

Određivanje molekulske mase proteina odabranim fizikalno-kemijskim metodama

Jurilj, Robert

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:474317>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Robert Jurilj

0119051748

**ODREĐIVANJE MASE PROTEINA ODRABRANIM FIZIKALNO-KEMIJSKIM
METODAMA**
ZAVRŠNI RAD

Predmet: Fizikalna kemija

Mentor: doc. dr. sc. Anita Horvatić

Zagreb, 2024.

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Određivanje molekulske mase proteina odabranim fizikalno-kemijskim metodama

Robert Jurilj, 0119051748

Sažetak:

Proteini su makromolekule koje se nalaze u svim živim organizmima i sudjeluju u svim fiziološkim procesima, što ih čini predmetom istraživanja u različitim područjima istraživanja poput biologije, biokemije, biotehnologije, medicine, kao i u farmaceutskoj industriji. Navedena istraživanja mogu biti usmjerena ka karakterizaciji nepoznatih proteina (ponajprije njihovu identifikaciju) ili kvantifikaciju. Identifikacija proteina omogućuje daljnje određivanje svojstava proteina kao što su potvrda strukture (primarne, sekundarne, tercijarne i/ili kvaterne) posttranslacijskih modifikacija, fizikalno-kemijskih svojstava (pI, molekulska masa), ali i određivanje njihove biološke funkcije i lokalizacije. Određivanje molekulske mase posebno je važno kod karakterizacije pročišćenih proteina od interesa (npr. enzima i biofarmaceutika). Rad će se usmjeriti na određivanje molekulske mase odabranim fizikalno-kemijskim metodama. Iako postoje brojne metode, fokus će biti na analitičkom centrifugiranju, elektroforezi u gelu te spektrometriji masa kao najsuvremenijoj i najsofisticiranijoj metodi.

Ključne riječi: molekulska masa, analitičko ultracentrifugiranje, elektroforeza, spektrometrija masa

Rad sadrži: 23 stranica, 7 slika, 2 tablice, 13 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb.

Mentor: doc. dr. sc. Anita Horvatić

Datum obrane: 16. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION DANA

Undergraduate thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory of Physical Chemistry and Corrosion

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Determination of Molecular Mass of Proteins by Selected Physicochemical Methods

Robert Jurilj, 0119051748

Abstract:

Proteins are macromolecules essential for life participating in numerous physiological processes, which makes them the subject of study in various research fields such as biology, biochemistry, biotechnology, medicine and the pharmaceutical industry. The research can be focused on the characterization of unknown proteins (preferably their identification) and/or quantification. Protein identification enables further determination of protein properties such as structure determination (e.g. amino acid sequence, secondary, tertiary and quaternary structure, post-translational modification), physicochemical properties (pI, molecular weight) or biological function. Molecular weight determination is crucial for purified proteins of interest (e.g. enzymes or biopharmaceuticals). Although there are numerous methods, this work will be focus on the determination of molecular weight by selected physicochemical methods: analytical centrifugation, gel electrophoresis, and finally mass spectrometry as the most modern and sophisticated method.

Keywords: molecular mass, analytical centrifugation, gel electrophoresis, mass spectrometry

Thesis contains: 23 pages, 7 figures, 2 tables, 13 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb.

Mentor: doc. dr. sc. Anita Horvatić

Thesis defended: September 16, 2024

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2. 1. PROTEINI	2
2. 2. ANALITIČKO ULTRACENTRIFUGIRANJE	4
2. 3 ELEKTROFOREZA	10
2. 4. SPEKTROMETRIJA MASA.....	13
3. ZAKLJUČAK.....	20
4. LITERATURA.....	22

1. UVOD

Proteini su ključne makromolekule koje, osim što su sastavni dio građe stanica, sudjeluju u brojnim biološkim procesima. Njihova važnost čini ih predmetom istraživanja u biologiji, biotehnologiji, biomedicini, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji i sl. Kvalitativna analiza proteina uključuje određivanje i/ili potvrdu strukture, kao i fizikalno-kemijskih svojstva (pI, molekulska masa, itd.) te je od izuzetne važnosti za razumijevanje njihove uloge i interakcija u biološkim sustavima. Točno određivanje molekulske mase proteina omogućuje identifikaciju proteina, ali i provjeru čistoće proteina dobivenih npr. genetičkim inženjeringom te je upravo određivanje navedenog svojstva neizostavan dio analize proteina.

Među različitim tehnikama za određivanje molekulske mase, analitičko centrifugiranje, elektroforeza u gelu i spektrometrija mase ističu se kao vrlo značajne i efikasne metode koje pružaju pouzdane rezultate. Ipak, svaka od spomenutih metoda posjeduje svoje specifične prednosti i nedostatke, a odabir metode ovisi o prirodi proteina od interesa i odgovarajućim zahtjevima analize. Spektrometrija mase, kao najsuremenija i najsofisticiranija metoda, obuhvaća ne samo precizno određivanje molekulske mase, već i uvid u slijed aminokiselina, tercijarnu strukturu, posttranslacijske modifikacije te analizu interakcija između proteina i drugih molekula, ali i relativnu i apsolutnu kvantifikaciju.

U ovom se radu detaljno opisuje kako se koriste odabrane fizikalno-kemijske metode za određivanje molekulske mase proteina. Poseban naglasak bit će stavljen na spektrometriju masa. Cilj rada je prikazati važnost primjene svake od navedenih metoda u kontekstu biotehnoških istraživanja te pružiti širu sliku o načinima kojim ove metode doprinose boljem razumijevanju svojstava i funkcija proteina.

2. TEORIJSKI DIO

2. 1. PROTEINI

Proteini su jedna od ključnih skupina prirodnih makromolekula koji su esencijalni za izgradnju i funkcioniranje živog svijeta kakvog poznajemo. Zbog mnogobrojnih i raznovrsnih uloga u živim organizmima, proteini su od izuzetno velike važnosti za znanstvena istraživanja. Neke od uloga proteina u organizmima uključuju sudjelovanje u kontroli rasta i diferencijaciji stanica, izgradnju različitih stanica, tkiva i organizma, pokretanje samog organizma, zaštitu organizma od patogena, prijenos molekula, iona i signala unutar organizma te regulaciju biokemijskih reakcija.

Proteini su polimerne molekule koji se sastoje od monomernih jedinica - aminokiselina međusobno povezanih kovalentnim peptidnim vezama u nerazgranate polipeptidne lance. Primarna struktura proteina, definirana redoslijedom aminokiselina, određena je genetskom informacijom. Navedena struktura je odgovorna za pravilno usmjeravanje proteina u više nivoje struktura kao što su sekundarna i tercijarna, te u konačnici za određivanje funkcije proteina. I najmanja promjena u strukturi proteina značajno utječe na njegovu cjelokupnu strukturu, ali i na promjenu njegovih funkcija. Razlika između svakog pojedinog proteina temelji se na pobočnim ograncima aminokiselina koji čine strukturnu jedinicu. Pobočni ogranci svakog aminokiselinskog ostatka u polipeptidnom lancu razlikuju se po obliku, veličini, naboju, sposobnosti formiranja vodikovih ili ionskih veza te po kemijskoj reaktivnosti. Navedene ključne razlike zapravo određuju kako će se proteini presaviti u konačnu nativnu konformaciju, a time i sposobnost interakcije s drugim molekulama, što je bitno za njihovu specifičnu biološku funkciju (Teparić i sur., 2022.).

Točno određivanje molekulske mase proteina ključno je radi razumijevanja njegove strukture. Zbog same izvedbe i osjetljivosti metoda, moguće je različitom točnošću i preciznošću odrediti ili izmjeriti relativnu masu, ovisno radi li se o relativnoj molekulskoj, monoizotopnoj ili prosječnoj masi proteina (Tablica 1). Navedene mase su relativne i izražavaju se u Daltonima (Da). S druge strane, dobivene informacije u usporedbi s teorijskim vrijednostima mogu ukazati na moguće posttranslacijske modifikacije (oksidaciju, deamidaciju), razgradnju, vezanje proteina s odgovarajućim ligandima ili neke druge promjene u samoj primarnoj strukturi proteina. Budući da je spektrometrija masa najosjetljivija metoda visoke rezolucije, istom je moguće

detektirati izotopnu raspodjelu što omogućuje određivanje točne mase molekule, a time i utvrđivanje elementarnog sastava, kao i potvrdu strukture.

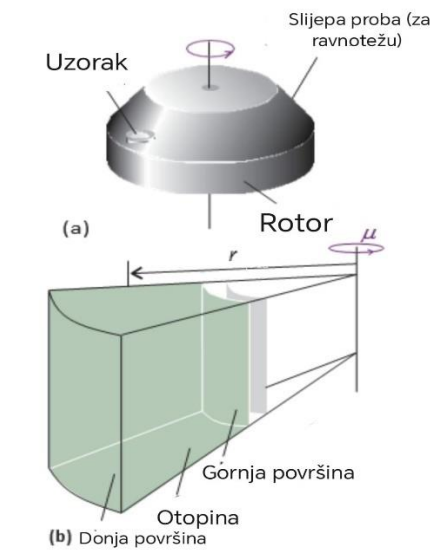
Tablica 1. Određivanje mase različitim analitičkim metodama

Naziv, mjerna jedinica	Definicija	Upotreba	Analitička metoda
Relativna molekulska masa, Da	Zbroj vrijednosti relativnih atomskih masa svih atoma u molekuli; omjer mase molekule i unificirane atomske jedinice, u , mase koja iznosi $1,6605 \times 10^{-24}$ g	Identifikacija, određivanje molekulske mase, provjera čistoće (smjese) proteina	Analitičko centrifugiranje, elektroforeza u gelu, spektrometrija masa
Prosječna masa, Da	Zbroj prosječne vrijednost mase svih atoma u molekuli	Identifikacija, potvrda primarne strukture	Spektrometrija masa
Monoizotopna masa, Da	Zbroj točnih masa najzastupljenijeg prirodnog izotopa svakog atoma u molekuli (izražava se na 4 decimale)	Određivanje točne mase, identifikacija, potvrda primarne strukture peptida i malih molekula	Spektrometrija masa

2. 2. ANALITIČKO ULTRACENTRIFUGIRANJE

Sedimentacija je proces u kojem se krute čestice iz suspenzije talože na dno posude (najčešće epruvete ili čaše) pod utjecajem gravitacijske ili centrifugalne sile. Brzina sedimentacije ovisi o jakosti utjecaja gravitacijskog polja te o gustoći, masi i obliku (točnije promjeru) čestica koje se razdvajaju. Prema tome, sferične i kompaktne molekule će uvijek brže sedimentirati od štapićastih molekula. U određenom trenutku tijekom sedimentacije gravitacijsko polje koje djeluje na čestice prema dnu posude nadvladava spontanu tendenciju čestica da se različito raspodijele po cijelom volumenu - difuziju. Posljedično tome, čestice se postupno slojevito sliježu unutar posude, ovisno o njihovoj veličini i gustoći.

Ultracentrifugiranje je tehnika koja primjenjuje visoke vrijednosti centrifugalnog polja umjesto gravitacijskog polja, čime se proces sedimentacije znatno ubrzava. Za razliku od mnogih drugih analitičkih tehnika, ovom metodom se makromolekulska svojstva mogu ispitivati u gotovo nativnim uvjetima, bez potrebe za standardima ili specifičnim matricama koje suprimiraju određeno „nepoželjno“ ponašanje čestica u otopini. Ultracentrifugiranje se provodi u ultracentrifugi, centrifugi s velikom brzinom okretanja (do 150 000 okretaja u minuti, *rpm*). U pravilu, cilindar se rotira oko svoje osi vrlo velikom brzinom zajedno s kivetom koja zadrži ispitivani uzorak (Slika 1.). Tijekom vrtnje sedimentacija napreduje, pri čemu se formira koncentracijski graničnik (Lebowitz i sur., 2003.). To je definirana granica koja razdvaja područje s većom koncentracijom taloženih molekula proteina od područja s nižom koncentracijom proteina, odnosno granica u kojoj dolazi do razdvajanja taloženih proteina i otopine iznad taloga tijekom centrifugiranja. Navedeni se graničnik pomiče prema vanjskoj površini u jedinici vremena, čime se proteini odvajaju ovisno o njihovoj veličini i gustoći. Razlike u centrifugalnoj sili na različitim udaljenostima od središta vrtnje su vrlo velike, pa se metoda može upotrebljavati za odvajanje pojedinih tvari na temelju razlike u molekularnoj masi, a time i za određivanje molekularne mase. Raspon veličina molekula na koje se može primijeniti brzina taloženja proteže se od nekoliko kDa (donja granica ograničena je maksimalnim brzinama rotora) do GDa (Edwards i sur., 2020.).



Slika 1. (a) Rotor ultracentrifuge. Uzorak je uravnotežen uzorkom iste mase koji je smješten nasuprot njemu. (b) Detaljni prikaz komore za uzorke: gornja površina je unutarnja površina i centrifugalna sila uzrokuje sedimentaciju prema donjoj površini (*prema* Atkins i de Paula, 2006.)

Za opisivanje kretanja molekule tijekom ultracentrifugiranja koristi se koeficijent sedimentacije, s [1]. To je vrijednost koja opisuje koliko se brzo kreću molekule prema dnu kivete pod utjecajem centrifugalne sile:

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{N_A f} = \frac{MD(1-\bar{v}\rho)}{RT} \quad [1]$$

gdje je u promatrana radijalna brzina makromolekula, ω kutna brzina rotora, r udaljenost od središta vrtnje, M molarna masa proteina, \bar{v} parcijalni specifični volumen proteina, ρ gustoća otapala, N_A Avogadrov broj, f koeficijent trenja, D koeficijent difuzije, a R je opća plinska konstanta.

Pomoću Svedbergove jednadžbe moguće je izračunati brzinu kojom se kreću proteini u ultracentrifugi. Koeficijent sedimentacije je od koristi jer daje procjenu o veličini i obliku proteina. Izračunate vrijednosti koeficijenta sedimentacije izražava se u Svedbergovim jedinicama [S] koje iznose 10^{-13} sekundi. Primjena Stokesove jednadžbe [2] ključna je za određivanje koeficijenta trenja sfernih i kompaktnih molekula proteina u otopini:

$$f_0 = 6\pi\eta R_0 \quad [2]$$

gdje je f_0 koeficijent trenja sferične molekule, η viskoznost otopine, a R_0 radijus sfere (Lebowitz i sur., 2003.). Koeficijent trenja opisuje silu koja djeluje na molekulu proteina dok se kreće kroz otopinu, suprotstavljajući se njezinom kretanju. Vidljivo je kako navedena sila ovisi o obliku i veličini molekule te o viskoznosti tekućine kroz koju se kreće molekula proteina. Koeficijent trenja koristan je u razumijevanju sedimentacije proteina jer molekule s većim koeficijentom sporije sedimentiraju, za razliku od onih koji imaju manji koeficijent trenja.

Kombiniranjem Svedbergove i Stokesove jednadžbe, navedeni radijus sfere može se matematički izraziti jednadžbom [3]:

$$R_0 = \left(\frac{3Mv}{4\pi N_A} \right)^{\frac{1}{3}} \quad [3]$$

U konačnici se iz jednadžbe za određivanje koeficijenta sedimentacije sfernih proteina [4]:

$$S_{sphere} = \frac{M(1-v)}{6\pi\eta \left(\frac{3Mv}{4\pi N_A} \right)^{\frac{1}{3}}} \quad [4]$$

jednostavnim matematičkim preoblikovanjem može dobiti izraz [5] kojim je moguće predvidjeti brzinu sedimentacije za sferne i kompaktne molekule proteina u vodi pri 20 °C:

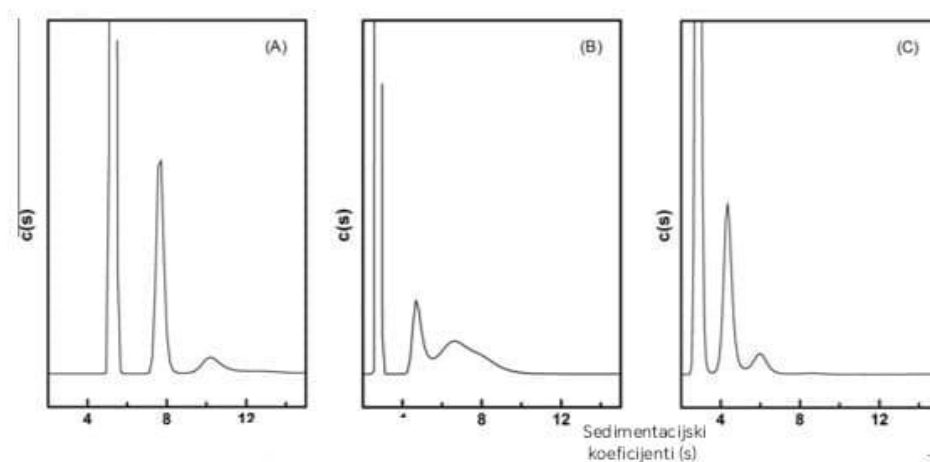
$$S_{sphere} = 0.012 \frac{M^{\frac{2}{3}}(1-v)}{v^{\frac{1}{3}}} \quad [5]$$

Vrijednost brzine sedimentacije koja se dobije korištenjem jednadžbe [5] predstavlja maksimalnu brzinu sedimentacije sferičnih proteina određene molarne mase. Zbog svoje simetrične strukture, sferični proteini imaju minimalan otpor prilikom kretanja kroz otopinu, odnosno najmanji koeficijent trenja te zato brže sedimentiraju. Kako bi se omogućila usporedba dobivenih podataka, točnije brzine sedimentacija dobivenih pri različitim laboratorijskim i eksperimentalnim uvjetima sedimentacije, potrebno je podatke prilagoditi standardnim uvjetima, čime se zapravo dobiju korigirane vrijednosti brzine sedimentacije u vodi pri temperaturi od 20 °C. Jednadžba za korekciju na standardne uvjete [6] je:

$$S_{20,w} = S_{T,B} \left(\frac{\eta_{T,B}}{\eta_{20,w}} \right) \left(\frac{1-v_{20,w}}{1-v_{T,B}} \right) \quad [6]$$

pri čemu T i B označavaju vrijednosti pri temperaturi i pod uvjetima u eksperimentu (pufer), a indeks $20, w$ označava standardne uvjete. Prema tome, omjer maksimalne vrijednosti i izmjerene vrijednosti brzine sedimentacije, $\frac{s_{sphere}}{s_{20,w}}$ odgovara omjeru eksperimentalnog koeficijenta trenja i minimalnog koeficijenta trenja $\left(\frac{f}{f_0}\right)$. Navedeni omjer omogućuje procjenu koliko oblik analiziranog proteina odstupa od idealnog sfernog oblika, gdje bi trenje bilo minimalno.

Računalni programi poput SEDNTERP-a mogu brzo i precizno izračunati ključne parametre kao što su viskoznost otopine (η), gustoća (ρ) i specifični volumen proteina (\bar{v}) za određivanje standardne korekcije brzine sedimentacije proteina. Osim toga, spomenuti softver omogućuje osnovno hidrodinamičko moduliranje proteina, odnosno pruža informacije o koeficijentu trenja proteina u otopini u odnosu na idealni sferni oblik. Usporedbom korigirane brzine sedimentacije i maksimalne brzine sedimentacije sfernog proteina određene mase može se procijeniti usklađenost vrijednosti $s_{20,w}$ s očekivanom molekulskom masom. Ako je dobivena eksperimentalna vrijednost $s_{20,w}$ znatno veća od teorijske očekivane vrijednosti, to može sugerirati da protein nije monomer ili da dolazi do agregacije proteina (Slika 2.). Naime, analizirani protein može agregirati pri čemu nastaje dimer ili složeniji kompleks. S druge strane, ako je dobivena vrijednost $s_{20,w}$ manja od teorijske vrijednosti, to ukazuje da je protein monomer, ali određenog oblika koji odstupa od idealnog sferičnog oblika. U tom slučaju moguće je zaključiti da protein sporije sedimentira zbog većeg otpora prilikom kretanja kroz otopinu. Usporedbom vrijednosti s i $\left(\frac{f}{f_0}\right)$ može se precizno definirati molekulska masa proteina u njegovom fiziološkom tj. nativnom obliku.



Slika 2. Različite brzine sedimentacije kao posljedica prostornog rasporeda pojedinog proteina (Arthur i Gabrielson, 2023.)

Modernije metode koriste Lammovu jednadžbu [7] koja precizno modulira sedimentacijske podatke (Lewitz i sur., 2003.). Navedena jednadžba opisuje kako se koncentracija proteina mijenja pod utjecajem centrifugalne sile i difuzije u ultracentrifugi u jedinici vremena u idealnim uvjetima (bez interakcija):

$$\frac{\partial c(r, t)}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[rD \frac{\partial c(r, t)}{\partial r} - s\omega^2 r^2 c(r, t) \right] \quad [7]$$

Rješavanjem ove jednadžbe dobiju se podatci koji opisuju kako se molekule proteina kreću i raspoređuju tijekom ultracentrifugiranja. Ovim se načinom omogućuje precizno određivanje koeficijenta sedimentacije. Korištenjem naprednih softverskih alata kao što su Sedfit i UltraScan, koji primjenjuju numeričke metode, odnosno računalnih tehnika za rješavanje Lammove jednadžbe, dobivaju se rezultati s velikom preciznošću. Osim toga, pomoću spomenutih alata, može se predvidjeti cijeli sedimentacijski proces u slučajevima kada sedimentacijska granica nije jasno vidljiva. Ovi alati, zahvaljujući visokom omjeru signala i šuma (SNR), omogućuju fleksibilnost u analizi, prilagođavajući se različitim eksperimentalnim uvjetima, kao što su različite brzine rotora. Takva detaljna analiza ne samo da povećava točnost određivanja molekulske mase proteina zbog preciznijeg određivanja brzine sedimentacija, nego pruža detaljan uvid u strukturu i interakciju proteina u odgovarajućoj otopini.

Zahvaljujući Svedbergovoj jednadžbi koja povezuje sedimentacijski i difuzijski koeficijent, analizom profila sedimentacijske granice između sedimentirane i

nesedimentirane zone može se odrediti molekulska masa. Pritom se preciznost određivanja molekulske mase povećava pri nižim brzinama rotora ultracentrifuge. Međutim, zbog postojanja različitih faktora koji utječu na sam proces sedimentacije, ova metoda (iako je relativno brza), sklonija je greškama tijekom određivanja molekulske mase. Heterogenost uzorka koji sadrži proteine s različitim vrijednostima koeficijenta sedimentacije može uzrokovati širenje granice sedimentacije. U tom slučaju, korištenjem Svedbergove jednadžbe s prosječnom vrijednošću koeficijenta sedimentacije proteina od interesa i prividnim difuzijskim koeficijentom određuje se približna molekulska masa koja je manja od stvarne molekulske mase tog proteina. Ta se pogreška može detektirati ako izmjereni koeficijent sedimentacije prelazi maksimalnu moguću vrijednost koeficijenta sedimentacije (s_{sphere}) za određenu približnu molekulska masu dobivenu kombinacijom Svedbergove i Stokesove jednadžbe. Dodatno, postojeće odbojne elektrostatske sile između molekula proteina smanjuju koeficijent sedimentacije proteina od interesa kao i širenje granice sedimentacije, što također rezultira pogrešnim izračunom približne molekulske mase. Ako se brzina sedimentacije (s) smanjuje povećanjem koncentracije, povećava se utjecaj međumolekulskih interakcija i doprinos sile trenja te se brzina sedimentacija smanjuje. Drugim riječima, postupnim povećanjem koncentracije proteina uslijed steričkih smetnji dolazi do smanjenja brzine sedimentacije. Kako je ranije spomenuto, najpreciznija metoda za određivanje molekulske mase proteina koristi matematičku diferencijalnu analizu za određivanje ovisnosti promjene sedimentacijske granica u jedinici vremena. Zbroj rješenja Lammove jednadžbe pokazuje kako će se protein ponašati u otopini pod utjecajem centrifugalne sile. Indirektno je povezan uz određivanje molekulske mase jer ipak omogućuje izračun vrijednosti koeficijenta sedimentacije koji je neizostavan parametar u određivanju molekulske mase proteina.

Većina proteina u eukariotima različito su glikozilirani s različitom raspodjelom glikana. Problem u određivanju molekulske mase glikoproteina analitičkim ultracentrifugiranjem je parcijalni specifični volumen glikoproteina koji se razlikuje od neglikoziliranih proteina, a ovisi isključivo o sastavu (vrsti i količini) glikana. U idealnim uvjetima koristi se mjerač gustoće, uređaj koji precizno mjeri parcijalni specifični volumen glikoproteina. Međutim, zbog nedovoljne količine uzorka najčešće se koriste osjetljivije metode za određivanje stupnja glikozilacije poput ultracentrifuge i spektrometrije masa (Abu Hammad i sur., 2023). U tom slučaju, parcijalni specifični

volumen glikoproteina određuje se na temelju dobivenih podataka, točnije masenom udjelu proteina i ugljikohidrata (w_p i w_c), kao i njihovim parcijalnim specifičnim volumenima (v_p i v_c). Dodatno, može se odrediti molekulska masa glikoproteina, čak i kada nije poznat sastav glikana, no s malom greškom (Abu Hammad i sur., 2023.).

Analitičkim ultracentrifugiranjem moguće je analizirati i membranske proteine. Membranski proteini su hidrofobni, što znači da ih je potrebno prevesti u topljivi oblik korištenjem anionskih deterdženata. U tom procesu, proteini s deterdžentima formiraju micelle. Kada bi se mjerila molekulska masa micela pomoću metode sedimentacijske ravnoteže, dobila bi se molekulska masa koja predstavlja zbroj mase proteina i deterdženata, čime se smanjuje vjernost mjerenja molekulske mase samog proteina i raste nepouzdanost u određivanju strukture proteina. Znanstvenici Reynolds i Tanford razvili su rješenje za određivanje molekulske mase takvih kompleksa bez potrebnog poznavanja kako se molekule proteina i deterdženta međusobno povezuju [8]:

$$M_c(1 - \bar{v}_c \rho) = M_p(1 - \bar{v}_p \rho) + M_D(1 - \bar{v}_D \rho) \quad [8]$$

Indeksi p , c i D označavaju protein, deterdžent i kompleks protein-deterdžent. Kao što je vidljivo iz jednadžbe [8], molekulska masa kompleksa rastavlja se na dva dijela: jedan dio pripada proteinu (M_p) te drugi koji pripada deterdžentu (M_D). Prilagođavanjem gustoće otopine dodatkom tvari poput saharoze ili glicerola tako da postane jednaka gustoći deterdženta, deterdžent postaje gravitacijski inaktivan. U tom slučaju, raspodjela koncentracije sedimentacijskom ravnotežom odražava samo molekulska masu proteina, a eliminiran je utjecaj deterdženta na cjelokupnu molekulska masu membranskog proteina.

2. 3 ELEKTROFOREZA

Često su makromolekule, poput proteina i nukleinskih kiselina električki nabijene i gibaju se prema suprotno nabijenoj elektrodi u električnom polju. Opisani fenomen naziva se elektroforeza, a rezultat je postizanje konstantne brzine (driftna brzina) kojom se kreće ion ili u konkretnom slučaju, makromolekula kada se pokretačka sila, zeE izjednači sa silom trenja koja mu se suprotavlja, trenjem, fs :

$$s = \frac{zeE}{f} \quad [9]$$

Iz navedene jednadžbe [9] za driftnu brzinu vidi se ovisnost mobilnosti makromolekule u električnom polju (E) o sveukupnom naboju molekule (z), obliku i veličini, a samim time i molarnoj masi. U pravilu, polimeri u tradicionalnim metodama elektroforeze kreću se vrlo sporo, što znači da je potrebno više od nekoliko sati kako bi se postiglo efikasno razdvajanje polimera iz određene smjese. Prema navedenoj jednadžbi [9], povećanjem jakosti električnog polja teorijski bi moglo ubrzati razdvajanje. Međutim, to dovodi do povećanog zagrijavanja medija (gela) uslijed otpora materijala kroz koju prolazi struja. Takvo nepoželjno zagrijavanje može uzrokovati loše i neujednačeno razdvajanje makromolekula, čim gel postaje nefunkcionalan za elektroforezu. Za razliku od tradicionalnih metoda, kapilarna elektroforeza, koja koristi vrlo tanke kapilare, rješava opisani problem zahvaljujući brzom odvođenju topline iz sustava. Zbog svojih malih dimenzija, kapilarna elektroforeza omogućuje primjenu jačih električnih polja bez značajnog zagrijavanja gela, čime se postiže učinkovito i kvalitetno razdvajanje makromolekula u kraćem vremenskom intervalu (Atkins i de Paula, 2006.).

Elektroforeza u gelu je laboratorijska tehnika u kojoj se biopolimeri kao što su proteini razdvajaju prolaskom kroz porozni polimerni gel. Budući da se čestice razdvajaju prolazeći kroz pore gela, veće čestice sporije migriraju u odnosu na manje čestice koje brže prolaze kroz pore. Ovim principom dolazi do razdvajanja sastojaka smjese proteina na temelju razlike u njihovim molekulskim masama. Postoje dvije vrste gela koji se najčešće koriste kao nosači mobilne faze, a to su agarozni i poliakrilamidni nosači (Teparić i sur., 2022.). U pravilu, agarozna ima znatno veće promjere pora od poliakrilamida te je prikladna za proučavanje i analizu većih makromolekula poput velikih i složenih enzimskih i DNA. Poliakrilamidni gel, s manjim porama, primjenjuje se za razdvajanje proteina manje veličine, odnosno molekulske mase. U oba slučaja, pripremom različite koncentracije agaroze ili poliakrilamida u gelu nastaju i različiti promjeri pora gela. Prema tomu, što je veća koncentracija agaroze ili poliakrilamida u gelu, to će biti manji promjer pora (raste stupanj umreženja polimera) i obrnuto. Primjenom gela koji sadrži veću koncentraciju poliakrilamida (PAGE) omogućuje se učinkovito razdvajanje molekula proteina relativno male molekulske mase.

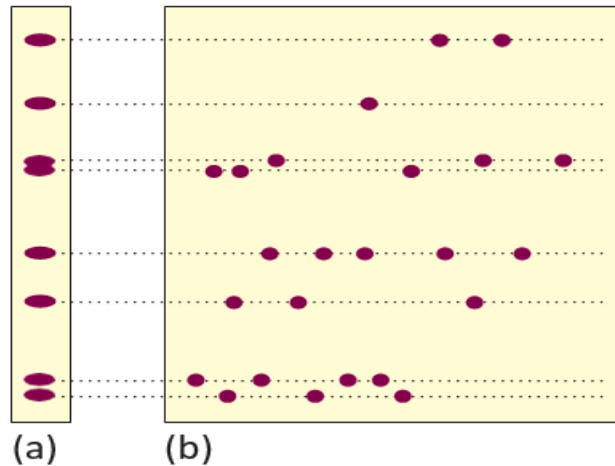
Prethodno je objašnjeno kako naboj kao jedan od parametara utječe na postizanje driftne brzine. Na primjer, proteini iste molekulske mase, ali različitog neto naboja putovat će kroz gel različitim brzinama. Zbog toga je potrebno denaturirati

proteine djelovanjem određenog denaturirajućeg agensa poput natrijeva dodecil sulfata (SDS). SDS je anionski deterdžent koji stupa u komplekse s proteinima u konstantnom omjeru i denaturira ih do njihove primarne strukture. Zbog konstantne raspodjele naboja po jedinici mase uslijed vezanja SDS-a, 'maskirani' proteini razdvajaju se isključivo prema razlici u njihovim molekulskim masama. Nakon provedbe elektroforeze SDS-PAGE, procjena molekulske mase svakog razdvojenog denaturiranog proteina temelji se na usporedbi mobilnosti razdvojenog proteina i mobilnosti standardnog proteina poznate molekulske mase na gelu. Ipak, molekulske mase dobivene ovom metodom elektroforeze nisu jednako precizne kao vrijednosti mase dobivene spektrometrijom masa ili ultracentrifugiranjem.

Ukupni naboj proteina i drugih biopolimera ovisit će o pH medija u kojem se nalaze. Ako se protein nalazi u kiselom mediju, protoni se vežu na protein te će ukupni naboj proteina biti pozitivan, dok se u lužnatom mediju protoni otpuštaju s proteina, pa će ukupni naboj proteina biti negativan. Pri izoelektričnoj točki, pH medija odgovara točki u kojoj protein nema ukupni naboj, odnosno kada je broj pozitivnih i negativnih naboja jednak. Kako ukupni naboj proteina ovisi o pH medija u kojem se oni nalaze, tako i driftna brzina ovisi o pH medija. Kada se protein nalazi u svojoj izoelektričnoj točki, onda je driftna brzina jednaka nuli. Izoelektrično fokusiranje je separacijska metoda čiji se princip temelji na ovisnosti brzine kojom se protein kreće u električnom polju i ukupnom naboju tog proteina. To je tehnika koja razdvaja proteine prema njihovim izoelektričnim točkama. U ovoj metodi, proteini se raspršuju u mediju s pH gradijentom pod utjecajem električnog polja. Proteini se zaustavljaju na točnom položaju gdje pH vrijednost odgovara njihovoj izoelektričnoj točki, čime se omogućuje precizno razdvajanje proteina.

Vrsta elektroforeze koja se koristi za određivanje molekulske mase nepoznatog proteina naziva se 2D-elektroforeza. Navedena metoda kombinira dvije tehnike: SDS-PAGE i izoelektrično fokusiranje. Tijekom provedbe ove metode, prvo se smjese proteina razdvajaju izoelektričnim fokusiranjem na gelu u obliku trake s gradijentom pH, kao što je vidljivo na Slici 3. – (a). Pritom se dobiveni gel stavlja na drugi gel za SDS-PAGE, a primijenjeno električno polje djeluje okomito na smjer u kojem je prethodno provedeno izoelektrično fokusiranje. Dobiveni rezultati gela prikazani su na Slici 3. – (b). Opisanom metodom postiže se precizno razdvajanje smjese proteina prema njihovim izoelektričnim točkama i molekulskim masama. U suvremenim

proteomskim istraživanjima temeljenim na 2D-PAGE, dobivene proteinske točke se izrezuju iz gela, razgrađuju tripsinom i analiziraju spektrometrijom masa radi identifikacije i određivanja fizikalno-kemiskih svojstava kao što su molekulska masa, pl te posttranslacijske modifikacije.



Slika 3. Koraci u razdvajanju smjese dvodimenzionalnom elektroforezom: (a) Izoelektrično fokusiranje provodi se na tankom gelu i proteini se razdvajaju prema izoelektričnim točkama duž vertikalne osi prikaza. (b) Prvi se gel pričvrsti na drugi, veći gel, a zatim se izvodi SDS-PAGE s djelovanjem električnog polja u horizontalnom smjeru prikaza. Prikazane isprekidane horizontalne linije pokazuju kako se trake u dvodimenzionalnom gelu podudaraju s trakama u gelu na kojem je provedeno izoelektrično fokusiranje. (Atkins i de Paula, 2006.)

2. 4. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa najsuvremenija je i najpreciznija analitička metoda kojom se nakon ionizacije kvalitativno i kvantitativno analiziraju nastali ioni (Cindrić i Horvatić, 2008.). Ovom metodom moguće je odrediti molekulsku masu proteina, identificirati proteine, odrediti primarnu strukturu proteina (aminokiselinski slijed), identificirati posttranslacijske modifikacije poput glikolizacije, fosforilacije i disulfidnih veza, identificirati mutacije (zamjenu aminokiseline u slijedu), provjeriti strukturu i čistoću proteina dobivenog metodama genetičkog inženjerstva i sl. Zbog svoje osjetljivosti, spektrometrijom masa moguće je analizirati male količine uzorka, na granici između femtomola i pikomola. Za analizu proteina koriste se dvije ionizacijske tehnike:

ionizacija elektroraspršenjem (ESI) i matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI).

Matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem ili skraćeno MALDI je tehnika ionizacije uzorka koji uključuje desorpciju prije ionizacije (Cindrić i Horvatić, 2008.). Uzorak se miješa s čvrstom matricom koja sadrži organski materijal poput α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline. Zatim se uzorak ugrađen u kristale matrice ozračuje pulsevima lasera (npr. Nd-YAG). Navedena matrica ima sljedeće uloge: omogućuje sublimaciju uzorka te apsorbira energiju lasera pri čemu dolazi do ionizacije neutralne molekule uzorka u plinovitom agregatnom stanju pri čemu nastaju adukti s kationima kao što su npr. vodikov (H^+) ili natrijev kation (Na^+). MALDI metodom uglavnom nastaju jednostruki nabijeni ioni, ali se mogu pojaviti male količine dvostrukih i trostrukih nabijenih iona. Budući da se radi o pulsnoj tehnici, tehnika MALDI najčešće se kombinira s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta (TOF). U MALDI-TOF spektrometru masa, ioni se ubrzavaju u prostoru kratke udaljenosti (d) na koju djeluje električno polje određene jakosti (E) kako bi zadržala ione unutar analizatora. Zatim ioni putuju kroz područje driftanja određene duljine (l). Ovaj instrument mjeri vrijeme (t) koje je potrebno da ioni dođu do detektora [10]:

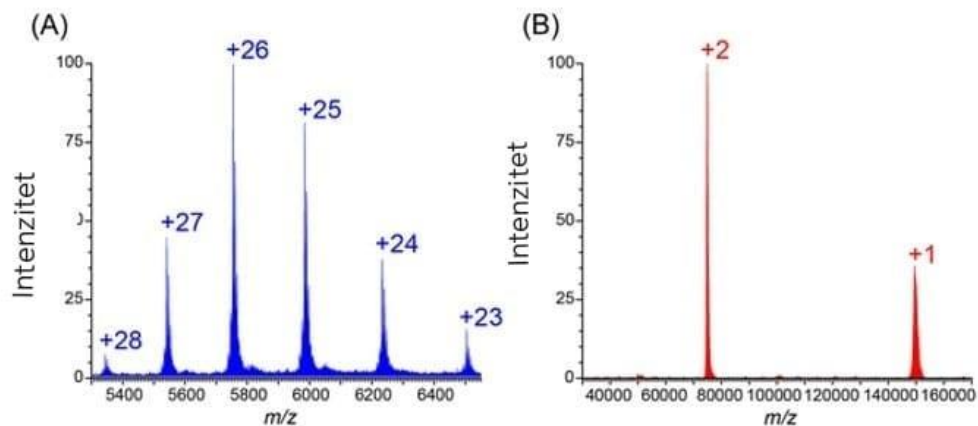
$$t = l \sqrt{\frac{m}{2zeEd}} \quad [10]$$

gdje je z broj naboja, a e predstavlja elementarni naboj. S obzirom da su vrijednosti d , l i E fiksni za određeni eksperiment, transformacijom ove jednadžbe može se izravno odrediti omjer mase i naboja (m/z) prikazan jednadžbom [11]:

$$\frac{m}{z} = 2eEd \quad [11]$$

Ionizacija elektroraspršenjem (ESI) analitička je metoda koja koristi električni naboj za ionizaciju molekula uzorka iz otopine. U ovom postupku, uzorak se otapa u odgovarajućem otapalu, a zatim se propušta kroz tanku kapilaru. Na vrhu kapilare primjenjuje se visoki napon, što stvara snažno električno polje. Pod utjecajem električnog polja, otopina formira sitne kapljice izlazeći iz kapilare. Kako otapalo isparava, formirane kapljice postaju još manje, što dovodi do povećanja gustoće naboja na površini. Taj proces rezultira ionizacijom molekula uzorka unutar kapljica i

prelaskom u plinovito stanje. ESI metodom nastaju višestruko nabijeni ioni (Slika 4.) koji ulaze u spektrometar masa, odvajaju se u analizatoru masa te detektiraju. Najčešći analizatori mase koji se primjenjuju u kombinaciji s ESI metodom su kvadrupolni analizatori (Q) ili ionska stupica (IT) omogućujući preciznu analizu omjera mase i naboja (m/z) iona.

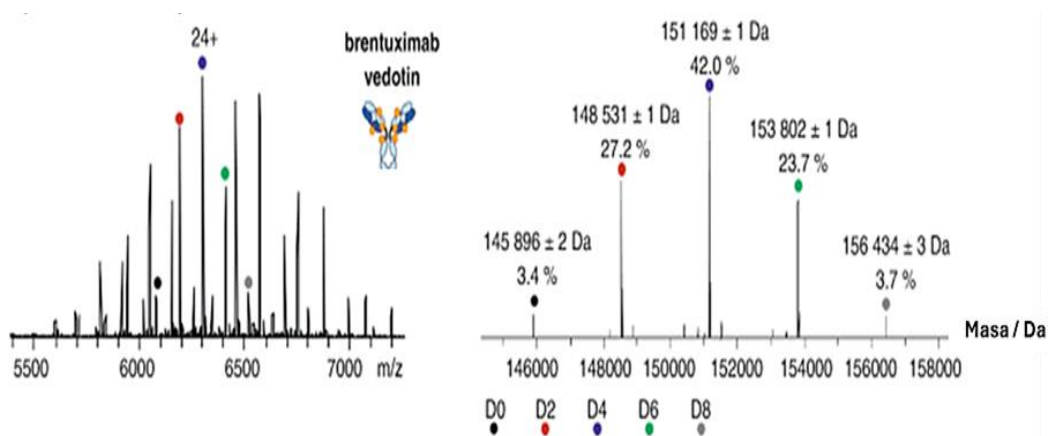


Slika 4. (A): ESI metodom nastaju višestruko nabijeni ioni i (B) MALDI metodom nastaju jednostruki nabijeni ioni (B) komercijalnog anti-insulina mAb pomoću TOF analizatora mase (*prema Ivanov i sur. 2024.*)

Tijekom pripreme uzoraka za analizu spektrometrijom masa, proteini se izoliraju iz uzoraka poput sirovina, gotovih proizvoda i kliničkih uzorka (serum, plazma ili tkivo) i sl. odgovarajućim metodama ekstrakcije nakon čega slijedi separacija. Za separaciju peptida i proteina najčešće se primjenjuje tekućinska kromatografija obrnutih faza koja se kontinuirano povezuje sa spektrometrijom masa, odnosno vezanim sustavom LC-MS uz ionizaciju ESI. U novije vrijeme, sve se više primjenjuje dvodimenzijnska kromatografija (2D-LC), čime se povećava mogućnost identifikacije i do nekoliko tisuća proteina i peptida vezanjem navedene tehnike sa spektrometrijom masa. Osim kromatografskih metoda, može se koristiti i dvodimenzionalna elektroforeza u gelu (2D gel elektroforeza, 2D SDS-PAGE) za odjeljivanje proteina koji se zatim najčešće analiziraju MALDI TOF metodom. Izravno povezivanje tekućinske kromatografije s MALDI metodom nije moguće, već se eluati dobiveni nakon separacije tekućinskom

kromatografijom miješaju s matricom, nanose na pločicu i nakon sušenja (kristalizacije matrice) analiziraju tehnikom MALDI-MS.

Molekulska masa intaktnog proteina može se odrediti tehnikama ESI- ili MALDI-MS. Međutim, tehnikom ESI nastaju višestruko nabijeni ioni koji ovise o prirodi otapala u kojoj se nalazi protein (pH, ionska jakost otapala, udio organske faze). Mijenjanjem sastava otapala ili pokretne faze nastaju različiti signali iona koje je teško interpretirati. Računalnom obradom podataka, točnije dekonvolucijom, dobivaju se signali koji odgovaraju prosječnoj molekulskoj masi intaktnog proteina (Slika 5.).



Slika 5. Spektar masa intaktnog proteinskog lijeka (brentuximab vedotin) prije (lijevo) i nakon dekonvolucije (desno) (Hernandez-Alba i sur., 2020.)

Analize proteina mogu se provoditi na dva načina: odozgor-nadolje (engl. *top-down*) i odozdol nagore (engl. *down-top*). Odozgor-nadolje tehnika zahtijeva točno mjerenje mase kako bi se odredio primarni aminokiselinski slijed proteina i analizirala mjesta posttranslacijskih modifikacija. Navedeni tip analize zahtijeva upotrebu sofisticiranih računalnih programa, ali i proteine visoke čistoće radi dobivanja pouzdanih rezultata. Analiza proteina načinom odozgol nagore uključuje enzimsko cijepanje proteina u gelu (nakon SDS-PAGE) ili otopini primjenom odgovarajućih proteaza, glikozidaza, hidrolaza ili nekih drugih enzima (Cindrić i Horvatić, 2008.). Najčešće proteaze koje se primjenjuju u analizi spektrometrijom mase su tripsin, Asp-N, Glu-C i Lys-C, ali je moguće primijeniti i nekoliko proteaza što otežava interpretaciju

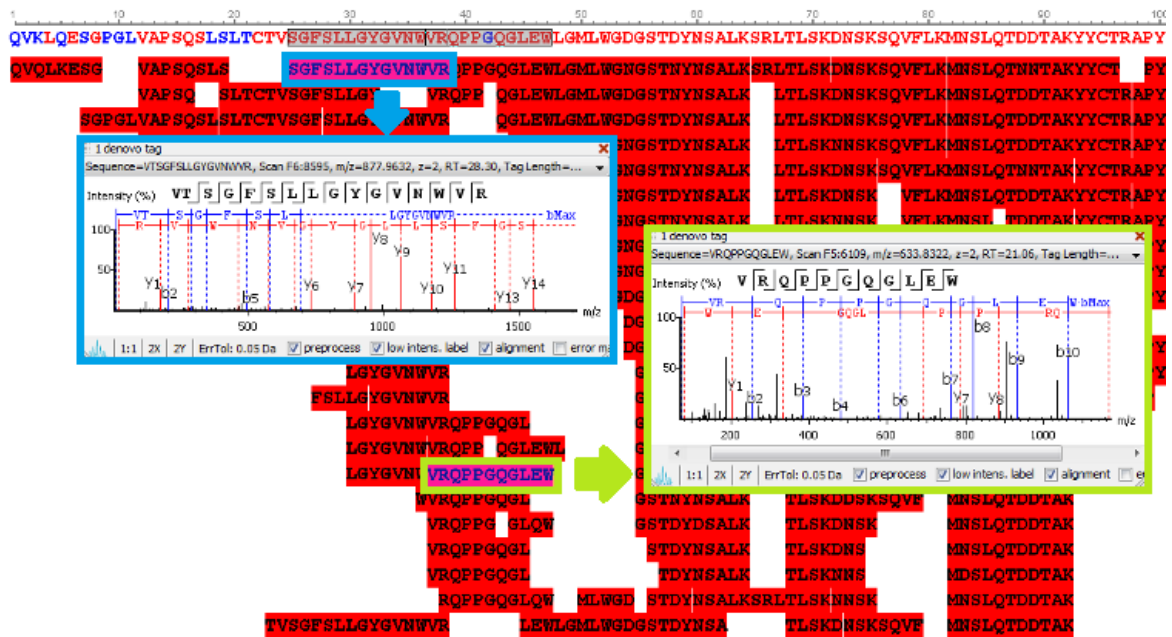
rezultata, ali povećava strukturnu informaciju. Specifično mjesto cijepanja svakih od navedenih enzima prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Specifično cijepanje proteina djelovanjem određenih proteaza

Proteinaze	Specifično mjesto cijepanja
Tripsin	Iza lizina i arginina, ako iza njih nema prolina
Asp-N	Ispred asparginske i glutaminske kiseline, ako iza njih nema glutaminske kiseline ili prolina
Glu-C	Iza lizina, ako iza njega nema prolina
Lys-C	Ispred asparginske kiseline

Nakon cijepanja proteina enzimima nastaju peptidi koji se pritom separiraju tekućinskom kromatografijom te analiziraju odabranom metodom spektrometrije mase. U samom instrumentu moguće je dobivene peptidne ione dodatno fragmentirati (u kolizijskoj ćeliji) tandemnom spektrometrijom masa (MS/MS) pri čemu se mjere mase iona prekursora kao i njihovih fragmenata (Cindrić i Galić, 2008.). Iz dobivenih podataka moguće je odrediti strukturu proteina usporedbom eksperimentalno određenih molekulskih masa s teorijskim (izračunatim) masama peptida i njihovih iona koji su pohranjeni u bazama podataka. Baze podataka koje se najčešće koriste su SwissProt ili NCBI.

Ako u postojećim bazama podataka nema podudarnosti, potrebno je koristiti druge proteinaze, analizirati potencijalne posttranslacijske modifikacije ili primjeniti *de novo* sekvencioniranje. *De novo* sekvencioniranje (Slika 6.) podrazumijeva potpuno određivanje primarne strukture proteina koja zahtijeva određivanje aminokiselinskog slijeda uz minimalnu uporabu baza podataka. Točnije, nakon spektrometrije masa, iz tandemnog spektra masa određuje se slijed aminokiselina u peptidu. Pri tome se određuje razlika masa između dva susjedna signala u spektru masa koji predstavljaju fragmente peptida, kao što je vidljivo na Slici 6. Identifikacija proteina izvodi se usporedbom slijeda dobivenog peptida s proteinskom bazom podataka.

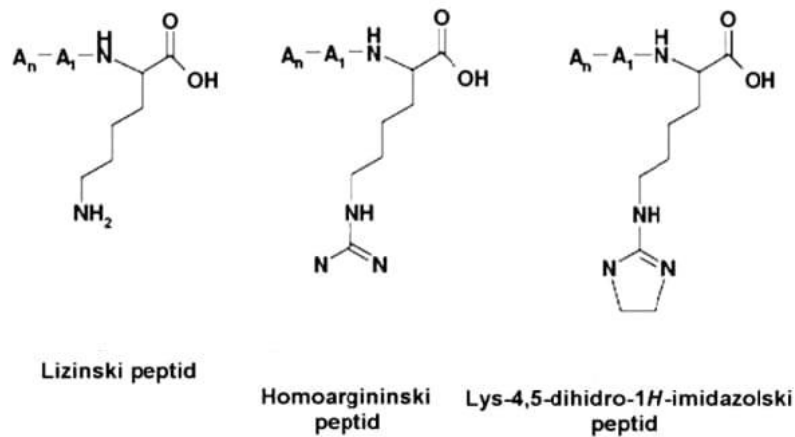


Slika 6. Princip *de novo* sekvenciranja u kombinaciji s dostupnim bazama podataka (Bioinformatics solutions, 2023.)

Posttranslacijske modifikacije poput fosforilacije i glikozilacije mogu se također detektirati određenim tehnikama spektrometrije mase uz prethodno obogaćivanje modificiranih proteina. Npr. zbog slabe zastupljenosti u uzorku, analiza fosfoproteina zahtijeva obogaćivanje fosfopeptida afinitetnom kromatografijom, a eksperimentalni podaci dobiveni spektrometrijom masa analiziraju se specijaliziranim računalnim programima kao i korištenjem baza podataka specifičnih za fosfoproteine. Nadalje, analiza glikoproteina obuhvaća enzimsko uklanjanje glikana vezanih za protein. Nakon toga slijedi analiza proteinskog dijela glikoproteina spektrometrijom masa i potraživanjem baze podataka specifičnih za glikoproteine. Dodatno, poznavanje načina vezanja N- i O-glikana pojednostavljuje samo pretraživanje (Cindrić i Galić, 2008.).

Detekcija peptida spektrometrijom masa ovisi o sastavu i slijedu aminokiselina, veličini i hidrofobnosti. Vezano uz digestiju tripsinom, zbog veće bazičnosti arginina u odnosu na lizin, svi fragmenti koji na C-kraju sadrže arginin mogu djelomično ili u potpunosti suprimirati signale lizinskih fragmenata, a to značajno utječe na određivanje primarnog slijeda aminokiselina i identifikaciju ciljanog proteina. Zbog navedenog

razloga, primjenjuju se kemijske modifikacije lizina (npr. derivatizacija O-metilizoureom ili 2-metoksi-4,5-dihidro-1H-imidazol, Slika 7.) kako bi se povećao udio ioniziranih i detektiranih lizinskih fragmenata.



Slika 7. Struktura karboksi-terminalnih lizinskih peptida: prije derivatizacije i nakon derivatizacije O-metilizoureom i 2-metoksi-4,5-dihidro-1H-imidazolom pri čemu nastaje homoarginin i lizin-4,5-dihidro-1H-imidazol (Cindrić i Galić, 2008.)

Dodatno, derivatizacija proteina s izotopnim različito obilježenim derivatizacijskim reagensima omogućava relativnu kvantifikaciju proteina u različitim uzorcima (npr. izobarni privjesci) (Almeida i sur., 2021.). Spomenuti reagensi specifično reagiraju s određenim dijelovima proteina poput amino-terminalnog kraja (N-kraj), lizina ili cisteina, dodajući izotope koji mijenjaju relativnu molekulsku masu proteina, ali ne i kemijsku strukturu. Nakon proteolize, pocijepani se fragmenti analiziraju odabranom metodom spektrometrije mase. Dobiveni omjeri intenziteta signala peptida obilježeni različitim izotopima koriste se za usporedbu količina ciljanih proteina između različitih uzoraka. U tom se slučaju mogu pratiti promjene u koncentraciji ciljanih proteina u različitim staničnim uvjetima ili patofiziološkim stanjima.

3. ZAKLJUČAK

Određivanje molekulske mase proteina prvi je korak u razumijevanju njihove strukture, funkcije i interakcija unutar bioloških sustava. U ovom radu prikazane su različite fizikalno-kemijske metode, poput analitičkog ultracentrifugiranja, elektroforeze u gelu i spektrometrije mase, koje omogućuju precizno određivanje molekulske mase proteina. Svaka od ovih metoda pruža jedinstvene prednosti omogućujući detaljnu analizu proteina, bilo da je riječ o određivanju molekulske mase, identifikaciji proteina ili analizi posttranslacijskih modifikacija.

Analitičko ultracentrifugiranje omogućuje detaljnu procjenu veličine, oblika i agregacijskog stanja proteina, što je od izuzetne važnosti za razumijevanje njihovih bioloških funkcija u nativnim uvjetima. Ova je metoda od velike pomoći za proučavanje proteinskih kompleksa i interakcija u otopini, odnosno omogućuje detaljnu analizu proteina u njihovom prirodnom okruženju.

Elektroforeza u gelu predstavlja jednostavniju metodu za razdvajanje proteina prema njihovoj molekulskoj masi i naboju. Ova tehnika korisna je za osnovnu analizu proteina koja obuhvaća klasičnu identifikaciju i kvantifikaciju različitih proteinskih komponenti unutar smjese. Kombinacija izoelektričnog fokusiranja i SDS-PAGE-a u 2D-elektroforezi omogućuje precizno razdvajanje proteina prema pI i molekulskoj masi, čime se omogućuje daljnja analiza složenih proteinskih uzoraka spektrometrijom masa.

Spektrometrija masa, kao najsuvremenija i najsvestranija tehnika, ističe se kao izuzetno moćan alat koji omogućuje precizno određivanje molekulske mase, kao i detaljnu analizu strukture proteina. Upotreba specifičnih kemijskih reagensa i različito izotopno obilježenih reagensa i derivatizacijskih postupaka olakšava interpretaciju spektara masa, čime omogućuje relativnu kvantifikaciju proteina, jednostavniju identifikaciju aminokiselinskih sljedova pojedinog proteina i analizu složenih peptidnih uzoraka.

U ovom radu istaknuta je važnost odabira prikladne metode za određivanje molekulske mase proteina, ovisno o prirodi proteina i željenim ciljevima istraživanja. Korištenjem kombinacije različitih metoda moguće je postići visoku preciznost u analizama, pružajući sveobuhvatan uvid u strukturu i funkciju proteina, što je od velike važnosti u biotehnologiji, medicini i drugim znanstvenim disciplinama. Na temelju ovog

rada, može se zaključiti da je precizno određivanje molekulske mase proteina neophodno za daljnje razumijevanje bioloških procesa i razvoj novih biotehnoloških i farmaceutskih proizvoda.

4. LITERATURA

Abu Hammad, K., Dinu, V., Gillis, R. B., Goodall, M., Harding, S. E., Jefferis, R. i sur. (2023.) Comparative sedimentation equilibrium analysis of two IgG1 glycoforms: IgGCri and IgGWid. *Eur Biophys J.* **52** (4-5), 439-443.

Almeida, A. M., Eckersall, P. D., Freire, J. P. B., Guillemin, N., Horvatić, A., Kuleš, J. i sur. (2021.) Influence of dietary Spirulina inclusion and lysozyme supplementation on the longissimus lumborum muscle proteome of newly weaned piglets. *J Proteomics* **244**. 104274, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104274>.

Arthur, K. K., Gabrielson, J. P. (2011.) Measuring low levels of protein aggregation by sedimentation velocity. *Methods.* **54** (1), 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.12.030>.

Atkins, P., de Paula, J. (2006.) Atkins' Physical Chemistry, 8. izd., W. H. Freeman and Company, New York, 652-668.

Bioinformatics solutions (2024), <<https://www.bioinfor.com/de-novo-sequencing/>>. Pristupljeno 7. rujna 2024.

Bowerman, S., Edwards, G. B., Luger, K., Muthurajan, U. M. (2020.) Analytical Centrifugation (AUC): An Overview of the Application of Fluorescence and Absorbance AUC to the Study of Biological Macromolecules. *Curr Protoc Mol Bio* **133** (1), e131 <https://doi.org/10.1002/cpmb.131>.

Cindrić, M., Galić, N. (2008.) Analiza proteina spektrometrijom masa. *Kem. Ind.* **57** (5), 231–243. <https://hrcak.srce.hr/23748>.

Cindrić, M., Horvatić, A., (2008.) Analiza farmaceutskih peptida spektrometrijom masa. *Medicina Fluminensis*, **45**, br. 3., 258-263. <https://hrcak.srce.hr/43667>.

Hernandez-Alba, O., Ehkirch, A., Beck, A., Cianférani, S. (2020). Analysis of ADCs by Native Mass Spectrometry. In: Tumey, L. (eds) Antibody-Drug Conjugates. *Methods Mol Biol.* **2078**. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9929-3_13.

Ivanov, D. G., Kaltashov, I. A., Yang, Y. (2024.) Mass spectrometry – based methods to characterize highly heterogeneous biopharmaceuticals, vaccines, and nonbiological

complex drugs at the intact – mass level. *Mass Spectrom Rev* **43** (1), 139-165. <https://doi.org/10.1002/mas.21829>.

Jurčević, I. L., Teparić, R., Slavica, A., Strelec, I.(2022.) Biokemija 1, Prehrambeno-biotehnološki fakultet sveučilišta u Zagrebu https://moodle.srce.hr/2022-2023/pluginfile.php/7757841/mod_resource/content/1/B1%20skripta_%20rec.pdf.

Pristupljeno 7. rujna 2024.

Lebowitz, J., Lewis, M. S., Schuck, P. (2002.) Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Prot Sci* **11**, 2067–2079. <https://doi.org/10.1110/ps.0207702>. Pristupljeno 7. rujna 2024.

Qiao, R., Tran, N. H., Xin, L., Chen, X., Li, M., Shan, B., and Ghodsi, A. (2021). Computationally instrument-resolution-independent de novo peptide sequencing for high-resolution devices. *Nat. Mach. Intell.* **3**, 420–425, doi:10.1038/s42256-021-00304-3

Izjava o izvornosti

Ja, Robert Jurilj, izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Izjava o izvornosti

Ja, Robert Jurilj, izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Robert Jurilj