

Nieomal wszystkie procesy w komórkach prowadzone są przez białka. Funkcja białek jest zależna od ich sekwencji aminokwasowej, modyfikacji potranslacyjnych i związanych ligandów. Wszystkie te elementy decydują o strukturze danego białka a tym samym o jego funkcjach biologicznych, które manifestują się w zwinionym białku. Dlatego też badanie struktur białek jest tak istotne. Jednakże białka, jak wszystkie inne cząstki, charakteryzują się pewną ruchliwością. Ze względu na duży rozmiar mają znacznie większy zakres ruchu (w porównaniu ze związkami drobnocząsteczkowymi), który również może mieć znaczenie fizjologiczne. W zwinionym białku możemy wyróżnić regiony o większej lub mniejszej stabilności. Stabilność tę możemy badać za pomocą unikalnej techniki jaką jest wymiana proton-deuter monitorowana za pomocą spektrometrii mas (HDX-MS). Jej szczególność wynika z możliwości obserwacji dynamiki danej struktury białkowej. Pozwala określić, które stabilność jak i stopień ekspozycji do środowiska danych regionów białka. Umożliwia ona mapowanie rejonu odpowiedzialnego za oddziaływanie między danymi białkami, poprzez określenie, które rejonu w wyniku oddziaływania stały się mniej podatne na wymianę proton-deuter. Technika ta znajduje szczególne zastosowanie w naukach o życiu, medycznych czy przemyśle biofarmaceutycznym, ze względu na badanie przeciwciał, mapowanie ich epitopów itd.

Wymiana wodoru na deuteru (HDX-MS) monitorowana spektrometrią mas (MS) jest sposobem na przeprowadzenie analizy białka dostarczającego unikalnych informacji na temat dynamiki jego struktury. Głównym zadaniem jest obserwacja zachowania się białka w stanie naturalnym w roztworze wodnym, gdzie cząsteczki wodoru są zastępowane przez cząsteczki deuteru. W kontrolowanych warunkach zachodzi spontaniczny proces wymiany. Ten rodzaj eksperymentu może zebrać bardzo skuteczne dane na temat tego, jak wymiana przebiega w głównym łańcuchu białka - wymiana w łańcuchach bocznych aminokwasów przebiega zbyt szybko, aby można ją było prawidłowo zmierzyć. Bada strukturę nie tylko na podstawowym poziomie, lecz także wyższego rzędu.

Proces analizy danych HDX-MS nie dość, że jest złożony ale również nieustandaryzowany. Oprogramowanie i sprzęt dedykowane do uzyskiwania surowych wyników eksperymentu zajmują się jedynie wstępnym przetwarzaniem i walidacją podstawowych danych. Wizualizacja i interpretacja danych zależy wyłącznie od umiejętności eksperymentatora, który może znajdować się na różnych poziomach i z różnych środowisk. Brak oficjalnej metodologii sprawia, że zadanie to jest jeszcze bardziej skomplikowane.

Szczególną cechą eksperymentów HDX-MS jest to, że wytwarzają one unikalne dane, których nie można uzyskać w żaden inny sposób. Na przykład, prawie jedna trzecia białek jest uważana za białko wewnętrznie nieuporządkowane - bez ustalonej lub uporządkowanej trójwymiarowej struktury. Dla nich eksperymenty krystalograficzne nie mogą być przeprowadzone - ale HDX-MS może. Jest to również odpowiednie rozwiązanie do analizy bardzo długich białek - w porównaniu z krótkimi sekwencjami białkowymi, które mogą być przetwarzane przy użyciu metody NMR. Ponadto HDX-MS może dać pewien wgląd, jeśli funkcja białka jest zachowana w połączeniu z innymi substancjami - co jest szczególnie ważne przy konstruowaniu i analizowaniu nowych lub już istniejących leków.

Wadą metody HDX-MS w porównaniu z krystalografią lub NMR jest uzyskanie danych dla całego peptydu (danych niskiej rozdzielczości) zamiast pojedynczego aminokwasu (wysokiej rozdzielczości). Eliminacja tego ograniczenia może sprawić, że metoda HDX-MS stanie się bardziej efektywna i konkurencyjna w stosunku do innych.

Dane z eksperymentów HDX-MS zapewniają unikalny wgląd w dynamikę struktury białek. Takie informacje są bardzo cennym dodatkiem do istniejących lub przyszłych modeli białek i kompleksów białkowych. Dostarczają one danych na temat mechaniki molekularnych procesów biologicznych, gdzie ich dynamika jest kluczowa dla zrozumienia ich przebiegu. Uważamy jednak, że dane HDX-MS mogą być analizowane w sposób bardziej efektywny i informacyjny poprzez przejście z par peptydów (o niskiej rozdzielczości) na pary aminokwasów (o wysokiej rozdzielczości).

**Dlatego też celem tej pracy jest stworzenie wiarygodnych metod biofizycznych do analizy eksperymentów HDX-MS o wysokiej rozdzielczości i ich zastosowania w badaniach białek nieustrukturyzowanych.**