



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Lucija Dončević

NEDVOJBENA IDENTIFIKACIJA PROTEINA SPEKTROMETRIJOM MASA

Kemijski seminar I

A. Butorac, M. Solak Mekić, A. Hozić, J. Diminić, D. Gamberger, M. Nišavić,
M. Cindrić, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **30** (2016) 1687-1694

Zagreb, 2021.

Sadržaj

§ 1. UVOD.....	1
§ 2. ANALITIČKE TEHNIKE U PROTEOMICI	2
2.1. Odgradnja proteina specifičnim proteinazama	4
2.2. Spektrometrija masa.....	5
2.2.1. Ionizacija elektroraspršenjem	6
2.2.2. Matricom pomognuta ionizacija laserskom desorpcijom	7
2.2.3. Tandemna spektrometrija masa	8
2.2.4. Fragmentacija protoniranih peptida.....	11
2.3. Specifično obilježavanje peptida u svrhu olakšanog cijepanja peptidne okosnice	13
2.3.1. Sulfonacija N-kraja peptida	14
2.4. Metoda nedvojbene identifikacije proteina spektrometrijom masa.....	18
§ 3. ZAKLJUČAK	21
§ 4. LITERATURNI IZVORI.....	21

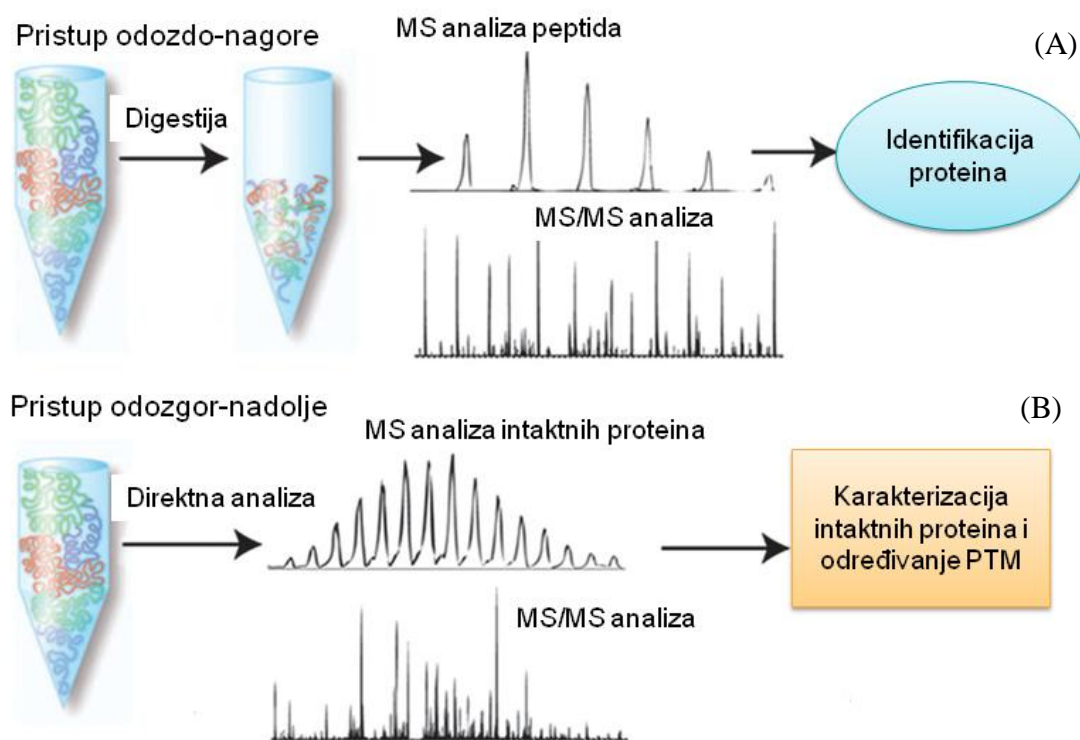
§ 1. UVOD

Pojam proteom prvi je puta definiran kako bi se opisao skup proteina kodiranih genomom, a potom i eksprimiranih, nekog organizma. Znanstvena grana koja proučava proteom, nazvana proteomika, izučava strukturni opis proteina i njihovih kompleksa, uključujući njihove izoforme, modifikacije te međusobne protein-protein interakcije i interakcije proteina s različitim reagensima.¹ Proteini se u svom linearnom slijedu, sastoje od dvadeset različitih i standardnih građevnih jedinica, tj. aminokiselina, međusobno povezanih peptidnom vezom. Aminokiseline nekog proteina poredane su jedinstvenim u pojedinom organizmu. Poznavanje specifičnog slijeda aminokiselina, do kojeg se dolazi analitičkim tehnikama sekvenciranja proteina, u konačnici omogućuje identifikaciju organizma u kojemu je eksprimiran analizirani protein. Obzirom na ubrzani razvoj analitičkih tehnika, sekvenciranje proteina do određene mjere spada u rutinski postupak proteinskog istraživanja, a identifikacija se najčešće provodi tehnikama spektrometrije masa koje su u zadnjih dvadeset godina nadvladale ostale analitičke tehnike. Osjetljivost spektrometra masa danas omogućuje analizu uzorka atomolarne količine, a brzina i pouzdanost takvih instrumenata pruža očitavanje velikog broja slijedova aminokiselina u razumnom vremenu i s velikom točnošću. Proteinskoj analizi može se pristupiti na dva osnovna načina: pristup odozgor-nadolje ili pristup odozdo-nagore. Pristup odozgor-nadolje, rjeđe je korišten pristup, koji se temelji na analizi intaktnih proteina. Suprotno tome, učestaliji pristup odozdo-nagore temelji se na analizi peptida koji nastaju enzimskim cijepanjem ciljanih proteina specifičnim proteinazama.²

Proteinska istraživanja iz godine u godinu postaju sve točnija, pouzdanija, jednostavnija i robusnija, ali identifikacija proteina i dalje nailazi na brojne prepreke. U ovom seminarskom radu predstavljena je tehnika za nedvojbenu identifikaciju proteina kao kompetentnu tehniku nad klasičnim metodama analiza proteina.

§ 2. ANALITIČKE TEHNIKE U PROTEOMICI

Prvi i izuzetno važan dio proteomskog istraživanja jest priprema uzorka za identifikaciju spektrometrijom masa. Tehnika odozgor-nadolje (*eng. top-down*) zahtijeva ekstrakciju proteina iz analiziranih uzorka, dok je za tehniku odozdo-nagore (*eng. bottom-up*) potreba i odgradnja, tj. cijepanje proteina ekstrahiranih iz stanica, tkiva ili organa (Slika 1). Pristup analize intaktnih proteina tehnikom odozgor-nadolje najčešće se koristi za identifikaciju post translacijskih modifikacija i karakterizaciju proteina. Nasuprot toga, tehnikom odozdo-nadolje krajnji produkt su spektri iz kojih se može odrediti aminokiselinski slijed pojedinog peptida te se tako postepeno strukturira sekvenca analiziranog proteina. Ovakav pristup omogućuje identifikaciju proteina koju je moguće provesti na dva načina: pretragom proteomskih baza podataka ili sekvenciranjem proteina *de novo*.³



Slika 1. Shematski prikaz identifikacije proteina pristupom odozgo-nagore (A) i pristupom odozgor-nadolje (B)

Pretraga proteomskih baza podataka bazira se na metodi otiska prsta mase peptida (PMF, eng. *Peptide Mass Fingerprinting*). Metoda podrazumijeva da su dobiveni spektri smjese peptida, nakon analize spektrometrijom masa, svojevrsni otisak prsta polaznog proteina. Eksperimentalno dobivene mase spektra se, pomoću posebno razvijenih računalnih programa, uspoređuju s masama peptida koji su teorijskim putem, tj. *in silico* nastali cijepanjem analiziranog proteina. Ovakva je metoda ograničena na identifikaciju samo onih proteina koji se već nalaze u bazama podataka. Isto tako, pretraga cjelokupne baze podataka nije moguća zbog velikog broja informacija koji sadrže sve proteinske baze. Tako je identifikacija moguća samo ukoliko nam je prethodno poznata taksonomska vrsta bića analiziranog proteina te se pretraga sužava na samo jedno promatrano biće.

Sekvenciranjem peptida *de novo* moguće je identificirati i one proteine koji se ne nalaze u proteomskim bazama podataka te odrediti mutacije ili post translacijske kodifikacije. Ovom se metodom iz spektra dobivenog spektrometrijom masa kreira slijed aminokiselina ili slovni niz analiziranog peptida. Na kraju se identifikacija proteina provodi pretragom spektra iščitane sekvence peptida u bazi podataka, odnosno iščitavanjem reverzne translacije. Ovakvom je metodom moguće pretražiti spektre u cjelokupnim bazama i tako odrediti taksonomsku vrstu bića bez prijašnjeg znanja o vrsti analiziranog proteina.

2.1. Odgradnja proteina specifičnim proteinazama

Identifikacija tehnikom odozdol nagore provodi se analizom proteinskih fragmenata nastalih enzimskom ili kemijskom odgradnjom proteina. Specifične proteinaze cijepaju protein na specifičnim mjestima aminokiselinskog slijeda. Neki od proteolitičkih reagensa navedeni su u tablici 1. od kojih se najčešće koristi tripsin. Odgradnja proteina tripsinom može se odvijati u otopini ili gelu ukoliko se nakon ekstrakcije proteini razdvajaju elektroforetskim tehnikama.⁴ Odgradnjom proteina tripsinom ujedno nastaju peptidi optimalne dužine (oko 30 aminokiselina) za analizu spektrometrijom masa. Nastali peptidi nakon digestije sadrže bazične aminokiseline arginina i lizina na C-kraju čime je dodatno olakšana njihova analiza spektrometrijom masa.⁵

Tablica 1. Najčešće korištene proteinaze i kemijski reagensi za odgradnju proteina. Aminokiseline ispred ili iza kojih se protein cijepa označene su jednoslovnim kraticama, a X označava bilo koju aminokiselinu²

Proteinaza	Mjesto cijepanja peptidne okosnice
Kimotripsin	FX, YX, WX, LX, MX, IX, SX, TX, VX, HX, GX, AX
Tripsin	KX, RX EX i DX u fosfatnim puferima
Glu-C	EX u NH ₄ HCO ₃ puferu
Lys-C	KX, NX
Arg-C	RX, KX
Asp-N	XD, XC, XE
V8	EX
Kemijski reagensi	Mjesto cijepanja peptidne okosnice
Cianogenbromid (CNBr)	XM
Hidroksilamin	NG

2.2. Spektrometrija masa

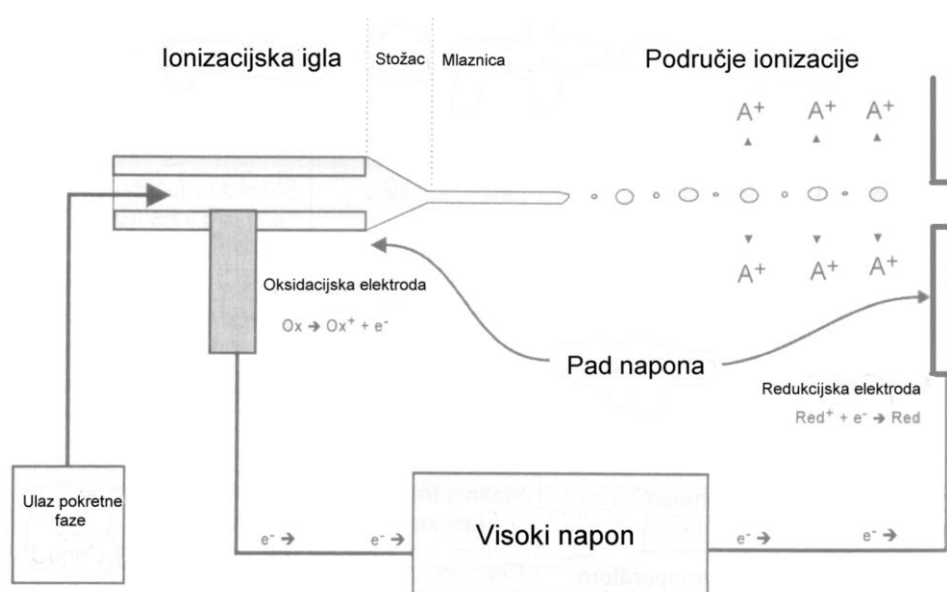
Nakon pripreme uzorka, analiza dobivenih peptida vrši se tehnikama spektrometrije masa. Prije usavršavanja spektrometrije masa korištene su kemijske ili enzimске metode za ispitivanje proteina. Proteini su bili sekvencirani postupnom kemijskom razgradnjom s N- prema C-kraju uz naknadnu identifikaciju dobivenih aminokiselina spektroskopskim metodama. Od prije tri desetljeća, spektrometrija masa postepeno je nadjačala spektroskopske i kromatografske metode sekvenciranja peptida i proteina, pružajući više informacija, brže vrijeme analiziranja, veću osjetljivost i točnost.

Spektrometrija masa (MS, eng. *Mass Spectrometry*) koristi se za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju pozitivnih $[M+H]^+$ ili negativnih $[M-H]^-$ iona u plinovitoj fazi, ovisno o njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Postupak analize podrazumijeva ionizaciju molekula u ionizacijskoj komori, a nastali se ioni zatim separiraju u analizatoru te detektiraju. Rezultat takve analize je spektar masa, gdje pojedini pik spektra predstavlja specifičnu vrijednost m/z detektiranog iona. Nastali ioni se mogu selektivno odijeliti u analizatoru tako da se jedan ion (ion prekursor) odabrane vrijednosti m/z odjeljuje u analizatoru te putuje dalje u drugi analizator gdje se fragmentira. Nastali se fragmenti ponovo odjeljuju na osnovi vrijednosti m/z te u konačnici detektiraju. Rezultat je tandemni spektar masa (MS/MS), koji sadrži informacije o m/z vrijednostima fragmenata i iona prekursora.

Dvije najčešće korištene tehnike ionizacije su matricom pomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (MALDI, eng. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) i ionizacija elektroraspršenjem (ESI, eng. *electrospray ionization*). Obje tehnike omogućuju efikasnu ionizaciju makromolekula bez njihove degradacije. Spektrometre masa moguće je direktno povezati s drugim analitičkim instrumentima. Najčešće vezani instrument je tekućinski kromatograf (LC, eng. *Liquid Chromatography*), a spojnica između uređaja LC i MS ima ulogu otparavanja tekućine, ionizacije neutralnih molekula nakon procesa desorpcije i uvođenja iona analita u analizator masa. Kromatografija ujedno ima i važnu ulogu u separaciji molekula analita prije analize zbog visoke osjetljivosti instrumenata spektrometra masa.⁶

2.2.1. Ionizacija elektroraspršenjem

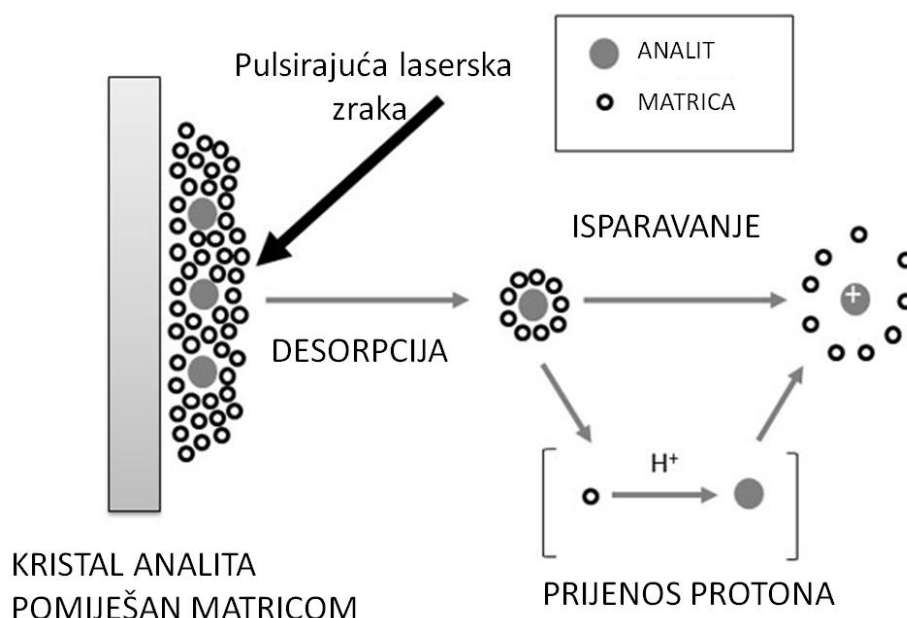
Ionizacija elektroraspršenjem je jedna od najzastupljenijih tehnika ionizacije u vezanom sustavu LC-MS i kompatibilna je sa svim analizatorima masa. Prikladan protok pri kojem se dobiva optimalna količina iona u ionizacijskoj komori je najčešće 50 μl u minuti. Ovisno o naponu na kapilari i kolektorskoj elektrodi, ionizacija može biti pozitivna i negativna. Ionizacija i vaporizacija događaju se pri atmosferskom tlaku u struji dušika. Optimalna temperatura ionizacije viša je od 100 °C. Pokretna faza i analit ulaze u ionizator kroz kapilaru (iglu), koja je elektroda pod visokim naponom (2-5 kV). Na vršku igle oblikuje se maglica sastavljena od kapljica otapala i nešto uparenog otapala. Kolektorska elektroda privlači tako nabijene kapljice i daje im dodatno ubrzanje. Kako otapalo otparava pod utjecajem struje dušika, temperature i električnog potencijala (ioni unutar kapljice otapala pokušavaju doći na površinu kapljice), tako se kapljice smanjuju. Nakon što se dovoljno smanje, tj. kada se svi ioni nalaze na površini kapljica, kulonove sile odbijanja postaju veće od sile napetosti površine te kapljice otparavaju, a analit kristalizira ili prelazi u plinovitu fazu. Oko iona analita se u trenutku napuštanja površine kapljice stvara sfera uparenog otapala. Nakon otparavanja kapljica, nastali kvazi-molekulski ioni prolaze kroz otvor iza kojeg se nalazi analizator masa u visokom vakuumu (Slika 2).



Slika 2. Procesi prijenosa naboja kod ionizacije elektroraspršenjem

2.2.2. Matricom pomognuta ionizacija laserskom desorpcijom

Matricom pomognuta ionizacija laserskom desorpcijom je tehnika ionizacije analita koja također uključuje desorpciju analita prije same ionizacije. Uzorak se u otopini miješa s matricom koja ima dvojak ulogu. Matrica mora biti dobar izvor protona kako bi nastali pozitivno nabijeni ioni analita. Osim toga, matrica mora tijekom kristalizacije na pločici stvarati smjesu s analitom koja može apsorbirati energiju lasera pri određenoj valnoj duljini i tako omogućiti prijelaz molekula matrice i analita u plinovito stanje. Laseri visoke energije proizvode pulsirajuću lasersku zraku koja u doticaju s površinom kristala isparava molekule UV-apsorbirajuće matrice. Pri tome u plinovito stanje prelaze i molekule analita okružene kristalima matrice. Često se kao laserski izvor koristi dušikov laser pri valnoj duljini 337 nm, a najčešće upotrebljavane matrice su sinapinska, nikotinska i aminobenzojeva kiselina. Međutim, vrsta matrica ovisi i o vrsti analita tako da se za određenu svrhu može primijeniti i više desetaka različitih matrica. Prilikom pripreve uzorka, otopina matrice u smjesi lako hlapljivog otapala i vode pomiješa se s otopinom analita od kojih se 1 μ l nanese na pločicu MALDI. Sušenjem nastaje kristalni oblik matrice i analita. Prikaz desorpcije i ionizacije molekula matrice i analita dana je na slici 3.⁷



Slika 3. Proces desorpcije i ionizacije u matricom pomognutoj ionizaciji desorpcijom laserskog zračenja

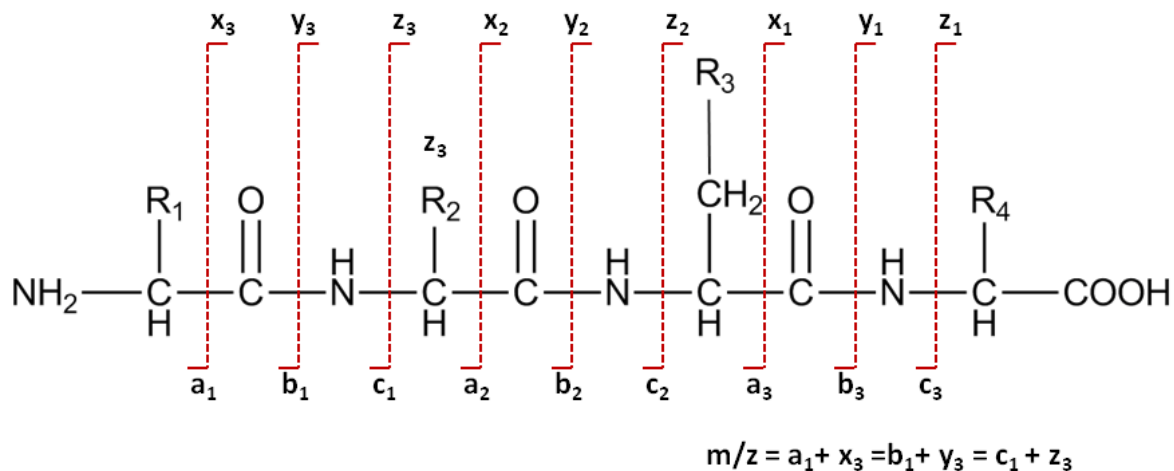
Ovakvom načinu analize nedostaje kromatografska komponenta direktno povezana sa spektrometrom masa. Nadomjestak tome koriste se tehnike ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE, eng. *Solid Phase Extraction*), ZipTip ili iskapavanjem eluata s kapilarne tekućinske kromatografske kolone. Tehnika analize MALDI zahtijeva najmanju količinu analita od svih tehnika analize proteina, pa su moguće analize proteina koncentracije atomolova.

2.2.3. Tandemna spektrometrija masa

Masa peptida i nativnih proteina moguće je odrediti spektrometrijom masa, ali za strukturnu karakterizaciju peptida i proteina potrebna je daljnja fragmentacija peptidnih iona, tj. analiza MS/MS. Način fragmentacije uvelike ovisi o uvjetima ionizacije, građi kolizijske ćelije, inertnom plinu (Ar, N₂, zrak, itd.) i vrsti instrumenta. Osnovni uvjet za detekciju nastalih fragmentnih iona, ali i iona prekursora, jest da moraju biti nabijeni. Pozitivni ionski fragmenti najčešće nastaju dodatkom protona ili adukcijom iona natrija, kalija, amonija ili organskih molekula. Kako bi nastali negativni ionski fragmenti, potrebno je ukloniti proton analiziranog peptida.⁸

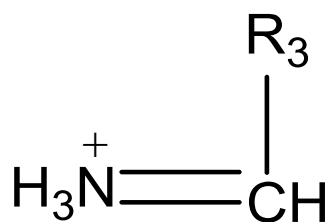
Najčešće korištena tehnika fragmentacije jest kolizijom inducirana disocijacija (CID, eng. *Collision Induced Dissociation*). Pri takvoj vrsti fragmentacije ioni prekursori stupaju međusobno u interakciju ili u interakciju s inertnim plinom (Ar, N₂, zrak, itd.). Interakcije rezultiraju fragmentacijom peptida ili proteina na specifičnim mjestima strukture peptida.

Detekcijom fragmenata nastaje spektar MS/MS koji nosi informaciju o peptidnoj sekvenci. Ionski produkti nastali fragmentacijom iona prekursora označavaju se definiranom nomenklaturom u spektrometriji masa i označavaju se slovima a_n, b_n i c_n odnosno z_n, x_n i y_n ovisno o tome jesu li nastali cijepanjem C- odnosno N-kraja peptida (Slika 4). Tehnikom ionizacije MALDI nastaju isključivo jednostruko nabijeni ioni, dok su tehnikom elektroraspršanja jednostruko nabijeni ioni rijetko prisutni. Ujedno su proteini i peptidi u većini slučajeva pozitivne molekule što ih čini pogodnim za analizu MS ili MS/MS u pozitivnom načinu rada spektrometra masa. Analiza negativnih peptidnih iona radi se uz dodatnu pripremu uzorka ili pri posebnim uvjetima stoga se takve analize rijetko provode.



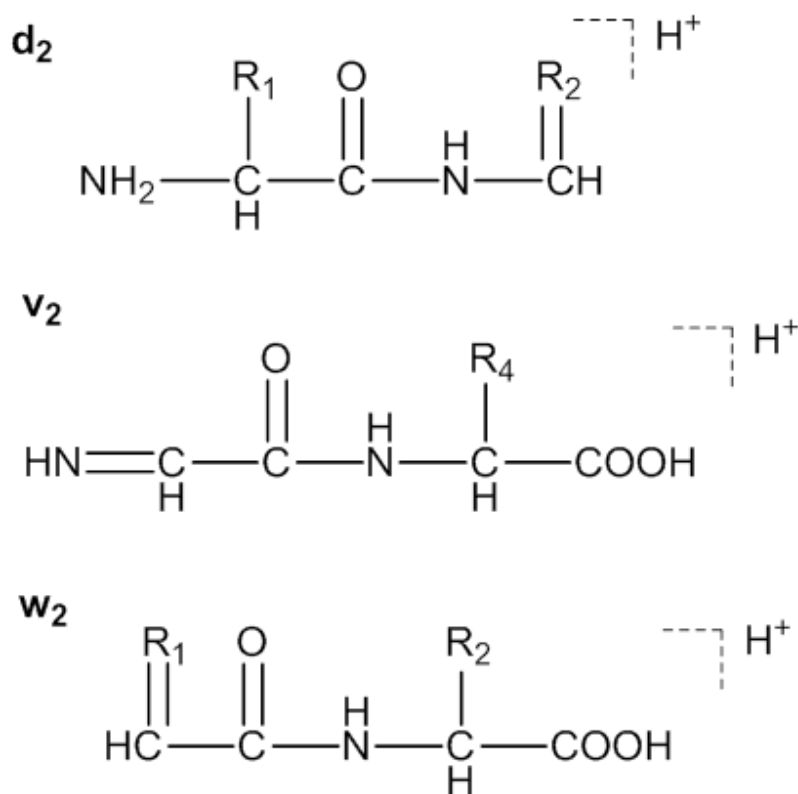
Slika 4. Prikaz svih fragmenata proteinskih iona definiranom nomenklaturom u spektrometriji masa. Subskript fragmenata (1, 2 i 3) označava redni broj aminokiseline u peptidnom lancu

Osim jednostrukog cijepanja peptidne okosnice postoji mogućnost nastajanja ioniziranih fragmenata internom pregradnjom i kombinacijom više iona. U području do m/z 200 često se mogu uočiti interni fragmenti odnosno imonij ioni koji nastaju daljnjom fragmentacijom već nastalih a i y iona (Slika 5). Prisutnost takvih iona u spektru MS/MS naziva se još i dijagnostičkim ionima jer potvrđuju prisutnost određene aminokiseline u fragmentiranom peptidu.



Slika 5. Strukturni prikaz imonij iona

Uz osnovne fragmentirane ione peptida (a, b, c, y, x i z), eksperimentalnim uvjetima u kolizijskoj ćeliji pregradnjom u plinovitoj fazi mogu nastati i satelitni ioni. Satelitni ioni označavaju se kao d, v i w (Slika 6), a pomažu kod identifikacije izobarnih iona aminokiselina (npr. izoleucina i leucina) te tako omogućuju potpunu identifikaciju primarnog slijeda peptida ili proteina.⁹

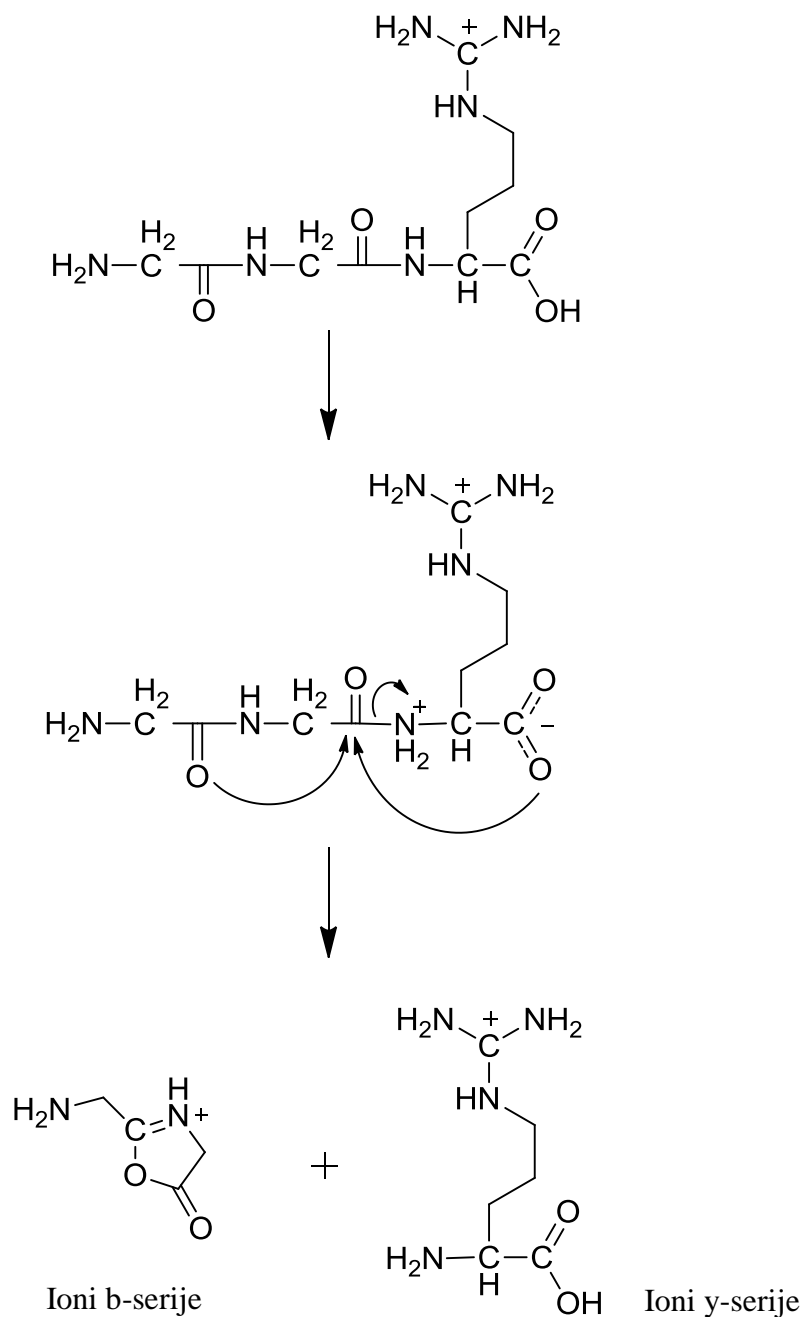


Slika 6. Strukturni prikaz satelitnih iona

2.2.4. Fragmentacija protoniranih peptida

Primjena spektrometrije masa za određivanje strukture proteina oslanja se na interpretaciju spektra fragmeniranih peptida. Model pokretnog iona (eng. *mobile proton*) smatra se sveobuhvatnim principom interpretacije spektra MS/MS koji opisuje način disocijacije protoniranih peptida u plinskoj fazi. U osnovi, model pretpostavlja da zbog različitih funkcionalnih skupina, molekule peptida mogu biti protonirane na bočnim ograncima aminokiselina, N-kraju peptida te atomima kisika i dušika peptidne okosnice. Takvi protonirani peptidi metodama meke ionizacije (ESI i MALDI) u plinskoj fazi lokaliziraju pozitivan naboj na bazičnim mjestima u molekuli kao što u N-kraj i bočni ogranci aminokiselinskih ostataka, osobito arginin, lizin i histidin.¹⁰

Određeni peptidi posjeduju mjesta u molekuli, koja su energetska ili kinetički favorizirana za protonaciju. Takva mjesta pripadaju ionima peptida nastalih triptičkom odgradnjom proteina koji se kasnije ioniziraju tehnikama MADLI ili ESI. Kako je spomenuto u poglavlju 2.1, peptidi nastali triptičkom odgradnjom sadrže bazične bočne ogranke lizina ili arginina na C-kraju što su ujedno i favorizirana mjesta protonacije. Preostala mjesta peptida, koja su nepovoljnija za protonaciju, postaju u potpunosti protonacijski nedostupna zbog povećanja interne energije pepida uslijed CID fragmentacije. Povećanjem interne energije nastaju i reaktivni međuproducti, a to su protonirani peptidni izomeri s protonom na dušikovom atomu peptidne veze. Prema modelu pokretnog iona, proton prisutan na dušiku reaktivnog međuproducta migrira na kinetički favorizirano mjesto čime dolazi do disocijacije peptidne veze i nastanka iona b- i y-serije (Slika 7).¹¹



Slika 7. Mehanizam fragmentacije peptida, čime nastaju b- i y-ioni prema modelu pokretnog iona

Iako teorijski detaljno razjašnjen, način fragmentacije peptidnih iona teško je previdjeti. Općeniti zaključak je da će prilikom fragmentacija protoniranih peptida u plinskoj fazi najprije doći do disocijacije peptidne veze čime će najzastupljeniji fragmentni ioni u spektru MS/MS biti b- ili y-serije.

2.3. Specifično obilježavanje peptida u svrhu olakšanog cijepanja peptidne okosnice

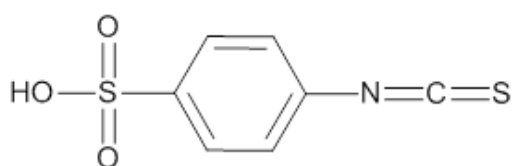
Specifično obilježavanje peptida ili derivatizacija koristi se kao sredstvo za kemijski aktiviranu fragmentaciju (CAF, eng. *Chemically Activated Fragmentation*). Razvoj takve tehnike započeo je 1990-it godina, a prvi je puta uočena oksidacijom ogranaka triptičkih peptida koji na C-kraju završavaju argininom.¹² Kroz godine, CAF je služio različitim svrhama te su se primjenjivali mnogobrojni reagensi za obilježavanje peptida. Bez obzira na brojnost i raznolikost reagensa CAF, karakteristike optimalnog reagensa za obilježavanje su:

- brza i selektivna reakcija obilježavanja bez nužnog pročišćavanja smjese peptida prije analize spektrometrijom masa,
- kompatibilnost reagensa s tehnikama ionizacije i analizatora masa,
- bolja fragmentabilnost i jednostavniji fragmentacijski put obilježenog u odnosu na nativni peptid,
- mogućnost detekcije strukturno specifičnih fragmentnih iona.^{2,13}

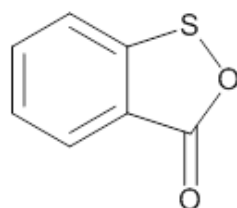
Kemijsko modificiranje peptida postao je rutinski postupak pripreme uzorka tehnikom odozdol nagore koji omogućuje pouzdanu identifikaciju peptida spektrometrijom masa. Postupak derivatizacije najčešće se upotrebljava prilikom analize peptida tehnikom MALDI-MS/MS. Kemijske modifikacije peptida generalno se mogu podijeliti u tri skupine: sulfonacija N-kraja, gvanidacija lizina na C-kraju i alkilacija cisteina. U prvoj spomenutoj skupini, sulfhidridne skupine blokiraju se postupkom alkilacije kako bi se spriječilo stvaranje neželjenih disulfida, dok u preostale dvije skupine modifikacije mijenjaju polaritet peptida poboljšavajući njihovu ionizaciju ili fragmentaciju.¹⁴

2.3.1. Sulfonacija N-kraja peptida

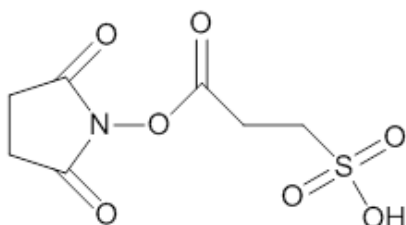
Sulfonacija N-kraja peptida pokazala se kao najuspješnija metoda za dobivanje interpretativno jednostavnijih spektara. Najčešće korišteni reagensi CAF za sulfonaciju N-kraja peptida su 4-sulfofenil-izotiocijanat (SPITC), NHS ester 2-sulfopropionske kiseline (Ettan CAF) i ciklički anhidrid 2-sulfobenzojeve kiseline (SBAn) (Slika 8).²



4-sulfofenil-izotiocijanat
SPITC



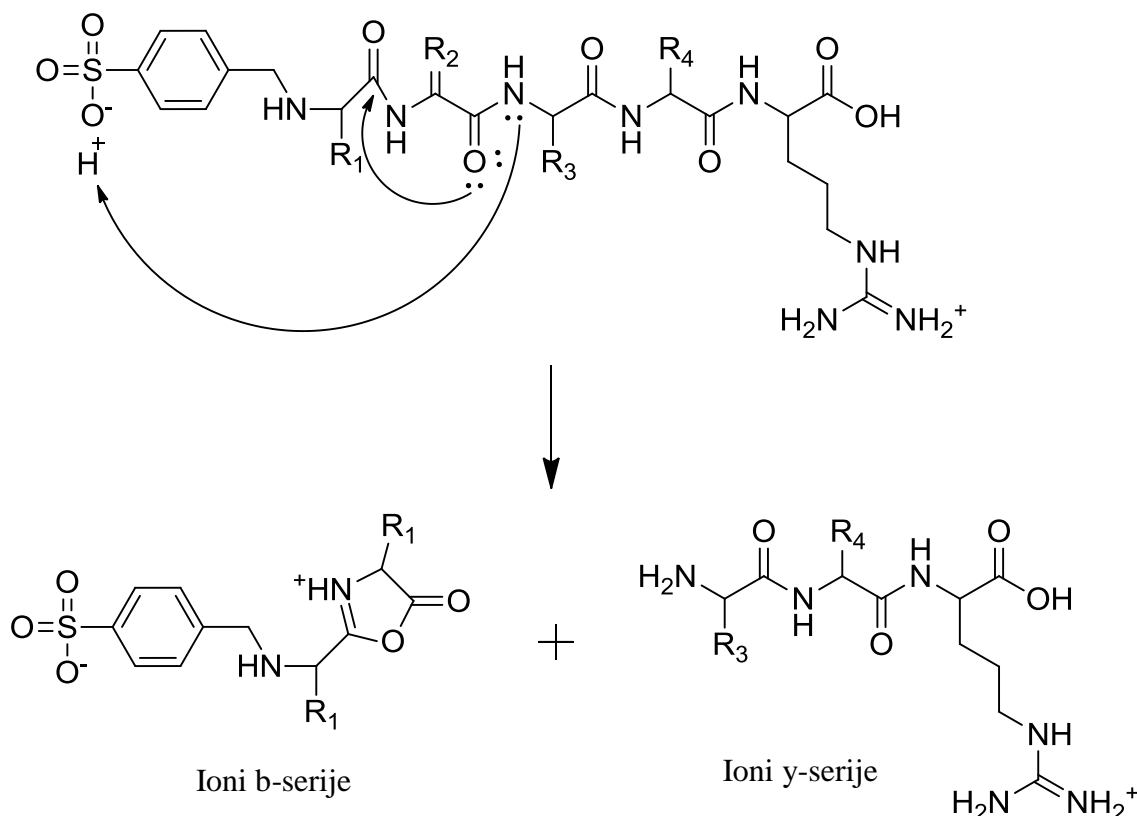
Ciklički anhidrid 2-
sulfobenzojeve kiseline
SBAn



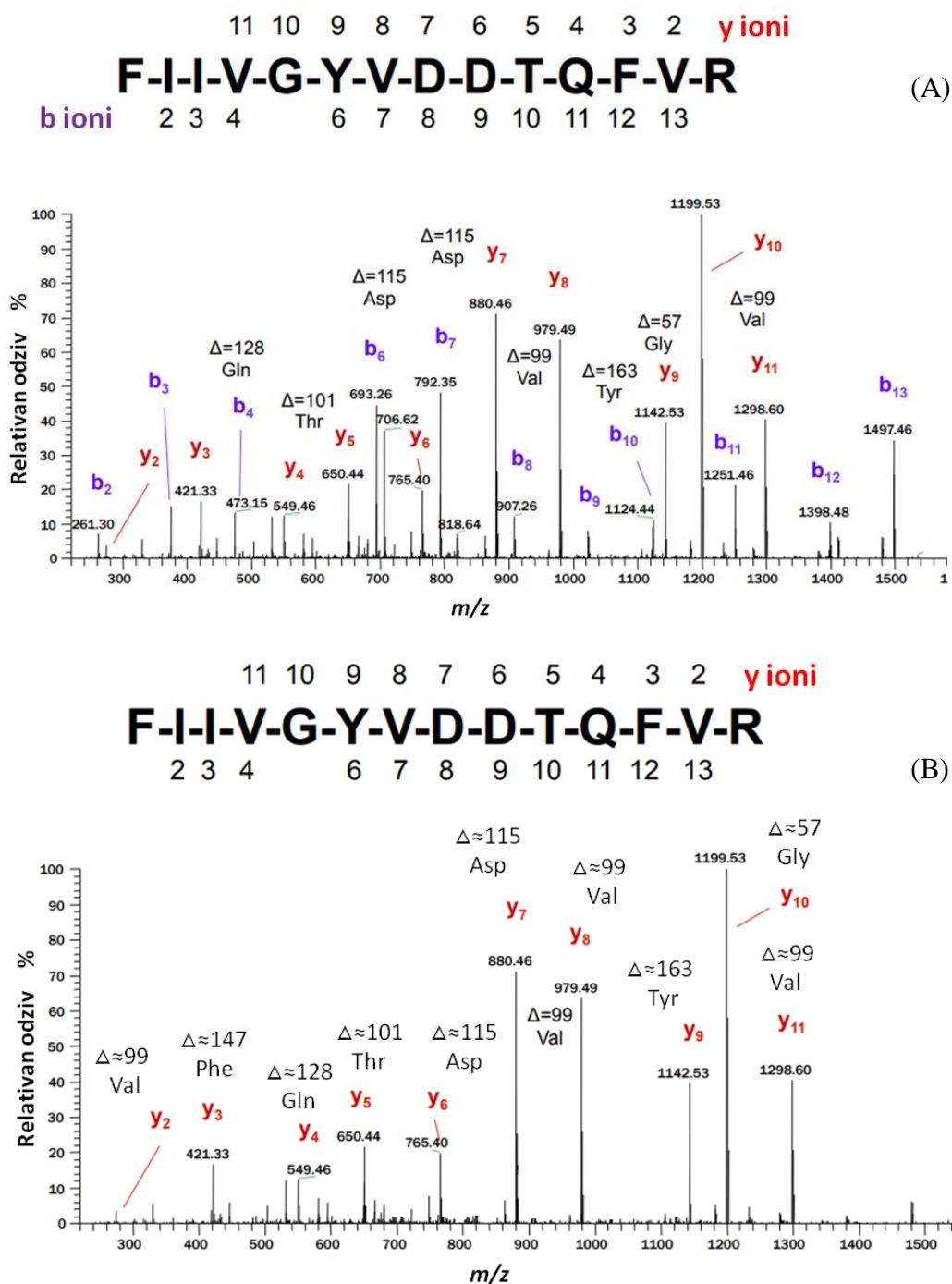
NHS ester 2-
sulfopropionske kiseline
Ettan CAF

Slika 8. Strukture najpoznatijih reagensa CAF za specifično obilježavanje N-kraja peptida

Sulfonacijom N-kraja triptičkog peptida nastaje Zwitterion ${}^{-}\text{O}_3\text{-R-A}_1\text{-A}_2\text{-A}_3\text{-A}_4\text{-A}_5\text{-X}^{+}$ gdje R označava ostatak derivatizacijskog reagensa, A bilo koju aminokiselinu te X arginin ili lizin. Takav Zwitterion, kao što je vidljivo i iz formule, u plinovitom stanju nosi pozitivan i negativan naboj. Ionizacija pomoću tehnike MALDI kemijski obilježenog peptida, kiseli se N-kraj peptida deprotonira dok se bazične skupine lizin i arginin na C-kraju protoniraju. Protonacijom C-kraja (lizin i arginin), najbazičnije mjesto peptida postaje okupirano te, prema spomenutom modelu pokretnog protona, amidne skupine postaju favorizirano mjesto protonacije. Rezultat toga je disocijacija peptidne veze čime analizom MALDI-MS/MS nastaju ioni b- i y-serije. Međutim, b-ioni, koji su ujedno i Zwitterioni, nisu detektibilni jer se negativan naboj sulfonske skupine neutralizira pozitivnim nabojem C-kraja b-iona (Slika 9). Posljedično se spektar MS/MS pretežno sastoji od signala y-iona čime je interpretacija spektra znatno olakšana.² Razlika spektra MS/MS koji sadrži signale samo iona y-serije i spektra istog peptida koji sadrži signale iona y- i b-serije prikazana je na slici 10.



Slika 9. Mehanizam fragmentacije triptičkog peptida obilježenim sulfonskim reagensom SPITC



Slika 10. Spektar peptida F-I-I-V-G-Y-V-D-D-T-Q-E-V-R koji sadrži ione b- i y-serije (A) i spektar istog peptida koji sadrži ione y-serije (B)¹⁵

Metode specifičnog obilježavanja N-kraja peptida sulfonacijom ima i nekoliko nedostataka. Reakcije derivatizacijskih reagensa su nespecifične što može uzrokovati vezanje reagensa CAF na bočne ogranke (npr. lizina). Isto tako, u reakcijama reagensa CAF s peptidom može doći do neželjene kemijske degradacije peptida.¹⁴

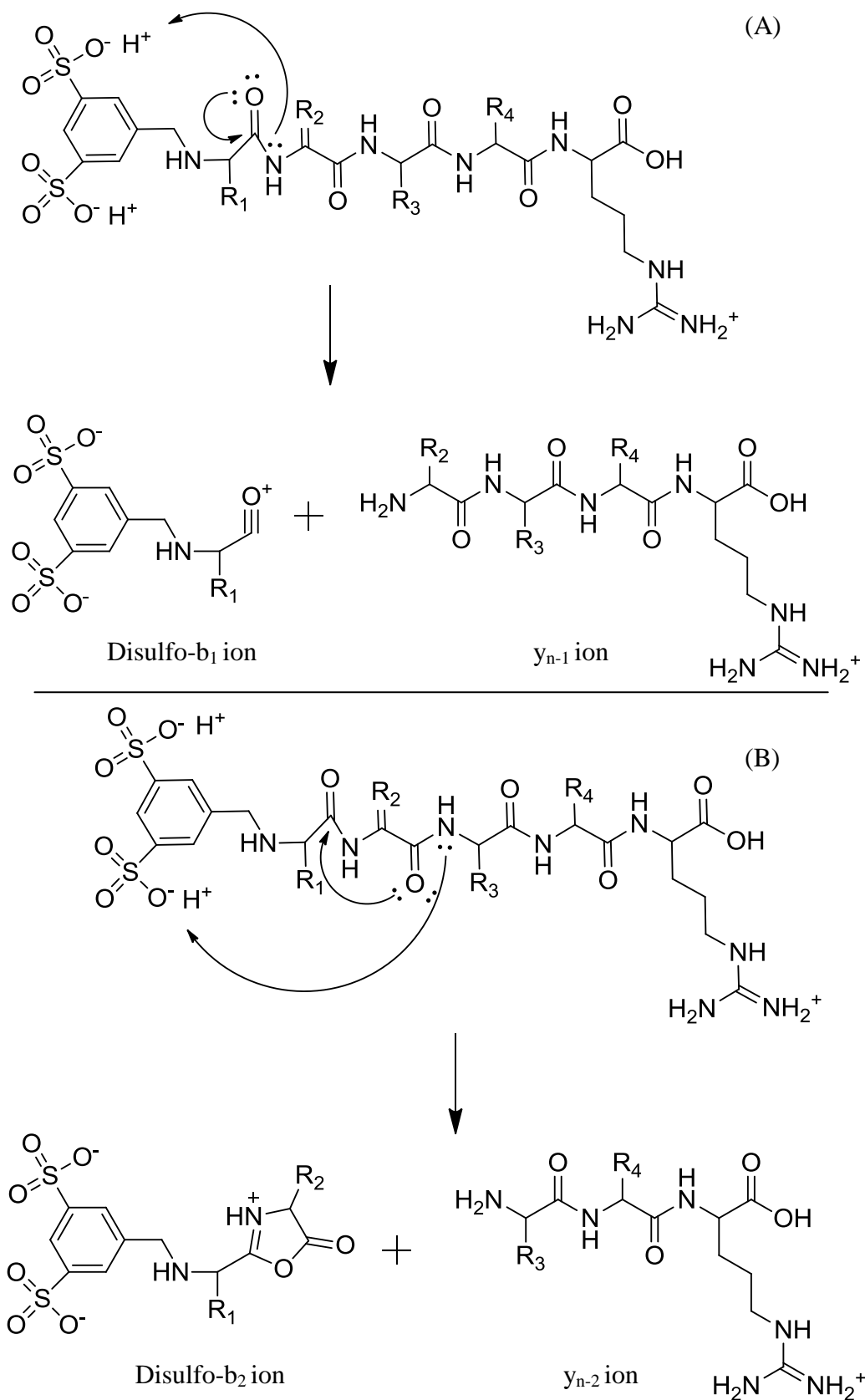
Kako bi se uklonile navedene mane, često se derivatizacija peptida provodi u dva koraka. Ta metoda najprije uključuje postupak gvanidacije te nakon toga sulfonacije. Dodatni korak gvanidacije sprječava neželjeno obilježavanje terminalnog lizina, ali dodatni korak pripreve uzorka nerijetko rezultira smanjenjem koncentracije peptida. Butorac i suradnici razvili su metodu sulfonacije N-kraja peptida reagenskom SPITC kako bi izbjegli korak gvanidacije.¹⁴ Promjenom pH reakcije otopine moguće je usmjeriti reakciju vezanja sulfonskog reagensa CAF prema N-kraju peptida. Kiseli uvjeti pokazali su povećanje intenziteta signala za 6 do 10 puta u odnosu na reakciju provedenu u bazičnim uvjetima prilikom vezanja reagensa SPITC za N-kraj peptida.¹⁴ Izotiocijanatna skupina reagensa SPITC može se neželjeno vezati na prolin, lizin i tirozin u peptidu kojima je pK_a vrijednost redom 10,6, 10,5 i 10,0 dok je pK_a vrijednost N-kraja peptida otprilike 8. Ujedno, lizin koji se nalazi na samom kraju triptičkog peptida najizloženiji je neželjenoj reakciji s reagensom SPITC. Smanjenjem vrijednosti pH reakcijske otopine, izotiocijanatna skupina ima dovoljan afinitet vezanja na amino skupinu N-kraj peptida, ali nedovoljan za stupanje u reakciju s ostalim bazičnijim skupina.

2.4. Metoda nedvojbene identifikacije proteina spektrometrijom masa

Derivatizacijski reagensi najčešće se u spektrometriji masa koriste kako bi se poboljšala osjetljivost, odnosno ionizacija i fragmentacija peptida. Međutim, određeni reagensi CAF, osim povećanja osjetljivosti, omogućuju analizu peptida u pozitivnom i negativnom načinu spektrometra masa.

Gledano sa stajališta spektrometrije masa, klasičnim se analizama MS/MS nederivatiziranih peptida dobivaju interpretativno složeni spektri. Neusmjereni put fragmentacije peptida u fragmentacijskoj ćeliji kao i veliki broj signala često rezultiraju nepotpunim fragmentacijskim nizovima i nemogućnost asignacije serije iona peptida. Iz tog je razloga razvijen disulfonski reagens CAF koji obilježava N-kraj peptida i ima dvojaku ulogu. Prije svega, omogućuje bolju ionizaciju i usmjerava fragmentacijski put iona, ali ujedno daje predominantnu seriju samo jednog tipa iona u pozitivnom načinu rada spektrometra masa i drugog tipa iona u negativnom načinu rada.

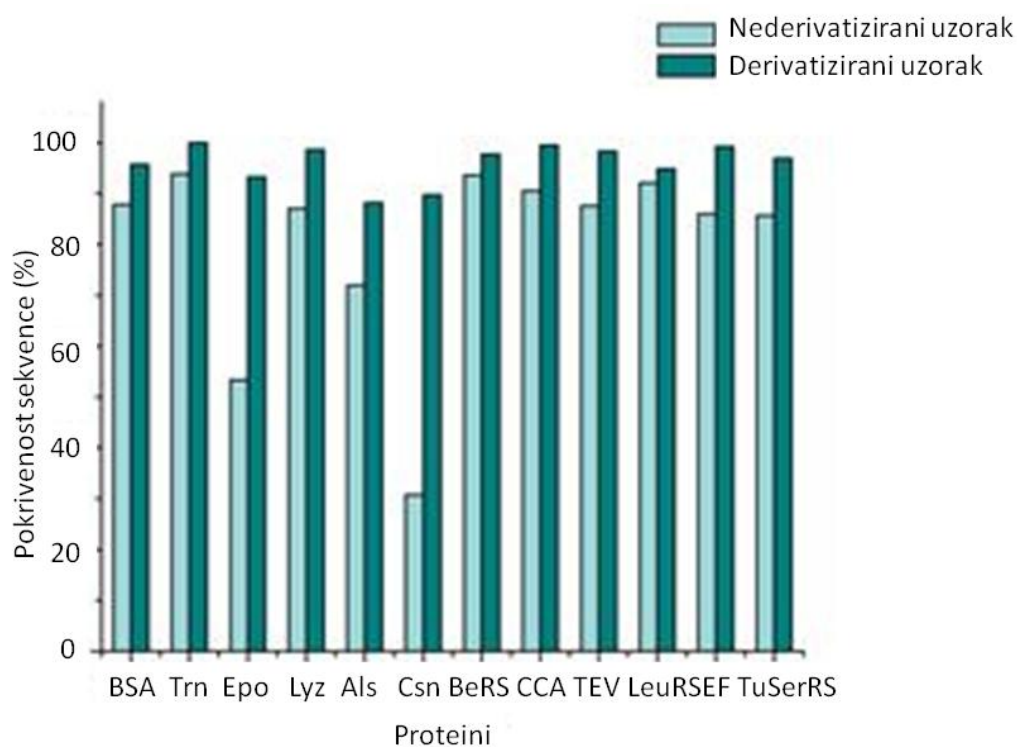
Kao što je ranije navedeno, standardnom metodom obilježavanjem N-kraja peptida sulfonskim reagensom (npr. SPITC) nije moguće detektirati nastale Zwitterione b-serije. Međutim, dodatkom još jedne sulfonske skupine nastaje b-ion negativnog naboja koji je moguće snimiti negativnim načinom rada MS-a. Nastali ioni b-serije, za razliku od iona y-serije, u svojoj strukturi zadržavaju reagens CAF (Slika 11). Bez obzira na povećanje mase b-iona, razlika susjednih signala spektra MS/MS i dalje je pokazatelj aminokiselinskog slijeda analiziranog peptida.



Slika 11. Dvije reakcije (A) i (B) fragmentacije triptičkog peptida obilježenog reagensom CAF s dvije sulfonske skupine

Analiza peptida u pozitivnom i negativnom načinu rada, tj. analizom y- i b-iona istog uzorka, doprinosi većoj pokrivenosti peptidne sekvence proteina. Veća pokrivenost sekvence ujedno rezultira nedvojbenoj identifikaciji analiziranog proteina. Takvom je analizom moguće identificirati i razlikovati genomski slične i evolucijski bliske organizme (npr. *E. coli* i *K. pneumoniae*) što prijašnjim metodama nije bilo moguće.

Usporedna analiza uzorka peptida pripremljenim klasičnim postupkom bez specifičnog obilježavanja te obilježavanjem istih peptida na N-kraju disulfonskim reagensom CAF koji omogućuje analizu pozitivnih i negativnih iona pokazala je veću pokrivenost proteinske sekvence obilježenog uzorka za 59%.¹⁶



Slika 12. Pokrivenost proteinske sekvence (%) nederivatiziranog i derivatiziranog uzorka različitih proteina¹⁶

§ 3. ZAKLJUČAK

Svrha proteomskih istraživanja bazira se pojavije na identifikaciji proteina analizom peptida dobivenih cijepanjem proteina, uz kvantitativne usporedbe ekspresije, nakon inicijalnog postupka pretrage proteinskih baza podataka. Najčešća metoda koja se koristi u takvim istraživanjima je pristup odozdo-nagore, gdje se proteinski uzorak odgradnjom specifičnim proteinazama razgrađuje na peptide. Analizom nastalih peptida spektrometrijom mase važno je poznavati mehanizam fragmentacije, kako bi se mogli asignirati nastali spektri.

Da bi se proširila pretraga baze tj. definiralo biće ili homološki pretražilo puno šire, u tu se svrhu koriste reagensi za kemijski aktiviranu fragmentaciju. Ti reagensi usmjeravaju mehanizam fragmentacije prema peptidnoj vezi, čime nastaju ioni pepdinih fragmenata gotovo isključivo jedne serije iona (npr. u pozitivu y-ioni, a u negativu b-ioni). Na taj način se može načiniti iščitavanje reverzne translacije sa amino kiselinskim sekvencama, koje su nepogrešivo iščitane s lijevog i desnog kraja proteina (N- tj. C-kraja), preklopljene i odaslane u bazu na pretragu kao slovni niz. Takav način pretrage može, za razliku od preklapanja analizom dobivenih spektara sa *in silico* produciranim spektrima, odrediti vrstu nakon pretrage cjelokupne baze i dodatno načiniti homološku pretragu baze.

Različite metode obilježavanja peptida reagensima CAF olakšale su analizu proteina u smislu ionizacije i usmjerene fragmentacije, no ne i bolje pokrivenosti sekvence prilikom identifikacije analiziranog uzorka. Reagens koji obilježava peptid na N-kraju te sadrži dvije sulfoksi skupine, uspješno je našao aplikativnu svrhu prilikom ionizacije peptida u pozitivnom, ali i negativnom načinu rada spektrometra masa. Tako je usmjerenom fragmentacijom u pozitivnom načinu MS analize moguće detektirati gotovo jedino ione y-serije peptida, dok se negativnom MS analizom detektiraju gotovo isključivo ioni b-serije. Kako je već bilo pojašnjeno, a ovdje će se ponovno naglasiti, dobivena dva spektra s dvije serije iona istog peptida rezultira većoj pokrivenosti sekvence, a time i nedvojbenu identifikaciju proteina.

§ 4. LITERATURNI IZVORI

1. Tyers, M. & Mann, M. From genomics to proteomics. *Nature* vol. 422 193–197 (2003).
2. Dodig, I. Iščitavanje reverzne translacije sekvenciranjem peptida de novo tehnikama tandemne spektrometrije masa. (2016).
3. Washburn, M. P. & Yates, J. R. Analysis of the microbial proteome. *Current Opinion in Microbiology* vol. 3 292–297 (2000).
4. Choksawangkarn, W., Edwards, N., Wang, Y., Gutierrez, P. & Fenselau, C. Comparative study of workflows optimized for In-gel, In-solution, and on-filter proteolysis in the analysis of plasma membrane proteins. *J. Proteome Res.* **11**, 3030–3034 (2012).
5. Baird, T. T. & Craik, C. S. Trypsin. in *Handbook of Proteolytic Enzymes* vol. 3 2594–2600 (Elsevier Ltd, 2013).
6. Kadakeri, S. *et al.* Protein synthesis and characterization. in *Artificial Protein and Peptide Nanofibers* 121–161 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/b978-0-08-102850-6.00006-1.
7. Solid mixed matrices and their advantages in matrixassisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry.
https://www.researchgate.net/publication/311699628_Solid_mixed_matrices_and_their_advantages_in_matrixassisted_laser_desorptionionisation_time-of-flight_mass_spectrometry (5.5.2021.).
8. Brewis, I. A. & Brennan, P. Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins. in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* vol. 80 1–44 (Academic Press Inc., 2010).
9. Rousecor, J. C., Yu, W. & Martin, S. A. A comparison of the peptide fragmentation obtained from a reflector matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight and a tandem four sector mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **6**, 822–835 (1995).
10. Kohtani, M., Schneider, J. E., Jones, T. C. & Jarrold, M. F. The mobile proton in polyalanine peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 16981–16987 (2004).
11. Bythell, B. J., Suhai, S., Somogyi, Á. & Paizs, B. Proton-driven amide bond-cleavage

- pathways of gas-phase peptide ions lacking mobile protons. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14057–14065 (2009).
12. Cox, K. A., Gaskell, S. J., Morris, M. & Whiting, A. Role of the site of protonation in the low-energy decompositions of gas-phase peptide ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**, 522–531 (1996).
 13. Willard, B. B. & Kinter, M. Effects of the position of internal histidine residues on the collision-induced fragmentation of triply protonated tryptic peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 1262–1271 (2001).
 14. Butorac, A. *et al.* Benefits of selective peptide derivatization with sulfonating reagent at acidic pH for facile matrix-assisted laser desorption/ionization de novo sequencing. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **30**, 1687–1694 (2016).
 15. Carr, S. *Fundamentals of Biological Mass Spectrometry and Proteomics.*
 16. HIGHER SEQUENCE COVERAGE OF PROTEINS WITH UPLC/MS^E.
<http://rapidcell.proteinacrobat.com/application.html> (5.5.2021.).