

IONTOVÁ CYKLOTRONOVÁ REZONANCE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ (FT-ICR MS) A JEJÍ VYUŽITÍ JAKO NEJFLEXIBILNĚJŠÍ HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKÉ METODY V PROTEOMICE

MICHAL BOHÁČ^a, ARND INGENDOH^b, JENS FUCHSER^b a MATTHIAS WITT^b

^a Scientific Instruments Brno, spol. s r.o., Havlíčkova 86, 602 00, Brno, Česká republika, ^b Bruker Daltonik GmbH, Fahrenheitstrasse 4, D-28359, Bremen, Německo

Došlo 22.9.05, přijato 18.10.05.

Klíčová slova: FTMS, hmotnostní spektrometrie, iontová cyklotronová, rezonance s Fourierovou transformací, Bruker Daltonics, proteomika, CID, SORI, IRMPD, ECD, ESI, MALDI

Obsah

1. Úvod
2. Metody
3. Výsledky a diskuse
 - 3.1. Výhoda robustnosti kombinovaného ionizačního zdroje
 - 3.2. Unikátní rozlišení i pro vysoké hmotnosti
 - 3.3. Unikátní přesnost změřených hmot v MS spektrech
 - 3.4. Vysoká přesnost hmot v MS/MS spektrech
 - 3.5. Možnosti ultrapřesné izolace a fragmentace
 - 3.6. Různé možnosti fragmentace iontů
4. Závěr

1. Úvod

Hmotnostní spektrometrie patří v posledních letech bezesporu k jedněm z nejprogressivnějších a nejdynamičtější se vyvíjejících analytických metod. Také již není chápána jako pouhá detekční metoda, přiřazená za nejrůznějšími separačními technikami, ale v mnoha svých obměnách nalézá uplatnění v různých biotechnologických oblastech, farmacii, designu léčiv, ale především v nejdynamičtějších oblastech výzkumu jako jsou genomika, metabolomika, či v dnešní době nesmírně populární proteomika. Jednou z nejperspektivnějších hmotnostně spektrometrických metod je metoda iontové cyklotronové rezonance, ultracitlivá a nedestruktivní metoda přinášející spektra s nejlepším rozlišením a přesností.

Princip iontové cyklotronové rezonance s využitím Fourierovy transformace (zkráceně FT-ICR MS nebo jen FTMS)¹⁻⁴ je založen na pohybu iontů v homogenním magnetickém poli tak, jak k němu dochází v cyklotronové (ICR) cele. Ionty vznikají v iontovém zdroji za atmosférického tlaku a postupně prochází přes několik stupňů se

vzrůstajícím vakuem až do ICR cely s tlakem v řádech 10^{-10} až 10^{-11} mbar a teplotou blízkou absolutní nule. ICR cela, která je ve své podstatě elektromagnetickou iontovou pastí, je umístěna uvnitř prostorově homogenního supravodivého magnetu s vysokým statickým magnetickým polem. Tento permanentní magnet je zpravidla chlazen kapalným héliem a dusíkem. Pro nabitě částice v cele platí, že magnetická síla daná Lorenzovým zákonem (rovnice 1)

$$\vec{F}_{\text{mag}} = z \vec{v} \cdot \vec{B} \quad (1)$$

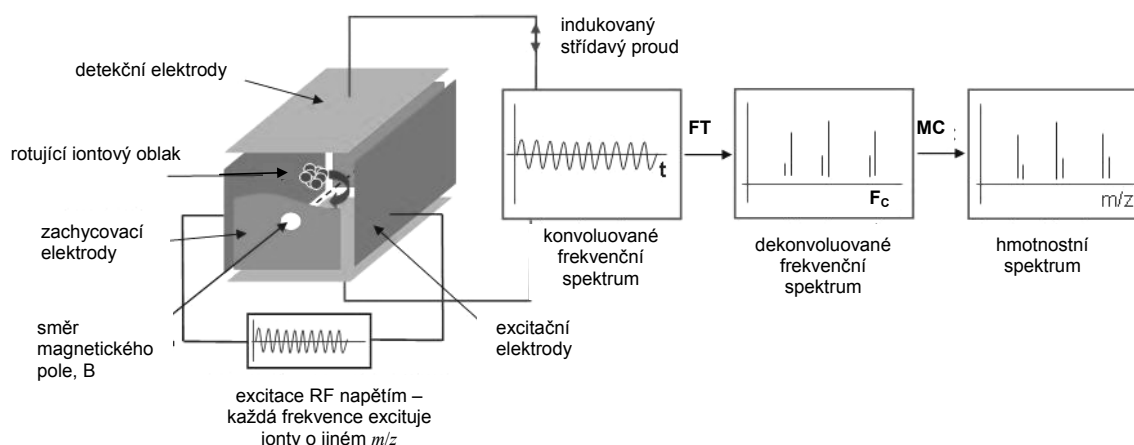
působící na částici o hmotnosti m a náboji z , a pohybující se rychlostí v uvnitř homogenního magnetického pole o magnetické indukci B , je v rovnováze se silou odstředivou. Díky této rovnováze (rovnice 2) dochází k její radiální stabilizaci a pohybu po spirálovité dráze o poloměru r

$$\vec{F}_{\text{ods}} = \frac{mv^2}{r} = z \vec{v} \cdot \vec{B} \quad (2)$$

Elektrostatické pole aplikované na zachycovací elektrody pak stabilizuje ionty axiálně tím, že jim zabraňuje opustit celu podél osy magnetického pole (obr. 1). Magnetická síla a rychlostní složka v , která je kolmá k magnetickému poli B , pak způsobují, že nabitě částice rotují po určených drahách s danou frekvencí. Frekvence tohoto cyklotronového pohybu f_c je dána rovnicí 3

$$f_c = \frac{zB}{2\pi m} = \frac{eB}{2\pi m/z} \quad (3)$$

z je náboj iontu a e je jednotkový náboj. Cyklotronová frekvence iontu je tak nepřímě úměrná hodnotě m/z . Ionty v cele nejprve rotují po nízkých orbitách. Při následné aplikaci rychlého frekvenčního napětového pulzu na excitačních elektrodách je jejich pohyb excitován a ionty se stejnými hodnotami m/z se synchronizují do oblaků koherentně se pohybujících iontů. Pohyb těchto oblaků excitovaných iontů, které jsou v rezonanci s excitačním napětím a pohybují se na vyšších orbitách, je sledován měřením střídavého proudu, který je při průletu indukovan na detekčních elektrodách. Frekvence tohoto indukovaného proudu je stejná jako cyklotronová frekvence f_c a intenzita je úměrná počtu iontů. Změnou frekvence excitačního napětí dojde ke zrušení rezonance pro oblak o daném m/z , a tím dojde k relaxaci a pádu těchto iontů zpět na nízké orbity. Jiný oblak iontů o rozdílné hmotnosti, který je v rezonanci s novým napětím, je ale excitován a výše zmíněným způsobem detegován. Měřením cyklotronových frekvencí pro všechny m/z v požadovaném hmotnostním rozsahu se získá komplexní spektrum všech detegovaných frekvencí proti času (konvoluované frekvenční spektrum).



Obr. 1. Schématický náčrt uspořádání cely iontové cyklotronové rezonance a způsobu získávání hmotnostních spekter metodou FTMS

Jeho následnou dekonvolucí metodami Fourierovy transformace se získá spektrum intenzit proti dekonvoluovaným frekvencím a toto spektrum se následně transformuje na formát standardního hmotnostního spektra intenzit proti hodnotám m/z (obr. 1).

Na rozdíl od ostatních hmotnostně spektrometrických metod nedochází v FTMS při detekci iontů k jejich destrukci na detektoru. Těto vlastnosti je s výhodou využíváno pro provádění dalších experimentů na zachycených iontech, jako jsou následné fragmentace v cele, studium reakcí v plynné fázi, disociace iontů nebo interakcí mezi iontem a molekulami. Díky tomu, že frekvence je fyzikálně měřitelná veličina, stanovitelná s vysokou přesností a magnetické pole supravodivého magnetu v FTMS systému může být vysoce homogenní a stabilní, může být také hodnota m/z získaná touto metodou určena s vysokou přesností. Z těchto důvodů je FTMS známá jako metoda, při které se dosahuje vysokého rozlišení ($>100\,000$ při $m/z\,1000$), vysoké přesnosti hmoty (až na úrovni sub ppm), ale i vysoce přesně rozlišené izolace iontů před MS/MS nebo MS^n experimenty^{5,6}. Mezi nejruznější aplikace této vysoce přesné hmotnostně spektrometrické metody patří analýzy velmi komplikovaných směsí^{7,8}, vzorků pro kombinatoriální chemii^{9,10}, studie pro zjišťování a charakterizaci struktur^{11–13}, proteomické studie^{14,15}, nebo screening léčiv^{16–18}.

Pro proteomické studie, mezi které patří identifikace proteinů či ověřování jejich sekvence, *de-novo* sekvenování nebo charakterizace post-translačních modifikací (PTM), lze v FTMS s úspěchem využít několik možných fragmentačních technik. Patří mezi ně kolizně indukovaná disociace (CID – z angl. Collision-Induced Dissociation)¹⁹, trvalé mimorezonanční ozařování (SORI – z angl. Sustained Off-Resonance Irradiation)²⁰, infračervená multifotonová disociace (IRMPD – z angl. Infra-Red MultiPhoton Dissociation)²¹ nebo disociace záchytem elektronů (ECD – z angl. Electron Capture Dissociation)^{22,23}. Protože excitační čas používaný pro tyto MS/MS techniky (kromě SORI) je v rozsahu od několika 10 ms do několika

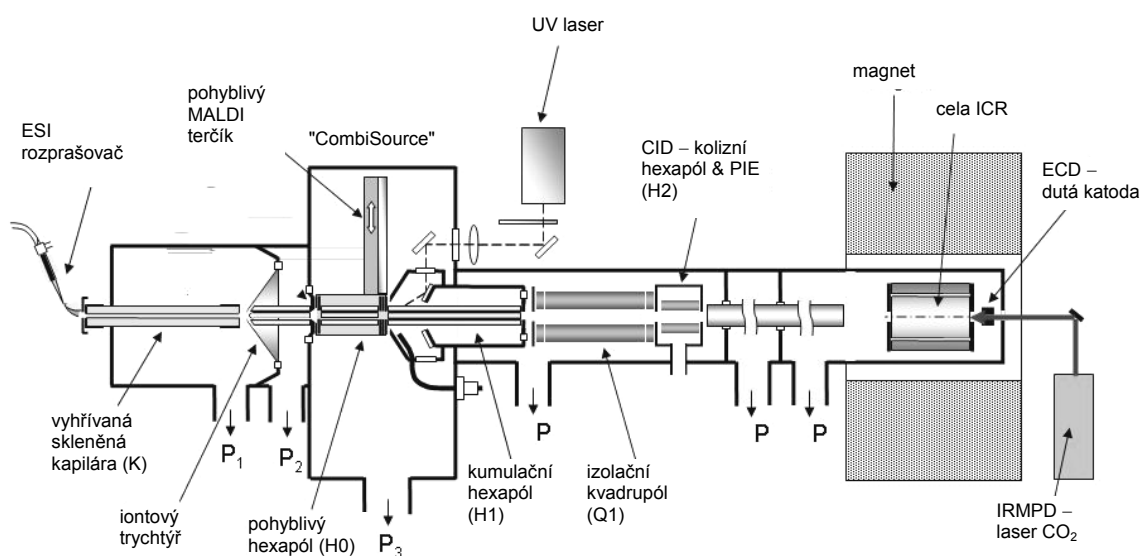
100 ms (cit.^{24–27}), jsou tyto popisované metody výhodným řešením pro spojení „online“ se separačními metodami vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)²⁸ nebo v určitém případě též kapilární elektroforézy (CE)²⁹.

Elektrosprej (ESI)^{30,31} a MALDI (z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)^{32,33} jsou v současnosti dvě nejdůležitější, vzájemně komplementární ionizační techniky, využívané v proteomice. Výběr vhodné ionizační techniky vždy závisí na způsobu přípravy vzorku, jeho předfrakcionaci či na použité separační metodě. A protože častá výměna ESI a MALDI ionizačních zdrojů znamená nejen ztráty pracovního času přístroje, ale také zvyšuje riziko poruch, velmi výhodným řešením může být použití kombinovaného zdroje CombiSource³⁴. Plně automatická záměna jednoho iontového zdroje za druhý v daném kombinovaném zdroji pak trvá pouhých 60 sekund.

Obecně platí, že nejruznější proteomické studie se vyznačují velkým rozsahem požadavků na instrumentaci, vždy v závislosti na cílech dané studie. Také platí, že FTMS je hmotnostně spektrometrická technika, která nabízí nejširší rozsah možností, a to jak pro ionizaci vzorku (ESI, MALDI), tak pro následnou fragmentaci molekul (CID, SORI, IRMPD, ECD). Obě tyto výhody, navíc v kombinaci s nepřekonatelnými výkonnostními parametry přístroje (citlivost, přesnost, rozlišení), dělají z techniky FTMS nejuniverzálnější nástroj, použitelný nejen pro proteomické studie. Na následujících příkladech aplikací budou popsány a diskutovány výhody zmiňované univerzálnosti a kvality přístrojů FTMS.

2. Metody

FTMS hmotnostní spektrometry APEX-Q firmy Bruker Daltonics (Billerica, MA, USA) jsou standardně osazovány supravodivými magnety o magnetické indukci 7, 9,4 nebo 12 Tesla s aktivním stíněním. Také jsou dodávány s kombinovaným ionizačním zdrojem „CombiSource“,



Obr. 2. Schématický náčrt uspořádání FTMS hmotnostního spektrometru Apex-Q firmy Bruker Daltonics (BillERICA, MA, USA)

využívajícím elektrosprej Apollo v kombinaci se zdrojem MALDI. Kompletní schéma tohoto přístroje je ukázáno na obr. 2. V případě ionizace vzorku s využitím téměř ortogonálního ESI zdroje Apollo vzniklé ionty nejprve prochází vyhřívanou skleněnou kapilárou (K), kde jsou odpařovány případné zbytky solventu. Tyto zbytky spolu s potenciálně vzniklými neutrálními molekulami jsou následně zachyceny na iontovém trychtýři (z angl. funnel nebo skimmer), přes který procházejí studované ionty do systému s vyšším vakuem (P_2). Následně je jejich pohyb usměrněn prvním hexapólovým vodičem iontů (H0) a poté vstupují do druhého lineárního hexapólového vodiče iontů H1, který může být také využit jako lineární iontová past (kumulační hexapól). Hexapólový iontový vodič H0 je umístěn na pohyblivé se platformě, na které je zároveň umístěn i MALDI terčik.

V případě používání MALDI zdroje tak pohyblivá se platforma odsune hexapól H0 z dráhy a před H1 předsune MALDI terčik. Stejně jako všechny ostatní MALDI přístroje firmy Bruker Daltonics má i přístroj APEX-Q MALDI terčik ve standardním formátu mikrotitračních destiček (MTP, z angl. MicroTiter Plate) s 384 pozicemi pro nanášení vzorků. Také v tomto případě lze kromě klasických ocelových MALDI terčiků využívat patentované technologie AnchorChip, kdy je povrch terčiku pokryt hydrofobní vrstvou a pouze na jednotlivých pozicích jsou místa s hydrofilními kotvičkami, které slouží k lepšímu zkoncentrování a homogennímu usychání vzorku na terčiku. Mezi největší výhody této technologie patří bezesporu zvýšená citlivost a rozlišení přístroje³⁵. MALDI terčik se může pohybovat v osách X a Y a tím lze buď manuálně nebo automaticky ozařovat laserem jakoukoli z 384 pozic se

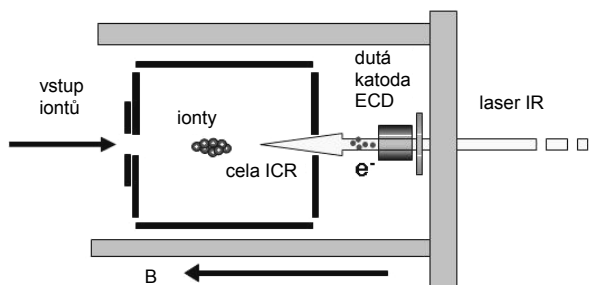
vzorkem. Po laserovém nástřelu jsou molekuly desorbovány z matrice a ionizovány přímo do kumulačního hexapólu H1. V MALDI módu je současně s laserovým pulzem použitelný do hexapólu H1 kolizní plyn, který má za úkol zchladit desorbované a ionizované molekuly. Desorbované ionty tak lze před vstupem do ICR zchladit a hromadit v H1, který slouží jako jednoduchá lineární iontová past. Přepnutí z MALDI módu do ESI a zpět je principálně velmi rychlé, probíhá automaticky řádově v desítkách sekund.

Nejnovější intenzivní výzkum v oblasti hmotnostně selektivní iontové optiky pro FTMS systémy, která slouží k selektivní akumulaci a/nebo disociaci iontů ještě před vstupem do vlastní cely ICR, výrazně obohatil možnosti FTMS instrumentace^{36,37}. První část iontové optiky přístroje APEX-Q je tvořena kvadrupólovým hmotnostním filtrem Q1, za kterým je umístěna hexapólová kolizní cela H2. Ionty tak mohou být kumulovány buď již v lineární hexapólové pasti Apollo zdroje H1, nebo v hexapólové kolizní cele H2. Výhodou kumulace iontů až v hexapólu H2 je její vysoká selektivita, protože se hromadí pouze ionty o přesně vybraném m/z , které jsou před tím izolovány při průletu kvadrupólem Q1. Tímto způsobem může být například zvýšena pro ionty s velmi nízkým přirozeným výskytem jejich populace v hexapólu H2 ještě před jejich fragmentací. Tento typ kumulace iontů pak vede k výraznému zvýšení citlivosti přístroje v MS/MS módu. Aby bylo možné provést fragmentaci iontů v kolizní cele H2 (CID), musí se snížit kompenzace stejnosměrného proudu v H2, čímž se získá správná kolizní energie, důležitá pro fragmentaci iontů. Na závěr jsou všechny fragmenty poslány do ICR cely k analýze. Z toho důvodu se všechna FTMS spektrální data vyznačují vysokou přesností změře-

ných hmot a rozlišením.

Kromě výše zmiňovaného způsobu kumulace a následné CID-fragmentace v hexapólu H2 se v FTMS instrumentaci využívají další fragmentační techniky, používané přímo v cele ICR: SORI, IRMPD a ECD. V případě fragmentační techniky SORI se v podstatě jedná o typ CID fragmentace, kdy se pomocí dusíkového pulzu zvýší tlak v cele ICR až na 10^{-6} mbar a současně se akcelerují ionty pomocí mimořezonančního radiofrekvenčního urychlovacího napětí, které je obvykle nastaveno o 1–2 kHz nižší než cyklotronová frekvence studovaných iontů²⁰. Pokaždé, když je cyklotronová frekvence iontů ve stejné fázi s frekvencí mimořezonančního napětí, dojde k jejich urychlení, naopak pokud jsou v opačné fázi, dojde k jejich opětovnému zpomalení. Urychlené ionty kolidují s atomy dusíku v cele a při každé kolizi dojde k dodání malého množství excitační energie těmto iontům. Tím, že se tento proces opakuje v řádech stovek cyklů za sekundu, dochází k dodání dostatečného množství energie pro vlastní nízkoenergetické fragmentační procesy. Nově vzniklé fragmenty ale již nejsou v rezonanci s radiofrekvenčním urychlovacím napětím, a proto nedochází k jejich urychlování a tím další fragmentaci. Nevýhodou této fragmentační techniky je její relativní pomalost oproti IRMPD a ECD z důvodu nutnosti zavádění a následného odvádění kolizního plynu dusíku z ICR cely.

Druhým a podstatně rychlejším způsobem nízkoenergetické fragmentace je využití excitace paprskem infračervených fotonů (IRMPD). Pro IRMPD způsob fragmentace je používán laser CO₂ s maximálním výstupním výkonem 25 W (Synrad, Mukilteo, WA, USA), který je umístěn za vlastním magnetem s celou ICR (obr. 2). Laserový paprsek prochází do vlastního vakuovaného prostoru s celou ICR přes BaF okénko a následně otvorem ve středu duté katody ECD (obr. 3). S každým absorbovaným fotonem dochází k absorpci malého množství energie peptidickými ionty a jejich excitaci. Protože dochází k absorpci velkého množství fotonů, je tato výsledná a prostorově distribuovaná energie dostatečná pro nízkoenergetické fragmentace absorbujících nabitých molekul. Na rozdíl od SORI však nově vzniklé fragmenty dále absorbují energii z přicházejících fotonů a dochází



Obr. 3. Detailnější náčrt uspořádání ICR cely a fragmentačních technik IRMPD a ECD

k jejich dalším nízkoenergetickým fragmentacím. Z toho důvodu jsou IRMPD fragmentační spektra bohatší na menší fragmenty a jsou tím méně specifická než spektra SORI.

Třetí fragmentační metodou prováděnou uvnitř cely ICR je ECD fragmentace, která se od SORI a IRMPD výrazně liší. Aby bylo možné použít IRMPD a ECD techniky zároveň bez jakýchkoliv úprav, byla vytvořena nepřímo zahřívána dávkovací katoda prstencovitého tvaru³⁸. Toto uspořádání pak dovoluje provádět vysokorychlostní ECD fragmentaci prstencovitým proudem pomalých elektronů o nízké energii (< 1 eV), který je kolmý na celou ICR. Pokud několikanásobně nabitý iont v ICR cele zachytí elektron, uvolní se velké množství energie a dochází k rychlé fragmentaci. Jako nejpravděpodobnější princip této fragmentace se považuje princip tzv. „horkého vodíkového atomu“³⁹. Při něm dochází k zachycení elektronu funkční skupinou s násobným nábojem na pozitivním iontu (typicky protonovaný Arg, Lys, His nebo terminální aminokyselina), čímž dojde k neutralizaci náboje a tvorbě radikálů nebo iontů s nespárovaným elektronem. Následkem toho dochází k rychlému rozpadu vazby N–H a uvolnění „horkého“ vodíkového atomu s přebytkem energie cca 6 eV. Tento vodíkový atom se přesouvá podél peptidové páteře k funkční skupině s vysokou afinitou k vodíku, (např. skupina NHCO), kde je znovu navázán. Díky lokálnímu přebytku energie přinesené vodíkovým atomem dochází k rychlému rozpadu vazby N–C α . N–Koncový peptidový fragment pak reprezentuje produktový iont C-typu a C-koncový peptidový fragment reprezentuje produktový iont Z-typu. Díky vysoké rychlosti tohoto fragmentačního procesu nedochází k distribuci excitační energie přes další atomy v molekule a lze získat fragmenty obsahující i jinak labilní post-translační modifikace, které se při použití nízkoenergetických fragmentací ztrácejí. Z toho důvodu je ECD vhodnou fragmentační technikou nejen pro sekvenování peptidů a malých proteinů, ale také pro zjišťování post-translačních modifikací.

Postupné nebo současné použití SORI, IRMPD a ECD a fragmentace na identické skupině iontů chyčených v cele ICR v rámci jednoho FTMS experimentu dovoluje získat víceúrovňová MS/MS/MS data. Tato vysoká flexibilita výměny/přepínání mezi IRMPD a ECD v rámci stejného experimentu je velice výhodná během analýz proteinových štěpení, popř. analýz celých proteinů. Obecně pak platí, že možnost provádění IRMPD a ECD experimentů je jednou z hlavních výhod FTMS instrumentace ve srovnání s tandemovými spektrometry typu trojitý kvadrupól nebo QTOF, které dovolují provádět pouze časově náročnější CID experimenty.

Pro všechny zde zmiňované proteomické analýzy s využitím FTMS instrumentace byl použit systém kapalinové chromatografie Ultimate NanoLC od firmy Dionex/LC Packings, který byl doplněn autosamplérem Famos a přepínačem mikrokolon Switchos II. Použitý průtok byl 200 nL min⁻¹ při 90–120 min gradientu acetonitril/voda. Pro separaci byla použita 75 μ m PepMap kolona od firmy LC Packings.

3. Výsledky a diskuse

3.1. Výhoda robustnosti kombinovaného ionizačního zdroje

Obrovskou výhodou kombinovaného ESI/MALDI zdroje „CombiSource“ je, že během přepínání mezi těmito módy není třeba systém stále kalibrovat ani jinak ladit. Následující experiment ukazuje stabilitu a robustnost systému i při častém automatickém přepínání mezi módy. V tomto experimentu byl pro měření použit peptid LHRH (s monoizotopickým píkem MH^+ 1183,56432 Da), který byl střídavě ionizován pomocí MALDI i ESI. Během 30 min došlo 20× k automatické výměně modů. Přesnost získaných dat v ESI módu byla 0,81 ppm (standardní odchylka 0,2 ppm) a v MALDI módu 1,18 ppm (odchylka 0,45 ppm) jak ukazuje tabulka I.

3.2. Unikátní rozlišení i pro vysoké hmotnosti

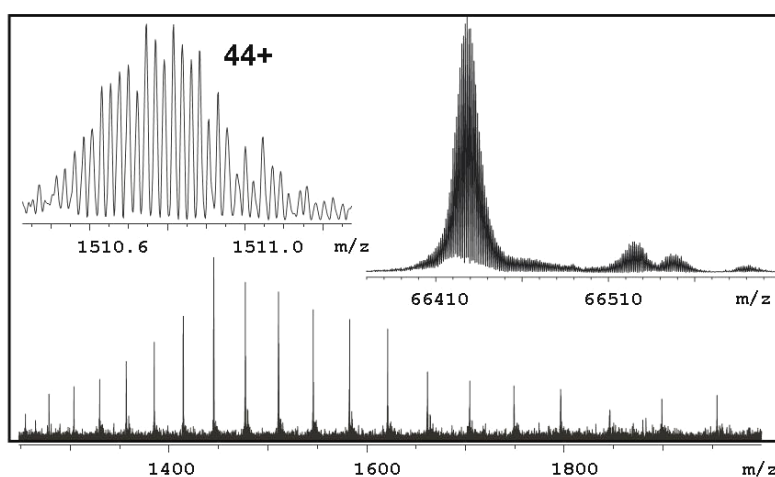
Rozlišení systému APEX-Q může dosáhnout až hodnot větších než milión. Obr. 4 ukazuje MALDI spektrum Substance P (MW 1346,728 Da) s rozlišením 1,8 miliónu při použití magnetu o indukci 9,4 Tesla. Při těchto rozlišeních mohou být izotopicky rozlišeny kompletní proteiny. Obr. 4 ukazuje ESI hmotnostní spektrum intaktního BSA (albumin v hovězím séru, MW 66 430 Da). Jak je vidět z obr. 4, je v tomto spektru možné pozorovat a jasně rozlišit i malé aduktivní ionty. Nicméně měřicí čas pro získání tohoto FT spektra je cca 5 s, což je relativně dlouhá doba, která neodpovídá typické šířce píků HPLC. Z toho důvodu bylo toto spektrum změněno v infúzním experimentu. Protože většina parametrů FTMS přístroje se zlepšuje lineárně nebo kvadraticky se zvyšujícím se polem magnetu⁴⁰, je použití FTMS instrumentace s lepšími magnety důležité pro provádění experimentů také na časové škále HPLC (jednotky až desetiny sekund). Obr. 5 ukazuje ESI spekt-

rum intaktního proteinu karbonáthydrolyasy (MW 29 022 Da) s plným izotopickým rozlišením, získaným za 0,5 s na FTMS přístroji s magnetem 12 Tesla.

Tabulka I

Ukázka robustnosti kombinovaného ionizačního zdroje CombiSource na hodnotách přesnosti změřených hmot pro peptid LHRH (MH^+ 1183,56432 Da) při automatickém střídání ionizací ESI a MALDI

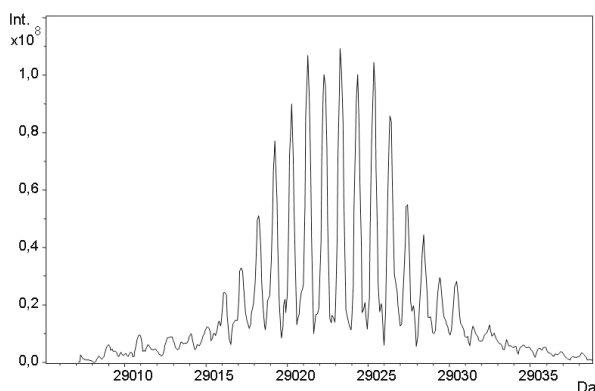
Zdroj	Experimentální hmota [Da]	Přesnost hmot [ppm]
MALDI	1183,56225	1,75
ESI	1183,56342	0,76
MALDI	1183,56312	1,01
ESI	1183,56366	0,56
MALDI	1183,56311	0,85
ESI	1183,56330	0,86
MALDI	1183,56323	0,69
ESI	1183,56334	0,83
MALDI	1183,56323	0,92
ESI	1183,56342	0,76
MALDI	1183,56218	1,81
ESI	1183,56346	0,73
MALDI	1183,56262	1,44
ESI	1183,56342	1,33
MALDI	1183,56230	1,71
ESI	1183,56346	0,73
MALDI	1183,56311	1,02
ESI	1183,56342	0,76
MALDI	1183,56357	0,63
ESI	1183,56344	0,74
<i>Průměr z MALDI</i>	<i>1183,56292</i>	<i>1,18</i>
<i>Průměr z ESI</i>	<i>1183,56337</i>	<i>0,81</i>



Obr. 4. Ukázka vysokého rozlišení přístroje na plně rozlišeném ESI spektru pro intaktní BSA (albumin v hovězím séru, MW 66 430 Da)

3.3. Unikátní přesnost změřených hmot v MS spektrech

Stejně kvalitní výsledky jako pro celé proteiny o vysokých hmotnostech lze samozřejmě získat i pro proteinové štěpy. Obr. 6 ukazuje BPC (Base Peak Chromatogram) pro albumin hovězího séra (BSA), štěpení a MS/MS spektrum vybraného piku. Jak lze zjistit z vyhledávání v databázi MASCOT, jsou přesnosti měřené hmoty pro

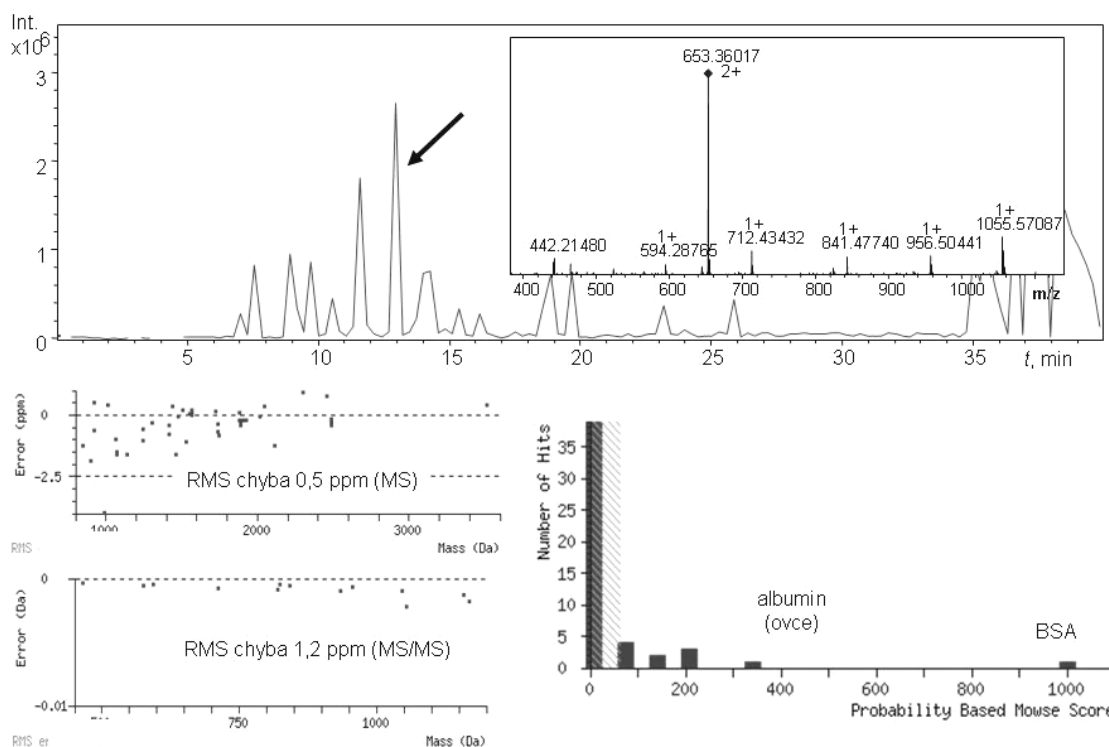


Obr. 5. Ukázka vysokého rozlišení přístroje na izotopicky rozlišeném ESI spektru pro intaktní protein karbonáthydrolyasu (MW 29 022 Da)

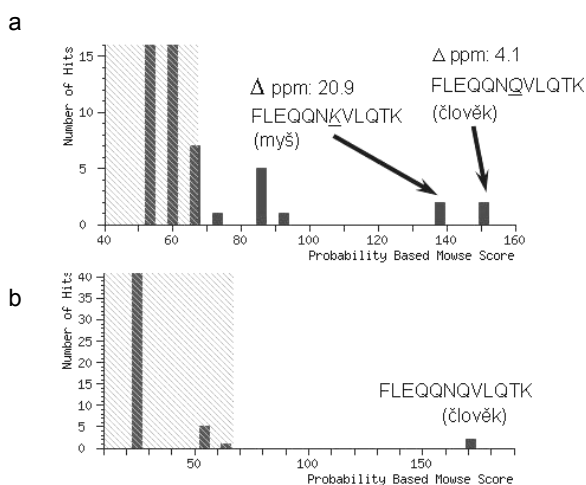
MS spektra (důležité pro experimenty proteinového otisku prstu – PMF, z angl. Peptide Mass Fingerprinting) a MS/MS spektra v průměru 0,5 ppm, resp. 1,2 ppm (standardní odchylky jsou 0,78 ppm, resp. 1,78 ppm). Vyhledávání v databázi MASCOT bylo provedeno s tolerancí chyby určení MS spektra 5 ppm a chyby určení MS/MS spekter 10mDa a získané výsledky vyhledávání vedly k jednoznačnému určení proteinu BSA na základě vysokého počtu pozitivních nálezů v databázi (obr. 6). Přesnost měřené hmoty v MS spektrech je bezesporu nejdůležitějším parametrem pro vyhledávání PMF v proteinových databázích. Se zvyšující se přesností se omezuje možnost falešných pozitivních nálezů v databázi a urychluje se vyhledávací čas.

3.4. Vysoká přesnost hmotností v MS/MS spektrech

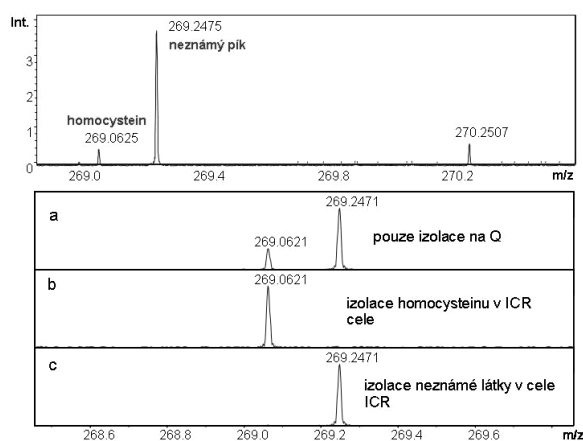
Také pro získaná MS/MS data je velmi důležitá přesnost měřené hmotnosti vzorků. V některých případech totiž může být velmi důležité rozlišovat i malé rozdíly v sekvencích na základě ultrapřesných MS/MS spekter. Obr. 7 ukazuje např. FT MS/MS spektrum ze štěpení proteinu albuminu v lidském séru (HSA – Human Serum Albumin). Pokud by toto MS/MS spektrum bylo použito pro vyhledávání s povolenou chybou hmoty 50 ppm (což je typická hodnota pro spektra z iontových pastí), z databáze MASCOT by byly získány dvě podobné peptidové sekven-



Obr. 6. Ukázka přesnosti přístroje při měření MS a MS/MS spekter pro PMF experimenty a jejich důležitosti pro jednoznačné vyhledávání pomocí databáze MASCOT



Obr. 7. Ukázka vlivu přesnosti měření MS/MS spekter na jednoznačné určení proteinu albuminu v lidském séru pomocí databázového vyhledávání MASCOT; a) obr. ukazuje výsledek vyhledávání při povolené chybě 50 ppm a b) obr. při povolené chybě 5 ppm



Obr. 8. Ukázka vysoké přesnosti izolace a fragmentace v ICR cele na spektru aminokyseliny homocysteinu o m/z 269,0625; v cele ICR lze izolovat a separátně fragmentovat dva různé píky s minimálním rozdílem hmot

ce z různých živočišných druhů, v tomto případě z myši a člověka (obr. 7a). Hmotnostní rozdíl těchto dvou sekvencí je přitom pouhých 36 mDa, daných rozdílem hmotností aminokyselin Gln a Lys. Takovýto výsledek by přitom vedl k úvahám, zda se jedná pouze o kontaminant, který se dostal do vzorku v rámci laboratorní přípravy, nebo zda se jedná o peptid důležitý pro lidský protein. Pokud by se však jednalo o spektrum z FTMS a kritérium povolené chyby hmoty pro vyhledávání by bylo 5 ppm, výsledek z databáze by jednoznačně odhalil protein jako lidský (obr. 7b).

3.5. Možnosti ultrapřesné izolace a fragmentace

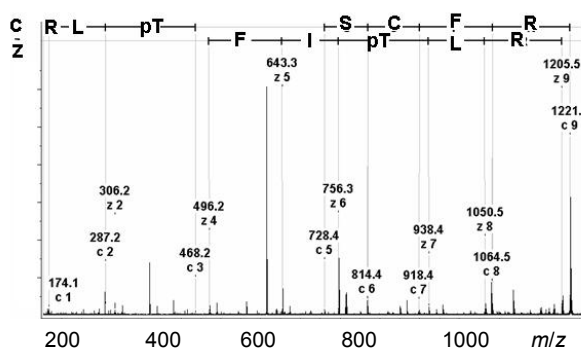
FTMS poskytuje nejen MS/MS data s vysokou přesností hmotností a rozlišením. V případě, že k izolaci a fragmentaci iontů dochází v ICR cele namísto ve vnějším kvadrupólu Q1 a hexapólu H2, je tato izolace před vlastní fragmentací extrémně přesná. Obr. 8 ukazuje tento výhodný způsob izolace na spektru aminokyseliny homocysteinu o m/z 269,0625. V tomto spektru se kromě píku aminokyseliny vyskytuje také jeden neznámý pik, který je posunut pouze o 185 mDa. Oba píky přitom mohou být v cele ICR izolovány a následně fragmentovány individuálně. Používá se k tomu technologie korelovaných harmonických excitačních polí CHEF (z angl. Correlated Harmonic Excitation Fields), která vychází z principu fragmentace SORI (cit. ^{41–46}). Tuto technologii lze s úspěchem využít pro izolaci násobných iontů pro kterýkoli z MS^n fragmentačních kroků. Navíc lze pomocí prvotní izolace na Q1 ještě minimalizovat počet jiných nežádoucích iontů před vstupem do cely ICR.

3.6. Různé možnosti fragmentace iontů

CID je homogenní (ergodická) fragmentační technika, při které dochází k distribuci energie mezi všechny kolizí excitované ionty a případně vede k disociaci na místech nejslabších vazeb. Např. u post-translačně modifikovaných (PTM) peptidů dochází obvykle k fragmentaci na nejvíce labilních vazbách, tedy vazbách na danou modifikaci. Ve většině případů tedy tato MS/MS spektra nedovolují žádnou interpretaci, která by vedla k identifikaci umístění vazebného místa PTM v peptidu.

Na druhé straně ECD indukuje fragmentaci elektronovým paprskem s nízkou energií letícího uvnitř cely ICR, ve které se spirálovitě pohybují zachycené ionty. V případě, že několikanásobně nabitý iont zachytí elektron, dojde k uvolnění velkého množství energie a dochází k okamžité fragmentaci v místě nebo blízko záchytu elektronu. Mechanismus této fragmentace je vysvětlen intramolekulárním přenosem vodíku, který má za následek rychlou fragmentaci před náhodnou distribucí vzniklé energie. Okamžitou fragmentací dochází ke vzniku fragmentů, které obsahují labilní PTM a které by byly při použití fragmentace CID ztraceny. Z toho důvodu může být ECD technika použita nejen jako další pomocník pro zjišťování sekvence peptidů a malých proteinů z MS/MS spekter, ale také a především může být a bývá použita pro zjišťování pozic labilních PTM. FTMS je v současné době jediný hmotnostní analyzátor, který je schopen provádět ECD experimenty, jelikož je to jediná iontová past, ve které elektrony a mnohonásobně nabití ionty mohou existovat společně při relativně nízkých energiích. Obr. 9 zobrazuje MS/MS spektrum ECD fragmentace fosforylovaného peptidu. Na rozdíl od CID fragmentace v Q1 je pouze ECD fragmentační technika schopna odhalit PTM threoninu na pozici T3.

ECD je sama o sobě velice efektivní fragmentační technikou, v kombinaci s IRMPD však navíc dovoluje disociace velkých peptidů nebo dokonce intaktních a vyso-



Obr. 9. MS/MS spektrum fosforylovaného peptidu, ukazující možnost použití ECD fragmentace pro jednoznačné určování post-translačních modifikací v proteinech či peptidech

ce odolných proteinů⁴⁷. IRMPD pracuje na principu ozáření mateřských (prekursorových) iontů intenzivním proudem infračervených fotonů o šířce cca 2 mm. Fragmentace poté probíhá směrem od ozářených, tzv. „horkých“ iontů. Díky dobrému prostorovému překrytí infračerveného paprsku s oblakem vzniklých primárních fragmentů je často možné provést jejich další efektivní excitaci a případnou sekundární fragmentaci. Obvyklý postup fragmentačních experimentů na iontech proteinů v cele ICR je jejich excitace proudem infračervených fotonů a následná fragmentace pomocí ECD. Tímto způsobem pak vzniká vysoký počet násobně nabitých iontů a tyto jsou využívány pro přesné ověření proteinových sekvencí.

4. Závěr

Jak bylo ukázáno na některých příkladech v tomto článku, je technologie FTMS v současnosti nejvyšší hmotnostně spektrometrickou metodou, která může být použita pro nejrůznější (nejen) proteomické studie. FTMS se vyznačuje možnostmi získat spektra s maximálním rozlišením a přesností hmot, kromě toho se jedná o metodu velice citlivou. Navíc se FTMS instrumentace firmy Bruker Daltonics vyznačuje výraznou modifikovatelností a to jak na straně plně automatických kombinovaných ESI/MALDI zdrojů, tak na straně možných izolačních a fragmentačních technik. Možnost osazení magnety o síle až 12 Tesla dělá z těchto instrumentů i velmi rychlé spektrometry, které lze spojovat s rychlou HPLC, nanoLC nebo dokonce CE. Všechny tyto výhody a nesporné kvality FTMS instrumentace jsou bohužel vyváženy její relativně vysokou cenou, která v současnosti brání jejímu masovějšímu rozšíření. Bezsporu se ale jedná o technologii se zajímavou budoucností.

LITERATURA

1. Comissarow M. B., Marshall A. G.: *J. Chem Phys.* 62, 293 (1975).

2. Comissarow M. B., Marshall A. G.: *J. Chem. Phys.* 64, 110 (1976).

3. Marshall A. G., Grosshans P. B.: *Anal. Chem.* 63, 215A–229A (1991).

4. Baykut G., Eyley J.: *Trends Anal. Chem.* 5, 44 (1989).

5. Marshall A. G., Hendrickson C. L., Jackson G. S.: *Mass Spectrom. Rev.* 17, 1 (1998).

6. Amster I. J.: *J. Mass Spectrom.* 31, 1325 (1996).

7. Qian K., Rodgers R. P., Hendrickson C. L., Emmett M. R., Marshall A. G.: *Energy Fuels* 15, 492 (2001).

8. Rodgers R. P., Blumer E. N., Freitas M. A., Marshall A. G.: *Anal. Chem.* 71, 5171 (1999).

9. Walk T. B., Trautwein A. W., Bandel H., Jung G.: *Comb. Chem.* 1999, 561.

10. Schmid D. G., Grosche P., Bandel H., Jung G.: *Biotechnol. Bioeng.* 71, 149 (2001).

11. He H., Shen B., Korshalla J., Siegel M. M., Carter G. T. J.: *Antibiot.* 53, 191 (2000).

12. Shi S. D.-H., Hendrickson C. L., Marshall A. G., Siegel M. M., Kong F., Carter G. T.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 1285 (1999).

13. Huang N., Siegel M. M., Kruppa G. H., Laukien F. H.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 1166 (1999).

14. Shen Y., Tolic N., Zhao R., Pasa-Tolic L., Li L., Berger S. J., Harkewicz R., Anderson G. A., Belov M. E., Smith R. D.: *Anal. Chem.* 73, 3011 (2001).

15. Pasa-Tolic L., Jensen P. K., Anderson G. A., Lipton M. S., Peden K. K., Martinovic S., Tolic N., Bruce J. E., Smith R. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 121, 7949 (1999).

16. Hofstadler S. A., Griffey R. H.: *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* 3, 423 (2000).

17. Griffey R. H., Sannes-Lowery K. A., Drader J. J., Mohan V., Swayze E. E., Hofstadler S. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 122, 9933 (2000).

18. Griffey R. H., Hofstadler S. A., Sannes-Lowery K. A., Ecker D. J., Crooke S. T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 10129 (1999).

19. Gauthier J. W., Trautman T. R., Jacobson D. B.: *Anal. Chem. Acta* 246, 211 (1991).

20. Senko M. W., Speir J. P., McLafferty F. W.: *Anal. Chem.* 66, 2801 (1994).

21. Little D. P., Speir J. P., Senko M. W., O'Connor P. B., McLafferty F. W.: *Anal. Chem.* 66, 2809 (1994).

22. Zubarev R. A., Horn D. M., Fridriksson E. K., Kelleher N. L., Kruger N. A., Lewis M. A., Carpenter B. K., McLafferty F. W.: *Anal. Chem.* 72, 563 (2000).

23. Hakansson K., Emmett M. R., Hendrickson C. L., Marshall A. G.: *Anal. Chem.* 73, 3605 (2001).

24. Li W., Hendrickson C. L., Emmett M. R., Marshall A. G.: *Anal. Chem.* 71, 4397 (1999).

25. Palmblad M., Tsybin Y. O., Ramstrom M., Bergquist J., Hakansson P.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 988 (2002).

26. Davidson W., Frego L.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 993 (2002).

27. Tsybin Y. O., Wetterhall M., Markides K. E., Hakansson P., Bergquist J.: *Eur. J. Mass Spectrom.* 8, 389 (2002).

28. Shen Y., Zhao R., Belov M. E., Conrads T. P., Anderson G. A., Tang K., Pasa-Tolic L., Veenstra T. D., Lipton M. S., Udseth H. R., Smith R. D.: *Anal. Chem.* **73**, 1766 (2001).
29. Wetterhall M., Johnson T., Bergquist J., v knize: *Mass Spectrometry and Hyphenated Techniques in Neuropeptide Research*, (Silberring J., Ekman R., ed.), str. 135. John Wiley, New York 2002.
30. Yamashita M., Fenn J. B.: *J. Phys. Chem.* **88**, 4451 (1984).
31. Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M.: *Science* **246**, 64 (1989).
32. Karas M., Bahr U., Bachmann D., Hillenkamp F.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **78**, 53 (1987).
33. Karas M., Bahr U., Hillenkamp F.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **92**, 231 (1989).
34. Baykut G., Fuchser J., Witt M., Weiss G., Gosteli C.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 1631 (2002).
35. Schurenberg M.: *Anal. Chem.* **72**, 3436 (2000).
36. Wang Y. S., Stone S. D. H., Hendrickson C. L., Marshall A. G.: *Int. J. Mass Spectrom.* **198**, 113 (2000).
37. Belov M. E., Nikolaev E. N., Anderson G. A., Udseth H. R., Conrads T. P., Veenstra T. D., Masselon C. D., Gorshkov M. V., Smith R. D.: *Anal. Chem.* **73**, 253 (2001).
38. Tsybin Y. O., Witt M., Baykut G., Kjeldsen F., Hakansson P.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 1759 (2003).
39. McLafferty F. W., Guan Z., Haupts U., Wood T. D., Kelleher N. L.: *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 4732 (1998).
40. Marshall A.G., Guan S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1819 (1996).
41. Heck A. J. R., De Koning L. J., Pinkse F. A., Nibbering N. M. M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5**, 406 (1991).
42. de Koning L. J., Nibbering N. M. M., van Orden S. L., Laukien F. H.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **165/166**, 209 (1997).
43. Heck A. J. R., Derrick P. J.: *Anal. Chem.* **69**, 3603 (1997).
44. Heck A. J. R., O'Sullivan M. L., Derrick P. J.: *Adv. Mass Spectrom.* **14**, C026140/1-C026140/6 (1998).
45. Heck A. J. R., Derrick P. J.: *Eur. Mass Spectrom.* **4**, 181 (1998).
46. Kawashima K.: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **47**, 160 (1999).
47. Meng F., Du Y., Miller L. M., Patrie S. M., Robinson D. E., Kelleher N. L.: *Anal. Chem.* **76**, 2852 (2004).

M. Boháč^a, A. Ingendoh^b, J. Fuchser^b, and M. Witt^b (^a *Scientific Instruments Co., Brno, Czech Republic,* ^b *Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany*): **Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry as the Most Precise and Flexible Method in Proteomics and its Application**

This paper reviews the application of FT-ICR mass spectrometers for various proteomic purposes and presents on several examples advantages over other mass spectrometry approaches. FT-ICR MS shows uncomparably high resolution. Numerous isolation and dissociation/fragmentation techniques, such as SORI and ECD (Electron Capture Dissociation), or their combination, give precise information about studied proteomic samples.