

IDENTIFIKACE PROTEINŮ KOMBINACÍ PEPTIDOVÉHO MAPOVÁNÍ A FRAGMENTACE SULFONOVANÝCH PEPTIDŮ

JURAJ LENČO^{a,b} a JIŘÍ STULÍK^a

^aProteomové centrum pro studium intracelulárního parazitizmu bakterií, Vojenská lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, ^bÚstav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

jurasch@seznam.cz

Došlo 17.6.03, přepracováno 18.12.03, přijato 21.1.04.

Klíčová slova: identifikace proteinů, MALDI-TOF MS, rozpad za iontovým zdrojem

Úvod

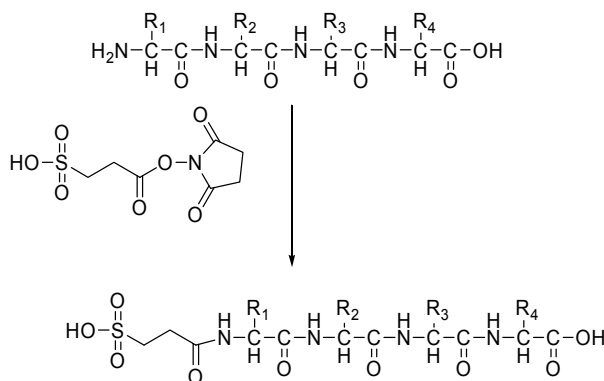
Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) je rutinně používaná technika pro identifikaci proteinů. Spolu s vysokorozlišovací dvojrozměrnou polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (2D-PAGE) patří ke klasickým metodám proteomiky.

Na přístrojích MALDI-TOF se identifikace proteinů provádí především metodou peptidového mapování (PMF – peptide mass fingerprinting, cit.¹). Metoda PMF je založena na enzymovém štěpení proteinu sekvenčně specifickou proteasou. Při enzymatickém štěpení trypsinem vznikají peptidy s argininem nebo lysinem na C-konci. Hmotnostní spektrum získané ze směsi proteolytických štěpů představuje specifickou charakteristiku proteinu. Měřenou veličinou je poměr hmotnost/náboj (m/z). Hodnoty m/z odečtené ze spektra lze v databázových programech porovnat s teoreticky vypočtenými hodnotami m/z proteolytických štěpů. Na základě shody experimentálních a teoretických hodnot lze ke spektru s určitou jistotou přiřadit protein.

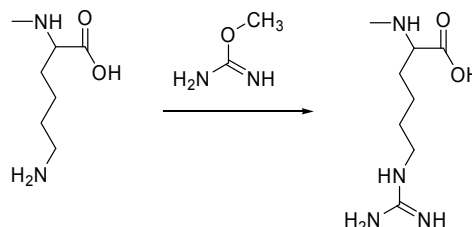
Jednoduchost a rychlost přípravy vzorků pro analýzu MALDI-TOF, rychlost samotné analýzy a snadné vyhodnocení spekter činí tuto metodu ideální pro rutinní identifikaci proteinů separovaných pomocí 2D-PAGE. V některých situacích však není možné protein jednoznačně identifikovat pouze ze spektra proteolytických štěpů. V těchto případech je potřebné určit sekvenci aminokyselin v proteinu. Moderní hmotnostní spektrometry MALDI-TOF jsou schopny poskytnout informace o sekvenci aminokyselin v analýze PSD (post-source decay – rozpad za iontovým zdrojem)²⁻⁴. Analýzu PSD lze lokalizovat i některé posttranslační modifikace⁴. Pro usnadnění analýzy PSD jsou hmotnostní spektrometry některých výrobců vybaveny speciálními typy reflektromu, např. reflektorem se zakřiveným polem (curved-field

reflectron, cit.⁵).

Fragmentace peptidu na aminokyseliny nebývá úplná a výsledná spektra PSD jsou často velmi komplikovaná. V posledních letech byly vypracovány techniky, které problémy spojené s analýzou PSD překonávají. Keough zavedením silně kyselých sulfoskupiny na N-koncovou aminoskupinu peptidu dosáhl dramatického zvýšení fragmentace. Při analýze PSD derivatizovaných peptidů byly generovány především γ - a β -ionty⁶, tedy ionty vznikající fragmentací peptidu v místě peptidové vazby. Výrazný pokrok přineslo zavedení ve vodě stabilního sukcinimidylesteru 3-sulfopropanové kyseliny, který je schopen připojit sulfoskupinu k N-koncové aminoskupině peptidu i ve vodním prostředí (obr. 1, cit.⁷). Aby u peptidů zakončených lysinem zůstala nederivatizována ϵ -aminoskupina lysinu, je nutné ji blokovat. Reakce s hydrogensulfátem *O*-methylisomočoviny je při zásaditém pH velmi selektivní (obr. 2, cit.⁸). Negativně nabitá sulfoskupina na N-konci dodává β -iontu celkový neutrální náboj (obr. 3), což zjednodušuje jeho detekci. Výsledné spektrum PSD s chemicky asistovanou fragmentací (CAF) je tedy složeno výhradně z γ -iontů, což usnadňuje interpretaci spektra. Velmi výhodné je proteolytické štěpy adsorbovat na reverzní fázi C₁₈ např. v ZipTip špičkách. Při reakcích s takto imobilizovanými peptidy se lze vyhnout komplikacím s čištěním a izolací a celý postup je výrazně urychlen⁹.



Obr. 1. Příklad reakce N-koncové aminoskupiny tetrapeptidu se sukcinimidylesterem 3-sulfopropanové kyseliny; při reakci se molekulová hmotnost peptidu zvyšuje o 136,0 Da

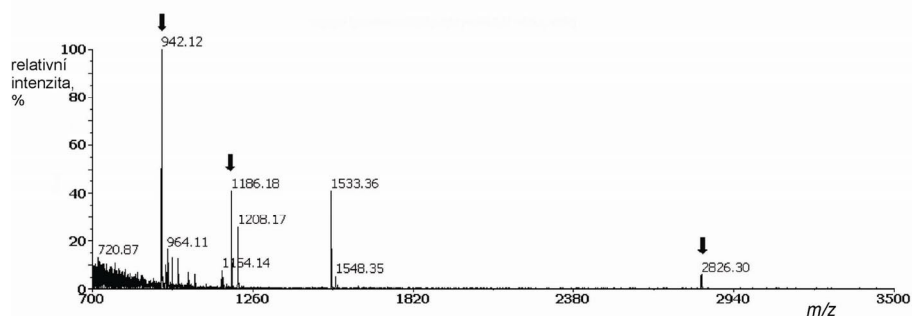


Obr. 2. Schéma blokování ϵ -aminoskupiny lysinu přeměnou na homoarginin; při reakci se molekulová hmotnost peptidu zvyšuje o 42,0 Da

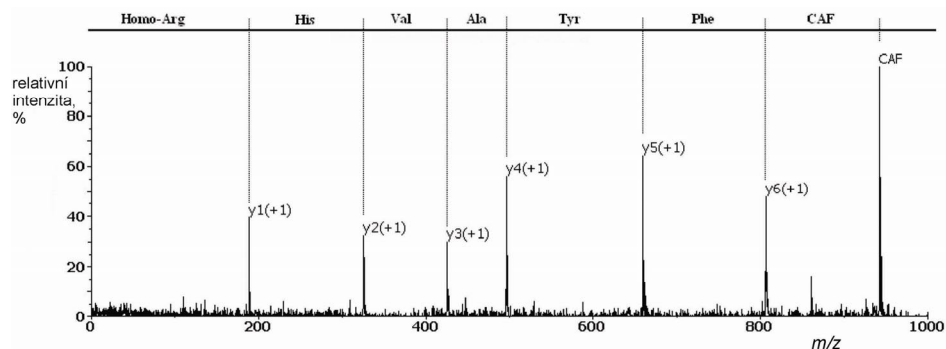
Výsledky a diskuse

Úspěšnost identifikace proteinů separovaných pomocí 2D-PAGE na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF je závislá na mnoha faktorech, mezi které patří např. množství a vlastnosti proteinu, typ barvení gelu 2D-PAGE, protokol pro enzymatické štěpení proteinu, příprava matrice a vzorku pro analýzu, kontaminace vzorku a jeho purifikace. Až na výjimky byly proteiny identifikovány metodou PMF. Jestliže byl protein identifikován menším počtem peptidů než pět, nebo aminokyseliny peptidů pokryly méně než 20%

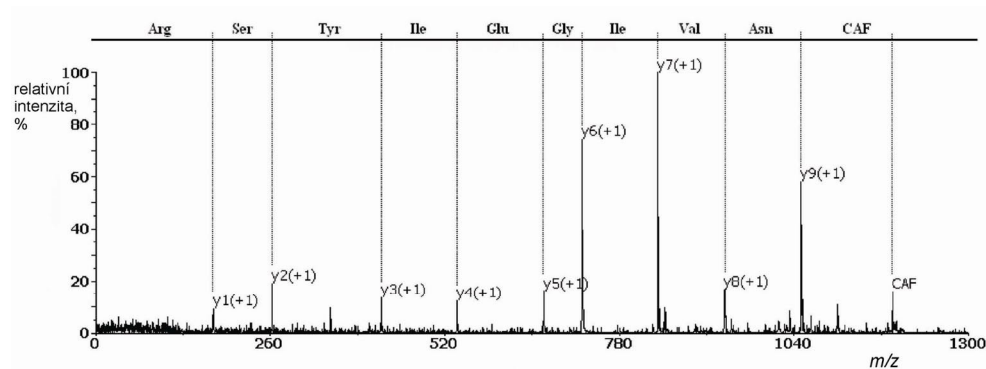
aminokyselinové sekvence proteinu a nebo hodnota isoelektrického bodu a molekulová hmotnost proteinu vykazovaly výrazné rozdíly proti hodnotám zjištěným z 2D-PAGE, byla identifikace potvrzena analýzou PSD s CAF, jak je ukázáno na příkladu. Spektrum PMF (obr. 4) bylo porovnáno se spektrem derivatizovaných peptidů (obr. 5). Rozdíly od původních hodnot byly 136 Da u piku 1186,18 a 2826,30 a 178 Da u piku 942,12. Rozdíl 178 Da svědčí o modifikaci původního lysinu na C-konci na homoarginin. Kompletní série y-iontů potvrdila předpokládanou sekvenci aminokyselin Phe-Tyr-Ala-Val-His-Lys v peptidu o původní hodnotě



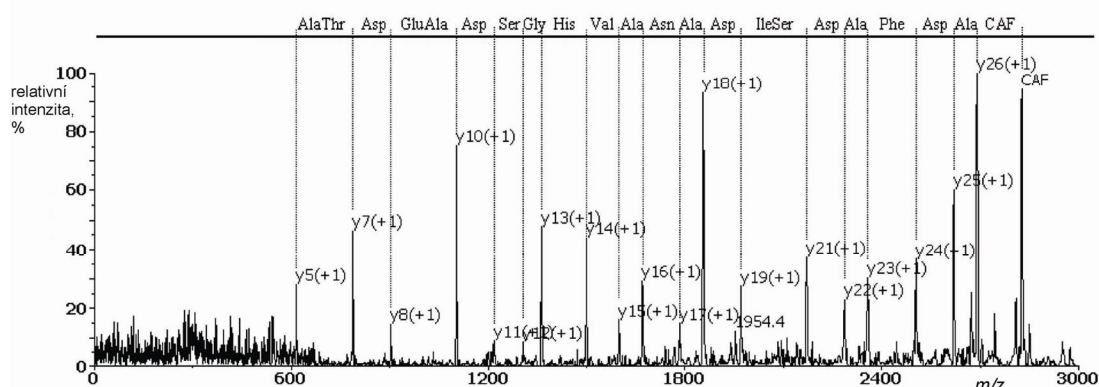
Obr. 5. Spektrum měřené po derivatizaci peptidů v pozitivním refletronovém módu s matricí DHB; šipky značí peptidy, u kterých byla provedena analýza PSD



Obr. 6. Spektrum PSD derivatizovaného peptidu o m/z 942,1, matrice CHCA



Obr. 7. Spektrum PSD derivatizovaného peptidu o m/z 1186,2, matrice CHCA

Obr. 8. Spektrum PSD derivatizovaného peptidu o m/z 2826,3, matrice CHCA

m/z 764,38 (obr. 6) a Asn-Val-Ile-Gly-Glu-Ile-Tyr-Ser-Arg v peptidu o původní hodnotě m/z 1050,52 (obr. 7). Téměř kompletní série iontů y_{26} - y_5 potvrdila část předpokládané sekvence Ala-Asp-Phe-Ala-Asp-Ser-Ile-Asp-Ala-Asn-Ala-Val-His-Gly-Ser-Asp-Ala-Glu-Asp-Thr-Ala-Ala-Gln-Glu-Ile-Arg v peptidu o původní hodnotě m/z 2690,21 (obr. 8). Při běžném potvrzení identifikace je postačující určit část sekvence u jednoho peptidu a porovnat ji se sekvencí předběžně určenou při PMF. Zobrazený příklad tyto požadavky tedy výrazně přesahuje.

Slabé místo protokolu pro derivatizaci peptidů je manipulace se ZipTip špičkami. Zvládnutí této techniky vede k úspěšné derivatizaci vzorků. Derivatizované peptidy jsou velmi snadno fragmentovány, a proto pro výběr matečných iontů je někdy nutné použít tzv. „chladnou“ matici DHB. Matrice DHB se v některých případech osvědčila i pro vlastní analýzu PSD.

Závěr

PSD s CAF je technika určená pro sekvenování peptidů o neznámé primární struktuře (tzv. *de-novo* sekvenování) na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF. V naší laboratoři našla uplatnění jako prvek, který výrazně zjednodušuje a ulehčuje získání a vyhodnocení spekter PSD pro potvrzení identifikace proteinů.

Ettan™ souprava pro CAF-MALDI sekvenování byla laskavým darem od prof. C. R. Noe z Ústavu farmaceutické chemie Univerzity Vídeň. Tato práce je součástí projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt č. LN00A033).

LITERATURA

1. Henzel W. J., Watanabe C., Stults J. T.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 931 (2003).
2. Spengler B., Kirsch D., Kaufmann R., Jaeger E.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6, 105 (1992).

3. Šedo O., Havel J.: *Chem. Listy* 97, 109 (2003).
4. Chaurand P., Leutzenkirchen F., Spengler B.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 91 (1999).
5. Cornish T. J., Cotter R. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8, 781 (1994).
6. Keough T., Youngquist R. S., Lacey M. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7131 (1999).
7. Liminga M., Carlsson U., Larsson C., Maloisel J. L., Palmgren R., Keough T., Youngquist R. S.: *Proceedings of 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL, May 27-31 2001.* Chicago 2001.
8. Keough T., Lacey M. P., Youngquist R. S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 2348 (2000).
9. Hellman U., Bhikhabhai R.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 1851 (2002).

J. Lenčo^{a,b} and J. Stulík^a (^a*Proteome Center for the Study of Intracellular Parasitism of Bacteria, Purkyně Military Medical Academy, Hradec Králové*, ^b*Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Charles University, Hradec Králové*): **Identification of Proteins by Combination of MALDI-TOF Peptide Mass Fingerprinting and Fragmentation of Sulfonated Peptides**

The MALDI-TOF MS is an ideal method for routine identification of proteins separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). However, in some cases the outputs from peptide mass fingerprinting (PMF) do not enable unambiguous identification of proteins. In such situation, determination of a partial amino acid sequence of the target protein would be extremely helpful in the PMF identification. Sequencing using MALDI-TOF post-source decay (PSD) usually generates complex spectra and the fragmentation is not complete. PSD sequencing with chemically assisted fragmentation allows to avoid these problems. Application of both methods in identification of proteins of *Francisella tularensis* is presented.