

INTEGROVANÁ ŘEŠENÍ PRO PROTEOMICKÉ PRACOVNÍ POSTUPY – SIGMA-ALDRICH

KLAUS HERICK

*SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Eschenstr. 5, D-82024 Taufkirchen, Německo
kherick@europe.sial.com*

Došlo 5.9.05, přijato 9.10.05.

Klíčová slova: fosfopeptidy, deglykosylace, kvantifikace, trypsin, elektroforéza

Obsah

1. Úvod
2. Příprava vzorku pro 2D-gelovou elektroforézu
 - 2.1. C7BzO a jiné detergenty kompatibilní s elektroforézou
 - 2.2. Odstranění albuminu a IgG
 - 2.2.1. Technologie pro odstranění albuminu a IgG založená na barvivu
 - 2.2.2. Technologie pro odstranění albuminu a IgG založená na protilátkách
3. Příprava vzorku pro hmotnostní spektrometrii
 - 3.1. Analýza fosfopeptidů
 - 3.1.1. Analýza fosforylačních míst proteinu využitím obohacení PHOS-Select™ před MS
 - 3.1.2. Obohacení fosfopeptidu
 - 3.2. Analýza glykopeptidů
 - 3.2.1. Enzym PNGasa F: Účinná N-deglykosylace v analýze glykoproteinů
 - 3.2.2. Účinná deglykosylace proteinu v gelu
 - 3.3. Přístupy štěpení proteinu
 - 3.3.1. Trypsin proteomické čistoty
 - 3.3.2. Výběr proteasy
 - 3.3.3. Protease Profiler
 - 3.4. Účinná mikroizolace a guanidylace peptidů přímo z terčů MALDI
 - 3.4.1. Účinnost guanidylace
4. Kvantitativní proteomika
 - 4.1. Zavedení stabilních izotopů pro MS
 - 4.2. Sigma zakázkový servis AQUA-peptidová syntéza
 - 4.2.1. Princip Protein-AQUA
 - 4.2.2. Výběr optimálního AQUA-peptidu
 - 4.2.3. AQUA-peptidy
 - 4.3. Inkorporace ¹⁸O tryptinem pro analýzu diferenční exprese proteinu
 - 4.3.1. Metody značení

1. Úvod

Proteomické analýzy zahrnují mnoho stupňů od izolace buněčných komponent, přes elektroforetickou či chromatografickou separaci jednotlivých proteinů až po analýzu hmotnostní spektrometrií (MS). Klíčovým je vždy příprava vzorku, ať již pro primární separace nebo pro MS. Dalším důležitým aspektem proteomických experimentů je kvantifikace analyzovaných peptidových fragmentů metodou MS. V tomto článku jsou zmíněny základní postupy výše uvedených příprav vzorků a kvantifikace.

2. Příprava vzorku pro 2D-gelovou elektroforézu

Efektivní příprava proteomického vzorku zůstává problémem, protože neexistuje žádná univerzální metoda extrakce pro různé typy výchozích materiálů. Tento problém je zvláště významný, jedná-li se o membránové proteiny. Ačkoliv v posledních letech došlo k pokroku v rozpouštění membránových proteinů, základní otázkou zůstává výběr detergentu. Detergenty jsou klíčová činidla, která rozpouštějí proteiny a udržují je rozpouštěné během separace dvourozměrnou gelovou elektroforézou (2D elektroforéza). Problémy s rozpustností mohou nastat ve dvou stupních: (i) když jsou membrány rozpuštěny ve směsi detergent-chaotrop a (ii) během elektroforézy v prvním rozměru, když jsou proteiny separovány podle svých izoelektrických bodů (pI). Protein je ve svém pI vysoce agregovaný a je rozpouštěn v pufru s nízkou koncentrací soli nebo bez soli (vzorkový nanášecí pufr).

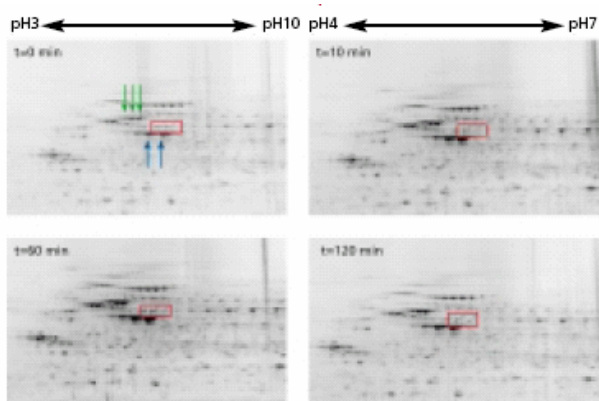
Z těchto důvodů byl pro testování detergentů v různých kombinacích (pro získání vzorků optimalizovaných pro další analýzy, jako je 2D elektroforéza) použit faktorizovaný maticový přístup. Na základě práce Dr. Thierry Rabillouda z CEA-Grenoble ve Francii byly pro optimalizovanou extrakci proteinu z různých zdrojů¹⁻⁵ zavedeny nové detergenty.

2.1. C7BzO a další detergenty kompatibilní s elektroforézou

Sady pro přípravu vzorku založené na C7BzO

Selekční metoda hledání optimálního detergentu je založena na použití ProteoPrep kitu pro extrakci vzorku buď se čtyřmi směsnými solubilizačními pufrů (katalogové číslo PROT-TOT) a nebo ProteoPrep sadě vzorkových detergentů s deseti různými detergenty (katalogové číslo PROT-DT).

Vynikající schopnost extrakce a solubilizace proteinu v různých typech tkání jako bakteriální, živočišné a rostlinné vykazují sulfobetainové detergenty C7BzO



Obr. 1. Identifikace proteinů indukovaných tepelným šokem v CHO buňkách

(katalogové číslo C0856) a ASB-14 (katalogové číslo A1346). Protože detergent ASB-14 ruší proteinovou kvantifikaci, byly vyvinuty dvě sady pro snadnou přípravu vzorku, které jsou založeny na C7BzO s optimalizovanými protokoly pro 2D elektroforézu. Jedná se o ProteoPrep univerzální extrakční kit (katalogové číslo PROT-TWO) a ProteoPrep membránový extrakční kit (katalogové číslo PROT-MEM). ProteoPrep univerzální extrakční kit umožňuje následnou izolaci frakcí rozpustných a membránových proteinů. V oddělených frakcích se tak získají jak cytoplasmatické, tak membránové proteiny. Kromě toho může být tato sada použita pro stanovení, zda je protein, který je předmětem zájmu, rozpustný ve vodě nebo jedná-li se o membránový protein. ProteoPrep membránová extrakční sada extrahuje pouze membránové proteiny. Je proto vhodná pro studium membránových proteomů jako jsou proteiny spojené s buněčnou signalizací. Příklad je na obr. 1, kde byl proveden experiment s tepelným šokem a proteiny byly extrahovány za optimalizovaných podmínek. Buňky byly extrahovány 2% C7BzO, který byl připraven v roztoku 7 M močoviny, 2 M thiomočoviny a 40 mM Tris pufru. Buněčné extrakty (250 μ g) byly fokusovány na pH 4–7 prouzcích s imobilizovaným pH gradientem (IPG proužky). SDS-PAGE byla provedena na 4 až 20% gelech. Srovnáním obrazů gelů a použitím softwaru (Nonlinear) pro 2-D elektroforetické analýzy byly identifikovány dva proteiny (označeny rámečky), které vykazují zvýšenou hladinu exprese jako funkci trvání tepelného šoku. Tyto proteinové proužky byly, společně s dalšími proteinovými markery (označené šipkami), vyříznuty, štěpeny a analyzovány MALDI-MS. Po vyhledání v databázi výsledné hmotnostní peptidové mapy byly markerové proteiny první sady identifikovány jako izoformy β -aktinu. β -Aktin má molekulovou hmotnost 40 kDa a pI přibližně 5,4. Markerové proteiny druhé sady byly identifikovány jako izoformy vimentinu. Vimentin má molekulovou hmotnost přibližně 57 kDa a pI 5,4 (obr. 1).

2.2. Odstranění albuminu a IgG

Hlavními přístupy při hledání cirkulačních biomarkerů jsou studium proteinového složení plasmy a séra. S velkým zájmem se v současné době studuje lidský sérový proteom, zejména kvůli možnosti identifikace biomarkerů určitých nemocí. Náročnost analýzy séra spočívá v širokém rozmezí koncentrací proteinů. Většina farmaceuticky zajímavých proteinů se vyskytuje v nízkých koncentracích a nadbytek albuminu a protilátek (především IgG), které dohromady tvoří více než 70 % sérových proteinů, tyto analýzy velmi komplikují. Odstranění albuminu a IgG zjednodušuje vizualizaci proteinů komigrujících s albuminem a IgG na gelu. Dále umožňuje použití vyšší nanášky vzorku (4 až 5 krát), a tím značně zlepšenou vizualizaci proteinů s nižším počtem kopií.

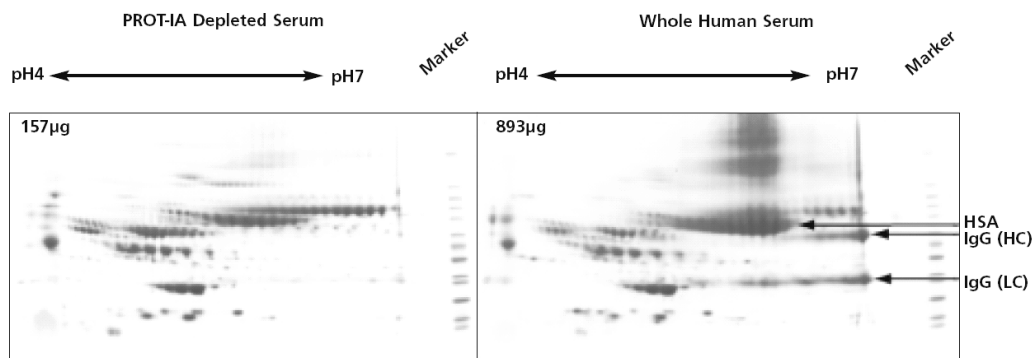
Sigma nabízí dvě sady pro odstranění IgG a albuminu, které využívají dvě rozdílné technologie: (i) ProteoPrep® Blue IgG kit pro odstranění albuminu a IgG (katalogové číslo PROT-BA) – je založena na patentované pryskyřici spojující vazbu přes Protein G a přes modrou barvu a (ii) agarosu s navázaným proteinem G – ProteoPrep® IA imunoafinitní IgG kit pro odstranění albuminu (katalogové číslo PROT-IA) – která je založena na malých ligandech rekombinantních protilátek navázaných na pryskyřici.

2.2.1. Technika pro odstranění albuminu a IgG založená na barvívě

ProteoPrep™ Blue Albumin a Kit pro odstranění IgG specificky odstraňují albumin a IgG z 25 vzorků lidského séra (25 μ l až 100 μ l) pro následnou analýzu metodou dvojrozměrné elektroforézy. Typicky je odstraněno 95 % albuminu a 80 % IgG ze 75 μ l lidského séra. Médium se vyznačuje nízkou nespecifickou vazbou, protože neobsahuje Cibacron® Blue (která je obecně známá vysokým nespecifickým vázáním nealbuminových proteinů). Reagencie této sady jsou v pufrch s močovinou místo v pufrch se solemi, což znamená, že vzorky séra zbavené albuminu mohou být aplikovány v 2D elektroforéze bez srážení proteinu. Fokusace proteinů na prouzcích s imobilizovanými pH gradienty (IPG) pro dvojrozměrnou elektroforézu proteinů a analýza MS v gelu štěpených proteinů je negativně ovlivněna (např. špatné rozlišení skvrn) přítomností solí nebo pufrů o vysokých koncentracích. Experimenty ukazují, že nahrazení solí močovinou umožní navázání albuminu za současné inhibice vazby nealbuminových proteinů.

2.2.2. Technika pro odstranění albuminu a IgG založená na protilátkách

Pryskyřice pro odstranění albuminu a IgG založené na protilátkách vykazují vyšší specifitu než pryskyřice založené na barvívě. Nicméně, pryskyřice založené na protilátkách mají obvykle nižší vazebnou kapacitu proteinu. Pro odstranění lidského albuminu a IgG byla vyvinuta nová



Obr. 2. Výhody séra zbaveného albuminu a IgG; z 50 μ l vzorku lidského séra byl použitím ProteoPrepTM imunoafinitního kitu pro odstranění albuminu a IgG (PROT-IA) odstraněn albumin a IgG. Poté byla provedena 2D elektroforéza s 15 μ l vzorku séra a sérum, zbaveným albuminu a IgG, použitím 11cm, pH 4-7 IPG proužků. Metodou ELISA bylo stanoveno, že došlo k 99% odstranění albuminu a IgG

imunoafinitní pryskyřice, která je založena na protilátkách s vysokou vazebnou kapacitou. Vazebné fragmenty použitých rekombinantních protilátek jsou malé (12 kDa) jednořetězcové proteiny, které jsou exprimovány v kvasinkách. Malé jednořetězcové fragmenty protilátek vykazují vysokou specifitu běžných IgG protilátek s molekulovou hmotností 150 kDa. Výhodou jejich použití je zvýšená stabilita, zvýšení koncentrace vazebných míst, a tím vazebné kapacity pro antigen.

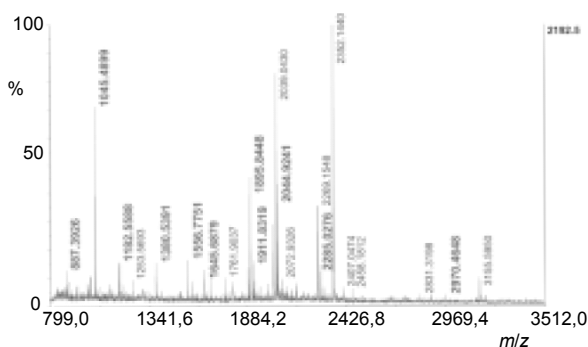
Při porovnání schopnosti odstranit lidský albumin a IgG s použitím tohoto imunoafinitního kitu a imunoafinitní pryskyřice založené na klasických protilátkách byly na nosiče aplikovány různé objemy lidského séra a pomocí ELISA bylo stanoveno procentuální odstranění albuminu a IgG. Sada PROT-IA vykazuje 2–4 krát vyšší vazebnou kapacitu pro lidský albumin a IgG než běžná pryskyřice s protilátkou. PROT-IA odstraňuje více než 98 % albuminu z 50 μ l séra. K tomu, aby běžná pryskyřice dosáhla stejné účinnosti, by bylo možné použít pouze 15 μ l séra nebo méně. Podobně bude PROT-IA odstraňovat více než 98 % IgG z 50 μ l séra, zatímco pro dosažení podobné účinnosti odstranění u běžné pryskyřice musí být použito 20 μ l séra nebo méně (data nejsou ukázána). Optimalizovaný protokol umožňuje použít vzorek séra ihned po izolaci přímo pro 2D elektroforézu, protože udržuje nízké ředění vzorku v přebytku nad nízkým obsahem solí ekvilibračního pufru. To je umožněno nízkou koncentrací solí v pufru a je tím eliminována potřeba srážet protein před elektroforézou (obr. 2). Protože po použití tohoto imunoafinitního kitu není nutné protein koncentrovat nebo srážet, je celý postup rychlý a může být proveden za méně než 30 min.

3. Příprava vzorku pro hmotnostní spektrometrii

3.1. Analýza fosfopeptidů

3.1.1. Analýza fosforylačních míst proteinu s využitím obohacení kitem PHOS-SelectTM před MS

Lidský genom kóduje přibližně 2000 kinas a 1000 fosfatas řídicích fosforylaci proteinu a tím mnoho buněčných aktivit a drah. Stav okamžité fosforylace proteinu a tím i jeho aktivity závisí na poměru kinas a fosfatas, které na něj působí. Odhaduje se, že přibližně 30 % lidských proteinů je fosforylováno a většina fosforylovaných proteinů obsahuje tři a více fosforylovaných zbytků. Biologická důležitost fosforylace je důvodem pro intenzivní studium kinas a fosfatas a funkčních aspektů fosforylací. V současnosti se MS běžně používá pro identifikaci fosfopeptidů z fosfoproteinových tryptických štěpů. Problémem této analýzy je velké množství nefosforylovaných peptidů, které maskují fosfopeptidové signály. Pro obohacení koncentrace fosfopeptidů je často používán PHOS-SelectTM kit.



Obr. 3. MS analýza tryptického štěpení GST-MELK po obohacení směsi za pomoci PHOS-SelectTM; 90 % peptidů na spektru jsou fosfopeptidy

3.1.2. Obohacení fosfopeptidu

Komplexní příklad použití PHOS-Select™ je ukázán na obr. 3 (data laskavě poskytl Dr. Nick Morrice, MRC Protein Phosphorylation Unit, School of Life Sciences, University of Dundee, UK). Tryptický štěp proteinkinasy MELK, exprimované jako GST fúzní protein v *E. coli*, byl analyzován po obohacení PHOS-Select™ použitím ABI 4700 proteomického analyzátoru TOF-TOF MS. 90 % peptidů na hmotnostním spektru 4700 TOF-TOF jsou fosfopeptidy. V tryptickém štěpu před obohacením pomocí PHOS-Select™ nebyly detegovány žádné fosfopeptidové ionty. Jestliže se k obohacení fosfopeptidů použil PHOS-Select™, více než 95 % všech nefosforylovaných peptidových iontů bylo odstraněno (není ukázáno).

3.2. Analýza glykopeptidů

3.2.1. Enzym PNGasa F: Účinná N-deglykosylace v analýze glykoproteinů

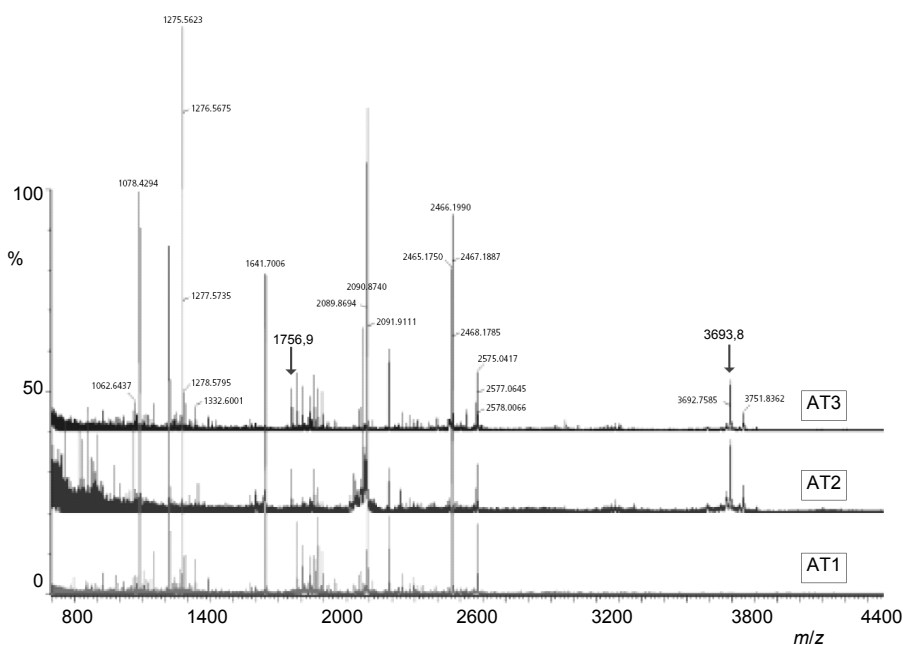
Glykosylace je jednou z nejčastějších posttranslačních modifikací proteinů v eukaryotických buňkách. Glykoproteiny hrají roli v celé řadě biologických funkcí, jako např. vazba k receptoru, buněčná signalizace, imunitní rozpoznávání, záněty a patogenita. Savčí glykoproteiny obsahují tři hlavní typy oligosacharidů (glykanů): N-vázané, O-vázané a glykosylfosfatidylinositolové (GPI) lipidové kotvy.

Pro studium struktury a funkce glykoproteinu je často žádoucí odstranění všech nebo pouze vybrané třídy glyka-

nů. Odštěpení N-vázaných glykanů zlepšuje výsledky při MALDI-TOF MS analýze, protože glykopeptidy díky své mikroheterogenitě potlačují při MS analýze signál. Peptid-N-glykosidasa F (PNGasa F) je jeden z nejpoužívanějších enzymů pro deglykosylaci glykoproteinů.

3.2.2. Účinná deglykosylace proteinu v gelu

Jako příklad byla vybrána deglykosylace glykoproteinu α 1-antitrypsinu provedená ve vývojovém pracovišti Sigma-Aldrich. Po redukci a alkykaci (použitím tributylfosfinu a jodacetamidu obsažených v ProteoPrep™ redukčním a alkylačním kitu, katalogové číslo PROT-RA), byly vzorky rozděleny na gelu a barveny. Proužek glykoproteinu byl vyříznut. Vzorky v gelu byly odbarveny, vysušeny a inkubovány s PNGasou F. Vysušené kousky gelu byly potom inkubovány s trypsinem (katalogové číslo T6567) a poté byla okolní kapalina obsahující tryptické peptidy odstraněna a použita pro další analýzu. Příprava MS vzorku je zjednodušena díky tomu, že enzymový přípravek neobsahuje detergenty a stabilizátory, které by mohly interferovat s MS analýzou. Roztok peptidů po hydrolyze trypsinem byl před analýzou koncentrován a odsolen na C18 ZipTip®. Zde popsané výsledky byly získány MS analýzou na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF. Peptidy byly analyzovány v reflexním režimu při snímání kladných iontů použitím 4-hydroxy- α -kyanoskořicové kyseliny jako matrice. Spektra byla získána v hmotnostním rozsahu 4000 m/z s nastaveným potlačecím matrice na 800 hmotnostních jednotek. Analýza dat byla provedena použitím software ProteinLynx™ (obr. 4).



Obr. 4. MALDI-TOF MS analýza nativního a deglykosylovaného α 1-antitrypsinu; hmotnostní peptidový profil kontrolního (AT1), deglykosylovaného v gelu (AT2) a deglykosylovaného v roztoku (AT3) lidského α 1-antitrypsinu. Všechny proteiny byly před MS analýzou podrobeny štěpení trypsinem. Ve vzorku, na který bylo působeno PNGasou F (chybí v kontrolním vzorku), odpovídá signál m/z 1756 peptidovému fragmentu 268-283 a signál m/z 3693 peptidovému fragmentu 94-125.

3.3. Přístupy štěpení proteinu

3.3.1. Trypsin proteomické čistoty

Trypsin proteomické čistoty nabízený firmou Sigma vykazuje velmi dobrou proteolytickou účinnost (vytváří více tryptických peptidů). To vede k většímu sekvenčnímu pokrytí studovaného proteinu. Hmotnostní spektra jsou značně zjednodušená a to díky sníženému počtu interferujících autolytických píků a jejich neurčitých aduktů. Trypsin proteomické čistoty izolovaný z prasečích pankreatů umožňuje správné a přesné štěpení na karboxylové straně Arg a Lys zbytků. Enzym byl důkladně zpracován redukční methylací pro minimalizaci autolýzy. Chymotrypsinická aktivita je inhibována působením TPCK (L-1-chloro-3[4-tosylamido]-4-fenyl-2-butanon). Izolace zahrnuje i afinitní chromatografii a lyofilizaci ze zředěné kyseliny. Výsledkem je vysoce čistý trypsin s vysoce specifickou proteolytickou aktivitou, který je vhodný pro náročná kritéria proteomického výzkumu. Je určen k působení jak v roztoku, tak i v gelových štěpech. Pro zajištění čerstvého enzymu pro každé použití je enzym balen v praktických 20 μ g baleních.

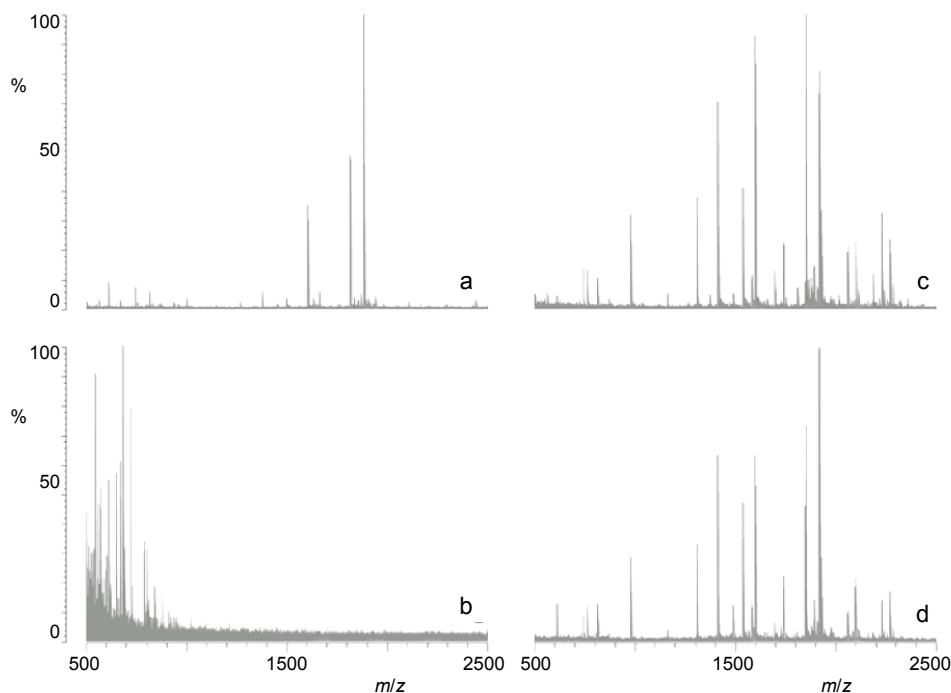
3.3.2. Výběr proteasy

Protease Profiler kit (katalogové číslo PP0500) po-

skytuje kromě trypsinu proteomické čistoty čtyři osvědčené alternativní proteasy, činidlo pro rozpuštění enzymu a enzymový reakční pufr. Každá složka je v čistotě vhodné pro MS analýzu. Protease Profiler kit umožňuje provádět doplňkové experimenty jako dvojí enzymové štěpení a hledání alternativních štěpených míst. Dvojí enzymové štěpení je používáno, když počáteční štěpení poskytuje peptidové fragmenty větší než 5000 Da, což je často za optimální detekční oblastí pro většinu MS systémů/přístrojů. Druhé štěpení použitím proteasy s rozdílnou specifitou vede k fragmentaci velkých peptidů za vytvoření menších peptidů vhodných pro MS. V případech, kdy by použití trypsinu mohlo být nevhodné pro některé proteinové vzorky, je třeba identifikovat alternativní proteolytický enzym. Protease Profiler kit umožňuje štěpení jak v roztoku, tak v gelu s optimalizovanými protokoly a činidly pro štěpení za obou podmínek.

3.4. Účinná mikroizolace a guanidylace peptidů přímo z terčů MALDI

Enzymové štěpení proteinů trypsinem s následnou analýzou získaných peptidů pomocí MS představuje základní postup při proteomickém výzkumu. Trypsin vytváří peptidy, jejichž C-koncové aminokyseliny jsou buď argi-



Obr. 5. MALDI-TOF MS analýza tryptického štěpu myoglobinu; peptidy byly analyzovány buď (a) bez guanidylace, (c) s guanidylací, podle postupu detailně popsaného v ProteoMass guanidylačním kitu a (d) s guanidylací, po mikroizolaci vzorku z terčů. V obou guanidylovaných vzorcích bylo identifikováno větší množství peptidů, vedoucí ke zvýšení pokrytí sekvence a odpovídající vyšší spolehlivosti během identifikace proteinu. Spektrum (b) naznačuje, že peptidy byly z terčů zcela odstraněny. Píky pozorované v tomto spektru odpovídají aduktům s maticí MALDI

nin nebo lysin. Dřívější studie ukázaly, že detekce peptidů MS je ovlivněna několika základními vlastnostmi, včetně bazicity C-koncové aminokyseliny⁶⁻⁸, aminokyselinového složení⁷, hydrofobnosti a velikosti peptidu⁶ a schopnosti vytvoření stabilních sekundárních struktur⁹. Kromě toho bylo pro peptidové směsi získané tryptickým štěpením popsáno potlačování signálu¹⁰. S tím souvisí nebezpečí negativního ovlivnění pokrytí sekvence a identifikace proteinu. Pokud peptidy, o které máme specifický zájem (jako peptidy s posttranslačními modifikacemi), mají na C-konci lysin, může docházet k horší ionizaci a může to být kritickým faktorem při získávání dat. Jeden ze způsobů, jak překonat tento problém, je přeměna lysinového zbytku na homoarginin, guanidylací postranního řetězce s ϵ -aminoskupinou¹¹⁻¹⁶. Snížením chyby při ionizaci tak může být zvýšeno pokrytí sekvence.

V současné době se guanidylace lysinových peptidů stala jedním z postupů pro zlepšení hmotnostně spektrometrických analýz v proteomických laboratořích. Guanidylované lysinové peptidy vykazují zvýšenou ionizaci u obou typů MS ionizace ať desorpce z matrice laserem (MALDI) nebo ionizace elektrospřejem (ESI)^{11-14,17}.

3.4.1. Účinnost guanidylace

Guanidylace může být provedena na již dříve analyzovaných tryptických peptidech a to následnou mikroizolací z MALDI terčiku. Jako příklad byl metodou MALDI-TOF MS analyzován tryptický štěp myoglobinu (obr. 5). Nejprve byly nanášeny a analyzovány neguanidylované peptidy (obr. 5a). Vzorek byl poté extrahován z gelu roztokem 70% acetonitrilu, guanidylován a znovu nanášen na MALDI terčik. Vzorek byl derivatizován bez nutnosti izolačního mezistupně vzorku nebo oddělení MALDI matrice od získaných peptidů. Analýza „zbytkového“ vzorku (obr. 5b) po opětovné aplikaci matrice ukazuje absenci peptidových piků. To jasně ukazuje, že byl získán celkový obsah vzorku z původní skvrny. Jediné pozorované píky odpovídaly matrici MALDI. Pro srovnání byly myoglobinné peptidy před nanášením a analýzou guanidylovány také v roztoku (obr. 5c). Spektrum mikroizolovaného a guanidylovaného vzorku (obr. 5d) je srovnatelné s guanidylací v roztoku.

Guanidylace je užitečná zejména v případech, kdy je množství vzorku omezené nebo pro vzorky, u kterých jsou pro identifikaci nebo další charakterizaci nutné vícenásobné analýzy. Získané vzorky je skutečně možné derivatizovat jakýmkoliv z celé řady prostředků¹⁸, zejména, je-li původní analýza provedena „shotgun“ přístupem – název pro techniku, kdy po štěpení trypsinem je použito LC-MALDI-MS analýzy za pomoci iontové pasti^{19,20}. Závěrem lze říci, že účinná mikroizolace vzorků z MALDI terčiku a jejich následná guanidylace je rychlou a výhodnou metodou pro získání doplňkových informací z tryptických štěpů. To je důležité zejména pro analýzy, které neposkytly vhodné informace po počátečním zkoumání anebo pro cenné vzorky. Využití tohoto postupu vede k vysoce kvalitním spektrům MALDI a tím k zlepšení pokrytí sekvence a spolehlivosti při identifikaci a charakterizaci

proteinu. Ačkoliv tandemové hmotnostně spektrometrické (MS/MS) analýzy nejsou součástí této studie, má se za to, že sekvenční informace mohou být získány z peptidů s koncovým lysinem, které před guanidylací vykazovaly nedostatečnou intenzitu.

4. Kvantitativní proteomika

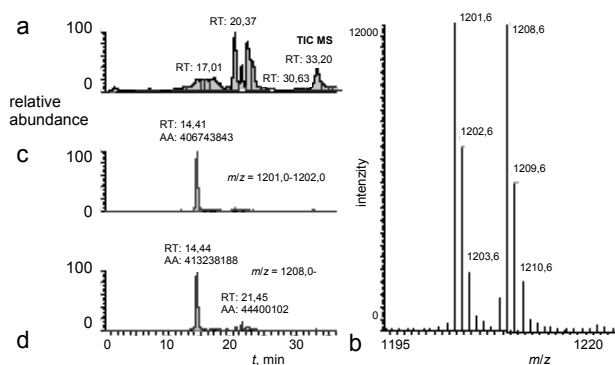
4.1. Zavedení stabilních izotopů pro MS

Kvantifikace metodou MS může být dosaženo diferenčním nebo srovnávacím způsobem při analýze vzorků, značených stabilním izotopem, ve srovnání se vzorky proteinů a peptidů, které obsahují přirozený izotop. Peptidy obsahující izotopicky značené aminokyseliny a přírodní peptidy vykazují při HPLC dělení identické eluční profily, ale poskytují odlišná MS spektra.

Značení proteinů může být provedeno několika způsoby. Jedna z možností je použitelná pro proteiny izolované z buněk pěstovaných v mediích, které postrádají přirozenou aminokyselinu a místo ní je v mediu aminokyselina značená stabilním izotopem. Další postup je použití minimálního média doplněného odpovídajícími izotopově značenými zdroji uhlíku a dusíku nebo buňky mohou růst na komplexním mediu ISOGRO™. Jinou možností označení specifických proteinů je enzymatické vnesení ¹⁸O na C-konec peptidů. To je možné v případě, kdy jsou proteiny štěpeny serinovými proteasami (např. trypsinem) v prostředí vody s ¹⁸O. Elegantní způsob získání izotopicky značených peptidů je jejich syntéza. Pokud totiž známe primární strukturu peptidů, které chceme kvantifikovat srovnáním s izotopicky značenými peptidy, může být použita syntéza na pevné fázi např. využitím syntézy značených peptidů na zakázku, kterou nabízí systém Sigma AQUA peptidů. Značení může být dosaženo také chemicky, když např. jodacetamid značený stabilním izotopem reaguje s cysteinovými zbytky. Sigma-Aldrich vyrábí a nabízí aminokyseliny značené ¹³C a ¹⁵N a vodu s ¹⁸O v různých specifikacích.

4.2. Sigma zakázkový servis AQUA peptidová syntéza

Proteomická MS je dosud z podstaty nekvantitativní, ačkoliv potřeba přímé proteinové kvantitativní techniky v buněčných nebo tkáňových lyzátech je velká. Steve Gygi a jeho tým ukázal novou strategii pro úplnou kvantifikaci proteinu použitím peptidů značených stabilním izotopem a HPLC-MS (cit.²¹⁻²³). Tato technika, nazvaná Protein-AQUA™, je založena na běžném principu: použití molekuly značené stabilním izotopem jako vnitřního standardu. Vnitřní standardizace použitím sloučenin značených stabilním izotopem je často používána v MS analýzách malých molekul, ale aplikováním této metody na analýzy proteinů a peptidů umožnil Gygiho tým studium složitých biologických vzorků kvantitativně a poskytl nový cenný nástroj pro proteomiku.



Obr. 6. Směs pěti proteinů (obsahující stejná množství aldolasy, myoglobinu, lysozymu, peroxidasy a karboxylhydrasy) byla připravena o finální koncentraci 1 mg ml⁻¹ a štěpena přes noc trypsinem proteomické čistoty (T 6567). Stejná množství peptidu čistěného HPLC (GSITEQLLNAR) a jeho izotopově značeného analogu (GSITEQLL*NAR) bylo rozděleno do pěti proteinových tryptických štěpení (a). Vzorek byl analyzován reverzní fází LCMS použitím Agilent 1100 Capillary LC, následované Finnigan LCQ Classic iontovou pastí (b). Byla získána data omezeného toku iontů prokazující ko-eluci nativních (c) a izotopově značených (d) peptidů v poměru jedna ku jedné. Teoretický poměr 1:1 se přesně shodoval s experimentálním poměrem 1:1,02. (*označuje přítomnost plně značené (¹³C, ¹⁵N) aminokyseliny) (cit.²¹)

4.2.1. Princip Protein-AQUA

V stupni 1 je z proteinu²¹, o který se zajímáme, vybrán optimální tryptický peptid. Ten je *in vitro* syntetizován s tím, že obsahuje jednu aminokyselinu značenou stabilním izotopem (AQUA Peptid). Nativní peptid a syntetický AQUA Peptid mají stejné fyzikální vlastnosti, včetně velikosti, náboje, hydrofobnosti, iontového charakteru a schopnosti být ionizován. Ve směsi se nativní i syntetické peptidy při kapalinové chromatografii eluují společně, během elektroforézy putují také společně a ionizují se stejně. Avšak jejich relativní molekulová hmotnost je odlišná (o 6 až 10 jednotek, podle toho, který stabilní aminokyselinový izotop byl vybrán pro vnesení). Nativní peptid a syntetický AQUA Peptid jsou jednoduše rozlišitelné hmotnostní spektrometrií.

Ve druhém stupni je biologický vzorek se studovaným proteinem extrahován a je přidáno známé množství syntetického AQUA Peptidu, např. 500 fmol. Vzorek je poté podroben štěpení a analyzován HPLC-MS. V experimentu popsaném Gerberem a Gyim byla vytvořena iontová spektra pro nativní peptid a pro syntetický AQUA Peptidový vnitřní standard. Využitím poměrů pík bylo potom vypočítáno množství nativního peptidu.

Na obr. 6 je ukázána přesnost a specifita Protein-AQUA. Oba peptidy, jak přirozený, tak syntetický AQUA Peptid, byly přesně stanoveny a kvantifikovány ve směsi tryptického štěpení pěti proteinů: teoretický poměr 1:1 se přesně shodoval s experimentálním poměrem 1:1,02.

4.2.2. Výběr optimálního AQUA-peptidu

Který peptid ze studovaného proteinu by měl být pou-

žit pro syntézu značeného peptidu? Tento AQUA peptid by měl být především snadno detegovatelný MS, tj. měl by se dobře ionizovat; výběr pouze na základě dat poskytnutých bioinformatikou nemusí být dostatečný. Vynikajícím zdrojem pro AQUA Peptidy, které již byly validovány, je PeptideAtlas (www.peptideatlas.org), publikovaný Ruedi Aebersoldem a spolupracovníky²⁴. Tento postup má mnoho aplikací, např. Gerber a Gygi popsali metody pro (i) kvantifikaci malého množství kvasničných proteinů, účastnicích se při umlčení genu, (ii) kvantitativní stanovení stupně fosforylace Ser1126 lidského separasového proteinu, závislé na buněčném cyklu a (iii) identifikace kinas schopných fosforylovat Ser1501 separasy při stanovení kinasy *in vitro*²¹. O'Conner a spol. zjistili množství BipA globálního regulačního proteinu v *E. coli* a předpověděli model jeho regulačního mechanismu²⁵.

4.2.3. AQUA-Peptidy

Firma Sigma-Aldrich vyvinula zakázkový systém syntézy peptidu, která vyhovuje specifickým požadavkům AQUA experimentů. AQUA peptidy na zakázku jsou syntetizovány s použitím úplně značených ¹³C a ¹⁵N (více než 98 %) aminokyselin (jedna značená aminokyselina na peptid) a jsou přísně testovány pro zajištění 95% čistoty peptidu (HPLC na reverzní fází), mají potvrzenou relativní molekulovou hmotnost (MALDI-TOF MS) a specifický obsah peptidu. AQUA peptidy na zakázku jsou dostupné v malých baleních (5 × 1 nmol), které zajišťují vhodnou přípravu vzorku a poskytují přiměřené množství peptidu. Pro kvantifikaci jsou dostupné dvě metody: (i) aminokyselinovou analýzou (AAA) a (ii) spektrometricky využitím fluorekaminu. Fosforylované aminokyseliny mohou být také syntetizovány pro analýzy posttranslačních modifikací. Peptidy jsou dodávány jako soli kyseliny trifluorocetové; jsou však také dostupné v roztoku s octanem amonným.

4.3. Inkorporace ¹⁸O trypsinem pro analýzu diferenční exprese proteinu

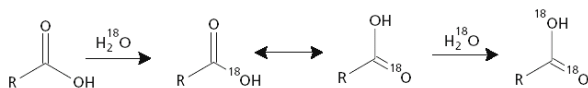
Diferenční proteinová exprese představuje v proteomice důležitou oblast. Izotopové značení je běžně používaná metoda pro relativní kvantifikaci proteinu, avšak je bohužel často velmi finančně nákladná a pracovně náročná. ¹⁸O Proteom Profiler kit (katalogové číslo P3623) eliminuje tyto problémy a poskytuje cenově výhodnou a jednoduchou metodu pro provádění relativní proteinové kvantifikace. Základem této sady je enzymatické vnesení stabilního izotopové značky (¹⁸O) do téměř všech peptidů v tryptickém štěpu. Základním předpokladem pro úspěšnost této metody je fakt, že kyslíkové atomy se v nepřítomnosti proteasy vyměňují pomalu. Tato metoda je považována za komplexní značící proces, kdy jsou značeny všechny peptidy (kromě C-koncového peptidu původní proteinové molekuly, kdy nedojde k inkorporaci stabilního izotopu pokud C-koncová aminokyselina není arginin nebo lysin). Vnesení dvou atomů ¹⁸O do každého peptidu vede k posunu hmotnosti o 4 jednotky, který lze snadno pozorovat při

hmotnostně spektrometrické analýze vzorku. Analýza posunu hmotnosti umožňuje odlišit značené a neznačené vzorky a kvantifikovat jejich relativní množství.

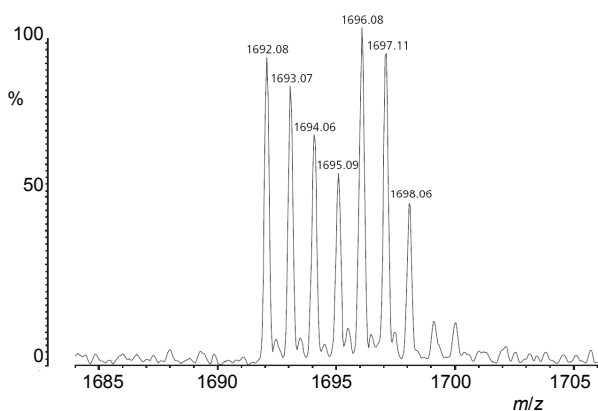
4.3.1. Metody značení

^{18}O Proteom Profiler kit je sada navržená pro porovnání dvou proteinových populací. Před použitím tohoto kitu by vzorky měly být denaturovány, redukovány a alkylovány (jak je popsáno v příbalovém letáku). Poté, použitím centrifugačních kolon, které jsou součástí tohoto kitu, jsou odstraněny detergenty, chaotropní činidla a redukční a alkylační činidla. Proteiny jsou následně podrobeny štěpení a pro vnesení ^{18}O značky do tryptických peptidů je využita enzymová aktivita trypsinu. Trypsin umožňuje vnesení dvou atomů ^{18}O na peptid (obr. 7). To je způsobeno charakterem dlouhodobé interakce mezi peptidem a proteasou, umožňující dosažení rovnováhy obou kyslíkových atomů karboxylu na C-konci. Díky vnesení dvou atomů ^{18}O bude značený peptid na hmotnostním spektru vykazovat posun o + 4 Da. Vzorky jsou poté analyzovány vhodnou metodou, jako je MALDI-TOF MS nebo LC-MS.

Užitečnost ^{18}O Proteom Profiler kitu byla prokázána



Obr. 7. Vnesení ^{18}O do obou kyslíkových atomů karboxylu C-koncové aminokyseliny katalyzované trypsinem



Obr. 8. MALDI-TOF hmotnostní spektrum peptidu YSHEEI-AMATVTALR, odvozeného z aldolasy; spektrum představuje očekávané výsledky, získané pro dva proteinové roztoky o stejné koncentraci analyzované použitím této sady. Základ píku m/z 1692,08 ($m/z + 0$ Da) má přibližně stejnou intenzitu (10) nebo integrovanou plochu píku jako pik m/z 1696,08 (hmotnost + 4 Da, 14). Píky 1693,07, 1694,06 a 1695,09, (spolu s píky 1697,11 a 1698,06) představují normální izotopovou distribuci, získanou z MS analýzy peptidu

vyhodnocením dvou různých proteinových vzorků. Pro tento experiment byly použity proteinové vzorky složené ze směsi karbonylanhydrasy (katalogové číslo C4396) a aldolasy (katalogové číslo A2714) o známých koncentracích. Vzorky byly denaturovány v 8 M guanidin hydrochloridu, pufovány na pH 8,5 (katalogové číslo G7294) a poté redukovány a alkylovány použitím ProteoPrep redukčním a alkylačním kitem (PROT-RA). Poté byly vzorky odsoleny a trypticky štěpeny použitím činidel poskytnutých v ^{18}O Proteom Profiler kitu. Po štěpení byly oba vzorky sušeny za vakua. Použitím Trypsin Singles (katalogové číslo T7575) byla do testovacích a kontrolních vzorků vnesena značka (buď ^{16}O nebo ^{18}O). Vzorky byly inkubovány přes noc při 37 °C, druhý den byly vakuově vysušeny, rekonstituovány v 0,1% trifluoroctvé kyselině, smíchány a analyzovány MALDI-TOF MS. Analýza dat ukázala, že pozorované poměry píků pro oba proteiny jsou přesné v širokém koncentračním rozmezí (obr. 8).

LITERATURA

- Rabilloud T., Blisnick T., Heller M., Luche S., Aebersold R., Lunardi J., Braun-Breton C.: *Electrophoresis* 20, 3603 (1999).
- Tastet C., Charmont S., Chevallet M., Luche S., Rabilloud T.: *Proteomics* 3, 111 (2003).
- Luche S., Santoni V., Rabilloud T.: *Proteomics* 3, 249 (2003).
- Rabilloud T.: *Electrophoresis* 17, 813 (1996).
- Santoni V., Molloy M., Rabilloud T.: *Electrophoresis* 21, 1054 (2000).
- Krause E., Wenschuh H., Jungblut P. R.: *Anal. Chem.* 71, 4160 (1999).
- Baumgart S., Lindner Y., Kuhne R., Oberemm A., Wenschuh H., Krause E.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 863 (2004).
- Zhu Y. F., Lee K. L., Tang K., Allman S. L., Taranenko N. I., Chen C. H.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9, 1315 (1995).
- Wenschuh H., Halada P., Lamer S., Jungblut P., Krause E.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 115 (1998).
- Kratzer R., Eckerskorn C., Karas M., Lottspeich F.: *Electrophoresis* 19, 1910 (1998).
- Beardsley R. L., Karty J. A., Reilly J. P.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 2147 (2000).
- Hale J. E., Butler J. P., Knierman M. D., Becker G. W.: *Anal. Biochem.* 287, 110 (2000).
- Brancia F. L.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 2070 (2000).
- Beardsley R. L., Reilly J. P.: *Anal. Chem.* 74, 1884 (2002).
- Thevis M., Ogorzalek Loo R. R., Loo J. A.: *J. Proteome Res.* 2, 163 (2003).
- Fenaille F., Morgan F., Parisod V., Tabet J. C., Guy P. A.: *J. Mass. Spectrom.* 39, 16 (2004).
- Brancia F. L., Openshaw M. E., Kumashiro S.: *Rapid*

- Commun. Mass Spectrom. *16*, 2255 (2002).
18. Rosenfeld J. M.: Trends Anal. Chem. *22*, 785 (2003).
 19. Zhen Y., Xu N., Richardson B., Becklin R., Savage J. R., Blake K., Peltier J. M.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. *15*, 803 (2004).
 20. Bodnar W. M., Blackburn R. K., Krise J. M., Moseley M. A.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. *14*, 971 (2003).
 21. Stemmann O., Zou H., Gerber S. A., Gygi S. P., Kirschner M. W.: Cell *107*, 715 (2001).
 22. Gerber S. A., Rush J., Stemman O., Kirschner M. W., Gygi S. P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. *100*, 6940 (2003).
 23. Kirkpatrick D. S., Gerber S. A., Gygi S. P.: Methods *35*, 265 (2005).
 24. Desiere F., Deutsch E. W., Nesvizhskii A. I., Mallick P., King N. L., Eng J. K., Aderem A., Boyle R., Brunner E., Donohoe S., Fausto N., Hafen E., Hood L., Katze M. G., Kennedy K. A., Kregenow F., Lee H., Lin B., Martin D., Ranish J. A., Rawlings D. J., Samuelson L. E., Shio Y., Watts J. D., Wollscheid B., Wright M. E., Yan W., Yang L., Yi E. C., Zhang H., Aebersold R.: Genome Biol. *6*:R9 (2005). <http://genomebiology.com/2004/6/1/R9>
 25. Owens R. M., Pritchard G., Skipp P., Hodey M., Connell S. R., Nierhaus K. H., O'Connor C. D.: EMBO J. *23*, 3375 (2004).
- K. Herick** (*Sigma-Aldrich, GmbH, Taufkirchen, Germany*): **Integrated Solutions for Proteomics in Sigma-Aldrich**
- The article describes the latest advances in the development of techniques and approaches in the field of proteomics in the Sigma-Aldrich company. It focuses on three major areas – on sample preparation for two-dimensional electrophoresis, on sample preparation for MS and on quantitative determinations in proteomic studies. A part of the article is devoted to new custom synthesis of labeled peptides for the determination of peptides using MS technique.