ mutantu zvolili vodík-deuteriovou výměnu spojenou s hmotnostní spektrometrií, která sice neposkytuje struktury s vysokým rozlišením, ale dokáže monitorovat změny konformace proteinu v roztoku při široké škále podmínek včetně nízkého pH.^{63,64} Úroveň deuterace poskytuje informaci o přístupnosti rozpouštědla k páteři proteinu (peptidovému řetězci) a zapojení vodíkových můstků pro jednotlivé části proteinu. Části proteinu, které nejsou přístupné rozpouštědлу nebo jsou silně zapojeny do vodíkových můstků, vykazují velmi nízkou deuteraci. V kontextu membránových proteinů se jedná o např. membránové úseky, které jsou vnořeny do membrány, resp. při našich experimentech jsou obaleny detergentem.^{68,69} V případě proteinu CIC-*ec1* se jednalo např. o oblast proteinu 294-305 (Obr. 16, str. 48), kde nedocházelo k deuteraci při žádném z provedených experimentů.

Prvním krokem diplomové práce byla příprava proteinů. Pro expresi CIC-*ec1* byly použity kompetentní buňky *E. coli* BL-21 (DE3) a plasmidy pASK75 – CIC-*ec1* – WT/QQQ, které byly navrženy v spolupracující laboratoři profesorky M. Maduke ze Stanfordské Univerzity v USA. Po expresi provedené ve 4 l TB média následovala vícekroková purifikace. Prvním krokem purifikace byla afinitní chromatografie, která umožnila odstranění většiny proteinů od CIC-*ec1*. Následovalo štěpení histidinové kotvy CIC-*ec1*, která by v případě ponechání na proteinu mohla ovlivnit jeho konformaci, a tím výsledky strukturních studií. Dalším krokem byla

gelová permeační chromatografie, pomocí které byl odstraněn imidazol ze vzorku. Jelikož štěpení kotvy neprobíhá se stoprocentní účinností byla zařazena reverzní afinitní chromatografie, která umožnila oddělení ClC-*ecI* proteinů, u nichž se histidinovou kotvu nepodařilo odštěpit. Posledním krokem byla gelová permeační chromatografie, která vedla k převedení proteinu do pufru o správném složení a odstranění dalších kontaminací. Kontrolní elektroforéza po posledním purifikačním kroku potvrdila, že oba proteiny byly získány v dostatečné čistotě (Obr. 12, str. 44). Výtěžek proteinu ClC-*ecI* byl 8 mg a QQQ mutantu ClC-*ecI* 6 mg. Kontaminace bakteriálními proteiny z exprese by bylo možné odstranit dalšími purifikačními kroky, například iontově výměnou chromatografií. Nicméně v každém dalším purifikačním kroku, by docházelo ke snížení výtěžku a vzhledem k tomu, že manipulace s membránovými proteiny je náročná a kontaminace byly jen minoritní, rozhodli jsme se další purifikační kroky nezařadit.

U zde využitého „bottom-up“ přístupu vodík-deuteriové výměny spojené s hmotnostní spektrometrií, předchází analýze štěpení proteinů. Vhodný způsob štěpení proteinů zabezpečuje dostatečné prostorové rozlišení a kompletní sekvenční pokrytí. Důležitými ukazateli jsou redundance a délka produkovaných peptidů.⁹¹ Proto byla před HDX experimenty provedena optimalizace proteolytického štěpení ClC-*ecI*. Štěpení bylo provedeno na proteolytické koloně, jelikož předešlé experimenty ukázaly, že to je rychlejší a efektivnější způsob než štěpení v roztoku. Rychlost štěpení je důležitým faktorem, protože příliš dlouhé zpracování vzorků vede ke ztrátě deuterace, z důvodu zpětné výměny za protium.^{95,96} Ze stejného důvodu se pro štěpení proteinů v HDX experimentech používají kyselé proteasy, štěpící při kyselém pH, kdy je H/D výměna nejpomalejší.^{79,91} Dalším faktorem, ovlivňujícím rychlost zpětné výměny, je teplota, kdy s rostoucí teplotou roste i rychlost výměny.^{77,80} Pro HDX-MS experimenty ClC-*ecI* a jeho QQQ mutantu byly testovány dvě teploty a tři proteasové kolony. Nejprve byly porovnány dvě různé teploty štěpení: 0 °C a 20 °C. Pro toto srovnání byl použit imobilizovaný pepsin. Štěpení při teplotě 0 °C vedlo k nízkému sekvenčnímu pokrytí 71,04 % (Obr. 13, str. 45) i k výrazně nižší redundanci 3,82 (Obr. 14A, str. 46) v porovnání s teplotou 20 °C (sekvenční pokrytí: 90,70 %, redundance: 7,16). Vyšší efektivita štěpení při 20 °C může být způsobena vyšší fluiditou detergentu, a tím i lepší přístupností proteasy k proteinu. Proto pro další experimenty byla zvolena teplota 20 °C, při níž benefit vyšší efektivity štěpení převyšoval negativum větší zpětné výměny

způsobené vyšší teplotou štěpení (experimentálně zjištěné ztráty deuterace přibližně 2-5 %). Tuto ztrátu lze jednoduše kompenzovat použitím plně deuterovaných kontrol. Tyto vzorky představují maximální dosažitelnou deuteraci, a je jim při zpracování dat přiřazena hodnota deuterace 100%. Kromě štěpení ClC-*ec1* imobilizovaným pepsinem, byly testovány další dvě proteasové kolony při teplotě 20 °C – imobilizovaný nepenthesin 2 a ko-imobilizovaný nepenthesin 2-pepsin. Nejvyšší dosažené sekvenční pokrytí bylo 96,41 % a redundance 10,38 při štěpení ClC-*ec1* pomocí ko-imobilizovaného nepenthesinu 2 a pepsinu (Obr. 13, str. 45 a Obr. 14B, str. 46). Tyto podmínky byly použity pro štěpení všech dalších vzorků HDX výměny.

Jelikož ClC-*ec1* transportuje H⁺, má hodnota pH v jeho okolí značný vliv na jeho konformaci. Protonace postranních řetězců reziduí proteinu je klíčová pro transport iontů a přechod proteinu mezi jednotlivými stavy.^{2,10} Pro pochopení transportního mechanismu proteinu byly sledovány změny struktury proteinu v závislosti na změně pH. Hodnota pH však neovlivňuje jenom konformaci proteinu, ale také rychlost výměny (Obr. 10, str. 25). Zvýšením pH o jednotku se H/D výměna urychlí desetkrát, proto při každém experimentu bylo nutné provést korekci na odlišnou rychlost výměny (Obr. 15, str. 47).^{77,79} Vzhledem k této korekci byly zvoleny časové body výměny tak, aby po provedení korekce bylo možné deuteraci v jednotlivých časových bodech přímo srovnávat. Po provedení korekce se v případě shody prostorového uspořádání proteinu křivky jednotlivých pH v deuteracních grafech překrývaly. V případě, že deuteracní křivky pro různá pH na sebe nenasazují, sledujeme změnu konformace proteinu v konkrétním segmentu proteinu.

Krystalová struktura ClC-*ec1* ukázala, že jeho helixy jsou uspořádané do invertovaných topologických opakování.⁹ Tento motiv byl nalezen u jiných transportních proteinů, které během svého transportního mechanismu mění konformaci mezi stavem otevřeným ven a otevřeným dovnitř. Na základě strukturální podobnosti byla vyslovena hypotéza, že i ClC-*ec1* bude transportovat ionty podobným mechanismem.¹⁰⁶ Předěšlé studie pomocí mutací naznačily, že stav, při kterém je protein otevřen směrem ven, je indukovan protonací.^{2,10} Tuto konformaci se vědci pokoušeli zachytit pomocí krystalografie, ale krystalizace ClC-*ec1* při nízkém pH nebyla úspěšná. Z toho důvodu pro studium tohoto prostorového uspořádání byl navržen QQQ mutant (E148Q, E203Q a E113Q) reprezentující stav, v němž jsou tři klíčové glutamáty, které se podílí

na transportu, protonovány.⁴⁰ V první části strukturních studií pomocí HDX-MS, bylo sledováno prostorové uspořádání ClC-*ec1* a jeho QQQ mutantu při čtyřech různých pH 4,4; 5,4; 6,4 a 7,4. Postupní snižování pH o jednotku umožnilo sledování postupné protonace obou proteinů a srovnání jejich konformací při různých pH. Experimentálně bylo ověřeno, že QQQ mutant ClC-*ec1* při pH 7,4 se svou prostorovou strukturou v mnoha oblastech skutečně přibližuje ClC-*ec1* při pH 4,4 (Obr. 16, str. 48 a Obr. 17A,B, str. 49). Toto zjištění potvrzuje, že QQQ mutant ClC-*ec1* při pH 7,4 je skutečně dobrým modelem protonovaného stavu proteinu, což je v souladu s předešlými studiemi.⁴⁰ Porovnání strukturních změn proteinů při jednotlivých pH pomocí diferenční teplotní mapy (Obr. 17C, str. 49) ukazuje, že snížením pH se rozdíly v konformaci zmenšují, ale nevytrácí se úplně ani při pH 4,4. Tento experiment ověřil, že mutace tří glutamátů (QQQ mutace) v transportní dráze nereflektuje plně protonovaný stav ani při pH 4,4. Pro dosažení plně protonovaného stavu je nutné protonovat i jiné části proteinu mimo transportní dráhu. Proto jsme se rozhodli provést experiment při nižších hodnotách pH a sledovat protonaci celého, nyní již jen nemutovaného chloridového kanálu, v závislosti na různých pH.

V následujícím experimentu byla konformace ClC-*ec1* při velmi nízkém pH – 3,0 srovnána s prostorovým uspořádáním proteinu při pH 4,5 a 6,0. Při přechodu z pH 6,0 na 4,5 byly pozorovány jen malé změny v prostorovém uspořádání a to i při nejdelších časových bodech výměny. Přechod na pH 3,0 doprovázely výraznější konformační změny ve více oblastech (Obr. 18, str. 50, Obr. 19, str. 51). Nárůst deuterace při pH 3,0 v porovnání s pH 4,5 a 6,0 je zřetelný na grafech závislosti deuterace na čase (Obr. 18, str. 50). Tento experiment potvrzuje, že ClC-*ec1* při pH 4,5 skutečně nedosahuje plné protonace, a že změna prostorové struktury ClC-*ec1*, indukovaná protonací, probíhá ve dvou krocích. Porovnání konformace při pH 3,0 a 6,0 zobrazené na struktuře pomocí diferenčního barvení ukázalo, které helixy jsou změnou prostorového uspořádání nejvíce exponovány rozpouštědlu (Obr. 19B, str. 51). Jedná se zejména o oblast transportních drah, kde byly pozorovány největší rozdíly v deuteraci. Tedy snížením pH na hodnotu 3,0 dochází k jejich otevření a tvorbě řetězců vody podél celých transportních drah. Řetězce vody se pravděpodobně podílí na transportu iontů přes protein, což bylo zmíněno v předešlých studiích.⁴⁰ Avšak tato data ukazují, že k otevření nedochází jednomu na jedné straně proteinu, ale skrz celý protein. Toto zjištění naznačuje, že protein pravděpodobně nealteruje mezi stavem otevřeným ven

a otevřeným dovnitř, jak se předpokládalo.¹⁰⁶ Abychom vyloučili, že takto nízké pH poškozuje protein v průběhu HDX experimentu, byla provedena kontrola jeho integrity po posledním časovém bodu. CIC-*ec1* byl na závěr opět vystaven deuteraci po dobu 20 s a jelikož deuterace odpovídala počátečnímu 20s značení, bylo možné konstatovat, že nedochází k narušení struktury CIC-*ec1* nebo jeho fragmentaci.

V posledním HDX-MS experimentu jsme se zaměřili na sledování změn konformace CIC-*ec1* vlivem postupné protonace, v rozsahu nízkých pH. Experiment byl proveden při pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 a 6,5, přičemž protein při pH 6,5 reprezentuje stav s nízkou koncentrací H⁺. Deuterační grafy na Obr. 20, str. 52 potvrdily velké změny při pH 3,0, jako bylo pozorováno už v experimentu popsaném v předchozím odstavci. Dále byly pozorovány změny i při pH 3,5 i když v menší míře než u pH 3,0. U některých segmentů byly pozorovány malé změny a zvýšení přístupnosti rozpouštědla už i při pH 4,0/4,5 (např. 19-25 či 200-208), obdobně jako v předchozím experimentu. Rozdíly v konformaci proteinu mezi jednotlivými pH na úrovni celé sekvence potvrdily, že k největším změnám dochází mezi pH 3,0 a 3,5 (Obr. 21A, str. 53). Z ostatních pH přechodů byly pozorovány částečné změny prostorového uspořádání mezi pH 3,5 a 4,0, a to zejména při delších časech výměny. Konformace CIC-*ec1* při pH 4,0 a 4,5 byla téměř stejná, rozdíly v deuteraci byly minimální. Zobrazení rozdílů deuterace na struktuře CIC-*ec1* ukazuje, že při pH 4,5 je část transportní dráhy více přístupná rozpouštědлу oproti pH 6,5 (Obr. 21E, str. 54). Při přechodu z pH 4,0 na 3,5 dochází k vyšší deuteraci transportních drah i k malé deuteraci některých vzdálenějších helixů (Obr. 21C, str. 54). Přechod na pH 3,0 je spojen s velkými změnami prostorového uspořádání ve více oblastech proteinu (Obr. 21B, str. 54). Tento experiment potvrzuje výsledky předešlého HDX experimentu, že protonací proteinu dochází k rozsáhlým konformačním změnám vedoucím k otevření transportních drah a k tvorbě řetězců vody podél celého proteinu. K této změně dochází částečně mezi pH 3,5 a 4,0, ale převážně až při okyselení na pH 3,0.

Studium transportního mechanismu CIC-*ec1* pomocí HDX-MS popsané v této práci poskytlo bližší pohled na strukturní změny, kterými protein během transportu prochází. Předpokládané střídavé otevírání na obě strany membrány se jeví jako nepravdivé, jelikož experimenty ukázaly, že pozorované globální konformační změny vedou k otevření celé transportní dráhy skrz protein a tvorbě vodních řetězců.

K této tranzici dochází částečně už při snížení pH na hodnotu 4,5. Největší změny konformace jsou pozorovány až mezi pH 3,5 a 3,0.

6 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na expresi a purifikaci H^+/Cl^- antiporteru *ClC-ecI* z *E. coli*. Připravená byla přirozená forma a varianta s mutacemi v klíčových transportních aminokyselinách (tzv. QQQ mutant). Obě formy byly studovány pomocí vodík-deuteriové výměny spojené s hmotností spektrometrií (HDX-MS). Získané výsledky shrnují následující body:

- oba proteiny byly připraveny v dostatečné čistotě s výtěžkem 8 mg (*ClC-ecI*) a 6 mg (QQQ *ClC-ecI*) z 4 l TB média
- byla provedena optimalizace proteolytického štěpení *ClC-ecI*, přičemž nejlepšího výsledku bylo dosaženo pomocí kolony ko-immobilizovaného nepenthesinu 2-pepsinu při 20 °C (sekvenční pokrytí: 96,41 %, redundance: 10,38)
- QQQ mutant *ClC-ecI* je dobrým modelem protonovaného stavu *ClC-ecI*, nicméně nenahrazuje stav plné protonace
- *ClC-ecI* prochází největšími konformačními změnami pod pH 3,5, kdy dochází k otevření transportních drah proteinu a tvorbě vodních řetězců skrz celý protein

Seznam použité literatury

- (1) Hynek, R.; Valentová, O.; Kodíček, M. *Biochemie - chemický pohled na biologický svět*, 2nd ed.; VŠCHT: Praha, **2018**. ISBN 978-80-7592-124-6.
- (2) Accardi, A.; Miller, C. Secondary Active Transport Mediated by a Prokaryotic Homologue of ClC Cl⁻ Channels. *Nature* **2004**, *427* (6977), 803–807. <https://doi.org/10.1038/nature02314>.
- (3) Jentsch, T. J.; Pusch, M. ClC Chloride Channels and Transporters: Structure, Function, Physiology, and Disease. *Physiol. Rev.* **2018**, *98* (3), 1493–1590. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2017>.
- (4) Rinke, I.; Artmann, J.; Stein, V. ClC-2 Voltage-Gated Channels Constitute Part of the Background Conductance and Assist Chloride Extrusion. *J. Neurosci.* **2010**, *30* (13), 4776–4786. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6299-09.2010>.
- (5) Koch, M. C.; Steinmeyer, K.; Lorenz, C.; Ricker, K.; Wolf, F.; Otto, M.; Zoll, B.; Lehmann-Horn, F.; Grzeschik, K.-H.; Jentsch, T. J. The Skeletal Muscle Chloride Channel in Dominant and Recessive Human Myotonia. *Science* **1992**, *257* (5071), 797–800. <https://doi.org/10.1126/science.1379744>.
- (6) Lange, P. F.; Wartosch, L.; Jentsch, T. J.; Fuhrmann, J. C. ClC-7 Requires Ostm1 as a β -Subunit to Support Bone Resorption and Lysosomal Function. *Nature* **2006**, *440* (7081), 220–223. <https://doi.org/10.1038/nature04535>.
- (7) Vandewalle, A.; Cluzeaud, F.; Peng, K. C.; Bens, M.; Lüchow, A.; Günther, W.; Jentsch, T. J. Tissue Distribution and Subcellular Localization of the ClC-5 Chloride Channel in Rat Intestinal Cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2001**, *280* (2), C373–381. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.2.C373>.
- (8) Günther, W.; Lüchow, A.; Cluzeaud, F.; Vandewalle, A.; Jentsch, T. J. ClC-5, the Chloride Channel Mutated in Dent's Disease, Colocalizes with the Proton Pump in Endocytotically Active Kidney Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95* (14), 8075–8080. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8075>.
- (9) Dutzler, R.; Campbell, E. B.; Cadene, M.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. X-Ray Structure of a ClC Chloride Channel at 3.0 Å Reveals the Molecular Basis of Anion Selectivity. *Nature* **2002**, *415* (6869), 287–294. <https://doi.org/10.1038/415287a>.
- (10) Dutzler, R.; Campbell, E. B.; MacKinnon, R. Gating the Selectivity Filter in ClC Chloride Channels. *Science* **2003**, *300* (5616), 108–112. <https://doi.org/10.1126/science.1082708>.

- (11) Ignoul, S.; Eggermont, J. CBS Domains: Structure, Function, and Pathology in Human Proteins. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2005**, *289* (6), C1369–C1378. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00282.2005>.
- (12) Bykova, E. A.; Zhang, X.-D.; Chen, T.-Y.; Zheng, J. Large Movement in the C Terminus of CLC-0 Chloride Channel during Slow Gating. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13* (12), 1115–1119. <https://doi.org/10.1038/nsmb1176>.
- (13) Meyer, S.; Savaresi, S.; Forster, I. C.; Dutzler, R. Nucleotide Recognition by the Cytoplasmic Domain of the Human Chloride Transporter CLC-5. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14* (1), 60–67. <https://doi.org/10.1038/nsmb1188>.
- (14) Carr, G.; Simmons, N.; Sayer, J. A Role for CBS Domain 2 in Trafficking of Chloride Channel CLC-5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *310* (2), 600–605. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.057>.
- (15) Jentsch, T. J.; Steinmeyer, K.; Schwarz, G. Primary Structure of Torpedo Marmorata Chloride Channel Isolated by Expression Cloning in Xenopus Oocytes. *Nature* **1990**, *348* (6301), 510–514. <https://doi.org/10.1038/348510a0>.
- (16) Maduke, M.; Pheasant, D. J.; Miller, C. High-Level Expression, Functional Reconstitution, and Quaternary Structure of a Prokaryotic Clc-Type Chloride Channel. *J. Gen. Physiol.* **1999**, *114* (5), 713–722. <https://doi.org/10.1085/jgp.114.5.713>.
- (17) Flis, K.; Bednarczyk, P.; Hordejuk, R.; Szewczyk, A.; Berest, V.; Dolowy, K.; Edelman, A.; Kurlandzka, A. The Gef1 Protein of *Saccharomyces Cerevisiae* Is Associated with Chloride Channel Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *294* (5), 1144–1150. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00610-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00610-1).
- (18) Poroca, D. R.; Pelis, R. M.; Chappe, V. M. ClC Channels and Transporters: Structure, Physiological Functions, and Implications in Human Chloride Channelopathies. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00151>.
- (19) Lossin, C.; George, A. L. Chapter 2 Myotonia Congenita. In *Advances in Genetics*; Academic Press, **2008**; Vol. 63, p. 25–55. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)01002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)01002-X).
- (20) Catalán, M.; Niemeyer, M. I.; Cid, L. P.; Sepúlveda, F. V. Basolateral CLC-2 Chloride Channels in Surface Colon Epithelium: Regulation by a Direct Effect of Intracellular Chloride. *Gastroenterology* **2004**, *126* (4), 1104–1114. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.01.010>.
- (21) Jeworutzki, E.; López-Hernández, T.; Capdevila-Nortes, X.; Sirisi, S.; Bengtsson, L.; Montolio, M.; Zifarelli, G.; Arnedo, T.; Müller, C. S.; Schulte, U.; Nunes, V.; Martínez, A.; Jentsch, T. J.; Gasull, X.; Pusch, M.; Estévez, R. GlialCAM, a Protein Defective in a Leukodystrophy, Serves

- as a ClC-2 Cl⁻ Channel Auxiliary Subunit. *Neuron* **2012**, *73* (5), 951–961. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.12.039>.
- (22) Adachi, S.; Uchida, S.; Ito, H.; Hata, M.; Hiroe, M.; Marumo, F.; Sasaki, S. Two Isoforms of a Chloride Channel Predominantly Expressed in Thick Ascending Limb of Henle's Loop and Collecting Ducts of Rat Kidney. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (26), 17677–17683.
- (23) Estévez, R.; Boettger, T.; Stein, V.; Birkenhäger, R.; Otto, E.; Hildebrandt, F.; Jentsch, T. J. Barttin Is a Cl⁻ Channel Beta-Subunit Crucial for Renal Cl⁻ Reabsorption and Inner Ear K⁺ Secretion. *Nature* **2001**, *414* (6863), 558–561. <https://doi.org/10.1038/35107099>.
- (24) Uchida, S.; Sasaki, S.; Nitta, K.; Uchida, K.; Horita, S.; Nihei, H.; Marumo, F. Localization and Functional Characterization of Rat Kidney-Specific Chloride Channel, ClC-K1. *J. Clin. Invest.* **1995**, *95* (1), 104–113.
- (25) Andrini, O.; Keck, M.; Briones, R.; Lourdel, S.; Vargas-Poussou, R.; Teulon, J. ClC-K Chloride Channels: Emerging Pathophysiology of Bartter Syndrome Type 3. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **2015**, *308* (12), F1324–F1334. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00004.2015>.
- (26) Rickheit, G.; Maier, H.; Strenzke, N.; Andreescu, C. E.; De Zeeuw, C. I.; Muenscher, A.; Zdebik, A. A.; Jentsch, T. J. Endocochlear Potential Depends on Cl⁻ Channels: Mechanism Underlying Deafness in Bartter Syndrome IV. *EMBO J.* **2008**, *27* (21), 2907–2917. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.203>.
- (27) Picollo, A.; Pusch, M. Chloride/Proton Antiporter Activity of Mammalian CLC Proteins ClC-4 and ClC-5. *Nature* **2005**, *436* (7049), 420–423. <https://doi.org/10.1038/nature03720>.
- (28) Stobrawa, S. M.; Breiderhoff, T.; Takamori, S.; Engel, D.; Schweizer, M.; Zdebik, A. A.; Bösl, M. R.; Ruether, K.; Jahn, H.; Draguhn, A.; Jahn, R.; Jentsch, T. J. Disruption of ClC-3, a Chloride Channel Expressed on Synaptic Vesicles, Leads to a Loss of the Hippocampus. *Neuron* **2001**, *29* (1), 185–196. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00189-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00189-1).
- (29) Okkenhaug, H.; Weylandt, K.-H.; Carmena, D.; Wells, D. J.; Higgins, C. F.; Sardini, A. The Human ClC-4 Protein, a Member of the CLC Chloride Channel/Transporter Family, Is Localized to the Endoplasmic Reticulum by Its N-Terminus. *FASEB J.* **2006**, *20* (13), 2390–2392. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5588fje>.
- (30) Poët, M.; Kornak, U.; Schweizer, M.; Zdebik, A. A.; Scheel, O.; Hoelter, S.; Wurst, W.; Schmitt, A.; Fuhrmann, J. C.; Planells-Cases, R.; Mole, S. E.; Hübner, C. A.; Jentsch, T. J. Lysosomal Storage Disease upon Disruption of the Neuronal Chloride Transport Protein ClC-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (37), 13854–13859. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606137103>.

- (31) Engh, A. M.; Maduke, M. Cysteine Accessibility in CLC-0 Supports Conservation of the CLC Intracellular Vestibule. *J. Gen. Physiol.* **2005**, *125* (6), 601–617. <https://doi.org/10.1085/jgp.200509258>.
- (32) Estévez, R.; Schroeder, B. C.; Accardi, A.; Jentsch, T. J.; Pusch, M. Conservation of Chloride Channel Structure Revealed by an Inhibitor Binding Site in CLC-1. *Neuron* **2003**, *38* (1), 47–59. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00168-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00168-5).
- (33) Zifarelli, G.; Pusch, M. Conversion of the 2 Cl⁻/1 H⁺ Antiporter CLC-5 in a NO₃⁻/H⁺ Antiporter by a Single Point Mutation. *EMBO J.* **2009**, *28* (3), 175–182. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.284>.
- (34) Accardi, A.; Lobet, S.; Williams, C.; Miller, C.; Dutzler, R. Synergism Between Halide Binding and Proton Transport in a CLC-Type Exchanger. *J. Mol. Biol.* **2006**, *362* (4), 691–699. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.081>.
- (35) Picollo, A.; Xu, Y.; Johner, N.; Bernèche, S.; Accardi, A. Synergistic Substrate Binding Determines the Stoichiometry of Transport of a Prokaryotic H⁺/Cl⁻ Exchanger. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19* (5), 525–531. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2277>.
- (36) Jayaram, H.; Accardi, A.; Wu, F.; Williams, C.; Miller, C. Ion Permeation through a Cl⁻ - Selective Channel Designed from a CLC Cl⁻ /H⁺ Exchanger. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (32), 11194–11199. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804503105>.
- (37) Accardi, A.; Walden, M.; Nguitragool, W.; Jayaram, H.; Williams, C.; Miller, C. Separate Ion Pathways in a Cl⁻/H⁺ Exchanger. *J. Gen. Physiol.* **2005**, *126* (6), 563–570. <https://doi.org/10.1085/jgp.200509417>.
- (38) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC.
- (39) Han, W.; Cheng, R. C.; Maduke, M. C.; Tajkhorshid, E. Water Access Points and Hydration Pathways in CLC H⁺ /Cl⁻ Transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (5), 1819–1824. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317890111>.
- (40) Chavan, T. S.; Cheng, R. C.; Jiang, T.; Mathews, I. I.; Stein, R. A.; Koehl, A.; Mchaourab, H. S.; Tajkhorshid, E.; Maduke, M. A CLC-Ec1 Mutant Reveals Global Conformational Change and Suggests a Unifying Mechanism for the CLC Cl⁻/H⁺ Transport Cycle. *eLife* **2020**, *9*, e53479. <https://doi.org/10.7554/eLife.53479>.
- (41) Abraham, S. J.; Cheng, R. C.; Chew, T. A.; Khantwal, C. M.; Liu, C. W.; Gong, S.; Nakamoto, R. K.; Maduke, M. ¹³C NMR Detects Conformational Change in the 100-KD Membrane Transporter CLC-Ec1. *J. Biomol. NMR* **2015**, *61* (3–4), 209–226. <https://doi.org/10.1007/s10858-015-9898-7>.
- (42) Khantwal, C. M.; Abraham, S. J.; Han, W.; Jiang, T.; Chavan, T. S.; Cheng, R. C.; Elvington, S. M.; Liu, C. W.; Mathews, I. I.; Stein, R. A.; Mchaourab, H. S.; Tajkhorshid, E.; Maduke, M.

- Revealing an Outward-Facing Open Conformational State in a CLC Cl⁻/H⁺ Exchange Transporter. *eLife* **2016**, *5*, e11189. <https://doi.org/10.7554/eLife.11189>.
- (43) Miller, C.; Nguitrageol, W. A Provisional Transport Mechanism for a Chloride Channel-Type Cl⁻/H⁺ Exchanger. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2009**, *364* (1514), 175–180. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0138>.
- (44) Feng, L.; Campbell, E. B.; Hsiung, Y.; MacKinnon, R. Structure of a Eukaryotic CLC Transporter Defines an Intermediate State in the Transport Cycle. *Science* **2010**, *330* (6004), 635–641. <https://doi.org/10.1126/science.1195230>.
- (45) Basilio, D.; Noack, K.; Picollo, A.; Accardi, A. Conformational Changes Required for H⁺/Cl⁻ Exchange Mediated by a CLC Transporter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21* (5), 456–463. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2814>.
- (46) Picollo, A.; Malvezzi, M.; Houtman, J. C. D.; Accardi, A. Basis of Substrate Binding and Conservation of Selectivity in the CLC Family of Channels and Transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16* (12), 1294–1301. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1704>.
- (47) Li, M. J.; Guttman, M.; Atkins, W. M. Conformational Dynamics of P-Glycoprotein in Lipid Nanodiscs and Detergent Micelles Reveal Complex Motions on a Wide Time Scale. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293* (17), 6297–6307. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002190>.
- (48) Garavito, R. M.; Ferguson-Miller, S. Detergents as Tools in Membrane Biochemistry. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (35), 32403–32406. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100031200>.
- (49) Kjølbye, L. R.; De Maria, L.; Wassenaar, T. A.; Abdizadeh, H.; Marrink, S. J.; Ferkinghoff-Borg, J.; Schiøtt, B. General Protocol for Constructing Molecular Models of Nanodiscs. *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *61* (6), 2869–2883. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00157>.
- (50) Dürr, U. H. N.; Soong, R.; Ramamoorthy, A. When Detergent Meets Bilayer: Birth and Coming of Age of Lipid Bicelles. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *69*, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2013.01.001>.
- (51) Knowles, T. J.; Finka, R.; Smith, C.; Lin, Y.-P.; Dafforn, T.; Overduin, M. Membrane Proteins Solubilized Intact in Lipid Containing Nanoparticles Bounded by Styrene Maleic Acid Copolymer. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (22), 7484–7485. <https://doi.org/10.1021/ja810046q>.
- (52) Frauenfeld, J.; Löving, R.; Armache, J.-P.; Sonnen, A. F.-P.; Guettou, F.; Moberg, P.; Zhu, L.; Jegerschöld, C.; Flayhan, A.; Briggs, J. A. G.; Garoff, H.; Löw, C.; Cheng, Y.; Nordlund, P. A Saposin-Lipoprotein Nanoparticle System for Membrane Proteins. *Nat. Methods* **2016**, *13* (4), 345–351. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3801>.

- (53) Yeh, V.; Goode, A.; Bonev, B. B. Membrane Protein Structure Determination and Characterisation by Solution and Solid-State NMR. *Biology* **2020**, *9* (11), 396. <https://doi.org/10.3390/biology9110396>.
- (54) Boulos, I.; Jabbour, J.; Khoury, S.; Mikhael, N.; Tishkova, V.; Candoni, N.; Ghadie, H. E.; Veessler, S.; Bassim, Y.; Azar, S.; Harb, F. Exploring the World of Membrane Proteins: Techniques and Methods for Understanding Structure, Function, and Dynamics. *Molecules* **2023**, *28* (20), 7176. <https://doi.org/10.3390/molecules28207176>.
- (55) Srivastava, A.; Nagai, T.; Srivastava, A.; Miyashita, O.; Tama, F. Role of Computational Methods in Going beyond X-Ray Crystallography to Explore Protein Structure and Dynamics. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (11), 3401. <https://doi.org/10.3390/ijms19113401>.
- (56) Murata, K.; Wolf, M. Cryo-Electron Microscopy for Structural Analysis of Dynamic Biological Macromolecules. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2018**, *1862* (2), 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.07.020>.
- (57) Yip, K. M.; Fischer, N.; Paknia, E.; Chari, A.; Stark, H. Atomic-Resolution Protein Structure Determination by Cryo-EM. *Nature* **2020**, *587* (7832), 157–161. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2833-4>.
- (58) Fortea, E.; Lee, S.; Chadda, R.; Argyros, Y.; Sandal, P.; Mahoney-Kruszka, R.; Ciftci, H. D.; Falzone, M. E.; Huysmans, G.; Robertson, J. L.; Boudker, O.; Accardi, A. Structural Basis of pH-Dependent Activation in a CLC Transporter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2024**. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01210-5>.
- (59) Palmer, A. G. I. NMR Characterization of the Dynamics of Biomacromolecules. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (8), 3623–3640. <https://doi.org/10.1021/cr030413t>.
- (60) Patching, S. G. Solid-State NMR Structures of Integral Membrane Proteins. *Mol. Membr. Biol.* **2015**, *32* (5–8), 156–178. <https://doi.org/10.3109/09687688.2016.1139754>.
- (61) Puthenveetil, R.; Vinogradova, O. Solution NMR: A Powerful Tool for Structural and Functional Studies of Membrane Proteins in Reconstituted Environments. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (44), 15914–15931. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.009178>.
- (62) Elvington, S. M.; Liu, C. W.; Maduke, M. C. Substrate-Driven Conformational Changes in CIC-Ec1 Observed by Fluorine NMR. *EMBO J.* **2009**, *28* (20), 3090–3102. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.259>.
- (63) Iacob, R. E.; Engen, J. R. Hydrogen Exchange Mass Spectrometry: Are We Out of the Quicksand? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23* (6), 1003–1010. <https://doi.org/10.1007/s13361-012-0377-z>.

- (64) Mayne, L.; Paterson, Y.; Cerasoli, D.; Englander, S. W. Effect of Antibody Binding on Protein Motions Studied by Hydrogen-Exchange Labeling and Two-Dimensional NMR. *Biochemistry* **1992**, *31* (44), 10678–10685. <https://doi.org/10.1021/bi00159a006>.
- (65) Skinner, J. J.; Lim, W. K.; Bédard, S.; Black, B. E.; Englander, S. W. Protein Dynamics Viewed by Hydrogen Exchange. *Protein Sci.* **2012**, *21* (7), 996–1005. <https://doi.org/10.1002/pro.2081>.
- (66) Wales, T. E.; Engen, J. R. Hydrogen Exchange Mass Spectrometry for the Analysis of Protein Dynamics. *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25* (1), 158–170. <https://doi.org/10.1002/mas.20064>.
- (67) Marcisin, S. R.; Engen, J. R. Hydrogen Exchange Mass Spectrometry: What Is It and What Can It Tell Us? *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397* (3), 967–972. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3556-4>.
- (68) Hvidt, A.; Linderstrøm-Lang, K. The Kinetics of the Deuterium Exchange of Insulin with D₂O. An Amendment. *Biochim. Biophys. Acta* **1955**, *16*, 168–169. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(55\)90200-6](https://doi.org/10.1016/0006-3002(55)90200-6).
- (69) James, E. I.; Murphree, T. A.; Vorauer, C.; Engen, J. R.; Guttman, M. Advances in Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry and the Pursuit of Challenging Biological Systems. *Chem. Rev.* **2022**, *122* (8), 7562–7623. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00279>.
- (70) Englander, S. W.; Kallenbach, N. R. Hydrogen Exchange and Structural Dynamics of Proteins and Nucleic Acids. *Q. Rev. Biophys.* **1983**, *16* (4), 521–655. <https://doi.org/10.1017/S0033583500005217>.
- (71) Fuentes, E. J.; Wand, A. J. Local Dynamics and Stability of Apocytochrome B562 Examined by Hydrogen Exchange. *Biochemistry* **1998**, *37* (11), 3687–3698. <https://doi.org/10.1021/bi972579s>.
- (72) Wildes, D.; Marqusee, S. Hydrogen Exchange and Ligand Binding: Ligand-Dependent and Ligand-Independent Protection in the Src SH3 Domain. *Protein Sci.* **2005**, *14* (1), 81–88. <https://doi.org/10.1110/ps.04990205>.
- (73) Chetty, P. S.; Mayne, L.; Lund-Katz, S.; Englander, S. W.; Phillips, M. C. Helical Structure, Stability, and Dynamics in Human Apolipoprotein E3 and E4 by Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (5), 968–973. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617523114>.
- (74) Engen, J. R.; Smithgall, T. E.; Gmeiner, W. H.; Smith, D. L. Identification and Localization of Slow, Natural, Cooperative Unfolding in the Hematopoietic Cell Kinase SH3 Domain

- by Amide Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry. *Biochemistry* **1997**, *36* (47), 14384–14391. <https://doi.org/10.1021/bi971635m>.
- (75) Guttman, M.; Lee, K. K. Isotope Labeling of Biomolecules: Structural Analysis of Viruses by HDX-MS. *Methods Enzymol.* **2016**, *566*, 405–426. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.05.021>.
- (76) Perrin, C. L. Proton Exchange in Amides: Surprises from Simple Systems. *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22* (8), 268–275. <https://doi.org/10.1021/ar00164a002>.
- (77) Bai, Y.; Milne, J. S.; Mayne, L.; Englander, S. W. Primary Structure Effects on Peptide Group Hydrogen Exchange. *Proteins* **1993**, *17* (1), 75–86. <https://doi.org/10.1002/prot.340170110>.
- (78) Oganessian, I.; Lento, C.; Wilson, D. J. Contemporary Hydrogen Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Methods* **2018**, *144*, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.04.023>.
- (79) Walters, B. T.; Ricciuti, A.; Mayne, L.; Englander, S. W. Minimizing Back Exchange in the Hydrogen Exchange-Mass Spectrometry Experiment. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23* (12), 2132–2139. <https://doi.org/10.1007/s13361-012-0476-x>.
- (80) Covington, A. K.; Robinson, R. A.; Bates, R. G. Ionization Constant of Deuterium Oxide from 5 to 50 Deg. *J Phys Chem* *70* 3820-4Dec 15 1966 **1966**. <https://doi.org/10.1021/j100884a011>.
- (81) Lown, D. A.; Thirsk, H. R.; Wynne-Jones, Lord. Effect of Pressure on Ionization Equilibria in Water at 25°C. *Trans. Faraday Soc.* **1968**, *64* (0), 2073–2080. <https://doi.org/10.1039/TF9686402073>.
- (82) Kim, P. S.; Baldwin, R. L. Influence of Charge on the Rate of Amide Proton Exchange. *Biochemistry* **1982**, *21* (1), 1–5. <https://doi.org/10.1021/bi00530a001>.
- (83) Slys, G. W.; Percy, A. J.; Schriemer, D. C. Restraining Expansion of the Peak Envelope in H/D Exchange-MS and Its Application in Detecting Perturbations of Protein Structure/Dynamics. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (18), 7004–7011. <https://doi.org/10.1021/ac800897q>.
- (84) Coales, S. J.; E, S. Y.; Lee, J. E.; Ma, A.; Morrow, J. A.; Hamuro, Y. Expansion of Time Window for Mass Spectrometric Measurement of Amide Hydrogen/Deuterium Exchange Reactions. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **2010**, *24* (24), 3585–3592. <https://doi.org/10.1002/rcm.4814>.
- (85) Hoofnagle, A. N.; Resing, K. A.; Ahn, N. G. Protein Analysis by Hydrogen Exchange Mass Spectrometry. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32* (1), 1–25. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142417>.
- (86) Wales, T. E.; Eggertson, M. J.; Engen, J. R. Considerations in the Analysis of Hydrogen Exchange Mass Spectrometry Data. In *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*;

- Matthiesen, R., Ed.; *Methods in Molecular Biology*; Humana Press: Totowa, NJ, **2013**; Vol. 1007, pp 263–288. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-392-3_11.
- (87) Zhang, Z.; Smith, D. L. Determination of Amide Hydrogen Exchange by Mass Spectrometry: A New Tool for Protein Structure Elucidation. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **1993**, *2* (4), 522–531.
- (88) Dupree, E. J.; Jayathirtha, M.; Yorkey, H.; Mihasan, M.; Petre, B. A.; Darie, C. C. A Critical Review of Bottom-Up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field. *Proteomes* **2020**, *8* (3), 14. <https://doi.org/10.3390/proteomes8030014>.
- (89) Pan, J.; Han, J.; Borchers, C. H.; Konermann, L. Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry with Top-down Electron Capture Dissociation for Characterizing Structural Transitions of a 17 KDa Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (35), 12801–12808. <https://doi.org/10.1021/ja904379w>.
- (90) Xie, M. *What is HDX-MS Epitope Mapping?*. Rapid Novor. Dostupné z URL: <https://www.rapidnovor.com/what-is-hdx-ms-epitope-mapping/> [cit. 16. 2. 2024].
- (91) Cravello, L.; Lascoux, D.; Forest, E. Use of Different Proteases Working in Acidic Conditions to Improve Sequence Coverage and Resolution in Hydrogen/Deuterium Exchange of Large Proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17* (21), 2387–2393. <https://doi.org/10.1002/rcm.1207>.
- (92) Powers, J. C.; Harley, A. D.; Myers, D. V. Subsite Specificity of Porcine Pepsin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1977**, *95*, 141–157. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0719-9_9.
- (93) Kadek, A.; Mrazek, H.; Halada, P.; Rey, M.; Schriemer, D. C.; Man, P. Aspartic Protease Nephthesin-1 as a Tool for Digestion in Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (9), 4287–4294. <https://doi.org/10.1021/ac404076j>.
- (94) Tsiatsiani, L.; Akeroyd, M.; Olsthoorn, M.; Heck, A. J. R. Aspergillus Niger Prolyl Endoprotease for Hydrogen–Deuterium Exchange Mass Spectrometry and Protein Structural Studies. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (15), 7966–7973. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01161>.
- (95) Wang, L.; Pan, H.; Smith, D. L. Hydrogen Exchange-Mass Spectrometry: Optimization of Digestion Conditions*. *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1* (2), 132–138. <https://doi.org/10.1074/mcp.M100009-MCP200>.
- (96) Ahn, J.; Cao, M.-J.; Yu, Y. Q.; Engen, J. R. Accessing the Reproducibility and Specificity of Pepsin and Other Aspartic Proteases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2013**, *1834* (6), 1222–1229. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.10.003>.

- (97) Möller, I. R.; Slivacka, M.; Hausner, J.; Nielsen, A. K.; Pospíšilová, E.; Merkle, P. S.; Lišková, R.; Polák, M.; Loland, C. J.; Kádek, A.; Man, P.; Rand, K. D. Improving the Sequence Coverage of Integral Membrane Proteins during Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Experiments. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (17), 10970–10978. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00973>.
- (98) Zhang, H.-M.; Bou-Assaf, G. M.; Emmett, M. R.; Marshall, A. G. Fast Reversed-Phase Liquid Chromatography to Reduce Back Exchange and Increase Throughput in H/D Exchange Monitored by FT-ICR Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20* (3), 520–524. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.11.010>.
- (99) Wu, Y.; Engen, J. R.; Hobbins, W. B. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) Further Improves Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17* (2), 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.10.009>.
- (100) Coales, S. J.; Tomasso, J. C.; Hamuro, Y. Effects of Electrospray Capillary Temperature on Amide Hydrogen Exchange. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **2008**, *22* (9), 1367–1371. <https://doi.org/10.1002/rcm.3512>.
- (101) Burns, K. M.; Rey, M.; Baker, C. A. H.; Schriemer, D. C. Platform Dependencies in Bottom-up Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **2013**, *12* (2), 539–548. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.023770>.
- (102) Iacob, R. E.; Murphy III, J. P.; Engen, J. R. Ion Mobility Adds an Additional Dimension to Mass Spectrometric Analysis of Solution-Phase Hydrogen/Deuterium Exchange. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22* (18), 2898–2904. <https://doi.org/10.1002/rcm.3688>.
- (103) Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S. Probability-Based Protein Identification by Searching Sequence Databases Using Mass Spectrometry Data. *Electrophoresis* **1999**, *20* (18), 3551–3567. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19991201\)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2).
- (104) Kavan, D.; Man, P. MStools—Web Based Application for Visualization and Presentation of HXMS Data. *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, *302* (1), 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2010.07.030>.
- (105) McIlvaine, T. C. A Buffer Solution for Colorimetric Comparison. *J. Biol. Chem.* **1921**, *49* (1), 183–186. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86000-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86000-8).
- (106) Duran, A. M.; Meiler, J. Inverted Topologies in Membrane Proteins: A Mini-Review. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2013**, *8*, e201308004. <https://doi.org/10.5936/csbj.201308004>.