

ANALÝZA PEPTIDŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE MALDI-TOF

ONDREJ ŠEDO* a JOSEF HAVEL

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail: sedo@post.cz

Došlo 7.6.02, přepracováno 17.12.02, přijato 10.1.03.

Klíčová slova: analýza peptidů, neuroprotektivní peptidy, MALDI-TOF MS, PSD

Úvod

Význam metody hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice (MALDI) v poslední době neobyčejně vzrůstá. Důvodem je schopnost této techniky ionizovat za účasti matrice i velké biomolekuly (>1 000 000 Da) a detegovat vzniklé ionty v analyzátoru měřením doby letu (TOF), což dává metodě nezastupitelnou roli zejména v analýze lidského proteomu, v současnosti nejrozsáhlejším výzkumném projektu v oblasti přírodních věd.

Kromě molekulové hmotnosti je metoda MALDI-TOF MS schopna poskytnout údaje i o struktuře peptidů. Zvýšením výkonu laseru je možné dosáhnout nadměrné excitace molekul analytu, které se v důsledku přebytku energie rozpadají na menší fragmenty (obr. 1), z jejichž molekulových hmotností lze odvodit část sekvence aminokyselin nebo celou strukturu peptidu. Sledován může být rozpad molekul peptidu přímo v iontovém zdroji metodou ISD/ISF (in-source decay/fragmentation – rozpad/fragmentace ve zdroji) nebo během letu v analyzátoru TOF metodou PSD (post-source decay – rozpad za iontovým zdrojem).

Při PSD jsou laserovými pulsy získány molekulové ionty všech peptidů z analyzované směsi, zvolený peptid je pak od ostatních separován pomocí tzv. iontové brány (ion gate, viz obr. 2). Během letu se část iontů rozpadá. Kinetická energie těchto iontů se distribuuje na vznikající fragmenty v závislosti na jejich hmotnosti. V reflektoru poté dochází k separaci iontů na základě různé kinetické energie. Metoda PSD byla úspěšně aplikována pro určování struktury peptidů izolovaných z živočišných tkání¹, při studiu exprese genů² nebo pro identifikaci proteinů určením malé části jejich struktury³. S její pomocí lze lokalizovat posttranslační modifikace jako například radikálovou nitraci⁴ nebo fosforylaci⁵. Metoda ISD se používá méně často kvůli nutnosti předchozí separace analyzovaného peptidu, navíc lze s její pomocí získat informaci jen o části struktury peptidů⁶.

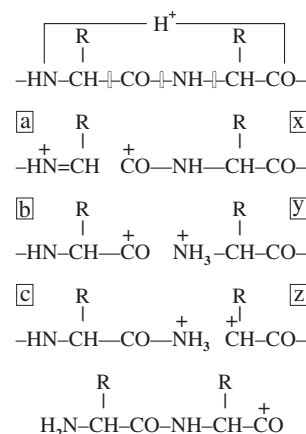
Přítomnost určitých druhů peptidů v mozku má spojitost s Alzheimerovou chorobou. Vedle tzv. β -amyloidů a prese-

nilinů, které poškozují mozkové synapse, byl v nedávné době objeven peptid nazvaný humanin^{7,8}, který naopak neurony chrání před neurotoxickými účinky patologických peptidů. Jde o peptid s molekulovou hmotností 2686,3 a strukturou Met-Ala-Pro-Arg-Gly-Phe-Ser-Cys-Leu-Leu-Leu-Leu-Thr-Ser-Glu-Ile-Asp-Leu-Pro-Val-Lys-Arg-Arg-Ala. Mechanismus jeho neuroprotektivního působení nebyl doposud objasněn, jeho biologická účinnost může být výrazně ovlivněna substitucí některé z aminokyselin.

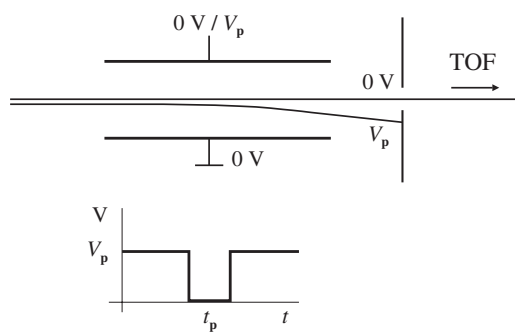
Experimentální část

Chemikálie a přístroje

Pro přípravu všech roztoků byla použita voda redestilovaná v křemenné aparatuře od fy. Heraeus (Německo), acetonitril a kyselina trifluoroctová byly dodány firmou Merck



Obr. 1. Struktura a názvosloví fragmentů vznikajících rozpadem peptidů, struktura vnitřního fragmentu



Obr. 2. Schéma principu funkce iontové brány; ionty jsou během průletu mezi destičkami iontové brány vychylovány napětím V_p . V okamžiku, kdy iontovou bránou procházejí ionty zvoleného peptidu (čas t_p), je napětí V_p vypnuto, a pouze tyto ionty pokračují dále do reflektoru

* Ondrej Šedo získal 1. místo za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie v celostátní soutěži o cenu firmy Merck v Praze 6.–7. února 2002.

(Německo). Jako matrice pro MALDI byla použita kyselina α -kyan-4-hydroxysočicová (CHC – 3-(4-hydroxyfenyl)-2-kyanpropenová kyselina) od firmy Sigma-Aldrich (Německo).

Analýzy byly provedeny na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF Axima-CFR (Kratos Analytical Shimadzu Corporation, Anglie).

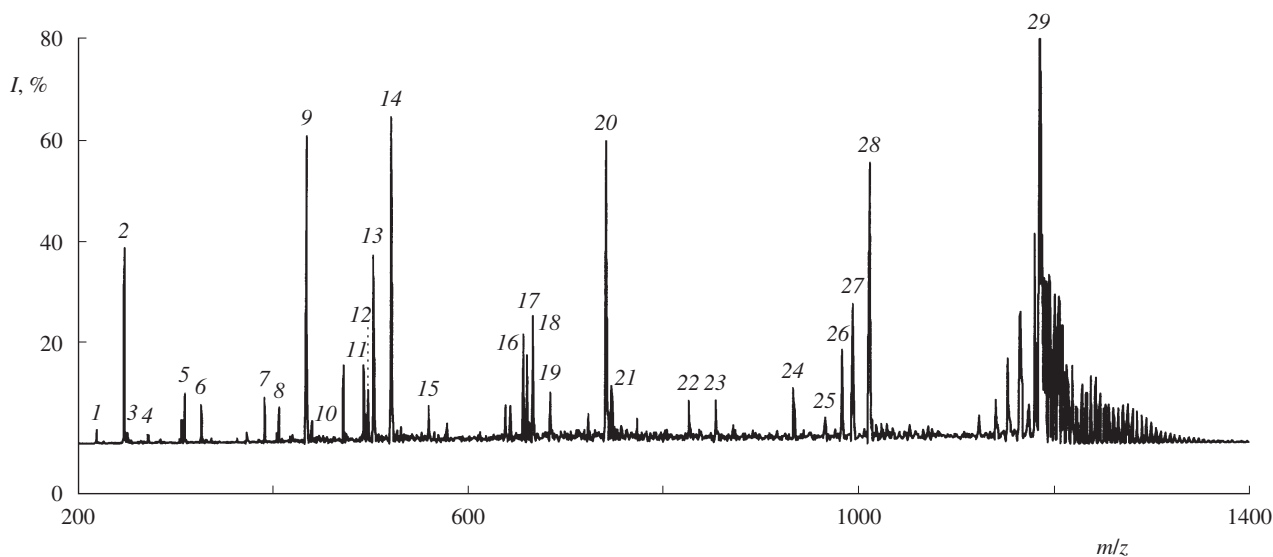
Příprava vzorků

Pro analýzu byl používán nasycený roztok matrice CHC

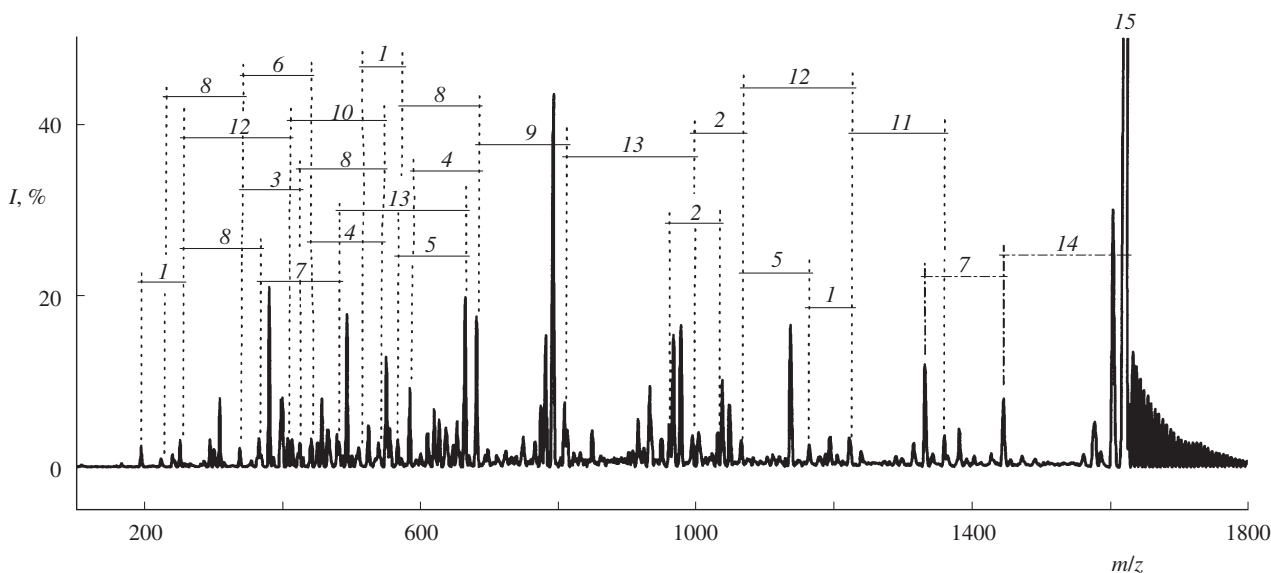
ve směsi 0,1% trifluoroctové kyseliny a acetonitrilu 1:1. Bylo postupováno tak, že 1 μ l roztoku matrice byl s 1 μ l vzorku smíchán přímo na destičce spektrometru a směs byla poté sušena proudem vzduchu při laboratorní teplotě.

Výsledky a diskuse

Metodou PSD bylo analyzováno několik peptidů s molekulovými hmotnostmi 1000–2500, přičemž u všech byl pozorován vznik iontů typu a, b a y, fragmentů vytvořených



Obr. 3. PSD spektrum lidského luteinizačního a vylučovacího hormonu (struktura pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂); koncentrace peptidu 10 μ mol.l⁻¹, matrice CHC, naměřeno v reflektorném pozitivním módu se zpožděnou extrakcí a iontovou bránou nastavenou na 1170–1190 Da, výkon laseru 1,67 mW; 1 – a₁, 2 – b₁, 3 – SY, 4 – WS, 5 – y₃-NH₃, 6 – y₃, 7 – SYGL-28, 8 – a₂, 9 – b₂, 10 – y₄, 11 – a₃, 12 – b₃-H₂O, 13 – y₅, 14 – b₃, 15 – SYGLR-NH₃, 16 – a₄, 17 – y₆, 18 – b₄-H₂O, 19 – b₄, 20 – b₅, 21 – y₇, 22 – a₆, 23 – b₆, 24 – y₈, 25 – a₇-NH₃, 26 – a₇, 27 – b₇-NH₃, 28 – b₇, 29 – [M+H]⁺



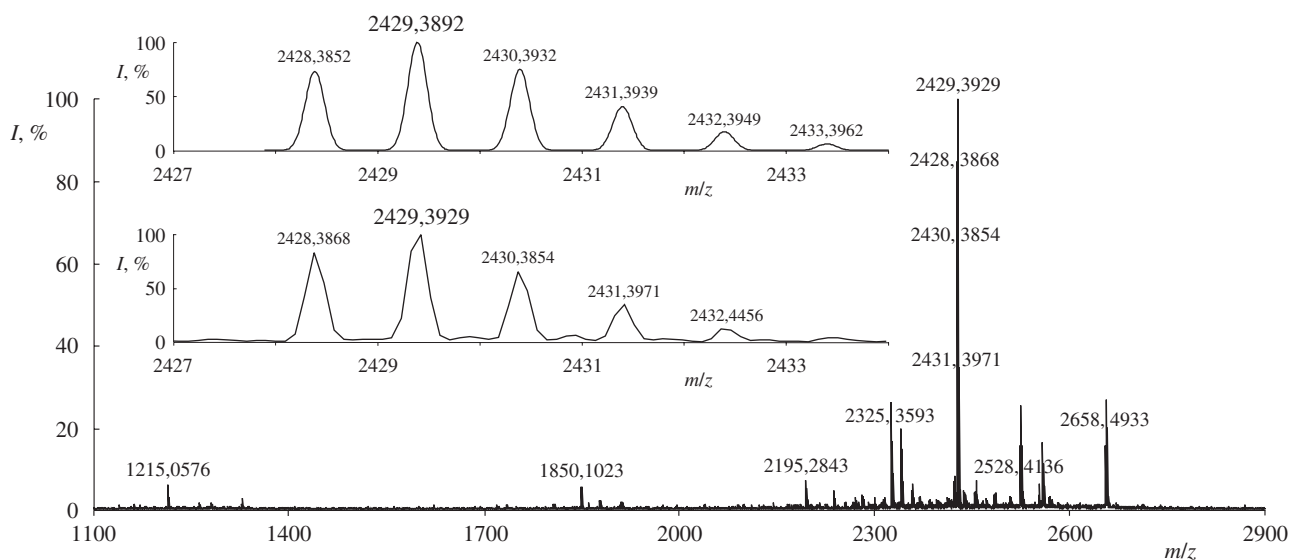
Obr. 4. Nalezení části sekvence aminokyselin v neznámém peptidu; koncentrace peptidu 10 μ mol.l⁻¹, matrice CHC, naměřeno v reflektorném pozitivním módu se zpožděnou extrakcí a iontovou bránou nastavenou na 1610–1635 Da, výkon laseru 2,33 mW; 1 – Gly, 2 – Ala, 3 – Ser, 4 – Pro, 5 – Val, 6 – Cys, 7 – Leu/Ile, 8 – Asn, 9 – Lys/Gln, 10 – Met, 11 – His, 12 – Arg, 13 – Trp, 14 – CO-Met-NH₃, 15 – [M+H]⁺

odštěpením vody nebo amoniaku od těchto iontů a vnitřních fragmentů (příklad jednoho z naměřených PSD spekter je uveden na obr. 3).

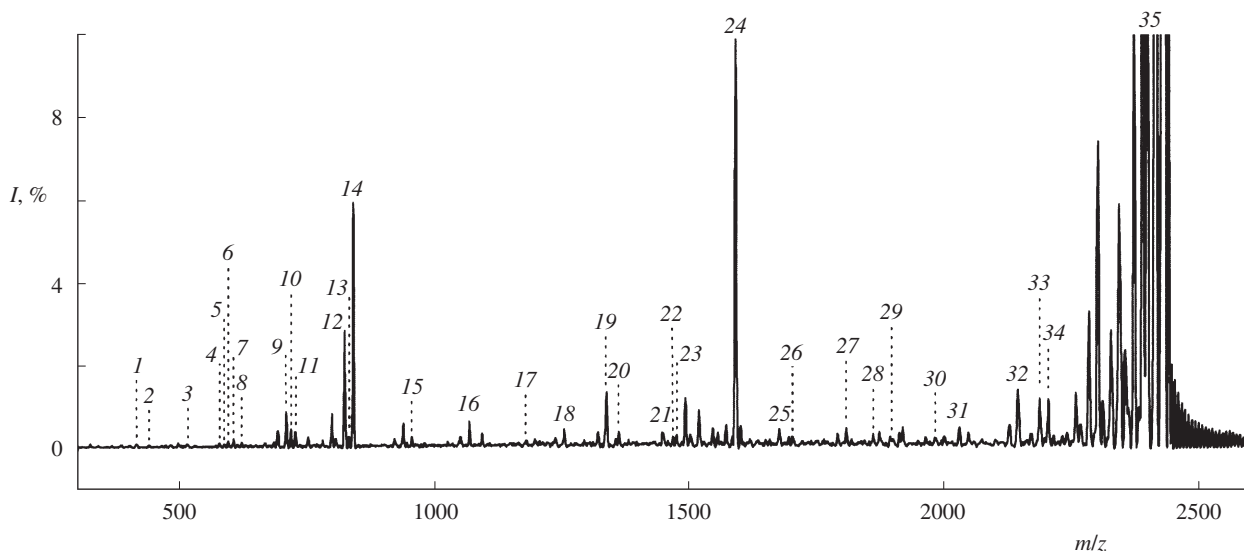
Určení struktury „neznámého“ peptidu

V tomto případě byl analyzován peptid o „neznámé“ struktuře, jejíž určení popíšeme jako ukázkou. Monoizotopická relativní hmotnost tohoto peptidu byla zjištěna analýzou ve směsi se čtyřmi jinými peptidy se známými hmotnostmi, které sloužily jako vnitřní kalibrační standardy. Výsledná hodnota molekulové hmotnosti „neznámého“ peptidu byla určena

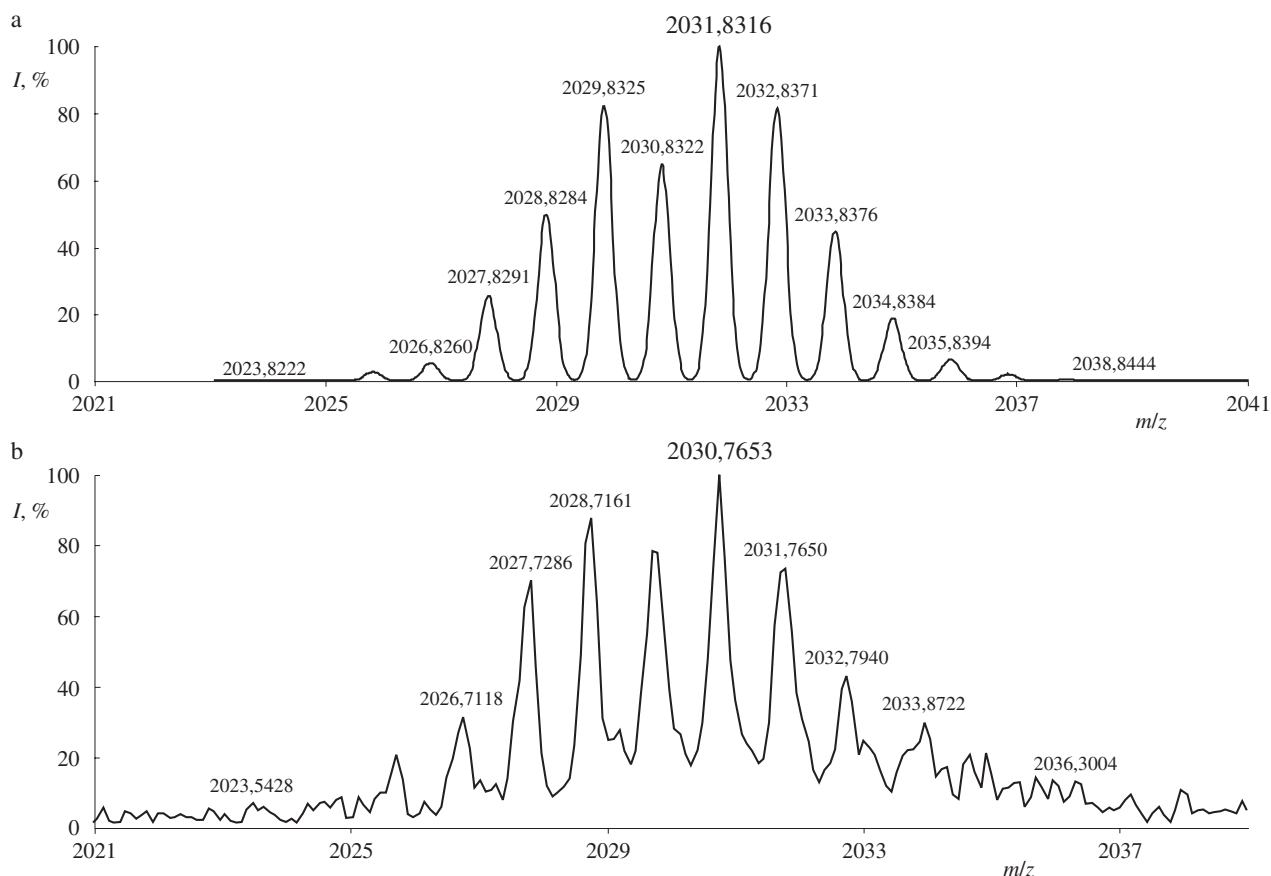
s přesností 23 ppm ($1618,851 \pm 0,037$). S použitím vyšší energie laseru pak byla provedena analýza pomocí PSD. Při vyhodnocování spekter bylo využito skutečnosti, že se molekulové hmotnosti iontů typu a a b liší o 28 Da. Z takto identifikovaných možných iontů typu b se podařilo určit část sekvence aminokyselin (obr. 4). Všechny zjištěné údaje byly poté zapsány do programu ProteinProspector MS-Seq (cit.⁹), ve kterém byl v databázi OWL (aktualizace 7.2.2001) nalezen pouze jeden peptid odpovídající zadaným parametrům. Šlo o peptid bombesin, který má monoizotopickou molekulovou hmotnost 1618,815 a strukturu pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂.



Obr. 5. Hmotnostní spektrum směsi vzniklé při syntéze derivátu neuroprotektivního peptidu; vodný roztok o koncentraci $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, matrice CHC, měřeno v reflektornovém pozitivním módu se zpožděnou extrakcí, výkon laseru $1,57 \text{ mW}$; srovnání teoretického modelu molekuly $\text{C}_{108}\text{H}_{186}\text{N}_{32}\text{O}_{29}\text{S} + \text{H}^+$ (ve výřezu nahoře) s detailním pohledem na pík hlavního produktu (ve výřezu dole)



Obr. 6. PSD spektrum derivátu neuroprotektivního peptidu; matrice CHC, naměřeno v reflektornovém pozitivním módu se zpožděnou extrakcí a iontovou bránou nastavenou na 2420–2450 Da, výkon laseru 3 mW ; 1 – y_3 , 2 – $b_4\text{-NH}_3$, 3 – y_4 , 4 – $a_6\text{-NH}_3$, 5 – a_6 , 6 – $b_6\text{-NH}_3$, 7 – b_6 , 8 – y_5 , 9 – $y_6\text{-NH}_3$, 10 – $b_7\text{-NH}_3$, 11 – y_6 , 12 – $y_7\text{-NH}_3$, 13 – $b_8\text{-NH}_3$, 14 – y_7 , 15 – y_8 , 16 – y_9 , 17 – y_{10} , 18 – y_{11} , 19 – $y_{12}\text{-NH}_3$, 20 – b_{13} , 21 – a_{14} , 22 – y_{13} , 23 – b_{14} , 24 – b_{15} , 25 – $y_{15}\text{-H}_2\text{O}$, 26 – b_{16} , 27 – y_{16} , 28 – a_{18} , 29 – b_{18} , 30 – a_{19} , 31 – b_{19} , 32 – y_{19} , 33 – b_{20} , 34 – y_{20} , 35 – $[\text{M}+\text{H}]^+$



Obr. 7. Srovnání modelového spektra (a) derivatizovaného peptidu bombesinu o struktuře $C_{71}H_{110}N_{24}O_{18}S$ (bombesin). $OsO_4 \cdot C_{10}H_8N_2$ (OsO_4 -bipy). H^+ , vypočítaného na základě přirozeného isotopového zastoupení prvků, s naměřeným spektrem (b); měřeno v reflektornovém pozitivním módu se zpožděnou extrakcí, výkon laseru 1,67 mW

Analýza směsi peptidů

Pomocí metody MALDI-TOF byla analyzována směs vzniklá při pokusu o syntézu derivátu neuroprotektivního peptidu humaninu. Cílem analýzy bylo potvrzení struktury hlavního produktu a pokus o určení složení fragmentů peptidu obsažených v preparátu. Na základě struktury předpokládaného produktu syntézy (Ala-Arg-Gly-Phe-Gly-Cys-Leu-Leu-Leu-Thr-Gly-Glu-Ile-Asp-Leu-Pro-Val-Lys-Arg-Arg-Ala) byla vypočítána jeho teoretická molekulová hmotnost a isotopový vzor jeho molekulových píků, které byly srovnány s naměřeným spektrem (obr. 5). Metodou PSD byla potvrzena struktura hlavního produktu (obr. 6) a nalezena struktura dalších dvou peptidů. Z deseti měření intenzit píků všech ionizovaných produktů bylo odhadnuto zastoupení hlavního produktu na $30,9 \pm 3,1$ %.

Derivatizace peptidů a jejich analýza

Jedním z mnoha činidel, která by mohla sloužit k určování struktury proteinů, je komplex oxid osmičelý-bipyridin (OsO_4 -bipy), který podle literatury^{10,11} reaguje v peptidových řetězcích především s tryptofanem a ze sterických důvodů není schopen pronikat do vnitřních částí struktur proteinů. Na obr. 7 je uvedeno srovnání spektra peptidu bombesinu derivatizova-

ného OsO_4 -bipy s modelem vytvořeným na základě předpokládaného mechanismu reakce.

Závěr

Byla vytvořena a prověřena metodologie určování molekulových hmotností a struktury peptidů metodou MALDI-TOF MS. Získané zkušenosti byly úspěšně aplikovány při určování sekvence aminokyselin v peptidech a při kontrole čistoty a potvrzení struktury nového derivátu neuroprotektivního peptidu humaninu. Demonstrována byla principiální možnost ionizace peptidů derivatizovaných OsO_4 -bipy.

Některé peptidy byly laskavě poskytnuty prof. RNDr. Emilem Palečkem, DrSc., z Biofyzikálního ústavu AV ČR, Brno. Tato práce je součástí projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, projekt č. CEZ: J 07/98: 143100011.

LITERATURA

1. Marvin L. F., Zatylny C., Leprince J., Vandry H., Henry J.: Peptides 9, 1391 (2001).

2. Ovsyannikova G., Johnson K. L., Naylor S., Poland G. A.: *J. Immunol. Methods* 246, 1 (2000).
3. Flad T., Kalbacher H., Kaufmann R., Spangler B., Meyer H.: *Immunol. Lett.* 56, 336 (1997).
4. Sarver A., Scheffler N. K., Shetler M. D., Gibson B. W.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 439 (2001).
5. Talbo G. H., Suckau D., Malkoski M., Reynolds E. C.: *Peptides* 22, 1093 (2001).
6. Reiber D., Grover T. A., Brown R. S.: *Anal. Chem.* 70, 673 (1998).
7. Hashimoto Y., Niikura T., Tajima H., Yasukawa T., Sudo H., Ito Y., Kita Y., Kawasumi M., Kouyama K., Doyu M., Sobue G., Koide T., Tsuji S., Lang J., Kurokawa K., Nishimoto I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6336 (2001).
8. Patočka J., Slaninová J.: *Cesk. Slov. Psychiat.* 98, 221 (2002).
9. <http://prospector.ucsf.edu/ucshtml4.0u/msseq.htm>; 23.11.2001.
10. Deetz J. S., Behrman E. J.: *J. Org. Chem.* 45, 135 (1980).
11. Emerman M., Behrman E. J.: *J. Histochem. Cytochem.* 30, 395 (1981).

O. Šedo and J. Havel (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Analysis of Peptides by MALDI-TOF Mass Spectrometry**

The MALDI-TOF MS method can be used for the exact determination of molecular weight of peptides. Detailed study of fragmentation of metastable ions after leaving the ion source (post-source decay, PSD) makes it possible to determine also the sequence of amino acids in peptides. If complete primary structure cannot be reliably determined due to the complexity of PSD spectra, the missing part of the sequence can be found in Internet bases. Because of a simple preparation of samples and short analysis times, MALDI-TOF MS is an extraordinarily suitable method for checking purity of peptide preparations. It can be also used for study of peptide derivatization.