



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Ivan Grgičević

Student 1. godine Poslijediplomskog sveučilišnog studija Kemija

Primjena spektrometrije masa u istraživanju lijekova

Kemijski seminar 1

Smjer: Analitička kemija

Prema radu:

Tüting, C., Iacobucci, C., Ihling, C. H., Kastritis, P. L., Sinz, A. (2020) Structural analysis of 70S ribosomes by cross-linking/mass spectrometry reveals conformational plasticity. *Scientific Reports*, **10**, 12618

Zagreb 2024.

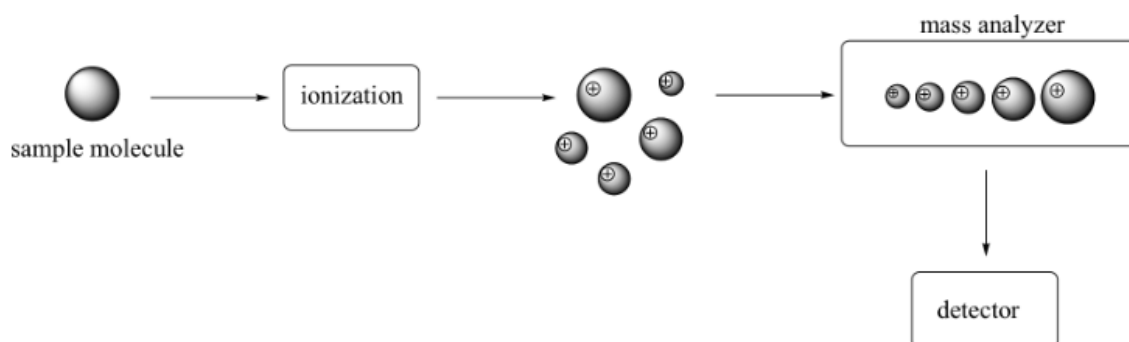
Sadržaj

Uvod	1
Spektrometrija masa	1
Povijest spektrometrije masa	1
Izvedbe spektrometara masa	3
Ionski izvori	3
Analizatori korišteni u spektrometriji masa	3
Detektori	8
Spektrometrija masa s analizatorom pokretljivosti iona (IMS)	10
Povijest	10
Ionizacija uzoraka	11
Razdvajanje na temelju ionske pokretljivosti	11
Primjene IMS-a	15
Makrolidni antibiotici i njihov način djelovanja	17
Antibakterijsko djelovanje	18
Imunomodulacija	19
Farmakokinetika	19
Metaboličke interakcije makrolida	19
Bakterijska otpornost na makrolide	21
Ribosomi; struktura i funkcija	22
Struktura ribosoma	22
Funkcija ribosoma	26
Primjena spektrometrije masa u istraživanju lijekova	29
Analiza proteina i peptida	29
Analiza malih molekula	30
Analiza protein-ligand interakcija (PLI)	31
Analiza protein-protein interakcija (PPI)	34
XL-MS analiza interakcija	36
Zaključak	42
Literatura	44

Uvod

Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (eng. *Mass Spectrometry*; MS) je analitička tehnika koja se koristi za određivanje molekulske mase iona mjerenjem omjera mase i naboja iona. Rezultati su prikazani u spektru masa, gdje je ploha intenziteta signala prikazana kao funkcija omjera mase i naboja. Spektrometrija masa koristi se u mnogim različitim poljima i primjenjiva je na čiste uzorke kao i na složene smjese.



Slika 1. Shematski prikaz procesa snimanja spektara masa

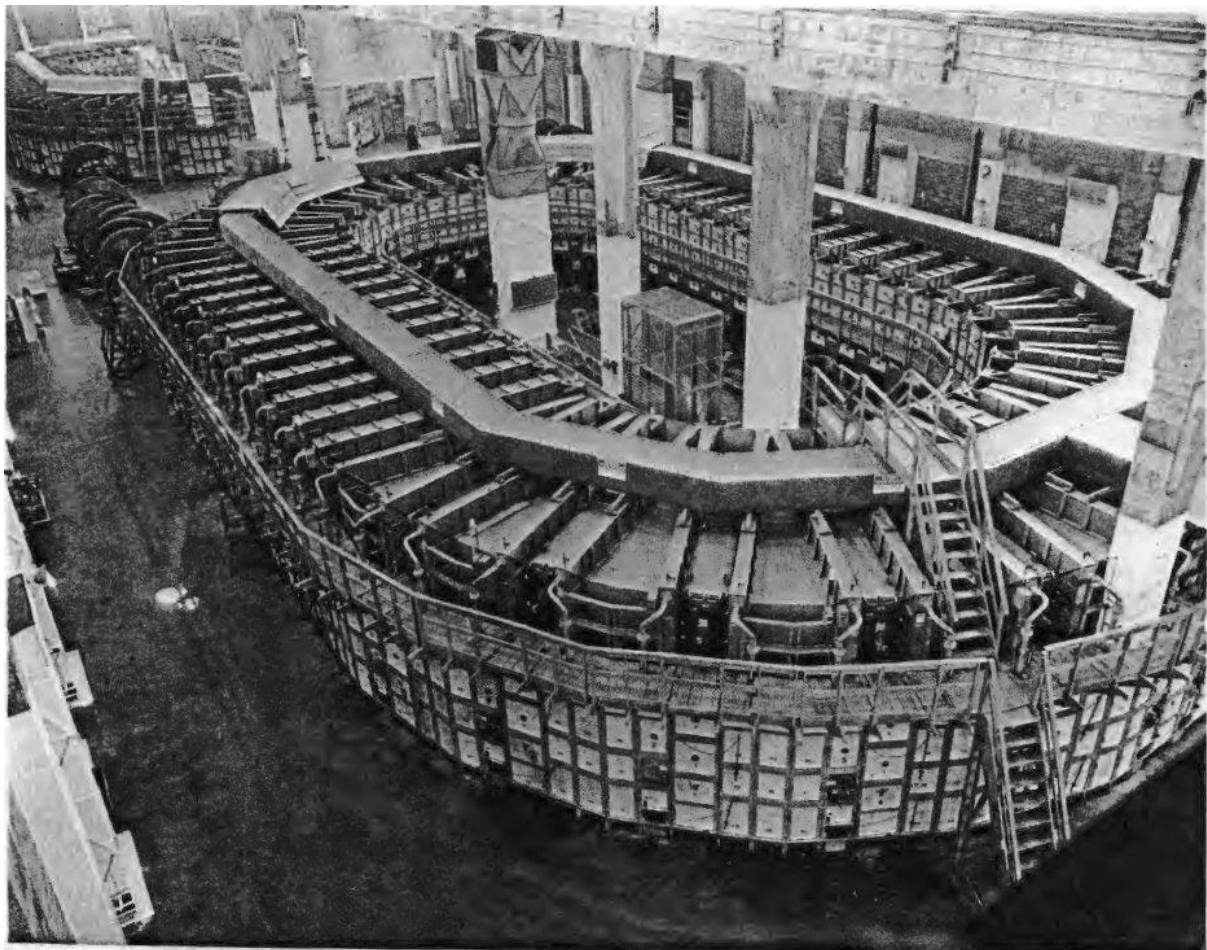
U tipičnom postupku, uzorak, koji može biti krut, tekući ili plinovit, ionizira se, primjerice bombardiranjem snopom elektrona. To može uzrokovati da se neke molekule uzorka raspadnu na pozitivno nabijene fragmente ili jednostavno postanu pozitivno nabijene bez fragmentiranja. Ti se ioni (fragmenti) zatim odvajaju prema omjeru mase i naboja, ubrzavanjem i podvrgavanjem električnom ili magnetskom polju. Ioni istog omjera mase i naboja proći će istu količinu otklona.¹ Ioni se otkrivaju detektorom, kao što je multiplikator elektrona, koji može otkriti nabijene čestice. Atomi ili molekule u uzorku mogu se odrediti povezivanjem poznatih masa (npr. cijele molekule) s identificiranim masama ili karakterističnim uzorkom fragmentacije u spektru masa.

Povijest spektrometrije masa

Eugen Goldstein je 1886. godine promatrao je zrake dobivene plinskim pražnjenjem pod niskim tlakom, koje su se kretale dalje od anode kroz kanale u perforiranoj katodi, suprotno smjeru negativno nabijenih katodnih zraka. Goldstein je nazvao ove pozitivno nabijene anodne zrake *Kanalstrahlen*; kanalne zrake. Wilhelm Wien je otkrio da snažna električna ili magnetska polja odvlače kanalne zrake te je 1899. godine konstruirao uređaj s okomitim električnim i magnetskim poljima koji su razdvajali pozitivne zrake prema omjeru naboja i mase (Q/m). Wien je otkrio da omjer naboja i mase ovisi o vrsti plina u cijevi za pražnjenje. Engleski znanstvenik Joseph John Thomson kasnije je unaprijedio Wienov rad smanjenjem tlaka kako bi stvorio maseni spektrograf. Riječ *spektrograf* postala je dio međunarodnog znanstvenog vokabulara već do 1884. godine.² Rane uređaje za spektrometriju masa koji su

mjerili omjer mase i naboja iona sastojali su se od instrumenata koji su bilježili spektar masenih vrijednosti na fotografskoj ploči, preteče današnjih detektora.^{3,4} Spektroskop masa konstrukcijski je sličan masenom spektrografu, osim što se snop iona usmjerava prema fosfornom ekranu.⁵ Konfiguracija masenog spektroskopa koristila se u ranim instrumentima kada je bilo potrebno brzo podešavanje postavki. Nakon što je instrument ispravno podešen, umetala se fotografska ploča i izlagala putujućim ionima. Izraz *maseni spektroskop* nastavio se koristiti i nakon zamjene izravnog osvjetljavanja fosfornog ekrana neizravnim mjerenjima pomoću osciloskopa.⁶ Upotreba izraza spektroskopija masa danas se ne preporučuje zbog mogućnosti zabune s optičkom spektroskopijom.⁷ Danas uobičajeni naziv, *spektrometrija masa* se često skraćuje kao MS.¹

Moderne tehnike spektrometrije masa osmislili su Arthur Jeffrey Dempster i Francis William Aston 1918. i 1919. godine. Sektorske spektrometre masa poznate kao kalutroni, razvio je Ernest Lawrence, a korišteni su za odvajanje izotopa urana tijekom Projekta Manhattan.⁸ Kalutronski spektrometri masa koristili su se za obogaćivanje urana u postrojenju Y-12 u Oak Ridgeu, Tennessee, koje je osnovano tijekom Drugog svjetskog rata.



Slika 2. Kalutronski spektrometar masa iz postrojenja Y-12

Godine 1989. polovica Nobelove nagrade za fiziku dodijeljena je Hansu Dehmelu i Wolfgangu Paulu za razvoj tehnike ionske zamke u 1950-ima i 1960-ima. Godine 2002. Nobelova nagrada za kemiju dodijeljena je Johnu Bennettu Fennu za razvoj elektrosprej ionizacije (eng.

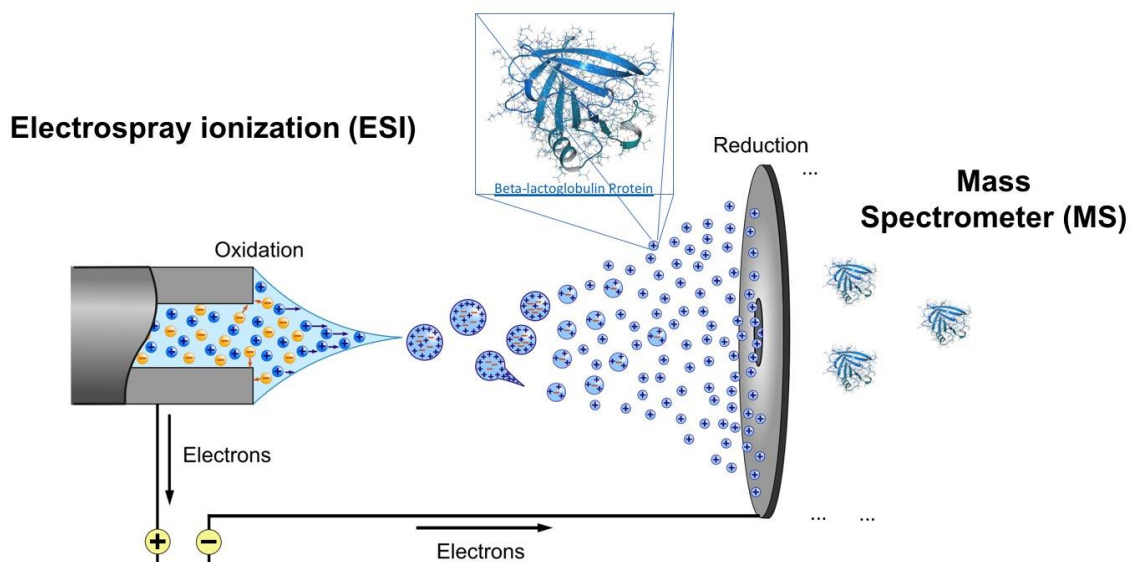
Electrospray Ionisation; ESI) i Koichiju Tanaki za razvoj mekog laserskog isparavanja (eng. *Soft Laser Desorption*; SLD) te njihovu primjenu u ionizaciji bioloških makromolekula, posebice proteina.⁹

Izvedbe spektrometara masa

Moderni spektrometri masa sastoje se od tri glavna dijela: ionski izvor, analizator i detektor. Tome moramo pridodati podatkovni sustav, odnosno računalo koji pretvara električni signal u masene spektre koje možemo interpretirati.

Ionski izvori

Ionski izvori u spektrometriji masa mogu biti raznoliki, a vrstu ionskog izvora za analizu određujemo prema vrsti i fizikalno kemijskim karakteristikama analita. Najrašireniji način ioniziranja analita je elektrosprej ionizacija koja se koristi za veliki raspon različitih analita, ovisno o veličini i fizikalno kemijskim karakteristikama molekule, od malih molekula do velikih proteina ili antitijela. Osim ESI ionskog izvora, poznajemo i kemijsku ionizaciju u atmosferskom tlaku (eng. *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*; APCI), matricom potpomognutu lasersku desorpciju/ionizaciju (eng. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*; MALDI), desorpciju elektrosprej ionizaciju (eng. *Desorption Electrospray Ionisation*; DESI) i druge.



Slika 3. Shematski prikaz ioniziranja u ESI izvoru

Analizatori korišteni u spektrometriji masa

Postoji više vrsta različitih analizatora koje koristimo u spektrometriji masa koji se također koriste ovisno o primjeni. Najrašireniji analizatori u modernim instrumentima su kvadrupolni analizatori (eng. *Quadrupole*). Ovisno o samoj konstrukciji i namjeni, poznajemo tandem

kvadrupolne analizatore i jednostruke kvadrupolne analizatore. Razlika je u namjeni i broju kvadrupola. Osim kvadrupolnih, poznajemo i razne izvedbe analizatora vremena leta (eng. *Time-of-Flight*; ToF), magnetske sektorske analizatore, različite ionske zamke te, Fourier transformirane spektrometre masa.

Većina analizatora razdvajaju ione prema njihovom omjeru mase prema naboju. Dinamiku nabijenih čestica u električnim i magnetskim poljima u vakuumu upravljaju sljedeća dva zakona:

Lorentzova sila $F = Q \cdot (E + v \times B)$

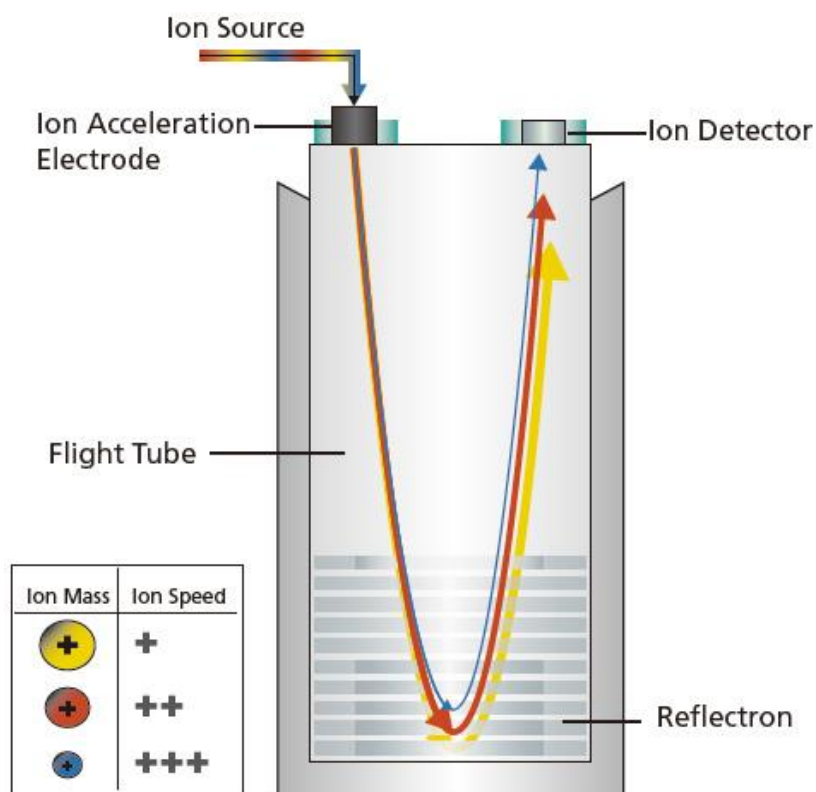
Drugi Newtonov zakon $F = m \cdot a$

Ovdje je F sila koja se primjenjuje na ion, m masa iona, a ubrzanje, Q naboj iona, E električno polje, a $v \times B$ je vektorski umnožak brzine iona i magnetskog polja.¹

Stavljanjem gornjih izraza za silu koja se primjenjuje na ion u jednadžbu dobivamo:

$$\left(\frac{m}{Q}\right) \cdot a = E + v \times B$$

Ova diferencijalna jednadžba je klasična jednadžba gibanja za nabijene čestice. Uz početne uvjete čestice, ona potpuno određuje kretanje čestice u prostoru i vremenu u smislu omjera mase i naboja. Stoga se spektrometri masa mogu smatrati „spektrometrima mase prema naboju“. Pri prikazu podataka uobičajeno je koristiti bezdimenzionalni m/z , gdje je z broj elementarnih naboja na ionu. Ova količina, iako se neformalno naziva omjerom mase prema naboju, točnije predstavlja omjer masenog broja i broja naboja.¹



Slika 4. Schematski prikaz načina rada ToF analizatora

Spektrometrija masa s analizatorom vremena leta (ToF)

Spektrometrija masa s analizatorom vremena leta je metoda spektrometrije masa u kojoj se omjer mase i naboja iona određuje mjerenjem vremena leta. Ioni se ubrzavaju električnim poljem poznate jačine.¹⁰ Izraz za potencijalnu energiju nabijene čestice je određena nabojem (Q) i jakošću električnog polja (U):

$$E_p = Q \cdot U$$

Ubrzanje rezultira time da ion ima istu kinetičku energiju, kao i svaki drugi ion koji ima isti naboj. Pritom se potencijalna energija izjednačuje sa kinetičkom. Izraz za kinetičku energiju svake mase definiran je masom (m) i brzinom (v):

$$E_k = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$$

Kada izjednačimo potencijalnu i kinetičku energiju dobijemo sljedeći izraz:

$$Q \cdot U = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$$

Brzina iona ovisi o omjeru mase i naboja, teži ioni istog naboja postižu niže brzine, iako će ioni s većim nabojem također povećati brzinu. Nakon ubrzanja iona, brzina se više ne mijenja, a može se odrediti na temelju vremena puta kroz ToF cijev jer je duljina puta (d) poznata:

$$v = \frac{d}{t}$$

Supstitucijom izraza za brzinu dobivamo sljedeću jednadžbu:

$$Q \cdot U = \frac{1}{2} \cdot m \cdot \left(\frac{d}{t}\right)^2$$

Nakon što se jednadžba malo preuredi da se izračuna vrijeme leta iona dobijemo:

$$t^2 = \frac{d^2}{2U} \cdot \frac{m}{Q}$$

Ovdje je namjerno prvi član grupiran jer sadrži konstante, duljinu puta iona kroz ToF cijev (d) i napon kojim ubrzavamo ione na ulazu u ToF cijev (U):

$$t = \frac{d}{\sqrt{2U}} \cdot \sqrt{\frac{m}{Q}}$$

Taj član možemo zamijeniti konstantom koja je karakteristična za svaki ToF instrument (k):

$$t = k \cdot \sqrt{\frac{m}{Q}}$$

Ova jednadžba pokazuje da mjerenjem vremena koje ionu treba da dosegne detektor na poznatoj udaljenosti, uz poznatu energiju kojom je ion ubrzan i poznatu duljinu puta,

možemo dobiti omjer mase i naboja iona. Iz ovog omjera i poznatih eksperimentalnih parametara moguće je identificirati ion.

Tandemski analizator vremena leta (ToF/ToF)

Tandem vremena leta (ToF/ToF) je metoda tandemске spektrometrije masa u kojoj se koriste dva analizatora vremena leta zaredom.¹¹ U ToF/ToF MS-u, ioni se ubrzavaju u prvi ToF i ulaze u kolizijsku ćeliju gdje se fragmentiraju sudaranjem sa molekulama plina, najčešće argona. Fragmentirani ioni se razdvajaju u drugom ToF-u. Za snimanje punog spektra prekursor (eng. *parent*) iona ToF/ToF djeluje u MS načinu. U ovom načinu, energija pulsirajućeg lasera odabire se nešto iznad praga MALDI-ja za određenu matricu, koja se koristi kako bi se osigurala kompromis između raspona iona za sve prekursor ione i smanjenje fragmentacije istih iona. Kada se radi u tandemu (MS/MS) načinu, energija pulsa lasera znatno se povećava iznad praga MALDI-ja. Prvi ToF spektrometar masa, u osnovi, cijev leta koja završava vremenski odabranim selektorom iona, izolira prekursor ione po izboru pomoću filtra brzine, obično tipa Bradbury-Nielsen, a drugi ToF-MS koji uključuje post akcelerator, cijev leta, ionsko zrcalo i ionski detektor analizira fragmentirane ione. Fragmentirani ioni u MALDI ToF/ToF rezultat su raspada prekursornih iona vibracijski uzbuđenih iznad njihove razine disocijacije u MALDI izvoru (eng. *post source decay*). Dodatna fragmentacija iona implementirana u visokoenergetsku kolizijsku ćeliju može se dodati u sustav kako bi se povećala stopa disocijacije vibracijski uzbuđenih prekursora. Neki dizajni uključuju *overload* signala prekursora kao dio drugog ToF-MS-a kako bi se smanjio trenutno električno opterećenje na ionski detektor.¹²

Reflektorski ToF

Raspodjela kinetičke energije u smjeru leta iona može se ispraviti korištenjem reflektora. Reflektor koristi konstantno elektrostatičko polje kako bi reflektirao ionski snop prema detektoru.¹³ Ioni veće energije prodru dublje u reflektor i prolaze nešto duži put do detektora, dok ioni koji imaju manju energiju istog omjera mase i naboja prodiru bliže u reflektor i, prema tome, prolaze kraći put do detektora. Ravna površina ionskog detektora, obično mikrokanalna ploča (eng. *Micro-Chanell Plate*, MCP) postavljena je na ravninu na kojoj ioni istog m/z , ali s različitim energijama, stižu u isto vrijeme računajući s obzirom na početak pulsa ekstrakcije na ulazu u ToF cijev. Točka istovremenog dolaska iona istog omjera mase i naboja, ali s različitim energijama, često se naziva fokusom vremena leta. Dodatna prednost reflektorskog aranžmana je što se postiže dvostruko dulji put leta u zadanoj duljini ToF instrumenta. Osim ove izvedbe postoje i izvedbe dvostrukog, trostrukog i višestrukog reflektiranja iona. Time se put iona, a samim time i rezolucija dodatno povećava.

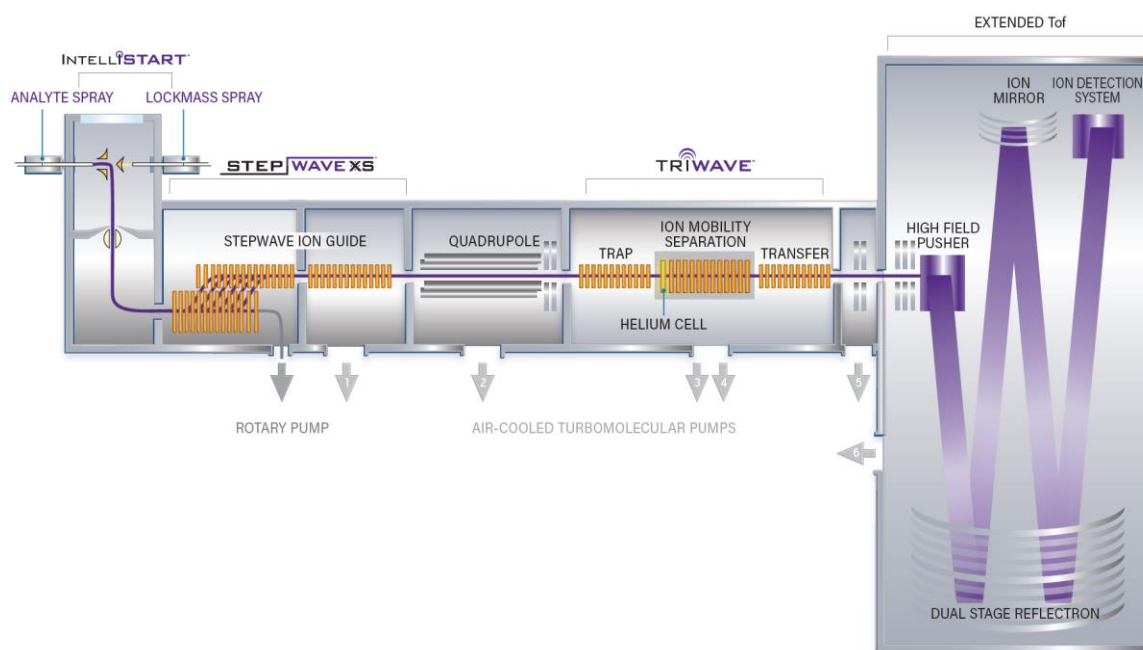
ToF analizator putem ortogonalne ekstrakcije

Kontinuirani izvori iona, najčešće ESI, općenito se povezuju s ToF analizatorom masa putem ortogonalne ekstrakcije, pri čemu se ioni uvedeni u ToF analizator masa ubrzavaju duž osi

koja je okomita na njihov početni smjer kretanja. Ortogonalno ubrzanje u kombinaciji s kolizijskim hlađenjem iona omogućuje razdvajanje fragmentiranih iona u regiji ubrzanja iona na ulazu u ToF cijev. Pomoću ove tehnike moguće je postići vrlo visoku rezoluciju za ione proizvedene u MALDI ili ESI izvorima. Prije ulaska u područje ortogonalnog ubrzanja ili pulser, ioni proizvedeni u kontinuiranim (ESI) ili impulsivnim (MALDI) izvorima fokusirani su u snop promjera od 1-2 mm sudarima s preostalim plinom u radio frekventnim više-polarnim vodičima (eng. *Radio Frequency Multi-Polar Guides*). Sustav elektrostatičkih leća montiranih u visoko vakuumskom području prije pulsatora čini snop paralelnim kako bi se umanjio njegov rasap u smjeru ubrzanja. Kombinacija kolizijskog hlađenja iona i ortogonalne akceleracije ToF-a¹⁴ omogućila je značajan porast rezolucije modernih ToF MS-a s nekoliko stotina do nekoliko stotina tisuća, bez ugrožavanja osjetljivosti.

Kombinirani kvadrupolni analizator i analizator vremena leta

Spektrometar masa koji ima kombinirani analizatore; kvadrupolni-i analizator vremena leta (Q-ToF-MS) ima sličnu konfiguraciju kao tandemski kvadrupolni spektrometar masa koji ima kvadrupol za rezoluciju masa i heksapolom za kolizijsku ćeliju, ali umjesto drugog kvadrupola za rezoluciju masa koristi se analizator vremena leta.¹⁵ Oba elementa mogu raditi samo koristeći radiofrekventni napon (eng. *Radio Frequency*; RF) kako bi omogućili svim ionima da prođu do ToF analizatora masa s minimalnom fragmentacijom. Kako bi se povećao spektralni detalj, sustav koristi disocijaciju poticanu kolizijom (eng. *Collision Induced Dissociation*; CID). Kada ioni dosegnu ToF cijev, ionski pulsator ih šalje prema reflektoru i natrag prema detektoru. Budući da ionski pulsator prenosi istu kinetičku energiju svim molekulama, vrijeme leta diktira masa analita.



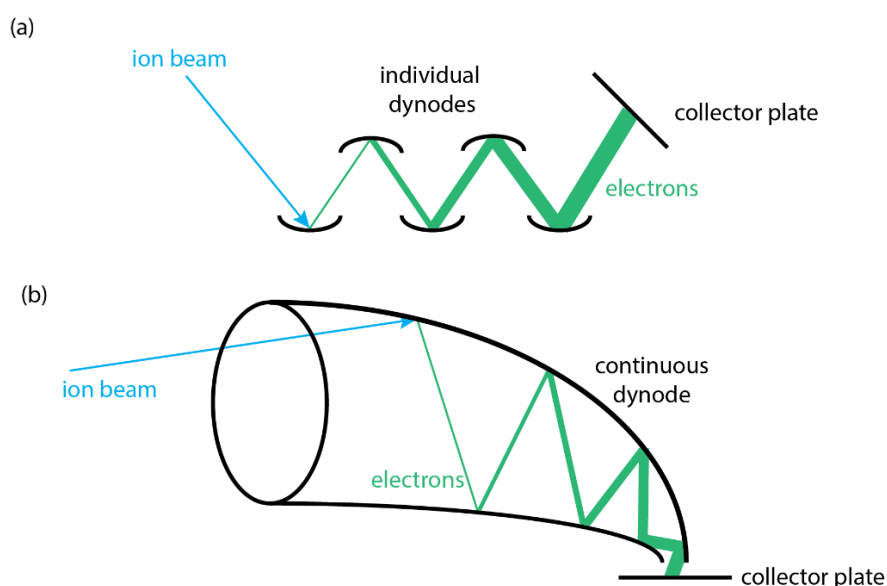
Slika 5. Shematski prikaz Q-ToF spektrometra masa sa tri analizatora, kvadrupolnim, analizatorom pokretljivosti iona i ToF analizatorom sa trostrukom refleksijom

Q-ToF je sposoban mjeriti masu do četvrte decimalne mjesta i često se koristi za farmaceutsku i toksikološku analizu kao metoda pretraživanja analoga ili metabolita lijekova. Identifikacija se obavlja prikupljanjem masenog spektra i usporedbom s bibliotekama tandemskih masenih spektara.¹⁶

Detektori

Detektor iona obično se sastoji od detektora mikrokanalnih ploča ili brzog detektora sekundarnih emisija (eng. *Secondary Emission Detector*; SEM) gdje je prva konvertorna ploča ili dinoda (eng. *dynode*) ravna. Električni signal s detektora snima se putem pretvarača vremena u digitalni oblik (eng. *Time Digital Converter*; TDC) ili brzog analognog-digitalnog pretvarača (eng. *Analog Digital Converter*; ADC). TDC se uglavnom koristi u kombinaciji s ortogonalno-akceleracijskim ToF instrumentima.

Pretvarači vremena u digitalni oblik registriraju dolazak pojedinog iona u diskretne vremenske binove, a kombinacija praga okidača i diskriminatora s konstantnim omjerom (eng. *Constant Fraction Discriminator*; CFD) razlikuje elektroničku buku od događaja dolaska iona. CFD pretvara električne impulse oblika Gaussovih krivulja duljine nekoliko nanosekundi različitih amplituda generiranih na anodi MCP-a u impulse zajedničkog oblika (npr. impulse kompatibilne s TTL/ESL logičkom sklopovlju) poslone TDC-u. Korištenje CFD-a pruža vremensku točku koja odgovara položaju maksimalnog vrha neovisno o varijaciji amplitude vrha uzrokovane varijacijom dobitka MCP-a ili SEM-a. Brzi CFD-ovi naprednih dizajna imaju vrijednost mrtvog vremena jednaka ili manja od dva puta vremena odgovora na jedan pojedinačni hit detektora iona; vrijeme odgovora na jedan hit za MCP s kanalima širine 2-5 mikrona može biti negdje između 0,2 ns i 0,8 ns, ovisno o kutu kanala, čime se sprječava ponovno okidanje iz istog impulsa. Dvostruka rezolucija modernih višekratnih TDC-ova može biti toliko niska kao što su 3-5 nanosekundi.¹⁷



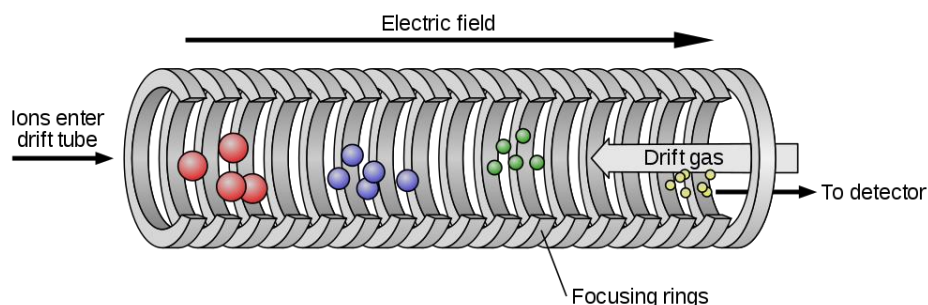
Slika 6. Razne izvedbe detektora na principu multiplikatora elektrona

TDC je detektor brojanja - može biti izuzetno brz, do nekoliko pikosekundi rezolucije, ali mu je dinamički raspon ograničen zbog nemogućnosti pravilnog brojanja događaja kada više iona istovremeno, tj. unutar mrtvog vremena TDC-a, pogodi detektor. Rezultat ograničenog dinamičkog raspona je da je broj iona (događaja) zabilježenih u jednom masenom spektru manji u usporedbi s stvarnim brojem. Problem ograničenog dinamičkog raspona može se ublažiti upotrebom dizajna višekanalnih detektora; niz mini-anoda povezanih s zajedničkom grupom MCP-a i višestrukim CFD/TDC-om, gdje svaki CFD/TDC bilježi signale s pojedinačnih mini-anoda. Kako bi se postigli vrhovi sa statistički prihvatljivim intenzitetima, brojanje iona prati zbrajanje stotina pojedinačnih masenih spektara zvano histogramiranje. Kako bi se postigla vrlo visoka brzina brojanja, ograničena samo trajanjem pojedinačnog ToF spektra koje može biti visoko kao nekoliko milisekundi u višeputnim ToF postavkama, koristi se vrlo visoka stopa ponavljanja izvlačenja iona u ToF cijev. Komercijalni ortogonalno akceleracijski ToF analizatori masa obično rade pri ponavljanjima od 5-30 kHz. U kombiniranim masenim spektrima dobivenim zbrajanjem velikog broja pojedinačnih događaja detekcije iona, svaki vrh je histogram dobiven zbrajanjem brojanja u svakom pojedinačnom binu. Budući da snimanje pojedinačnog dolaska iona s TDC-om daje samo jednu točku u vremenu, TDC eliminira dio širine vrha određen ograničenim vremenom odgovora kako MCP detektora tako i predpojačala. To rezultira boljom rezolucijom dobivenih masa.

Moderni ultra-brzi analogni-digitalni pretvarači od 10 GSsample/s digitaliziraju pulsirajući ionski tok s MCP detektora u diskretnim vremenskim intervalima od 100 pikosekundi. Moderni 8-bitni ili 10-bitni 10 GHz ADC ima mnogo veći dinamički raspon od TDC-a, što omogućuje njegovu upotrebu u instrumentima za MALDI-ToF s visokim vršnim strujama. Za snimanje brzih analognih signala s MCP detektora potrebno je pažljivo uskladiti impedanciju anode detektora s ulaznim sklopovljem ADC-a (preamplifikatorom), kako bi se minimizirao ringing efekt. Rezolucija u masenim spektrima snimljenim s ultra-brzim ADC-om može se poboljšati upotrebom detektora MCP-a s malim porama (2-5 mikrona) s kraćim vremenima odgovora.¹⁸

Spektrometrija masa s analizatorom pokretljivosti iona (IMS)

Spektrometrija masa pokretljivosti iona (eng. *Ion Mobility Spectrometry*; IMS) je analitička kemijska metoda koja razdvaja ionske čestice u plinskoj fazi na temelju njihove interakcije s kolizijskim plinom i njihovih masa.



Slika 7. Schematski prikaz općenitog principa rada IMS analizatora

U prvom koraku, ioni se razdvajaju prema svojoj pokretljivosti kroz plinski pufer na vremenskoj skali od milisekundi pomoću ćelije u kojoj ioni putuju, ćelije pokretljivosti iona. Razdvojeni ioni se zatim uvode u analizator u drugom koraku gdje se njihovi omjeri mase i naboja mogu odrediti na vremenskoj skali mikrosekundi. Učinkovito razdvajanje analita postignuto ovom metodom čini je široko primjenjivom u analizi kompleksnih uzoraka poput proteina i metabolita.¹⁹

Povijest

Earl W. McDaniel nazvan je ocem spektrometrije masa sa analizatorom pokretljivosti iona. Ranih 1960-ih godina, spojio je ćeliju za drift ionske pokretljivosti niske frekvencije s sektorskim spektrometrom masa.²⁰ Kombinacija spektrometrije masa na principu vremena leta i spektrometrije pokretljivosti iona predstavljena je 1963. u Bell Labsu. McKnight, McAfee i Sipler objavili su kombinaciju IMS-ToF 1967. godine. Njihov instrument uključivao je ortogonalni ToF.²¹ Cohen i suradnici su 1969. godine podnijeli patentni zahtjev na IMS-Q-MS sustav. Kvadrupolni MS je tada bio poboljšanje u odnosu na ToF-MS, jer je ToF-MS imao spore elektroničke sustave prikupljanja podataka. Young, Edelson i Falconer objavili su IMS-ToF s ortogonalnom ekstrakcijom 1970. godine.²² Korišten je blago modificirani sustav koji su predstavili isti sustav kao McKnight i suradnici 1967. godine. Njihov rad kasnije je reproduciran u značajnoj knjizi *Transport Properties of Ions in Gases* autora Edwarda A. Masona i Earla W. McDaniela, koju stručnjaci smatraju *biblijom IMS-a*.

Godine 1996. Guevremont i suradnici predstavili su plakat na konferenciji Američkog društva spektrometrije masa (eng. *American Society for Mass Spectrometry*, ASMS) o IMS-ToF sustavu. Tanner je 1997. godine patentirao je kvadrupol s aksijalnim poljima koji se mogu koristiti kao ćelija za drift IMS razdvajanje. Također spominje kombinaciju ovih kvadrupola s ortogonalnim ToF-MS-om. Clemmer je 1998. godine razvio IMS-ToF kombinaciju koristeći koaksijalni IMS-TOF sustav²³, a 1999. godine IMS-ToF s ortogonalnim ToF sustavom.²⁴ Taj rad doveo je do razvoja kombiniranih instrumenata IMS-Q-CID-ToF-MS, a na kraju i do razvoja

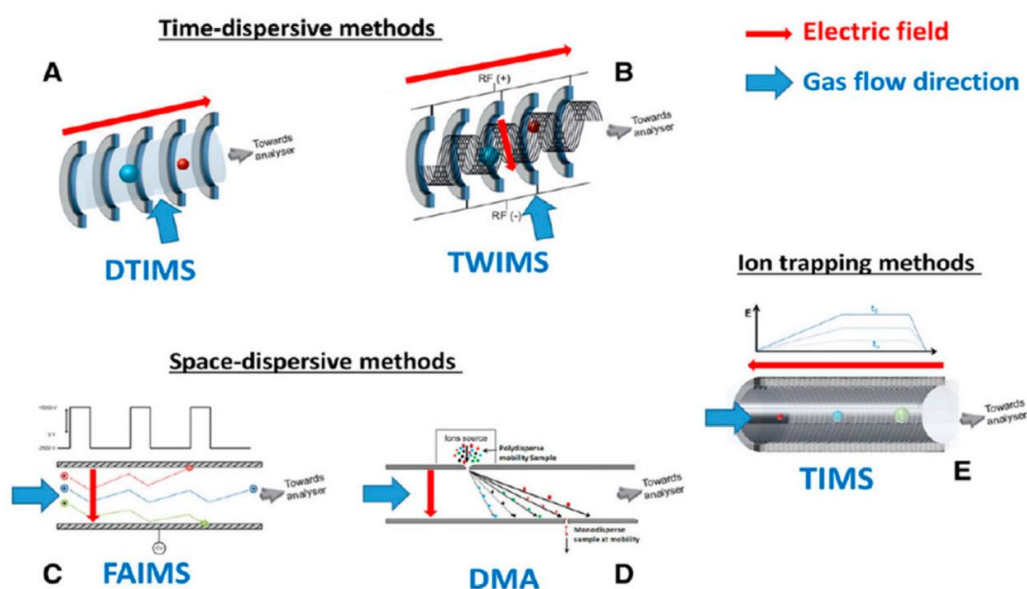
prvog komercijalnog instrumenta za spektrometriju masa sa analizatorom pokretljivosti iona na svijetu 2006. godine. Synapt, kako se naziva, uključuje kvadrupol (Q) za odabir prekursora prije IMS razdvajanja, što dodatno poboljšava fleksibilnost kombinacija spektrometrije masa sa analizatorom pokretljivosti iona. Uskoro slijede i drugi proizvođači sa svojim rješenjima. Tipični analizator koji se koristi uz IMS je ToF ili Q-ToF, prema tome, IMS-MS je kombinacija spektrometra pokretljivosti iona i spektrometra masa, kako je raspravljeno od strane profesorice Claire Evers i njenih kolega u nedavnom pregledu.²⁵

Ionizacija uzoraka

Prvi dio instrumenta je, kao i kod klasičnog MS-a, ionski izvor gdje se uzorci pretvaraju u ione u plinskoj fazi. Mnoge metode ionizacije slične onima tradicionalno korištenim za spektrometriju masa koriste se i za IMS, ovisno o fizičkom stanju analita. Uzorci u plinskoj fazi obično se ioniziraju pomoću radioaktivne ionizacije, korona pražnjenja i tehnika fotoionizacije. Elektrosprej ionizacija je uobičajena metoda za ionizaciju uzoraka u otopini.²⁶ Analiti u čvrstom stanju ioniziraju se metodom ionizacije matricom potpomognutom laserskom desorpcijom za velike molekule ili laserskom desorpcijom (eng. *Laser Desorption Ionisation*, LDI) za molekule s manjim masama.

Razdvajanje na temelju ionske pokretljivosti

Postoje različite vrste spektrometara koji koriste analizatore pokretljivosti iona i različite vrste spektrometara masa. U principu je moguće kombinirati svaku vrstu prvog s bilo kojom vrstom drugog. Međutim, u stvarnom svijetu, različite vrste analizatora pokretljivosti iona uparuju se s različitim vrstama spektrometara masa kako bi se postigla razumna osjetljivost. Glavne vrste analizatora pokretljivosti iona koji su upareni sa spektrometrom masa primjene su opisane u nastavku.



Slika 8. Različite izvedbe IMS analizatora

U spektrometriji pokretljivosti iona brzina putovanja iona kroz drift cijev ili brzina drifta, je definirana izrazom:

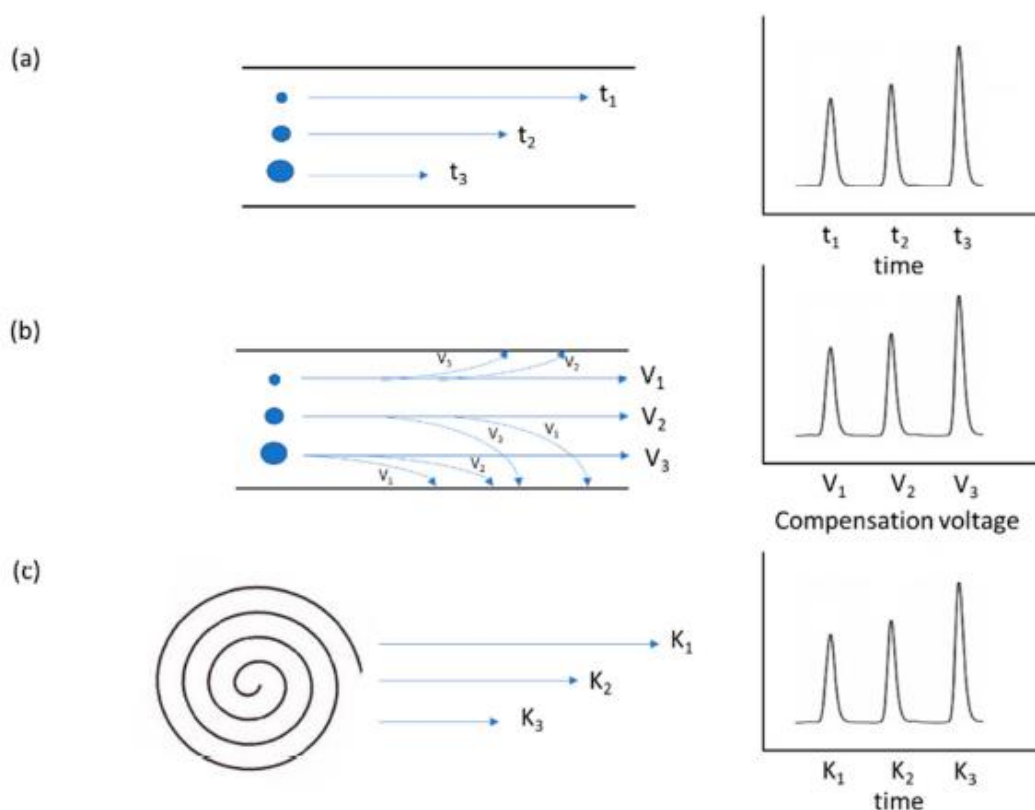
$$v_d = K \cdot E$$

U gornjem izrazu količina pokretljivosti iona je K , a jakost električnog polja E . Ako izraz modificiramo uzimajući u obzir standardnu gustoću plina (n_0) ionska pokretljivost se često izražava kao reducirana pokretljivost iona (K_0). Ta vrijednost se može prikazati koristeći standardnu temperaturu (T_0) i tlak (p_0):

$$K_0 = K \cdot \frac{n}{n_0} = K \cdot \frac{T_0}{T} \cdot \frac{p}{p_0}$$

Pokretljivost iona (K) je moguće teoretski izračunati uz pomoć Mason Schamp-ove jednadžbe koristeći uz određene pretpostavke:

$$K = \frac{3}{16} \cdot \sqrt{\frac{2\pi}{\mu kT}} \cdot \frac{Q}{n\Omega}$$



Slika 9. Podjela IMS analizatora na temelju mehanizama separacije: **(a)** Vremenski disperzivne metode: ove metode koriste različite vremenske parametre za razdvajanje iona, poput njihovih brzina ili vremena prolaska kroz analizator; **(b)** Prostorno disperzivne metode: ove metode koriste fizičke dimenzije ili geometriju kako bi razdvojile ione, poput njihovih veličina; **(c)** Metode zadržavanja iona s selektivnim otpuštanjem: ove metode koriste sposobnost zadržavanja iona u određenim uvjetima, a zatim ih selektivno otpuštaju radi analize.

U gore navedenoj Mason Schamp-ovoj jednadžbi Q je naboj iona, n je gustoća plinovitih molekula, μ je reducirana masa iona i molekula plina, k je Boltzmannova konstanta, T je temperatura plinovitih molekula, a Ω je rotacijski poprečni presjek sudara (eng. *Collision Cross Section*, CCS) između iona i molekula plina. Ova jednadžba približno vrijedi u granici niskog električnog polja, gdje je omjer E/n mali, pa je stoga termalna energija iona mnogo veća od energije koju dobiju iz električnog polja između sudara. S obzirom na to da ovi ioni imaju slične energije kao i molekule plina, u ovom slučaju dominantni pokretači iona pokazuju difuzijske sile. Omjer E/n obično se izražava u *Townsendima* (Td), a prijelaz između niskih i visokih polja obično se procjenjuje da se događa između 2 Td i 10 Td.²⁷

Spektrometrija ionske pokretljivosti putem drift cijevi (DTIMS)

U DTIMS-u (eng. *Drift Tube Ion Mobility Spectrometry*), ioni putuju kroz cijev čija duljina može varirati od 5 cm do 300 cm koristeći gradijent električnog polja. Manji ioni putuju brže kroz drift cijev od iona s većim presjecima sudara. Dakle, ioni se razdvajaju na temelju vremena drifta kroz cijev.²⁸ Drift cijev ionske pokretljivosti ne koristi RF napon koji može zagrijati ione i tako može sačuvati strukturu iona. Fizičko svojstvo iona koji odražava oblik iona, CCS, može se precizno izmjeriti na drift cijevi ionske pokretljivosti.²⁹ Rezolucija je visoka, rezolucija CCS-a može biti veća od 100. Drift cijev ionske pokretljivosti široko se koristi za analizu strukture. Obično je uparen s spektrometrom masa s analizatorom vremena leta.

Mobilnost iona u drift cijevi se eksperimentalno može odrediti mjerenjem vremena drifta iona t_D koji se kreće kroz homogeno električno polje razlike potencijala U i duljine puta drifta L :

$$K = \frac{L^2}{t_D U}$$

Rezolucijska moć drift cijevi R_p , ako pretpostavimo da je difuzija jedini doprinositelj širenju peaka, može se izračunati po jednadžbi:

$$R_p = \frac{t_d}{\Delta t_d} = \sqrt{\frac{LEQ}{16kT \ln 2}}$$

Gdje je jedini do sada nespomenuti parametar Δt_d , širina peaka na pola visine (eng. *Full Width at Half Maximum*; FWHM), inače veličina koja se uobičajeno koristi kod izražavanja rezolucije spektrometara masa.

Diferencijalna spektrometrija pokretljivosti (DMS)

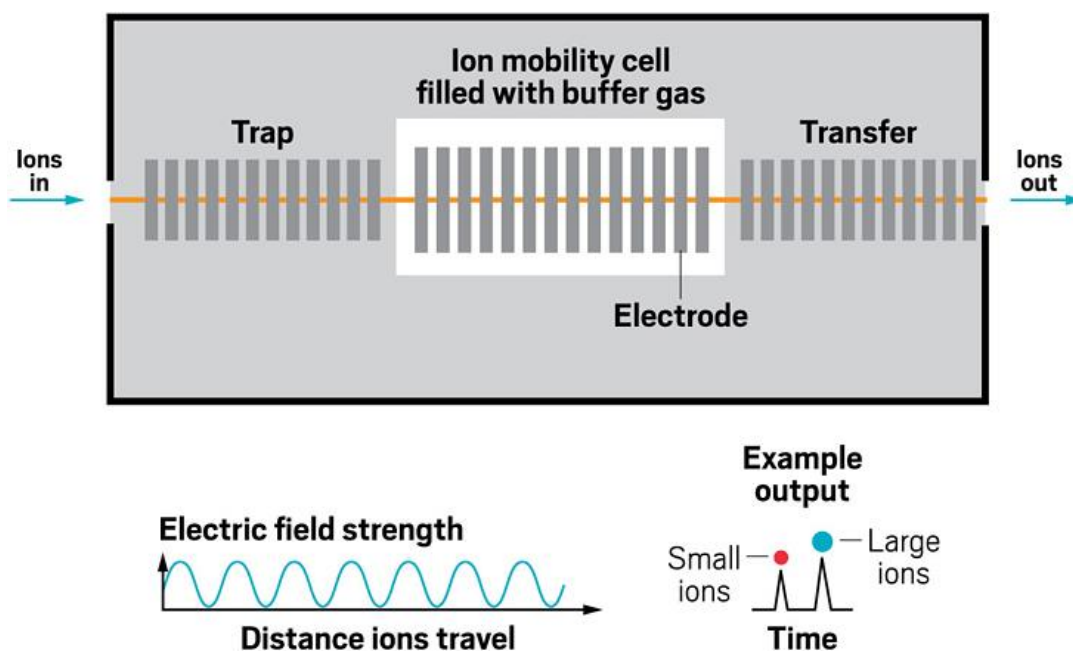
Također poznata kao asimetrična spektrometrija valova ionske pokretljivosti (eng. *High-Field Asymmetric-waveform Ion Mobility Spectrometry*; FAIMS) ili RF-DC spektrometrija pokretljivosti iona je tehnika u kojoj se ioni razdvajaju primjenom asimetričnog visokonaponskog vala na radiofrekvenciji (RF) u kombinaciji s statičkim električnim valom (eng. *Direct Current*, DC) primijenjenim između dviju elektroda.³⁰ Ovisno o omjeru

pokretljivosti iona u visokom polju i u niskom polju, on će migrirati prema jednoj od elektroda. Samo ioni s određenom pokretljivošću će proći kroz uređaj. Dobro je poznato da visoko RF polje narušava konformaciju iona, stoga je FAIMS tehnika je tehnika razdvajanja bez očuvanja strukture iona i CCS iona se ne može mjeriti.³¹ Budući da je FAIMS analizator, osjetljivost u načinu skeniranja je mnogo niža nego kod analizatora pokretljivosti iona koji koriste drift cijev gdje se svi ioni analiziraju. Stoga se FAIMS obično uparuje s spektrometrom masa s tandem kvadrupolom koji je također vrsta instrumenta za selekciju iona.

Metode pod atmosferskim tlakom omogućuju veću rezoluciju i bolje razdvajanje zbog veće stope interakcija iona i obično se koriste za samostalne uređaje, kao i za detektore za plinsku, tekućinsku i superkritičnu kromatografiju. Kao što je prikazano gore, rezolucijska snaga ovisi o ukupnom padu napona kroz koji ion prolazi. Korištenjem napona drifta od 25 kV u drift cijevi na atmosferskom tlaku duljine 15 cm, postiže se rezolucijska snaga veća od 250, čak i za male, jednostruko nabijene ione.³² To je dovoljno za postizanje razdvajanje nekih izotopnih analoga na temelju njihove razlike u reduciranoj masi μ .³³

Spektrometrija ionske pokretljivosti putem putujućeg vala (TWIMS)

U TWIMS-u, (eng. *Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry*) ioni se razdvajaju prema njihovoj pokretljivosti kroz putujući val u kolizijskom plinu. Na seriju prstenastih elektroda nazvanih stogovi prstenastih ionskih vodiča (eng. *Stacked Ring Ion Guide*; SRIG) primjenjuju se RF i DC naponi kako bi se ograničili ioni i stvorio putujući val.³⁴ Ovisno o brzini i veličini putujućeg vala, ioni se mogu razdvojiti. Manji ioni imaju veću pokretljivost kroz val zbog manjeg broja sudara s molekulama plina i izlaze iz ćelije brže od iona s nižom pokretljivošću, odnosno veći ioni. Slično kao u DTIMS-u, vrijednosti CCS-a iona mogu se izračunati s TWIMS-om koristeći kalibraciju dobivenu s poznatim standardima.³⁵ Komercijalni primjer TWIMS-MS instrumentacije je već spomenuti Waters Synapt.

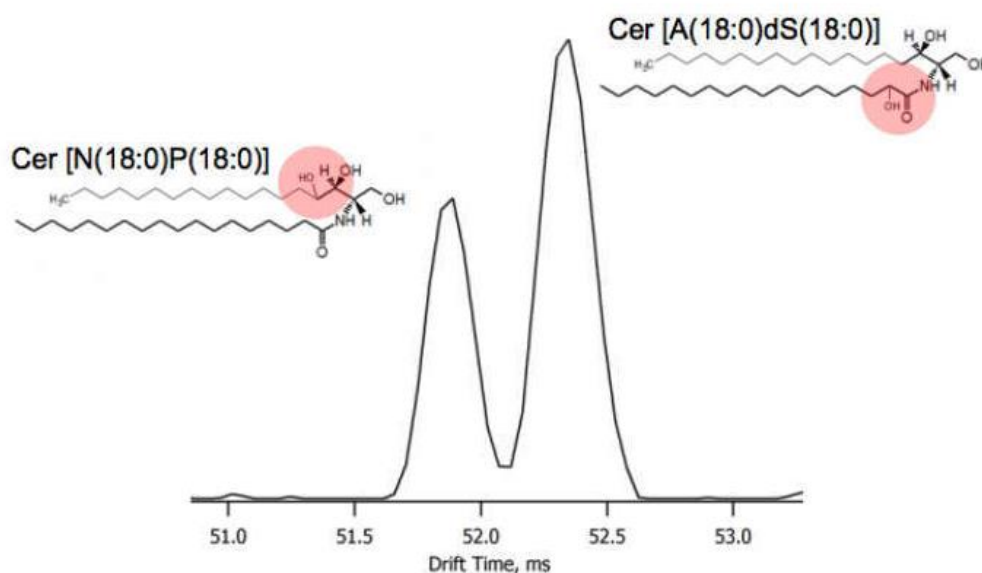


Slika 10. Shematski prikaz IMS regije TWIMS spektrometra masa

Tradicionalno je IMS instrument koji koristi analizator vremena leta spojen na analizator pokretljivosti iona.²⁶ ToF-MS ima mnoge prednosti uključujući visoku brzinu prikupljanja podataka i dobru osjetljivost. Budući da se spektrometrijski podaci prikupljaju na mikrosekundnoj vremenskoj skali, za svaki MS spektar, prikupljen na vremenskoj skali milisekundi, prikupljaju se višestruki spektri pokretljivosti iona. Kvadrupolni spektrometar masa također je spojen na IMS, iako s sporijom brzinom skeniranja. Drugi izvedbe spektrometara masa, uključujući ionsku zamku, Fourierov transformiranu ionsku ciklotronsku rezonancu (FT-ICR) ili magnetski sektorski spektrometri masa spojeni su s različitim izvedbama IMS za različite primjene.²⁸ Također su razvijeni hibridni spektrometri masa koji su spojeni na više od jedne ćelije ionske pokretljivosti za tandemsku ili IMSⁿ-MS^m primjenu.³⁶

Primjene IMS-a

IMS tehnika može se koristiti za analizu složenih smjesa na temelju različitih pokretljivosti u električnom polju. Struktura ionskih čestica u plinskoj fazi može se proučavati korištenjem IMS-a putem mjerenja CCS-a i uspoređivanjem s CCS-om standardnih uzoraka ili CCS-om izračunatim iz molekularnog modeliranja. Očito je poboljšana omjer signala i šuma jer se šum može fizički odvojiti od signala u IMS-u. Osim toga, izomeri se mogu razdvojiti ako im se oblici razlikuju. Kapacitet vrha IMS-a mnogo je veći od MS-a, pa se može pronaći i analizirati više spojeva. Ova karakteristika je vrlo važna za studije omike koje zahtijevaju analizu što više spojeva u jednom snimanju podataka.³⁷ Koristi se u detekciji kemijskih bojnih otrova, detekciji eksploziva, u proteomici za analizu proteina, peptida, molekula sličnih lijekovima i nanočestica.³⁸



Slika 11. Primjer upotrebe IMS-a za razdvajanje regioizomera

Nadalje, IMS se može koristiti za praćenje izomernih reakcijskih intermedijera i ispitivanje njihove kinetike.³⁹ Nedavno je FAIMS na mikro skali integriran s MS-om sa elektrosprej ionizacijom i tekućinskom kromatografijom kako bi se brzo razdvojili ioni u milisekundama

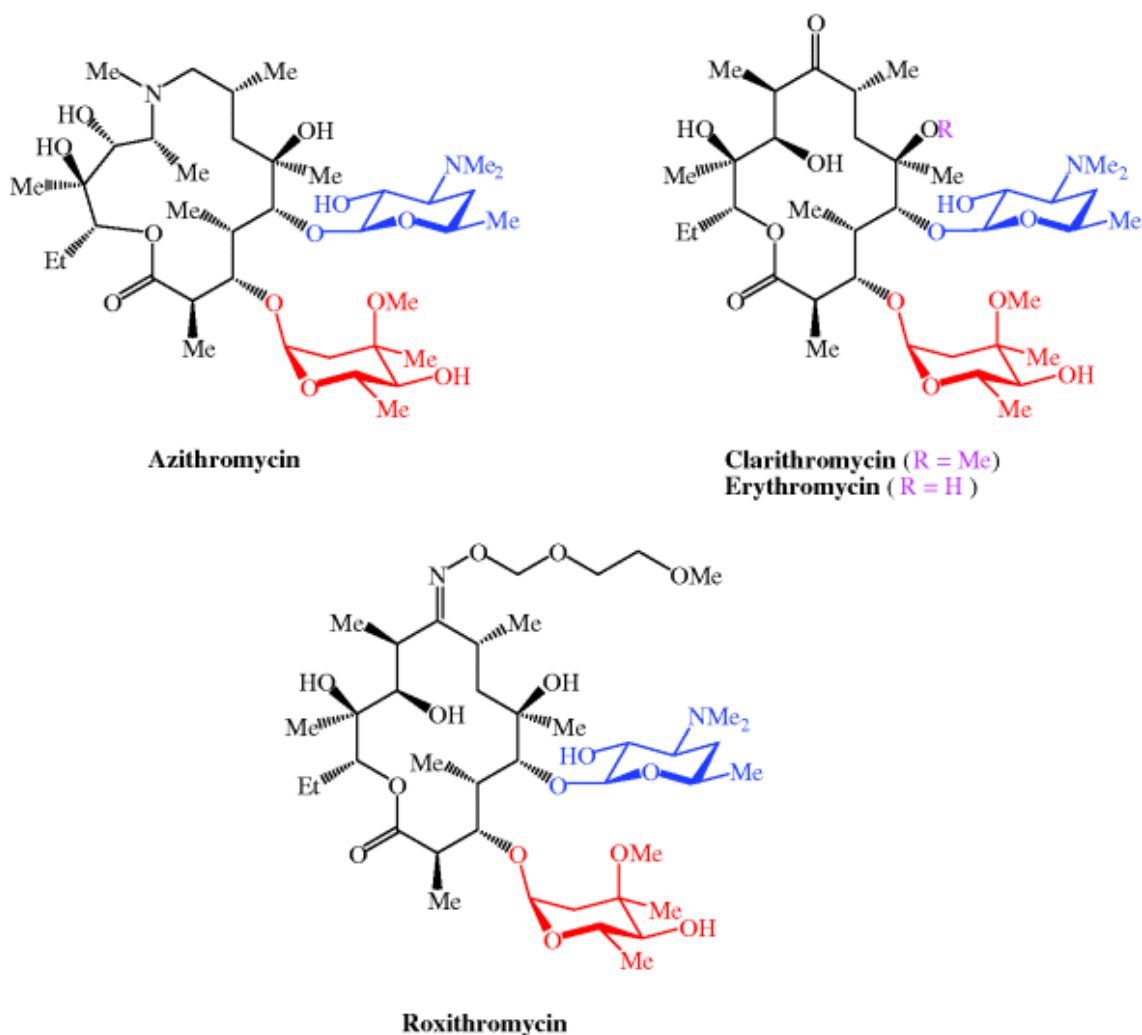
prije analize. Upotreba mikroskopskog FAIMS-a može značajno poboljšati kapacitet vrha i omjer signala i šuma za niz primjena, uključujući proteomiku i farmaceutsku analizu.⁴⁰

Nedavne publikacije opisuju korištenje metoda aktivacije iona u plinskoj fazi korištene kako bi se dobili novi uvidi u složene strukture. Kolizijski inducirano razmatanje (eng. *Collision Induced Unfolding*; CIU) je tehnika u kojoj se unutarnja energija iona povećava kroz sudare s plinom prije analize IMS-om. Razmatanje iona promatra se kroz veće CCS-ove, a energija na kojoj se razvijanje događa djelomično odgovara nekovalentnim interakcijama unutar iona. Ova tehnika koristi se za diferencijaciju poliubikvitinskih veza⁴¹ i netaknutih antitijela.⁴²

Makrolidni antibiotici i njihov način djelovanja

Makrolidi su klasa većinom prirodnih spojeva s velikim makrocikličnim laktonskim prstenom na koji su povezani jedan ili više deoksi šećera, obično kladinoza i desozamin. Laktonske prstenove uglavnom čine 14-, 15- ili 16-člani prstenovi. Makrolidi pripadaju poliketidnoj klasi prirodnih proizvoda. Neki makrolidi imaju antibiotičku ili antifungalnu aktivnost i koriste se kao farmaceutski lijekovi. Rapamicin je također makrolid i prvotno je razvijen kao antifungalni lijek, ali se sada koristi kao imunosupresivni lijek i istražuje se kao potencijalna terapija za dugovječnost.⁴³

Prvi otkriveni makrolid bio je eritromicin, koji je prvi put korišten 1952. godine. Eritromicin je široko korišten kao zamjena za penicilin u slučajevima kada su pacijenti alergični na penicilin ili imaju bolesti otporne na penicilin. Kasnije razvijeni makrolidi, uključujući azitromicin i klaritromicin, potekli su iz kemijske modifikacije eritromicina, ovi spojevi su dizajnirani da se lakše apsorbiraju i imaju manje nuspojava. Eritromicin je, primjerice, uzrokovao gastrointestinalne nuspojave kod značajnog broja korisnika.⁴⁴



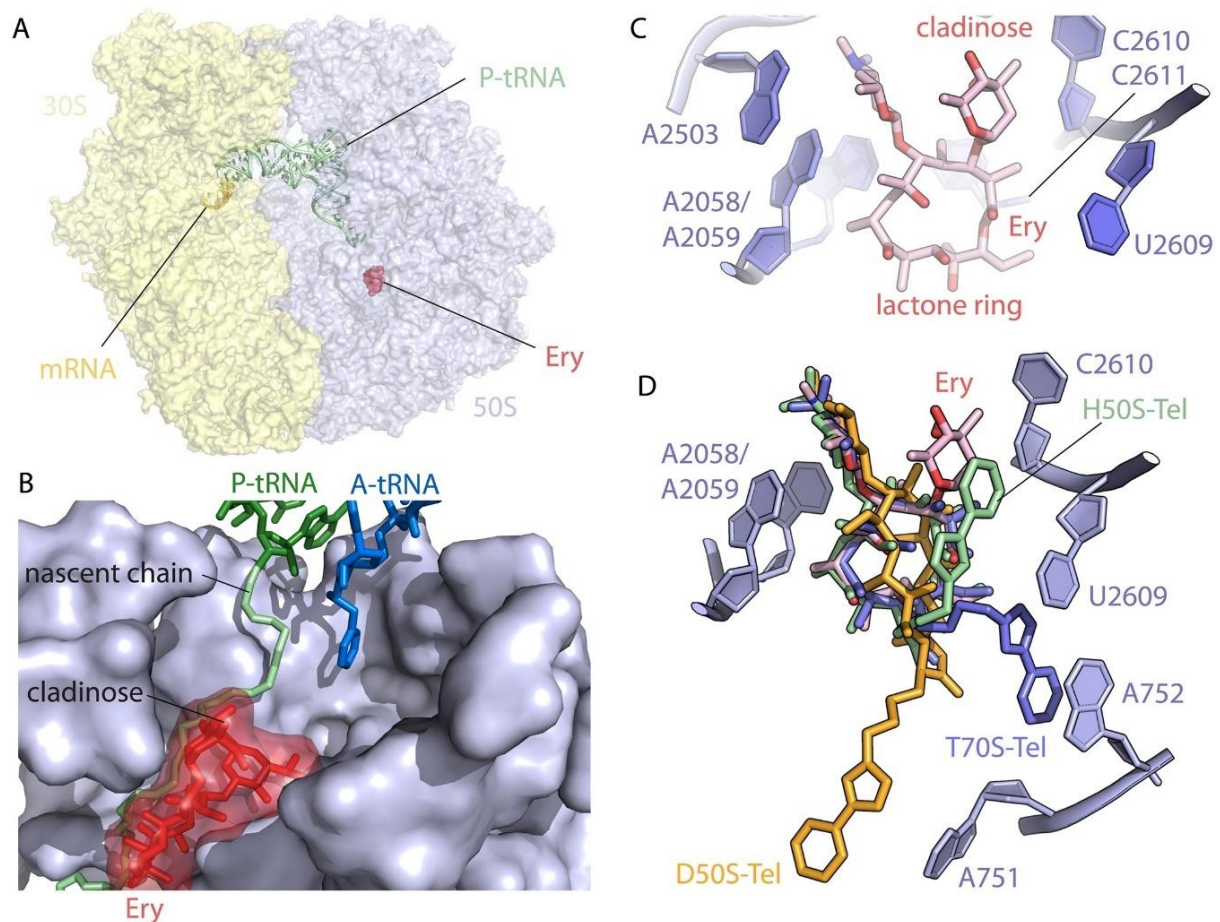
Slika 12. Primjeri makrolidnih antibiotika

Antibiotski makrolidi koriste se za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim bakterijama (npr. *Streptococcus pneumoniae*) i nekim Gram-negativnim bakterijama (npr.

Bordetella pertussis, *Haemophilus influenzae*), te nekih infekcija dišnog sustava i mekih tkiva.⁴⁵ Antimikrobni spektar makrolida nešto je širi od penicilina, stoga su makrolidi česta zamjena za pacijente s alergijom na penicilin. Beta-hemolitički streptokoki, pneumokoki, stafilocoki i enterokoki obično su osjetljivi na makrolide. Za razliku od penicilina, makrolidi su pokazali učinkovitost protiv *Legionella pneumophila*, mikoplazme, mikobakterija, nekih rikecija i klamidije. Administracija makrolidnih lijekova moguća je na različite načine, uključujući tablete, kapsule, suspenzije, injekcije i lokalno.

Antibakterijsko djelovanje

Makrolidi su inhibitori sinteze proteina. Mehanizam djelovanja makrolida je inhibicija bakterijske biosinteze proteina, a smatra se da to čine sprječavanjem peptidil-transferaze da dodaje rastući peptid povezan s tRNA na sljedeću aminokiselinu, mehanizam sličan onome kloramfenikola, kao i inhibicijom translacije. Još jedan potencijalni mehanizam je prijevremeno odvajanje peptidil-tRNA od ribosoma.⁴⁶



Slika 13. Prikaz molekule eritromicina (Ery) vezane na 50S podjedinicu ribosoma (A), Uvećani prikaz eritromicina blizu P mjesta (B), konformacija eritromicina i najbliže baze u veznom mjestu 70S ribosoma (C), superpozicija telitromicina uz eritromicin u veznom mjestu ribosoma različitih vrsta; vidljive su razlike u konformaciji telitromicina (D)

Makrolidni antibiotici se reverzibilno vežu na mjesto P na 50S podjedinici bakterijskog ribosoma. Ovo djelovanje se smatra bakteriostatičnim. Makrolidi se aktivno koncentriraju unutar leukocita, te se stoga transportiraju na mjesto infekcije.⁴⁷

Imunomodulacija

Makrolidni antibiotici eritromicin, klaritromicin i roksitromicin dokazali su se kao učinkoviti dugoročni tretman za idiopatsku, prevalentnu azijsku bolest pluća poznatu kao difuzni panbronhiolitis (eng. *Diffuse panbronchiolitis*; DPB). Uspješni rezultati makrolida u liječenju DPB-a proizlaze iz kontrole simptoma putem imunomodulacije, odnosno prilagodbe imunološkog odgovora, uz dodatnu korist niskih doza lijeka.⁴⁸ Terapijom makrolidima u liječenju DPB-a postiže se veliko smanjenje upale i oštećenja bronhiola putem suzbijanja, ne samo proliferacije neutrofilnih granulocita, već i aktivnosti limfocita i opstruktivnih sekreta u dišnim putevima. Međutim, antimikrobno i antibiotsko djelovanje makrolida, prema vjerovanju, nisu uključeni u njihove povoljne učinke u liječenju DPB-a.⁴⁹ To je očito jer je doza liječenja preniska za borbu protiv infekcije, a u slučajevima DPB-a s pojavom bakterije *Pseudomonas aeruginosa* otporne na makrolide, terapija makrolidima i dalje proizvodi značajne protuupalne rezultate.

Farmakokinetika

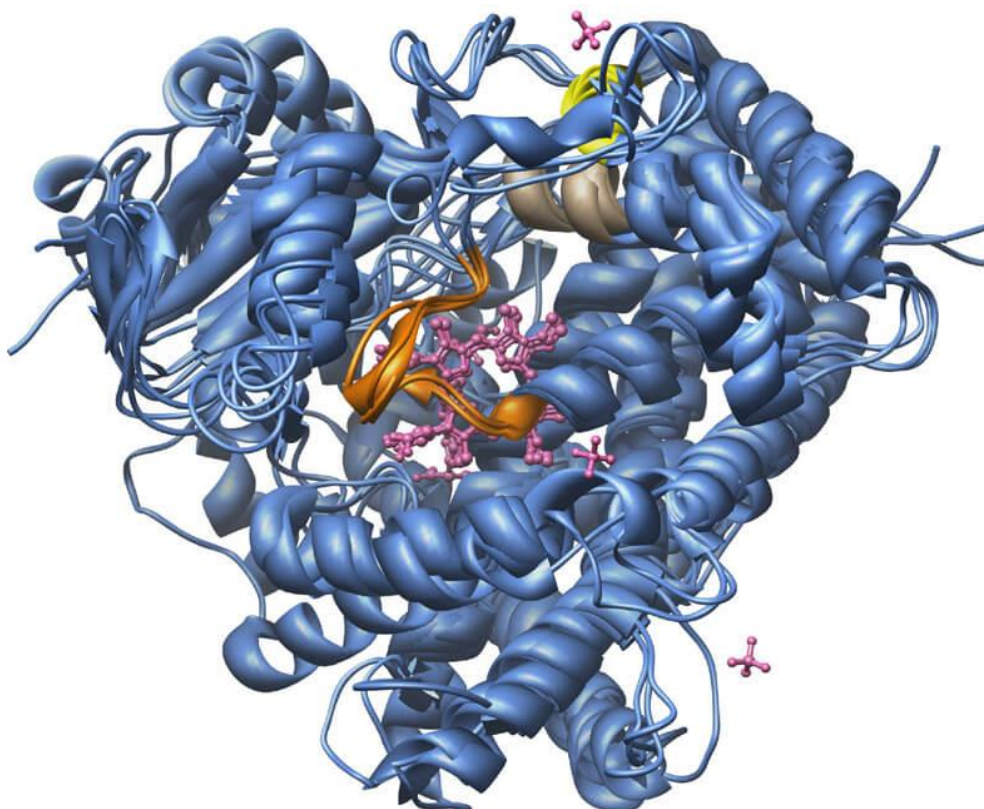
Za razliku od eritromicina, azitromicin je kiselinski stabilan antibiotik, pa se može uzimati oralno bez potrebe za zaštitom od želučanih kiselina. Lako se apsorbira, ali je apsorpcija veća na prazan želudac. Vrijeme do postizanja maksimalne koncentracije kod odraslih iznosi 2,1 do 3,2 sata za oralne oblike doziranja. Zbog visoke koncentracije u fagocitima, azitromicin se aktivno transportira na mjesto infekcije. Tijekom aktivne fagocitoze, oslobađaju se velike koncentracije. Koncentracija azitromicina u tkivima može biti više od 50 puta veća nego u plazmi zbog ioniziranja i visoke lipidne topljivosti. Poluživot azitromicina omogućuje primjenu velike pojedinačne doze, a ipak održava bakteriostatske razine u zaraženom tkivu tijekom nekoliko dana.⁵⁰

Nakon jedne doze od 500 mg, približni terminalni poluživot eliminacije azitromicina iznosi 68 sati. Izlučivanje azitromicina putem žuči, uglavnom nepromijenjenog, glavni je put eliminacije. Tijekom tjedna, oko 6% administrirane doze pojavljuje se kao nepromijenjeni lijek u urinu.⁵¹

Metaboličke interakcije makrolida

CYP3A4 je enzim koji metabolizira mnoge lijekove u jetri. Makrolidi inhibiraju CYP3A4, što znači da smanjuju njezinu aktivnost i povećavaju razinu lijekova koji ovise o njoj za eliminaciju. To može dovesti do nuspojava ili interakcija lijekova.⁵²

Makrolidi imaju cikličku strukturu s laktonskim prstenom i šećernim ostacima. Oni mogu inhibirati CYP3A4 putem mehanizma nazvanog inhibicija temeljena na mehanizmu (eng. *Mechanism Based Inhibition*; MBI), koji uključuje stvaranje reaktivnih metabolita koji se kovalentno i nepovratno vežu za enzim, čime ga čine neaktivnim. MBI je ozbiljniji i dugotrajniji od reverzibilne inhibicije, jer zahtijeva sintezu novih molekula enzima kako bi se obnovila aktivnost.⁵³



Slika 14. Prikaz enzima CYP3A4

Stupanj MBI-a makrolidima ovisi o veličini i strukturi njihovog laktonskog prstena. Klaritromicin i eritromicin imaju laktonski prsten s 14 članova, koji je skloniji demetilaciji od strane CYP3A4 i naknadnoj formaciji nitrosoalkena, reaktivnih metabolita koji uzrokuju MBI. S druge strane, azitromicin ima laktonski prsten s 15 članova, koji je manje podložan demetilaciji i formaciji nitrosoalkena. Stoga je azitromicin slab inhibitor CYP3A4, dok su klaritromicin i eritromicin snažni inhibitori koji povećavaju površinu pod krivuljom (eng. *Area Under Curve*; AUC) koadministriranih lijekova više od pet puta.⁵³ AUC je mjera izloženosti lijeka u tijelu tijekom vremena. Inhibirajući CYP3A4, makrolidni antibiotici, poput eritromicina i klaritromicina, ali ne i azitromicin, značajno mogu povećati AUC vrijednost lijekova koji ovise o njoj za eliminaciju, što može dovesti do većeg rizika od nuspojava ili interakcija lijekova. Azitromicin se izdvaja od ostalih makrolidnih antibiotika jer je slab inhibitor CYP3A4, i ne povećava značajno AUC vrijednost koadministriranih lijekova.⁵⁴

Razlika u inhibiciji CYP3A4 makrolidima ima kliničke implikacije, na primjer, za pacijente koji uzimaju statine, koji su lijekovi za snižavanje kolesterola koji se uglavnom metaboliziraju putem CYP3A4. Administracija klaritromicina ili eritromicina sa statinima može povećati rizik

od miopatije izazvane statinima, stanja koje uzrokuje bol i oštećenje mišića. Međutim, azitromicin ne utječe značajno na farmakokinetiku statina i smatra se sigurnijom alternativom. Druga opcija je uporaba fluvastatina, statina koji se metabolizira putem CYP2C9, enzima koji nije inhibiran klaritromicinom.⁵³

Makrolidi, uključujući azitromicin, ne bi se trebali uzimati s kolhicinom jer to može dovesti do toksičnosti kolhicina. Simptomi toksičnosti kolhicina uključuju gastrointestinalne smetnje, groznicu, mialgije, pancitopeniju i zatajenje organa.⁵⁴

Bakterijska otpornost na makrolide

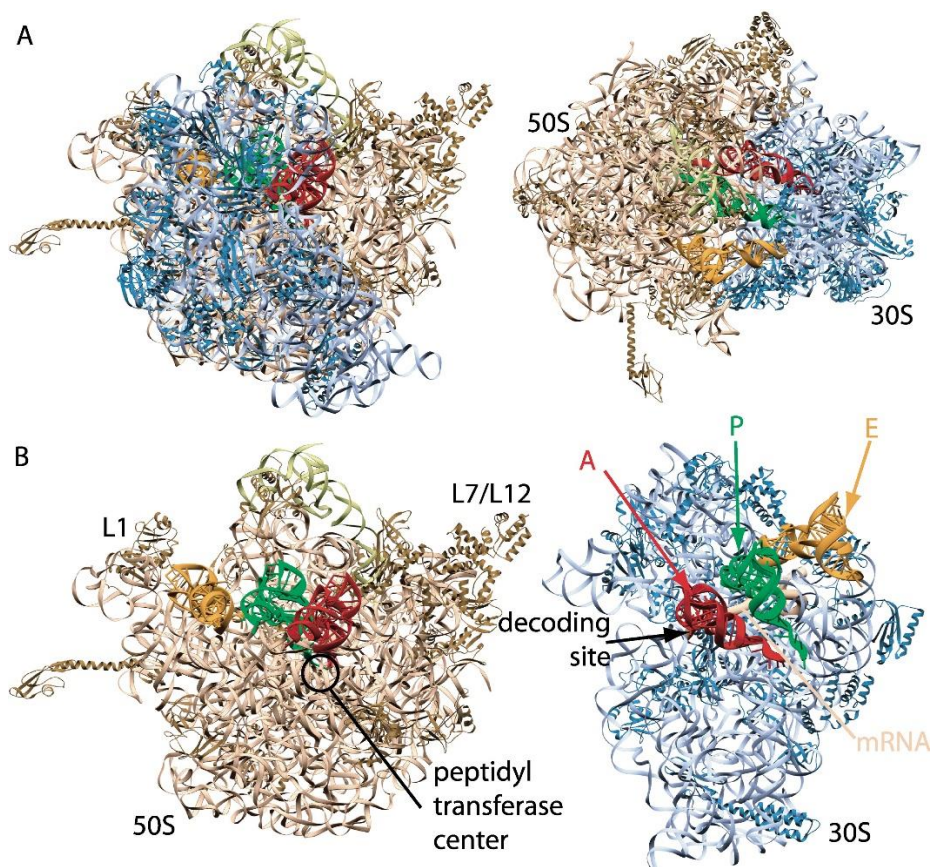
Makrolidi i ketolidi čine obitelj klinički važnih antibiotika koji inhibiraju sintezu proteina vezanjem unutar izlaznog tunela bakterijskog ribosoma. Glavni način otpornosti bakterija na makrolide javlja se post-transkripcijskom metilacijom 23S bakterijskog ribosomalnog RNA. Ova stečena otpornost može biti plazmidom posredovana ili kromosomska, tj. putem mutacije, i rezultira unakrsnom otpornošću na makrolide, linkozamide i streptogramine, odnosno MLS otporan fenotip.⁵⁵ Beckert i suradnici su zaključili da makrolidni antibiotici prekidaju translaciju na određenim sekvencijskim motivima, pri čemu ketolidi pretežno uzrokuju zastoje na Arg/Lys-X-Arg/Lys motivima, a makrolidi pokazuju širu specifičnost.⁵⁶ Definirali su dijelove ribosoma blokiranih tijekom sinteze sekvence Arg-Leu-Arg od strane makrolida eritromicina i ketolida telitromicina. Uz duboku mutagenezu i *in silico* predikcije molekularne dinamike, strukture otkrivaju kako eritromicin i telitromicin djeluju s Arg-Leu-Arg motivom kako bi izazvali translacijski zastoj i rasvijetlili osnovu za manje strogo sekvencijsko specifično djelovanje eritromicina u odnosu na telitromicin. Budući da je programirano zastajanje na Arg/Lys-X-Arg/Lys motivima korišteno za aktivaciju izražavanja gena otpornosti na antibiotike, ovo istraživanje pruža važne uvide za budući razvoj poboljšanih makrolidnih antibiotika.

Dva druga oblika stečene otpornosti uključuju proizvodnju enzima koji inaktiviraju lijekove (esteraze ili kinaze), kao i proizvodnju aktivnih ATP-ovih ovisnih proteinskih izlučivača koji prenose lijek izvan stanice.⁵⁷

Azitromicin, primjerice, se koristi za liječenje streptokokne upale grla, odnosno infekcija skupine A uzrokovana *Streptococcus pyogenes*, kod pacijenata osjetljivih na penicilin; međutim, makrolidno otporni sojevi pojavljuju se s umjerenom učestalošću. Cefalosporin je druga opcija za ove pacijente.⁵⁸

Ribosomi; struktura i funkcija

Ribosomi su makromolekule koji se nalaze unutar svih stanica, a obavljaju biološku proteinsku sintezu, odnosno translaciju glasničke RNA, mRNA. Ribosomska RNA nalazi se u centru ribosoma gdje se odvija sinteza proteina. Ribosomi povezuju aminokiseline u točno određenom nizu koji je određen kodonima glasničke RNA molekule kako bi formirali polipeptidne lance. Ribosomi se sastoje od dva glavna dijela: malih i velikih ribosomskih podjedinica. Svaka podjedinica sastoji se od jedne ili više ribosomskih RNA molekula i mnogo ribosomskih proteina, r-proteina.⁵⁹ Ribosomi i povezane molekule poznate su i kao translacijski aparat.



Slika 15. Struktura ribosoma sa označenom malom (30S) i velikom podjedinicom (50S), PTC, A, P i E mjesta.

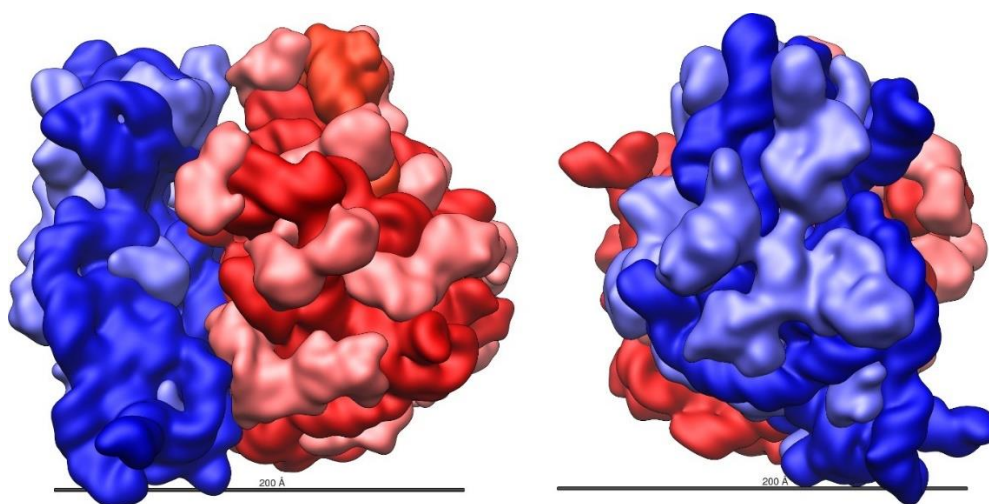
Struktura ribosoma

Ribosom je kompleksna stanična struktura. Sastoji se uglavnom od specijalizirane RNA poznate kao ribosomska RNA, rRNA, te desetaka različitih proteina čiji točan broj varira malo između vrsta. Ribosomski proteini i rRNA organizirani su u dva različita ribosomska dijela različitih veličina, općenito poznata kao velika i mala podjedinica ribosoma. Ribosomi se sastoje od dvije podjedinice koje se spajaju i djeluju kao jedan kako bi preveli mRNA u polipeptidni lanac tijekom sinteze proteina. Budući da su formirani od dvije podjedinice različite veličine, nešto su dulji na osi nego u promjeru.

Prokariotski ribosomi

Prokariotski ribosomi imaju promjer od oko 200 Å i sastoje se od 65% ribosomske RNA i 35% ribosomskih proteina. Kristalografija je pokazala da nema ribosomskih proteina blizu mjesta reakcije za sintezu peptidnih veza. To sugerira da proteinske komponente ribosoma ne sudjeluju izravno u katalizi formiranja peptidne veze, već da ti proteini djeluju kao struktura koja može pojačati sposobnost rRNA za sintezu proteina.⁶⁰

Ribosomske podjedinice prokariota i eukariota prilično su slične. Jedinica mjere koja se koristi za opis ribosomskih podjedinica i fragmenata rRNA je Svedbergova jedinica, mjera brzine sedimentacije u centrifugiranju umjesto veličine. To objašnjava zašto se imena fragmenata ne zbrajaju: na primjer, bakterijski 70S ribosomi sastoje se od 50S i 30S podjedinica.



Slika 16. Prokariotski 70S ribosom bakterije *E. coli*; velika 50S podjedinica je obojana u crveno, a mala 30S podjedinica je obojana u plavo

Prokarioti imaju 70S ribosome, od kojih se svaki sastoji, kako je već spomenuto, od male i velike podjedinice. Primjerice, *E. coli* ima 16S RNA podjedinicu koja se sastoji od 1540 nukleotida, te je povezana s 21 proteinom. Velika podjedinica sastoji se od 5S RNA podjedinice koja sadrži 120 nukleotida, te 23S RNA podjedinice koja sadrži 2900 nukleotida i 31 proteina.⁶¹

Afinitetno obilježavanje za tRNA veze na *E. coli* ribosomu omogućilo je identifikaciju A i P proteinskih mjesta vjerojatno povezanih s aktivnošću peptidil transferaze, kako su pokazali Collatz i Czernilofsky.^{62,63} Dodatna istraživanja pokazala su da su proteini S1 i S21, u suradnji s 3'-krajem 16S ribosomske RNA, uključeni u početak procesa translacije.

Eukariotski ribosomi

Eukariotski ribosomi imaju promjer između 250 i 300 Å s omjerom rRNA i proteina koji je sličan onome prokariotskih ribosoma. Eukarioti imaju 80S ribosome smještene u citoplazmi, od kojih svaki sastoji se od male 40S i velike 60S podjedinice. Njihova 40S podjedinica sadrži

18S RNA i sastoji se od 1900 nukleotida i 33 proteina. Velika podjedinica sadrži 5S RNA koji se sastoji od 120 nukleotida, 28S RNA koji se sastoji od 4700 nukleotida, te 5,8S RNA koji se sastoji od 160 nukleotida i 49 proteina.⁶⁴

Tijekom 1977. godine, Czernilofsky je objavio istraživanje koje je koristilo afinitetno označavanje kako bi identificiralo tRNA-vezna mjesta na ribosomima jetre štakora. Neki proteini, uključujući L32/33, L36, L21, L23, L28/29 i L13, implicirani su kao oni na centru ili blizu centra peptidil transferaze.⁶⁵

Arhealni ribosomi

Arhealni ribosomi dijele iste opće dimenzije kao bakterijski, sastavljeni su od 70S ribosoma od kojih je svaki sastavljen od 50S velike podjedinice, 30S male podjedinice i tri rRNA lanca. Međutim, na sekvencijskoj razini, arhealni ribosomi puno su bliži eukariotskima nego bakterijskima. Svaki dodatni ribosomski protein koji arheje imaju u usporedbi s bakterijama ima eukariotski pandan, dok takav odnos ne vrijedi između arheja i bakterija.⁶⁶

Plastoribosomi i mitoribosomi

U eukariota, ribosomi su prisutni u mitohondrijima, ponekad nazivani i mitoribosomi i u plastidima poput kloroplasta, također nazivani i plastoribosomi. Također se sastoje od velikih i malih podjedinica povezanih s proteinima u jednu 70S česticu. Ti ribosomi slični su bakterijskim, a ovi se organeli smatraju da su nastali kao simbiotske bakterije.⁶¹ Od te dvije vrste ribosoma, ribosomi kloroplasta sličniji su bakterijskima nego mitohondrijskima. Mnogi komadi rRNA u mitohondrijima su skraćeni, a u slučaju 5S rRNA i zamijenjeni su drugim strukturama kod životinja i gljiva. Nasuprot tome, biljni mitoribosomi imaju produženi rRNA i dodatne proteine u usporedbi s bakterijama, posebice mnoge PPR proteine.⁶⁷

Alge kriptomonada i klorarhinofiti mogu sadržavati nukleomorfu koja podsjeća na eukariotsku jezgru. Eukariotski 80S ribosomi mogu biti prisutni u odjeljku koji sadrži nukleomorfu.⁶⁸

Korištenje razlika

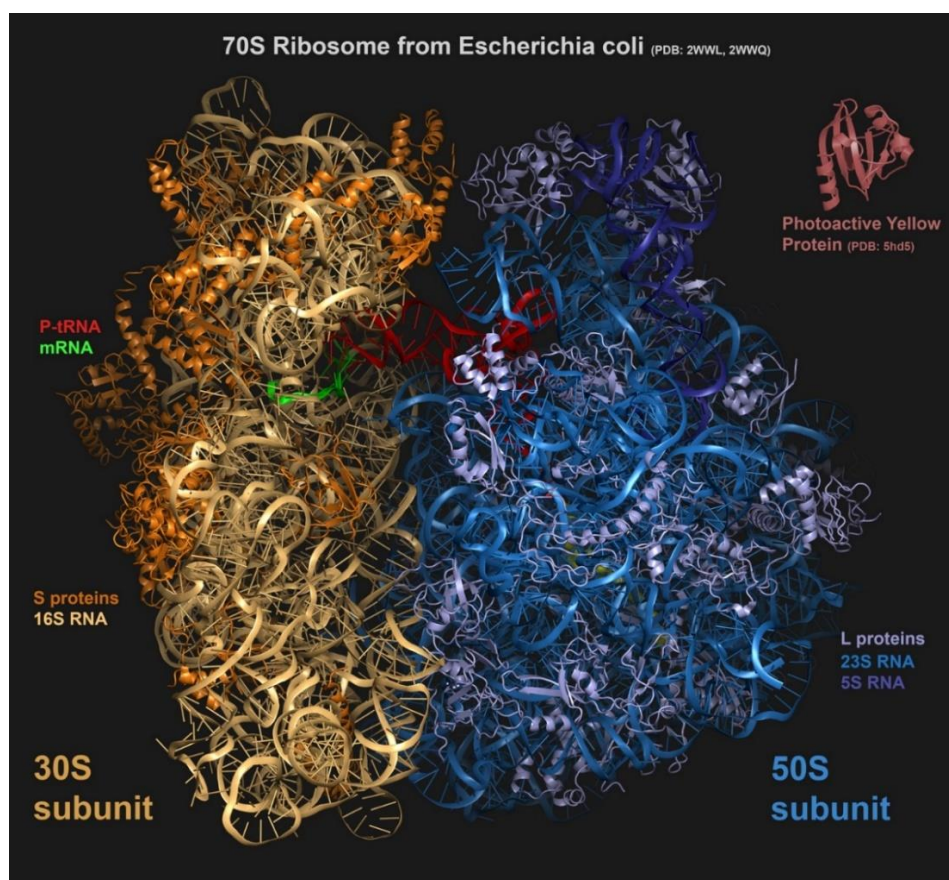
Razlike između bakterijskih i eukariotskih ribosoma koriste medicinski kemičari za stvaranje antibiotika koji mogu uništiti bakterijsku infekciju bez oštećenja stanica zaražene osobe. Činjenica da su bakterijski 70S ribosomi ranjivi na antibiotike dok eukariotski 80S ribosomi nisu, olakšava taj posao.⁶⁹ Iako mitohondriji posjeduju ribosome slične bakterijama, mitohondriji nisu pogođeni ovim antibioticima jer su okruženi dvostrukom membranom koja ne propušta lako te antibiotike u organelu. Značajna iznimka je antineoplastički antibiotik kloramfenikol, koji inhibira bakterijske 50S i eukariotske mitohondrijske 50S ribosome.⁷⁰ Međutim, ribosomi u kloroplastima su drugačiji, otpornost na antibiotike u ribosomskim proteinima kloroplasta svojstvo je koje se može uvesti kao oznaka koristeći genski inženjering.⁷¹

Zajednička svojstva

Različiti ribosomi dijele osnovnu strukturu, koja je prilično slična unatoč velikim razlikama u veličini. Većina RNA visoko je organizirana u različite tercijarne strukturne motive, na primjer pseudouzorci koji pokazuju koaksijalnu složenost. Dodatna RNA u većim ribosomima nalazi se u nekoliko dugih kontinuiranih umetaka,⁷² tako da formiraju petlje izvan osnovne strukture bez njezina narušavanja ili mijenjanja. Sva katalitička aktivnost ribosoma provodi se putem RNA dok se proteini nalaze na površini i čini se da stabiliziraju strukturu.⁶¹

Struktura visoke rezolucije

Opća molekularna struktura ribosoma poznata je od ranih 1970-ih. Početkom 2000-ih postignuta je struktura visoke rezolucije, reda veličine nekoliko angstroma.



Slika 17. Struktura prokariotskog 70S ribosoma bakterije *E. coli*; označeni su svi bitni dijelovi strukture

Prvi radovi koji su dali strukturu ribosoma na atomskoj razini objavljeni su gotovo istovremeno krajem 2000. godine. Velika prokariotska 50S podjedinica određena je iz arheje *Haloarcula marismortui*⁷³ i bakterije *Deinococcus radiodurans*,⁷⁴ a struktura male 30S podjedinice određena je iz *Thermus thermophilus*.⁷⁵ U svibnju 2001. godine ove su koordinate korištene za rekonstrukciju cijele čestice *T. thermophilus* 70S s rezolucijom od 5,5 Å. Ova strukturalna istraživanja nagrađena su Nobelovom nagradom za kemiju 2009. godine.⁷⁶

Dva rada objavljena su u studenom 2005. godine sa strukturama 70S ribosoma *Escherichia coli*. Strukture praznog ribosoma određene su s rezolucijom od 3,5 Å korištenjem rendgenske kristalografije.⁷⁷ Zatim, dva tjedna kasnije, objavljena je struktura temeljena na krio-elektronskoj mikroskopiji (eng. *cryo-Electronic Microscopy*; cryo-EM ili krio-EM), koja prikazuje ribosom s rezolucijom od 11-15 Å u trenutku kada novo sintetiziranim proteinskim lancem prolazi kroz proteinski kanal.⁷⁸

Prve atomske strukture ribosoma kompleksirane s tRNA i mRNA molekulama riješene su korištenjem rendgenske kristalografije od strane dviju neovisnih grupa, s rezolucijom od 2,8 Å⁷⁹ i 3,7 Å.⁸⁰ Ove strukture omogućavaju uvid u detalje interakcija ribosoma s mRNA i s tRNA vezanim na klasična ribosomska mjesta. Interakcije ribosoma s dugim mRNA koji sadrže Shine-Dalgarno sekvence vizualizirane su ubrzo nakon toga s rezolucijom od 4,5-5,5 Å.⁸¹

Godine 2011. prva potpuna atomska struktura eukariotskog 80S ribosoma iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* određena je kristalografskim metodama.⁸² Model otkriva arhitekturu eukariotskih specifičnih elemenata i njihovu interakciju s univerzalno konzerviranom jezgrom. Istodobno je objavljen i potpuni model strukture eukariotskog 40S ribosoma u *Tetrahymena thermophila* i opisana je struktura 40S podjedinice, kao i mnogo toga o interakciji 40S podjedinice s faktorom inicijacije translacije eIF1 (eng. *Eucaryotic Translation initiation Factor 1*) tijekom inicijacije translacije.⁸³ Slično tome, struktura eukariotske 60S podjedinice također je određena iz *Tetrahymena thermophila* u kompleksu s faktorom eIF6 (eng. *Eucaryotic Translation initiation Factor 6*).⁸⁴

Funkcija ribosoma

Ribosomi su sitne čestice sastavljene od RNA-e i povezanih proteina koji služe za sintezu proteina. Proteini su potrebni za mnoge stanične funkcije, poput popravljanja oštećenja ili usmjeravanja kemijskih procesa. Njihova glavna funkcija je pretvoriti genetski kod u niz aminokiselina i izgraditi polimere proteina od monomera aminokiselina.⁸⁵

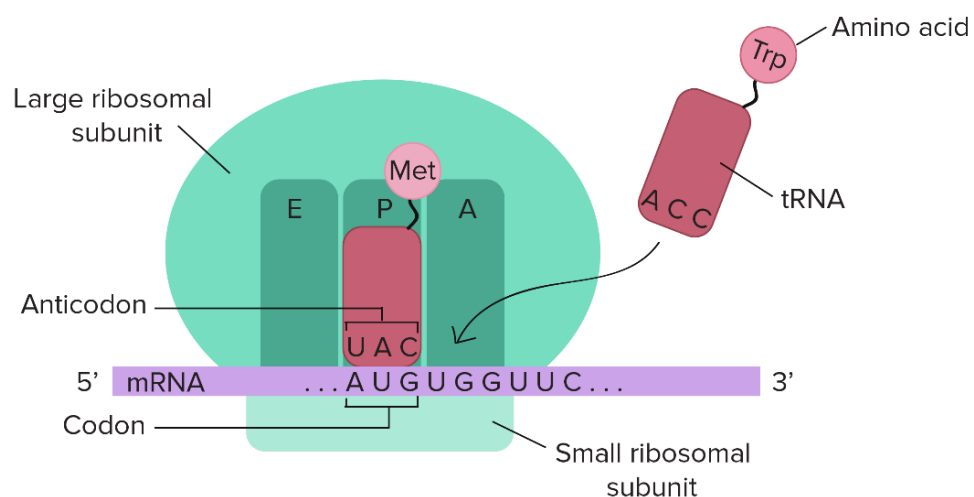
Ribosomi djeluju kao katalizatori u dva izuzetno važna biološka procesa nazvane peptidil transfer i peptidil hidroliza. Peptidil transferazni centar (eng. *Peptidyl Transferase Centre*; PTC) je odgovoran za stvaranje proteinskih veza tijekom elongacije proteina. Ribosomi imaju dvije glavne funkcije: dekodiranje poruke i formiranje peptidnih veza. Te dvije funkcije nalaze se u ribosomskim podjedinicama. Mala podjedinica ima dekodirajuću funkciju, dok velika podjedinica katalizira formiranje peptidnih veza, nazvanu peptidil-transferazna aktivnost.⁸⁶

Translacija

Glasnička RNA sadrži niz kodona koji se dekodiraju od strane ribosoma kako bi se napravio protein. Koristeći mRNA kao predložak, ribosom prelazi preko svakog kodona koji se sastoji od tri nukleotida, sparujući ga s odgovarajućom aminokiselinom nastaje aminoacil-tRNA. Aminoacil-tRNA sadrži komplementarni antikodon na jednom kraju i odgovarajuću aminokiselinu na drugom kraju. Radi brzog i točnog prepoznavanja odgovarajućeg tRNA, ribosom koristi velike konformacijske promjene odnosno konformacijsko prepoznavanje.⁸⁷ Mala ribosomska podjedinica, obično vezana za aminoacil-tRNA koji sadrži prvu

aminokiselinu metionin, veže se na AUG kodon mRNA i regrutira veliku ribosomsku podjedinicu. Ribosom sadrži tri RNA vezna mjesta, označena kao A, P i E. A vezno mjesto veže aminoacil-tRNA ili faktore signaliziranja terminacije; P vezno mjesto veže peptidil-tRNA, tRNA vezan na polipeptidni lanac, dok E vezno mjesto veže slobodni tRNA.⁸⁸ Sinteza proteina započinje kodonom AUG blizu 5' kraja mRNA. Zatim se mRNA se prvo veže na P mjesto ribosoma. Ribosom prepoznaje startni kodon koristeći Shine-Dalgarno sekvencu mRNA u prokariotima i Kozakovu kutiju u eukariotima. Ribosom koristi tRNA koji odgovara trenutnom kodonu na mRNA-u kako bi dodao aminokiselinu na polipeptidni lanac. To se radi za svaki kodon na mRNA-u, dok ribosom ide prema 3' kraju mRNA. Obično u bakterijskim stanicama, nekoliko ribosoma radi paralelno na jednoj mRNA, tvoreći ono što se naziva poliribosom ili polizom.

Iako kataliza peptidne veze uključuje C2 hidroksilnu skupinu adenzina na P mjestu RNA u mehanizmu protonskog prijenosa, drugi koraci u sintezi proteina, kao što je translacija, uzrokovani su promjenama u konformaciji proteina. Budući da je njihova katalitička jezgra napravljena od RNA, ribosomi se klasificiraju kao ribozimi, i smatra se da bi mogli biti ostaci RNA svijeta.⁸⁹



Slika 18. Shematski prikaz procesa translacije

Kotranslacijsko preklapanje

Ribosom je poznat po aktivnom sudjelovanju u presavijanju proteina.⁹⁰ Strukture dobivene na ovaj način obično su identične onima dobivenim tijekom kemijskog presavijanja proteina; međutim, putanje koje vode do konačnog proizvoda mogu biti različite. U nekim slučajevima, ribosom je ključan za dobivanje funkcionalnog oblika proteina. Na primjer, jedan od mogućih mehanizama presavijanja duboko zakrivljenih proteina oslanja se na ribosom koji gura lanac kroz pričvršćenu petlju.⁹¹

Dodavanje aminokiselina ovisnih o translaciji

Prisutnost proteina za kontrolu kvalitete ribosoma (eng. *Ribosome-associated Protein Quality Control*; Rqc2) povezana je s mRNA-neovisnom elongacijom proteina.⁹² Ova

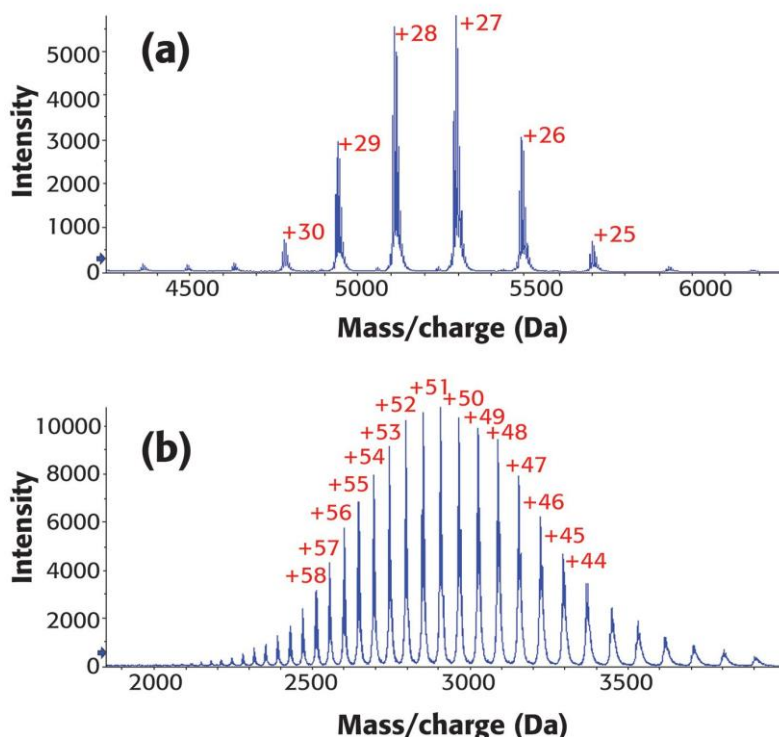
elongacija rezultat je ribosomskog dodavanja CAT repova pomoću tRNA donesenih od strane Rqc2. Ribosomi produžuju C-terminalni dio zastoja proteina s nasumičnim, translaciji neovisnim sekvencama alanina i treonina.⁹³

Primjena spektrometrije masa u istraživanju lijekova

Neprekidan razvoj spektrometrije masa rezultirao je širokom dostupnošću i usvajanjem spektrometrije masa visoke rezolucije (eng. *High Resolution Mass Spectrometry*; HRMS) u laboratorijima diljem svijeta. Mogućnosti i povezane prednosti HRMS-a čine ga neprocjenjivim analitičkim alatom za karakterizaciju, *screening* i kvantifikaciju analita u širokom spektru primjena u razvoju farmaceutskih proizvoda. Te primjene uključuju otkrivanje lijekova, karakterizaciju proizvoda kako malih molekula tako i novih modaliteta lijekova, studije metabolizma *in vitro* i *in vivo*, kontrolu kvalitete nakon odobrenja i farmakovigilanciju. Géhin i Holman su prije nekoliko godina napravili zanimljiv presjek trenutnih mogućnosti HRMS-a i njegove primjene u farmaceutskoj industriji.⁹⁴

Analiza proteina i peptida

Karakterizacija proteina nekada je bila dominirana klasičnim tehnikama, poput optičke spektroskopije, raspršenja svjetlosti, ultracentrifuge, kalorimetrije, SDS-PAGE elektroforeze i kromatografije isključivanja po veličini, zbog ograničenja koja su nametnule analitički velike molekule, a koji su pružale malo strukturnih informacija.⁹⁵



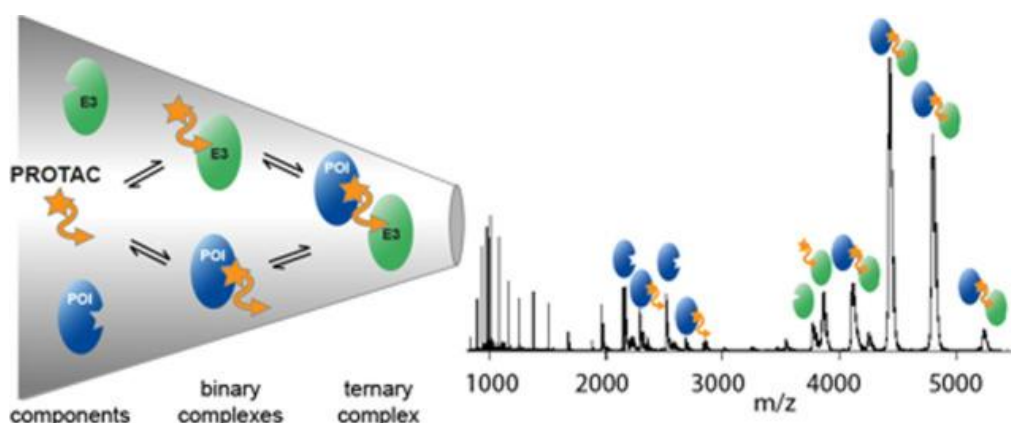
Slika 19. Primjer izgleda masenih spektara nativnog (a) i denaturiranog (b) proteina

Primjena MS-a za karakterizaciju proteina označila je masovnu analizu mnogih proteina u jednoj disciplini, nazvanoj *proteomika*. U početku, korišteni su spektrometri masa niske rezolucije, ali razvoj HRMS-a omogućio je nove uvide u karakterizaciju, određivanje sekvenci

peptida, posttranslacijske modifikacije i strukturu višeg reda, posebno kroz upotrebu native spektrometrije masa. Nativna MS je poseban pristup analizi gdje se biološki analiti raspršuju iz nenedenaturirajućeg otapala kako bi se sačuvale nekovalentne interakcije u plinskoj fazi za analizu, tj. proteinske strukture ostaju u svojim tercijskim i kvaternim stanjima.⁹⁶ Nativna MS se obično izvodi pomoću nano-ESI-a zbog niske potrošnje uzorka, ujednačenijih faktora odziva i veće tolerancije na soli i pufere. Ove analize pružaju uvid i u stehiometriju podjedinica, vezane ligande, topologiju proteinskih kompleksa, dinamiku proteina i afinitete vezanja. Termin nativna MS (eng. *native MS*) je prvi put upotrijebljen 2004. godine, a njegova se primjena koristi i za opis analize proteinskih kompleksa, DNA-proteinskih i RNA-proteinskih kompleksa s ciljem definiranja odnosa strukture i funkcije. Ove informacije su važne za razumijevanje proteinskih interakcija, strukturne biologije, dizajniranje lijekova i dijagnostiku bolesti.⁹⁷

Analiza malih molekula

Protein degradatori, poznati kao proteolitički usmjerene kimere (eng. *Proteolysis Targeting Chimeras*; PROTACs), su inhibitori koji blokiraju aktivnosti unutarstaničnih ciljnih proteina i ometaju signalne puteve. Ove su se molekule moda pojavile kao novi modalitet koja je doživjela ograničeni rast zbog složenosti PROTAC-posredovanih proteinskih interakcija koje uključuju binarne i tercijske interakcije između komponenata.⁹⁸ Beveridge i suradnici su koristili nativni MS kako bi učinkovito proučavali komplekse proteina posredovane PROTAC-ima na način koji ne zahtijeva označavanje. Upotreba nativnog MS-a pokazala se sposobnom za karakterizaciju kompleksa PROTAC-proteina, polukvantifikaciju njihovih ravnoteža, uvid u specifičnosti PROTAC-a za substratne proteine i kooperativnost PROTAC-a te za provođenje konkurentnih eksperimenata. Njihov rad ističe potencijal native MS za visokoprotokne metode u razvoju PROTAC-a.⁹⁹



Slika 20. Princip analize i izgled masenih spektara različitih kompleksa PROTAC-a i proteina u nativnom MS-u

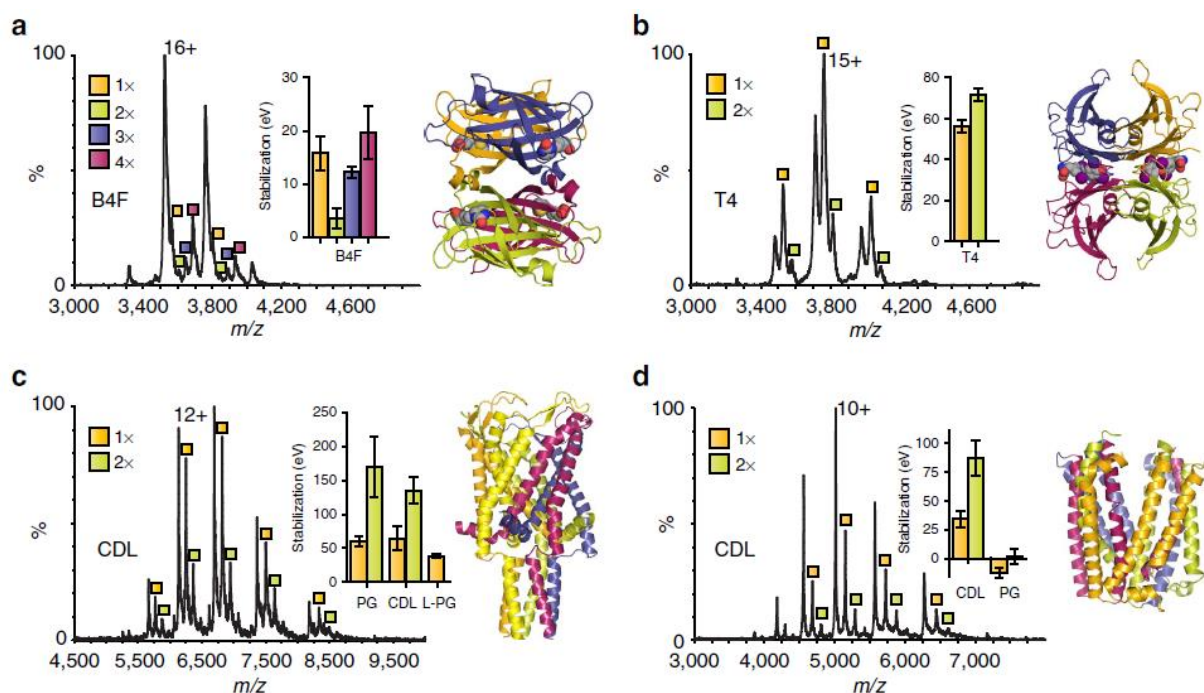
Još jedan primjer male molekule je Monometil auristatin E (MMAE) je antimitotički agens koji pokazuje snažnu aktivnost u kliničkim studijama protiv različitih limfoma, leukemija i čvrstih tumora S obzirom da je toksičan, formulira se u konjugat sa antitijelom koje služi kao sredstvo za ciljanu isporuku aktivne tvari. Lee i suradnici razvili su LC-MS metodu visoke

rezolucije za kvantifikaciju MMAE-a i njegovu predkliničkom farmakokinetiku kako bi proučili njegove profile kratkoročne i dugoročne stabilnosti i procijenili rezultate farmakokinetičke studije na štakorima kao predkliničkom životinjskom modelu. HRMS pristup za ovu studiju pomogao je u stvaranju sveobuhvatnog razumijevanja farmakokinetičkih karakteristika ovog specifičnog konjugata lijeka i antitijela i mogao bi se općenito primijeniti u razvoju drugih takvih gotovih proizvoda.¹⁰⁰

Osim navedenih analita i metoda, dvije su vrlo bitne vrste studija koje mogu olakšati put razvoja lijeka na način da razjasne interakcije koje lijekovi stvaraju prilikom svog metabolizma ili kako moderiraju metabolizam. Radi se o proučavanju protein-ligand i protein-protein interakcija. Obje vrste interakcija se prilično uspješno mogu proučavati na razne načine primjenom spektrometrije masa.

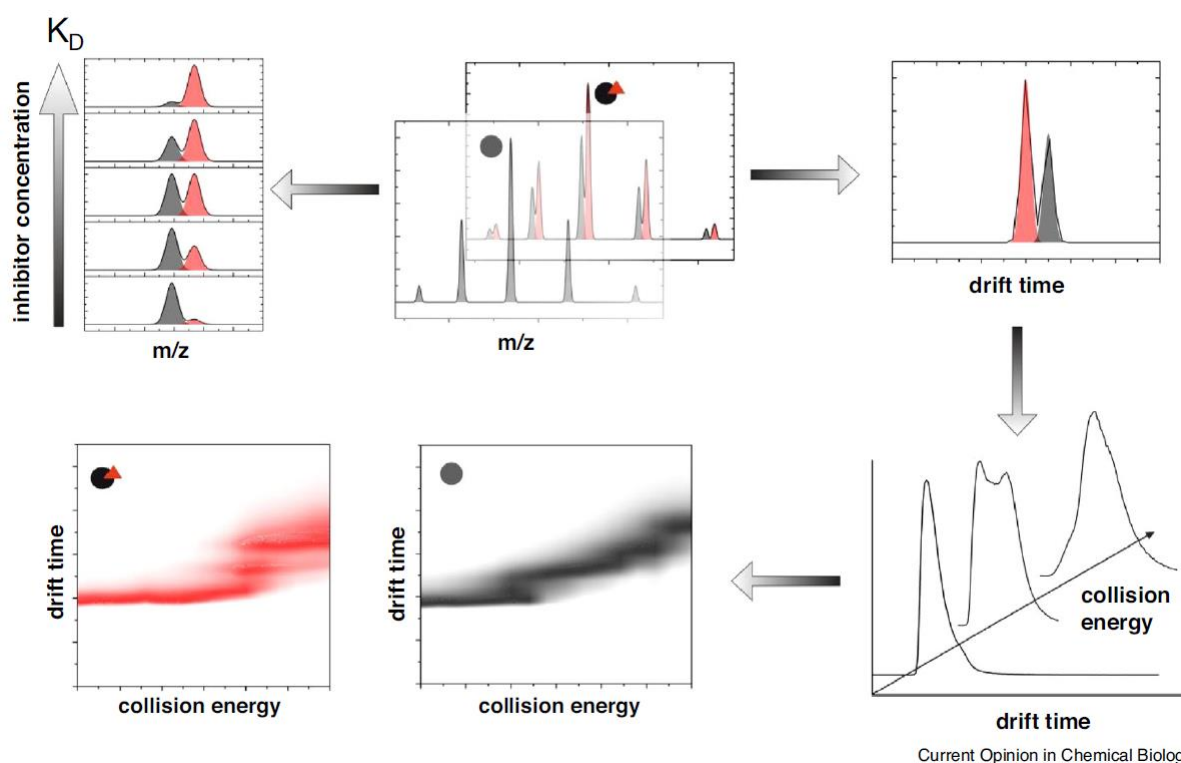
Analiza protein-ligand interakcija (PLI)

Interakcije proteina i liganda (eng. *Protein-Ligand Interactions*; PLI) su nužni preduvjet za prijenos signala, imunoreakciju i regulaciju gena. Studije interakcije proteina-liganda su važne za razumijevanje mehanizama biološke regulacije te pružaju teorijsku osnovu za dizajn i otkrivanje novih lijekova. Također, razumijevanje nastajanja interakcija proteina i liganda u aktivnom mjestu nam daje uvid u metabolizam lijeka.



Slika 21. Stabilizacije toplivih i membranskih proteina pomoću molekula liganda u plinskoj fazi. Za svaki sustav prikazan je tipičan maseni spektar, s deriviranom stabilizacijom proteina pomoću liganda i reprezentativnom kristalnom strukturom proteina. (a) Streptavidin s B4F; (b) transtiretin s L-tiroksinom (T4); (c) *S. aureus* MscL s lipidima L- α -PG, CDL i lizil-PG; (d) Protein za izbacivanje toksičnih spojeva i lijekova iz *P. furiosus* s CDL-om i PG¹⁰¹

Učinci interakcija proteina-liganda na stabilnost proteina obično se prate putem niza standardnih testova u otopini, iako se malo testova može provesti na membranskim proteinima. Timothy Allison i suradnici su razvili smo pristup koji koristi IMS-MS koji razlikuje vezanje liganda na topive i membranske proteine izravno putem promjena u masi i ionskoj pokretljivosti, te procjenjuje učinke tih interakcija na stabilnost proteina mjerenjem otpornosti na razvijanje.¹⁰¹ Razmatanje proteina potiče se kroz kolizijsku aktivaciju, što uzrokuje promjene u strukturi proteina i posljedično ionsku pokretljivost u plinskoj fazi. To omogućuje detaljnu karakterizaciju učinaka vezanja liganda na protein s dosad neviđenom osjetljivošću. Opisana je metoda i softver potreban za izvlačenje parametara iz podataka o ionskoj pokretljivosti koji omogućuju kvantitativnu analizu pojedinačnih vezanih događaja. Ova metodologija obećava za istraživanje biološki značajnih interakcija između membranskih proteina i kako lijekova tako i lipida koje nije moguće karakterizirati na druge načine.

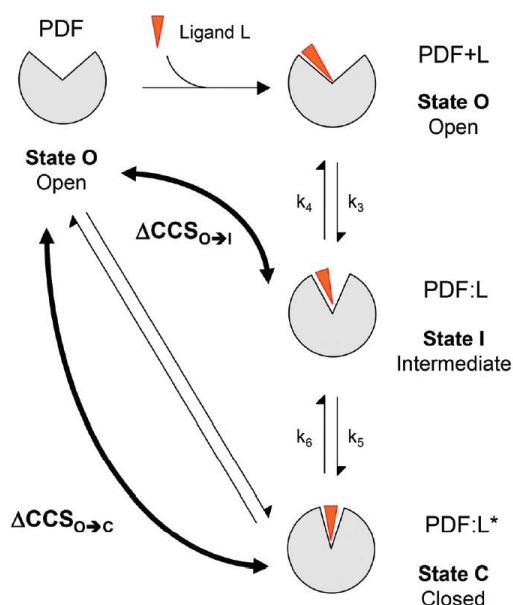


Slika 22. Nativna IMS može pružiti informacije o utjecaju vezanja liganda na konformaciju i stabilnost proteina. Određivanje distribucije vremena dolaska (eng. *Arrival Time Distribution*; ATD) pri različitim energijama sudara rezultira karakterističnim CIU i omogućuje dobivanje informacija o snazi vezanja liganda te konformacijskoj stabilnosti vezanog ili nevezanog proteina. Akvizicija masenih spektara pri različitim koncentracijama malih molekula ili liganda može se koristiti za određivanje jačine interakcije putem izračuna disocijacijske konstante K_D .¹⁰²

Određivanje endogenih i egzogenih spojeva u takvim uzorcima važno je za razumijevanje zdravstvenog statusa osobe. Iz tog razloga, razvoj novih pristupa koji mogu biti komplementarni već standardnim pristupima, uglavnom baziranim na tekućinskoj kromatografiji povezanoj sa spektrometrijom masa, je dobrodošao. U tom smislu, spektrometrija pokretljivosti iona pojavila se na analitičkoj sceni kao moćna tehnika za

razdvajanje i karakterizaciju spojeva na temelju njihove pokretljivosti. IMS je korišten u nekoliko područja iskorištavajući njegovu ortogonalnost s drugim analitičkim tehnikama razdvajanja, poput tekućinske kromatografije, plinske kromatografije, kapilarne elektroforeze ili kromatografije sa superkritičnim fluidom. Bioanalitika nije jedno od područja na kojima je IMS bio najviše primijenjen. Međutim, tijekom posljednjih godina, interes za korištenje ovog pristupa za analizu bioloških uzoraka očito je porastao. Garcia i suradnici demonstriraju to principima koji kontroliraju razdvajanje u IMS-u i pregledava nedavne primjene ove tehnike u području bioanalitike.¹⁰³

Ovi primjeri pokazuju da je spektrometrija masa pokretljivosti iona (IMS-MS) važan analitički alat za strukturnu evaluaciju proteina te poboljšava mnoga područja biofizičke analize. Evers i suradnici su proučavali proteine povezane s raznim bolestima, uključujući enzime poput protein kinaza, transkripcijske faktore poput p53, i intrinzično neuređene proteine, uključujući one sklone agregaciji, pomoću IMS-MS tehnike.¹⁰² Pokazali su kako se ova moćna tehnika može koristiti za razumijevanje dinamike konformacija proteina i putova agregacije, te posebno o utjecaju malih molekula, uključujući klinički relevantne lijekove, na te procese. Također, pokazani su primjeri kako se IMS-MS može koristiti kao relativno brza strategija *screeninga* za evaluaciju mehanizama i konformacijskih aspekata interakcija proteina s ligandima. Demonstrirano je da IMS-MS može pružiti informacije o učinku vezanja liganda na konformaciju i stabilnost proteina, te da se može koristiti za razlučivanje mogućih konformacijskih promjena. Dobivanje različitog *drift* vremena pri različitim energijama sudara rezultat je karakteristične promjene konformacije i omogućuje dobivanje informacija o jačini vezanja liganda kao i konformacijskoj stabilnosti vezanog i nevezanog proteina. Snimanje masenih spektara pri različitim koncentracijama malih molekula ili liganda može se koristiti za određivanje jačine interakcije izračunavanjem disocijacijske konstante, K_D .



Slika 23. Shematski prikaz mehanizma vezanja PDF1B. U apoPDF1B, aktivno mjesto je uglavnom u otvorenoj konformaciji (Stanje O). Nakon vezanja liganda, aktivno mjesto se zatvara djelomično (Stanje I) ili potpuno (stanje C). Svaka konforamcija ima svoj CCS i može se razlikovati koristeći IMS analizator.¹⁰⁴

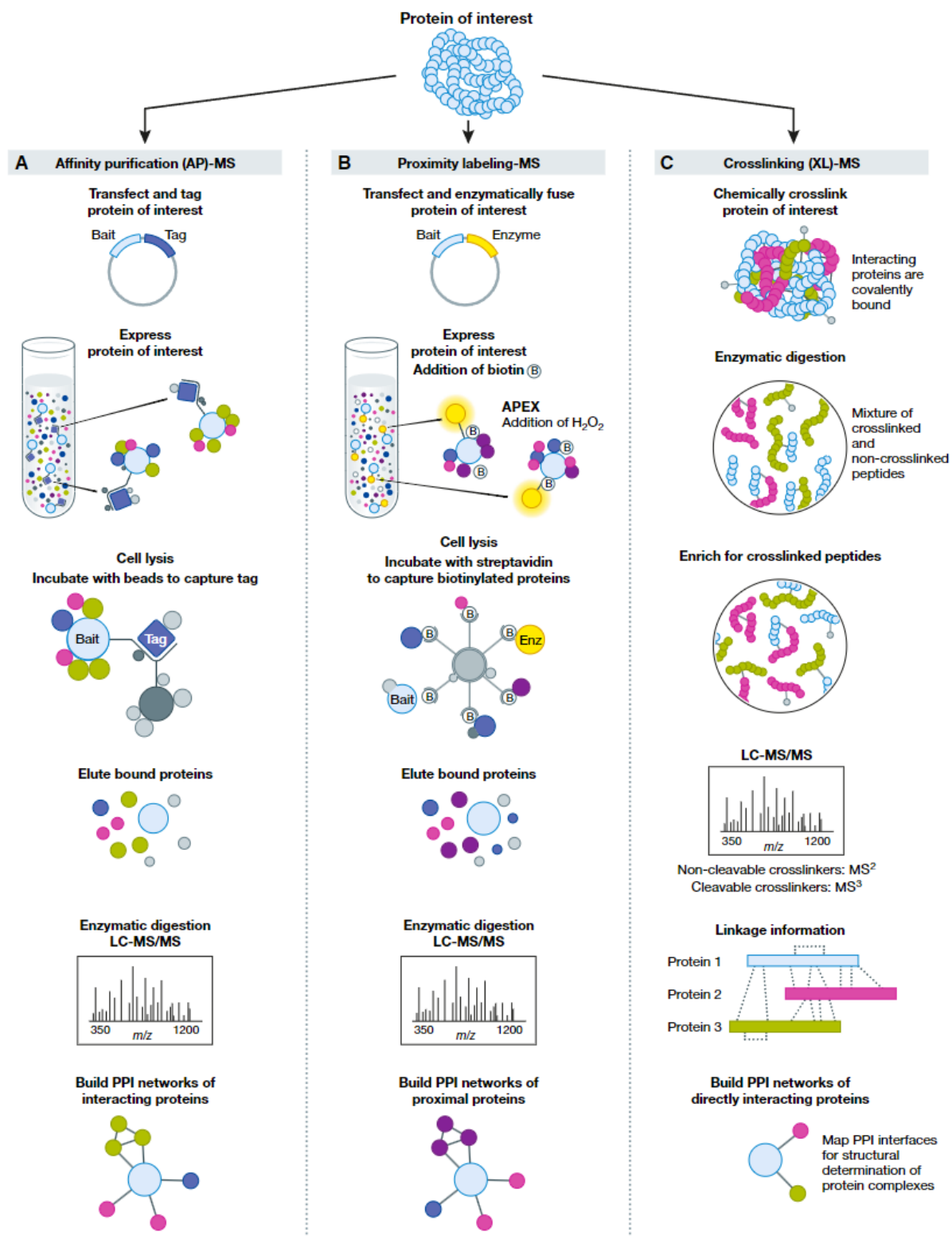
Vidimo da IMS-MS ima sve više primjene u karakterizaciji i identifikaciji lijekova i metabolita lijekova, uglavnom zahvaljujući komplementarnom razdvajanju iona analita na temelju njihove veličine i oblika u plinskoj fazi, a ne samo na temelju omjera njihove mase i naboja. Ross i Xu su u svom radu predstavili različite vrste IMS tehnika, usredotočujući se na one koje omogućavaju mjerenje CCS-a, fizičkog svojstvo iona koje odražava njegovu veličinu i oblik u plinskoj fazi.¹⁰⁵ Osim toga, bave se i ulogom IMS-a u velikom kemijskom prostoru lijekova i multimodalnim distribucijama određenih lijekova prilikom IMS razdvajanju zbog prisutnosti protomera. Također, prikazuju se metaboličke reakcije lijekova i primjena IMS-a u razdvajanju i identifikaciji izomernih metabolita lijekova, te o različitim pristupima generiranju teoretskih i predviđenih podataka CCS, uključujući metode izračuna na temelju teorije i modele predikcije temeljene na podacima, te trenutno dostupne resurse o tim pristupima. Konačno, trenutna ograničenja i budućim smjerovima primjene IMS-a.

Stojko i suradnici su se bavili analizom protein-ligand kompleksa kada su uključene vrlo suptilne konformacijske promjene pomoću IMS-a.¹⁰⁴ Kao dokaz koncepta, istraživali su interakcije između peptidne deformilaze (eng. *Peptide Deformylase 1B*; PDF1B), potencijalnog cilja za razvoj novih antibiotika, i tri specifična inhibitora koji se vezuju na različite načine. Prvo, klasična spektrometrija masa otkriva dvije vrste liganda, oba u 1:1 stehiometriji s PDF1B, ali s različitim afinitetima i stabilnostima u plinskoj fazi. Zatim, konformacijski probir IMS-om ističe dvije vrlo bliske, ali značajno različite konformacije inducirane ligandima, s presjecima kolizije koji se razlikuju za manje od 1%. Realno-vremenski IMS koristi se ne samo za praćenje dinamike vezanja liganda za PDF1B, već i za prebacivanje između holokonformacija. Ovo istraživanje pruža dodatne dokaze da najpotentniji ligandi inhibiraju peptidne deformilaze putem mehanizma sporo-tvrđog vezanja, u skladu s prethodnim strukturnim i enzimološkim studijama. Osim toga, ovaj pristup, u kojem se karakteristike dobivene pomoću realne MS kombiniraju s IMS konformacijskim probirima, pokazuje se vrijednim u karakterizaciji izuzetno suptilnih dinamičkih konformacijskih promjena koje nastaju kada ligandi vežu proteinske komplekse. Prikazani su i potencijali kao i ograničenjima IMS-a u kontekstu detekcije vrlo malih konformacijskih promjena induciranih vezanjem liganda.

Analiza protein-protein interakcija (PPI)

Interakcije proteina (engl. *Protein-Protein Interactions*; PPI) su fizički kontakti visoke specifičnosti koji se uspostavljaju između dvije ili više proteinskih molekula kao rezultat biokemijskih događaja potaknutih interakcijama koje uključuju elektrostatičke sile, vodikove veze i hidrofobni učinak. Mnoge su fizičke veze s molekularnim asocijacijama između lanaca koji se pojavljuju u staničnom ili živom organizmu u specifičnom biomolekularnom kontekstu. Proteini rijetko djeluju sami, jer su njihove funkcije obično regulirane. Mnogi molekularni procesi unutar stanice provode se pomoću molekularnih sustava koji su sastavljeni od brojnih proteinskih komponenti organiziranih njihovim PPI-ima. Ove fiziološke interakcije čine takozvanu interaktomiku organizma, dok su nenormalne PPI-je osnova za bolesti povezane s agregacijom proteina, poput Creutzfeldt-Jakobove i Alzheimerove bolesti.

Postoji mnogo metoda za otkrivanje PPI. Svaki od pristupa ima svoje prednosti i nedostatke, posebno u pogledu osjetljivosti i specifičnosti metode.¹⁰⁶ Najkonvencionalnije i široko korištene metode visokog protoka su metoda dvostrukog kvašćevog hibrida (eng. *Yeast two-hybrid*, Y2H) i vezna pročišćenja povezana sa spektrometrijom masa.



Slika 24. Pregled MS-baziranih metoda za određivanje proteinskih interakcijskih mreža i načina rada¹⁰⁷

Bolje razumijevanje molekularnih mehanizama koji leže u osnovi bilo koje bolesti ključno je za ubrzanje razvoja novih terapijskih intervencija. Mehanizmi bolesti često su posredovani interakcijama između proteina. Uvidi u fizičko preusmjeravanje protein-protein interakcija kao odgovor na mutacije, patološke uvjete ili infekciju patogenima mogu unaprijediti naše razumijevanje etiologije, progresije i patogeneze bolesti, te dovesti do identifikacije potencijalnih bioloških meta za lijekove. Napredak u kvalitativnim i kvantitativnim pristupima na temelju spektrometrije masa omogućio je nepristrano mapiranje ovih bolestima posredovanih promjena u protein-protein interakcijama na globalnoj razini. Richards i suradnici su prikazali razne MS tehnike koje su bile ključne za identifikaciju protein-protein interakcija na sistemskoj razini, te raspravljamo o izazovima povezanim s tim metodologijama, kao i o novim napredcima u području MS-a koji imaju za cilj rješavanje tih izazova. Pregled primjera iz različitih konteksta bolesti ilustrira potencijal MS-om temeljenih pristupa mapiranju PPI za otkrivanje mehanizama bolesti, lociranje novih bioloških meta, i naposljetku prelazak prema personaliziranim primjenama. Richards i suradnici spominju tekućinsku kromatografiju spregnutu sa spektrometrijom masa (LC-MS) kao osjetljivu, preciznu i selektivnu metodu za kvantifikaciju proteina, a isto spominju Aebersold i Mann, 2016. godine.^{108,109} Jedna od njezinih glavnih prednosti u identifikaciji PPI je globalna i nepristrana priroda proteomike MS-om. Ovo je u suprotnosti s drugim metodama za identifikaciju PPI, uključujući Y2H, koji mapira fizičke, binarne interakcije unaprijed određenog skupa proteina od interesa. Tri su glavne metode proučavanja proteina i interakcija proteina pomoću spektrometrije masa; *Affinity purification* MS (AP-MS), *Proximity labelling* MS (PL-MS) i *Crosslinking* MS (XL-MS). Svaka tehnika za sebe ima svoje prednosti i nedostatke, a shematski prikaz načina rada u određenoj metodi je prikazan na slici 24.

XL-MS analiza interakcija

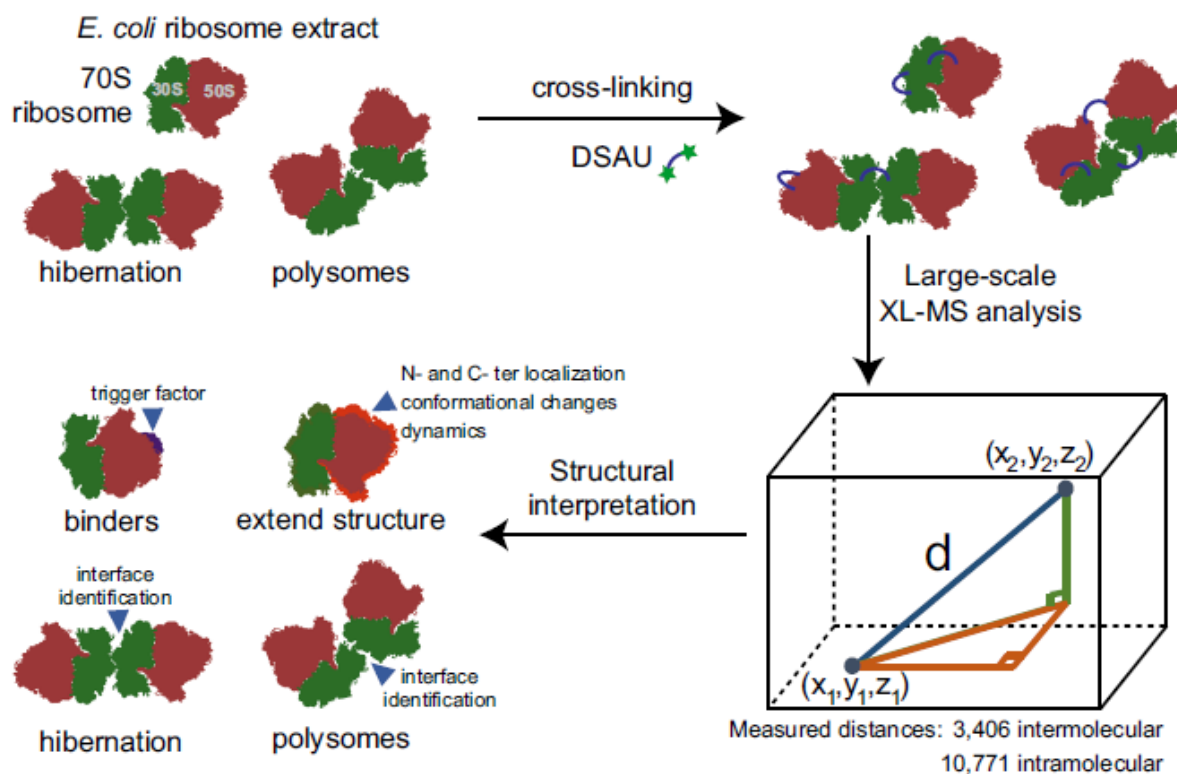
Spektrometrija masa križnih veza (XL-MS) moćan je pristup proučavanju dinamike proteina i interakcija u otopini. U posljednjih nekoliko godina istraživači su postigli značajne metodološke napretke u prikupljanju i analizi podataka, čime su XL-MS učinili privlačnijim i za laboratorije koje nisu specijalizirane za tu svrhu.¹¹⁰ U studijama XL-MS-a, križne veze, linkeri, poput disukcinimidil suberata (DSS) ili disukcinimidil sulfoksida (DSSO) dodaju se proteinu kako bi kovalentno spojili dva primarna amina u blizini definiranoj duljinom lanca reagensa odnosno linkera. Odabrani proteolitički enzim zatim se koristi za razgradnju proteina u peptide uz zadržavanje križne veze za analizu LC-MS-om. Vezani linkeri nameću definirana ograničenja udaljenosti na proteinskim skupinama, koja jednaka zbroju duljine razmaka linkera i duljine bočnih lanaca dviju povezanih ostataka.¹¹¹ Ove informacije mogu se koristiti za naknadnu strukturnu analizu i identifikaciju PPI.¹¹² Najznačajnije, XL-MS ima veliki potencijal za primjenu na razini proteoma kako bi istovremeno istraživao strukture i interakcije proteinskih kompleksa u staničnom kontekstu. Analiza proteoma pomoću XL-MS-a uglavnom se postiže upotrebom linkera koji se u MS uvjetima lako odcjepljuju.¹¹³ To proizlazi iz činjenice da takvi linkeri pojednostavljaju zahtjevniju analizu XL-MS podataka dajući ionske profile linkera. Paralelno su razvijene različite strategije prikupljanja podataka za učinkovitu

identifikaciju križnih veza, uključujući metode temeljene na MS², metode temeljene na MS³ ili kombinaciju obje. Metode temeljene na MS² preuzimaju informacije o fragmentu iona isključivo na temelju MS² fragmentacije cijelog linkera.¹¹⁴ Metode temeljene na MS³, s druge strane, pokreću dodatne MS³ skenove na linker. Kao takve, MS³ bazirani pristupi generiraju bogatije informacije o sekvencama križnih veza. Međutim, njihov spori radni ciklus kompromitira kapacitet identifikacije križnih veza iz kompleksnih uzoraka. Nedavno je uvedena metoda postupne fragmentacije visoke energije sudara (eng. *High-energy Collisional Dissociation*, HCD), promovirajući akvizicije s brzim radnim ciklusom kako bi se poboljšala brzina skeniranja, a time identifikacija križnih veza. Iako s velikim potencijalom, strategija postupnog HCD-a primijenjena je samo na jednostavnim uzorcima, poput pojedinačnih proteina ili proteinskih kompleksa^{115,116} i nije jasno kako se ta metoda ponaša u usporedbi s drugim uobičajeno korištenim MS³-baziranim metodama u velikim interaktomičkim studijama.

Tijekom proteklih desetljeća, kvantitativna proteomika dala je nezamjenjive doprinose različitim izazovima u temeljnoj biologiji i kliničkom istraživanju. Među različitim kvantitativnim pristupima, oznaka tandemskim masenim tagom (eng. *Tandem Mass Tag*; TMT) jedna je od najmoćnijih metoda jer kombinira jednostavnost, dostupnost, uspostavljene analitičke metode i sposobnost kvantifikacije do 27 uzoraka paralelno.¹¹⁷ Spajanje kvantitativnih metoda poput TMT-a s XL-MS-om potencijalno može dodati kvantitativne informacije studijama PPI-a i tako pružiti jedinstvene uvide u kvantitativnu modulaciju mreža PPI-a u određenim bolestima ili uvjetima liječenja. Do sada je samo jedna TMT-bazirana kvantitativna strategija prikupljanja XL-MS-a opisana. U ovoj metodi, kolizijski inducirana disocijacija, CID-MS² izvodi se na svakom prekursor ionu. Ako se jedinstvena masena razlika izvedena iz linkera vidi u MS², pokreću se naknadni MS³ skenovi za identifikaciju i sinkronizirani skenovi odabira prekursora, SPS-MS³ za kvantifikaciju. Ovisnost o MS³ akvizicijama za identifikaciju i kvantifikaciju rezultira izuzetno dugim radnim ciklusima, što smanjuje analitičku dubinu ovog pristupa, posebno ako je složenost uzorka visoka, a količina uzorka ograničena. Metoda je testirana samo na jednostavnim uzorcima i možda nije prikladna za velike interaktomičke studije.¹¹⁸ Ovo pokazuje da postoji hitna potreba za TMT-baziranom kvantitativnom strategijom prikupljanja XL-MS-a prilagođenom profiliranju interaktoma kompleksnih uzoraka.

Tüting i suradnici su koristili ribosom bakterije *E. coli* kao izvanredan primjer za testiranje i optimizaciju postupaka *Crosslinking MS* (XL-MS).¹¹⁹ Zahvaljujući svojoj visokoj prisutnosti, ribosomalni proteini često se identificiraju u studijama proteoma na razini cijele stanice ili ekstrakata stanica. Provedeno je temeljito križno vezivanje ribosoma *E. coli* koristeći aminoreaktivni linker disukcinimidil diacetat ureu (DSAU). Analizirane su 143 dobivene strukture ribosoma *E. coli*, mapirajući ukupno 10771 intramolekulskih udaljenosti za 126 parova križnih veza i 3405 intermolekulskih udaljenosti za 97 parova proteina. Zanimljivo je da 44% intermolekulskih križnih veza pokriva regije koje do sada nisu razjašnjene u nijednoj strukturi visoke rezolucije ribosoma *E. coli*, što ukazuje na plastičnost križno povezanih regija. Sistematski su karakterizirane sve križne veze i otkrivene su fleksibilne regije, konformacijske promjene i stehiometrijske varijacije u vezanim ribosomskim proteinima, te je preuređeno ukupno 2057 ostataka, odnosno 15794 atoma. Ovaj radni model objašnjava više od 95% svih

križnih veza, rezultirajući optimiranom strukturom ribosoma *E. coli* na temelju dobivenih podataka o križnim vezama.



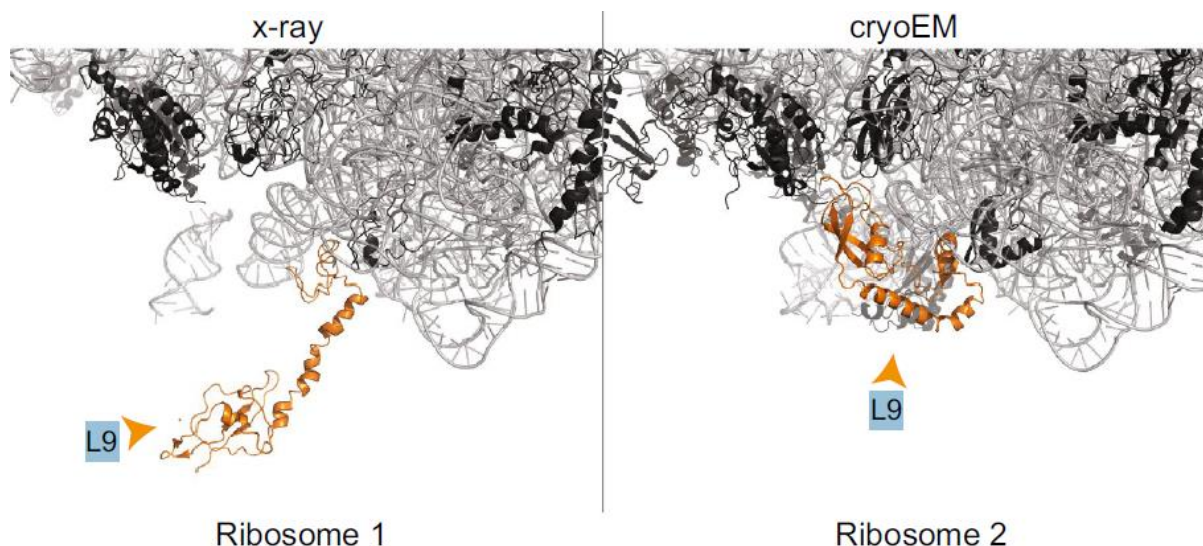
Slika 25. Korišten DSAU linker s 70S *E. coli* ribosomom kako bismo identificirali intramolekularne linkere, fleksibilne regije, stanja višeg reda te modeliranje regija koje su prethodno ostale nerazjašnjene koristeći izvedene podatke i strukturne podatke dostupne u Protein Data Bank¹¹⁹

Ovo istraživanje je pokazalo da XL-MS omogućuje uvid u strukturne informacije za sve regije ribosoma, uključujući i uređene i fleksibilne regije, što rezultira detaljnim razumijevanjem cjelokupne arhitekture ribosoma. XL-MS je sazrio iz metode proučavanja izoliranih biomolekula u proteomsku metodu za razumijevanje staničnih interakcija proteina.¹²⁰ Za postizanje tog cilja razvijeni su novi linkeri kako bi se optimiziralo otkrivanje križnih peptida s osjetljivim protokolima LC/MS/MS, a pokušano je i procijeniti stope lažnih otkrića (eng. *False Discovery Rate*; FDR) za križne veze.^{121,122} Međutim, važna provjera za proteomsku XL-MS je mapiranje križnih veza na strukturne modele. Još uvijek se razvija područje vezano uz mjeru udaljenosti koja je najprikladnija za mapiranje križnih veza, odnosno Euclidova naspram površinski izložene udaljenosti.¹²³ Također, korisnost izračuna FDR-a i njihova korelacija s pravim pozitivnim protein-protein interakcijama te odgovarajućim strukturnim modelima, kao i odabir molekularnih modela koji se koriste za mapiranje unkarinskih veza, u nekim su slučajevima suboptimalni.¹²⁴ To je zato što trenutna istraživanja imaju pristranost prema visoko-zastupljenim proteinima, ali se implementiraju metode za rješavanje tog problema. Drugi razlog je što se malo molekularnih modela pohranjenih u bazama podataka struktura procjenjuje za udaljenosti križnih veza, a za svaki proteinski kompleks odabran je samo jedan molekularni model za izračun udaljenosti, unatoč bogatstvu strukturnih podataka.¹²⁵ Ova

očita ograničenja dalje umanjuju kvalitetu dobivenih rezultata, koji bi mogli biti relevantni za strukturnu biologiju i funkciju proučavanog proteina.

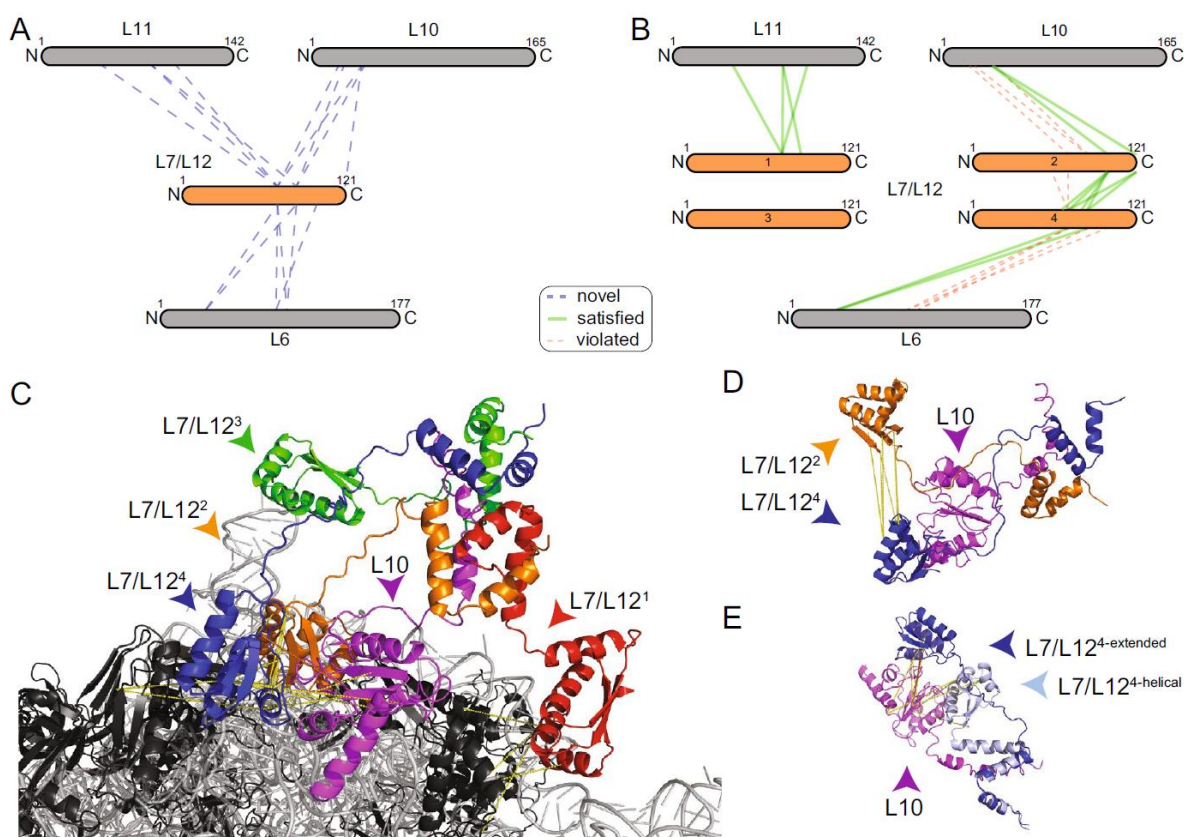
U istraživanju je korišten disukcinimidil diacetilurea (DSAU) kao amin-reaktivni, urea-bazirani linker. Posjeduje duljinu prostora od otprilike 10 Å i kraći je od široko korištenog linkera DSBU.¹²⁶ Stoga, DSAU omogućuje mjerenje različitog podskupa ograničenja udaljenosti tijekom strukturnog mapiranja i/ili naknadnog modeliranja. Križno je povezan ribosom *E. coli* s DSAU-om i pronađeno je 126 unutar i 97 međumolekulskih križnih veza uz FDR od 1%. Zatim su sve identificirane križne veze sveobuhvatno mapirane na sve odgovarajuće strukture *E. coli* ribosoma. Na temelju tih podataka, remodelirane su fleksibilne proteinske regije i otkrivena je osnovna konformacijska plastičnost, lokaliziran je ribosomom-povezan šaperon, faktor okidač, dovršene su strukture proteina dodatnim ostacima i domenama i otkrivena su stanja višeg reda ribosoma. Na kraju ističemo široku sinergiju XL-MS-a s metodama visoke rezolucije strukture, budući da su eksperimenti XL-MS-a omogućili remodeliranje ukupno 2057 ostataka, optimizirajući trenutni radni model ribosoma *E. coli*.

Objavljene strukture ribosoma *E. coli*, iako impresivno velikog broja, obuhvaćaju većinu ribosomskih proteina, veznika, kofaktora i stanja translacije. Zanimljivo je da su eksperimenti identificirali otprilike 50% križnih veza koje su nove, i nisu dio do sada objavljenih ribosomskih struktura visoke rezolucije. To znači da trenutni strukturni modeli samo djelomično rekapituliraju intrinzičnu fleksibilnost 70S ribosoma. Ova metodologija, tj. mapiranje križnih veza na sve strukture ribosoma i naknadno modeliranje na temelju križnih veza, omogućila je dobivanje novih informacija u tehničkim, biokemijskim i biološkim aspektima. Vizualizacijom udaljenost križnih veza identificirani su kristalni kontakti, kao u slučaju proteina L9 (Slika 26.) gdje se vidjelo da taj proteinski dio ribosoma postoji u dvije različite konformacije.



Slika 26. Različite konformacije proteina L9; protein je lokaliziran u području asimetrične jedinice u kristalnoj strukturi (4V4H), i stoga je u produženoj konformaciji. U strukturi krio-EM-a (5U9F), protein se preklapio na površinu ribosoma. Ostatak prikazane strukture čine ribosomski proteini su prikazani u crnoj boji, a RNA u sivoj.¹¹⁹

Identificirana su kompleksna oligomerizacijska stanja L7/L12 i predložen model za njegovu strukturalnu ulogu u kontekstu ribosoma; otkriveni su diskretne, ali ograničene konformacije za N-terminalne i C-terminalne regije križno povezanih ribosomskih proteina S1 i L31. Napredne metode obrade slika korištenjem krio-EM-a za sortiranje i klasificiranje različitih populacija ribosoma iz jednog uzorka mogu pružiti uvide u heterogenost ribosoma.



Slika 27. Gusta interakcijska mreža L7/L12 zabilježena XL-MS-om. Proteini povezani preko križnih veza istaknuti su bojom. Križne veze prikazane su kao isprekidane linije, a koje zadovoljavaju opisane strukture (žute) ili djelomično zadovoljavaju opisane strukture (narančaste) su označene. (A) Interakcijska mreža proteina L7/L12, (B) križne veze nakon remodeliranja, (C) model interakcije tetramera L7/L12 (plava, zelena, crvena, narančasta) vezanog za heliks L10 na temelju informacija o križnim vezama, (D) intramolekularne križne veze između CTD domena L7/L12 koje zadovoljavaju opisanu konformaciju, (E) intermolekularne križne veze koje zadovoljavaju opisanu i produženu i helikalnu konformaciju veznog područja L7/L12.¹¹⁹

Posebno, ribosomske klase uključujući faktor okidača u kompleksu s ribosomom *E. Coli*, predviđaju rekapitulaciju ovog modela gdje faktor okidača interagira s 23S RNA u proširenoj konformaciji. Testabilna hipoteza za ribosomologe na temelju proširenog modela ribosoma može uključivati sustav L7/L12, za koji je razvijena učinkovita deplecija na izoliranim ribosomima. Četiri kopije L7/L12 vežu se na periferiju ribosoma na N-terminalni kraj, dok C-terminalni kraj hvata molekule tRNA i GTP-aze za učinkovitu translaciju.¹²⁷ Funkcijske studije pokazuju da smanjenje zgloba dovodi do inaktivacije dok produljenje zgloba nema ili ima samo manji utjecaj na translaciju. Osim toga, na temelju jednog konstrukta s nasumičnim

nizom, zaključeno je da sastav ostataka zgloba nema utjecaja na aktivnost translacije.¹²⁸ Za područje zgloba primijećeno je da je kodiran prijelaz između zavojnice u heliks, zadovoljavajući podatke o križnim vezama. Stoga se pretpostavlja da lokalni prijelazi sekundarne strukture mogu ležati u osnovi funkcije L7/L12. Sustavan pristup za ispitivanje, poticanje ili sprječavanje formiranja predviđene sekundarne strukture područja zgloba mogao bi dešifrirati specifičnosti u mehanizmu prepoznavanja uključujući L7/L12. Ukupno je objašnjeno sedam novih i četiri križne unutar-molekulske, te 28 novih i 10 križnih međumolekulskih veza, uz već definirane križne veze. Ovaj konačni model uključuje 115 unutar-molekulskih i 71 međumolekulsku križnu vezu, sada ispunjavajući prag udaljenosti od oko 30 Å za intramolekulske i 37,5 Å za međumolekulske križne veze. Ova metoda preoblikovanja jednog proteina u krutom okruženju može se dalje poboljšati razmatranjem okoline proteina za fleksibilnost i prikladnost za preoblikovanje, posebno ako je uključen i rRNA, kao npr. u ogranku L1. Osim toga, sedam križnih veza nije bilo odgovarajuće za multimer L7/L12. Ovaj predloženi vezani model od četiri proteina L7/L12 je trenutna slika varijabilnih kompleksa koje multimer može zauzeti za ispitivanje sa-tRNA, stoga je samo podskup podataka o križnim vezama relevantan. Fleksibilnost sučelja 30S-50S dodatno je istaknuta s pet dodatnih križnih veza koje su mapirane na L5, S9 i S10, koje su sve poznate po sudjelovanju u vezi s tRNA, pomacima okvira i rotacijskim kretanjem. Trenutno je metoda za konačno uklapanje svih izvedenih križnih veza u jedan statički model ili u slike trenutaka nemoguća, i naglašava činjenicu da ribosom sadrži, čak i u svojem jedinstvenom, pročišćenom stanju, veliki i složen konformacijski oblik strukture.

Ovo istraživanje može poslužiti kao referentna točka za provođenje biokemijskih eksperimenata na novom modeliranom proteinskom području, vođenom pomoću XL-MS-a. Bilo bi zanimljivo vidjeti interakcije liganda i proteina u aktivnom mjestu pomoću ove metode.

Osim toga, HRMS je ključan u istraživanju i razvoju lijekova, nudeći vrijedne informacije za optimizaciju vodećih spojeva, identifikaciju ciljeva i farmakokinetičke studije. Precizno kvantificirajući afinitete vezanja i stehiometrije interakcija proteina i liganda, HRMS usmjerava dizajn novih terapeutika s poboljšanom učinkovitošću i selektivnošću.

Međutim, unatoč izvanrednim mogućnostima, HRMS nije bez izazova. Složenost bioloških uzoraka, dinamički raspon izražavanja proteina i složenosti analize podataka predstavljaju značajne prepreke koje zahtijevaju kontinuirano usavršavanje metodologija i računalnih alata. Dodatno, integracija HRMS-a s komplementarnim tehnikama poput spektrometrije ionske pokretljivosti (IMS) i spektrometrije masa križnih veza (XL-MS) obećava daljnje poboljšanje našeg razumijevanja interakcija proteina i liganda.

Zaključak

Spektrometrija masa visoke rezolucije predstavlja temelj u otkrivanju složene dinamike interakcija proteina i liganda. Njena neusporediva osjetljivost, točnost i raznolikost omogućavaju istraživačima da prodru duboko u molekularne mehanizme koji upravljaju tim interakcijama s neviđenom preciznošću. Omogućujući identifikaciju, kvantifikaciju i strukturalnu karakterizaciju kompleksa proteina i liganda, HRMS nudi neprocjenjive uvide u temeljne principe koji leže u osnovi bioloških procesa i mehanizama bolesti.

Jedna od ključnih prednosti HRMS-a leži u njegovoj sposobnosti da pruži sveobuhvatan pregled interakcija proteina i liganda u njihovom prirodnom okruženju. Za razliku od tradicionalnih metoda, HRMS omogućava proučavanje ovih interakcija u kompleksnim biološkim matricama, omogućavajući istraživačima da uhvate puni spektar interakcija koje se događaju unutar živih sustava. Nadalje, HRMS olakšava otkrivanje suptilnih konformacijskih promjena koje inducira vezanje liganda, pružajući uvid u dinamičku prirodu kompleksa proteina i liganda.

Gledajući unaprijed, budućnost HRMS-a u području interakcija proteina i liganda izgleda obećavajuće, s nekoliko uzbudljivih izgleda na horizontu.

1. Napredak u instrumentaciji: Nastavak poboljšanja u instrumentaciji spektrometrije masa, poput povećane rezolucije, osjetljivosti i brzine, omogućit će sveobuhvatniju i precizniju analizu interakcija proteina i liganda. Nove tehnologije, poput kriogenske elektronske mikroskopije spojene sa spektrometrijom masa, imaju potencijal za otkrivanje strukturnih detalja dinamičnih kompleksa s dosad neviđenom jasnoćom.
2. Integracija multi-omičkih pristupa: Integracija HRMS-a s drugim omičkim tehnologijama, poput genomike, transkriptomike i metabolomike, omogućit će holističko razumijevanje staničnih procesa i putova bolesti. Ovaj višedimenzionalni pristup omogućit će istraživačima razotkrivanje složenih mreža interakcija proteina i liganda u različitim biološkim kontekstima, otvarajući put personaliziranoj medicini i ciljanijim terapijama.
3. Primjena u razvoju lijekova: HRMS će nastaviti igrati ključnu ulogu u otkrivanju i razvoju lijekova olakšavajući optimizaciju vodećih spojeva, farmakokinetičke studije i screening toksičnosti. Mogućnost brze i točne karakterizacije interakcija proteina i liganda u složenim biološkim matricama ubrzat će identifikaciju novih ciljeva lijekova i razvoj preciznih terapeutika.
4. Veliki podaci i računalno modeliranje: S povećanjem obujma i složenosti podataka spektrometrije mase, bit će sve veća potreba za sofisticiranim računalnim algoritmima i tehnikama strojnog učenja kako bi se podaci učinkovito analizirali i interpretirali. Integracija eksperimentalnih podataka s računalnim modeliranjem poboljšat će naše prediktivne sposobnosti i produbiti naše razumijevanje interakcija proteina i liganda na atomskoj razini.
5. Klinička primjena i otkrivanje biomarkera: Analiza interakcija proteina i liganda temeljena na HRMS-u ima veliki potencijal za kliničke primjene, uključujući otkrivanje

biomarkera, dijagnozu bolesti i stratifikaciju pacijenata. Profiliranje interakcija proteina i liganda u uzorcima pacijenata može pomoći u identifikaciji biomarkera bolesti i razvoju dijagnostike prilagođene za personalizirane strategije liječenja.

Ukratko, budućnost HRMS-a u proučavanju interakcija proteina i liganada obilježena je inovacijama, suradnjom i interdisciplinarnim pristupima. Kako tehnologija nastavlja napredovati, a naše razumijevanje molekularne biologije raste, HRMS će ostati na čelu znanstvenih otkrića, potičući proboje u biomedicinskom istraživanju i kliničkoj praksi. HRMS je revolucionirao proučavanje interakcija proteina i liganda, nudeći neviđene uvide u njihovu strukturu, dinamiku i funkcionalne implikacije.

Literatura

1. Sparkman, O. D. (2000) *Mass spectrometry desk reference*. Pittsburgh: Global View Pub.
2. Downard, K. (2004). *Mass Spectrometry: A Foundation Course*. London: Royal Society of Chemistry
3. Squires, G (1998) Francis Aston and the mass spectrograph. *Journal of the Chemical Society: Dalton Transactions*, 23, 3893-3900.
4. Downard, K. M. (2007) Historical account: Francis William Aston: the man behind the mass spectrograph. *European Journal of Mass Spectrometry*. 13 (3), 177-190.
5. Thomson, J. J. (1913) *Rays Of Positive Electricity and Their Application to Chemical Analysis*. London: Longman's Green and Company.
6. Siri, W. (1947) Mass spectroscope for analysis in the low-mass range. *Review of Scientific Instruments*. 18 (8), 540-545.
7. Price, P. (1991) Standard definitions of terms relating to mass spectrometry : A report from the committee on measurements and standards of the American society for mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2 (4), 336-348.
8. Parkins, W. E. (2005) The uranium bomb, the calutron, and the space-charge problem. *Physics Today*. 58 (5), 45-51.
9. *The Nobel Prize in Chemistry 2002: Information for the Public* (2002) Dostupno na: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002/summary/> [01. ožujka 2024.]
10. Stephens, W. E. (1946) A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Physical Review*. 69 (11-12), 691.
11. Medzihradzky, K. F., Campbell, J. M., Baldwin, M. A., Falick, A.M., Juhasz, P., Vestal, M. L., Burlingame, A.L. (2000) The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Analytical Chemistry*. 72 (3), 552-558.
12. Vestal, M. L., Campbell, J.M. (2005) Tandem Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Biological Mass Spectrometry. Methods in Enzymology*. 402, 79-108.
13. Mamyrin, B. A., Karataev, V. I., Shmikk, D. V., Zagulin, V. A. (1973). The mass-reflectron, a new nonmagnetic Time-of-Flight Mass Spectrometer with high resolution. *Journal of Experimental and Theoretical Physics*. 37, 45.
14. Dodonov, A. F., Chernushevich, I. V., Laiko, V. V. (1994) *Time-of-Flight Mass Spectrometry*. ACS Symposium
15. Chernushevich, I. V.; Loboda, A. V.; Thomson, B. A. (2001). An introduction to Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 36 (8), 849-865.
16. Noble, C., Dalsgaard, P. W., Johansen, S. S., Linnet, K. (2018) Application of a screening method for fentanyl and its analogues using UHPLC-QTOF-MS with data-independent acquisition (DIA) in MS^E mode and retrospective analysis of authentic forensic blood samples. *Drug Testing and Analysis*. 10 (4), 651-662.

17. Dubois, F., Knochenmuss, R., Zenobi, R., Brunelle, A., Deprun, C., Le Beyec, Y. (1999) A comparison between ion-to-photon and microchannel plate detectors. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 13 (9), 786-791.
18. Park, M. A., Callahan, J. H., Vertes A. (1994) An inductive detector for time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 8 (4), 317-322.
19. Lanucara, F., Holman, S. W., Gray, C. J., Evers, C. E. (2014) The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nature Chemistry*. 6, 281-294.
20. McDaniel, E., Martin, D. W., Barnes, W. S. (1962) Drift Tube-Mass Spectrometer for Studies of Low-Energy Ion-Molecule Reactions. *Review of Scientific Instruments*. 33 (1), 2-7.
21. McKnight, L. G., McAfee, K. B., Sipler, D. P. (1967) Low-Field Drift Velocities and Reactions of Nitrogen Ions in Nitrogen. *Physical Review*. 164 (1), 62-70.
22. Young, C., Edelson, D., Falconer, W. E. (1970) Water Cluster Ions: Rates of Formation and Decomposition of Hydrates of the Hydronium Ion. *The Journal of Chemical Physics*. 53 (11), 4295-4302.
23. Henderson, S. C., Valentine, S. J., Counterman, A. E., Clemmer, D. E. (1999) ESI/ion trap/ion mobility/time-of-flight mass spectrometry for rapid and sensitive analysis of biomolecular mixtures. *Analytical Chemistry*. 71 (2), 291-301.
24. Hoaglund, C. S., Valentine, S. J., Sporleder, C. R., Reilly, J. P., Clemmer, D. E. (1998) Three-dimensional ion mobility/ToF-MS analysis of electrosprayed biomolecules. *Analytical Chemistry*. 70 (11), 2236-2242.
25. Lanucara, F., Holman, S. W., Gray, C. J., Evers, C. E. (2014) The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nature Chemistry*. 6 (4), 281-294.
26. Kanu, A. B., Dwivedi, P., Tam, M., Matz, L., Hill, H. H. (2008) Ion mobility-mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 43 (1), 1-22.
27. Yousef, A., Shrestha, S., Viehland, L. A., Lee, E. P. F., Gray, B. R., Ayles, V. L., Wright, T. G., Breckenridge, W. H. (2007) Interaction potentials and transport properties of coinage metal cations in rare gases. *The Journal of Chemical Physics*. 127 (15), 154309
28. Laphorn, C., Pullen, F., Chowdhry, B. Z. (2013) Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules: separating and assigning structures to ions. *Mass Spectrometry Reviews*. 32 (1), 43-71.
29. Gabelica, V., *et al.* (2019) Recommendations for reporting ion mobility Mass Spectrometry measurements. *Mass Spectrometry Reviews*. 38 (3): 291-320.
30. Kolakowski, B. M., Mester, Z. (2007) Review of applications of high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) and differential mobility spectrometry (DMS). *Analyst*. 132 (9), 842-864.
31. Shvartsburg, A. A., Li, F., Tang, K., Smith, R. D. (2007) Distortion of ion structures by field asymmetric waveform ion mobility spectrometry. *Analytical Chemistry*. 79 (4), 1523-1528.
32. Kirk, A. T., Zimmermann, S. (2015) Pushing a compact 15 cm long ultra-high resolution drift tube ion mobility spectrometer with R = 250 to R = 425 using peak

- deconvolution. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry*. 18 (1-2), 17-22.
33. Kirk, A. T. Raddatz, C. R., Zimmermann, S. (2016) Separation of Isotopologues in Ultra-High-Resolution Ion Mobility Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 89 (3), 1509-1515.
 34. Lanucara, F., Holman, S. W., Gray, C. J., Evers, C. E. (2014) The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nature Chemistry*. 6 (4), 281-294.
 35. May, J. C., McLean, J. A. (2015) Ion mobility-mass spectrometry: time-dispersive instrumentation. *Analytical Chemistry*. 87 (3), 1422-1436.
 36. Kliman, M., May, J. C., McLean, J. A. (2011) Lipid analysis and lipidomics by structurally selective ion mobility-mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1811 (11), 935-945.
 37. Aizpurua-Olaizola, O., Toraño, J. S., Falcon-Perez, J. M., Williams, C., Reichardt, N., Boons, G. J. (2018) Mass spectrometry for glycan biomarker discovery. *Trends in Analytical Chemistry*. 100, 7-14.
 38. Angel, L. A., Majors, L. T., Dharmaratne, A. C., Dass, A. (2010) Ion mobility mass spectrometry of Au₂₅(SCH₂CH₂Ph)₁₈ nanoclusters. *ACS Nano*. 4 (8), 4691-4700.
 39. Hilgers, R., Yong, T. S., Briš, A., Pereverzev, A. Y., White, P., Jansen, J. J., Roithová, J. (2022) Monitoring Reaction Intermediates to Predict Enantioselectivity Using Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie*. 61 (36), e202205720.
 40. Kabir, K. M., Donald, W. A. (2017) Microscale differential ion mobility spectrometry for field deployable chemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 97, 399-427.
 41. Wagner, N. D., Clemmer, D. E., Russell, D. H. (2017) ESI-IM-MS and Collision-Induced Unfolding That Provide Insight into the Linkage-Dependent Interfacial Interactions of Covalently Linked Diubiquitin. *Analytical Chemistry*. 89 (18), 10094-10103.
 42. Tian, Y., Han, L., Buckner, A. C., Ruotolo, B. T. (2015) Collision Induced Unfolding of Intact Antibodies: Rapid Characterization of Disulfide Bonding Patterns, Glycosylation, and Structures. *Analytical Chemistry*. 87 (22), 11509-11515.
 43. Arriola Apelo, S. I., Lamming, D. W. (2016). Rapamycin: An InhibiTOR of Aging Emerges From the Soil of Easter Island. *Journal of Gerontology A*. 71 (7), 841-849.
 44. Omura S, ed. (2002) *Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology, and Practice* (2nd Edition). Cambridge: Academic Press.
 45. *Macrolide Antibiotics Comparison: Erythromycin, Clarithromycin, Azithromycin* (1999) Dostupno na: [https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196\(11\)64140-2/abstract](https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196(11)64140-2/abstract) [02. ožujak 2024.]
 46. Tenson, T., Lovmar, M., Ehrenberg, M. (2003) The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of Molecular Biology*. 330 (5), 1005-1014.
 47. Bailly, S., Pocidalo, J. J., Fay, M., Gougerot-Pocidalo, M. A. (1991) Differential modulation of cytokine production by macrolides: interleukin-6 production is increased by spiramycin and erythromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35 (10), 2016-2019.

48. López-Boado, Y. S., Rubin, B. K. (2008) Macrolides as immunomodulatory medications for the therapy of chronic lung diseases. *Current Opinion in Pharmacology*. 8 (3), 286-291.
49. Schultz, M. J. (2004) Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54 (1), 21-28.
50. Derendorf, H. (2020) Excessive lysosomal ion-trapping of hydroxychloroquine and Azithromycin. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 55 (6), 106007.
51. Bekele, L. K., Gebeyehu, G. G. (2012) Application of Different Analytical Techniques and Microbiological Assays for the Analysis of Macrolide Antibiotics from Pharmaceutical Dosage Forms and Biological Matrices. *ISRN Analytical Chemistry*. 2012, 1-17.
52. Zhang, L., Xu, X., Badawy, S., Ihsan, A., Liu, Z., Xie, C., Wang, X., Tao, Y. (2020) A Review: Effects of Macrolides on CYP450 Enzymes. *Current Drug Metabolism*. 21 (12), 928-937.
53. Hougaard Christensen, M. M., Bruun Haastrup, M., Øhlenschlaeger, T., Esbech, P., Arnspang Pedersen, S., Bach Dunvald, A. C., Bjerregaard Stage, T., Pilsgaard Henriksen, D., Thestrup Pedersen, A. J. (2020) Interaction potential between Clarithromycin and individual statins-A systematic review. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 126 (4), 307-317.
54. Westphal J. F. (2000) Macrolide - induced clinically relevant drug interactions with cytochrome P-450A (CYP) 3A4: an update focused on clarithromycin, azithromycin and dirithromycin. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 50 (4), 285-295.
55. Li, L., Feng, W., Zhang, Z., Xue, H., Zhao, X. (2015) Macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes and genotypes of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine mastitis. *BMC Veterinary Research*. 11, 168.
56. Beckert *et al* (2021) Structural and mechanistic basis for translation inhibition by macrolide and ketolide antibiotics. *Nature Communications*. 12, 4466.
57. Munita, J. M., Arias, C. A. (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*. 4 (2), 481-511.
58. Choby, B. A. (2009) Diagnosis and Treatment of Streptococcal Pharyngitis. *American Family Physician*. 79 (5), 383-390.
59. de la Cruz, J., Karbstein, K., Woolford, J. L. (2015) Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annual Review of Biochemistry*. 84, 93-129.
60. Wilson, D. N., Doudna Cate, J .H. (2012) The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 4 (5), a011536.
61. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell (4th ed.)*. New York: Garland Science. p. 342.
62. Collatz, E., Küchler, E., Stöffler, G., Czernilofsky, A. P. (1976) The site of reaction on ribosomal protein L27 with an affinity label derivative of tRNA Met f. *FEBS Letters*. 63 (2), 283-286.

63. Czernilofsky, A. P., Collatz, E. E., Stöffler, G., Kuechler, E. (1974) Proteins at the tRNA binding sites of *Escherichia coli* ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 71 (1), 230-234.
64. Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., Ban, N. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science*. 334 (6058), 941-948.
65. Fabijanski, S., Pellegrini, M. (1977) Identification of proteins at the peptidyl-tRNA binding site of rat liver ribosomes. *Molecular & General Genetics*. 184 (3), 551-556.
66. Wang, J., Dasgupta, I., Fox, G. E. (2009) Many nonuniversal archaeal ribosomal proteins are found in conserved gene clusters. *Archaea*. 2 (4), 241-251.
67. Waltz, F., Nguyen, T. T., Arrivé, M., Bochler, A., Chicher, J., Hammann, P., Kuhn, L., Quadrado, M., Mireau, H., Hashem, Y., Giegé, P. (2019) Small is big in Arabidopsis mitochondrial ribosome. *Nature Plants*. 5 (1), 106-117.
68. Archibald, J. M., Lane, C. E. (2009) Going, going, not quite gone: nucleomorphs as a case study in nuclear genome reduction. *The Journal of Heredity*. 100 (5), 582-590.
69. Recht, M. I., Douthwaite, S., Puglisi, J. D. (1999) Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *The EMBO Journal*. 18 (11), 3133-3138.
70. (1970) Chloramphenicol-Induced Bone Marrow Suppression. *JAMA*. 213 (7), 1183-1184.
71. Newman, S. M., Boynton, J. E., Gillham, N. W., Randolph-Anderson, B. L., Johnson, A. M., Harris, E. H. (1990) Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics*. 126 (4), 875-888.
72. Penev, P. I., Fakhretaha-Aval, S., Patel, V. J., Cannone, J. J., Gutell, R. R., Petrov, A. S., Williams, L. D., Glass, J. B. (2020) Supersized ribosomal RNA expansion segments in Asgard archaea. *Genome Biology and Evolution*. 12 (10), 1694-1710.
73. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., Steitz, T. A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. 289 (5481), 905-920.
74. Schluenzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F., Yonath, A. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell*. 102 (5): 615-623.
75. Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T., Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 407 (6802), 327-339.
76. Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., Noller, H. F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*. 292 (5518), 883-896.
77. Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M., Cate, J. H. (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science*. 310 (5749), 827-834.

78. Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C. L., Ban, N., Frank, J. (2005). Structure of the *E. coli* protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature*. 438 (7066), 318-324.
79. Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R., Ramakrishnan, V. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*. 313 (5795), 1935-1942.
80. Korostelev, A., Trakhanov, S., Laurberg, M., Noller, H. F. (2006) Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. *Cell*. 126 (6), 1065-1077.
81. Yusupova, G., Jenner, L., Rees, B., Moras, D., Yusupov, M. (2006) Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome. *Nature*. 444 (7117) 391-394.
82. Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M. (2011) The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*. 334 (6062), 1524-1529.
83. Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S. F., Haag, A., Ban, N. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science*. 331 (6018), 730-736.
84. Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., Ban, N. (2011) Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science*. 334 (6058), 941-948.
85. Tirumalai, M. R., Rivas, M., Tran, Q., Fox, G. E. (2021) The Peptidyl Transferase Center: a Window to the Past. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 85 (4), e0010421.
86. Lafontaine, D., Tollervey, D. (2001) The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2 (7), 514-520.
87. Savir, Y., Tlusty, T. (2013) The ribosome as an optimal decoder: A lesson in molecular recognition. *Cell*. 153 (2), 471-479.
88. Konevega, A. L., Soboleva, N. G., Makhno, V. I., Semenov, Y. P., Wintermeyer, W., Rodnina, M. V., Katunin, V. I. (2004) Purine bases at position 37 of tRNA stabilize codon-anticodon interaction in the ribosomal A site by stacking and Mg²⁺-dependent interactions. *RNA*. 10 (1), 90-101.
89. Cech, T. R., (2000) Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science*. 289 (5481), 878-879.
90. Fedorov, A. N., Baldwin, T. O. (1997) Cotranslational protein folding. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (52): 32715-32718.
91. Dabrowski-Tumanski, P., Piejko, M., Niewieczeral, S., Stasiak, A., Sulkowska, J. I. (2018) Protein knotting by active threading of nascent polypeptide chain exiting from the ribosome exit channel. *The Journal of Physical Chemistry B*. 122 (49), 11616-11625.
92. Defenouillère, Q., Yao, Y., Mouaikel, J., Namane, A., Galopier, A., Decourty, L., Doyen, A., Malabat, C., Saveanu, C., Jacquier, A., Fromont-Racine, M. (2013) Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (13), 5046-5051.

93. Keeley, J., Gutnikoff, R. (2015) Ribosome studies turn up new mechanism of protein synthesis. *Howard Hughes Medical Institute*. Dostupno na: <https://www.hhmi.org/news/ribosome-studies-turn-new-mechanism-protein-synthesis> [02. ožujka 2024.]
94. Géhin, C., Holman, S. W. (2021) Advances in high-resolution mass spectrometry applied to pharmaceuticals in 2020: A whole new age of information. *Analytical Science Advances*. 2, 142-156.
95. Domon, B., Gallien, S. (2015) Recent advances in targeted proteomics for clinical applications. *Proteomics Clinical Applications*. 9(3-4), 423-431.
96. Leney, A. C., Heck, A. J. R. (2017) Native mass spectrometry: what is in the name?. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 28(1), 5-13.
97. Swearingen, K. E., Moritz, R. L. (2016) High-field asymmetric wave form ion mobility spectrometry for mass spectrometry based proteomics. *Expert Review of Proteomics*. 9(5), 505-517.
98. An, S., Fu, L. (2018) Small-molecule PROTACs: An emerging and promising approach for the development of targeted therapy drugs. *eBio Medicine*. 36, 553-562
99. Beveridge, R., Kessler, D., Rumpel, K., *et al.* (2020) Native mass spectrometry can effectively predict PROTAC efficacy. *ACS Central Science*. 6(7), 1223-1230.
100. Lee, B. I., Park, M., Choi, J., *et al.* (2020) Liquid chromatography high resolution mass spectrometric method for the quantification of monomethyl auristatin E (MMAE) and its preclinical pharmacokinetics. *Biomedical Chromatography*. 34(8), e4855.
101. Allison, T., Reading, E., Liko, I. *et al.* (2015) Quantifying the stabilizing effects of protein-ligand interactions in the gas phase. *Nature Communications*. 6, 8551.
102. Evers, C. E., Vonderach, M., Ferries, S., Jeacock, K., Evers, P. A. (2018) Understanding protein-drug interactions using ion mobility-mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology*. 42, 167-176.
103. Garcia, X., Sabaté, M. d. M., Aubets, J., Jansat, J. M., Sentellas, S. (2021) Ion Mobility-Mass Spectrometry for bioanalysis. *Separations*. 8, 33.
104. Stojko, J. *et al.* (2015) Ion mobility coupled to native mass spectrometry as a relevant tool to investigate extremely small ligand-induced conformational changes. *Analyst*. 140, 7234-7245
105. Ross, D. H., Xu, L. (2021) Determination of drugs and drug metabolites by ion mobility-mass spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1154, 338270.
106. Titeca, K., Lemmens, I., Tavernier, J., Eyckerman, S. (2019) Discovering cellular protein-protein interactions: Technological strategies and opportunities. *Mass Spectrometry Reviews*. 38 (1), 79-111.
107. Richards, A. L., Eckhardt, M., Krogan, N. J. (2021) Mass spectrometry-based protein-protein interaction networks for the study of human diseases. *Molecular Systems Biology*. 17, e8792
108. Richards, A. L., Merrill, A. E., Coon, J. J. (2015) Proteome sequencing goes deep. *Current Opinion in Chemical Biology*. 24, 11-17.

109. Aebersold, R., Mann, M. (2016) Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*. 537, 347-355.
110. Ruwolt, M., Schnirch, L., Lima, D. B., Nadler-Holly, M., Viner, R., Liu, F. (2022) Optimized TMT-Based Quantitative Cross-Linking Mass Spectrometry Strategy for Large-Scale Interactomic Studies. *Analytical Chemistry*. 94 (13), 5265-5272
111. Kao, A., Chiu, C. L., Vellucci, D., Yang, Y., Patel, V. R., Guan, S., Randall, A., Baldi, P., Rychnovsky, S. D., Huang, L. (2011) Development of a novel cross-linking strategy for fast and accurate identification of cross-linked peptides of protein complexes. *Molecular and Cell Proteomics*. 10, M110.
112. Liu, F., Heck, A. J. R. (2015) Interrogating the architecture of protein assemblies and protein interaction networks by cross-linking mass spectrometry. *Current Opinion in Structural Biology*. 35, 100–108.
113. Gonzalez-Lozano, M. A., Koopmans, F., Sullivan, P. F., Protze, J., Krause, G., Verhage, M., Li, K. W., Liu, F., Smit, A. B. (2020) Stitching the synapse: Cross-linking mass spectrometry into resolving synaptic protein interactions. *Scientific Advances*. 6, 5783.
114. Liu, F., Lössl, P., Scheltema, R., Viner, R., Heck, A. J. R. (2017) Optimized fragmentation schemes and data analysis strategies for proteome-wide cross-link identification. *Nature Communications*. 8, 15473.
115. Stieger, C. E., Doppler, P., Mechtler, K. (2019) Optimized Fragmentation Improves the Identification of Peptides Cross-Linked by MS-Cleavable Reagents. *Journal of Proteome Research*. 18, 1363–1370.
116. Beveridge, R., Stadlmann, J., Penninger, J. M., Mechtler, K. (2020) A synthetic peptide library for benchmarking crosslinking-mass spectrometry search engines for proteins and protein complexes. *Nature Communications*. 11, 742.
117. Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Hamon, C., Mohammed, A. K., Hamon, C. (2003) Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry*. 75, 1895–1904.
118. Smith, D.-L., Götze, M., Bartolec, T. K., Hart-Smith, G., Wilkins, M. R. (2018) Characterization of the interaction between arginine methyltransferase Hmt1 and its substrate Npl3: use of multiple cross-linkers, mass spectrometric approaches, and software platforms. *Analytical Chemistry*. 90, 9101–9108.
119. Tüting, C., Iacobucci, C., Ihling, C. H., Kastritis, P. L., Sinz, A. (2020) Structural analysis of 70S ribosomes by cross-linking/mass spectrometry reveals conformational plasticity. *Scientific Reports*, 10, 12618
120. Iacobucci, C., Gotze, M., Sinz, A. (2020) Cross-linking/mass spectrometry to get a closer view on protein interaction networks. *Current Opinion in Biotechnology*. 63, 48-53.
121. Sinz, A. (2003) Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. *Journal of Mass Spectrometry*. 38, 1225-1237.
122. Fischer, L., Rappsilber, J. (2017) Quirks of error estimation in cross-linking/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 89, 3829-3833.

123. Bullock, J. M. A., Schwab, J., Thalassinou, K., Topf, M. (2016) The importance of non-accessible crosslinks and solvent accessible surface distance in modeling proteins with restraints from crosslinking mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics*. 15, 2491-2500.
124. Yugandhar, K., Wang, T.-Y., Yu, H. (2020) Structure-based validation can drastically under-estimate error rate in proteome-wide crosslinking mass spectrometry studies. *Nature Methods*. 17, 985-988.
125. Fursch, J., Kammer, K. M., Kreft, S. G., Beck, M., Stengel, F. (2020) Proteome-wide structural probing of low-abundant protein interactions by cross-linking mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 92, 4016-4022.
126. Muller, M. Q., Dreiocker, F., Ihling, C. H., Schafer, M., Sinz, A. (2010) Cleavable cross-linker for protein structure analysis: Reliable identification of cross-linking products by tandem MS. *Analytical Chemistry*. 82, 6958-6968.
127. Carlson, M. A. *et al.* (2017) Ribosomal protein L7/L12 is required for GTPase translation factors EF-G, RF3, and IF2 to bind in their GTP state to 70S ribosomes. *FEBS Journal*. 284, 1631-1643.
128. Bubunenkov, M. G., Chuikov, S. V., Gudkov, A. T. (1992) The length of the interdomain region of the L7/L12 protein is important for its function. *FEBS Letters*. 313, 232-234.