



## Oznaczanie modyfikacji potranslacyjnych białek metodami spektrometrii mas

Łukasz Marczak

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

### Analysis of protein posttranslational modifications using mass spectrometry

#### Summary

Identification of posttranslational modifications (PTMs) of proteins provides better understanding of their biological functions. Mass spectrometry has become a method of choice for the analysis of PTMs, both MALDI-ToF and tandem (MS/MS) mass spectrometers are perfect tools for assignment of PTMs. The latter due to their peptide fragmentation capability give better identification and information about localization of PTMs in protein molecule. In this paper, an overview of possible use of mass spectrometry and bioinformatic tools together with description of the basic features and limits of the analysis of post translational modifications by mass spectrometry are presented.

#### Key words:

mass spectrometry, posttranslational modifications, proteins, proteomics, peptide fragmentation, chromatography.

### 1. Wprowadzenie

Zasadniczy postęp uzyskany w ostatnim dwudziestolecu w konstrukcji spektrometrów mas, polegający na opracowaniu nowych metod jonizacji, sposobów rozdziału generowanych jonów oraz podwyższeniu czułości spowodował, że ta metoda instrumentalna jest powszechnie z powodzeniem stosowana w analizach proteomicznych (1,2). Prowadzone badania dotyczą m.in. analizy potranslacyjnych modyfikacji białek, czyli chemicznych zmian ich reszt aminokwasowych mających wpływ na

#### Adres do korespondencji

Łukasz Marczak,  
Instytut Chemii  
Bioorganicznej,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Noskowskiego 12/14,  
61-704 Poznań.

właściwości fizykochemiczne oraz stabilność i aktywność tej klasy biopolimerów. Wprowadzenie w określonych pozycjach nowych grup chemicznych często prowadzi do zmiany funkcji białka, którego różne izoformy mogą brać udział w odmiennych procesach biologicznych. Obok alternatywnego splicingu oraz cięć proteolitycznych są one odpowiedzialne za dużą zmienność proteomu u eukariontów – genom człowieka liczy około 30 tys. genów, a ilość białek szacuje się na poziomie ok. 10 razy wyższym. Obecność modyfikacji potranslacyjnych w białku powoduje zmiany w oddziaływaniach z innymi białkami, kierowanie ich do specyficznych miejsc w komórce, oraz ma wpływ na strukturę trzeciorzędową cząsteczek. Na przykład, przyłączenie grup fosforanowych – fosforylacja, lub acetylacja czy metylacja pełnią rolę swoistych przełączników regulujących replikację czy naprawę uszkodzeń DNA (3). Fosforylacja jest również obok ubikwitynylacji oraz specyficznej glikozylacji białek istotnym znacznikiem w procesach prowadzących do ich degradacji (4). Zaburzenia w procesach regulujących modyfikacje białek są groźne dla organizmu, w przypadku ludzi mogą prowadzić do wielu chorób, takich jak: choroba Alzheimera (5) czy choroby nowotworowe (6). Niektóre reakcje prowadzące do chemicznej modyfikacji białek są jednak procesami niekontrolowanymi i mogą prowadzić same w sobie do stanów chorobowych. Przykładem takiego typu reakcji jest N-homocysteinyłacja, czyli przyłączenie cząsteczki homocysteiny do reszty lizyny w białkach. W wyniku podstawienia homocysteiny do reszty lizyny diametralnie zmieniają się właściwości chemicznie modyfikowanych białek poprzez zmianę struktury trzeciorzędowej, co w konsekwencji może prowadzić np. do chorób układu krwionośnego w przypadku białek krwi (7). W świecie ożywionym mamy do czynienia z różnego typu modyfikacjami, gdzie odpowiednie cząsteczki są przyłączane do grup hydroksylowych, aminowych oraz tiolowych w resztach aminokwasowych w łańcuchu peptydowym. Należy również pamiętać, że niektóre modyfikacje, takie jak alkilacje grup tiolowych czy też utlenianie reszt metioniny i tyrozyny zostają w sposób zamierzony bądź nie wprowadzone do cząsteczek białka podczas procesów przygotowywania próbek do analiz metodami spektrometrii mas (8).

Z podanych względów niezwykle istotna jest identyfikacja modyfikacji białka oraz określenie reszt aminokwasowych, które ulegają zmianie (podstawieniom grupami modyfikującymi), gdyż pozwala to na dokładniejsze poznanie funkcji białek w żywym organizmie (9,10). Szczególnie istotne znaczenie ma jednak analiza modyfikacji dla poznania procesów prowadzących do powstania stanów chorobowych, gdyż wiadomo, że rozregulowanie procesów, np. fosforylacji czy glikozylacji białek może być przyczyną wspomnianych chorób (5,6). Od wielu lat do analizy modyfikacji potranslacyjnych białek wykorzystuje się różnorakie techniki spektrometrii mas. W celu rozdzielenia skomplikowanych mieszanin substancji spektrometry mas sprzęgane są z urządzeniami służącymi do rozdzielenia mieszanin, takimi jak chromatograf ciekłowy o niskich przepływach (rzędu 100 – 500 nl/min) oraz małych średnicach stosowanych kolumn (ok. 100  $\mu$ m) (11). Do wstępnego rozdzielenia mieszaniny białek używa się również technik elektroforezy żelowej oraz elektroforezy kapilarnej (12-14).

Oznaczenie masy całego, oczyszczonego białka jest przydatną metodą w szukaniu modyfikacji – porównanie eksperymentalnie oznaczonej masy cząsteczkowej białka z masą obliczoną ze znanej sekwencji aminokwasowej dostarcza podstawowych informacji na temat potencjalnie przyłączonych podczas różnych procesów biochemicznych reszt chemicznych. Dodatkowo, analiza widma masowego (wartości  $m/z$  poszczególnych jonów oraz ich intensywności) często pozwala odkryć modyfikacje heterogenne wynikające z obróbki białka, a które opisują różny stan zmodyfikowania białka. Analiza całych białek nie daje jednak żadnej informacji o lokalizacji modyfikacji, tak zatem konieczna jest analiza sekwencji peptydów powstających w wyniku trawienia białka za pomocą technik tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) (15). Istnieje wiele podejść metodycznych służących do identyfikacji oraz lokalizowania modyfikacji białek, ale najpopularniejszymi i najefektywniejszymi są:

1) mapowanie peptydów realizowane z wykorzystaniem techniki MALDI ToF (ang. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*), czyli spektrometria mas z jonizacją poprzez desorpcję próbki laserem z matrycy, gdzie rozdział jonów zachodzi w analizatorze mierzącym czas lotu jonów. Porównaniu podlegają masy peptydów powstających w wyniku trawienia proteazami (jony  $[M+H]^+$ ). Widma masowe są rejestrowane zarówno dla białek modyfikowanych jak i białek pozbawianych grup modyfikujących;

2) sekwencjonowanie peptydów modyfikowanych stosując układy chromatograf cieczerw – tandemowy spektrometr mas (LC/ESI/MS<sup>n</sup> lub LC MALDI/ToF/ToF) (16-18).

W obu omawianych podejściach białka badane analizuje się po uprzednim strawieniu proteolitycznym, w wyniku czego otrzymuje się złożoną mieszaninę peptydów. Wykorzystanie technik chromatograficznych (LC – chromatografia cieczerw, CE – elektroforeza kapilarna) do rozdzielania mieszanin peptydów uzyskanych w wyniku trawienia modyfikowanego i niemodyfikowanego białka przed wykonaniem widm masowych znacznie zwiększa prawdopodobieństwo zidentyfikowania typu i miejsca modyfikacji (13,14).

Najistotniejszą grupę modyfikacji białek stanowią podstawniki chemiczne, kowalencyjnie przyłączone do reszt aminokwasowych w wyniku działania różnorodnych enzymów. Wśród nich należy wymienić fosforylację, sulfatację, nitrację, O- i N- glikozylację oraz acylację. Inną grupę stanowią modyfikacje wynikające z proteolitycznego cięcia białka, które prowadzą do obniżenia jego masy cząsteczkowej. Jako przykład można tutaj podać odcięcie reszty metioniny, prowadzące do zmniejszenia masy cząsteczkowej o 131 Da. Również obróbka białka prekursorowego, polegająca na odcięciu sekwencji sygnałnej prowadząca do jego biologicznej aktywacji jest przykładem tego typu modyfikacji potrancyjnej. Można wymienić jeszcze takie zmiany w białku jak: utlenianie reszt aminokwasowych (metionina i tryptofan), czy tworzenie mostków disiarczkowych pomiędzy resztami cysteiny (19,20).

## 2. Wykorzystanie technik spektrometrii mas do analizy modyfikacji potranslacyjnych białek

### 2.1. Spektrometria mas MALDI ToF

Zastosowanie spektrometrów mas MALDI-ToF pozwala na określenie mas cząsteczkowych peptydów z dokładnością nawet do 5 ppm. Największymi zaletami tej techniki są: wysoka czułość i tolerancja na obecność w próbce soli oraz innych zanieczyszczeń (bufory, detergenty, polimery, itp.), a także – w ograniczonym zakresie, możliwość analizy fragmentacji poszczególnych składników badanych mieszanin (21-23). Zarejestrowane w widmie masowym wartości  $m/z$  dla poszczególnych desorbowanych z matrycy protonowanych cząsteczek  $[M+H]^+$  peptydów, czyli produktów otrzymanych w wyniku trawienia proteolitycznego, specyficznych dla każdego białka, oraz ich intensywności nazywa się mapą peptydową. Analiza mapy peptydowej białka prowadzi do skutecznej identyfikacji jeśli jego sekwencja została zarejestrowana wcześniej w bazach danych białek lub kwasów nukleinowych (używa się w tym celu programów typu Mascot, Protein Prospector, itp.). Tylko poprawna identyfikacja białka daje możliwość znalezienia cząsteczek modyfikujących, przyłączonych chemicznie do reszt aminokwasowych. W tym celu mapę peptydową białka porównuje się z teoretyczną mapą peptydową uzyskaną z trawienia sekwencji zidentyfikowanego białka *in silico*. Wszystkie niedopasowane peptydy, czyli takie których masy nie pasują do proponowanej sekwencji aminokwasowej są peptydami potencjalnie modyfikowanymi, a zatem szukając jonów o wartościach  $m/z$  przesuniętych zgodnie z wartościami odpowiadającymi masom grup modyfikujących, można im przypisać odpowiednie, znane masy reszt aminokwasowych (fosforylacje, glikozylacje, metylacje, acetylacje itp.) (patrz tab.). Bazę danych zawierającą większość znanych modyfikacji potranslacyjnych można znaleźć w internecie na stronach ABRF (<http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home>). Ręczna analiza tego typu danych jest dość żmudna i czasochłonna, dlatego zaproponowano wiele programów i serwisów internetowych ułatwiających przeprowadzenie odpowiednich obliczeń. Do najlepszych i najpopularniejszych programów należą znajdujące się na serwisie ExPASy (<http://expasy.org/tools/>), są to programy FindMod oraz GlycoMod. Pierwszy z wymienionych jest systemem uniwersalnym i pozwala na identyfikację najpowszechniej występujących modyfikacji. Do przeprowadzenia analizy wystarczy znajomość sekwencji aminokwasowej białka oraz lista mas peptydów otrzymana na podstawie obliczeń teoretycznych (rys. 1). Podczas prowadzenia tego rodzaju obliczeń konieczne jest określenie warunków przeprowadzenia trawienia proteolitycznego przed analizą MS (należy wziąć pod uwagę możliwą redukcję i alkilację białek). Konieczne jest również zdefiniowanie dokładności pomiaru masy w używanym spektrometrze mas i opcjonalnie zdefiniowanie własnych, znanych modyfikacji. Podczas prowadzenia obliczeń w wybranym programie wyliczane są wszystkie możliwe kom-

The experimentally measured peptide masses are compared with the theoretical peptides calculated and mass differences are used to better characterize the protein of interest (Documentation / Mass ...)

Podaj sekwencje białka lub numer w bazach danych →

If your protein is not in Swiss-Prot or TrEMBL, please specify (if known) the source of your protein:  (The information will be used to determine whether to filter out non-canonical modifications and filter all other sequences.)

Podaj listę wartości m/z peptydów otrzymaną doświadczalnie →

Zdefiniuj możliwe modyfikacje potranslacyjne (opcjonalnie) → 

modification name	amino acids this modification can be observed on	atom composition
0	example	0
1	Asp	H: 5, O: 1, C: 2, N: 1, S: 0
2		H: 0, O: 1, C: 1, N: 1, S: 0
3		H: 0, O: 1, C: 1, N: 1, S: 0

Określ warunki przygotowania próbki i wykonania analizy → 

All peptide masses are:  
 with cysteines treated with  methionine sulfoxide  
 with acetylamide adducts on cysteines  
 with methionines oxidized  
 + [Mass] or  [M] or  [M+H]  
 average or  monoisotopic

Mass tolerance:    
 Select an enzyme:   
 Allow for  missed cleavage sites (MC):   
 Display peptides sorted by  peptide masses or in  chronological order in the protein.

Use the result by e-mail  
 Your e-mail address:   
 Name of the unknown protein:

To run the search:   
 To clear all fields:

Last modified: 05/01/2009 by ALC

Rys. 1. Strona główna programu FindMod pozwalającego na identyfikację modyfikacji potranslacyjnych białek na podstawie analiz w spektrometrze MALDI-ToF.

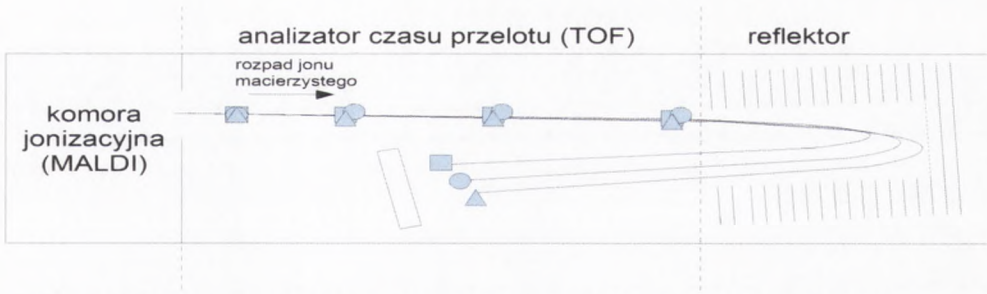
binacje i zostają one podane w postaci listy znalezionych potencjalnych modyfikacji. Opis programu FindMod oraz przykłady zastosowania można znaleźć, np. w pracy Wilkinsa i wsp. (24). Program GlycoMod jest ukierunkowany na analizę białek glikozylowanych, jest on bardziej złożony od programu FindMod, przy czym oprócz identyfikacji samych N- i O-glikozylacji pozwala również na bardziej szczegółową analizę samych łańcuchów cukrowych. Trzeba jednakże pamiętać, że przy tego rodzaju obliczeniach obecność znalezionych modyfikowanych peptydów traktuje się jedynie jako prawdopodobną. W miarę możliwości należy wykonać dodatkowo analizy znalezionych peptydów metodami tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) w celu potwierdzenia hipotetycznych modyfikacji. Program GlycoMod był wykorzystany m.in. do analizy N-glikozylacji enzymów *Chrysosporium lucknowense*. W ten sposób udało się ustalić dokładny wzorzec glikozylacji 28 enzymów, spośród których każdy był produktem ekspresji innego genu (25). Szczegółowy opis omawianej aplikacji oraz przykłady jej zastosowania w praktyce zawarto w pracy Coopera i wsp. (26).

Charakterystyka wybranych modyfikacji potranslacyjnych białek

Rodzaj modyfikacji	Miejsce przyłączenia (aminokwas w sekwencji)	Masa cząsteczkowa modyfikacji(Da)
acetylacja	K N-terminalnie: wszystkie oprócz N,K,R,H,F,W,Y	42,0106
biotynyłacja	K	226,0776
deamidacja	N,Q	0,9840
formylacja	wszystkie	27,9949
O-GlcNAc	S,T (N)	203,0794
hydroksylacja	P,K,D,N	15,9949
metylacja	C,K,R,H,D,E,N,Q N-terminalnie :P,A	14,0157
S-nitrozylacja	C	28,99017
fosforylacja	S,T,Y,H,C,D	79,9663

Innym podejściem do identyfikacji modyfikacji z użyciem technik spektrometrii mas MALDI-ToF jest porównawcza analiza map peptydowych przed- i po enzymatycznym bądź chemicznym usunięciu modyfikacji z badanego białka. Peptydy, którymi różnią się poszczególne próbki analizuje się pod kątem znajdujących się na nich modyfikacji. W odróżnieniu od techniki już opisanej, w tym podejściu teoretycznie nie jest potrzebna znajomość sekwencji białka (jego prawidłowa identyfikacja), aczkolwiek jest ona przydatna do precyzyjnego określenia miejsca przyłączenia szukanych grup modyfikujących białka. Tego rodzaju podejścia stosuje się najczęściej do określania miejsc fosforylacji oraz glikozylacji (27).

Na widmach masowych otrzymanych w spektrometrze typu MALDI-ToF z zainstalowanym reflektorem przedłużającym drogę przelotu jonu (patrz rys. 2) możliwa jest rejestracja jonów metastabilnych, czyli powstałych w wyniku rozpadu jonu macierzystego  $[M+H]^+$  w obszarze wolnym od pola. Jony potomne (fragmentacyjne), będące produktem rozpadu jonów macierzystych, są analizowane w spektrometrach Maldi ToF z wykorzystaniem metody PSD (ang. *Post Source Decay* – rozpad poza źródłem) (28,29). W tym podejściu, dzięki wyizolowaniu jonu macierzystego  $[M+H]^+$  odpowiedniego peptydu, można badać fragmenty (jony potomne) powstałe w wyniku samoistnego rozpadu poza źródłem Maldi. Pod względem struktury oraz otrzymywanych danych, widmo MALDI-ToF PSD jest bardzo zbliżone do widma MS/MS uzyskanego w tandemowych spektrometrach mas, a zatem pozwala na bardziej szczegółową analizę sekwencji peptydu oraz zlokalizowania modyfikacji. W praktyce jednak wykonanie takiego widma jest trudne i możliwe tylko w pewnych specyficznych warunkach, a mianowicie wybrany jon powinien występować w przewodzie ilościowej nad pozostałymi jonami i musi być on także możliwy do odseparowania. Bardzo często jony metastabilne powstają po oderwaniu grupy fosfo-



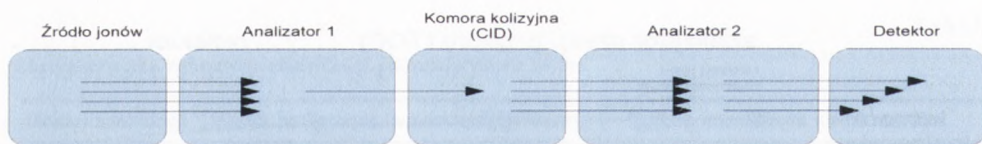
Rys. 2. Analiza fragmentacji PSD w spektrometrze typu MALDI-ToF, powstające w analizatorze w wyniku samoistnego rozpadu jony metastabilne są rozdzielane przez powtórne ich przyspieszenie w reflektorze, a poszczególne jony potomne są wykrywane w detektorze.

rylowej od reszt seryny lub treoniny. W tym przypadku na widmie masowym obserwujemy słabo rozdzieloną grupę sygnałów o masie niższej od jonu macierzystego o 98 Da (30,31). Rejestrowano w widmach masowych również jony fragmentacyjne powstające po odłączeniu reszt cukrowych od peptydów powstających w wyniku trawienia białek rekombinowanych (32). Metoda MALDI ToF PSD była także wykorzystana do określenia miejsc łączenia się grup tiolowych cystein w mostki disiarczkowe (33).

Ostatnim opisywanym podejściem metodycznym umożliwiającym analizę i identyfikację modyfikacji potranslacyjnych białek techniką MALDI-ToF jest metoda ISD (ang. *In Source Decay* – rozpad w źródle), czyli badanie fragmentacji zachodzącej w źródle jonów (34,35). O ile opisywane już metody wymagają trawienia białek bezpośrednio przed analizą, tak metoda ISD pozwala na badanie całego białka i częściowe określenie jego sekwencji oraz miejsc modyfikacji. W omawianym podejściu nie ma możliwości oddzielenia jonu macierzystego od innych jonów, badane białko powinno być jednorodne (np. oczyszczone z wykorzystaniem szeregu technik chromatograficznych). Rejestrowane w widmie masowym jony potomne typu *c* oraz pozwalają na określenie przesunięć w masach cząsteczkowych peptydów, co przekłada się na określenie sekwencji aminokwasowej. Po dalszej analizie prowadzi to również do zlokalizowania najbardziej powszechnych modyfikacji potranslacyjnych. Metodę tę wykorzystano do analizy cytochromu C z drożdży, dzięki czemu określono lokalizację przyłączenia hemu oraz stopień metylacji reszt lizyn (36).

## 2.2. Analiza modyfikacji białek w tandemowych spektrometrach mas (MS/MS)

Tandemowe spektrometry mas (MS/MS) posiadają dwa analizatory jonów rozdzielone tzw. komorą kolizyjną (CID, ang. *Collision Induced Dissociation* – rozpad indukowany kolizyjnie) (patrz rys. 3). Analizatory w spektrometrach mas, w których można badać fragmentacje (rozpady) jonów, mogą być zbudowane w różnoraki spo-



Rys. 3. Ogólny schemat tandemowego spektrometru mas pozwalającego na analizę fragmentacji peptydów.

sób (do rozdzielania jonów wykorzystywane są różne zjawiska fizyczne): potrójny kwadrupol (QqQ – gdzie środkowy kwadrupol jest komorą zderzeń), kwadrupol z komorą kolizyjną oraz analizatorem czasu przelotu (Q-ToF), pułapka jonowa (w tym przypadku fragmentacja zachodzi bezpośrednio w pułapce, a rozpady kolejnych jonów mogą być rejestrowane do dziewięciu razy), analizatory TOF/TOF oraz analizatory cyklotronowego rezonansu jonowego z transformacją Fouriera (FT ICR, ang. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance – Mass Spectrometry*) czy też spektrometr mas typu Orbitrap. Tak zbudowane spektrometry mas w przypadku analizy peptydów dają możliwość określania sekwencji aminokwasów dla wybranych peptydów, oraz na podstawie zmian wartości  $m/z$  jonów fragmentacyjnych określania rodzaju występujących modyfikacji potranslacyjnych. Precyzyjne określenie masy cząsteczkowej czy też przyrostu tej masy, na jakie pozwalają techniki MS/MS, zarówno na poziomie analizy białka jak i peptydu jest niezwykle pomocne podczas określania rodzaju modyfikacji potranslacyjnych. Chemiczna trwałość wiązania grupy modyfikującej do peptydu jest podstawowym czynnikiem pozwalającym na skuteczną identyfikację techniką tandemowej spektrometrii mas. Pewne grupy chemiczne są stabilne w trakcie analizy (nie ulegają oderwaniu w pierwszych krokach fragmentacji), z kolei inne łatwo ulegną rozpadowi. Na przykład modyfikacja polegająca na acetylowaniu lizyny jest połączeniem bardzo stabilnym i prowadzi do wzrostu masy peptydu o 42 Da, ale już fosforylacja seryny oraz treoniny są zdecydowanie mniej trwałe, i dlatego w widmach jonów potomnych fosforylowanych peptydów obserwuje się oderwanie obojętnej cząsteczki kwasu fosforowego (37). Oprócz informacji na temat sekwencji peptydów, w widmach masowych obserwuje się często jony potomne powstające w wyniku odszczepienia fragmentu cząstki aminokwasu z pozostającą na nim w dalszym ciągu modyfikacją. Fragmenty te mają zazwyczaj masę cząsteczkową nie przekraczającą 400 Da. W takich przypadkach jonami diagnostycznymi są dla peptydów zawierających fosfotyrozyny – jon 216 Da, a np. dla acetylowanej lizyny – jon 126 Da (38-40).

Wykorzystanie techniki MS/MS umożliwia również śledzenie modyfikacji obecnych w analizowanych białkach już na poziomie analizy chromatograficznej poprzez wyszukiwanie jonów obojętnych cząsteczek odpowiadających masą grupom modyfikującym. Jeżeli szukamy konkretnej modyfikacji potranslacyjnej wystarczy zaprogramować wykonanie analiz LC/MS/MS w taki sposób, aby w trakcie ich wykonywania rejestrowane były widma, w których rejestrowane są jony potomne powstające



w wyniku eliminacji obojętnej cząsteczki o określonej masie (odpowiadającej masie cząsteczkowej substancji modyfikującej). Każdorazowo rozpad jonu macierzystego peptydu  $[M+H]^+$  zachodzi w sposób specyficzny dla danej modyfikacji. Na przykład w trakcie analiz stopnia fosforylacji szukamy w widmach masowych jonów fragmentacyjnych (potomnych) powstających w wyniku utraty cząsteczki obojętnej o masie 98 Da (kwas fosforowy). Analiza jonów powstałych w wyniku utraty obojętnej cząsteczki jest najczęściej prowadzona na spektrometrach mas z analizatorem typu pułapka jonowa umożliwiającą szybką analizę MS/MS i wielokrotną fragmentację ( $MS^n$ ) (41-43), a także na spektrometrach wyposażonych w potrójny kwadrupol.

Zastosowanie sprzężenia chromatografu ciekłego i tandemowego spektrometru mas (LC-MS/MS) prowadzi do nagromadzenia ogromnych ilości informacji, w związku z tym zostało opracowanych wiele metod obliczeniowych wspomagających analizę danych. Ogólnie ujmując, algorytmy te umożliwiają analizę widma MS oraz MS/MS biorąc pod uwagę głównie różnice w masach poszczególnych jonów, a także utraty obojętnych cząsteczek oraz obecność jonów diagnostycznych (44). Zazwyczaj w pierwszym etapie analizy przeprowadza się identyfikację białek obecnych w próbce, a dopiero potem możliwa jest bardziej szczegółowa analiza wybranych białek pod kątem obecności dodatkowych podstawników. Wstępne przeszukiwanie baz danych jest zazwyczaj dokonywane tylko z uwzględnieniem podstawowych modyfikacji, takich jak: alkilowane reszty cystein czy utlenianie metioniny. Dopiero w kolejnych etapach przeszukiwania baz analizy widm masowych są prowadzone pod kątem wystąpienia modyfikacji, i w tym przypadku możliwe są szczegółowe porównania mas potencjalnie zmodyfikowanych peptydów do mas otrzymanych w wyniku analizy *de novo*. Pomimo że analizy wspomagane komputerowo są bardzo pomocne powinno się je stosować z rozważą, a uzyskiwane rezultaty przeszukiwań baz za pomocą dedykowanych programów przyjmować z dużą ostrożnością, gdyż podawane wyniki mogą zawierać fałszywe informacje, w przypadkach gdy dokładność pomiaru masy jonów w używanym spektrometrze mas nie jest wystarczająca. Obecność kilku modyfikacji na jednym peptydzie również może prowadzić do nieprawdziwych wyników podawanych przez programy wspomagające analizę.

### 2.3. Spektrometry mas przystosowane do fragmentacji typu ECD lub ETD

W roku 1998 McLafferty wraz ze wsp. przedstawili alternatywną w stosunku do indukowanej kolizyjnie dysocjacji (CID), metodę fragmentacji peptydów nazwaną dysocjacją wywoływaną wychwytem elektronu (ECD, ang. *Electron Capture Dissociation*) (45). W metodzie tej, niskoenergetyczne elektrony poddawane są reakcji z kationami powstającymi w wyniku przyłączenia protonu do cząsteczek peptydów (jony  $[M+H]^+$ ) w polu magnetycznym spektrometru z analizatorem cyklotronowego rezonansu jonowego z transformacją Fouriera (FT ICR-MS). Reakcje zachodzące w tych warunkach prowadzą do przyłączenia elektronów do protonowanych pepty-

dów powodując powstanie kationów z dodatkowym elektronem. Taki nieparzysto-elektronowy jon ulega przegrupowaniu i rozpadowi. Następująca dalej fragmentacja peptydu nie jest zależna od jego długości i sekwencji, i co najważniejsze, w przeciwieństwie do dysocjacji w wyniku zderzeń z gazem obojętnym nie następuje w tym przypadku oderwanie chemicznie przyłączonej reszty. Metoda ta bardzo ułatwia analizę modyfikacji, takich jak: fosforylacja (46), N- i O-glikozylacja (47,48) czy sulfatacja (49). Wadą techniki fragmentacji jonów metodą ECD jest konieczność współdziałania komory jonizacyjnej z analizatorami FT ICR – urządzeniami bardzo drogimi, przez co dostępnymi ciągle w niewielu laboratoriach. Od pewnego czasu produkowane są jednak spektrometry mas z jonizacją wykorzystującą podobne mechanizmy oddziaływań między jonami. Mowa tutaj o fragmentacji wynikającej z dysocjacji w wyniku przeniesienia elektronu (ETD, ang. *Electron Transfer Dissociation*), w tym przypadku dysocjacja peptydów następuje w wyniku przeniesienia elektronu z anionorodnika na protonowany peptyd. Proces ten powoduje fragmentację wiązania peptydowego według mechanizmu zbliżonego do fragmentacji ECD – również tutaj fragmentacja zachodzi z preferowanym zachowaniem chemicznych modyfikacji peptydu (50). Największą zaletą ETD jest fakt, że jest ona stosowana wraz z analizatorami typu pułapki jonowej, które są stosunkowo tanie, łatwe w obsłudze oraz szeroko dostępne (50).

### 3. Podsumowanie

Spektrometria mas jest metodą stosowaną z wyboru, jako narzędzie przydatne w badaniach biologicznych, biochemicznych oraz medycznych, zarówno w laboratoriach naukowych jak i przemysłowych. Opracowane strategie badania modyfikacji potranslacyjnych metodami spektrometrii mas przyczyniły się już do głębszego poznania działania systemów biologicznych, zarówno w przypadku mikroorganizmów jak i roślin i zwierząt. Opisywane podejścia analityczne z wykorzystaniem technik spektrometrii mas są ciągle rozwijane, a najnowsze przykłady ich zastosowania pokazują, że spektrometry o dokładności pomiaru masy rejestrowanych jonów poniżej 5 ppm oraz wielokrotnej fragmentacji protonowanych cząsteczek  $(M+nH)^{n+}$  pozwalają na bardzo szczegółową analizę modyfikacji białek. Również w nowych metodach fragmentacji peptydów (ECD, ETD) wykazano niezwykłą przydatność w analizie modyfikacji potranslacyjnych białek i w wielu przypadkach usprawniły ją przenosząc na wyższy poziom dokładności i czułości. Coraz bardziej zaawansowane metody obliczeniowe (bioinformatyczne) są wykorzystywane do przewidywania potencjalnych miejsc modyfikacji białek oraz w analizie ogromnych zestawów danych otrzymywanych w wyniku bardzo szczegółowych analiz, których opracowywanie tradycyjnymi metodami, bez wykorzystania metod informatycznych byłoby niezwykle czasochłonne. Zastosowanie nowych, stale rozwijanych metod bioinformatycznych uczyni w najbliższej przyszłości możliwe przyspieszenie, czy wręcz w niektó-

rych przypadkach umożliwi analizę *de novo* sekwencji aminokwasowych. Wiele doniesień w literaturze dotyczy także analizy ilościowej białek modyfikowanych, a dzięki opracowaniu metod znakowania peptydów trwałymi izotopami pierwiastków i zastosowaniu technik LC-MS/MS możliwe staje się oznaczanie dowolnie modyfikowanych białek ilościowo w sposób względny oraz absolutny. Popularyzacja technik spektrometrii mas również w polskich laboratoriach, sprawia, że omawiane techniki stają się coraz bardziej dostępne, a zatem analiza modyfikacji potranslacyjnych białek metodami MS będzie w przyszłości podejściem badawczym powszechnie stosowanym.

Opracowanie powstało w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego: nr N204 053 32/1226.

## Literatura

1. *Method in Molecular Biology*, (2000), Ed. Chapman J. R., vol. 146, Humana Press, Totowa, New Jersey.
2. *Handbook of Proteomic Methods*, (2003), Ed. Conn P. M., Humana Press, Totowa, New Jersey.
3. Strahl B. D., Allis C. D., (2000), *Nature*, 403, 41-45.
4. Meierhofer D., Wang X., Huang L., Kaiser P., (2008), *J. Proteome Res.*, 7, 4566-4576.
5. Liu F., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Hart G. W., Gong C. X., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10804-10809.
6. Crane R., Gadea B., Littlepage L., Wu H., Ruderman J. V., Aurora A., (2004), *Biol. Cell.*, 96, 215-229.
7. Jakubowski H., (2007), *Clin. Chem. Lab. Med.*, 45, 1704-1716.
8. Krüger R., Hung C. W., Edelson-Averbukh M., Lehmann W. D., (2005), *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 1709-1716.
9. Tokumoto M., Horiguchi R., Nagahama Y., Tokumoto T., (1999), *Gene*, 239, 301.
10. Jenuwein T., Allis C. D., (2001), *Science*, 293, 1074-1080.
11. Ishihama Y., (2005), *J. Chromatogr. A*, 1067, 73-83.
12. Rabilloud T., (2002), *Proteomics*, 2, 3-10.
13. Baruthio F., Quadroni M., Rüegg C., Mariotti A., (2008), *Proteomics*, 8, 4733-4747.
14. Hu A., Lo A. A., Chen C. T., Lin K. C. Ho Y. P., (2007), *Electrophoresis*, 28, 1387-1392.
15. Mann M., Jensen O. N., (2003), *Nat. Biotechnol.*, 21, 255-261.
16. Hoffman M. D., Sniatynski M. J., Kast J., (2008), *Anal. Chim. Acta*, 627, 50-61.
17. Chen G., Pramanik B. N., (2008), *Expert Rev. Proteomics*, 5, 435-444.
18. Siuti N., Kelleher N. L., (2007), *Nat. Methods*, 4, 817-821.
19. Krishna R. G., Wold F., (1993), *Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol.*, 67, 265-298.
20. Graves D. J., Martin B. L., Wang J. H., (1994), *Co- and Post-Translational Modification of Proteins: Chemical Principles and Biological Effects*, 204-220, Oxford University Press, New York.
21. Carroll J. A., Beavis R. C., (1996), in: *Laser Desorption and Ablation*, Eds. Miller J. C., Haglund R. F., Academic Press: San Diego, Chapter 7.
22. Mann M., Talbo G., (1996), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7, 11-19.
23. Hühmer A. F. R., Aced G. I., Perkins M. D., Gürsoy R. N., Jois D. S. S., Larive C., Siahaan T. J., Schöneich C., (1997), *Anal. Chem.*, 69, 38R-41R.
24. Wilkins M. R., Gasteiger E., Gooley A. A., Herbert B. R., Molloy M. P., Binz P. A., Ou K., Sanchez J. C., Bairoch A., Williams K. L., Hochstrasser D. F., (1999), *J. Mol. Biol.*, 289, 645-657.
25. Gusakov A. V., Antonov A. I., Ustinov B. B., (2008), *Carbohydr. Res.*, 343, 48-55.
26. Cooper C. A., Gasteiger E., Packer N. H., (2001), *Proteomics*, 1, 340-349.
27. Liao P. C., Leykam J., Andrews P. C., Gae D. A., Allison M. R., (1994), *J. Anal. Biochem.*, 219, 9-20.

28. Annan R. S., Carr S. A., (1996), *Anal. Chem.*, 68, 3413-3421.
29. Spengler B., Kirsch D., Kaufmann R., Jaeger E., (1992), *Rapid Com. Mass Spectrom.*, 6, 105-108.
30. Kaufmann R., Spengler B., Lützenkirchen F., (1993), *Rapid Com. Mass Spectrom.*, 7, 902-910.
31. Talbo G., Mann M., (1994), in: *Techniques in Protein Chemistry*, Crabb J. W., Ed., Academic Press: New-York, vol. V, 105-114.
32. Huberty M. C., Vath J. E., Yu W., Martin S. A., (1993), *Anal. Chem.*, 65, 2791-2800.
33. Crimmins D. L., Saylor M., Rush J., Thoma R. S., (1995), *Anal. Biochem.*, 226, 355-361.
34. Brown R. S., Lennon J. J., (1995), *Anal. Chem.*, 67, 3990-3999.
35. Lennon J. J., Walsh K. A., (1997), *Protein Sci.*, 6, 2446-2453.
36. Lennon J. J., Walsh K. A., (1999), *Protein Sci.*, 8, 2487-2493.
37. Annan R. S., Huddleston M. J., Verma R., Deshaies R. J., Carr S. A., (2001), *Anal. Chem.*, 73, 393-404.
38. Kim J. Y., Kim K. W., Kwon H. J., Lee D. W., Yoo J. S., (2002), *Anal. Chem.*, 74, 5443-5449.
39. Dormeyer W., Ott M., Schnolzer M., (2005), *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 1226-1239.
40. Steen H., Kuster B., Fernandez M., Pandey A., Mann M., (2001), *Anal. Chem.*, 73, 1440-1448.
41. Beausoleil S. A., Jedrychowski M., Schwartz D., Elias J. E., Villen J., Li J., Cohn M. A., Cantley L. C., Gygi S. P., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 12130-12135.
42. Chang E. J., Archambault V., McLachlin D. T., Krutchinsky A. N., Chait B. T., (2004), *Anal. Chem.*, 76, 4472-4483.
43. Gruhler A., Olsen J. V., Mohammed S., Mortensen P., Faergeman N. J., Mann M., Jensen O. N., (2005), *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 310-327.
44. Seungjin N., Jaeho J., Heejin P., Kong-Joo L., Eunok P., (2008), *Mol. Cell. Proteomics*, 7, 2452-2463.
45. Zubarev R. A., Kelleher N. L., McLafferty F. W., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 3265-3266.
46. Stensballe A., Jensen O. N., Olsen J. V., Haselmann K. F., Zubarev R. A., (2000), *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14, 1793-1800.
47. Mirgorodskaya E., Roepstorff P., Zubarev R. A., (1999), *Anal. Chem.*, 71, 4431-4436.
48. Hakansson K., Cooper H. J., Emmett M. R., Costello C. E., Marshall A. G., Nilsson C. L., (2001), *Anal. Chem.*, 73, 4530-4536.
49. Kelleher N. L., Zubarev R. A., Bush K., Furie B., Furie B. C., McLafferty F. W., Walsh C. T., (1999), *Anal. Chem.*, 71, 4250-4253.
50. Syka J. E., Coon J. J., Schroeder M. J., Shabanowitz J., Hunt D. F., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 9528-9533.