Proč vyšlo toto číslo

Genomika a proteomika patří v poslední době k nejčastěji skloňovaným slovům nejen v biochemii, ale i v analytické chemii, molekulární biologii a v řadě dalších disciplín. Zatímco genomika nám umožňuje lépe se orientovat ve složitých otázkách dědičnosti na základě mapování genů jako základních jednotek dědičnosti, proteomika se snaží o identifikaci všech proteinů v určité buňce a určení jejich role. V obou případech je nutné mít k dispozici analytické metody umožňující stanovení extrémně nízkých koncentrací nukleových kyselin či proteinů ve složitých biologických matricích. Je skutečně fascinující, jak technologický pokrok v oblasti moderní analytické instrumentace, vyvolaný rostoucími požadavky právě ze strany genomiky a proteomiky, posunul hranice analytické chemie do dříve nemyslitelných oblastí.

Dynamický rozvoj analytické proteomiky byl umožněn zejména díky pokrokům hmotnostní spektrometrie, a to hlavně využitím nových ionizačních technik MALDI a ESI, za které byla v roce 2002 udělena Nobelova cena J. Fennovi a K. Tanakovi. V této souvislosti si vzpomínám na historku, kterou mi vyprávěl John Fenn. Když poprvé žádal o grant na studium nabíjení velkých biologických molekul, byla jeho žádost zamítnuta se zdůvodněním, že to není proveditelné a i kdyby to proveditelné bylo, tak to nebude k ničemu užitečné. Mám pocit, že tento přístup k pravému vyhledávacímu výzkumu, který jedině může vést k novým objevům, je celosvětově rozšířený. U tohoto výzkumu skutečně nelze předem naplánovat ani výsledek ani jeho praktické dopady a ve většině případů skutečně nikam nevede. Ale ten nepatrný zlomek vede ke skutečným objevům hodným toho jména a už proto by měl být tento typ výzkumu podporován a udržován, minimálně v oblasti vysokých škol, kde představuje ideální možnost, jak seznámit studenty se skutečnou poznávací činností a ne jen se stereotypním opakováním zažitých postupů umožňujících sice trvalý a konstantní postup, nikoliv však zásadní průlom v oblasti poznání.

Výsledky genomiky a proteomiky se dnes široce uplatňují při studiu příčin různých chorob, hledání markerů patologických stavů, vývoji nových léčiv, při sledování kvality a bezpečnosti potravin, využití nových technických enzymů, při enzymatické likvidaci škodlivin, zvyšování výnosů různých zemědělských plodin a pěstování nových odolnějších odrůd s nižším obsahem nevhodných látek, a v mnoha dalších oblastech.

Proto redakce našeho časopisu považuje vydání zvláštního čísla Chemických listů zaměřeného na tuto oblast za plně oprávněné a užitečné a doufá, že bude kladně přijato i našimi čtenáři. Výzva k sepsání článků s touto tématikou se setkala s tak širokým ohlasem, že nebylo možné všechny došlé články zařadit do jediného čísla. Ty články, které se do tohoto čísla vzhledem k jeho omezenému rozsahu nevejdou, budou vycházet postupně v nově zavedené rubrice genomika a proteomika.

Je mojí milou povinností poděkovat všem, kteří přispěli k vydání tohoto čísla. Zejména jde o RNDr. Josefa Chmelíka, DrSc., který je v roli hostujícího redaktora duchovním otcem tohoto čísla a věnoval jeho přípravě obrovské množství času a energie. (Na tomto místě si neodpustím trochu škodolibě poznamenat, že není na škodu, když renomovaní autoři ochutnají nelehký redaktorský chlebíček a uvědomí si, jak složitá a těžká je práce redaktora). Dále je třeba poděkovat celé řadě firem, bez jejichž podpory a přispění by toto číslo nespatřilo světlo světa. Myslím si, že naše odborná veřejnost by měla znát jména těchto firem, kteří podporují aktivity České společnosti chemické a přispívají k rozšiřování nejmodernějších poznatků v moderních chemických disciplínách mezi našimi čtenáři. Proto je uvádím dále v abecedním pořadí:

Applied Biosystems, Darmstadt
HPST s. r. o.
Immunotech a. s.
Merck, s. r. o.
Scientific Instruments Brno, spol. s r.o.
Shimadzu GmBh Praha
Sigma-Aldrich, s. r. o.
Spectronex, spol. s r. o.

Přestože se někomu může zdát zaměření jednotlivých článků poněkud monotónní, mohu čtenáře ujistit, že sám proces mapování lidského genu a odhalování funkcí jednotlivých proteinů v živé buňce patří k největším dobrodružstvím lidského poznání v oblasti přírodních věd.

Jiří Barek

PROTEOMICKÝ PRŮVODCE

JOSEF CHMELÍK

Ústav analytické chemie AV ČR, Veveří 97, 611 42 Brno, Česká republika
chmelik@iach.cz

Došlo 4.9.05, přijato 16.11.05.

Klíčová slova: proteomika, definice, přístupy, metody, cíle

Obsah

1. Úvod
2. Přístupy k proteomickému studiu
3. Metody proteomického studia
4. Cíle proteomiky
5. Obsah proteomického čísla Chemických listů

1. Úvod

Proteomika se během posledního desetiletí stala jedním z nejdynamičtějších oborů v přírodních vědách. Za to vděčí rozvoji molekulární biologie, genomiky, bioinformatiky a spektroskopických a separačních metod, což přispělo k zdokonalení analýzy nukleových kyselin (např. rychlé sekvenování), separace a charakterizace bílkovin (např. dvourozměrná gelová elektroforéza a chromatografie, nové ionizační metody hmotnostní spektrometrie). Využití výpočetní techniky pro zpracování dat získaných hmotnostní spektrometrií umožnilo rychlou identifikaci bílkovin.

Existuje celá řada definic proteomiky. Za jednu z nejlepších považuji tuto: proteomika je obor, který se zabývá systematickou analýzou bílkovin z hlediska jejich identity, množství a funkcí. Jiné definice popisují spíše jednotlivé oblasti studia bílkovin (např. identifikaci, vztahy mezi strukturou a funkcí) nebo způsob získávání údajů (např. rychlá identifikace bílkovin zejména pro diagnostické účely).

Prudce rostoucí počet publikací znesnadňuje začínajícím proteomikům získat ucelenou představu. Toto číslo Chemických listů je věnováno především chemickým a analytickým metodám vhodným k identifikaci bílkovin (tedy tzv. analytické proteomice), bioinformatice, některým vztahům mezi genomem a proteomem, vybraným skupinám bílkovin a několika příkladům identifikace bílkovin a je určeno zejména studentům a dalším zájemcům, kteří nemají přístup k zahraniční literatuře. Tento článek proto upozorňuje na další práce věnované proteomické problematice publikované v českých časopisech. Protože dosud publikované proteomické příspěvky v české literatuře v důsledku různých přístupů jednotlivých autorů působí poněkud roztříštěně, pokusil jsem se v tomto článku shrnout a utřídit některé častěji používané termíny a metody s cílem usnadnit čtenářům pochopení dalších prací v tomto čísle, které jsou shrnuty v závěrečné části tohoto příspěvku.

2. Přístupy k proteomickému studiu

Existuje celá řada rozdílných přístupů k proteomickému studiu jak z hlediska použité metodologie, tak účelu a cílů. V následující části budou zmíněny jenom vybrané častěji používané přístupy:

Analytická proteomika je založena na kombinaci separace bílkovin ze složitých biologických směsí, jejich charakterizaci hmotnostní spektrometrií a na bioinformatickém zpracování získaných údajů. Hlavním cílem je identifikace bílkovin včetně stanovení molekulové hmotnosti, sekvence (pořadí) aminokyselin a určení posttranslačních modifikací. Dalšími cíli jsou např. charakterizace nekovalentních interakcí bílkovin s jinými látkami a kvantitativní stanovení heterogenity.

Strukturní proteomika se zabývá studiem struktury bílkovin s použitím krystalografie, NMR, MS a řady dalších technik s cílem pochopit strukturní chování bílkovin (tvorbu a stabilitu nativní konformace) a využít tyto poznatky v proteinovém inženýrství při modifikacích bílkovin pro specifické účely (léčiva, průmyslové enzymy atd.).

Funkční proteomika se zabývá nejen funkcí bílkovin, ale zejména studiem komplexních životních procesů, jejichž pochopení má zásadní význam pro studium vývoje organismu či mechanismu a léčbu nemocí.

Diferenční (srovnávací) proteomika je založena na analýze složitých směsí bílkovin, která sleduje změny složení bílkovin při různých stavech organismu (např. normální versus patalogický stav) s cílem nalézt a identifikovat rozdílně se vyskytující bílkoviny.

High-throughput proteomika je zaměřena na rychlé získávání velkého množství údajů o bílkovinách, což je důležité zejména pro screeningové účely ve zdravotnictví, zemědělství, kontrole potravin atd.

High-coverage proteomika se zabývá získáváním údajů o sekvenci aminokyselin včetně posttranslačních modifikací bílkovin s cílem co nejvyššího pokrytí primární struktury (tj. stanovením pořadí co nejvyššího počtu aminokyselinových zbytků v bílkovině), což je důležité při studiu role bílkovin v životních procesech.

Bottom-up proteomika představuje „klasický“ postup identifikace bílkovin, kdy je daná bílkovina nejprve izolována ze směsi, potom enzymově rozštěpena na směs peptidů, které jsou charakterizovány hmotnostní spektrometrií (molekulová hmotnost, případně sekvence). K tomu jsou většinou využívány specifické peptidy, tj. peptidy, které odpovídají specificitě použitého enzymu (zpravidla trypsinu).

Shotgun proteomika je obecný postup pro identifikace bílkovin, kdy je neseparovaná směs bílkovin nejprve enzymově rozštěpena na směs peptidů, které jsou následně separovány vhodnou metodou (nejčastěji HPLC) a potom sekvenovány tandemovou hmotnostní spektrometrií (často jsou využívány i nespecifické enzymy např. proteinasa K). Jedna z metod se nazývá MudPIT (multidimensional protein identification technology, vícerozměrná technologie identifikace bílkovin).

Top-down proteomika je postup identifikace bílkovin, kdy je daná bílkovina nejprve izolována ze směsi a potom charakterizována (nejvýhodněji je celá molekula fragmentována v hmotnostním spektrometru). Tento přístup přináší rychlé informace o molekulové hmotnosti, sekvenci aminokyselin a posttranslačních modifikacích.

3. Metody proteomického studia

Příprava vzorku pro identifikaci je velmi důležitá. Není příliš rozumné začít homogenizací celého organismu a z této komplexní směsi se snažit charakterizovat celý proteom. I kdyby se to podařilo, což v současnosti se nedaří plně ani pro mikroorganismy, nezískáme více informací než ty, které známe již z genomu. Proto je nutné si definovat na začátku každého projektu jeho cíle a na tomto základě vzorek dostatečně zjednodušit (vybrat jen určitou část organismu nebo typ bílkovin) a tomu přizpůsobit izolační postup (výběr extrakčních činidel, separační metody atd.).

Tradiční metodou analytické proteomiky je dvourozměrná gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu, využívaná nejen k separaci bílkovin, ale i k získávaní dvourozměrných map bílkovin, které lze přímo využít k proteomické charakterizaci organismů, tkání, buněk, metabolických procesů atd.[1–3]. Další tradiční metodou je Edmannova degradace bílkovin využívaná k jejich sekvenaci, která je nyní nahrazována hmotnostní spektrometrií[4]. Dvourozměrná kapalinová chromatografie spíše doplňuje než nahrazuje dvourozměrnou gelovou elektroforézu[5]. Její největší předností je, že separované bílkoviny jsou v roztoku, a lze je tedy snadno použít ke stanovení jejich molekulové hmotnosti, ze které lze rychle zjistit, zda je bílkovina posttranslačně modifikovaná. Tyto bílkoviny lze použít pro další studium. Existuje řada dalších metod, které umožňují izolovat bílkoviny pro proteomické účely. Část z nich je založena na principu kapilární elektroforézy a isoelektrické fokusace v kapalině[6–8], další využívají field-flow frakcionaci[9] pro izolaci bílkovin[10] nebo biologických částic[11]. Nejdůležitější jsou stále metody chromatografické. Kromě dvourozměrné kapalinové chromatografie se využívají v proteomice i další techniky (např. gelová chromatografie[12]), ale stále důležitější úlohu hrají afinitní techniky[13–15].

Dynamický rozvoj analytické proteomiky byl umožněn zejména díky pokrokům hmotnostní spektrometrie, a to hlavně využitím nových ionizačních technik MALDI a ionizace elektrosprejem (ESI), za které byla v roce 2002 udělena Nobelova cena K. Tanakovi a J. Fennovi. Existuje několik hmotnostně spektrometrických způsobů identifikace bílkovin: stanovení molekulové hmotnosti intaktních bílkovin, PMF (peptide mass fingerprinting, peptidové mapování), fragmentační analýza peptidů a fragmentační analýza intaktních bílkovin.

Stanovení molekulové hmotnosti intaktní bílkoviny sice nelze považovat za dostatečnou identifikaci, na druhou stranu poskytuje okamžitou informaci o možných posttranslačních modifikacích.

PMF využívá stanovení molekulové hmotnosti peptidů vzniklých specifickým štěpením bílkovin určitým enzymem, stanovené molekulové hmotnosti peptidů jsou porovnány s teoretickými molekulovými hmotnostmi peptidů vzniklých specifickým štěpením stejným enzymem všech bílkovin v databázích. Výhodou je, že tento postup vyžaduje velmi malé množství bílkovin a že ho lze snadno automatizovat. Nevýhodou je pak nejednoznačnost výsledků při analýze směsí bílkovin a to, že jde pouze o nepřímou identifikaci, která selhává u mutací a posttranslačních modifikací.

Fragmentační analýza využívá stanovení molekulové hmotnosti fragmentových iontů vzniklých v hmotnostním spektrometru z peptidů ke stanovení jejich aminokyselinové sekvence. Ta je potom využita pro identifikaci v databázích. Původně byla tato technika náročnější a pomalejší než PMF, protože byla vyvinuta pro elektrosprejovou tandemovou hmotnostní spektrometrii (ESI MS/MS), ale rychlý rozvoj tandemových technik MALDI (např. MALDI TOF/TOF, MALDI Q-TOF) umožnil použití stejného vzorku pro oba přístupy. Navíc fragmentační analýza peptidů umožňuje i analýzu nespecifických peptidů[16] nebo stanovení sekvence aminokyselin u bílkovin, které nejsou v databázích, tzv. *de novo* sekvenací. Fragmentační analýza intaktních bílkovin s použitím MS přináší v případech, kdy je daná bílkovina nejprve izolována ze směsi a potom fragmentována tandemovou hmotnostní spektrometrií, informace o molekulové hmotnosti, sekvenci aminokyselin a posttranslačních modifikacích[18].

Údaje získané z MS/MS analýzy peptidů lze interpretovat několika postupy. Dříve se používala ruční interpretace kolizních spekter, kdy je získaná sekvenční informace použita k prohledávání databáze bílkovin vyhledávacím programem. Zpracování obrovského množství dat získaného hmotnostní spektrometrií si vyžádalo možnost přímého využití experimentálních MS/MS dat pro vyhledávací programy. Další rozvoj výpočetní techniky a bioinformatiky nejen pro rychlou identifikaci bílkovin, ale i pro zjišťování jejich biologické role, je nezbytnou podmínkou splnění cílů proteomického výzkumu.

4. Cíle proteomiky

Proteomika, která prochází v posledních letech rychlým vývojem, zasahuje do všech oblastí vědy i aplikací, kde nějakou roli hrají bílkoviny. Hlavním cílem proteomiky je popis a vysvětlení role bílkovin v procesech, které probíhají v organismech, což zahrnuje identifikaci bílkovin (včetně stanovení molekulové hmotnosti, sekvence aminokyselin, kvantitativní stanovení heterogenity, určení vazeb

S–S a posttranslačních modifikací), interakce bílkovin s jinými látkami, kvalitativní i kvantitativní stanovení změn složení bílkovin během biologických procesů atd. Nejdůležitější jsou aplikace proteomiky v medicíně (studium příčin a mechanismů chorob, nalezení markerů patologických stavů), farmacii (hledání a vývoj léčiv), potravinářství (kvalita a bezpečnost potravin, nové výrobní procesy), průmyslu (technické enzymy), ochraně životního prostředí (likvidace škodlivin enzymy), zemědělství (zvyšování výnosů, pěstování nových odolnějších odrůd s nižším obsahem škodlivých látek) atd.

Proteomika generuje stále větší množství dat o bílkovinách v makromolekulárních komplexech, buňkách, organelách, tkáních i celých organismech a tempo získávání dat se neustále zrychluje. Současně se zlepšují a vyvíjejí nové proteomické techniky, a to jak analytické, biologické, tak zejména bioinformatické, neboť produkované množství dat přesahuje možnosti nepočítačového zpracování.

5. Obsah proteomického čísla Chemických listů

Prudký rozvoj proteomiky nebyl dosud příliš zachycen v české odborné literatuře[3], proto se výbor proteomické sekce České společnosti pro biochemii a molekulární biologii spolu s redakcí Chemických listů dohodl na přípravě proteomického čísla, které by poskytlo českým zájemcům pokud možno ucelený přehled této problematiky. Na počátku jsem oslovil asi 30 pracovníků, kteří se u nás proteomikou zabývají, aby napsali příspěvek na určité téma. Asi dvě třetiny oslovených vyhovělo mé žádosti a první část společného úsilí nyní čtenářům předkládáme. Druhá část příspěvků bude v Chemických listech publikována v roce 2006, kde se mimo jiné objeví referáty o glykoproteinech, měření protemických dat a studiu trojrozměrné struktury bílkovin hmotnostní spektrometrií.

Úvodní články první části shrnují historii, vývoj a obecnější přístupy proteomiky[19,20]. Následující příspěvky popisují moderní chemické proteomické postupy, využití proteolytických enzymů[21], integrovaných řešení[22] a mikrofluidiky[23] v proteomice. Další příspěvek se zabývá důležitou skupinou bílkovin fosfoproteiny[24]. Tři firemní příspěvky popisují moderní hmotnostně spektrometrickou instrumentaci[25–27].

Aplikace jsou jednak zaměřeny na využití dvojrozměrné kapalinové chromatografie pro izolaci bílkovin[28], jednak na využití proteomiky v molekulární toxikologii[29], na charakterizaci proteomu bakteriofága 812 (cit.[30]) a na proteomickou identifikaci glutenových bílkovin[31].

Tato práce byla podpořena prostředky výzkumnému záměru MŠMT č. Z40310501.

LITERATURA

1. Bouchal P., Kučera I.: Chem. Listy *97*, 29 (2003).
2. Váňa P., Šmarda J.: Chem. Listy *98*, 1130 (2004).
3. Collinsová M., Jiráček J.: Chem. Listy *98*, 1112 (2004).
4. Cantin G. T., Yates J. R.: J. Chromatogr. A *1053*, 22 (2004).
5. Vollmer M., Horth P., Vad C., Nagele E.: LC GC Europe *17*, 14 (2004).
6. Chmelík J., Janča J.: Chem. Listy *83*, 321 (1989).
7. Chmelík J., Thormann W.: J. Chromatogr. *600*, 305 (1992).
8. Thormann W., Caslavska J., Molteni S., Chmelík J.: J. Chromatogr. *589*, 321 (1992).
9. Chmelík J.: Chem. Listy *93*, 670 (1999).
10. Kang D., Moon M.H.: Anal. Chem. *77*, 4207 (2005).
11. Urbánková E., Vacek A., Chmelík J.: J. Chromatogr., B *687*, 449 (1996).
12. Šalplachta J., Řehulka P., Chmelík J.: J. Mass Spectrom. *39*, 1395 (2004).
13. Madera M., Mechref Y., Novotny M. V.: Anal. Chem. *77*, 4081 (2005).
14. Opiteck G. J., Scheffler J. E.: Expert Rev. Proteomics *1*, 57 (2004).
15. Baumann M., Meri S.: Expert Rev. Proteomics *1*, 207 (2004).
16. Zdráhal Z., Plocek J., Konečný P., Chmelík J.: Chem. Listy *91*, 811 (1997).
17. Řehulka P., Chmelík J. Allmaier G.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *19*, 79 (2005).
18. Kelleher N. L.: Anal. Chem. *76*, 196A (2004).
19. Kovářová H.: Chem. Listy *99*, 886 (2005).
20. Weiser J., Holub M., Nezbedová Š, Bezoušková S.: Chem. Listy *99*, 890 (2005).
21. Štosová T., Havliš J., Lenobel R., Šebela M.: Chem. Listy *99*, 896 (2005).
22. Herick K.: Chem. Listy *99*, 906 (2005).
23. Grym J., Foret F.: Chem. Listy *99*, 915 (2005).
24. Halada P.: Chem. Listy *99*, 922 (2005).
25. Godula M.: Chem. Listy *99*, 930 (2005).
26. Verner P.: Chem. Listy *99*, 937 (2005).
27. Boháč M., Ingendoh A., Fuchser J., Witt M.: Chem. Listy *99*, 943 (2005).
28. Skalníková H., Kovářová H., Moos J., Filová V., Halada P.: Chem. Listy *99*, 952 (2005).
29. Fella K., Glückmann M., Kruft V., Kamer P.-J., Kröger M.: Chem. Listy *99*, 957 (2005).
30. Zdráhal Z., Eyer L., Konečná H., Preisler J.: Chem. Listy *99*, 962 (2005).
31. Šalplachta J., Allmaier G., Chmelík J.: Chem. Listy *99*, 967 (2005).

J. Chmelík *(Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Veveří 97, 611 42 Brno, Czech Republic)* **Proteomic Guide**

Proteomics is a fast developing field aimed at protein identification. Its development was made possible by improvement of separation and spectroscopic techniques, and development of bioinformatics necessary for data evaluation. This review summarizes some basic approaches, aims and methods (including MS, electrophoresis, chromatography, focusing field-flow fractionation, etc.). The review opens a special proteomics issue of the journal.

PROTEOMIKA V POSTGENOMOVÉ DOBĚ

HANA KOVÁŘOVÁ

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Rumburská 89, 27721 Liběchov
kovarova@iapg.cas.cz

Došlo 3.9.05, přijato 11.11.05.

Klíčová slova: proteom, genom, dvojrozměrná gelová elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, posttranslační modifikace

Obsah

1. Úvod
2. Rozvoj proteomiky
   2.1. Cesta od genomu k proteomu
   2.2. Dělení proteinů
   2.3. Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií
3. Současná tvář proteomiky
   3.1. Elektromigrační technika
   3.2. Chromatografické techniky
   3.3. Identifikace a kvantifikace proteinů
4. Aplikace proteomiky
   4.1. Proteinové profilování
   4.2. Posttranslační modifikace
   4.3. Proteinové interakce
5. Kam směřuje proteomika

Úvod

Termín „genom“ označuje veškerou výbavu nukleových kyselin, které zajišťují buněčnou dědičnost a kódují strukturu i funkční projev buňky. Analogicky „proteom“ zahrnuje všechny bílkoviny (proteiny), které tvoří převažující součást buněčných struktur a vykonávají prakticky všechny buněčné funkce: převádějí a zpracovávají biologickou informaci, uskutečňují výměnu látek a energie (metabolismus).

Slovo „proteom“ (proteome; protein complement of the genome) použil poprvé australský doktorand Mark Wilkins v r. 1994 na konferenci v Sieně. Vznikl nový obor zvaný proteomika, jehož náplní je globální identifikace proteinů v určité zdravé nebo nemocné buňce či tkáni a studium jejich funkce či interakce[1]. Velmi brzy se ukázalo, že proteomika bude v porovnání s genomikou, studiem na úrovni nukleových kyselin, daleko složitější. Příčinou je proměnlivost určitého proteomu během buněčného růstu a diferenciace, ale i vliv funkčních produktů jiných buněčných typů či vnitřního prostředí organismu, které se mění v závislosti na stárnutí, při adaptaci na změny vnějšího prostředí a v průběhu nemoci. Proteiny jsou stále pozměňovány. Navazují se na ně fosforečné, cukerné nebo lipidové skupiny, spojují se s jinými proteiny do větších molekulárních celků. Děje se tak v průběhu jejich syntézy i po dobu jejich setrvání v organismu. Množství jednotlivých proteinů v jediné eukaryotické buňce se odhaduje v rozmezí od 1 do 10^6 molekul a dosahuje až 10^{10} v séru[2]. Není tedy divu, že základní skladba lidského genomu byla rozluštěna během jediného roku na robotických zařízeních a DNA sekvenátorech americké firmy Celera Genomics Craiga Ventera, zatímco pro sestavení proteomu jsou nezbytné citlivé metody dělení proteinů, jejich automatické zpracování a náročné určování proteinů hmotnostní spektrometrií.

Proteomika je klíčem k systematickému studiu biologických dějů. Vývoj směřuje ke stále citlivějším metodám. Cílem je identifikovat a charakterizovat proteiny v nejnižších možných koncentracích.

2. Rozvoj proteomiky

2.1. Cesta od genomu k proteomu

Technologický rozvoj analytické proteinové chemie kolem roku 1990 byl původně zaměřen na zvyšování citlivosti metod používaných k identifikaci proteinů dělených na gelech. Nejčastěji bylo používáno určování sledu aminokyselin od *N*-konce neporušených proteinů nebo enzymově štěpených proteinových fragmentů (Edmanovo sekvenování), ale tento způsob byl pomalý a málo citlivý[3]. V těchto letech byly už rozluštěny genomy několika mikroorganismů a to vytvořilo předpoklady k identifikaci proteinů pomocí genových databází. Efektivnost tohoto přístupu byla však omezena schopností určit částečnou sekvenční informaci z daného proteinu a srovnat ji s daty uloženými v genových databázích.

2.2. Dělení proteinů

K dělení proteinů se stále používá dvojrozměrná gelová elektroforéza (2DE). Poprvé byla popsána v roce 1975 nezávisle třemi různými autory[4–6]. Předností této metody je rozdělení jednotlivých proteinů ze směsi získané z buněk, tkání či tělních tekutin na gelech podle dvou nezávislých biochemických charakteristik. Nejprve jsou proteiny v prvním směru rozděleny podle svých nábojů (do isoelektrických bodů, pI) a poté v kolmém směru podle svých molekulových hmotností. Výsledkem je tzv. proteinová mapa, v níž každý protein zaujímá charakteristikou pozici. Proteiny v gelu jsou vizualizovány barvením různými způsoby, přičemž nejvyšší citlivosti dosahuje stříbření[7]. Technika 2DE jako první umožnila a podpořila současnou

kvantitativní analýzu velkého počtu proteinů.

Metoda 2DE přispěla již v 80. letech k sestavování proteinových databází. V této době byly také navrženy statistické metody (shlukovací algoritmy či metoda hlavních komponent) hodnocení proteinových map. Identifikaci proteinů z gelů však umožnilo až použití nových analytických přístrojů, které byly vyvinuty na počátku 90. let.

2.3. Identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií

V hmotnostní spektrometrii (MS) je měřena hmotnost molekuly (přesněji poměr hmotnosti k náboji), která musí být nejprve ionizována a přenesena do vysokého vakua přístroje. Zatímco analýza malých molekul byla úspěšná, látky s vyšší molekulovou hmotností se rozkládaly. Vývoj dvou metod, ionizace elektrosprejem[8] (ESI) a laserová desorpce za přítomnosti matrice[9] (MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization) ke konci 80. letech druhého tisíciletí vyřešil tento problém a otevřel cestu k výrobě nových typů přístrojů. Iontové zdroje MALDI jsou nejčastěji spojeny s analyzátorem hmotnosti TOF (time of flight), zatímco ESI je obvykle spojen s iontovou pastí (IT) nebo kvadrupolovým (Q) radiofrekvenčním typem analyzátoru. Vedle MALDI-TOF jsou také dostupné hmotnostní spektrometry využívající ESI iontové zdroje a hybridní Q-TOF analyzátory[10].

Četné experimenty potvrdily, že stanovení hmotnosti proteinů, pokud nedosahuje extrémní přesnosti, nestačí k jejich určení. To umožní teprve hmotnosti peptidů, které vzniknou štěpením proteinu na specifických místech. Identifikace pak spočívá v srovnání spektra experimentálních peptidů s teoretickými spektry vypočítanými ze sekvenčních databází. V roce 1993 bylo publikováno pět nezávislých sdělení o vyhledávacích databázových algoritmech[11–15]. Tak vznikly metody známé jako peptidové hmotnostní mapování či otiskování (peptide mass mapping/fingerprinting).

3. Současná tvář proteomiky

3.1. Elektromigrační technika: 2DE a MS

Dvojrozměrná polyakrylamidová elektroforéza zůstává základem proteomiky[16]. Použití imobilizovaných pH gradientů do velké míry vyřešilo problém reprodukovatelnosti prvého rozměru a usnadnilo dělení bazických proteinů. Zdokonaluje se účinnost solubilizace membránových proteinů, i když přetrvávají problémy s hydrofobními proteiny nebo proteiny o extrémní velikosti či pI. Objevují se i další postupy jako techniky diferenčního fluorescenčního značení proteinů (DIGE) či fluorescenční detekce separovaných proteinů, která výrazně rozšiřuje oblast linearity při kvantifikaci proteinů. Počítačové vyhodnocování velkého počtu proteinových map, nezbytné pro úplné objasnění různých biologických procesů, se vylepšuje a automatizuje díky novému programovému vybavení, přesto stále vyžaduje určité manuální zásahy. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF se stala metodou první volby při identifikaci proteinů dělených 2DE.

3.2. Chromatografické techniky: LC-MS

Omezení související s použitím klasické elektromigrační techniky vedla k rychlému rozvoji pokročilejší generace proteomických technik, zejména kombinace kapalinové chromatografie (LC) a tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS), a značení stabilním izotopem[10]. Tyto techniky jsou založeny na podmínce, že měření peptidů vzniklých proteolytickým štěpením komplexní směsi proteinů může být použito jak pro identifikaci proteinů, tak pro jejich relativní kvantifikaci. Při použití LC-MS postupu jsou peptidy děleny kapalinovou chromatografií s reverzní fází (RP-HPLC) a poté jsou nastříknuty na hmotnostní spektrometr ESI. Softwarové vybavení přístroje může vybrat jednotlivé prekurzorové ionty pro tandemovou MS/MS analýzu. Ty jsou pak fragmentovány za vzniku dceřinných iontů, které jsou dále změřeny a zobrazeny ve výsledném spektru MS/MS a udávají aminokyselinovou sekvenci prekurzoru. Vzhledem k vysoké kapacitě kolon RP-HPLC a vysoké analytické schopnosti ESI-MS je možné analyzovat velmi komplexní směsi peptidů, což bylo poprvé demonstrováno na příkladu peptidů prezentovaných hlavním histokompatibilním komplexem imunitního systému[17]. Je zřejmé, že analyzátor hmotnostního spektrometru je jeho rozhodující součástí a schopnost generovat hmotnostní spektra udávající informace o iontech odvozených ze studovaných peptidů/proteinů je klíčovým prvkem v kontextu současné proteomiky. Vedle již zmíněných analyzátorů typu IT, TOF a Q, je nutné zmínit i analyzátor typu FT-ICR (Fourier transform ion cyclotron resonance) [18], který vychytává ionty podobně jako iontová past, avšak za podmínek vysokého vakua v silném magnetickém poli. Jeho předností je vysoká přesnost měření hmotnosti a rozlišení. V posledních letech se úspěšně prosazují nové konfigurace iontových zdrojů a hmotnostních analyzátorů, např. MALDI-TOF/TOF, kde je mezi dva analyzátory TOF vložena kolizní cela. MALDI-generované prekurzorové ionty jsou v prvním analyzátoru TOF analyzovány podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) a vybrané ionty pak procházejí kolizní celou, kde jsou dále fragmentovány a hmotnosti iontových fragmentů jsou měřeny ve druhém analyzátoru TOF (cit.[19]). Obdobně může být vložena kolizní cela i mezi quadrupolový iontový filtr a analyzátor TOF (Q-TOF). Tyto hybridní přístroje poskytují informačně bohatá hmotnostní spektra a v současné proteomice zaujímají dominantní místo při identifikaci i *de novo* sekvenaci proteinů.

3.3. Identifikace a kvantifikace proteinů

Ve snaze přidat LS-MS přístupům kvantitativní aspekt studia proteomů byly navrženy různé postupy, které využívají skutečnosti, že páry chemicky identických analytů s různým izotopickým složením mohou být rozlišeny v hmotnostním spektrometru díky rozdílu v jejich hmotnosti a že poměr signálních intenzit těchto párových analytů udává jejich relativní množství. Stabilní izotopové značky mohou být do peptidů zavedeny metabolicky pomocí značených aminokyselin, enzymově prostřednictvím přenosu ^{18}O z vody do peptidů[20], nebo chemickou reakcí vyu-

žívající např. ICAT (isotope-coded affinity tags)[21]. V současné době jsou popsány chemické postupy pro specifické izotopové značení skupin SH, aminoskupin, *N*-vázaných glykosacharidů aj. Značení určitých skupin či struktur je závislé na navržení vhodných chemických reakcí. V posledním období bylo popsáno tzv. značení SILAC (stable isotope labeling with amino acid in cell culture)[22], kdy je do proteinů jednoho z porovnávaných vzorků inkorporován ^{13}C-arginin. Nezanedbatelnou výhodou je, že takto může být označeno převážné množství peptidů aniž by bylo nezbytné použít chemické reakce.

4. Aplikace proteomiky

4.1. Proteinové profilování

Proteiny buněk, tkání či tělních tekutin mohou být v současné době charakterizovány pomocí výše popsaných metod. Jedno možné měřítko technického pokroku je počet identifikovaných proteinů. Pro komplexní vzorek tato čísla v současné době dosahují tisíce. Je jistě lákavé systematicky analyzovat proteiny exprimované v buňkách a tkáních, získat úplné proteinové mapy a uspořádat příslušné proteinové databáze. Nicméně, žádnou kompletní mapu jediného proteomu se dosud nepodařilo získat a tento fakt dokumentuje potřebu dalšího technologického vývoje v proteomice. Na rozdíl od jednoduchého vyzdvihování analytického charakteru použitých metod je však logické zdůraznit u proteomických studií potřebu řešit určitou biologickou otázku. Mnohé studie jsou proto zaměřeny na sledování změn proteinových profilů v závislosti na funkčním stavu buňky či tkáně. Získaná data jsou však spíše semikvantitativní založená na relativní kvantifikaci a představují seznam kandidátních proteinů typických pro sledovaný biologický jev. Aby byl pohled ucelenější, je nutné kombinovat i mnohé proteomické techniky, které často poskytují komplementární výsledky.

4.2. Posttranslační modifikace

Mnohé proteiny jsou posttranslačně modifikovány a počet možných modifikací aminokyselin dosahuje 200. Tyto posttranslační modifikace (PTM) jsou většinou reverzibilní a mají významnou regulační úlohu[23]. Vzhledem k tomu, že prakticky všechny PTM jsou spojeny se změnou molekulové hmotnosti proteinu, jsou metody hmotnostní spektrometrie ideálním prostředkem k určení typu modifikace, ale i aminokyseliny, na které se modifikace nachází. Proteomová analýza PTM je však mnohem obtížnější než jednoduchá identifikace proteinu, a to z důvodů nízké stechiometrie PTM, lability a reverzibility vazby, a potřeby izolovat modifikovaný peptid obsahující PTM (cit.[24]) .

4.3. Proteinové interakce

Interakce protein-protein jsou důležité nejen z hlediska regulace funkce proteinů, ale i jejich vnitrobuněčné lokalizace. Mnohé biologicky relevantní interakce probíhají s nízkou afinitou, jsou přechodné a závislé na specifickém buněčném mikroprostředí. Proteomický přístup ke studiu proteinových komplexů vyžaduje jejich specifické obohacení či purifikaci s následnou analýzou navázaných proteinů. Získání dostatečného množství proteinového komplexu s požadovanou čistotou však představuje nesnadný úkol. Specifické strategie musí být formulovány pro každý sledovaný proteinový komplex a jemné separační techniky musí být zvoleny tak, aby nedocházelo k narušení proteinových interakcí. Mezi nejčastěji používané izolační postupy patří afinitní purifikace interagujících proteinů a identifikační část experimentů kombinuje elektromigrační i chromatografické separace s hmotnostní spektrometrií[25]. Proteinové interakce mohou být určovány také pomocí proteinových čipů (arrays)[24]. Na malých destičkách jsou navázané specifické proteinové sondy a po kultivaci s buněčným lyzátem je interagující cílový protein prokázán pomocí fluorescence či jinou optickou metodou, popřípadě hmotnostní spektrometrickou technikou SELDI (surface enhanced laser desorption ionization).

5. Kam směřuje proteomika

Proteomika je dynamickým oborem, který se zabývá systematickým studiem proteomů neboli souborů buněčných a tkáňových bílkovin s cílem poskytnout podrobné poznatky o funkci, struktuře a kontrole biologických systémů. Většina velkých farmaceutických firem otevřela vlastní proteomová centra a mnoho biotechnologických společností má proteomiku jako hlavní program. Veřejný výzkum lidského proteomu je řízen mezinárodní organizací HUPO (Human proteome organization – www.hupo.org) a nedávno založená EuPA (European proteomics association) se zaměřuje i na výzkum proteomů mnoha dalších živočišných druhů a podporuje aktivity národních proteomických společností v Evropě. Také Proteomická sekce České společnosti pro biochemii a molekulární biologii je členem EuPA a aktivně vstupuje do evropského ale i celosvětového protemického výzkumu.

Přestože má proteomika multidisciplinární charakter, nejvýznamnější přínosy se očekávají v oblasti biomedicíny. Poznání proteinů, které se vyskytují v lidském organismu v nepředstavitelně mizivých množstvích miliontin mikrogramů nebo po nesmírně krátkou dobu, umožní poznat složité regulace a hierarchické úrovně lidského organismu a položí solidní i když složité základy pro klinickou medicínu zítřka.

LITERATURA

1. Wilkins M. R., Sanchez J.-C., Gooley A. A., Apper R. D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D. F., Williams K. L.: Biotech. Gen. Eng. Reviews *13*, 19 (1995).
2. Patterson S. D., Aebersold R. H.: Nature Genetics Suppl. *33*, 311 (2003).
3. Aebersold R. H., Leavitt J., Saavedra R. A., Hood L.

E., Kent S. B.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *84*, 6970 (1987).
4. O´Farrell P. H.: J. Biol. Chem. *250*, 4007 (1975).
5. Scheele G. A.: J. Biol. Chem. *250*, 5275 (1975).
6. Klose J.: Humangenetik *26*, 231 (1975).
7. Hochstrasser D. F. Merrill C. R.: Appl. Theor. Electrophor. *1*, 35 (1988).
8. Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M.: Science *246*, 64 (1989).
9. Karas M., Hillenkamp F.: Anal. Chem. *60*, 2299 (1988).
10. Aebersold R. H., Mann M.: Nature *422*, 198 (2003).
11. Henzel W. J., Billeci T. M., Stults J. T., Wong S. C., Grimley C., Watanabe C.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *90*, 5011 (1993).
12. Mann M., Hojrup P., Roepstorff P.: Biol. Mass Spectrom. *22*, 338 (1993).
13. Pappin D. J. C., Hojrup P., Bleasby A. J.: Curr. Biol. *3*, 327 (1993).
14. James P., Quadroni M., Carafoli E., Gonnet G.: Biochem. Biophys. Res. Commun. *195*, 58 (1993).
15. Yates J. R. III, Speicher S. Griffin P. R. Hunkapiller T.: Anal. Chem. *214*, 397 (1993).
16. Griffin T. J., Aebersold R. H.: J. Biol. Chem. *276*, 45497 (2001).
17. Hunt D. F., Henderson R. A., Shabanowitz J., Sakaguchi K., Michel H., Sevilir N., Cox A. L., Appella E., Engelhard V. H.: Science *255*, 1263 (1992).
18. Martin S. E., Shabanowitz J., Hunt D. F., Marto J. A.: Anal. Chem. *72*, 4266 (2000).
19. Medzihradszky K. F. , Campbell J. M., Baldwin M. A., Falick A. M., Juhasz P., Vestal M. L., Burlingame A. L.: Anal. Chem. *72*, 552 (2000).
20. Yao X., Freas A., Ramirez J., Demirev P. A., Fenselau C.: Anal. Chem. *73*, 2836 (2001).
21. Gygi S. P., Rist B., Gerber S. A., Turecek F., Gelb M. H ., Aebersold R. H.: Nature Biotechnol. *17*, 994 (1999).
22. Ong S. E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D. B., Steen H., Pandey A., Mann M.: Mol. Cell. Proteomics *1*, 376 (2002).
23. Krishna R., Wold F., v knize: *Protein structure – A practical Approach* (Creighton T. E., ed.), 2. vydání, str. 91. Oxford University Press, New York 1997.
24. Simpson R. J.: *Proteins and Proteomics.* Cold Spring Harbor Laboratory Press 2003.
25. Huber L. A.: Nature Rev. *4*, 74 (2003).

H. Kovářová (*Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Liběchov, Czech Republic):* **Proteomics in Postgenome Era**

Proteomics studies protein properties to provide an integrated view of cellular processes. Proteome, which is the protein complement of a genome, provides a platform for proteomics. Proteomics, a burgeoning field at present, is aimed at profiling and characterizing gene expression at the protein level, their post-translational modifications and interactions. The review is devoted to the most important events in the short history of proteomics and to recent trends and developments in the field.

PROTEOMIKA JAKO KOMPLEXNÍ PŘÍSTUP KE STUDIU FYZIOLOGICKÝCH REGULACÍ U BAKTERIÍ

JAROSLAV WEISER, MARTIN HOLUB, ŠÁRKA NEZBEDOVÁ a SILVIE BEZOUŠKOVÁ

Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
weiser@biomed.cas.cz

Došlo 2.9.05, přijato 1.11.05.

Klíčová slova: proteomika, mikrobiologie, diferenciace, antibiotika, streptomycety, 2D-elektroforéza, subproteomy, posttranslační modifikace

Obsah

1. Úvod
2. Popisná nebo dynamická proteomika?
3. Proteomové signatury
4. Volba fyziologických podmínek
5. Subproteomy
   5.1. Buněčné frakce
   5.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti
   5.3. Funkční nebo strukturní vlastnosti
   5.4. Posttranslační modifikace
6. Perspektivy – od expresních profilů k regulačním sítím a systémové biologii

1. Úvod

Biologický výzkum prošel v posledních letech zásadním posunem spočívajícím v propojení klasických molekulárně-genetických a biochemických technik s metodami fyzikálními, fyzikálně-chemickými a matematickými, což vedlo k vytvoření systému tzv. komplexní molekulární biologie. Proteomika jako jedna z nově vzniklých disciplín komplexní molekulární biologie prodělala obdobně dynamický vývoj, který čerpá z neobyčejného rozmachu genomiky. Ten v současné době přinesl znalost kompletní sekvence genomů několika stovek prokaryotních a eukaryotních organismů, počínaje nejjednoduššími bakteriemi a konče člověkem. Komplexní molekulární biologie přináší další rozměr do studia molekulární podstaty života tím, že dovoluje zkoumat nejrůznější fyziologické jevy v jejich složitosti. Na rozdíl od klasické molekulární biologie nestuduje jednotlivé geny nebo jejich malé skupiny, ale dovoluje studium celých genomů a exprese jejich velkých částí v čase i prostoru a tím poznání celých komplexů fyziologických aktivit organismů.

Obrovské množství sekvenačních dat popisujících struktury stále většího počtu genomů prokaryotních a eukaryotních organismů vyvolává potřebu efektivních a vysokokapacitních technik dovolujících přiřazení funkcí k jednotlivým genovým strukturám a odhalujících jejich vzájemnou interakci a v neposlední řadě i regulaci jejich exprese. Takové požadavky splňuje právě proteomika, která umožňuje sledovat současně většinu proteinů v buňce nebo tkáni a určit, jak jejich identitu, tak i úroveň jejich exprese danou jejich koncentrací v čase a prostoru. V kombinaci se znalostí kompletní sekvence genomu daného organismu pak umožňuje porozumět jednotlivým funkčním a regulačním genovým sítím a kaskádám. Spolu s analýzou exprese genů na úrovni mRNA (transkriptomika) a nízkomolekulárních metabolitů a signálních molekul (metabolomika) dovoluje vytvářet komplexní modely funkce buněk a tkání jednotlivých organismů.

Rozvoj metod, které proteomika využívá, dovoluje nejen hlubší pohled do systému přenosu a exprese genetické informace, ale tak jak se zvyšuje kapacita těchto technik, rozšiřuje se i oblast jejich využití, a to zejména v moderních biotechnologiích. Uplatnění nacházejí zvláště ve vyhledávání nových léčiv a biologicky aktivních látek a v identifikaci zásahových míst pro tato nová, stejně jako i pro dosud využívaná léčiva. Vzhledem k tomu, že nedávno vyšel v Chemických listech přehledný článek zabývající se základními principy a metodami používanými v proteomice[1], budeme se v tomto přehledu věnovat spíše některým experimentálním strategiím a aplikacím využívaným zejména v mikrobiologii.

Tak jako při vzniku a rozvoji řady oblastí molekulární biologie a biochemie sehrály významnou roli mikroorganismy a zejména bakterie, tak také stály u zrodu proteomiky. Mimo základní rys, že jde ve své většině o jednobuněčné organismy a tedy o zdroj biologicky homogenního materiálu, představují bakterie, díky krátké době zdvojnásobení jejich populací a možnosti získat obrovské množství jedinců, i fyziologicky velmi zajímavý model. V současné době mikrobiální proteomika nepředstavuje pouze metodické „cvičiště“ pro vývoj a testování nejrůznějších technik využitelných při studiu proteomů vyšších organismů a člověka, ale vzhledem k jejímu významu právě pro člověka představuje zcela svébytnou a dynamicky se rozvíjející oblast proteomiky[2,3]. Je možné definovat dva nejrychleji se rozvíjející směry v mikrobiální proteomice. V první řadě je to výzkum patogenních mikroorganismů, kde jde jednak o identifikaci virulentních faktorů, a tím poznání molekulárních mechanismů patogenicity, a dále pak o studium interakce hostitel-patogen. Protože v centru zájmu genomiky jsou zejména bakterie, které jsou původci řady infekčních onemocnění, zvyšuje se i zájem o studium jejich proteomů. Často se využívá tzv. srovnávací proteomiky, kdy se porovnávají proteiny příbuzných

patogenních a nepatogenních bakterií[4]. Toho bylo např. využito při studiu proteomu původce tuberkulózy *Mycobacterium tuberculosis*[5]. Prohloubení znalostí o proteinech, které se podílejí na pronikání patogenní bakterie do hostitelské buňky, umožnilo jejich odlišení od proteinů hostitele, a tím i studium interaktivních proteomů infikovaných buněk nebo tkání a patogenních bakterií. Toho bylo například využito při studiu interakce *Francisella tularensis* a makrofágů[6] nebo bakterií *Neisseria meningitidis* a jejich hostitelských epiteliálních buněk[7].

Další oblastí, která je v centru zájmu mikrobiální proteomiky, jsou biotechnologie, které buď využívají bakterie k výrobě nejrůznějších produktů, zejména v potravinářském průmyslu, anebo jako producenty léčiv, zejména antibiotik, či při výrobě nových vakcín[8]. Mikrobiální proteomika přispívá také výraznou měrou k řešení jednoho ze zásadních problémů při potírání infekčních onemocnění, kterým je široce rozšířená rezistence většiny patogenních mikroorganismů k antibiotikům[9].

Mimo uvedené praktické aplikace je však mikrobiální proteomika v současné době také základním systémovým prostředkem komplexní molekulární biologie při studiu bakteriální fyziologie[10–12].

2. Popisná nebo dynamická proteomika?

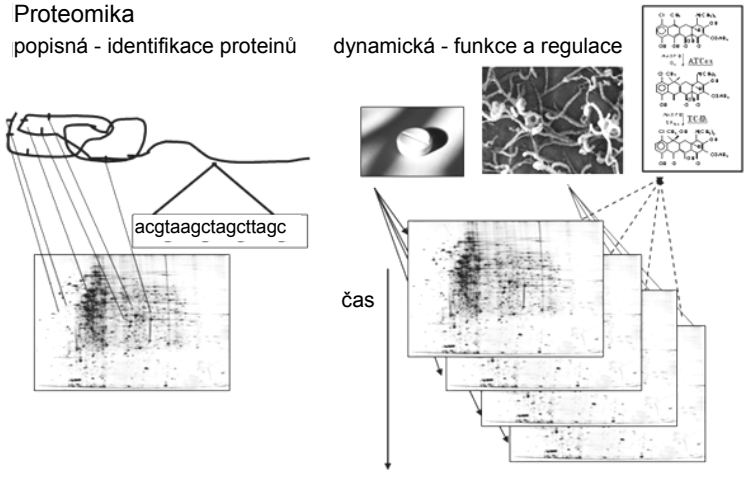
Za jeden ze základních cílů každé proteomové studie bývá považována identifikace jednotlivých proteinů rozdělených buď dvojrozměrnou gelovou elektroforézou[13] nebo některou z chromatografických technik[14]. To předpokládá znalost kompletní primární sekvence a struktury genomu zkoumaného organismu nebo organismu, který je mu dostatečně příbuzný. Vlastní identifikace a přiřazení proteinu k odpovídajícímu genu probíhá některou ze stále se rozšiřujícího spektra metod hmotnostní spektrometrie[15] a je základním principem popisné proteomiky.

Nicméně je možné zvolit i metodický přístup, který se do značné míry obejde bez znalostí získaných genomikou. V tomto případě se využívá postup, který pohlíží na studovaný proteom jako na soubor proteinů s neznámou identitou a sleduje jejich chování v čase. Dovoluje použít principy srovnávací proteomiky a s pomocí různých statistických metod dovoluje sestavení skupin proteinů, které vykazují identické charakteristiky a tvoří tzv. regulony. Ty představují uskupení proteinů, jejichž geny jsou regulovány identickými nebo podobnými regulačními mechanismy[16,17]. Tento přístup je možno s výhodou využít ke sledování nejrůznějších metabolických systémů, které v bakteriální buňce zodpovídají za procesy jako je biosyntéza sekundárních metabolitů a zejména antibiotik, morfologická diferenciace nebo reakce na změnu růstových podmínek, či stres[16,18] a je označován jako kvantitativní nebo dynamická proteomika (obr. 1).

Pro zařazení proteinů do regulačních uskupení je třeba provést obrazovou analýzu dvojrozměrných elektroforetických gelů, což dovoluje vytvořit expresní profily jednotlivých proteinů, které jsou určeny jejich koncentrací v čase. Tento přístup jsme využili i v naší laboratoři při studiu biosyntetické dráhy chlortetracyklinů u *Streptomyces aureofaciens*[19]. Pro rekonstrukci metabolických regulačních sítí je samozřejmě optimální kombinovat oba přístupy, popisnou proteomiku, tedy identifikaci jednotlivých proteinů, spolu s analýzou jejich expresních profilů v rámci analýzy dynamických proteomů[11] (obr. 1).

3. Proteomové signatury

Tak, jak jsou objasňovány principy fungování a regulace u stále komplexnějších metabolických systémů, ukazuje se, že v nich se uplatňují i geny a z nich exprimované proteiny, které nesouvisí jednoznačně se sledovanou aktivitou. Např. biosyntéza určité přírodní látky, např. antibiotika, nezávisí pouze na expresi genů kódujících biosyntetické enzymy a jejich regulátory, ale ovlivňuje ji řada meta-

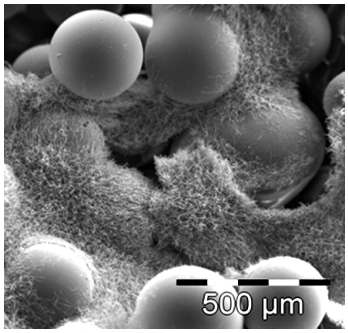


Obr. 1. **Schéma principu popisné a dynamické proteomiky**

bolických drah s touto aktivitou přímo nesouvisejících[20–23]. Každá bakteriální aktivita je tedy charakterizována určitým proteinovým profilem neboli proteomovou signaturou[24] reprezentovanou oběma typy proteinů. Každá proteomová signatura charakterizuje jednoznačně sledovaný fyziologický stav, nicméně vyskytují se určité, i velmi odlišné fyziologické situace, které jsou charakterizovány podobnými nebo stejnými proteomovými signaturami[25,12]. Jde například o proteomové signatury reflektující interakci bakteriální buňky s antibiotikem na jedné straně a reakci na chladový či teplotní stres[11,12] na straně druhé. Aby bylo možné přiřadit jednoznačně určitému fyziologickém stavu konkrétní proteomový profil nebo signaturu, je třeba studovat tento stav z několika úhlů pohledu a experimentální data extrahovat z dostatečného počtu jejich zdrojů, např. dvojrozměrných elektroforetických gelů, získaných za různých podmínek. To pak umožňuje rekonstruovat příslušné metabolické a regulační dráhy způsobem, který se co nejvíce blíží reálné situaci v buňce.

4. Volba fyziologických podmínek

Při navrhování proteomických experimentů je důležitá správná volba fyziologických podmínek, za nichž jsou získávány vzorky k analýze, tak aby získané výsledky co nejlépe odpovídaly situaci v přirozeném životním prostředí jednotlivých mikroorganismů. Studujeme-li např. funkční a regulační mechanismy biosyntézy antibiotik, ke které dochází v souvislosti se změnami v životním cyklu produkčních bakterií, je třeba expresi proteinů studovat za těchto fyziologických podmínek. Téměř tři čtvrtiny antibiotik, která jsou využívána v medicínské nebo veterinární praxi, jsou produkovány streptomycetami, skupinou převážně půdních bakterií s velmi složitým životním cyklem. Bylo prokázáno, že biosyntéza antibiotik (biochemická diferenciace) úzce souvisí s morfologickou diferenciací u těchto bakterií[26,27]. Přestože streptomycety jsou schopné produkovat antibiotika i v situaci, kdy k těmto morfologickým změnám nedochází, je pro objasnění vztahu biochemické a morfologické diferenciace nutné kultivovat je za podmínek, kdy dochází k oběma typům diferenciace. Z těchto důvodů jsme v naší laboratoři vyvinuli kultivační systém, který toto dovoluje. Tato kultivační technologie, vyvinutá pro účely proteomových studií diferenciace streptomycet, využívá jako oporu pro růst skleněné kuličky o průměru 265 až 325 μm a jako dynamickou složku běžná kapalná živná média využívaná pro submersní kultivaci streptomycet[28]. Principem systému je kapalné kultivační médium udržované kapilárními silami v prostoru mezi skleněnými kuličkami, z něj substrátové mycelium čerpá živiny. Povrch kuliček poskytuje mechanickou oporu pro růst jednotlivých vláken a jejich následnou přeměnu ve vzdušné mycelium a řetízky spór (obr. 2).



Obr. 2. **Kultivace a diferenciace *Streptomyces coelicolor* na skleněných kuličkách**

Produkci pigmentovaných antibiotik, doprovázející morfologické změny, jsme demonstrovali u *Streptomyces lividans,* kde tvorba červeného pigmentu (antibiotika) byla mnohem výraznější na skleněných kuličkách než ve stejném kapalném médiu nebo na agaru. Systém dovoluje snadné značení buněčných proteinů radioaktivními aminokyselinami přidanými do definovaného kapalného média, snadné rozbíjení buněk s využitím skleněných kuliček a reprodukovatelnou přípravu dostatečného množství proteinových vzorků pro proteomové analýzy.

Obdobný problém volby vhodných fyziologických podmínek nastává při studiu patogenních mikroorganismů, které jsou kultivovány v laboratoři v kapalných půdách anebo na agarových plotnách. Tento způsob kultivace se však výrazně liší od životních podmínek, ve kterých se vyskytují v buňkách nebo orgánech hostitelů. Např. u enterobakterií jsou podmínky laboratorní kultivace značně vzdálené od podmínek panujících v trávicím traktu hostitele. V tomto případě je podle našeho názoru podstatně vhodnějším systémem kontinuální kultivace v chemostatu. Dovoluje udržovat konstantní velikost populace a nastavit růstovou rychlost, což může lépe napodobit přirozené životní prostředí enterobakterií.

5. Subproteomy

Rozdělením proteomu jako souboru všech proteinů v buňce na menší jasně definované skupiny se vytváří tzv. subproteomy. Rozlišovací schopnost dvojrozměrné elektroforézy a dalších separačních metod je poměrně značná, v některých případech její teoretická hranice překračuje u některých bakterií i celkový počet otevřených čtecích rámců (genů kódujících proteiny). Nicméně reálné možnosti těchto separačních systémů jsou jiné. V první řadě, nikoli nezanedbatelný počet proteinů, se na gelu neobjeví prostě díky omezeným možnostem separační metody, jejich molární hmotnost nebo izoelektrický bod jsou mimo rozsah použitý v dané separaci, stejně jako řada z proteinů je velmi špatně rozpustná nebo vázaná na různé buněčné struktury a do elektroforetického gelového systému se nedostanou. V neposlední řadě častým důvodem, proč proteiny, které jsou v centru našeho zájmu, na gelech neuvidíme, je to, že se vyskytují v buňkách ve velmi nízké koncentraci. Obecně, velké rozdíly v koncentraci proteinů v buňkách jsou jedním ze zásadních problémů při analýze

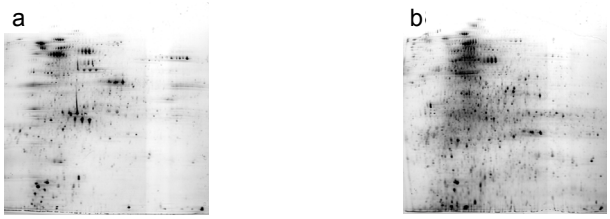
proteomů. Jedním z přístupů k jeho řešení, zejména při použití dvojrozměrné elektroforézy, je analýza tzv. subproteomů, kdy se množina proteinů, kterými se současně zabýváme, nějakým přesně definovaným způsobem zmenší[29,30]. Velmi často se k tomu využívají nejrůznější chromatografické techniky předřazené před dvojrozměrnou elektroforézu[31].

To vede nejen k výběru určité menší skupiny proteinů na základě některých jim společných vlastností, ale i k relativnímu zvýšení koncentrace proteinů vyskytujících se v buňkách často v malém množství. V následujících odstavcích se zmíníme o několika způsobech, jak takovéto subproteomy vytvářet a analyzovat. Je třeba zdůraznit, že řada těchto způsobů využívá kombinace některých z níže uvedených principů, a proto námi použité dělení je pouze orientační.

5.1. Buněčné frakce

Jedním z nejjednodušších způsobů, jak rozdělit buněčný materiál získaný po rozbití buněk, je separovat jej na subbuněčné frakce diferenciální centrifugací. Většinou je možné oddělit membránovou frakci a frakci rozpustných (cytoplazmatických) proteinů, která je zbavena všech částic sedimentujících při 30 000 × *g*. Podobnou technologii používáme při studiu potenciální signální funkce proteosyntetického elongačního faktoru EF-Tu vázaného na membrány u streptomycet (obr. 3). V tomto případě nejde o izolované membránové proteiny, ale o hrubou membránovou frakci obsahující řadu proteinů s membránami pouze asociovaných. U patogenních bakterií hrají membrány, vedle buněčné stěny, významnou roli v mechanismech virulence, jak bylo prokázáno v proteomových studiích u *Listeria monocytogenes*[32] a *Bartonella henselae*[33]. Studium subproteomů bakteriálních membrán vyžaduje řadu speciálních biochemických technik při přípravě proteinových vzorků, protože tyto proteiny jsou velmi často špatně rozpustné. Pro úspěšnou izolaci neexistuje žádná univerzální metoda a úspěch se většinou dostaví jako výsledek mnoha pokusů a omylů. Většinou jde o nalezení vhodné kombinace detergentů a denaturačních činidel[34,35].

Mimo rozdělení buněčných homogenátů na membrány a rozpustnou frakci je možné vyčlenit další subproteom, kterým je ribosomální frakce a s ní asociované proteiny[36]. Dávno před vznikem proteomiky byly ribosomální proteiny separovány ve dvojrozměrných elektroforetických systémech, založených ale na jiných principech než je O'Farellův systém[37], který je základem proteomických analýz. Rozvoj systému imobilizovaných pH gradientových (IPG) proužků dovolil i dělení silně basických proteinů, jakými je většina ribosomálních proteinů[36] a nahradil tak, v mnoha směrech nedokonalý, systém nerovnovážné dvojrozměrné elektroforézy[38].



Obr. 3. **Frakcionace proteinů *Streptomyces coelicolor* na membránový a cytoplazmatický proteom;** dvojrozměrná elektroforetická analýza membránového (a) a cytoplazmatického (b) proteomu. Dělení v prvním rozměru probíhalo na IPG proužcích s rozpětím pH 4-7 a proteiny byly obarveny stříbrem

5.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti

Dalším způsobem, jak rozdělit bohaté směsi buněčných proteinů, je využít jejich některých fyzikálněchemických vlastností. S výhodou je možné využít ty, na nichž je právě dvojrozměrná elektroforéza založena, tj. izoelektrického bodu a molekulové hmotnosti. Použití imobilizovaných pH gradientů (IPG) s malým rozmezím pH v prvním rozměru dělení dvojrozměrné elektroforézy dovoluje vytvořit sérii subproteomů pokrývajících celý rozsah pH, ve kterém se vyskytují izoeletrické body proteinů přítomných v buňkách. To opět vede k podstatnému snížení počtu proteinů při jednom dělení a k jejich relativnímu zkoncentrování[39]. Technika dospěla k tomu, že je možné v laboratoři připravit proužky IPG, které mají rozsah jedné jednotky pH a náklady na jejich výrobu jsou podstatně nižší než u komerčně dostupných.

Využití rozdílů v molekulových hmotnostech proteinů není zdaleka tak efektivní a mnohostranné jako v případě izoelektrických bodů, nicméně využití gradientových gelů SDS ve druhém rozměru dělení výrazným způsobem zlepšuje rozlišení na výsledných proteinových mapách.

5.3. Funkční nebo strukturní vlastnosti

Dělení (frakcionace), nebo spíše prefrakcionace buněčných proteinů na základě jejich funkčních nebo strukturních vlastností, je dalším způsobem, jak „zaostřit" experimentální postupy při vyhledávání a identifikaci určitých skupin proteinů. Velmi často se pro prefrakcionaci využívá schopnosti řady proteinů vázat nízkomolekulární ligandy. Tyto proteiny se pak dělí nejčastěji afinitní chromatografií, kdy je na matrici imobilizován samotný ligand nebo látka jeho vlastnosti napodobující. Těchto postupů se s výhodou využívá při izolaci GTP- nebo ATP-vazebných proteinů, či proteinů interagujících s DNA. Neméně důležitou vlastností proteinů je jejich schopnost interagovat s jinými proteiny. Informace o interakcích mezi proteiny významně napomáhají k objasnění jejich funkce a zároveň dovolují upřesnit jejich místo v buněčných regulačních schématech. Úspěch tzv. dvojhybridového systému vytvořeného u kvasinek pro identifikaci interakcí protein-protein vedl k tomu, že podobné systémy byly použity i u řady bakterií[41]. Aplikace těchto systémů na celé genomy pak dovoluje vytvořit interakční mapy pro kompletní proteomy u jednotlivých mikroorganismů.

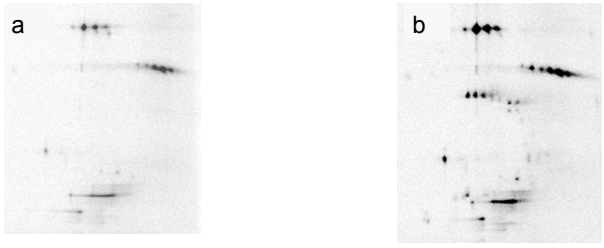
5.4. Posttranslační modifikace

Posttranslační modifikace regulují aktivity většiny proteinů u eukaryotních organismů a v poslední době se

ukazuje, že představují významný regulační mechanismus i u bakterií. Sekvenace řady bakteriálních genomů odhaluje u některých z nich přítomnost řady protein kinas, a to nejen jako součásti u prokaryot rozšířených, dvousložkových regulačních systémů, ale i kinas tzv. ekaryotního typu fosforylujících serinové, threoninové nebo tyrosinové zbytky[42,43].

V několika nedávno publikovaných proteomových studiích u *Streptomyces coelicolor* byla identifikována celá řada proteinů tvořících metabolické dráhy primárního i sekundárního metabolismu a ukázalo se, že poměr mezi počtem genů a proteinů je asi kolem 1,2, což naznačuje, že nezanedbatelná část proteinů prochází posttranslačními modifikacemi. S použitím hmotnostní spektrometrie byly demonstrovány příklady *N*-acetylací, adenylací a samozřejmě i fosforylací[44]. Techniky, které byly původně vyvinuty pro studium jednotlivých proteinů, je možno nyní systematicky aplikovat na celé populace proteinů a získat tak podstatně detailnější informace o jejich biologické funkci. Podstatným způsobem byly zlepšeny i techniky, které dovolují identifikovat a charakterizovat modifikační místa, sekvenovat peptidy, na kterých jsou lokalizována a s využitím metod značení stabilními izotopy pak i sledovat dynamiku vzniku modifikací[45]. Posttranslační modifikace hrají významnou roli v regulaci řady metabolických dějů u bakterií, a to jak v primárním nebo sekundárním metabolismu, tak i u mikrobiálních patogenů v mechanismech řídících jejich virulenci. V naší laboratoři se zabýváme studiem posttranslačních modifikací a zejména fosforylací EF-Tu a využíváme při tom analýzy kombinace dvou subproteomů – membránového proteomu a fosfoproteomu (obr. 4a). Při studiu fosforylačních aktivit v membránové frakci využíváme obohacení membránové proteinové frakce přidaným přečištěným elongačním faktorem Tu, což dovoluje zesílit fosforylační signál (obr. 4b). Ve spolupráci s laboratoří molekulární biologie patogenů jsme podobně analyzovali acylaci adenylátcyklasového toxinu u *Bordetella pertussis,* původce černého kašle, který zde představuje významný virulenční faktor[46].

Jako další příklad významu posttranslačních modifikací u patogenních bakterií je možné uvést fosforylace na tyrosinu u *Helicobacter pylori*, kde mnohočetné fosforylace proteinu CagA mohou ovlivňovat přenos signálů, a tak se účastnit rozvoje gastrického onemocnění způsobeného touto bakterií[47]. Separace nebo zvýraznění posttranslačně modifikovaných proteinů je tedy další cestou k vytvoření lépe analyzovatelných subproteomů.



Obr. 4. **Membránový fosfoproteom *Streptomyces coelicolor*;** fosforylační reakce s proteiny membránové frakce *S. coelicolor* a ATP jako donorem fosfátové skupiny probíhala *in vitro*. Proteiny byly v prvním rozměru separovány na proužcích IPG s rozpětím pH 4-7 a radioaktivně označené proteiny byly detegovány ve fosfo-imageru Fuji BAS5000. K membránové frakci (a) byl přidán přečištěný elongační faktor Tu jako potenciální substrát pro proteinkinasovou reakci (b)

6. Perspektivy – od expresních profilů k regulačním sítím a systémové biologii

V současné době, kdy se zdá být rozvoj proteomiky právě na vrcholu, se začíná rýsovat několik základních směrů v perspektivách dalšího směřování tohoto oboru. Začnou se totiž velmi brzy prolínat dvě základní koncepce proteomiky – popisná, přiřazující jednotlivé proteiny k příslušným genům, a kvantitativní, sledující dynamiku exprese genů v čase a prostoru. Zároveň se odděluje vysokokapacitní automatizovaná a robotizovaná proteomika, provozovaná zejména velkými biotechnologickými firmami a některými velkými a bohatými laboratořemi, od podstatně méně finančně a přístrojově náročné proteomiky v běžných akademických institucích, která se zabývá hlavně studiem fyziologicky jasně definovaných subproteomů. Zatímco průmysl hledá v proteomice rychlou návratnost velkých investic ve formě nových léčiv a diagnostických postupů, pro akademické instituce se otevírá obrovské množství možností využít v současnosti velmi rozvinuté proteomové technologie v menších přesně zacílených projektech, studujících nejrůznější dílčí biologické problémy a vyžadujících spíše než automatizované továrny na proteomy velkou dávku invence a kvalitní experimentální strategii při plánování experimentů.

Rychlý rozvoj bioinformatiky v posledních letech umožnil podstatně efektivnější zpracování obrovského množství proteomových dat, a tím rekonstrukci nebo modelování i velmi komplikovaných regulačních genových sítí[48,49]. Od nich je pak jen malý krok k naplnění obsahu a perspektiv nově vznikající biologické disciplíny, která nese název systémová biologie. Jejím hlavním cílem je pochopení konstrukce a řízení biologických procesů na systémové úrovni. Na rozdíl od klasické molekulární biologie, kde jsou studovány jednotlivé komponenty systému, jako jsou nukleové kyseliny, proteiny nebo metabolity, systémová biologie zkoumá organismy s využitím znalostí charakteristik jednotlivých jejich komponent a zaměřuje se na jejich dynamický vývoj a interakce[50,51].

Práce byla podpořena granty GA ČR 204/03/1014, 301/03/0292 a výzkumným záměrem AV0Z50200510.

LITERATURA

1. Collinsová M., Jiráček J.: Chem. Listy *98*, 1112 (2004).
2. Washburn M. P.,Yates J. R.: Curr. Opin. Microbiol. *3*, 292 (2000).

3. Cash P.: Electrophoresis *21*, 1187 (2000).
4. Cordwell S. J., Nouwens A. S., Walsh B. J.: Proteomics *1*, 461 (2001).
5. Jungblut P. R., Schaible U. E., Mollenkopf H. J., Zimny-Arndt U., Raupach B., Mattow J., Halada P., Lamer S., Hagens K., Kaufmann S. H.: Mol. Microbiol. *33*, 1103 (1999).
6. Havlasová J., Hernychová L., Halada P., Pellantová V., Krejsek J., Stulík J., Macela A., Jungblut P. R., Larsson P., Forsman M.: Proteomics *2*, 857 (2002).
7. Grifantini R., Bartolini E., Muzzi A., Draghi M., Frigimelica E., Berger J., Randazzo F., Grandi G.: Ann. N.Y. Acad. Sci. *975*, 202 (2002).
8. Grandi G.: Trends Biotechnol. *19*, 181 (2001).
9. Cash P., Argo E., Ford L., Lawrie L., McKenzie H.: Electrophoresis *20*, 2259 (1999).
10. Molloy M. P., Brzezinski E. E., Hang J., McDowell M. T., VanBogelen R. A.: Proteomics *3*, 1912 (2003).
11. VanBogelen R. A., Molloy M. P.: Proteomics *3*, 1833 (2003).
12. VanBogelen R. A.: Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. *83*, 27 (2003).
13. Gorg A.: *Proteomics: A Trends Guide* 2000, *2000,* 3.
14. Washburn M. ,Yates J.: Proteomics: A Trends Guide 2000, *2000*, 27.
15. Halada P. Řehulka P., Chmelík J.: Chem. Listy *99*, 922 (2005)
16. Vohradský J., Li X.-M., Dale G., Folcher M., Nguyen L., Viollier P. H., Thompson C. J.: J. Bacteriol. *182*, 4979 (2000).
17. Vohradský J., Li X. M., Thompson C. J.: Electrophoresis *18*, 1418 (1997).
18. Grunenfelder B., Rummel G., Vohradský J., Roder D., Langen H., Jenal U.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA *98*, 4681 (2001).
19. Li X. M., Novotná J., Vohradský J., Weiser J.: Appl. Microbiol. Biotechnol. *57*, 717 (2001).
20. Martin J. F., Demain A. L.: Microbiol. Rev. *44*, 230 (1980).
21. Vining L. C.: Biotechnology *28*, 1 (1995).
22. Novotná J., Vohradský J., Berndt P., Gramajo H., Langen H., Li X. M., Minas W., Orsaria L., Roeder D., Thompson C. J.: Mol. Microbiol. *48*, 1289 (2003).
23. Thompson C. J., Fink D., Nguyen L. D.: Genome Biol. *3*, 1020 (2002).
24. VanBogelen R. A., Schiller E. E., Thomas J. D., Neidhardt F. C.: Electrophoresis *20*, 2149 (1999).
25. VanBogelen R. A., Greis K. D., Blumenthal R. M., Tani T. H., Matthews R. G.: Trends Microbiol. *7*, 320 (1999).
26. Chater K. F.: Curr. Opin. Microbiol. *4*, 667 (2001).
27. Chater K. F.: Trends Genet. *5*, 372 (1989).
28. Nguyen L. D., Kalachová L., Novotná J., Holub M., Kofroňová O., Benada O., Thompson C. J., Weiser J.: Appl. Environ. Microbiol. *71*, 2848 (2005).
29. Cordwell S. J., Nouwens A. S., Verrills N. M., McPherson J. C., Hains P. G., Van Dyk D. D., Walsh B. J.: Electrophoresis *20*, 3580 (1999).
30. Stasyk T. ,Huber L. A.: Proteomics *4*, 3704 (2004).
31. Butt A., Davison M. D., Smith G. J., Young J. A., Gaskell S. J., Oliver S. G., Beynon R. J.: Proteomics *1*, 42 (2001).
32. Schaumburg J., Diekmann O., Hagendorff P., Bergmann S., Rohde M., Hammerschmidt S., Jansch L., Wehland J., Karst U.: Proteomics *4*, 2991 (2004).
33. Rhomberg T. A., Karlberg O., Mini T., Zimny-Arndt U., Wickenberg U., Rottgen M., Jungblut P. R., Jeno P., Andersson S. G. E., Dehio C.: Proteomics *4*, 3021 (2004).
34. Freiburghaus A. U.: Mol. Biotechnol. *2*, 281 (1994).
35. Molloy M. P., Herbert B. R., Walsh B. J., Tyler M. I., Traini M., Sanchez J. C., Hochstrasser D. F., Williams K. L., Gooley A. A.: Electrophoresis *19*, 837 (1998).
36. Fountoulakis M., Takacs B., Langen H.: Electrophoresis *19*, 761 (1998).
37. O'Farrell P. H.: J. Biol. Chem. *250*, 4007 (1975).
38. O'Farrell P. Z., Goodman H. M., O'Farrell P. H.: Cell *12*, 1133 (1977).
39. Cordwell S. J., Nouwens A. S., Verrills N. M., Basseal D. J., Walsh B. J.: Electrophoresis *21*, 1094 (2000).
40. Gorg A., Obermaier C., Boguth G., Weiss W.: Electrophoresis *20*, 712 (1999).
41. Frederickson R. M.: Curr. Opin. Biotechnol. *9*, 90 (1998).
42. Cozzone A. J.: Biochimie *80*, 43 (1998).
43. Umeyama T., Lee P. C., Horinouchi S.: Appl. Microbiol. Biotechnol. *59*, 419 (2002).
44. Hesketh A. R., Chandra G., Shaw A. D., Rowland J. J., Kell D. B., Bibb M. J., Chater K. F.: Mol. Microbiol. *46*, 917 (2002).
45. Mann M., Jensen O. N.: Nat. Biotechnol. *21*, 255 (2003).
46. Basar T., Havlíček V., Bezoušková S., Hackett M., Šebo P.: J. Biol. Chem. *276*, 348 (2001).
47. Backert S., Muller E. C., Jungblut P. R., Meyer T. F.: Proteomics *1*, 608 (2001).
48. Vohradský J.: FASEB J. *15*, 846 (2001).
49. Vohradský J.: J. Biol. Chem. *276*, 36168 (2001).
50. Kitano H.: Nature *420*, 206 (2002).
51. Kitano H.: Science *295*, 1662 (2002).

J. Weiser, M. Holub, Š. Nezbedová, and S. Bezoušková *(Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague):* **Proteomics Represents Complex Approach in Studies of Regulation of Bacterial Physiology**

This review deals with recent developments in complex molecular biology, which is moving from descriptive towards dynamic or quantitative proteomics, and its use as a tool in the studies of microbial physiology. It describes basic methodological strategies as well as examples of several projects where this approach is used in the studies of gene expression regulation in primary and secondary metabolism of industrially important bacteria.

Chem. Listy *99*, 896 – 905 (2005) Referáty

PROTEOLYTICKÉ ENZYMY: VÝZNAM PRO PROTEOMIKU

TAŤÁNA ŠTOSOVÁ[a], JAN HAVLIŠ[b], RENÉ LENOBEL[c] a MAREK ŠEBELA[a]

[a]Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, [b]Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, [c]Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého a Ústav experimentální botaniky AV ČR, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
sebela@prfholnt.upol.cz

Došlo 2.9.05, přijato 27.10.05.

Klíčová slova: peptid, peptidasa (proteasa), predikce štěpení, proteolýza, proteomika

Obsah

1. Úvod – proteolytické enzymy a jejich úloha v proteomice
2. Reakce katalyzovaná proteolytickými enzymy
3. Zdroje a klasifikace proteolytických enzymů
4. Stručný přehled vlastností vybraných enzymů
5. Trypsin a jeho výjimečné postavení v proteomice
6. Měření proteolytické aktivity
7. Počítačová predikce štěpných peptidů
8. Varianty procesu proteolýzy používané v proteomice
9. Modifikace proteolytických enzymů (modulace funkčnosti a termostability)
10. Závěr – perspektivy proteolýzy v moderní proteomice

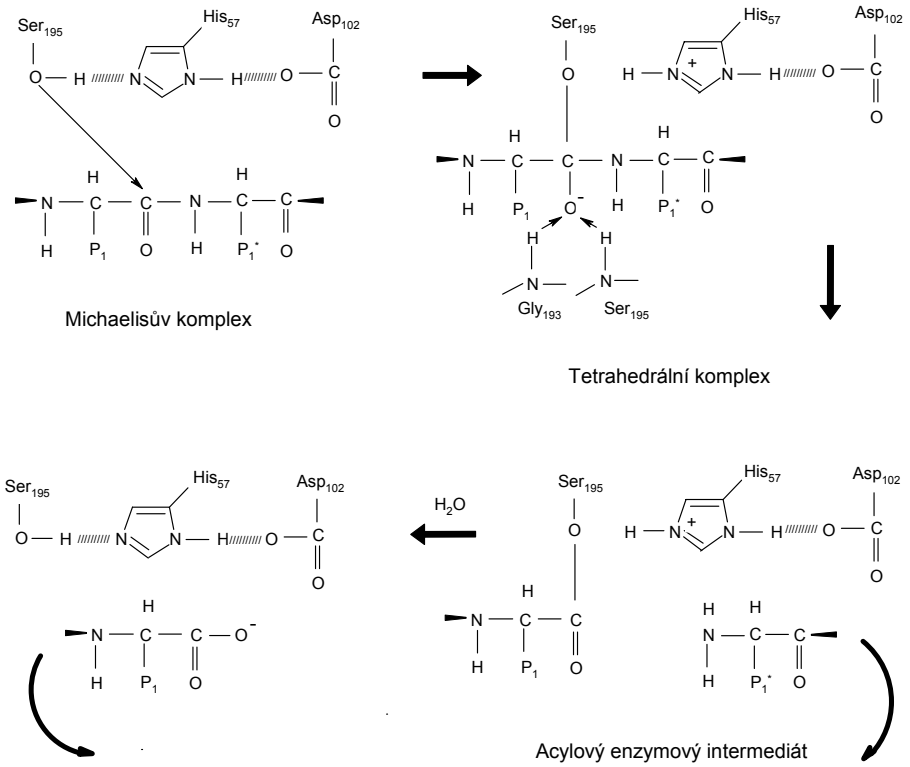
1. Úvod – proteolytické enzymy a jejich úloha v proteomice

Proteomika je vědecká disciplína, která zkoumá proteom, tedy soubor všech proteinů produkovaných určitou buňkou, tkání nebo organismem. Definuje rovněž vzájemné interakce těchto proteinů[1]. Využívá metod s vysokou výkonností (high throughput) jako jsou dvourozměrná (2D) elektroforéza, kapalinová chromatografie (LC) a hmotnostní spektrometrie (MS) s ionizací MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization tj. laserová desorpce a ionizace s účastí matrice) nebo ESI (electrospray ionization tj. ionizace elektrosprejem)[2]. S rozvojem instrumentace MS používané v proteomice se klíčovým stal způsob aplikace proteinového vzorku[1]. Nejběžnější strategie pro identifikaci proteinu vychází z jeho počátečního štěpení na peptidy, které se děje buď enzymovou nebo chemickou cestou. Molekulová hmotnost peptidových fragmentů se pak měří na hmotnostním spektrometru s vysokou přesností[3]. Proteolýza se již v rámci proteomiky stala rutinní záležitostí, neboť je komerčně dostupná celá řada enzymů, které lze volit a aplikovat na základě požadavků kladených na výslednou peptidovou směs. Nabízí několik praktických výhod: vysokou specifitu, minimalizované vedlejší reakce a dobrou účinnost štěpení[1]. Důležitá je přitom optimalizace složení a pH reakčního pufru, poměru enzym/substrát, teploty a doby inkubace. Ze všech dostupných proteolytických enzymů se v proteomice nejčastěji využívá trypsin. Má definovanou a poměrně úzkou substrátovou specifitu a poskytuje peptidy o velikosti vhodné pro MS analýzu, které mají navíc na *C*-konci zbytky bazických aminokyselin argininu a lysinu[1,4]. Pokud je třeba štěpit jiným enzymem, děje se tak zpravidla v omezeném množství případů. Příkladem může být studium posttranslačních modifikací proteinu (fosforylace, glykosylace aj.), neboť trypsinové štěpení nemusí vždy poskytovat peptidy o vhodné velikosti obsahující modifikované místo[1].

Chemické metody štěpení proteinů se používají pouze jako doplňkové, nejsou tedy tak běžné jako metody enzymové. Chemie nachází uplatnění zejména tam, kde není možné ve specifickém případě provádět proteolýzu[1]. Příkladem může být použití BrCN tj. bromkyanu pro štěpení ve vodě nerozpustných nebo membránových proteinů (specifické působení činidla na zbytky methioninu)[5]. Podobně můžeme pro štěpení zbytků tryptofanu využít BNPS-skatolu tj. 3-brom-3-methyl-2-[(2-nitrofenyl)merkapto]-3*H*-indolu[6]. Poměrně šetrná je hydrolýza proteinů zředěnou kyselinou mravenčí, která působí v místě zbytků kyseliny asparagové a zároveň je dobrým rozpouštědlem pro řadu proteinů[7].

2. Reakce katalyzovaná proteolytickými enzymy

Proteolytické enzymy katalyzují exergonní hydrolýzu peptidových vazeb v proteinech a peptidech (obr. 1). Synonymní název *proteasy* se používá od konce 19. století[8]. Kolem roku 1930 již bylo známo mnoho enzymů tohoto typu a nezávisle se vytvořily dva způsoby klasifikace. V Německu zavedli Grassmann a Dyckerhoff pojmy *proteinasa* a *peptidasa*[9]: proteinasa působí na proteiny, kdežto peptidasa na malé oligopeptidy. Příčina přednostního působení některých enzymů na malé peptidy byla vysvětlena při použití peptidových substrátů s blokovanými či volnými koncovými skupinami[8]. Ukázalo se, že proteinasy nevyžadují přítomnost volných konců substrátů. Naopak



Obr. 1. **Hydrolytické štěpení peptidové vazby trypsinem**; Upraveno podle textu Dunn B. M., v knize: *Proteolytic Enzymes. A Practical Approach* (Beynon R., Bond J. S., Eds.), str. 79, Oxford University Press, Oxford 2001. Na str. 80-84 lze v uvedené knize najít i reakční mechanismy ostatních typů peptidas

enzymy působící na krátké oligopeptidy vyžadují alespoň jeden konec volný – v blízkosti místa štěpení. Bergmann a Ross použili poprvé pojem *peptidasa* v širším slova smyslu, tedy pro všechny enzymy, které hydrolyzují peptidové vazby[10]. V závislosti na místě působení na polypeptidovém řetězci byly peptidasy rozděleny na dvě skupiny. První skupinu tvoří *endopeptidasy*, které katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb uvnitř řetězce a tvoří tak štěpné peptidy o rozmanité délce. Druhou skupinou jsou *exopeptidasy*, které katalyzují hydrolytické odštěpení koncové aminokyseliny. Mohou být proto klasifikovány jako *N*-koncové exopeptidasy (aminopeptidasy) nebo *C*-koncové exopeptidasy (karboxypeptidasy)[11,12]. Použití pojmu *peptidasa* (ekvivalentně *peptidhydrolasa*) v úzkém i širším slova smyslu se tak stalo zavádějícím. Podle doporučení International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB, Mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii) by měla být dána přednost používání v širším významu[8]. Pro enzymy působící na oligopeptidy (nikoli na celé proteiny) by se pak mělo užívat odvozených výrazů *exopeptidasa*, kde specifita vyžaduje volné koncové skupiny nebo *oligopeptidasa*, je-li specifita vázána na délku oligopeptidu (dipeptidasa, tripeptidasa apod.)[8].

3. Zdroje a klasifikace proteolytických enzymů

Nejběžnější endopeptidasy se získávají z orgánů trávicího traktu obratlovců (pankreas – elastasa, enterokinasa, chymotrypsin, trypsin; žaludek – pepsin), z krve (thrombin), sleziny (kathepsiny), rostlinného materiálu (bromelain, ficain, papain) či z kultur mikroorganismů (Glu-C, Pronase, subtilisin, thermolysin). Aminopeptidasy a karboxypeptidasy se izolují z pankreatu, rostlin a mikroorganismů[12].

Aktivní místo peptidasy se obvykle nachází v rýze na povrchu molekuly mezi dvěma přilehlými strukturními doménami[8]. Specifita enzymu je tak dána vlastnostmi vazebných míst umístěných podél rýhy u místa, kde probíhá hydrolýza peptidové vazby[8]. Při postupném zohledňování aktuálních poznatků o podstatě katalytického místa se nakonec ustálily čtyři charakteristické skupiny peptidas: serinové, cysteinové (thiolové), aspartátové a dále peptidasy obsahující kovový ion jako kofaktor[8,13]. K nim pak nedávno přibyla skupina threoninových peptidas[14]. Tato v podstatě již historická klasifikace se dodnes objevuje v tzv. systému EC, na němž je založeno názvosloví enzymů[8]. Pro diskusi evolučních a strukturních vztahů mezi

Tabulka I
Klasifikace proteolytických enzymů v Enzyme Nomenclature[17,18].
Endopeptidasy s dosud neznámým mechanismem katalýzy tvoří podpodtřídu EC 3.4.99.

Podpodtřída	Souhrnný název	Typický příklad	Poznámka
EC 3.4.11	aminopeptidasy	leucylaminopeptidasa, EC 3.4.11.1	zahrnuje i bývalé EC 3.4.1
EC 3.4.13	dipeptidasy	Glu-Glu dipeptidasa, EC 3.4.13.7	zahrnuje i bývalé EC 3.4.3
EC 3.4.14	dipeptidylpeptidasy, tripeptidyl-peptidasy	dipeptidyldipeptidasa I, EC 3.4.14.1	zahrnuje i bývalé EC 3.4.4
EC 3.4.15	peptidyldipeptidasy	peptidyldipeptidasa A, EC 3.4.15.1	
EC 3.4.16	serinové karboxypeptidasy	karboxypeptidasa C, EC 3.4.16.5	zahrnuje i bývalé EC 3.4.12
EC 3.4.17	metalokarboxypeptidasy	karboxypeptidasa A, EC 3.4.17.1	zahrnuje i bývalé EC 3.4.2, EC 3.4.12
EC 3.4.18	cysteinové karboxypeptidasy	kathepsin X, EC 3.4.18.1	
EC 3.4.19	ω-peptidasy	pyroglutamylpeptidasa I, EC 3.4.19.3	zahrnuje i bývalé EC 3.4.12
EC 3.4.21	serinové endopeptidasy	trypsin, EC 3.4.21.4	
EC 3.4.22	cysteinové endopeptidasy	papain, EC 3.4.22.2	zahrnuje i bývalé EC 3.4.4
EC 3.4.23	aspartátové endopeptidasy	pepsin A, EC 3.4.23.1	zahrnuje i bývalé EC 3.4.4
EC 3.4.24	metaloendopeptidasy	thermolysin, EC 3.4.24.27	zahrnuje i bývalé EC 3.4.4
EC 3.4.25	threoninové endopeptidasy	komplex endoproteinas proteasomu, EC 3.4.25.1	

peptidasami je důležitý princip homologie, tedy zjišťování podobnosti, která není náhodná, na základě porovnání (alignment) aminokyselinových sekvencí[15]. Vyčerpávající informace o peptidasách a jejich proteinových inhibitorech jsou k dispozici v databázi MEROPS, která je přístupná on-line na http://merops.sanger.ac.uk/ (cit.[16]).

Proteolytické enzymy jsou v katalogu Enzyme Nomenclature[17], který aktualizuje a vydává názvoslovný výbor při IUBMB, klasifikovány jako součást třídy 3-hydrolasy (celkem je šest enzymových tříd). Peptidasy tvoří podtřídu 3.4-hydrolasy působící na peptidové vazby. V rámci této podtřídy pak rozlišujeme celou řadu podpodtříd (tabulka I). Katalog enzymů v hypertextové formě s odkazy na další specializované webové stránky a databáze je k dispozici na internetu, http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/. Katalog je vydáván knižně[17] a aktualizován dodatky[18]. Při srovnání způsobu klasifikace ostatních enzymů na jedné straně a peptidas na straně druhé nalezneme jednu významnou odlišnost[8]. Rozdílné proteiny jsou klasifikovány jako jeden a týž enzym, katalyzují-li stejnou reakci. Na základě popisu této reakce pak můžeme enzym snadno pojmenovat. Pokud jediný enzymový protein katalyzuje několik reakcí, může mít přiřazeno i více EC čísel. Pro peptidasy byl zvolen odlišný přístup, neboť v základním principu je reakce, kterou katalyzují, všeobecně shodná. Specifita se samozřejmě liší, ale i když je známa, je prakticky nemožné z ní vyvodit jednoduché pojmenování. Závisí totiž nejen na charakteru aminokyselinových zbytků okolo štěpného místa, ale i na konformaci polypeptidového řetězce substrátu[8]. Využívá se proto klasifikace podle typu katalytického místa na základě experimentů s inhibitory[8]. Nadto jsou odlišeny i peptidasy z různých zdrojů, které jinak vykazují obdobnou nebo identickou specifitu: např. elastasa z pankreatu (EC 3.4.21.36) a elastasa z leukocytů (EC 3.4.21.37).

4. Stručný přehled vlastností vybraných enzymů

V proteomice nacházejí uplatnění zejména endopeptidasy používané k přípravě peptidových směsí a následné MS analýze peptidů (tabulka II)[1,12]. Svůj význam však mají i karboxypeptidasy a aminopeptidasy, které se využívají pro tzv. žebříčkové sekvencování (ladder sequencing) a při analýze posttranslačních modifikací proteinů[19–22]. Po endopeptidasovém štěpení proteinového vzorku následuje postupné štěpení exopeptidasou z *C*- nebo *N*-konce. Jsou generovány série peptidů (ladders), ve kterých se každá komponenta liší od té následující o jeden aminokyselinový zbytek. Tyto peptidy jsou analyzovány metodou MS a na základě hmotnostních rozdílů mezi po sobě následujícími proteolytickými fragmenty je pak určena aminokyselinová sekvence. Celý proces vede k identifikaci místa modifikace.

Trypsin (EC 3.4.21.4) je serinová endopeptidasa trávicího traktu obratlovců s mírně alkalickým optimálním

Tabulka II
Proteolytické enzymy běžně používané v proteomice[1,12,17,18]

Enzym	Místo štěpení	Výjimka	Rozsah pH
Trypsin	*C*-konec R-X, K-X	X = P	7,0–9,0
Chymotrypsin	*C*-konec F-, Y-, W-, L-, I-, V- a M-X	X = P	7,5–8,5
Endoproteinasa Glu-C (V8-DE)	*C*-konec E-X, D-X	X = P	4,0–8,0
Endoproteinasa Lys-C	*C*-konec K-X	(X = P)	8,5–8,8
Endoproteinasa Arg-C	*C*-konec R-X	(X = P)	7,5–8,5
Endoproteinasa Asp-N	*N*-konec X-D, X-E		6,0–8,5
Elastasa	*C*-konec A, V, L, I, G, S		8,5
Pepsin	F, M, L, W (zvl. F-L, F-F, F-Y)		2–4
Pronase	směs endo- a exoproteinas, štěpí téměř všechny peptidové vazby		7,0–8,0 [a]
Subtilisin	široká specifita, pref. *C*-konec nenabité aminokyseliny		7,0–11,0
Thermolysin	široká specifita (W, Y, F, I, L, V, A, M), převážně *N*-konec X-F, X-L		6,0–10,0

[a] V závislosti na povaze směsi

pH a striktní specifitou pro zbytky lysinu a argininu. Trypsin je z pankreatu vylučován do dvanáctníku ve formě inaktivního prekurzoru trypsinogenu[23]. Hovězí trypsinogen má relativní molekulovou hmotnost 24 000 a p*I* 9,4. Aktivuje se odštěpením *N*-koncového hexapeptidu působením enterokinasy a kaskádovitě pak autolýzou[12]. Vzniká β-trypsin s jedním polypeptidovým řetězcem (223 aminokyselin; M_r = 23 300; p*I* 10,5)[12,24], který podléhá další autolýze za vzniku víceřetězcových produktů (řetězce spojeny disulfidovými vazbami) – α-trypsinu (2 řetězce) a pseudotrypsinu (3 řetězce). Pseudotrypsin se svou specifitou štěpení blíží chymotrypsinu[25]. Trypsin obsahuje 101 aminokyselin ve stejných polohách jako v sekvenci chymotrypsinu (41 %)[12,23].

Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) ve skutečnosti představuje skupinu strukturně a katalyticky příbuzných serinových endopeptidas (optimum pH ~ 7,0–9,0)[12]. Extrakt z hovězího pankreatu obsahuje dvě formy zymogenu: chymotrypsinogen A (245 aminokyselin; M_r = 25 700; p*I* 9,1) a chymotrypsinogen B (248 aminokyselin; M_r = 25 800; p*I* 5,2)[12]. Aktivace zymogenů se účastní trypsin, zčásti je autokatalytická. V závislosti na podmínkách mohou z chymotrypsinogenu A vznikat π-, α-, δ-, β- nebo γ-chymotrypsin[12]. Specifita štěpení je na rozdíl od trypsinu nízká[26], preferuje aromatické aminokyseliny (tabulka II).

Elastasa (EC 3.4.21.36) je serinová endopeptidasa (240 aminokyselin; M_r = 25 700). Inaktivní prekurzor proelastasa se tvoří v pankreatu a je aktivován trypsinem. Vykazuje homologii s trypsinem i chymotrypsinem, zejména pokud jde o důležité katalytické aminokyseliny. Specifita štěpení zahrnuje nepolární nearomatické zbytky (tabulka II), optimum pH je 8,0–8,5 (cit.[12]).

Pepsin je kyselá aspartátová endopeptidasa (maximální aktivita při pH 1,0–2,0), která je hlavním enzymem žaludeční šťávy obratlovců[12]. Majoritní složkou je pepsin A (EC 3.4.23.1) s relativní molekulovou hmotností 34 500 (327 aminokyselin). V žaludeční sliznici se tvoří jako inaktivní pepsinogen (M_r = 42 500). Aktivace zymogenu je autokatalytická v přítomnosti HCl (cit.[12]). Minoritní pepsiny jsou klasifikovány jako pepsin B (gelatinasa, EC 3.4.23.2) a pepsin C (gastriksin, EC 3.4.23.3), tvoří se z vlastních zymogenů. Specifita štěpení (tabulka II) zahrnuje hydrofobní zbytky, zvláště aromatické[12].

Subtilisiny (EC 3.4.21.62) představují širokou skupinu extracelulárních serinových endopeptidas (optimum pH ~ 10,0) s vysokou termostabilitou, které jsou produkovány baktériemi rodu *Bacillus*[27]. Nejznámnější jsou subtilisin typ Carlsberg a subtilisin BPN´ (shodný s preparátem Novo, též Nagarse) z *B. subtilis* respektive *B. amyloquefaciens*. Jsou to strukturně velmi podobné enzymy tvořené jediným polypetidovým řetězcem, který čítá 274 (Carlsberg) nebo 275 aminokyselinových zbytků (BPN´). Relativní molekulová hmotnost činí zhruba 27 500, specifita štěpení je nízká. Existuje jistá preference pro velký nenabitý zbytek u štěpené peptidové vazby substrátu[27].

Thermolysin (EC 3.4.24.27) je termostabilní neutrální metaloendopeptidasa z *Bacillus thermoproteolyticus* (316 aminokyselin; M_r = 37 500). Molekula obsahuje ion Zn^{2+} a 3 ionty Ca^{2+}, vápník přispívá k termostabilitě[28]. Zhruba 50 % aktivity přetrvá hodinovou inkubaci při 80 °C (cit.[12]). Jeho specifita není vyhraněná (tabulka II), podobně jako u subtilisinu lze rozeznat jistou preferenci[28].

Streptomyces griseus slouží k produkci komerčního produktu s obchodní značkou Pronase[12]. Jde o filtrát z kultury zmíněné streptomycety, který obsahuje směs proteolytických enzymů (např. SG-trypsin, proteasu A

a B)[29]. Významnou složkou je i serinová endopeptidasa, která preferenčně štěpí u karboxylu kyseliny glutamové. Označuje se jako proteasa E (188 aminokyselin; M_r = 20 000)[29].

Serinová endopeptidasa Glu-C (též Protease V8, EC 3.4.21.19) je produktem bakterie *Staphylococcus aureus* V8. Štěpí peptidové vazby na *C*-konci kyseliny glutamové případně kyseliny asparagové (u Asp ve srovnání s Glu až 3000× pomaleji, optimum pH ~ 8,0)[30]. Sekvence má 268 aminokyselin (M_r = 30 000), tvoří se z prekurzoru (336 aminokyselin; M_r = 36 300)[31]. Endopeptidasa Lys-C (EC 3.4.21.50) z *Lysobacter enzymogenes* rovněž obsahuje katalytický serin (269 aminokyselin; M_r = 28 000). V rozmezí pH 7,0–9,0 štěpí peptidové vazby na *C*-konci lysinu[32,33]. Thiolová endopeptidasa Arg-C z *Clostridium histolyticum* (clostripain, EC 3.4.22.8) je heterodimer (526 aminokyselin; M_r = 59 600)[34]. Serinová endopeptidasa Arg-C (EC 3.4.21.-) z *Lysobacter enzymogenes* je monomer (M_r = 26 000)[35]. Oba enzymy štěpí specificky u argininového karboxylu (optimum pH ~ 7,5). Enzym Asp-N (EC 3.4.24.33) z *Pseudomonas fragi* je metaloendopeptidasa (M_r = 27 000)[36], která štěpí peptidové vazby na *N*-konci kyseliny asparagové nebo cysteové v rozmezí pH 6,0–8,0 (cit.[37]).

Nejznámější metalokarboxypeptidasy jsou karboxypeptidasy A a B, které se liší štěpením aminokyselin z *C*-konce substrátů[12]. Karboxypeptidasa A (EC 3.4.17.1) preferenčně štěpí aminokyseliny s aromatickým nebo rozvětveným postranním řetězcem. Naproti tomu karboxypeptidasa B (protaminasa, EC 3.4.17.2) preferenčně odštěpuje lysin a arginin[12]. Karboxypeptidasa Y (též karboxypeptidasa C, EC 3.4.16.5) je serinová exopeptidasa. Enzym z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (M_r = 60 000) má optimum pH při 4,5–6,0 (cit.[38]). Má širokou specifitu a uvolňuje z *C*-konce proteinů a peptidů aminokyselinové zbytky včetně prolinu, u glycinu a kyseliny asparagové je uvolňování významně zpomaleno[17].

5. Trypsin a jeho výjimečné postavení v proteomice

Rychlý vývoj genomiky přinesl generování objemných databází, které zahrnují nejen fragmenty DNA, ale i celé genomy. Úspěch strategie identifikace proteinů v proteomice spoléhá na výskyt hledané proteinové sekvence v takové databázi[1,3]. U organismů s dosud neznámým genomem je pomůckou *de novo* sekvencování peptidů a předpoklad homologie (vyhledávání typu MS Blast (cit.[39]) nebo MultiTag (cit.[40])). Pro štěpení proteinů v roztoku se využívají endopeptidasy uvedené v tabulce II, případně některé další enzymy (proteinasa K, cit.[41]). Pokud provádíme štěpení v polyakrylamidovém gelu, jedním z limitujících faktorů difuze peptidasy k substrátu je velikost její molekuly. Pro 12% polyakrylamidový gel, který je standardně používán k přípravě proteinového vzorku pro MS analýzu[42], byla odvozena zdánlivá velikost pórů 20 až 30 Å (cit.[43]). Molekula β-trypsinu má včetně solvatačního obalu rozměry menší (17 Å)[44]. Pro větší molekuly peptidas je difuzi bráněno ze sterických důvodů, případně je zcela znemožněna. K dalším výhodám použití trypsinu v proteomice patří jeho striktní substrátová specifita daná konfigurací aktivního místa (obr. 1), která poskytuje přiměřené množství definovaných peptidových fragmentů o příznivé ionizovatelnosti a velikosti pro MS analýzu[1]. Ostatně, výhodné je i optimum pH trypsinu, které umožňuje práci s levným těkavým pufrem na bázi hydrogenuhličitanu amonného (pH 7,8)[4].

Používání trypsinu je rozšířeno o protokoly s ostatními peptidasami. Většinou nejde o rutinní peptidové mapování, ale o analýzu specifických vlastností proteinů. Chymotrypsin někdy nahrazuje či doplňuje trypsin pro působení v roztoku i gelu[45,46]. Vzhledem k velikosti molekuly je pro štěpení proteinů v gelu vhodná i elastasa, např. při lokalizaci fosforylačních míst[47]. Při studiu glykosylace se uplatnily peptidasy Glu-C a Asp-N (cit.[48]). Použití Glu-C, Lys-C, případně thermolysinu se osvědčilo při analýze peptidů s disulfidovými vazbami[49]. Peptidasy Asp-N, Arg-C, Glu-C a Lys C jsou díky striktní specifitě výhodné pro peptidové mapování. S ohledem na velikost molekuly mohou být použity i v gelu[33,50,51]. Aplikace Pronasy je vázána na analýzu proteinových modifikací – posttranslačních[52] či vyvolaných působením chemických látek[53]. Enzym totiž poskytuje pouze krátké peptidy (2–8 aminokyselin)[52] a pro peptidové mapování je tak nevhodný. Pepsin nebo i jiné peptidasy s kyselým optimem pH se využívají zejména při MS detekci strukturních změn v proteinech na základě izotopové výměny vodík/deuterium[54,55]. Kyselé prostředí je důležité z toho důvodu, aby k proteolýze docházelo za podmínek, kdy je izotopová výměna pomalá. Pepsin byl použit i pro štěpení v gelu při analýze *O*-glykosylace proteinu[56].

Jinými limitujícími faktory použití peptidas v proteomové analýze jsou doba nutná k dostatečné proteolýze vzorku a rezistence některých proteinů vůči štěpení (např. kompaktních globulinů). Použití trypsinu obvykle vyžaduje dobu inkubace 4–24 h, pro některé proteiny je ale i tak neúčinný[57]. Průběh štěpení je primárně závislý na mobilitě struktury substrátu, kterou je možné ovlivňovat přítomností denaturačních činidel nebo teplotou[58,59]. Za zvýšené teploty lze využít termofilních peptidas: thermolysin poskytuje významné množství analyzovatelných peptidových fragmentů již během krátké inkubace při 65 °C (15 min). Specifita štěpení thermolysinu je při této teplotě mnohem vyšší než za běžných teplot[57]. Pro proteiny náchylné k proteolýze (např. myoglobin) je efekt thermolysinu za zvýšené teploty extrémně rychlý a peptidové fragmenty je tak možné získat přímo na destičce MALDI [57].

6. Měření proteolytické aktivity

Měřítkem aktivity endopeptidas je množství štěpných peptidů uvolněných za určitý časový interval. Absolutní kvantifikace štěpných peptidů např. hmotnostní spektro-

metrií je však obtížná a časově náročná[60]. Pro štěpení v gelu je stanovení dále zatíženo výraznou statistickou chybou související se sterickým stíněním štěpných míst[60]. Nejstarší metody měření aktivity jsou založeny na spektrofotometrickém stanovení peptidů v reakční směsi po vysrážení a odstranění nezreagovaného proteinového substrátu. Ansonova metoda využívá hemoglobinu jako substrátu a štěpné peptidy (obsahující Tyr) se stanovují fenolovým činidlem[61]. Kunitzova metoda je založena na štěpení kaseinu, absorpce uvolněných peptidů (s obsahem Tyr a Trp) se měří při 280 nm (cit.[62]). S rozvojem chemie peptidů se začaly více uplatňovat syntetické substráty. Jejich štěpení endo- či exopeptidasou má nejčastěji za následek uvolnění chromoforu (existují však i rozmanité fluorogenní substráty), který se měří spektrofotometricky při odpovídající vlnové délce. Pro trypsin jsou k dispozici ethylester N^{α}-benzoyl-L-argininu (BAEE) nebo N^{α}-benzoyl-DL--arginin-4-nitroanilid (BAPNA)[63]. V prvním případě se sleduje nárůst absorpce při 253 nm, ve druhém případě při 405 nm. Jako substrát pro chymotrypsin se používá ethylester *N*-benzoyl-L-tyrosinu (BTEE); měří se při 256 nm (cit.[64]). Vhodným substrátem pro pepsin je oktapeptid Lys--Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO_2)-Ala-Leu (monitorování při 300 nm)[65]. Aktivitu peptidas specifických pro kyselinu glutamovou (např. SGPE ze *Streptomyces griseus*) lze určit s použitím substrátu Z-Glu-NH-C_6H_4-NO_2 (410 nm)[29]. Aktivitu nespecifického subtilisinu lze rutinně stanovit s použitím řady substrátů, zmínit lze např. *N*-sukcinyl-L-Ala-L--Ala-L-Pro-L-Phe-4-nitroanilid[27]. Substrátem pro karboxypeptidasu A je např. Bz-Gly-Gly-L-α-hydroxy-β-fenyllaktát (monitorování při 254 nm)[66].

7. Počítačová predikce štěpných peptidů

Zásadní význam pro identifikaci proteinů metodou MS má predikce (předpověď), jaké peptidy vzniknou proteolytickým štěpením proteinů. Metodologie identifikace proteinů je založena buď na principu tzv. map molekulových hmotností peptidů (peptide mass mapping či peptide mass fingerprinting) nebo na principu identifikace úplné či částečné sekvence (sequence tag)[67–69]. Oba tyto přístupy jsou závislé na srovnání experimentálně získaných dat s předpověděnými. V prvním případě jde o srovnání experimentálně získaného souboru molekulových hmotností peptidů nebo souboru molekulových hmotností iontů fragmentů vzniklých z prekurzorového iontu s příslušnými předpověděnými soubory. V druhém případě se pak srovnává experimentálně zjištěná úplná nebo částečně interpretovaná aminokyselinová sekvence s jejich předpověďmi. Soubory dat se vždy předpovídají s ohledem na experimentální podmínky. Základem takové předpovědi jsou sekvence v kompozitních neredundantních databázích[70] (např. OWL, NRDB, viz níže). Následně, při procesu zvaném štěpení *in silico*, se na takto získané sekvence aplikuje algoritmus, který nahrazuje štěpení enzymem. Tento proces generuje soubor peptidových sekvencí a jejich molekulových hmotností, a to buď ve formě jejich hmotností monoizotopických nebo monoizotopických s adicí protonu (zohledňuje produkty vzniklé ionizací). Soubor by měl obsahovat i takové sekvence, které obsahují nedokonale štěpené úseky (miscleavage sites), vzniklé blokováním daného štěpného místa pro peptidasu sterickým uspořádáním. Jejich počet nastavuje uživatel; běžně se užívá generování peptidů obsahujících jeden až dva nedokonale štěpené úseky, pro volbu více než dvou musejí být zásadní důvody. To proto, že soubor proteolytických štěpů musí být pro následné srovnání s experimentálními daty co nejstručnější, jinak je ohroženo správné statistické vyhodnocení shody[71]. Dalšími položkami v souboru jsou peptidové sekvence obsahující modifikované aminokyseliny. Může jít o modifikace přirozené – např. fosforylace, záměrné – např. alkylace cysteinu, nebo o modifikace vzniklé v průběhu přípravy vzorku – např. oxidace methioninu nebo tryptofanu. Opět platí, že vnesením příliš mnoha modifikačních parametrů (> 2) se vzniklý soubor nadbytečně komplikuje. Co proces generování štěpných peptidů nemůže zohledňovat, to jsou posttranslační úpravy jako například alternativní sestřih.

Existuje mnoho volně i komerčně dostupných programů, které umožňují identifikaci proteinů na základě předpovězených proteolytických štěpů a statistické vyhodnocení shody. Odlišnosti jsou převážně v metodách vyhodnocení: http://umber.sbs.man.ac.uk/dbbrowser/OWL/, http://www.ebi.ac.uk/~holm/nrdb90/, http://prospector.ucsf.edu/, http://www.matrixscience.com/, http://www.expasy.org/tools/, http://prowl.rockefeller.edu/, http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptidesearchpage.html, http://vigen.biochem.vt.edu/protein_prospector/ucsfhtml4.0/instruct/fitman.htm#scoring.

8. Varianty procesu proteolýzy používané v proteomice

Původně se trypsin v proteomové analýze používal pro rozložení vzorku na štěpné produkty, které usnadňovaly či vůbec umožňovaly analýzu[72]. S nástupem peptidového mapování a proteomiky s použitím MS se ukázalo, že štěpení proteinů trypsinem (zkráceně trypsinace) musí splňovat určité podmínky dané povahou metodiky analýzy. Jde především o maximální výtěžek a úplnost štěpení (co největší počet peptidů vzniklých trypsinací daného proteinu a přitom experimentálně zjistitelných z jejich předpověděného počtu pozitivně ovlivňuje statistické skóre při vyhodnocení identifikace), minimalizace autolýzy trypsinu a opakovatelnost map molekulových hmotností peptidových štěpů[60]. Proces proteolytického štěpení v roztoku obsahuje z toho důvodu určitý poměr enzym/substrát (např. 1:50 až 1:5)[60]. Provádí se i redukce disulfidových vazeb dithiothreitolem a alkylace reaktivních cysteinů jodacetamidem, avšak jen je-li to nutné[73]. Štěpení trypsinem běžně probíhá 12 h při 37 °C, použitím methylovaného trypsinu při 58 °C lze dobu štěpení zkrátit na 30 min (cit.[4,60]).

Podstatně větší význam pro proteomiku má analýza proteinů separovaných v polyakrylamidových gelech[74]. Proteolýza v gelu je sice komplikována přítomností polyakrylamidové matrice, do které musí trypsin proniknout, na druhou stranu je usnadněna manipulace se vzorkem, např. při odstraňování produktů alkylace cysteinu. Po vyvolání barvením pomocí modři Coomassie[74] nebo stříbrem[42] jsou proteinové pásy vyříznuty s minimem neobarvených okrajů. Tyto části jsou potom dále nařezány na kostičky o velikosti cca 1 mm^3. Kvůli manipulaci se nedoporučují menší fragmenty (ucpávání špičky mikropipety). Následuje odbarvení, dehydratace acetonitrilem a vysušení. Gel je pak rehydratován roztokem trypsinu (1,5 μM) v 50 mM uhličitanu amonném při 4 °C, přičemž délka rehydratace určuje výtěžek enzymového štěpení[4]. Štěpení se provádí 12 h při 37 °C (je-li použit methylovaný trypsin, štěpí se 30 min při 58 °C) [4,60]. Postup lze rozšířit o redukci a alkylaci, jak již bylo uvedeno výše.

Proteolytické štěpení vzorku na membránách po přenosu z gelu metodou Western blotting se s nástupem proteomiky využívající MS začalo provádět dříve než přímá trypsinace proteinů v gelech[75]. V běžném postupu OMD (on-membrane digestion) se pracuje s poly(vinylidendifluoridovou) tedy PVDF membránou, která je po přenosu obarvena roztokem amidočerni[76]. Vyříznuté kousky membrány se odbarví zředěným methanolem a vysuší. Potom se přidá roztok trypsinu v uhličitanu amonném s 30% obsahem acetonitrilu a pokračuje se inkubací 12 h při laboratorní teplotě. Následuje odebrání horní vrstvy a extrakce peptidů. Spojený materiál se vysuší ve vakuovém koncentrátoru a suspenduje ve vhodném rozpouštědle pro následnou MS analýzu[76]. Inovací klasického postupu je tzv. proces jednostupňového štěpení a přenosu (OSDT, one-step digestion-transfer)[76]. OSDT se provádí při laboratorní teplotě ve speciálním zařízení po dobu 12–18 h. Používá se komerčně dostupná membrána Immobilon-AV (IAV), což je PVDF membrána s aktivovanými karboxyskupinami pro vazbu proteinů nebo peptidů. Přenosový/štěpící sendvič se skládá z dvojité vrstvy membrány IAV imobilizovaným trypsinem vložené mezi polyakrylamidový gel a PVDF membránu (sběrná plocha pro uvolněné peptidy)[76].

Princip štěpení vzorku trypsinem imobilizovaným na membráně je zdokonalen při on-line proteolýze v mikrokolonách/reaktorech, a to v souvislosti s nahrazováním klasické 2D elektroforézy vícerozměrnou chromatografií (MDC, multidimensional chromatography)[77]. Štěpení se provádí ve vodných roztocích[78] nebo ve směsi s mísitelnou organickou fází[79]. Získané peptidy se buď přímo analyzují metodou MS nebo dále separují. Pro přímé spojení štěpení s nanoESI-MS analýzou bylo též popsáno nano-zařízení s trypsinem ukotveným na membráně[80]. Zajímavou možností je rychlé štěpení trypsinem ukotveným na destičce MALDI (on-probe digestion). Jeho nevýhodou je nutnost vysoké koncentrace trypsinu a tím i zvýšená kontaminace autolytickými produkty[81]. Srovnání účinnosti štěpení trypsinem v roztoku a imobilizovaným trypsinem je shrnuto v cit.[82].

9. Modifikace proteolytických enzymů (modulace funkčnosti a termostability)

Modulační modifikace se týkají především dostupného trypsinu (i když třeba i chymotrypsinu), jehož zásadní použití v proteomice je omezeno dvěma komplikacemi. Enzym má poměrně malou termostabilitu – k jeho výrazné inaktivaci dochází již při 37 °C (30% pokles aktivity po půlhodinové inkubaci)[4]. V podmínkách optimální funkčnosti trypsinu (mírně alkalické pH) a v nepřítomnosti stabilizujících iontů Ca^{2+} probíhá navíc rychlá autolýza[83]. Autolytické peptidy představují rušivé pozadí při MS analýze směsi štěpných peptidů (digestu). Vzhledem ke specifitě štěpení (tabulka II) je možné autolýzu eliminovat kovalentní modifikací zbytků lysinu a argininu v molekule trypsinu[83,84]. Nejjednodušším postupem je alkylace nebo acylace lysinu[83–86]. Připravené deriváty, např. methylovaný[83], resp. acetylovaný[85] nebo sukcinylovaný[86] trypsin, vykazují podstatně vyšší rezistenci vůči autolýze než samotný trypsin. Acetamidinací lze docílit zachování kladného náboje původního zbytku[84]. Reakcí trypsinu s 1-guanyl-3,5-dimethylpyrazolem vzniká stabilní guanylovaný trypsin[86]. Argininové zbytky v proteinech se kvůli své značné bazicitě alkylují nebo acylují obtížně. Pro trypsin byla popsána jejich modifikace reakcí s biacetylem[84].

Již methylovaný trypsin je ve srovnání s nemodifikovaným enzymem odolnější vůči vyšším teplotám[4]. Enzym byl též stabilizován nitrací povrchových tyrosinových zbytků a jejich následnou redukcí na aminotyrosin[87]. K obdobné stabilizaci vedla acylace α-chymotrypsinu reakcí s anhydridy aromatických karboxylových kyselin[87]. Výrazné rezistence vůči tepelné inaktivaci lze dosáhnout vytvářením konjugátů s oligo- a polymery. Za zmínku stojí modifikace lineárními oligosacharidy[88] či cyklodextriny[89]. Cyklodextrinové konjugáty trypsinu byly připraveny enzymovou metodou s transglutaminasou[89]. V případě polymerů je ovšem výsledkem rozměrná molekula, která sice může katalyticky působit v roztoku, ale je nepoužitelná pro štěpení v gelu. V literatuře lze najít zmínky o konjugátech trypsinu např. s poly(*N*-isopropylakrylamidem)[90], methoxypolyethylenglykolem[91], polymery sacharosy[63] a karboxymethylcelulosou[92]. Naše skupina se zabývá konjugáty hovězího trypsinu s oligosacharidy a jejich testováním pro štěpení v gelu při peptidovém mapování (MALDI-MS)[93]. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím rafinosy, maltotriosy a stachyosy (pro reakci aktivovány oxidací jodistanem). Příslušné modifikované trypsiny vykazují vysokou termostabilitu (50% inaktivace nastává až při teplotách nad 60 °C, inkubace 30 min), produkce autolytických peptidů je ve srovnání se samotným hovězím trypsinem výrazně omezena[93].

10. Závěr – perspektivy proteolýzy v moderní proteomice

Moderní techniky ESI-MS (ve spojení s kvadrupólovou iontovou pastí nebo analyzátorem FT-ICR – Fourier transform ion cyclotron resonance) a MALDI-MS (TOF/TOF, time-of-flight) umožňují pracovat s intaktními proteiny, provádět jejich fragmentaci a měření MS/MS (cit.[94]). Tento postup se označuje jako top-down analýza (fungující shora dolů, tj. od intaktního proteinu k fragmentům). Aktuální alternativu představuje metoda bottom-up (zdola nahoru), která se též označuje jako shotgun (= angl. poloautomatická brokovnice střílející v krátkých intervalech)[94]. „Shotgun" proteomika je založena na počátečním štěpení složitého proteinového vzorku buď působením peptidas nebo chemickou metodou. Výsledkem je směs peptidů, která je analyzovatelná metodou LC-ESI-MS/MS nebo MALDI-MS s následnou identifikací bioinformatickými metodami. Použití MALDI-MS je však omezené kvůli složitosti digestů proteomů např. celých virů nebo baktérií. Výhodnější metodou LC-ESI-MS/MS lze během jednoho dne rutinně analyzovat 500–1000 proteinů z buněčného lyzátu, a to na jediném přístroji. Parametry dostupných technik „shotgun" proteomiky jako jsou úhrnná rychlost, citlivost a dynamický rozsah, nemohou být v současné době s použitím ostatních metod překonány[94].

Jak již bylo zmíněno v úvodní části, fragmentace membránových a jiných ve vodě nerozpustných proteinů je často prováděna chemickými metodami, tedy v prostředí organických rozpouštědel nebo jejich směsí s vodou (methanol, acetonitril, kyselina mravenčí). Podle potřeby se navíc ještě přidávají detergenty[95]. Samotné chemické štěpení však často neposkytuje peptidy vhodné pro přímou MS analýzu. Tento stupeň je proto nutné kombinovat se štěpením enzymovým[96]. Zde bohužel narážíme na nutnost úpravy vzorku pro dosažení optimálních podmínek proteolýzy, což způsobuje nežádoucí prodlevy, zvláště ve vysoce výkonné a „shotgun" proteomice. Řada laboratoří se proto zaměřila na vývoj a hledání postupů umožňujících aplikaci peptidas v prostředích s obsahem organického rozpouštědla[97]. Vzhledem k principu štěpné reakce je nutná alespoň minimální přítomnost vody v reakční směsi (proteolýza je totiž hydrolýza). V současné době lze nalézt např. práce využívající trypsinaci ve směsi 60 % methanolu a 40 % vodného roztoku NH_4HCO_3, pH 7,9 (cit.[98]). Dalším přístupem může být fragmentace nerozpustných proteinů robustní, ale nespecifickou proteinasou K[99]. Nabízí se rovněž chemická modifikace specifických peptidas, zejména trypsinu, pro zvýšení stability v nevodných prostředích jako je 50% acetonitril (Šebela a spol., nepublikované výsledky).

LITERATURA

1. Westermeier R., Naven T.: *Proteomics in Practice. A Laboratory Manual To Proteome Analysis.* Wiley-VCH, Weinheim 2002.
2. Lamond A., Mann M.: Trends Cell Biol. *7*, 139 (1997).
3. Pandey A., Mann M.: Nature *405*, 837 (2000).
4. Havliš J., Thomas H., Šebela M., Shevchenko A.: Anal. Chem. *75*, 1300 (2003).
5. Washburn M. P., Wolters D., Yates J. R. 3rd: Nat. Biotechnol. *19*, 242 (2001).
6. Greenberg Z., Bisello A., Mierke D. F., Rosenblatt M., Chorev M.: Biochemistry *39*, 8142 (2000).
7. Li A., Sowder R. C., Henderson L. E., Moore S. P., Garfinkel D. J., Fisher R. J.: Anal. Chem. *73*, 5395 (2001).
8. Barrett A. J., v knize: *Proteolytic Enzymes. A Practical Approach* (Beynon R., Bond J. S., ed.), str. 1. Oxford University Press, Oxford 2001.
9. Grassmann W., Dyckerhoff H.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. *179*, 41 (1928).
10. Bergmann M., Ross W. F.: J. Biol. Chem. *114*, 717 (1936).
11. Bergmann M.: Adv. Enzymol. *2*, 49 (1942).
12. Scott T., Eagleson M.: *Concise Encyclopedia of Biochemistry*. Walter de Gruyter, Berlin-New York 1988.
13. Hartley B. S.: Annu. Rev. Biochem. *29*, 45 (1960).
14. Seemüller E., Lupas A., Stock D., Löwe J., Huber R., Baumeister W.: Science *268*, 579 (1995).
15. Rawlings N. D., Barrett A. J.: Biochem. J. *290*, 205 (1993).
16. Rawlings N. D., Barrett A. J.: Nucleic Acids Res. *27*, 325 (1999).
17. Kolektiv: *Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992*. Academic Press, San Diego 1992.
18. Eur. J. Biochem. *223*, 1 (1993); Eur. J. Biochem. *232*, 1 (1995); Eur. J. Biochem. *237*, 1 (1996); Eur. J. Biochem. *250*, 1 (1997); Eur. J. Biochem. *264*, 610 (1999).
19. Bonetto V., Bergman A. C., Jornvall H., Sillard R.: Anal. Chem. *69*, 1315 (1997).
20. Patterson D. H., Tarr G. E., Regnier F. E., Martin S. A.: Anal. Chem. *67*, 3971 (1995).
21. Mano N., Iijima S., Kasuga K., Goto J.: Anal. Sci. *19*, 1469 (2003).
22. Wang R., Chait B. T.: Methods Mol. Biol. *64*, 175 (1997).
23. Walsh K., Neurath H.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *52*, 884 (1964).
24. Cunningham L.: J. Biol. Chem. *211*, 13 (1954).
25. Keil-Dlouhá V., Zylber N., Imhoff J., Tong N., Keil B.: FEBS Lett. *16*, 291 (1971).
26. Berezin I., Martinek K.: FEBS Lett. *8*, 261 (1970).
27. Svendsen I.: Carlsberg Res. Commun. *41*, 237 (1976).
28. Titani K., Hermodson M. A., Ericsson L. H., Walsh K. A., Neurath H.: Biochemistry *11*, 2427 (1972).
29. Svendsen I., Jensen M. R., Breddam K.: FEBS Lett. *292*, 165 (1991).
30. Sørensen S. B., Sørensen T. L., Breddam K.: FEBS Lett. *294*, 195 (1991).
31. Drapeau G. R.: Can. J. Biochem. *56*, 534 (1978).
32. Jekel P. A., Weijer W. J., Beintema J. J.: Anal. Biochem. *134*, 347 (1983).

33. Jenö P., Mini T., Moes S., Hintermann E., Horst M.: Anal. Biochem. *224*, 75 (1995).
34. Dargatz H., Diefenthal T., Witte V., Reipen G., von Wettstein D.: Mol. Gen. Genet. *240*, 140 (1993).
35. Wright D. S., Graham L. D., Jennings P. A.: Biochim. Biophys. Acta *1443*, 369 (1998).
36. Noreau J., Drapeau G. R.: J. Bacteriol. *140*, 911 (1979).
37. Drapeau G. R.: J. Biol. Chem. *255*, 839 (1980).
38. Nakagawa Y., Ghotb-Sharif J., Douglas K. T.: Biochim. Biophys. Acta *706*, 141 (1982).
39. Shevchenko A., Sunyaev S., Loboda A., Shevchenko A., Bork P., Ens W., Standing K. G.: Anal. Chem. *73*, 1917 (2001).
40. Sunyaev S., Liska A. J., Golod A., Shevchenko A., Shevchenko A.: Anal. Chem. *75*, 1307 (2003).
41. Han J., Pope M., Borchers C., Graves L. M.: Anal. Biochem. *310*, 215 (2002).
42. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.: Anal. Chem. *68*, 850 (1996).
43. Sarbolouki M. N., Mahnam K., Rafiee-Pour H. A.: Electrophoresis *25*, 2907 (2004).
44. Nakasako M.: J. Mol. Biol. *289*, 547 (1999).
45. Marshall J., Jankowski A., Furesz S., Kireeva I., Barker L., Dombrovsky M., Zhu W., Jacks K., Ingratta L., Bruin J., Kristensen E., Zhang R., Stanton E., Takahashi M., Jackowski G.: J. Proteome Res. *3*, 364 (2004).
46. Christoffers K. H., Li H., Keenan S. M., Howells R. D.: Mol. Brain Res. *118*, 119 (2003).
47. Schlosser A., Bodem J., Bossemeyer D., Grummt I., Lehmann W. D.: Proteomics *2*, 911 (2002).
48. Zhang X., Medzihradszky K. F., Cunningham J., Lee P. D., Rognerud C. L., Ou C. N., Harmatz P., Witkowska H. E.: J. Chromatogr., B *759*, 1 (2001).
49. Merewether L. A., Le J., Jones M. D., Lee R., Shimamoto G., Lu H. S.: Arch. Biochem. Biophys. *375*, 101 (2000).
50. Vieths S., Frank E., Scheurer S., Meyer H. E., Hrazdina G., Haustein D.: Scand. J. Immunol. *47*, 263 (1998).
51. Vougier S., Mary J., Friguet B.: Biochem. J. *373*, 531 (2003).
52. Wuhrer M., Koeleman C. A., Hokke C. H., Deelder A. M.: Anal. Chem. *77*, 886 (2005).
53. Noort D., Fidder A., Hulst A. G., Woolfitt A. R., Ash D., Barr J. R.: J. Anal. Toxicol. *28*, 333 (2004).
54. Cravello L., Lascoux D., Forest E.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *17*, 2387 (2003).
55. Wang L., Pan H., Smith D. L.: Mol. Cell. Proteomics *1*, 132 (2002).
56. Holland J. W., Deeth H. C., Alewood P. F.: Proteomics *5*, 990 (2005).
57. Bark S. J., Muster N., Yates J. R. 3rd, Siuzdak G.: J. Am. Chem. Soc. *12*, 1774 (2001).
58. Hubbard S. J., Eisenmenger F., Thornton J. M.: Protein Sci. *3*, 757 (1994).
59. Park Z. Y., Russell D. H.: Anal. Chem. *72*, 2667 (2000).
60. Havliš J., Shevchenko A.: Anal. Chem. *76*, 3029 (2004).
61. Anson M. L.: J. Gen. Physiol. *22*, 79 (1938).
62. Kunitz M.: J. Gen. Physiol. *30*, 291 (1947).
63. Venkatesh R., Sundaram P. V.: Protein Eng. *11*, 691 (1998).
64. Al-Ajlan A., Bailey G. S.: Arch. Biochem. Biophys. *348*, 363 (1997).
65. Cottrell T. J., Harris L. J., Tanaka T., Yada R. Y.: J. Biol. Chem. *270*, 19974 (1995).
66. Peterson L. M., Sokolovsky M., Vallee B. L.: Biochemistry *15*, 2501 (1976).
67. Pappin D. J. C., Hojrup P., Bleasby A. J.: Curr. Biol. *3*, 327 (1993).
68. Perkins D. N., Pappin D. J. C., Creasy D. M., Cottrell J. S.: Electrophoresis *20*, 3551 (1999).
69. Zhang W. Z., Chait B. T.: Anal. Chem. *72*, 2482 (2000).
70. Holm L., Sander C.: Bioinformatics *14*, 423 (1998).
71. Wise M. J., Littlejohn T. G., Humphery-Smith I.: Electrophoresis *18*, 1399 (1997).
72. Puigdomenech P., Palau J., Crane-Robinson C.: Eur. J. Biochem. *104*, 263 (1980).
73. Borchers C., Peter J. F.; Hall M. C., Kunkel T. A., Tomer K. B.: Anal. Chem. *72*, 1163 (2000).
74. Wilm M., Shevchenko A., Houthaeve T., Breit S., Schweigerer L., Fotsis T., Mann M.: Nature *379*, 466 (1996).
75. Aebersold R. H, Leavitt J., Saavedra R. A., Hood L. E., Kent S. B. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *84*, 6970 (1987).
76. Bienvenut W. V., Sanchez J. C., Karmime A., Rouge V., Rose K., Binz P. A., Hochstrasser D.: Anal. Chem. *71*, 4800 (1999).
77. Massolini G., Calleri E.: J. Sep. Sci. *28*, 7 (2005).
78. Hsieh Y. L. F., Wang H. Q., Elicone C., Mark J., Martin S. A., Regnier F.: Anal. Chem. *68*, 455 (1996).
79. Slysz G. W., Schriemer D. C.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *17*, 1044 (2003).
80. Cooper J. W., Chen J. Z., Li Y., Lee C. S.: Anal. Chem. *75*, 1067 (2003).
81. Harris W. A., Reilly J. P.: Anal. Chem. *74*, 4410 (2002).
82. Mirgorodskaya O. A., Kazanina G. A., Mirgorodskaya E. P., Shevchenko A. A., Maltsev K. V., Miroshnikov A. I., Roipstorff P.: Bioorg. Khim. *23*, 91 (1997).
83. Rice R. H., Means G. E., Brown W. D.: Biochim. Biophys. Acta *492*, 316 (1977).
84. Nureddin A., Inagami T.: Biochem. J. *147*, 71 (1975).
85. Fraenkel-Conrat H., Bean R. S., Lineweaver H.: J. Biol. Chem. *177*, 385 (1949).
86. Elsner C., Grahn S., Bauer S., Ullmann D., Kurth T., Jakubke H.-D.: J. Mol. Catal., B *8*, 193 (2000).
87. Mozhaev V. V., Šikšnis V. A., Melik-Nubarov N. S., Galkantaite N. Z., Denis G. J., Butkus E. P., Zaslavsky B. Y., Mestechkina N. M., Martinek K.: Eur. J. Biochem. *173*, 147 (1987).

88. Vaňková H., Pospíšilová M., Tichá M., Turková J.: Biotechnol. Tech. *8*, 375 (1994).
89. Villalonga R., Fernández M., Fragoso A., Cao R., Mariniello L., Porta R.: Biotechnol. Appl. Biochem. *38*, 53 (2003).
90. Matsukata M., Aoki T., Sanui K., Ogata N., Kikuchi A., Sakurai Y., Okano T.: Bioconjugate Chem. *7*, 96 (2001).
91. Zhang Z., He Z., Guan G.: Biotechnol. Tech. *13*, 781 (1999).
92. Villalonga R., Villalonga M. L., Gómez L.: J. Mol. Catal., B *10*, 483 (2000).
93. Šebela M., Havliš J., Drhlíková T., Thomas H., Schmalz N., Shevchenko A.: Acta Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Rerum Nat. - Chemica *43S*, 18 (2004).
94. VerBerkmoes N. C., Hervey W. J., Shah M., Land M., Hauser L., Larimer F. W., Van Berkel G. J., Goeringer D. E.: Anal. Chem. *77*, 923 (2005).
95. van Montfort B. A., Canas B., Duurkens R., Godovac-Zimmermann J., Robillard G. T.: J. Mass Spectrom. *37*, 322 (2002).
96. van Montfort B. A., Doeven M. K., Canas B., Veenhoff L. M., Poolman B., Robillard G. T.: Biochim. Biophys. Acta *1555*, 111 (2002).
97. Wu C. C., Yates J. R. 3rd: Nat. Biotechnol. *21*, 262 (2003).
98. Blonder J., Hale M. L., Lucas D. A., Schaefer C. F., Yu L. R., Conrads T. P., Issaq H. J., Stiles B. G., Veenstra T. D.: Electrophoresis *25*, 1307 (2004).
99. Wu C. C., MacCoss M. J., Howell K. E., Yates J. R. 3rd: Nat. Biotechnol. *21*, 532 (2003).

T. Štosová[a], J. Havliš[b], R. Lenobel[c] and M. Šebela[a]
(*[a]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic, [b]Department of Analytical Chemistry, Masaryk University, Brno, Czech Republic, [c]Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University and Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Olomouc, Czech Republic*): **Proteolytic Enzymes: Significance for Proteomics**

Proteolytic enzymes (peptidases) are important tools for proteomic research. This article reviews their application to digestion of proteins, which commonly precedes the mass spectrometry analysis of proteins. In the opening part, mechanism of proteolysis is described together with a detailed introduction to classification and nomenclature of enzymes. The following part brings an overview of proteolytic enzymes that are currently used in expression and functional proteomics including their properties and specificity. The review continues with reports on assays of proteolytic activity and computer prediction of peptide cleavage. The methodology of in-solution and in-gel digestion of samples and the use of peptidases for cleavage of proteins on membrane surfaces is also mentioned. Furthermore, chemical modifications of peptidases for improving their stability to autolysis and thermal inactivation are documented. Peptidase treatment of hydrophobic proteins in solutions containing organic solvents are also mentioned. Finally, new perspectives of proteolysis in shotgun proteomics are outlined.

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. Anylýza 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 terčíků 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 ^{18}O trypsinem 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 rozpuštěné 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 rozpuštěn v pufru s nízkou koncentrací soli nebo bez soli (vzorkový nanášecí pufr).

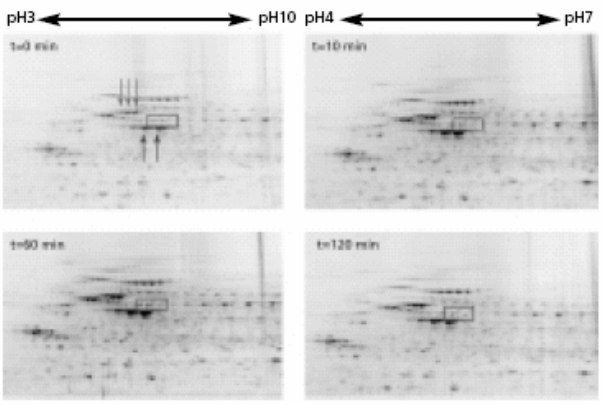
Z těchto důvodů byl pro testování detergentů v různých kombinacích (pro získání vzorků optimalizovaných pro další analýzy, jako je 2D elektroforéza) použit faktoriálový matricový přístup. Na základě práce Dr. Thierry Rabillouda z CEA-Grenoble ve Francii byly pro optimalizovanou extrakci proteinu z různých zdrojů[1–5] 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 pufry (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 μg) byly fokusovány na pH 4–7 proužcích 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 velikým 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.

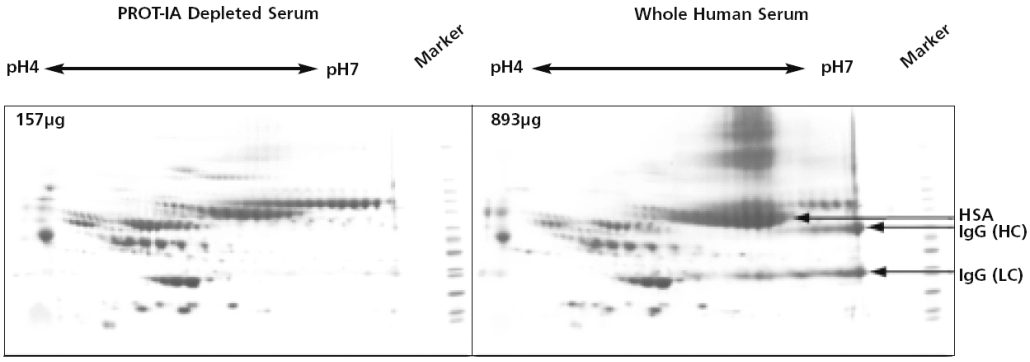
Sigma nabízí dvě sady pro odstranění IgG a albuminu, které využívají dvě rozdílné technologie: (*i*) ProteoPrep® Blue IgG kit pro odstranění albuminu a IgG (katalogové číslo PROT-BA) – je založena na patentované pryskyřici spojující vazbu přes Protein G a přes modrou barvu a (*ii*) agarosu s navázaným 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 barvivu

ProteoPrep™ Blue Albumin a Kit pro odstranění IgG specificky odstraňují albumin a IgG z 25 vzorků lidského séra (25 μl až 100 μl) pro následnou analýzu metodou dvojrozměrné elektroforézy. Typicky je odstraněno 95 % albuminu a 80 % IgG ze 75 μl 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 pufrech s močovinou místo v pufrech se solemi, což znamená, že vzorky séra zbavené albuminu mohou být aplikovány v 2D elektroforéze bez srážení proteinu. Fokusace proteinů na proužcích 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 barvivu. 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 µl vzorku lidského séra byl použitím ProteoPrep™ imunoafinitního kitu pro odstranění albuminu IgG (PROT-IA) odstraněn albumin a IgG. Poté byla provedena 2D elektroforéza s 15 µl vzorku séra a sérem, 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.

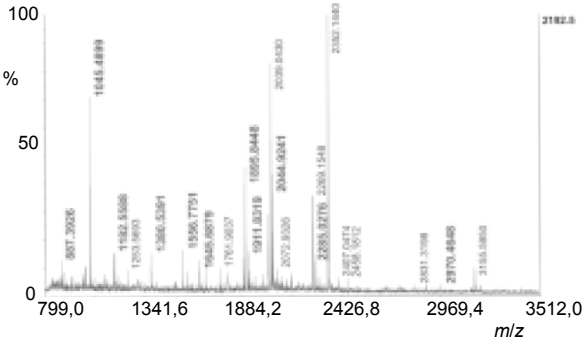
Při porovnání schopnosti odstranit lidský albumin a IgG s použitím tohoto imunoafinitního kitu a imunoafinitní pryskyřice založené na klasických protilátkách byly na nosiče aplikovány různé objemy lidského séra a pomocí ELISA bylo stanoveno procentuální odstranění albuminu a IgG. Sada PROT-IA vykazuje 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 µl séra. K tomu, aby běžná pryskyřice dosáhla stejné účinnosti, by bylo možné použít pouze 15 µl séra nebo méně. Podobně bude PROT-IA odstraňovat více než 98 % IgG z 50 µl séra, zatímco pro dosažení podobné účinnosti odstranění u běžné pryskyřice musí být použito 20 µl 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 soli 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-Select™ před MS

Lidský genom kóduje přibližně 2000 kinas a 1000 fosfatas řídících 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-Select™ kit.



Obr. 3. **MS analýza tryptického štěpení GST-MELK po obohacení směsi za pomoci PHOS-Select™;** 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. Anylýza glykopeptidů

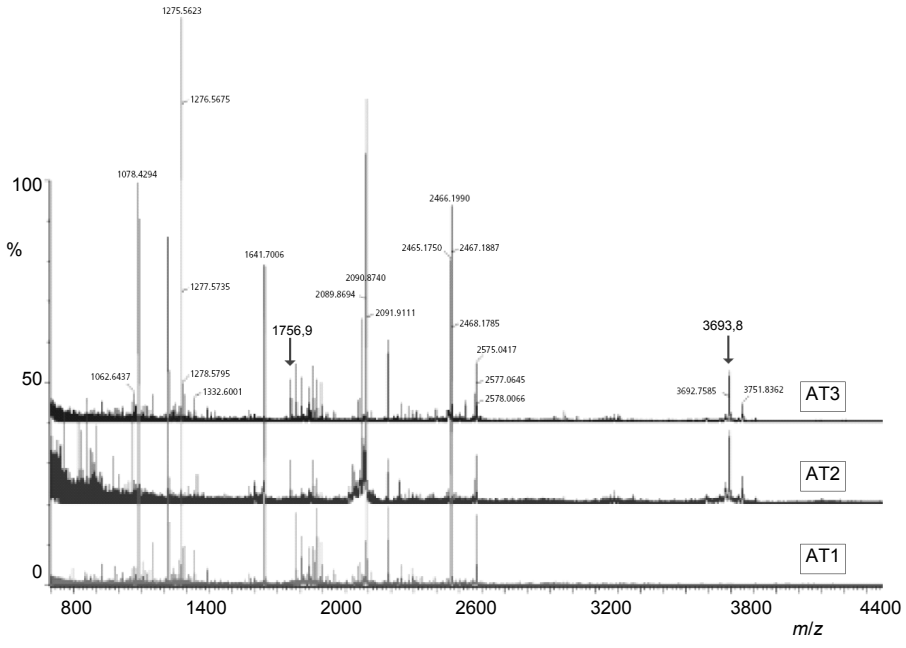
3.2.1. Enzym PNGasa F: Účinná N-deglykosylace v analýze glykoproteinů

Glykosylace je jednou z nejčastějších post-translačních 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 glykanů. 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 α1-antitrypsinu provedená ve vývojovém pracovišti Sigma-Aldrich. Po redukci a alkylaci (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 hydrolýze 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 potlačením matrice na 800 hmotnostních jednotek. Analýza dat byla provedena použitím software ProteinLynx™ (obr. 4).



Obr. 4. **MALDI-TOF MS analýza nativního a deglykosylovaného α1-antitrypsinu**; hmotnostní peptidový profil kontrolního (AT1), deglykosylovaného v gelu (AT2) a deglykosylovaného v roztoku (AT3) lidského α1-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

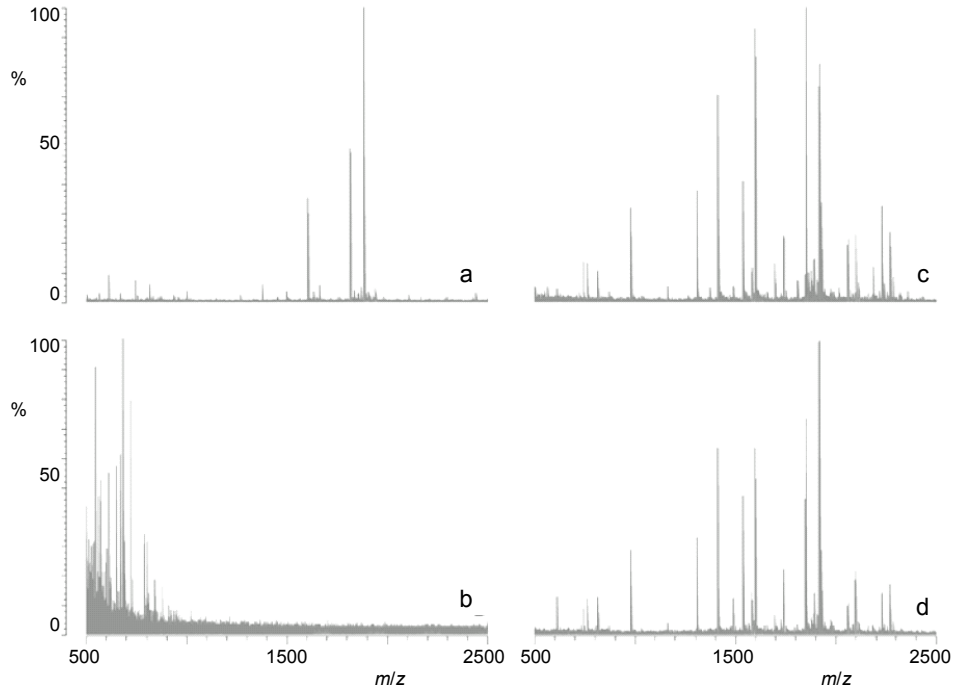
Trypsin proteomické čistoty nabízený firmou Sigma vykazuje velmi dobrou proteolytickou účinnost (vytváří více tryptických peptidů). To vede k většímu sekvenčnímu pokrytí studovaného proteinu. Hmotnostní spektra jsou značně zjednodušena a to díky sníženému počtu interferujících autolytických píků a jejich 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. Chymotryptická 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 kriteria 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 μg baleních.

3.3.2. Výběr proteasy

Protease Profiler kit (katalogové číslo PP0500) poskytuje 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 terčíků 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 terčíku. 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 terčíku zcela odstraněny. Píky pozorované v tomto spektru odpovídají aduktům s matricí MALDI

nin nebo lysin. Dřívější studie ukázaly, že detekce peptidů MS je ovlivněna několika základními vlastnostmi, včetně bazicity *C*-koncové aminokyseliny[6–8], aminokyselinového složení[7], hydrofobnosti a velikosti peptidu[6] a schopnosti vytvoření stabilních sekundárních struktur[9]. Kromě toho bylo pro peptidové směsi získané tryptickým štěpením popsáno potlačování signálu[10]. 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-aminoskupinou[11–16]. 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 desorpcí z matrice laserem (MALDI) nebo ionizace elektrosprejem (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 terčíku. Jako příklad byl metodou MALDI-TOF MS analyzován tryptický štěp myoglobinu (obr. 5). Nejprve byly naneseny a analyzovány neguanidylované peptidy (obr. 5a). Vzorek byl poté extrahován z gelu roztokem 70% acetonitrilu, guanidylován a znovu nanesen na MALDI terčík. 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 píků. To jasně ukazuje, že byl získán celkový obsah vzorku z původní skvrny. Jediné pozorované píky odpovídaly matrici MALDI. Pro srovnání byly myoglobinové peptidy před nanesením 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 prostředků[18], zejména, je-li původní analýza provedena „shotgun" přístupem – název pro techniku, kdy po štěpení trypsinem je použito LC-MALDI-MS analýzy za pomocí iontové pasti[19,20]. Závěrem lze říci, že účinná mikroizolace vzorků z MALDI terčíku 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

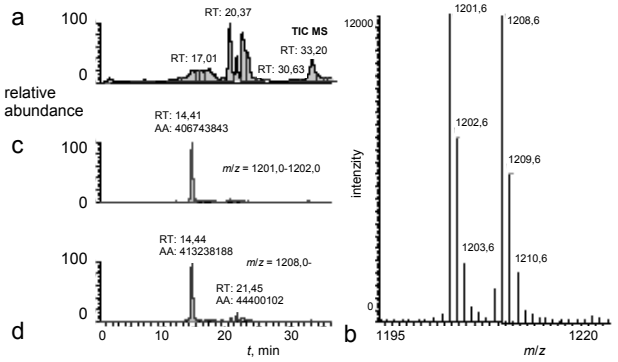
4.1. Zavedení stabilních izotopů pro MS

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 médiu ISOGRO™. Jinou možností označení specifických proteinů je enzymatické vnesení ^{18}O na *C*-konec peptidů. To je možné v případě, kdy jsou proteiny štěpeny serinovými proteasami (např. trypsinem) v prostředí vody s ^{18}O. 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 ^{13}C a ^{15}N a vodu s ^{18}O 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 karboylanhydrasy) byla připravena o finální koncentraci 1 mg ml^{-1} a štěpena přes noc trypsinem proteomické čistoty (T 6567). Stejná množství peptidu čištěného 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 (^{13}C, ^{15}N) aminokyseliny) (cit.[21])

4.2.1. Princip Protein-AQUA

V stupni 1 je z proteinu[21], 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 Gygim byla vytvořena iontová spektra pro nativní peptid a pro syntetický AQUA Peptidový vnitřní standard. Využitím poměrů píků 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 použit 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 spolupracovníky[24]. Tento postup má mnoho aplikací, např. Gerber a Gygi popsali metody pro (*i*) kvantifikaci malého množství kvasničných proteinů, účastnících 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 mechanismu[25].

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 ^{13}C a ^{15}N (více než 98 %) aminokyselin (jedna značená aminokyselina na peptid) a jsou přísně testovány pro zajištění 95% čistoty peptidu (HPLC na reverzní fázi), 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 fluoreskaminu. Fosforylované aminokyseliny mohou být také syntetizovány pro analýzy posttranslačních modifikací. Peptidy jsou dodávány jako soli kyseliny trifluoroctové; jsou však také dostupné v roztoku s octanem amonným.

4.3. Inkorporace ^{18}O trypsinem pro analýzu diferenční exprese proteinu

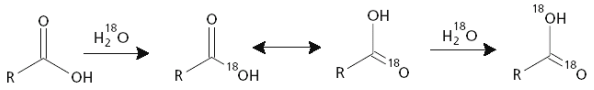
Diferenční proteinová exprese představuje v proteomice důležitou oblast. Izotopové značení je běžně používaná metoda pro relativní kvantifikaci proteinu, avšak je bohužel často velmi finančně nákladná a pracovně náročná. ^{18}O Proteom Profiler kit (katalogové číslo P3623) eliminuje tyto problémy a poskytuje cenově výhodnou a jednoduchou metodu pro provádění relativní proteinové kvantifikace. Základem této sady je enzymatické vnesení stabilní izotopové značky (^{18}O) 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 ^{18}O 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.

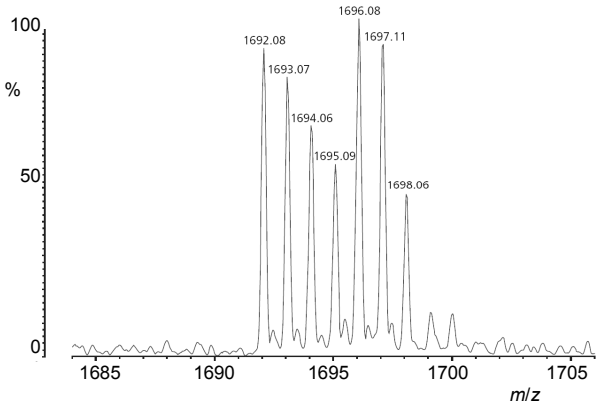
4.3.1. Metody značení

^{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 YSHEEIAMATVTALR, 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 (I0) nebo integrovanou plochu píku jako pík *m*/*z* 1696,08 (hmotnost + 4 Da, I4). 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, pufrovány 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% trifluoroctové 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

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

MIKROFLUIDIKA: NOVÝ ZPŮSOB ÚPRAVY A VNÁŠENÍ VZORKŮ PRO HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRII

JAKUB GRYM a FRANTIŠEK FORET

Ústav analytické chemie, Akademie věd České republiky, Veveří 97, 61142 Brno foret@iach.cz

Došlo 28.8.05, přijato 6.10.05.

Klíčová slova: mikrofluidika, hmotnostní spektrometrie, elektrosprej

Obsah

1. Úvod
2. Mikrotechnologie
3. Základní návrhy spojení mikrofluidiky s hmotnostní spektrometrií
   3.1. Rozhraní pro ESI-MS
   3.2. Aplikace
4. Závěr

1. Úvod

Detekce a charakterizace látek hmotnostní spektrometrií závisí na účinnosti počátečních stupňů přípravy vzorků. Tyto postupy často vyžadují několik následných stupňů, které jsou časově i finančně náročné. Paralelní postupy a automatizace jsou nezbytné pro většinu projektů vyžadujících analýzy velkého množství vzorků, jako např. v genomice nebo proteomice.

V posledním desetiletí jsme svědky velkého pokroku na poli mikrofluidiky („laboratoř na čipu“), miniaturizace a integrace analytických procesů. Lze předpokládat, že mikrofluidika bude hrát důležitou roli při vývoji instrumentace pro hromadné analýzy[1–8]. Hlavní přínosy spojené s miniaturizací spočívají v rychlosti analýz, malé spotřebě vzorku a činidel, integraci funkčních prvků a možnosti paralelních analýz[9–21]. Typické příklady využití miniaturizace a mikrofluidiky zahrnují vývoj v oblastech mikrokolonové chromatografie (μLC), kapilární elektrochromatografie (CEC), kapilární elektroforézy (CE)[4–9], předkoncentračních jednotek a mikroreaktorů[10–12]. Tyto techniky lze využít např. pro analýzy DNA, proteinů, peptidů nebo pro screening léčiv[14,24–31]. Klíčovým prvkem pro využití mikrofabrikovaných zařízení pro proteomiku je spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem (ESI-MS) nebo MALDI-MS (matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry)[22–25].

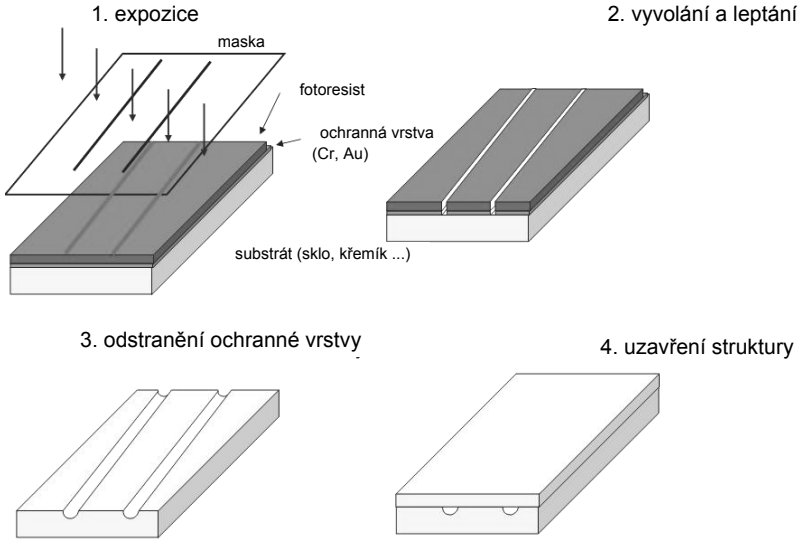
2. Mikrotechnologie

Mikrotechnologie nachází uplatnění hlavně při výrobě elektronických integrovaných obvodů. Standardním materiálem je křemík a velikost obvodů je v rozmezí od jednotek mm^2 (např. operační zesilovač) po jednotky cm^2 u mikroprocesorů. Nejmodernější technologie dnes umožňují tvorbu struktur s velikostí 60 nm. Mikrofluidická zařízení jsou v současném stupni vývoje podstatně jednodušší. Velikosti kanálků se pohybují většinou v rozsahu desítek mikrometrů a celé mikrofluidické bloky dosahují rozměrů 5–100 cm^2. Mikrofluidické „čipy“ mohou být vyrobeny z různých materiálů, např. skla[4,6–8], křemene[12–13], křemíku[5,9] nebo polymerních substrátů[16–20]. Výběr určitého materiálu závisí na jeho povrchových vlastnostech, dostupné technologii výroby a na ceně. Pro dosud nejrozšířenější optickou detekci (UV, laserem indukovaná fluorescence) jsou důležité i optické vlastnosti použitých materiálů.

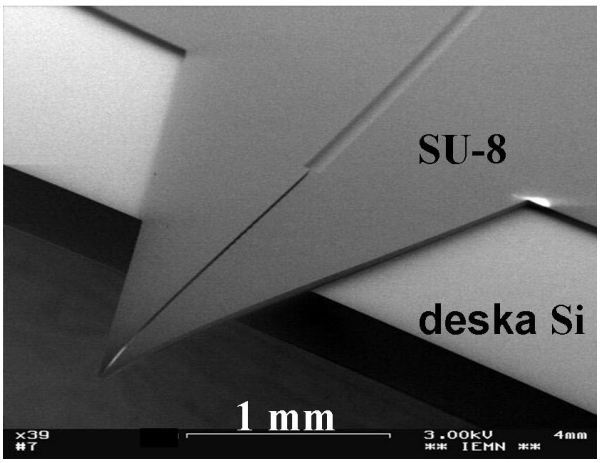
Nejpoužívanější technikou pro výrobu mikročipů je fotolitografie následovaná chemickým leptáním. Typický postup s využitím skla jako výchozího materiálu je na obr. 1.

Na plochu substrátu je ve vakuu nanesena cca 100 nm silná ochranná kovová vrstva (chrom; zlato) a potom tenká vrstva fotoresistu (0,4–2 μm). Poté je přes masku se zvolenou strukturou exponován fotoresist UV zářením při vlnové délce 300–400 nm. Fotochemická reakce během expozice buď rozruší polymerní strukturu fotoresistu (pozitivní resist) nebo ji zesíťuje (negativní resist). Při následném chemickém vyvolání je fotoresist odstraněn buď z exponované (pozitivní) nebo neexponované (negativní) plochy. Po odstranění ochranné kovové vrstvy je pak exponovaný substrát leptán roztokem HF do požadované hloubky kanálků (5–50 μm). Při použití skla jako substrátu je leptání anizotropické a šířka výsledného kanálku je větší než rozměry masky. Po důkladném vyčištění jsou vyleptané kanálky shora uzavřeny tepelným slinutím krycího skla (thermal bonding) při 500–600 °C. Samotné masky jsou nejčastěji připravovány na sklenění desce pokryté kovovou vrstvou absorbující UV záření (zlato nebo chrom 800–1000 Å). Obrazec masky je obvykle vytvořen přímým zápisem laserem nebo elektronovým paprskem.

Kromě anorganických materiálů jsou pro výrobu mikrofluidických systémů vhodné i plasty dovolující při hromadné výrobě značně snížit náklady. Plastová mikrofluidika (polyimid, polystyren, polyethylen, polykarbonát atd.) může být připravována různými technologiemi. Nejpoužívanější postupy využívají laserovou ablaci[17,32], odlévání proti vzoru s negativní mikrostrukturou[17], tepelné vtisknutí šablony (hot embossing)[18], tlakové lití[19] nebo ablace rentgenovým paprskem[20]. Z dalších technologií, které jsou většinou modifikované postupy z elektronického průmys-



Obr. 1. **Schéma fotolitografické přípravy mikrofluidického bloku**



Obr. 2. **Elektrosprejová špička vytvořená z fotorezistu SU-8 na křemíkovém plátku**; 20 μm široká dělící drážka spojující separační kanálek s vrcholem špičky slouží pro transport sprejované kapaliny kapilárními silami

lu, stojí za zmínku zejména litografie s využitím fotoresistu SU-8. Tento materiál umožňuje tvorbu mikrostruktur s velkým poměrem výška/šířka a je často používán pro přípravu šablon (master) pro replikaci. Příklad mikrofabrikované elektrosprejové špičky připravené na křemíkovém plátku z materiálu SU-8 (www.microchem.com) je na obr. 2 (cit.[34]). Další podrobné informace o technologiích pro mikrofluidiku lze najít na mnoha webových stránkách specializovaných pracovišť. Přehled řady užitečných odkazů je např. na webových stránkách Ústavu analytické chemie AV ČR (cit.[35]).

3. Základní návrhy spojení mikročipu a hmotnostního spektrometru

Nejčastějšími strukturami, které jsou vyvíjeny pro mikrofluidická zařízení, jsou separační jednotky, dávkovače vzorku, pumpy a výstupy pro rozhraní MS. Hlavní výhodou integrace jednotlivých prvků do jednoho systému je jednoduchost vytvoření rozvětvených kanálků bez tvorby mrtvých objemů a s tím spojeného rozmytí.

Kapilární elektroforéza je nejčastější separační metodou využívanou pro separace na mikročipech. Souvisí to s jednoduchostí připojení elektrod separačního napětí (na rozdíl od připojení chromatografické pumpy) a také je zájem o separace směsí DNA nebo proteinů, které jsou většinou analyzovány elektroforézou. Není proto překvapující, že první komerční mikrofluidická zařízení jsou určena pro elektroforetickou analýzu[36–38].

Značné úsilí je také zaměřeno na vývoj μLC. Účinnost LC pro separaci směsí peptidů a vyšší dávkovací kapacita oproti elektroforéze vytváří předpoklad pro citlivé separace s mikročipy. V nejjednodušším uspořádání lze plnit kanály mikročipu běžnými stacionárními fázemi[39]. Novější směr představují polymerní monolitické kolony, ve kterých je stacionární pórovitá struktura polymerována přímo uvnitř separačního kanálku. Tyto kolony jsou charakterizovány vysokou účinností (cca 10^5 teoretických pater . m^{-1}) a vysokou výslednou permeabilitou při nižším tlaku než u náplňových kolon[40]. Monolitické materiály nabízejí potenciál i pro vícekolonové systémy a tvorbu chemických reaktorů[41]. Třetí způsob přípravy chromatografické kolony představuje fotolitografická tvorba miniaturních sloupků, které slouží jako částice sorbentu, přímo uvnitř mikrofluidického bloku. Tyto struktury o rozměrech 5 × 5 × 10 μm byly například připraveny s využitím reak-

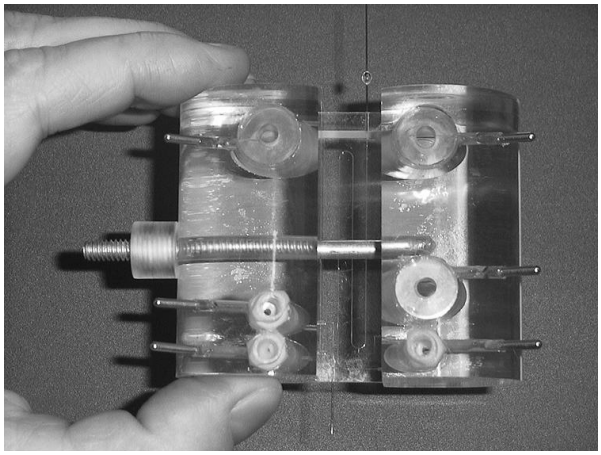
tivního iontového leptání (deep reactive ion etching)[42].

Pro dávkování vzorku do mikrofluidických systémů je nejčastěji používáno křížové (cross), nebo dvojité T (double-T) uspořádání[4,6]. V prvním případě je vzorek přiváděn kanálkem, který kříží separační kolonu, a objem dávkovaného vzorku je definován prostorem v místě křížení. Toto uspořádání sice umožňuje dávkovat velmi malé objemy, ale s nepříliš dobrou reprodukovatelností. V mnoha případech je výhodnější objem (reprodukovatelnost a kapacita) dávkování zvýšit uspořádáním „dvojité T“, kdy je vzorek přiveden ze strany a po vyplnění určitého segmentu (např. 1 mm) je opět odveden mimo separační kolonu. Pro transport vzorku uvnitř kanálků je často používána elektroosmóza umožňující snadné řízení rychlosti a směru toku vkládaným elektrickým napětím. Alternativně lze pro separaci a dávkování využít také tlak nebo vakuum[43], kdy vzorek do kanálku vtéká během předem určené doby za předem určeného tlakového rozdílu. Pro off-line spojení s MALDI-MS bylo využito i piezoelektrického elementu[44,45], který umožňuje generovat rychlý sled kapiček s pikolitrovým objemem. Na tomto místě stojí též za zmínku i vývoj chemických mikroreaktorů, které lze vytvářet v místech průchodu vzorku. Nejdůležitější současnou aplikací je dnes především imobilizace enzymů (např. trypsinu) buď přímo na stěny kanálků, nebo na segmenty polymerní náplně[41].

3.1. Rozhraní pro ESI-MS

Typické průtoky v mikrofluidických kanálcích jsou v rozsahu 10–300 nl min^{-1}. Tyto hodnoty jsou zároveň blízké optimálním průtokům při mikro/nano elektrosprejové ionizaci. Vhodným uspořádáním výstupu kapaliny z mikrofluidického bloku by tedy mělo být umožněno přímé (on-line) spojení s hmotnostním spektrometrem. Při prvních pokusech o generování ESI z mikrofluidických bloků bylo využito ústí kanálku vystupující na povrch čipu[22–24]. Dále byly testovány možnosti použití kapalinového spoje (liquid junction) a obtékané elektrosprejové jehly (liquid sheath)[25–31,43,46–51]. V poslední době, byly testovány i elektrosprejové jehly mikrofabrikované jako součást mikročipu[32,52,53].

Generování elektrospreje přímo z ústí kanálku na povrchu čipu vychází z předpokladu, že použitý materiál (sklo) je dobrý elektrický izolant a že malý průřez kanálku umožňuje dosáhnout dostatečně vysoké intenzity elektrického pole pro ionizaci ESI. V praxi tak lze dosáhnout kvalitní ESI-MS spektra při infuzi vzorků peptidů a proteinů[22,23]. Toto nejjednodušší uspořádání má ovšem i závažný nedostatek pro praktické využití. Tím je smáčení povrchu kolem ústí kanálku, které vede ke tvorbě kapky s objemem několika desítek nanolitrů. Vzniklý mrtvý objem neumožňuje použití tohoto uspořádání pro separace, kdy celkový objem zón se pohybuje v jednotkách nl. Částečným řešením je silanizace povrchu kolem ústí kanálku[22]. Hydrofobizace povrchu může omezit roztékání kapaliny vycházející z kanálku čipu. Tato úprava byla použita ve vícekanálkovém systému pro ESI-MS analýzu peptidových směsí[24]. Jako zajímavost lze uvést, že vlastnosti otevřených elektrosprejových kanálků připravených v silně hydrofobních plastech byly nedávno detailněji studovány v rámci vývoje reaktivního pohonu meziplanetárních sond[54]. V souladu s předešlými experimentálními výsledky bylo zjištěno, že elektrosprej aktivovaný z kanálku v hydrofobním materiálu např. (poly(dimethylsiloxan) je velmi podobný klasickému elektrospreji s jehlou[55]. Pro praktické využití bude však ještě nezbytný další vývoj.

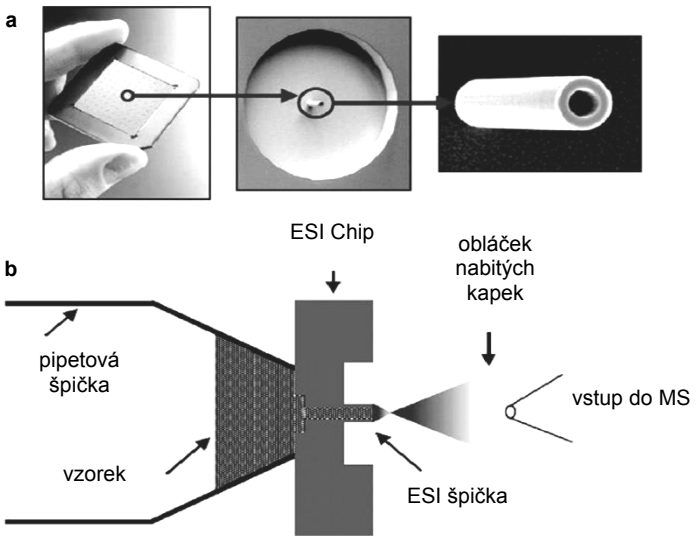


Obr. 3. **Mikrofluidický blok pro spojení CE-ESI-MS s externími elektrodovými zásobníky a kapilárami pro dávkování vzorku a elektrosprej**

Standardní způsob pro ionizaci ESI v současnosti využívá transport vzorku přes dutou jehlu (zaostřenou kapiláru, skleněnou pipetovou špičku atd.) připojenou na 1–4 kV. Pro studijní účely je možné použít externí ESI jehlu připojenou buď přímo ke konci mikrokanálku[25–28,43,47,49,51,] nebo s využitím kapalinového spoje[56]. Příklad tohoto uspořádání je na obr. 3 (cit.[43]).

Mikrofabrikace jehel ESI společně se separačními kanálky není jednoduchá a stále jsou ještě vyvíjeny vhodné technologie. Kromě již zmiňovaného fotorezistu SU-8, byly struktury dutých jehel vyrobeny i z vrstev parylenu (poly(*p*-xylen)) připravený vakuovou polymerizací nanesených na křemíkovém substrátu[52]. Nejpokročilejší technologií je však v současnosti pravděpodobně reaktivní iontové leptání (deep reactive ion etching), s jehož pomocí lze na křemíkovém plátku připravit pole elektrosprejových emitorů (průměr 10 μm, výška 50 μm). Toto uspořádání, které je zobrazeno[32] na obr. 4, je dnes dostupné i komerčně[57] pro hromadnou infuzní analýzu.

Mnoho úsilí je věnováno vývoji mikrofluidických zařízení na jedno použití. Vzhledem ke značnému komerčnímu potenciálu se vývoj zaměřuje hlavně na přípravu mikročipů z plastů. Jednou z prakticky používaných technologií výroby mikrokanálku s integrovanou elektrosprejovou špičkou je plazmové leptání polyimidu[58]. Výchozím materiálem, je polyimidová fólie (tloušťka 300 až 1000 μm) potažená vrstvou mědi o síle 5–30 μm. Tyto materiály se běžně používají pro výrobu ohebných plošných spojů v elektronice. Vzhledem k chemické odolnosti



Obr. 4. **Pole elektrosprejových špiček vytvořené na křemíkovém plátku**; část a) zobrazuje celý čip a detaily ESI špičky, část b) znázorňuje princip činnosti, kdy je analyzovaný vzorek přiváděn ze zadní strany běžnou plastovou pipetovací špičkou

je polyimid velmi vhodný i pro mikrofluidické struktury, které se nejprve fotolitograficky vytvoří na měděné vrstvě. Po odleptání slouží takto vytvořená negativní měděná struktura jako maska pro oxidační plazmové leptání polyimidu. Elektrosprejové špičky lze v nejjednodušším případě vytvořit přímo ořezem polyimidové fólie kolem ústí kanálku. Pro jemnější opracování bylo též použito obrábění excimerovým laserem[59]. Obdobné postupy jsou využívány i pro komerční produkci integrovaného systému pro HPLC na čipu ve spojení s hmotnostní spektrometrií[36]. Vysoké napětí pro generování elektrospreje lze připojit buď vodivou vrstvou (napařené zlato) nanesené přímo na elektrosprejovou špičku, nebo lze využít elektrické vodivosti nosného elektrolytu (nebo i vzorku samotného) a zdroj vysokého napětí připojit elektrodou umístěnou na vhodném místě podél dráhy průtoku vzorku.

3.2. Aplikace

Vývoj spojení mikrofluidiky s hmotnostní spektrometrií započal v posledních několika letech a lze očekávat podstatná vylepšení jak v technologii přípravy, tak v praktických návrzích a aplikacích. Zájem o tuto problematiku lze dokumentovat na vzrůstajícím počtu publikací, které se každoročně objevují ve vědecké literatuře.

Přímá infuze vzorků

Na počátku vývoje byly mikročipy využívány hlavně pro přímou infuzi vzorku. Hlavním trendem jsou dnes čipy pro jednorázové použití, které eliminují možnost kontaminace z předchozích analýz. Uspořádání je nejčastěji navrženo tak, aby byla dosažena kompatibilita se standardními mikrotitračními destičkami s 96 (384, 1536) jamkami. Toho lze dosáhnout buď návrhem mikrofluidického zařízení v tomto formátu[60], nebo využitím robotiky, kde ve spojení s pipetovací špičkou (ZIP TIP®) může systém provádět rychlé MS analýzy přímou infuzí bez nebezpečí kontaminace vzorku[57]. Řada publikovaných aplikací zahrnuje kvantitativní analýzu léčiv v plasmě[61,62], monitorování ligandů[63] nebo analýzu sacharidů[64,65].

Zkoncentrování a předseparace vzorku

Zkoncentrování a předseparace vzorku jsou často nezbytné pro dosažení kvalitních výsledků MS. Zlepšení citlivosti, buď fokusací na čipu, např. isotachoforézou[46] nebo externím zkoncentrováním vzorku, který je spojen s mikročipem[50], je stále věnována značná pozornost. Vzhledem k velmi malým průtokům, které lze ionizovat nanoelektrosprejem, je předkoncentrace vzorku velmi důležitá. Jako příklad lze uvést analýzu trypsinových peptidů proteinů získaných při separaci lyzátu membránových proteinů extrahovaných z *H. influenzae* na 2D PAGE. V tomto případě[50] byly 3 μl proteinového digestu zkoncentrovány na náplni sorbentu C18 a potom analyzovány kapilární elektroforézou na čipu ve spojení s ESI na hmotnostním spektrometru-Qq-TOF během 90 s. Typický limit detekce po zkoncentrování byl 2 nM. Alternativní metodou zkoncentrování vzorků peptidů je připojení zásobníku sorbentu C18 mezi mikročip a elektrosprej. V tomto případě byly analyzovány koncentrace 0,1 nM (cit.[26]). Kromě nespecifických hydrofobních interakcí lze pro zachycení žádané části vzorku využít i afinitních interakcí, např. sorbent s imobilizovanými protilátkami pro identifikaci peptidových fragmentů[66].

Zajímavé je použití sendvičových struktur s kanálky oddělenými membránou. Jako příklad může sloužit použití dvojité mikrodialýzy pro odstranění nečistot ze vzorku (s malou i velkou molekulovou hmotností), která byla použita v mikrozařízení spojeném s kvadrupólovou ionto-

vou pastí ESI/MS (cit.[30]). Zde byl polykarbonátový blok s hadovitě tvarovaným kanálkem vložen mezi dvě dialyzační membrány. Příměsi s vybranými molekulovými hmotnostmi byly ze vzorku odstraněny během průchodu vzorku k elektrosprejovému rozhraní. Toto zařízení bylo použito při analýzách vzorků DNA a proteinů. Podobné mikročipy pro odsolování proteinových vzorků byly vyrobeny i v polyimidu[67,68].

Separace

Jak již bylo zmíněno, elektroforéza je v současné době nejčastějším módem separace v mikrofluidických zařízeních. Častou aplikaci představuje separace směsí proteinů, peptidů a proteinových štěpů (protein digest). Pokud je zařízení dobře navrženo, je dosažená separace podobná jako při použití běžných kapilárních kolon. V přepočtu na jednotku délky separačního kanálku se separační účinnosti pohybují v řádu stovek tisíc teoretických pater na metr. Tato účinnost většinou stačí i při použití relativně krátkých separačních kanálků, typických pro mikrofluidické systémy[43]. V případě, že se podaří minimalizovat adsorpci na stěny separačního kanálku, lze stejné zařízení s úspěchem použít i pro analýzu proteinů. Ukázka separace proteinů v 11 cm dlouhém separačním kanálku (s polokruhovým průřezem a poloměrem 30 μm) je na obr. 5.

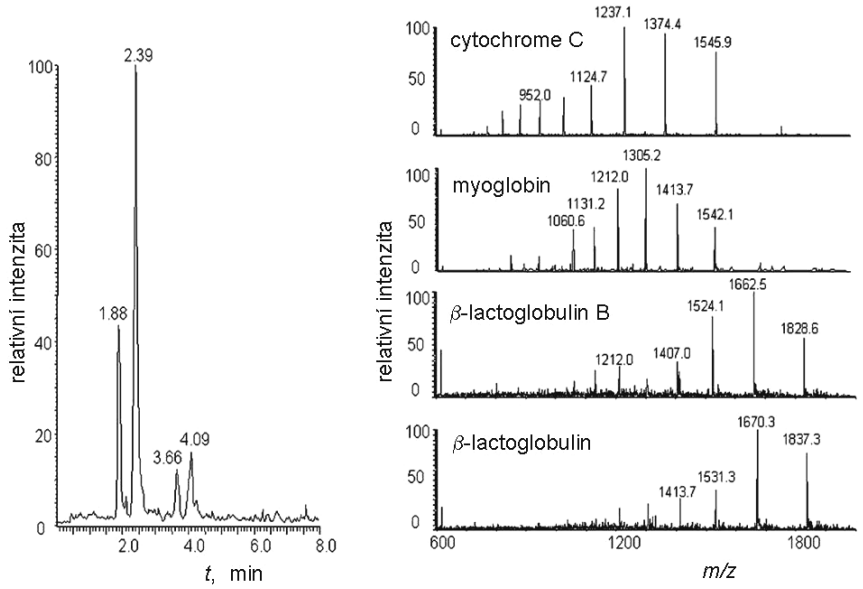
Dalším příkladem je analýza peptidů připravených trypsinovým štěpením 25 ng (5 μl) proteinu izolovaného po SDS elektroforéze[51]. Původní vzorek extraktu membránových proteinů z *H. influenzae* byl pro SDS elektroforézu aplikován v rozmezí 1–2 μg. Toto velmi malé počáteční množství vzorku dokumentuje schopnost mikrofluidických zařízení manipulovat a analyzovat stopová množství vzorků.

Odlišná koncepce mikroanalyzátoru byla uplatněna při návrhu sendvičového typu mikrozařízení z polykarbonátového bloku uzavřeného poly(ethylenetereftalátovým) filmem. V tomto návrhu byla laserovou ablací připravena i pyramidová ESI špička a zařízení bylo používáno pro isoelektrickou fokusaci a detekci proteinů MS (cit.[53,69]).

Kromě analýzy proteinů a peptidů bylo použití mikrofluidiky testováno i na řadě dalších vzorků, zejména pak pro separaci léčiv a metabolitů v tělesných tekutinách, což obvykle vyžaduje předúpravu vzorku (odsolení, deproteinaci atd.). Také zde se očekává, že mikrofluidika by mohla hrát důležitou roli, zvláště s využitím systémů integrujících separační kolonu s rozhraním ESI (cit.[70–72]). Je však třeba zdůraznit, že pro komerční úspěch bude třeba ještě ve vývoji pokračovat.

4. Závěr

Velké pokroky na poli mikrofluidiky mění bioanalytickou instrumentaci. Nejnovější trendy jsou publikovány ve specializovaných časopisech nebo speciálních číslech renomovaných časopisů[73]. Více detailních prací o mikrofluidice lze nalézt v nejnovějších souhrnných článcích[74,75]. Mikročipy mohou nabízet podstatné výhody, zvláště v souvislosti s on-line reaktory (IMER), pro čištění a zkoncentrování vzorku, nebo i pro jeho separaci. Vysoká rychlost separací na čipu je plně kompatibilní s velkým počtem analýz, které jsou ve spojení s hmotnostním spektrometrem vyžadovány v proteomice. Kapilární elektroforéza je nyní ve velké míře testována i na čipech. Spojení CE-MS umožňuje provést velké množství analýz ve velmi



Obr. 5. **Analýza CE-MS směsi proteinů**; základní elektrolyt 20 mM octan amonný-kyselina octová (pH 4,4), rozhraní ESI s kapalinovým spojem

krátké době. Stejně rychle lze provádět analýzy i s využitím chromatografických principů a lze předpokládat, že jak CE-MS, tak LC-MS budou dále vyvíjeny i v mikrofluidice. Dále lze očekávat, že paralelní separační mikrokolony[76] budou využívány i pro nanášení vzorků na MALDI terčíky pro hromadnou analýzu s využitím TOF (TOF-TOF) spektrometrů.

Tato práce byla podpořena z výzkumného záměru UIACH Z40310510 a projektů GA AV ČR S4031209 a GA ČR 203/03/0515.

LITERATURA

1. Manz A., Graber N., Widmer H. M.: Sens. Actuators B *1*, 244 (1990).
2. Manz A., Miyahara Y., Miura J., Watanabe Y., Miyagi H., Sato K.: Sens. Actuators B *1*, 249 (1990).
3. Manz A., Fettinger J. C., Verpoorte E. M. J., Lüdi H., Widmer H. M., Harrison D. J.: Trends Anal. Chem. *10*, 144 (1991).
4. Harrison D. J., Manz A., Fan Z. H., Lüdi H., Widmer H. M.: Anal. Chem. *64*, 1926 (1992).
5. Harrison D. J., Glavina P. G., Manz A.: Sens. Actuators B *10*, 107 (1993).
6. Jacobson S. C., Hergenröder R., Koutny L. B., Warmack R. J., Ramsey J. M.: Anal. Chem. *66*, 1107 (1994).
7. Jacobson S. C., Hergenröder R., Koutny L. B., Ramsey J. M.: Anal. Chem. *66*, 1114 (1994).
8. Jacobson S. C., Hergenröder R., Koutny L. B., Ramsey J. M.: Anal. Chem. *66*, 2369 (1994).
9. McEnery M., Tan A. M., Alderman J., Patterson J., O'Mathuna S. C., Glennon J. D.: Analyst *125*, 25 (2000)
10. Murakami Y., Takeuchi T., Yokoyama K., Tamiya E., Karube I., Suda M.: Anal. Chem. *65*, 2731 (1993).
11. Jacobson S. C., Koutny L. B., Hergenröder R., Moore A. W., Ramsey J. M.: Anal. Chem. *66*, 3472 (1994).
12. Jacobson S. C., Ramsey J. M.: Electrophoresis *16*, 481 (1995).
13. Jacobson S. C., Moore A. W., Ramsey J. M.: Anal. Chem. *67*, 2059 (1995).
14. Woolley A. T., Mathies R. A.: Anal. Chem. *67*, 3676 (1995).
15. Bousse L., Mouradian S., Minalla A., Yee H., Williams K., Dubrow R.: Anal. Chem. *73*, 1207 (2001).
16. Roberts M. A., Rossier J. S., Bercier P., Girault H.: Anal. Chem. *69*, 2035 (1997).
17. Duffy D. C., Schueller O. J. A., Brittain S. T., Whitesides G. M.: J. Micromech. Microeng. *9*, 211 (1999).
18. Martynova L., Locascio L. E., Gaitan M., Kramer G. W., Christensen R. G., MacCrehan W. A.: Anal. Chem. *69*, 4783 (1997).
19. Xu J. D., Locascio L., Gaitan M., Lee C. S.: Anal. Chem. *72*, 1930 (2000).
20. Ford S. M., Kar B., McWhorter S., Davies J., Soper S. A., Klopf M., Calderon G., Saile V.: J. Microcolumn. Sep. *10*, 413 (1998).
21. Madou M.: *Fundamentals of Microfabrication*. CRC Press, Boca Raton 1997.
22. Xue Q. F., Foret F., Dunayevskiy Y. M., Zavracky P. M., McGruer N. E., Karger B. L.: Anal. Chem. *69*, 426 (1997).
23. Ramsey R. S., Ramsey J. M.: Anal. Chem. *69*, 1174 (1997).
24. Xue Q. F., Dunayevskiy Y. M., Foret F., Karger B. L.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *11*, 1253 (1997).
25. Figeys D., Ning Y. B., Aebersold R.: Anal. Chem. *69*, 3153 (1997).
26. Figeys D., Aebersold R.: Anal. Chem. *70*, 3721 (1998).
27. Figeys D., Gygi S. P., McKinnon G., Aebersold R.: Anal. Chem. *70*, 3728 (1998).
28. Figeys D., Lock C., Taylor L., Aebersold R.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *12*, 1435 (1998).
29. Xu N. X., Lin Y. H., Hofstadler S. A., Matson D., Call C. J., Smith R. D.: Anal. Chem. *70*, 3553 (1998).
30. Xiang F., Lin Y. H., Wen J., Matson D.W., Smith R. D.: Anal. Chem. *71*, 1485 (1999).
31. Li J. J., Thibault P., Bings N. H., Skinner C. D., Wang C., Colyer C., Harrison D. J.: Anal. Chem. *71*, 3036 (1999).
32. Schultz G. A., Corso T. N., Prosser S. J., Zhang S.: Anal. Chem. *72*, 4058 (2000).
33. Tang K. Q., Lin Y. H., Matson D. W., Kim T., Smith R. D.: Anal. Chem. *73*, 1658 (2001).
34. Le Gac S., Arscott S., Ronaldo C.: Electrophoresis *24*, 3640 (2003).
35. http://www.iach.cz/ins/Useful%20Links.htm, staženo 20.10.05.
36. http://www.agilent.com/, staženo 20.10.05.
37. http://www.calipertech.com/, staženo 20.10.05.
38. http://www.biorad.com/, staženo 20.10.05.
39. Colón L.A., Maloney T. D., Fermier A. M.: J. Chromatogr., A *887*, 43 (2000).
40. Švec F.: J. Sep. Sci. *27*, 1419, (2004).
41. Křenková J., Foret F.: Electrophoresis *25*, 3550, (2004).
42. He B., Tait N., Regnier F.: Anal. Chem. *70*, 3790 (2000).
43. Zhang B. L., Foret F., Karger B. L.: Anal. Chem. *72*, 1015 (2000).
44. Laurell T., Wallman L., Nilsson J.: J. Micromech. Microeng. *9*, 369 (1999).
45. Laurell T., Nilsson J., Marco-Varga G.: J. Chromatogr., B: Biomed. Appl. *752*, 217 (2001).
46. Zhang B., Liu H., Karger B. L., Foret F.: Anal. Chem. *71*, 3258 (1999).
47. Lazar I. M., Sundberg S., Ramsey R. S., Ramsey J. M.: Anal. Chem. *71*, 3627 (1999).
48. Lazar I. M., Ramsey R. S., Jacobson S. C., Foote R. S., Ramsey J. M.: J. Chromatogr., A *892*, 195 (2000).
49. Bings N. H., Wang C., Skinner C. D., Colyer C. L., Thibault P., Harrison D. J.: Anal. Chem. *71*, 3292

(1999).
50. Li J. J., Wang C., Kelly J. F., Harrison D. J., Thibault P.: Electrophoresis *21*, 198 (2000).
51. Li J. J., Kelly J. F., Chemushevich I., Harrison D. J., Thibault P.: Anal. Chem. *72*, 599 (2000).
52. Licklider L., Wang X. Q., Desai A., Tai Y. C., Lee T. D.: Anal. Chem. *72*, 367 (2000).
53. Wen J., Lin Y. H., Xiang F., Matson D. W., Udseth H. R., Smith R. D.: Electrophoresis *21*, 191 (2000).
54. Lozano P., Martinez-Sanchez M., Lopez-Urdiales J. M.: Colloid Interface Sci. *276*, 392 (2004).
55. Svedberg M., Veszelei M., Axelsson J., Vangbo M., Nikolajeff F.: Lab. Chip *4*, 322 (2004).
56. Foret F., Zhou H. H., Gangl E., Karger B. L.: Electrophoresis *21*, 1363 (2000).
57. http://www.advion.com, staženo 20.10.05.
58. Rohner T. C., Rossier J. S., Girault H. H.: Anal. Chem. *73*, 5353, (2001).
59. Rossier J. S., Vollet C., Carnal A., Lagger G., Gobry V., Girault H. H., Michel P., Reymond F.: Lab. Chip *2*, 145 (2002).
60. Liu H. H., Felten C., Xue Q., Zhang B. L., Jedrzejewski P., Karger B. L., Foret F.: Anal. Chem. *72*, 3303 (2000).
61. Kapron J. T., Pace E., Van Pelt C. K., Henion J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *17*, 2019 (2003).
62. Leuthold L. A., Grivet C., Allen M., Baumert M., Hopfgartner G.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *18*, 1995 (2004).
63. Keetch C. A., Hernandez H., Sterling A., Baumert M., Allen M. H.: Anal. Chem. *75*, 4937 (2003).
64. Zamfir A., Vakhrushev S., Sterling A., Niebel H. J., Allen M., Peter-Katalinic J.: Anal. Chem. *76*, 2046 (2004).
65. Zhang S., Chelius D.: J. Biomol. Technol. *15*, 120 (2004).
66. Li Y., Cooper J. W., Lee C. S.: J. Chromatogr., A *979*, 241 (2002).
67. Lion N., Gobry V., Jensen H., Rossier J. S., Girault H. H.: Electrophoresis *23*, 3583 (2002).
68. Lion N., Gellon J. O., Jensen H., Girault H. H.: J. Chromatogr., A *1003*, 11 (2003).
69. Zhang B. L., Foret F., Karger B. L.: Anal. Chem. *73*, 2675 (2001).
70. Deng Y. Z., Zhang N. W., Henion J.: Anal. Chem. *73*, 1432 (2001).
71. Deng Y. Z., Henion J., Li J. J., Thibault P., Wang C., Harrison D. J.: Anal. Chem. *73*, 639 (2001).
72. Kameoka J., Craighead H. G., Zhang H. W., Henion J.: Anal. Chem. *73*, 1935 (2001).
73. Miniaturization 2004, Electrophoresis *25*, 2004.
74. Marco-Varga G., Nilsson J., Laurell T.: Electrophoresis *24*, 3521 (2003).
75. Lion N., Gellon J. O., Girault H. H.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *18*, 1614 (2004).
76. http://www.nanostream.com, staženo 20.10.05.

J. Grym and F. Foret *(Department of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno):* **Mikrofluidics: New Method of Treatment and Introduction of Samples for Mass Spectrometry**

Microfluidics is of special interest for handling very small samples without dead-volume connections and danger of sample cross-contamination typical of standard liquid couplings. Although the majority of the current systems is designed with optical or electrochemical detection coupling, those with mass spectrometry have been also demonstrated. The instruments for automated sample infusion analysis are now commercially available and microdevices utilizing chromatographic or capillary electrophoresis separation are developed. Background information on microchip manufacturing and microfluidic designs for interfaces to MS is presented. In addition to selected applications, potential future directions are also discussed.

METODICKÉ PŘÍSTUPY SOUČASNÉ FOSFOPROTEOMOVÉ ANALÝZY

PETR HALADA

Mikrobiologický ústav AV ČR Praha, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4
halada@biomed.cas.cz

Došlo 2.9.05, přijato 4.11.05.

Klíčová slova: fosforylace, proteomika, hmotnostní spektrometrie, posttranslační modifikace

Obsah

1. Úvod
2. Fosforylace proteinů
3. Metody selektivního záchytu fosfoproteinů a fosfopeptidů
4. Identifikace fosfopeptidů
5. Určení místa fosforylace
6. Kvantitativní fosfoproteomika
7. Závěr

1. Úvod

Genomová éra na konci minulého století odstartovala celou řadu sekvenačních projektů prokaryotických i eukaryotických organismů. V současné době je již přes 160 genomových projektů úspěšně dokončeno a sekvenace více než 600 genomů ještě probíhá[1]. Získání velkého počtu genomových sekvencí otevřelo nové možnosti biologického výzkumu a především umožnilo vznik nové vědní disciplíny – proteomiky. Tento mladý, ale rychle se rozvíjející obor, se zabývá detailním popisem veškerého proteinového komplementu genomu (proteomu) určité buňky, tkáně nebo organismu. Protože je proteom vždy studován v daném čase a za určitých podmínek, vystihuje přesně dynamiku zkoumaného systému. Jinými slovy lze říci, že proteom je „dynamický“, a naopak genom je považován za neměnný čili „statický“. Základním cílem proteomiky je objasnění struktury a funkce všech produktů genové exprese daného systému. To zahrnuje identifikaci každého proteinu včetně jeho kvantifikace, lokalizaci proteinu v buňce, určení protein-proteinových interakcí, analýzu multiproteinových komplexů a charakterizaci posttranslačních modifikací (PTM) jako jsou např. glykosylace a fosforylace. Fosforylace se vzhledem ke své úloze v biologických procesech řadí vůbec k nejdůležitějším a co do počtu k nejčastějším modifikacím proteinů. O jejím významu svědčí vyčlenění speciálního podoboru proteomové analýzy – fosfoproteomiky, která zkoumá veškeré fosfoproteiny v biologickém systému. Cílem této práce je podat ucelený pohled na status quo současné fosfoproteomové analýzy včetně přehledu nejužívanějších metodických postupů a nastínit nejen její možnosti, ale i omezení.

2. Fosforylace proteinů

Aktivita proteinů není určována pouze poměrem jejich biosyntézy a degradace, ale také specifickým procesem posttranslačních modifikací, které ovlivňují molekulární interakce proteinů, jejich funkci, stabilitu a lokalizaci. Fosforylace proteinů je jednou z nejdůležitějších kovalentních PTM v živých organismech. Reverzibilní fosforylace je hlavním regulátorem buněčných procesů jako jsou růst, dělení a diferenciace buňky, přenos signálu, genová exprese a metabolismus. Navázání fosfátové skupiny na molekulu proteinu katalyzují enzymy z rodiny proteinkinas, zatímco opačnou reakci, defosforylaci, katalyzují proteinfosfatasy. Buňka obsahuje stovky proteinkinas/proteinfosfatas, z nichž každá zodpovídá za fosforylaci/defosforylaci určitého proteinu nebo skupiny proteinů. Odhaduje se, že např. lidský genom kóduje přes 2000 kinas a více než 1000 fosfatas. Stav momentální fosforylace proteinu, a tím i jeho aktivity, závisí na poměru aktivit kinas a fosfatas, které na něj působí. U eukaryotických organismů se předpokládá, že téměř jedna třetina proteinů je fosforylovaných, a to na serinu (pS), threoninu (pT) nebo tyrosinu (pY) s relativním výskytem v poměru pS ~ 90 %, pT ~ 10 %, pY ~ 0,05 %. U baktérií byla také nalezena dosti vzácná fosforylace na histidinu, glutamové a asparagové kyselině. Pravděpodobnost, jestli bude daná aminokyselina fosforylována, pomůže odhadnout predikční program, který pro eukaryotické proteiny vyhodnocuje sekvenci v okolí aminokyseliny jako potenciální místo rozpoznávané proteinkinasami. Předpověď lze provést buď obecně[2] (NetPhos 2.0) nebo pro určitou kinasu[3] (NetPhosK 1.0).

Obdobně jako proteomika zkoumá veškerý proteinový komplement genomu, zabývá se fosfoproteomika globální analýzou fosforylace proteinů. K jejím hlavním cílům náleží identifikace fosfoproteinů a fosfopeptidů, přesné určení místa fosforylace a kvantifikace fosforylace. Vzhledem ke složitosti problematiky nelze pro splnění těchto cílů použít jedinou univerzální metodu, ale je nutno využít široké spektrum metodických přístupů[4–7]. Analýza fosfoproteomu tedy není vůbec jednoduchou a rutinní záležitostí, a to i přesto, že separační techniky a metody hmotnostní spektrometrie prošly během poslední dekády roz-

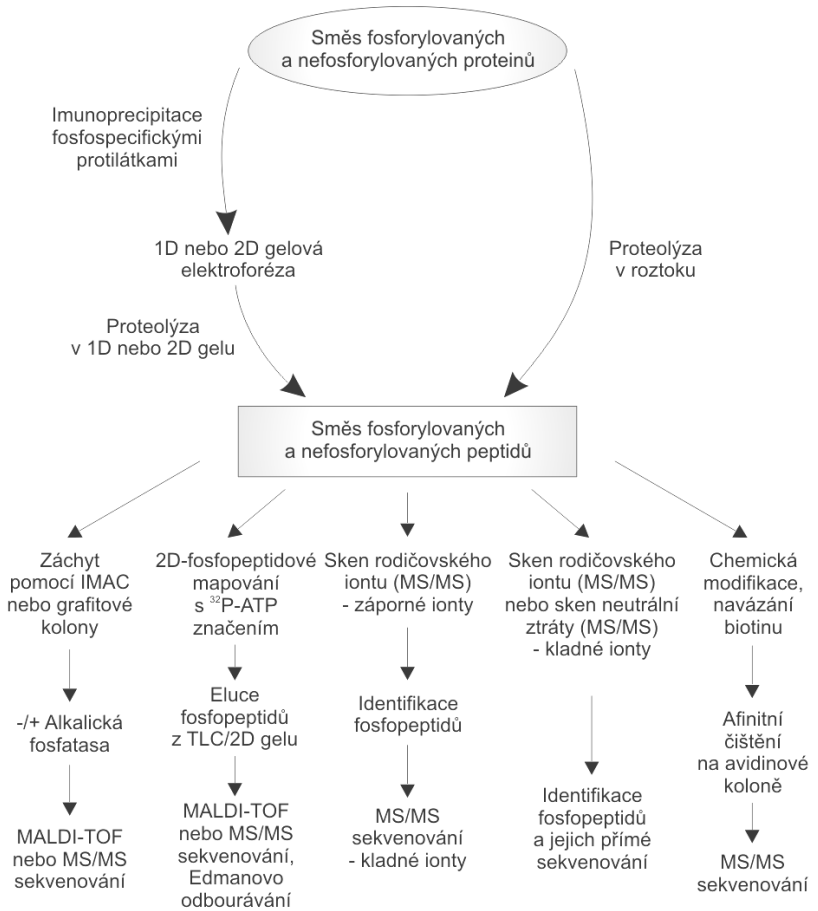
sáhlým vývojem. Obtíže při studiu fosforylace jsou způsobeny zejména následujícími důvody:

- Rozsah fosforylace je obecně nízký; jen nepatrná část proteinů v buňce je fosforylovaná v určitém čase.
- Absolutní množství fosfoproteinu v buňce je velmi malé.
- Místa fosforylace stejného proteinu se mohou lišit. Fosfoprotein je heterogenní, tzn. existuje v několika různých fosforylovaných formách.
- Dynamický rozsah používaných analytických metod pro studium fosforylace je omezený. Výsledkem je, že jsou identifikovány pouze majoritní formy fosfoproteinu, zatímco minoritní nejsou vůbec detegovány.
- V důsledku kontaminace fosfatasami může během přípravy vzorku docházet k částečnému odštěpení fosfátových skupin.
- Vzhledem ke kyselému a hydrofilnímu charakteru fosfopeptidů je účinnost jejich ionizace při analýzách MS podstatně nižší v porovnání s nemodifikovanými peptidy. Současně může docházet ke ztrátám fosfopeptidů na nosiči používaném na odsolení nebo separaci peptidové směsi vzniklé po proteolytickém štěpení fosfoproteinu.

V posledních letech byla vyvinuta a optimalizována celá řada metodických přístupů, které se snaží odstranit nebo alespoň zmírnit výše uvedené komplikace při fosfoproteomové analýze. K nim patří především izolace fosfopeptidů/fosfoproteinů pomocí specifických protilátek nebo s využitím afinitní chromatografie, diferenční peptidové mapování po enzymové defosforylaci alkalickou fosfatasou, použití aditiv zvyšujících signál fosfopeptidů při analýze MS a využití speciálních skenovacích funkcí hmotnostního spektrometru pro selektivní detekci fosfopeptidů v složitých směsích.

3. Metody selektivního záchytu fosfoproteinů a fosfopeptidů

Jak již bylo uvedeno, pouze nepatrná část proteinů v proteomu je v daném časovém okamžiku fosforylována. Pro úspěšnou charakterizaci fosforylace je proto nezbytné fosfoprotein/fosfopeptid izolovat buď s využitím specific-



Obr. 1. **Přehled nejčastěji užívaných metod pro izolaci a identifikaci fosforylovaných proteinů a peptidů**

kých protilátek, afinitní chromatografie s imobilizovanými ionty kovů (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC) či metodami s chemickou modifikací fosfátové skupiny (obr. 1).

Nejjednodušší metodou selektivního záchytu fosfoproteinů je imunoprecipitace pomocí fosfospecifických protilátek. Již delší dobu jsou komerčně dostupné protilátky proti pY, které umožňují imunoprecipitaci a následně i izolaci pY proteinů z komplexních směsí[8]. Snahy o selektivní záchyt pY peptidů pomocí těchto protilátek nebyly zatím úspěšné[9]. Pokusy izolovat pS a pT proteiny jsou v současnosti stále ojedinělé[10].

Afinitní chromatografie s imobilizovanými ionty kovů představuje bezesporu nejběžnější techniku pro selektivní záchyt fosfopeptidů[11,12]. Metodu lze použít pro pS, pT i pY peptidy. Je založena na vysoké afinitě záporně nabité hydrofilní fosfátové skupiny k iontům kovu, nejčastěji Fe^{3+} a Ga^{3+}. Ionty kovu jsou imobilizovány na chelatačním nosiči, kterým bývá iminodioctová nebo nitrilotrioctová kyselina. Zachycené fosfopeptidy jsou pak z nosiče uvolněny zvýšením pH (přídavkem NH_4OH) nebo fosfátem, což vyžaduje odsolení před analýzou MS. Pro přečištění fosfopeptidů se vzhledem k jejich hydrofilnímu charakteru nedoporučují nosiče na bázi reverzní fáze (Reversed Phase, RP) C18, na kterých dochází k velkým ztrátám. Mnohem vhodnější[13] je materiál Poros Oligo R3, který byl původně vyvinut pro čištění DNA/RNA. Ještě lepší výsledky byly nedávno dosaženy s mikrokolonkami naplněnými grafitovým práškem[14]. Získané fosfopeptidy mohou být měřeny v uspořádání off-line či on-line hmotnostní spektrometrií, případně je analýza MS spojena s defosforylací alkalickou fosfatasou[13]. Limitujícími faktory IMAC může být nižší afinita některých fosfopeptidů k materiálu IMAC, potíže při uvolnění fosfopeptidů s více fosfátovými skupinami a především nespecifický záchyt nefosforylovaných peptidů bohatých na aminokyseliny s karboxylovými skupinami (glutamová a asparagová kyselina). Posledně uvedený nedostatek lze minimalizovat derivatizací všech peptidů esterifikací methanolem, která významně snižuje nespecifickou vazbu karboxylových skupin při IMAC postupu[15]. Možnost aplikace IMAC pro izolaci fosfoproteinů zatím nebyla testována.

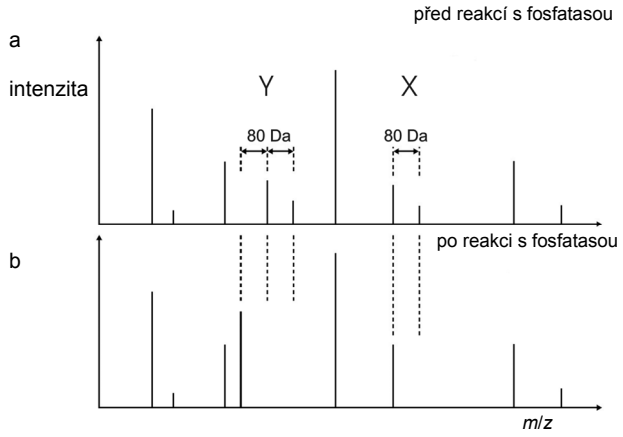
Pinkse a spol. nedávno prezentovali slibnou techniku[16] pro selektivní záchyt fosfopeptidů na předkolonce naplněné nosičem na bázi oxidu titaničitého (Titansphere). Metoda je založena na dvourozměrné chromatografii spojené přímo s hmotnostním spektrometrem.V prvním rozměru je zapojena kolona s TiO_2 a za ní následuje kolona RP. Fosfopeptidy jsou při kyselém pH selektivně zachyceny na první koloně, zatímco nemodifikované peptidy procházejí až na kolonu RP. Z ní jsou postupně eluovány a vstupují do hmotnostního spektrometru. Teprve poté jsou zvýšením pH z první kolony vymyty fosfopeptidy, které jsou po zkoncentrování na koloně RP nastřikovány k analýze MS. Tato metoda je v porovnání s technikou IMAC méně pracná a mohla by nalézt uplatnění při analýzách složitých směsí.

Jiný metodický přístup pro záchyt fosfoproteinů/fosfopeptidů založený na chemické derivatizaci fosfátové skupiny byl publikován současně dvěmi pracovišti. Oda a spol.[17] nejprve vystaví směs peptidů či proteinů vysokému pH, při kterém se β-eliminací odštěpuje H_3PO_4 za vzniku reaktivní dvojné vazby. Ta následně reaguje s nukleofilním činidlem, ethan-1,2-dithiolem, na jehož volnou thiolovou skupinu se naváže biotin. Takto označené peptidy/proteiny lze pak jednoduše izolovat afinitním čištěním na avidinové koloně. Popsaný postup je použitelný jen pro pS a pT peptidy/proteiny a vyžaduje modifikaci reaktivních cysteinových zbytků oxidací kyselinou permravenčí. Současně se ovšem oxiduje methionin na sulfon a tryptofan na dvě formy s dvěma a třemi kyslíkovými atomy. Případná *O*-glykosylace, která také snadno podléhá β-eliminaci, způsobuje další komplikace. U druhé strategie[18] jsou proteiny po alkylaci cysteinů nejprve štěpeny specifickou proteasou. Karboxylové skupiny vzniklých peptidů jsou derivatizovány amidací a aminoskupiny chráněny *terc*-butoxykarbonylovou skupinou. Takto ochráněné fosfopeptidy jsou modifikovány kondenzací s cystaminem, kovalentně zachyceny na pevném nosiči s imobilizovanou jodoctovou kyselinou, následně promyty a uvolněny trifluoroctovou kyselinou. Metoda byla použita pro pS, pT a také pro pY peptidy, nebyla však zatím vyzkoušena přímo na intaktních proteinech. Oba postupy se skládají z celé řady chemických reakcí a čistících kroků, z nichž každý představuje nezanedbatelné ztráty. Dostatečné množství materiálu je tedy obecným požadavkem přístupu založeného na chemické derivatizaci, což zatím umožňuje pouze záchyt hojně se vyskytujících fosfopeptidů/fosfoproteinů. Nespornou výhodou těchto metod je nahrazení záporně nabitého fosfátu neutrální funkční skupinou. Nově modifikovaný peptid se v porovnání s původním fosfopeptidem mnohem lépe ionizuje a také ochotněji fragmentuje. Přitom je nová funkční skupina dostatečně stabilní a při fragmentaci nedochází k jejímu přednostnímu odštěpení, což umožní snadno určit místo fosforylace (viz kapitoly 4, 5).

4. Identifikace fosfopeptidů

Prvním z úkolů fosfoproteomiky je identifikace fosfopeptidů neboli jejich odlišení od ostatních přítomných peptidů. Tradiční metody (obr. 1) zahrnují enzymové označení proteinu radioaktivním ATP následované proteolytickým štěpením. Vzniklá směs peptidů je pak rozdělena metodami HPLC, TLC (cit.[19,20]) nebo dvourozměrnou gelovou elektroforézou[21] (2DE) a fosfopeptidy jsou detegovány díky své radioaktivitě buď jako frakce HPLC, skvrna na gelu či na desce TLC. Tento postup fosfopeptidového mapování je dosti pracný a zdlouhavý, navíc vyžaduje práci s neoblíbenou radioaktivitou.

V poslední době zaujímají ve fosfoproteomové analýze výhradní místo metody založené na hmotnostní spektrometrii. MS poskytuje informaci o molekulové hmotnosti (Molecular Weight, MW), tedy o vlastnosti, která je charakteristická pro každé chemické individuum. Uvážíme-li, že každá PTM proteinu mění jeho hmotnost, je MS určitě



Obr. 2. **Diferenční fosfopeptidové mapování;** srovnání hmotnostních spekter MALDI-TOF trypsinového digestu před (a) a po (b) reakci s alkalickou fosfatasou umožní jednoznačnou detekci fosfopeptidů. Píky fosfopeptidů po reakci zcela zmizí. Hmotnostní rozdíl (Δm, násobek 80 Da odpovídá jednomu fosfátu) mezi signály fosfopeptidu a jeho defosforylovaného analogu určí počet navázaných fosfátových skupin. Peptid X tedy obsahuje jeden fosfát ($\Delta m = 1 \times 80$ Da), zatímco v sekvenci peptidu Y jsou navázány dvě fosfátové skupiny ($\Delta m = 2 \times 80$ Da)

ideálním nástrojem k analýze PTM. Každá fosfátová skupina navázaná na serin, threonin či tyrosin vede ke zvýšení molekulové hmotnosti o 80 hmotnostních jednotek, tzv. Daltonů (Da). Změření MW intaktního fosfoproteinu v kombinaci se znalostí MW nemodifikovaného proteinu či defosforylací fosfatasou umožní určení průměrného počtu fosfátů navázaných na polypeptidový řetězec. Takto získáme pouze hrubý odhad, pro získání přesnější informace je nutné podrobit protein proteolýze a pracovat s jeho fragmenty – peptidy. Pokud je sekvence proteinu známá, interpretace hmotnostního spektra peptidů – peptidové mapy, odhalí fosfopeptidové kandidáty jako píky s MW vyšší o násobky 80 Da než by příslušelo nemodifikovanému peptidu. Mnohem průkaznější je porovnání peptidových map před a po reakci s alkalickou fosfatasou[22] (obr. 2). Pokud najdeme ve spektrech odpovídající píky fosfopeptidu a jeho defosforylovaného analogu, odečteme navíc z rozdílu jejich MW počet fosfátů navázaných na původním fosforylovaném peptidu. Pokud najdeme v peptidové mapě po defosforylaci pouze nový signál, určíme peptid, který byl modifikován, ale ne počet fosfátů v jeho sekvenci. Nepřítomnost signálu fosfopeptidu ve spektru je typická pro větší (MW > 2500 Da) a vícenásobně fosforylované peptidy. S cílem získat co nejvíce informací z jednoho vzorku a snížit požadované množství proteinu lze defosforylaci provést přímo na terčíku MALDI po předchozím změření peptidové mapy[13]. Pro identifikaci pS a pT peptidů lze rovněž využít β-eliminace s následnou derivatizací původních fosfopeptidů směsí dvou alkanthiolů (např. C3 a C7)[23]. Tyto modifikované peptidy lze pak ve spektrech snadno rozpoznat díky charakteristické dvojici píků lišících se o 56 Da.

Vysoce specifickou metodu detekce fosfopeptidů představuje využití speciálních skenovacích funkcí tandemových hmotnostních spektrometrů jako je sken neutrálních ztrát a sken rodičovského iontu. Nicméně již běžná analýza MALDI-TOF může někdy odhalit fosfopeptidy díky jejich charakteristické fragmentaci[24]. Při měření v režimu kladných iontů vykazují pS a pT peptidy významnou ztrátu neutrální molekuly H_3PO_4 za vzniku četného iontu $[MH-98]^+$. Ten je doprovázen minoritním iontem $[MH-80]^+$, který odpovídá ztrátě HPO_3. Naopak ve spektrech pY peptidů dominuje pík iontu $[MH-80]^+$, což umožňuje jejich odlišení od pS a pT peptidů. Rozdílná fragmentace je vysvětlována vyšší stabilitou aromatického kruhu fosfotyrosinu.

Typická ztráta molekuly H_3PO_4 se nabízí pro detekci pS a pT peptidů ve složitých směsích s využitím skenu neutrálních ztrát. Za podmínek kolizně indukované disociace (Collisonally Induced Dissociation, CID) dochází k β-eliminaci H_3PO_4 z pS a pT za vzniku dehydroalaninu a dehydroamino-2-máselné kyseliny. Tento experiment lze provést jen u tandemových hmotnostních spektrometrů (MS/MS) jako je trojnásobný kvadrupól (Triple Stage Quadrupole, TSQ)[25], kvadrupól v kombinaci s analyzátorem z doby letu (Time Of Flight, Q-TOF), případně iontová past (Ion Trap, IT). Spektrometr je nastaven tak, že hledá kolizní spektra, která vykazují ztrátu 98, 49 a 32,3 Da odpovídající eliminaci H_3PO_4 z jednou, dvakrát a třikrát nabitých rodičovských iontů fosfopeptidů. Současně je z iontu vznikajícího neutrální ztrátou H_3PO_4 získáno spektrum MS/MS poskytující informaci o lokalizaci fosforylace. Původní pS a pT je pak v sekvenci peptidu identifikován jako dehydroalanin (69 Da) a dehydroamino-2-máselná kyselina (83 Da).

Za podmínek CID při analýze MS v režimu záporných iontů poskytují pS, pT i pY peptidy v alkalickém prostředí diagnostický ion PO_3^- (79 Da), který dovoluje jejich vysoce specifickou detekci pomocí skenu rodičovského iontu[26,27]. Při experimentu se zaznamenávají jen spektra rodičovských iontů (prekurzorů) poskytujících charakteristický ion 79 Da. Tato spektra obsahují pouze molekulární ion prekurzoru (fosfopeptidu). Pokud známe sekvenci proteinu, je tato informace dostačující pro přiřazení peptidu, který je fosforylován. Případné sekvenování pro detailní určení místa fosforylace vyžaduje změnu polarity spektrometru do režimu kladných iontů a rovněž snížení pH, což brání využití této metody při uspořádání LC-MS/MS.

Pro selektivní detekci pY peptidů byla vyvinuta metoda[28] založená na tvorbě imoniového iontu fosfotyrosinu s *m/z* 216,043. Technika vyžaduje hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením (Q-TOF) dovolující jednoznačně odlišit diagnostický fosfotyrosinový ion od ostatních interferujících peptidových fragmentů se stejnou hodnotou *m/z*. Měření se provádí v režimu kladných iontů, což usnadňuje sekvenování pY peptidu. Vzhledem k nestabilnímu chování pS a pT za podmínek CID nelze metodu použít pro detekci pS a pT peptidů .

Jiná technika umožňující identifikaci pS, pT i pY

peptidů kombinuje β-eliminaci fosfátu, chemickou derivatizaci a sken rodičovského iontu[29]. β-Eliminací v alkalickém prostředí vzniká reaktivní dvojná vazba, na kterou se aduje 2-(dimethylamino)ethan-1-thiol. Vytvořený thioether se oxiduje peroxidem vodíku na odpovídající sulfoxid, který se při CID snadno štěpí za vzniku derivátu sulfenové kyseliny s *m/z* 122. Tento ion díky své jedinečné hodnotě *m/z* jednoznačně odlišuje fosfopeptidy od ostatních peptidů. Techniku lze provádět i na spektrometru s nízkým rozlišením a rovněž v uspořádání LC-MS/MS.

Pro specifickou detekci fosfopeptidů jsou k dispozici také dvě méně známé techniky. První monitoruje přítomnost izotopu ^{31}P během HPLC separace digestu fosfoproteinu metodou MS s indukčně vázaným plazmatem (Inductively Coupled Plasma, ICP)[30]. Pro odlišení izobarických iontů s ^{31}P je nutno mít spektrometr s dostatečným rozlišením (většinou sektorový přístroj). Molekulová hmotnost fosfopeptidů je poté určena v samostatné analýze LC-MS s ionizací elektrosprejem (Electrospray Ionization, ESI). Měření poměru ^{31}P a ^{32}S metodou ICP-MS lze využít pro stanovení průměrného zastoupení fosfátu v molekule proteinu[31]. Druhá technika vychází ze skutečnosti, že fosforylace způsobuje změnu konformace peptidových iontů v plynné fázi[32,33]. Tato změna je detegována hmotnostním spektrometrem měřícím mobilitu iontů.

Kromě již popsaných technik existuje několik „triků“, většinou ve spojení s ionizací MALDI, jak snadno odhalit fosfopeptidy. Prvním je změření proteinového digestu v režimu záporných iontů na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF. Fosfopeptidy mají obecně velmi nízkou ionizační účinnost v režimu kladných iontů, zatímco v režimu záporných iontů dávají velmi intenzivní odezvy v porovnání se svými nefosforylovanými analogy[34]. To se projeví mnohem více, když se peptidy před analýzou MALDI esterifikují methanolem[35]. Jednoduché srovnání spekter měřených v režimu kladných a záporných iontů pomůže najít signály, které by mohly patřit fosfopeptidům.

Důležitým aspektem je rovněž volba matrice MALDI. Nejběžnějšími matricemi pro analýzu peptidů jsou 4-hydroxy-α-kyanskořicová a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB). Pro fosfopeptidy je vzhledem k jejich hydrofilnímu charakteru mnohem vhodnější DHB. Jako vhodná matrice je rovněž doporučován 2',4',6'-trihydroxyacetofenon s přídavkem citrátu amonného[36]. Přídavek aditiv jako jsou amonné soli[37] či kyselina fosforečná[38] k matrici MALDI je další možností, jak zvýraznit signál fosforylovaných peptidů. Navíc bylo zjištěno, že směs DHB a kyseliny fosforečné je výborným elučním činidlem při technice IMAC[39].

5. Určení místa fosforylace

Detekce fosfopeptidů je jen prvním krokem fosfoproteomové analýzy. Dalším logickým požadavkem je určení místa fosforylace. K tomu slouží dnes již výhradně tandemová hmotnostní spektrometrie (obr. 1), která zcela vytlačila tradiční Edmanovo odbourávání. Pokud je známa sekvence peptidu a ta obsahuje jen jeden serin, threonin či tyrosin, je přiřazení místa fosforylace snadné a vystačíme pouze se znalostí MW peptidu. Většina případů ovšem není tak triviálních (peptid obsahuje více hydroxyaminokyselin) a vyžaduje fragmentaci peptidu metodami MS/MS. Experimenty MS/MS se nejčastěji provádějí na IT (cit.[40,41]), TSQ (cit.[27,42]) a Q-TOF (cit.[43]) spektrometrech. Vzhledem k nestabilnímu chování fosfátové skupiny je hlavním procesem za podmínek CID ztráta fosfátu ve formě H_3PO_4 nebo HPO_3. Stabilita klesá v pořadí pY > pT > pS. Fosfát se proto nejsnáze uvolňuje z pS, nejméně ochotně z pY. Pro pS a pT je charakteristická ztráta H_3PO_4, u pY dominuje uvolnění HPO_3. Ochota uvolnit fosfátovou skupinu souvisí s nábojovým stavem peptidu a je největší pro jednou nabité ionty. U vícenásobně nabitých peptidů je k dispozici mobilní proton, který vyvolá fragmentaci peptidového řetězce za vzniku sekvenčních b- a y-iontů[44] umožňující určení místa navázání fosfátu. Někdy ovšem ztráta fosfátu převažuje a k fragmentaci peptidového řetězce téměř nedochází, což komplikuje lokalizaci místa modifikace. Komplikaci rovněž způsobují ztráty fosfátu a vody z b- a y-iontů, kdy navíc dostáváme fragmentové ionty b-98, y-98, b-18, y-18, případně b-80 a y-80. To platí především pro pS, méně již pro pT. Řešením může být nahrazení labilního fosfátu stabilní funkční skupinou. Fosfát se odstraní β-eliminací hydroxidem a protein se nechá reagovat buď s ethanthiolem[45] nebo siřičitanem sodným[46]. V prvním případě je pS/pT převeden na *S*-ethylcystein nebo β-methyl-*S*-ethylcystein, ve druhém na cysteovou nebo β-methylcysteovou kyselinu. Takto modifikované peptidy fragmentují podél celého peptidového řetězce a poskytují úplnější sekvenční informaci dovolující snažší určení místa fosforylace.

Skvělou metodou pro lokalizaci fosforylace je disociace záchytem elektronu (Electron Capture Dissociation, ECD) ve spojení s hmotnostní spektrometrií s iontovou cyklotronovou resonancí s Fourierovou transformací (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FTICR). ECD vyvolává rozsáhlejší a rovnoměrnější fragmentaci peptidu než CID a tím dosahuje vyššího pokrytí sekvence. Při ECD dále nedochází ke ztrátám H_3PO_4, HPO_3 ani H_2O, což dovoluje přímou identifikaci fosforylačních míst[47]. Díky extrémně vysokému rozlišení spektrometrů FTICR mohou být touto technikou studovány také velké peptidy i celé proteiny[48].

Jiná technika pro lokalizaci fosforylace využívá β-eliminace v kombinaci s adicí s 2-aminoethan-1-thiolem[49,50]. Před touto reakcí jsou všechny lysiny ochráněny a až poté jsou pS a pT selektivně přeměněny na analogy lysinu, *S*-(2-aminoethyl)cystein a β-methyl-*S*-(2-aminoethyl)cystein. Modifikované peptidy jsou štěpeny Lys-C proteasou a následná analýza MS pak jednoduše určí místa fosforylace. Nevýhodou je, že stejnou reakci podstupují také *O*-glykosylovaný serin a threonin.

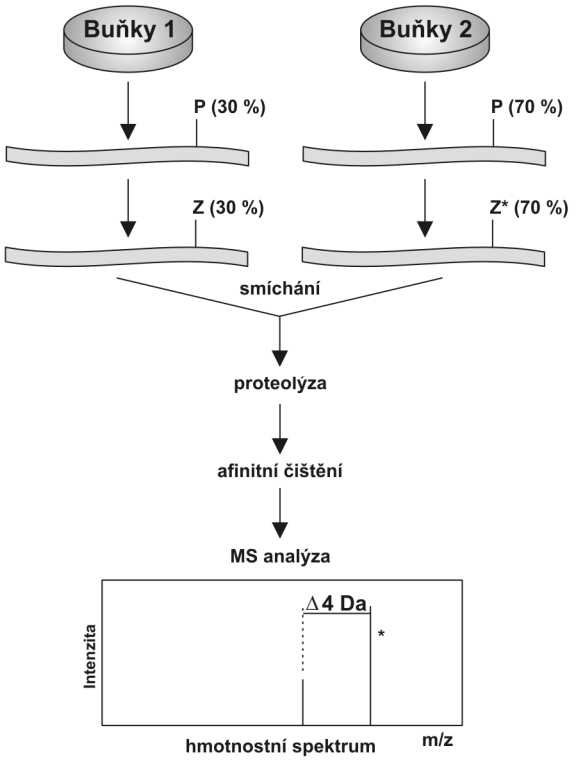
6. Kvantitativní fosfoproteomika

S ohledem na dynamické chování biologických systémů není identifikace fosfopeptidu a určení místa fosforylace dostačující informací pro pochopení úlohy daného fosfoproteinu v organismu. Dále by nás mělo zajímat, jak se fosforylace určitého místa mění v čase a jaký je stupeň této fosforylace v daném časovém okamžiku. Odpovědět na tyto otázky je schopna kvantitativní fosfoproteomika, u které je nutno ještě rozlišovat mezi určením relativní a absolutní stechiometrie fosforylace. Relativní kvantifikace sleduje změnu fosforylace určitého místa mezi dvěma buněčnými stavy, zatímco ve druhém případě se měří absolutní stechiometrie daného fosforylačního místa neboli stupeň fosforylace, tj. poměr fosforylované a nefosforylované formy, případně celkové množství fosfopeptidu, potažmo fosfoproteinu ve vzorku.

Techniky relativní kvantifikace jsou založeny na izotopovém značení proteinů buď *in vivo* během růstu buněk nebo *in vitro* chemickou derivatizací, která navíc umožňuje selektivní záchyt a detekci původního fosfopeptidu. Při *in vivo* značení roste jedna kultura na běžném kultivačním médiu, zatímco při druhé kultivaci stejné médium obsahuje výhradně izotop ^{15}N. Po určité době jsou obě kultivace spojeny, vybrané proteiny jsou separovány, podrobeny proteolytickému štěpení a analýze MS. Protože během růstu buněk byly inkorporovány oba izotopy dusíku (^{14}N a ^{15}N), naměříme pro každý proteolytický fragment dvojici píků. Poměr intenzit fosfopeptidu s ^{14}N a jeho nemodifikovaného analogu značeného ^{15}N pak odpovídá změně hladiny fosforylace určitého místa daného proteinu[51]. Provedení této techniky je velmi jednoduché, nedovoluje ale žádné selektivní zachycení fosfoproteinu/fosfopeptidu. Alternativou *in vivo* značení je tzv. metoda SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture), která pro vnesení těžkého izotopu využívá značených aminokyselin[52,53]. Strategie SILAC v kombinaci s izolací peptidů metodou IMAC byla nedávno úspěšně aplikována při kvantitativní analýze kvasinkového fosfoproteomu[54].

In vitro značení vychází z metody izotopicky kódovaných afinitních značek (Isotope Coded Affinity Tag, ICAT) uplatňovaných v klasické kvantitativní proteomice[55]. Rozšíření tohoto postupu pro kvantifikaci fosforylace (pouze pro pS a pT) se nazývá PhIAT (Phosphoprotein Isotope Coded Affinity Tag) a je uvedeno na obr. 3. Strategie PhIAT zahrnuje hydroxidem vyvolanou β-eliminaci fosfátu následovanou adicí ethan-1,2-dithiolu (EDT), který obsahuje buď čtyři vodíkové atomy nebo čtyři deuteria[56,57]. Po spojení obou vzorků se na volnou skupinu SH druhého thiolu naváže biotin, který umožní selektivní izolaci původních fosfopeptidů afinitní chromatografií. Získaná směs je analyzována na spektrometru LC-MS/MS, který určí sekvenci peptidu a místo fosforylace. Relativní změna fosforylace jednotlivých fosfopeptidů se odečte z poměru intenzit píků nativního a deuterovaného peptidu, které jsou ve spektrech snadno odhaleny díky jejich hmotnostnímu rozdílu 4 Da (D_0/D_4). Technika PhIAT byla po svém zavedení autory nepatrně modifikována[58]. Peptidy s EDT jsou v jednom stupni zachyceny a izotopově označeny na pevném nosiči obsahujícím buď lehké nebo těžké izotopy. Navázané peptidy jsou z nosiče uvolněny fotochemicky UV zářením a analyzovány LC-MS/MS. Jsou popsány také postupy nahrazující EDT jinými chemickými značkami[59,60].

Zatímco techniky relativní kvantifikace byly aplikovány i pro reálné vzorky, je absolutní stechiometrie fosforylace poněkud méně prozkoumanou oblastí, pro kterou bylo vyvinuto jen několik metodických přístupů. U prvního je nejprve vzorek rozdělen a obě poloviny jsou diferenčně izotopově označeny. Jedna z frakcí je defosforylována alkalickou fosfatasou, obě frakce jsou spojeny zpět a analyzovány MS. Stupeň fosforylace je odvozen ze srovnání intenzit signálů dvou diferenčně značených nefosforylovaných peptidů, přičemž se předpokládá, že nárůst



Obr. 3. **Kvantifikace relativní stechiometrie fosforylace metodou PhIAT využívající izotopově kódovaných afinitních značek;** změna fosforylace je určována pro dva rozdílné buněčné stavy (Buňky 1 a Buňky 2). Hladina fosforylace jednoho určitého fosforylačního místa je 30 % pro Buňky 1 a 70 % pro Buňky 2. Fosfát je nejprve nahrazen chemickou derivatizací afinitní značkou Z, která je u Buněk 2 izotopově označena čtyřmi atomy deuteria odpovídající hmotnostnímu rozdílu 4 Da (Z*). Po smíchání obou kultivací jsou proteiny štěpeny specifickou proteasou. Původně fosforylované peptidy jsou pak pomocí značky přečištěny a analyzovány hmotnostní spektrometrií. Relativní změna fosforylace se odečte z poměru intenzit píků nativního a deuterovaného peptidu (s hvězdičkou), které jsou ve spektrech snadno rozpoznány díky jejich hmotnostnímu rozdílu 4 Da

jeho intenzity odpovídá defosforylaci původního fosfopeptidu[61,62]. Druhá metoda nazvaná AQUA (Absolute QUAntification) je založena na izotopovém zřeďování[63]. Nejdříve je vybrán vhodný fosfopeptid, který bude sloužit pro kvantifikaci. Tento peptid je syntetizován s izotopově značenou aminokyselinou a použit jako interní standard, který je ve známém množství přidán ke vzorku. Absolutní kvantifikace je pak provedena na základě srovnání intenzit dvou odpovídajících píků fosforylovaného peptidu (izotopově značeného a nativního). V současné době byla prezentována zcela nová technika nevyžadující pracné a nákladné izotopické značení[64]. Metoda je založena na měření normalizovaného iontového proudu a umožňuje relativní i absolutní stanovení stechiometrie fosforylace.

7. Závěr

Přestože byla v posledních letech vyvinuta a rozpracována celá řada metodických přístupů pro izolaci, detekci, identifikaci a kvantifikaci fosfoproteinů, není charakterizace fosforylace minoritních proteinů nebo fosfoproteinů v komplexních směsích vůbec rutinní záležitostí. Navíc ve fosfoproteomice neexistuje jedna univerzální technika, a proto je nutno ze širokého spektra dostupných metod vybrat pro analýzu každého fosfoproteinu tu správnou individuální strategii. Klíčovými parametry ovlivňujícími volbu vhodné metody jsou množství proteinu, typ aminokyseliny, která je fosforylována, zda je k dispozici čistý fosfoprotein nebo komplexní směs proteinů a v neposlední řadě druh informace, který chceme získat. Jestliže pro identifikaci proteinu metodou peptidového mapování vystačíme s několika femtomoly, pro charakterizaci fosforylace, a PTM obecně, je nutno mít k dispozici množství proteinu minimálně řádu pikomolů. Pravděpodobnost úspěchu analýzy bude vždy vyšší, použijeme-li jakoukoliv techniku selektivního záchytu fosfoproteinu/fosfopeptidu. V nejbližší době lze očekávat, že se vzrůstajícím počtem známých proteinových sekvencí bude pro izolaci fosfoproteinů stále více využíváno fosfospecifických protilátek, především proti fosfoserinu a fosfothreoninu. Techniky selektivního záchytu fosfoproteinů/fosfopeptidů založené na chemické modifikaci a metodě IMAC budou optimalizovány se snahou o jejich on-line napojení na hmotnostní spektrometr pomocí čipové technologie. Díky schopnosti dosáhnout při peptidovém mapování až 100% pokrytí sekvence proteinu lze rovněž předpokládat častější využívání prozatím unikátní instrumentace FTICR. V kombinaci s technikou ECD je možné navíc získat informačně bohatší spektrum MS/MS než při experimentu CID a tak jednoznačně určit místo fosforylace. Kromě studia jednotlivých fosfoproteinů budou nové trendy fosfoproteomové analýzy směrovány na „globální“ charakterizaci fosforylace souboru proteinů celých organel nebo buněk.

Sepsání této publikace bylo podporováno grantovým projektem GAČR (204/04/0571) a výzkumným záměrem AV0Z50200510.

LITERATURA

1. http://ergo.integratedgenomics.com/ERGO_supplement/genomes.html, staženo 31.3.2005.
2. http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/, staženo 31.3.2005.
3. http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/, staženo 31.3.2005.
4. Mann M., Ong S. E., Gronborg M., Steen H., Jensen O. N., Pandey A.: Trends Biotechnol. *20*, 261 (2002).
5. Kalume D. E., Molina H., Pandey A.: Curr. Opin. Chem. Biol. *7*, 64 (2003).
6. McLachlin D. T., Chait B. T.: Curr. Opin. Chem. Biol. *5*, 591 (2001).
7. Salih E.: Mass Spectrom. Rev. (2004).
8. Pandey A., Podtelejnikov A. V., Blagoev B., Bustelo X. R., Mann M., Lodish H. F.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *97*, 179 (2000).
9. Marcus K., Immler D., Sternberger J., Meyer H. E.: Electrophoresis *21*, 2622 (2000).
10. Gronborg M., Kristiansen T. Z., Stensballe A., Andersen J. S., Ohara O., Mann M., Jensen O. N., Pandey A.: Mol. Cell. Proteomics *1*, 517 (2002).
11. Posewitz M. C., Tempst P.: Anal. Chem. *71*, 2883 (1999).
12. Stensballe A., Andersen S., Jensen O. N.: Proteomics *1*, 207 (2001).
13. Larsen M. R., Sorensen G. L., Fey S. J., Larsen P. M., Roepstorff P.: Proteomics *1*, 223 (2001).
14. Larsen M. R., Graham M. E., Robinson P. J., Roepstorff P.: Mol. Cell. Proteomics *3*, 456 (2004).
15. Ficarro S. B., McCleland M. L., Stukenberg P. T., Burke D. J., Ross M. M., Shabanowitz J., Hunt D. F., White F. M.: Nat. Biotechnol. *20*, 301 (2002).
16. Pinkse M. W., Uitto P. M., Hilhorst M. J., Ooms B., Heck A. J.: Anal. Chem. *76*, 3935 (2004).
17. Oda Y., Nagasu T., Chait B. T.: Nat. Biotechnol. *19*, 379 (2001).
18. Zhou H., Watts J. D., Aebersold R.: Nat. Biotechnol. *19*, 375 (2001).
19. Nagahara H., Latek R. R., Ezhevsky S. A., Dowdy S. F.: Methods Mol. Biol. *112*, 271 (1999).
20. Affolter M., Watts J. D., Krebs D. L., Aebersold R.: Anal. Biochem. *223*, 74 (1994).
21. Gatti A., Traugh J. A.: Anal. Biochem. *266*, 198 (1999).
22. Zhang X., Herring C. J., Romano P. R., Szczepanowska J., Brzeska H., Hinnebusch A. G., Qin J.: Anal. Chem. *70*, 2050 (1998).
23. Molloy M. P., Andrews P. C.: Anal. Chem. *73*, 5387 (2001).
24. Annan R. S., Carr S. A.: Anal. Chem. *68*, 3413 (1996).
25. Schlosser A., Pipkorn R., Bossemeyer D., Lehmann W. D.: Anal. Chem. *73*, 170 (2001).
26. Carr S. A., Huddleston M. J., Annan R. S.: Anal. Biochem. *239*, 180 (1996).
27. Annan R. S., Huddleston M. J., Verma R., Deshaies

R. J., Carr S. A.: Anal. Chem. *73*, 393 (2001).
28. Steen H., Kuster B., Fernandez M., Pandey A., Mann M.: Anal. Chem. *73*, 1440 (2001).
29. Steen H., Mann M.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. *13*, 996 (2002).
30. Wind M., Edler M., Jakubowski N., Linscheid M., Wesch H., Lehmann W. D.: Anal. Chem. *73*, 29 (2001).
31. Wind M., Wesch H., Lehmann W. D.: Anal. Chem. *73*, 3006 (2001).
32. Ruotolo B. T., Verbeck G. F. t., Thomson L. M., Woods A. S., Gillig K. J., Russell D. H.: J. Proteome Res. *1*, 303 (2002).
33. Ruotolo B. T., Gillig K. J., Woods A. S., Egan T. F., Ugarov M. V., Schultz J. A., Russell D. H.: Anal. Chem. *76*, 6727 (2004).
34. Janek K., Wenschuh H., Bienert M., Krause E.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *15*, 1593 (2001).
35. Xu C. F., Lu Y., Ma J., Mohammadi M., Neubert T. A.: Mol. Cell. Proteomics (2005).
36. Yang X., Wu H., Kobayashi T., Solaro R. J., van Breemen R. B.: Anal. Chem. *76*, 1532 (2004).
37. Asara J. M., Allison J.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. *10*, 35 (1999).
38. Kjellstrom S., Jensen O. N.: Anal. Chem. *76*, 5109 (2004).
39. Stensballe A., Jensen O. N.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *18*, 1721 (2004).
40. DeGnore J. P., Qin J.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. *9*, 1175 (1998).
41. Moyer S. C., Cotter R. J., Woods A. S.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. *13*, 274 (2002).
42. Neubauer G., Mann M.: Anal. Chem. *71*, 235 (1999).
43. Bennett K. L., Stensballe A., Podtelejnikov A. V., Moniatte M., Jensen O. N.: J. Mass Spectrom. *37*, 179 (2002).
44. Roepstorff P., Fohlman J.: Biomed. Mass Spectrom. *11*, 601 (1984).
45. Jaffe H., Veeranna, Pant H. C.: Biochemistry *37*, 16211 (1998).
46. Li W., Boykins R. A., Backlund P. S., Wang G., Chen H. C.: Anal. Chem. *74*, 5701 (2002).
47. Stensballe A., Jensen O. N., Olsen J. V., Haselmann K. F., Zubarev R. A.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *14*, 1793 (2000).
48. Sze S. K., Ge Y., Oh H., McLafferty F. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 1774 (2002).
49. Rusnak F., Zhou J., Hathaway G. M.: J. Biomol. Tech. *13*, 228 (2002).
50. Knight Z. A., Schilling B., Row R. H., Kenski D. M., Gibson B. W., Shokat K. M.: Nat. Biotechnol. *21*, 1047 (2003).
51. Oda Y., Huang K., Cross F. R., Cowburn D., Chait B. T.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 6591 (1999).
52. Ong S. E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D. B., Steen H., Pandey A., Mann M.: Mol. Cell. Proteomics *1*, 376 (2002).
53. Ibarrola N., Kalume D. E., Gronborg M., Iwahori A., Pandey A.: Anal. Chem. *75*, 6043 (2003).
54. Gruhler A., Olsen J. V., Mohammed S., Mortensen P., Faergeman N. J., Mann M., Jensen O. N.: Mol. Cell. Proteomics *4*, 310 (2005).
55. Gygi S. P., Rist B., Gerber S. A., Tureček F., Gelb M. H., Aebersold R.: Nat. Biotechnol. *17*, 994 (1999).
56. Goshe M. B., Conrads T. P., Panisko E. A., Angell N. H., Veenstra T. D., Smith R. D.: Anal. Chem. *73*, 2578 (2001).
57. Goshe M. B., Veenstra T. D., Panisko E. A., Conrads T. P., Angell N. H., Smith R. D.: Anal. Chem. *74*, 607 (2002).
58. Qian W. J., Goshe M. B., Camp D. G., 2nd, Yu L. R., Tang K., Smith R. D.: Anal. Chem. *75*, 5441 (2003).
59. Adamczyk M., Gebler J. C., Wu J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *16*, 999 (2002).
60. Weckwerth W., Willmitzer L., Fiehn O.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *14*, 1677 (2000).
61. Hegeman A. D., Harms A. C., Sussman M. R., Bunner A. E., Harper J. F.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. *15*, 647 (2004).
62. Zhang X., Jin Q. K., Carr S. A., Annan R. S.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *16*, 2325 (2002).
63. Gerber S. A., Rush J., Stemman O., Kirschner M. W., Gygi S. P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 6940 (2003).
64. Steen H., Jebanathirajah J. A., Springer M., Kirschner M. W.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 3948 (2005).

P. Halada (*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of Czech Republic, Praha, Czech Republic):*
Approaches to Current Phosphoproteomics

Characterization of post-translational modifications is one of the major challenges in proteomics. Reversible phosphorylation on serine, threonine and tyrosine residues is involved in regulation of many fundamental cellular events such as cell cycle, signal transduction, metabolism, and protein synthesis. To understand the molecular basis of these regulatory mechanisms, techniques capable of precise identification and quantitation of phosphorylation are needed. This review is devoted to recent trends in phosphoproteomics with special focus on mass spectrometry-based techniques. It covers enrichment of phosphoproteins/phosphopeptides using immobilized metal affinity chromatography and chemical derivatization techniques, phosphopeptide detection using differential peptide mass mapping, neutral loss and precursor ion scanning, localization of phosphorylation sites by tandem mass spectrometry as well as relative and absolute quantitation of phosphorylation stoichiometry.

IONIZACE LASEREM ZA PŘÍTOMNOSTI MATRICE ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU (AP-MALDI) – NOVÝ SMĚR V ANALÝZE PEPTIDŮ A PROTEINŮ

MICHAL GODULA

HPST s.r.o., Písnická 372/20, 142 00 Praha 4
michal.godula@hpst.cz

Došlo 27.8.05, přijato 27.10.05.

Klíčová slova: ionizace laserem, MALDI, proteiny

Obsah

1. Úvod
2. Princip ionizaceMALDI za atmosférického tlaku (AP-MALDI)
3. AP-MALDI v praxi
   3.1. AP-MALDI-IT-MS
   3.2. AP-MALDI-oaTOF
4. AP-MALDI v kombinaci s 2D-nanoHPLC
   4.1. Online 2D-HPLC-MS-MS s diskontinuálním gradientem
   4.2. Online 2D-HPLC-MS-MS se semi-kontinuálním gradientem
   4.3. Offline 2D-HPLC-MS-MS
   4.4. Offline 2D-nanoLC-MALDI-MS-MS
5. Závěr

1. Úvod

Proteiny či peptidy obsažené v buňkách v relativně nízkých koncentracích mohou hrát významnou roli v procesech probíhajících v buňce. Mezi tyto procesy patří např. regulace metabolismu, vliv na vznik různých nemocí atd. Hlavním úkolem hmotnostní spektrometrie je identifikace a kvantifikace těchto proteinů i ve velmi komplexních směsích proteinů obsažených v buňkách.

Nejrozšířenější MS technikou v analýze proteinů či peptidů je v současnosti beze sporu hmotnostní spektrometrie s ionizací MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)[1,2]. Principem MALDI ionizace je nanesení malého množství vzorku společně s vhodnou matricí (kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, kyselina α-kyano-4-hydroxy-skořicová a další) na terčík a následná desorpce a ionizace laserem. Výsledkem celého procesu je ionizace peptidů nebo proteinů a jejich následná hmotnostní analýza.

V minulosti byla většina systémů určených pro analýzu proteinů a peptidů konstruována s ionizací MALDI realizovanou ve vakuu a v kombinaci s analyzátorem doby letu iontů (Time of Flight, TOF).

Výhody klasického uspořádání MALDI-TOF jsou následující:

- vysoký hmotnostní rozsah systému umožňující analýzu intaktních proteinů,
- potenciálně lepší přesnost stanovení hmotností iontů,
- dobré rozlišovací schopnosti systému.

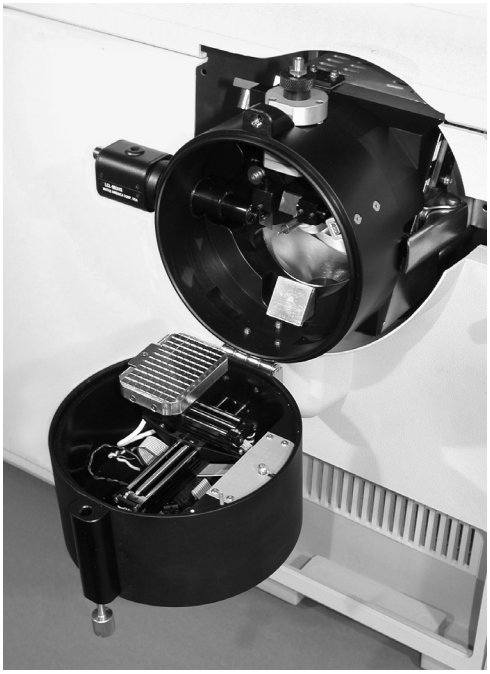
2. Princip ionizace MALDI za atmosférického tlaku (AP-MALDI)

V nedávné době byly publikovány pokusy realizovat MALDI za atmosférického tlaku (AP-MALDI)[3–6] v kombinaci s dalšími typy hmotnostních spektrometrů, např. na bázi iontové pasti (IT-MS). Bohužel, první experimenty s ionizací AP-MALDI poukázaly na možné problémy, zejména na nižší citlivost a poměrně intenzivní tvorbu aduktů matrice[4]. V současnosti již umožňuje technické řešení zdroje AP-MALDI analýzy směsí peptidů vzniklých enzymatickým štěpením proteinů o velmi nízkých koncentracích a navíc s možností získání MS/MS spekter. Využití MS/MS dat také výrazně zvyšuje specifitu vyhledávání v databázích peptidů a proteinů v porovnání s metodou PMF (peptide mass fingerprint) využívanou při identifikaci spekter získaných prostřednictvím konvenčních systémů MALDI-TOF.

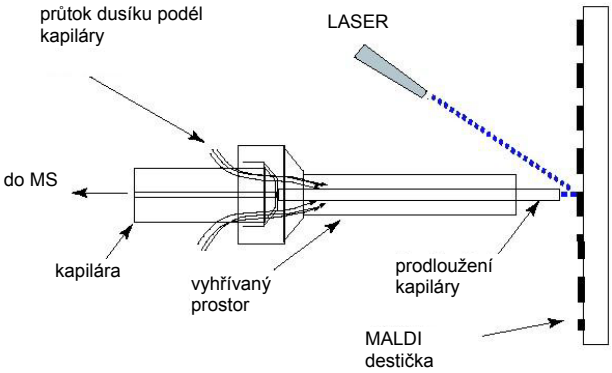
Nespornou výhodou ionizace AP-MALDI je možnost využití různých druhů hmotnostních analyzátorů, jako např. iontové pasti[7] nebo systému TOF s orthogonální akcelerací[8]. Navíc je možné využít jeden druh analyzátoru, např. systém s iontovou pastí pro analýzu jak intaktních proteinů s ionizací elektrosprejem (ESI), tak i směsí peptidů ionizací AP-MALDI. Výhody AP-MALDI v kombinaci s hmotnostním spektrometrem na bázi iontové pasti jsou následující:

- proces ionizace je realizován nezávisle na hmotnostním analyzátoru, a proto podmínky ionizace a kvalita povrchu terčíku popř. nanesení vzorku neovlivňují parametry analyzátoru (zejména rozlišení a přesnost měření hmotností iontů),
- je možné získat velmi rychle MS/MS data (na rozdíl od vakuového MALDI-TOF-MS) a informaci o sekvenci peptidů se subfemtomolovými koncentracemi,
- MS/MS data je možné získat nepoměrně levnější instrumentací oproti systémům Q-TOF nebo TOF-TOF,
- flexibilita – doba výměny zdroje z AP-MALDI např. za ESI velmi krátká (několik minut) a je možné využít jeden systém MS pro širší škálu experimentů.

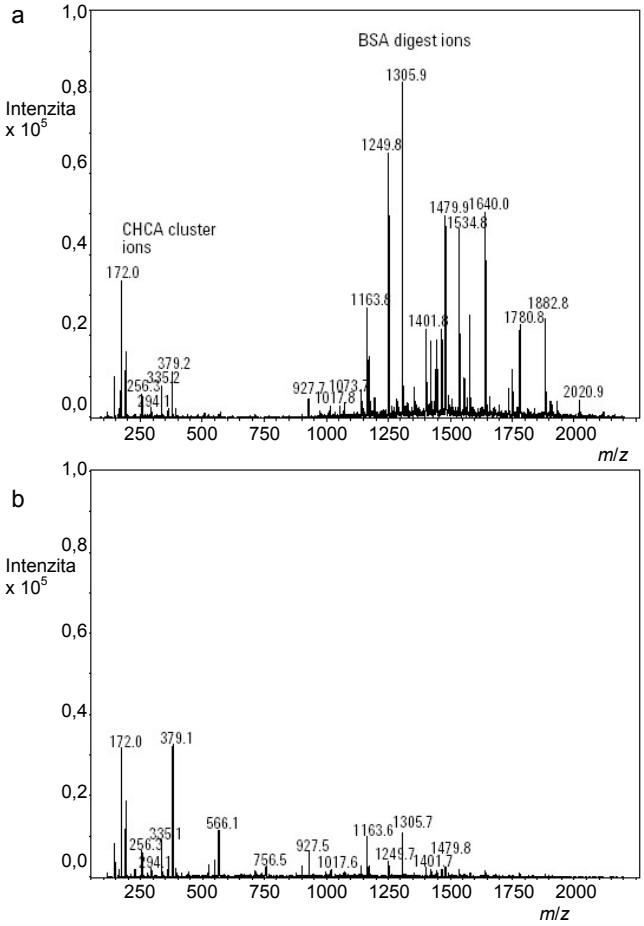
Na obr. 1. je zobrazen zdroj AP-MALDI firmy Agi-



Obr. 1. **AP-MALDI zdroj firmy Agilent Technologies**



Obr. 2. **Schéma zdroje AP-MALDI firmy Agilent Technologies**



Obr. 3. **Vliv protiproudu sušícího plynu na tvorbu shluků a intenzitu iontů peptidů z tryptického rozkladu hovězího serumalbuminu, matrice kyselina α-kyano-4-hydroxyskořicová; a) spektrum získané při použití vyhřívaného proudu sušícího plynu, b) spektrum získané po vypnutí vyhřívání sušícího plynu**

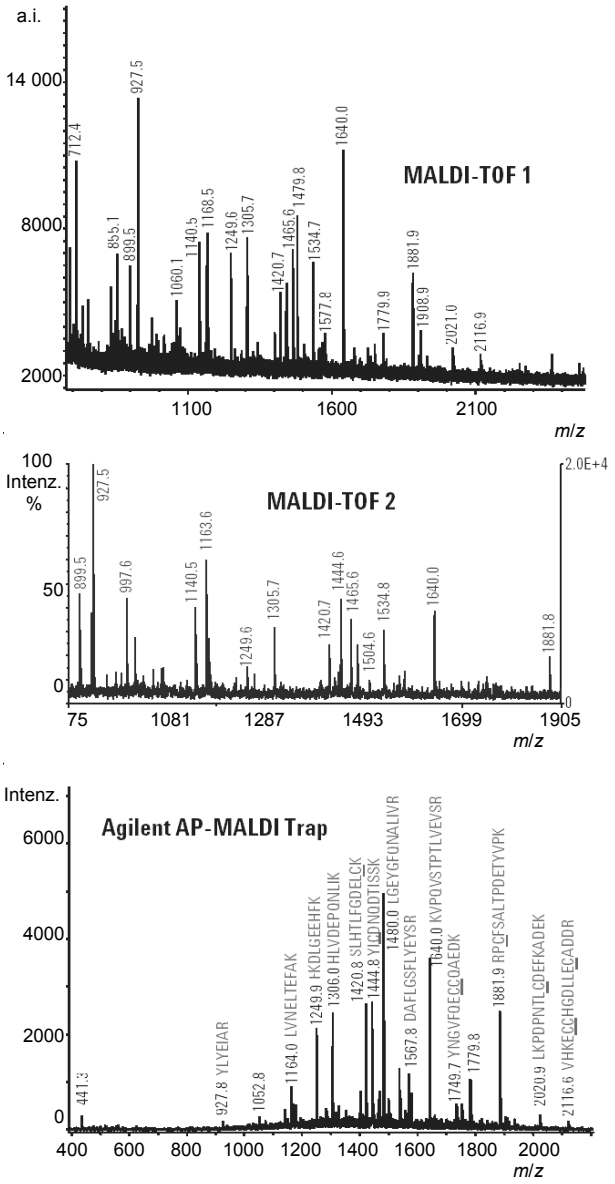
lent Technologies, uvedený na trh v roce 2004. Zdroj je vybaven dusíkovým laserem o vlnové délce 337 nm (10 Hz), který je přiváděn skrze optické vlákno o průměru 400 μm na pozici na terčíku o velikosti 200–250 μm. Energie laseru je 20–24 μJ. Schéma zdroje je pak uvedeno na obr. 2.

Hlavním rysem konstrukce zdroje je využití protiproudého uspořádání toku sušícího plynu oproti pohybu iontů při desorpci laserem. Ionty vzniklé při ionizaci jsou vtahovány do kapiláry MS kombinací účinku elektrostatického pole a vakua. Během jejich krátkého letu atmosférickou částí dochází k rozrušení shluků iontů vzniklých během ionizace účinkem proudu horkého dusíku. Účinek protiproudu sušícího plynu je velmi výrazný, jak je dokumentováno na obr. 3. Zatímco při využití sušícího plynu o teplotě 325 °C jsou dominantními ionty ve spektru ionty peptidů serumalbuminu, při experimentu bez vyhřívání sušícího plynu jsou dominantní ionty matrice v oblasti 100 až 600 amu (spodní obrázek)[8].

3. AP-MALDI v praxi

3.1. AP-MALDI-IT-MS

První z možností využití zdroje AP-MALDI, která bude zmíněna v tomto článku, je kombinace s hmotnostním analyzátorem na bázi iontové pasti (IT-MS). Pulsy laseru při ionizaci jsou synchronizovány s akumulačními fázemi iontové pasti hmotnostního spektrometru. Na obr. 4. je zobrazeno porovnání spekter směsi peptidů získaných enzymatickým štěpením hovězího serumalbuminu (BSA) trypsinem. Spektra byla pořízena po-



Obr. 4. **Porovnání spekter získaných pomocí dvou typů MALDI-TOF-MS a AP-MALDI-IT-MS systémů**; hovězí serumalbumin 5 fmol; C = carboxymethylovaný cystein

mocí dvou typů konvenčních systémů MALDI-TOF a systému IT-MS vybaveného zdrojem AP-MALDI.

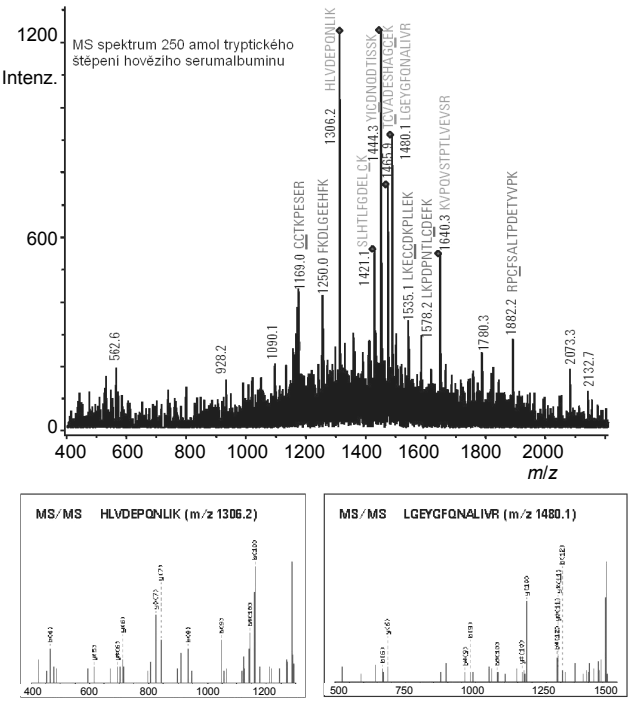
Z porovnání uvedeného v tab. I je zřejmé, že jak MALDI-TOF, tak i AP-MALDI-IT-MS, jsou zařízení schopná produkovat velmi podobná spektra. Klasické systémy MALDI-TOF ale produkují spektra s vyšší odezvou hmot o nižší a střední molekulové hmotnosti. V případě AP-MALDI-IT-MS nejsou ionty o nízké hmotnosti příliš významné. Tento jev je způsoben četnými kolizemi nízkomolekulárních iontů za atmosférických podmínek, čímž dochází ke snížení vnitřních energií iontů a tím i k jejich přenosu ze zdroje do hmotnostního detektoru. Zároveň je optická část systému IT-MS optimalizována pro přenos iontů o vyšších hmotnostech a tím dochází k potlačení transmise iontů o nízké hmotnosti, zejména pak iontů matrice.

Oproti klasickým systémům MALDI-TOF nabízí uspořádání AP-MALDI-IT-MS zřejmou výhodu v možnosti získání MS i MS/MS spekter na koncentračních hladinách nižších než 1 fmol. Např. na obr. 5. jsou znázorněna MS a MS/MS spektra získaná analýzou 250 amol BSA pomocí AP-MALDI-IT-MS systému[6]. Ionty označené v MS spektru kosočtvercem byly vybrány režimem AUTO-MS/MS pro izolaci a následnou fragmentaci. Na dvou spodních obrázcích jsou pak znázorněny příklady takto získaných spekter MS/MS. Takto získaná data lze následně využít pro vyhledávání v databázích proteinových nebo nukleotidových sekvencí.

Na druhé straně ale stále zůstává velkou výhodou klasického uspořádání MALDI-TOF možnost měření s vysokou přesností. Proto další část tohoto článku bude věnována možnostem propojení AP-MALDI s TOF-MS systémy.

3.2. AP-MALDI-oaTOF

Další alternativou využití AP-MALDI je aplikace této ionizace v systému vybaveném analyzátorem TOF s orthogonální akcelerací (oaTOF). Systém oaTOF může být využit v kombinaci s elektrosprejem např. pro 2D-HPLC-TOF-MS analýzu a v dalším kroku pro AP-MALDI analýzu peptidů vzniklých enzymatickým štěpe-



Obr. 5. **MS a MS/MS spektra BSA na hladině 250 amol, AP-MALDI-IT-MS a MS-MS**

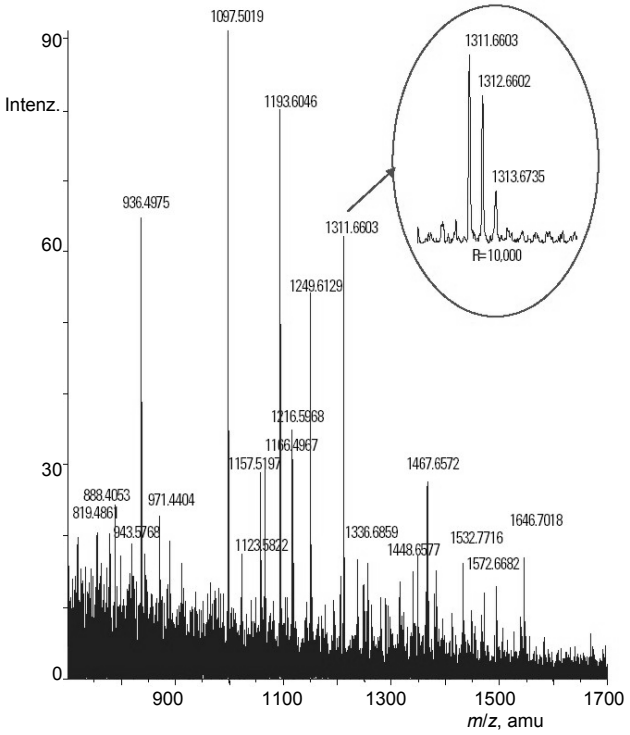
Tabulka I
Identifikované sekvence peptidů trypsinového štěpení hovězího serumalbuminu (BSA)

Sekvence peptidů[a]	Teoretická *m*/*z* [*m*/*z*]	AP-MALDI-IT-MS [*m*/*z*]	MALDI-TOF 1 [*m*/*z*]	MALDI-TOF 2 [*m*/*z*]
AWSVAR	689,4		689,4	
SEIAHR	712,4		712,4	
NYQEAK	752,4		752,4	
[a]				833,1
LSQKFPK	847,5		847,5	847,5
[a]				855,1
LCVLHEK	899,5		899,5	899,5
IETMREK	922,5		922,5	922,5
YLYEIAR	927,5	927,8	927,5	927,5
[a]				997,6
[a]				1060,1
CCTESLVNR	1140,5		1140,5	1140,5
LVNELTEFAK	1163,6	1164,0	1163,6	1163,6
CCTKPESER	1168,5	1168,9	1168,5	1168,5
FKDLGEEHFK	1249,6	1249,9	1249,6	1249,6
HLVDEPQNLIK	1305,7	1306,0	1305,7	1305,7
SLHTLFGDELCK	1420,7	1420,8	1420,7	1420,7
RHPEYAVSVLLR	1439,8	1439,5	1439,8	1439,8
YICDNQDTISSK	1444,6	1444,8	1444,6	1444,6
TCVADESHAGCEK	1465,6	1465,7	1465,6	1465,6
LGEYGFQNALIVR	1479,8	1480,0	1479,8	1479,8
QTALVELLKHKPK	1504,9	1504,7		1504,6
LKECCDKPLLEK	1534,7	1534,8	1534,7	1534,8
DDPHACYSTVFDK	1555,6	1555,7		
DAFLGSFLYEYSR	1567,7	1567,8		
LKPDPNTLCDEFK	1577,8	1577,7	1577,8	
KVPQVSTPTLVEVSR	1639,9	1640,0	1640,0	1640,0
YNGVFQECCQAEDK	1749,7	1749,7		
[a]		1779,8	1779,9	
RPCFSALTPDETYVPK	1881,9	1881,9	1881,9	1881,8
NECFLSHKDDSPDLPK	1902,9	1902,8		
LFTFHADICTLPDTEK	1908,9	1909,0	1908,9	
LKPDPNTLCDEFKADEK	2021,0	2020,9	2021,0	
VHKECCHGDLLECADDR	2116,8	2116,6	2116,9	

Pozn.: Koncentrace 5 fmol; [a] označuje hmoty, které neodpovídají žádné sekvenci vzniklé rozkladem BSA; C = karboxymethylovaný cystein[6]

ním proteinů. Jednoznačnou předností je pak rychlá výměna obou zdrojů a tedy i vysoká flexibilita přístroje. Podobně jako u AP-MALDI-IT-MS i zde je výhodou oddělení kroků ionizace a vlastní hmotnostní analýzy. Parametry ionizace tudíž neovlivňují dosažené rozlišení a přesnost stanovení hmotnosti analyzátoru oaTOF. Tím je dosaženo rutinního měření spekter s přesností hmot lepší než 5 ppm a vynikajícího rozlišení (>10 000). Výhodou systému oaTOF firmy Agilent Technologies je kromě již zmíněných parametrů i velmi široký dynamický rozsah (3–4 řády), který umožňuje simultánní stanovení peptidů přítomných ve vzorku na velmi rozdílných koncentračních hladinách.

Další výhodou již zmíněného uspořádání je mimo jiné také vynikající citlivost. Na obr. 6 je znázorněno spektrum produktů tryptického štepění 500 amol apotransferrinu. Pro interní kalibraci hmotnostní osy bylo použito iontů matrice (190,0499, 379,0925, 568,1351), čímž bylo dosaženo rutinně stanovení hmot s přesností lepší než 5 ppm. Pro PMF vyhledávání v databázi pak byl použit užší limit 10 ppm, čímž bylo dosaženo také vyšší pravděpodobnosti shody a eliminace potenciálně falešných výsledků[7].



Obr. 6. **Spektrum AP-MALDI-oaTOF-MS 500 amol apotransferrinu (APO) (tryptické štěpení)**

4. AP-MALDI v kombinaci s 2D-nanoHPLC

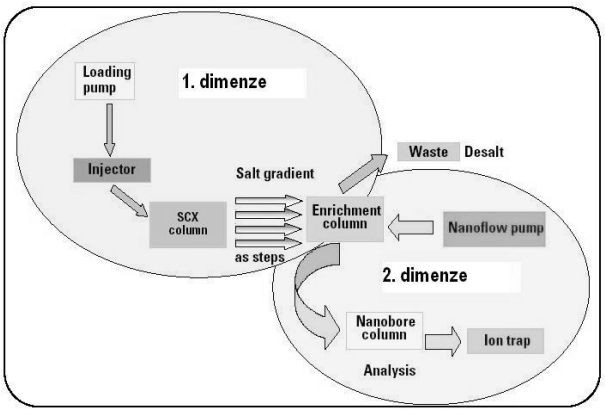
Identifikace proteinů v komplexních směsích v minulosti byla a stále je většinou realizována klasickým postupem, tj. separací směsi proteinů technikou dvourozměrné gelové elektroforézy (2D-GE), následným štěpením izolovaných proteinů vhodným enzymem a identifikací vzniklé směsi peptidů metodou MALDI-TOF. Nevýhodou tohoto uspořádání je časová a manuální náročnost. Na druhé straně, výhodou je možnost dosažení velmi spolehlivých výsledků díky vysokému rozlišení 2D-GE a spolehlivé identifikaci vyhledáváním v proteinových databázích (PMF).

Alternativní technikou, která nabývá stále většího významu, je analýza komplexních směsí peptidů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s MS detekcí. Vzhledem k tomu, že množství vzorku je obvykle velmi malé, využívá se k separaci směsí peptidů HPLC v kapilárním (průtok mobilní fáze 1–20 μl min^{-1}) nebo nano (10–1000 nl min^{-1}) uspořádání. Výhodou 2D-HPLC je možnost automatizace celého procesu a tím i dosažení reprodukovatelnějších výsledků.

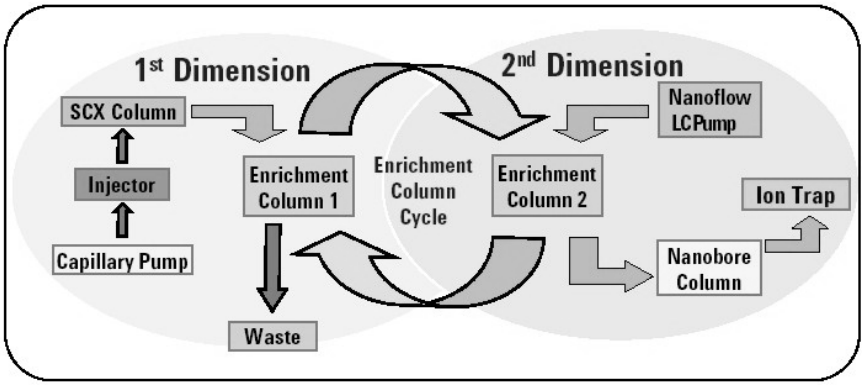
Existuje několik možností realizace 2D-HPLC v kombinaci s MS detekcí, které se liší v konfiguraci systému. Zároveň je prostřednictvím různého uspořádání systému dosaženo velmi odlišné kvality získaných dat.

4.1. Online 2D-HPLC-MS-MS s diskontinuálním gradientem

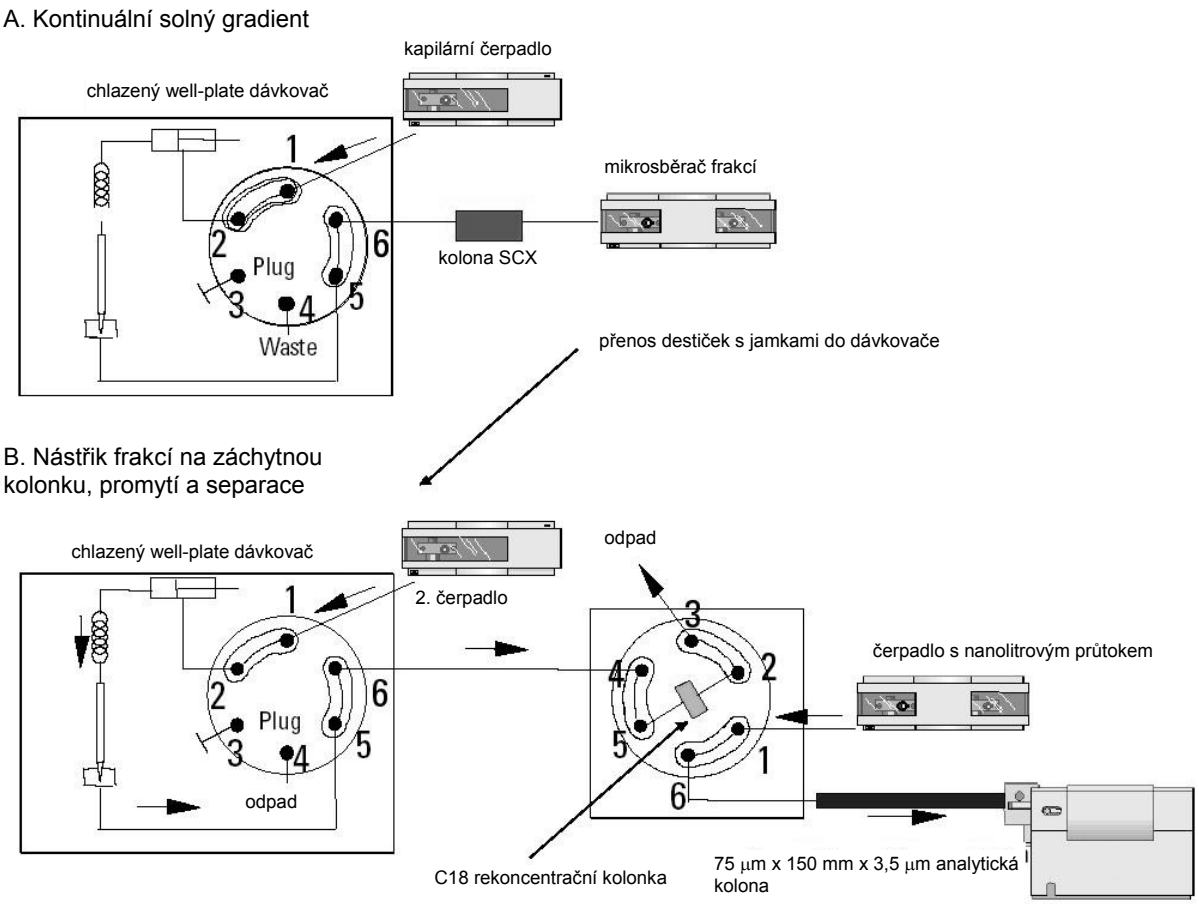
Nejjednodušší způsob realizace 2D-HPLC je zobrazen na obr. 7 (cit.[10]). V první dimenzi je vzorek obsahující peptidy vzniklé enzymatickým štěpením směsí proteinů nanesen automatickým dávkovačem na kolonu obsahující silný katex (SCX). Eluce frakcí peptidů z kolony SCX je realizována postupnými nástřiky roztoku mravenčanu



Obr. 7. **Princip online 2D-HPLC s diskontinuálním gradientem**



Obr. 8. **Online 2D-HPLC se semikontinuálním gradientem**



Obr. 9. **Offline 2D-HPLC-MS/MS**

amonného o rostoucích koncentracích (např. 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 300, 500, 1000 mM). Každá z frakcí je nejprve vedena na rekoncentrační kolonku, kde dojde k zachycení eluovaných peptidů. Poté dojde k přepnutí rekoncentrační kolonky do druhé dimenze (průtok řízený např. nano pumpou) a postupným gradientem organické fáze dochází k vymytí peptidů na analytickou kolonu. Následně je realizována jejich separace a detekce systémem ESI-IT-MS-MS.

4.2. Online 2D-HPLC-MS-MS se semi-kontinuálním gradientem

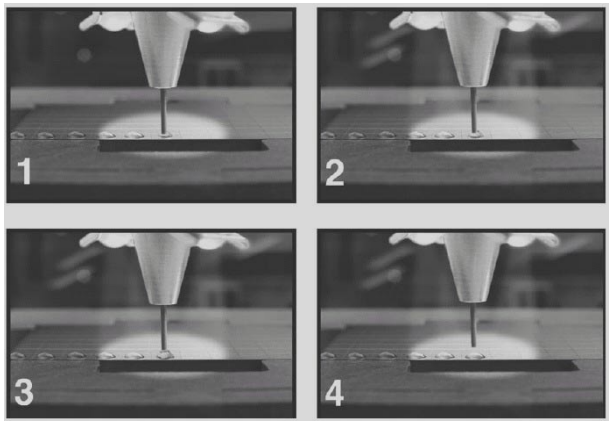
Diskontinuální 2D-HPLC, zmíněná v předchozím odstavci, má několik nevýhod. Jako hlavní je možno uvést tu, že kolona SCX není provozována v optimálním rovnovážném režimu a že dochází pouze k nástřikům jednotlivých dávek soli. To může vést např. k eluci jednoho peptidu ve dvou různých frakcích a tím ke snižování detekčních možností (citlivosti) systému. Optimalizovaným řešením je 2D-nanoHPLC se semikontinuálním gradientem – viz obr. 8. Základní princip je totožný s předchozím systémem. Nicméně v tomto uspořádání jsou peptidy vymývány z katexové kolonky kontinuálním gradientem na dvě cyklicky se přepínající rekoncentrační kolonky. Tímto uspořádáním je dosaženo podstatně lepšího rozlišení peptidů a tím i spolehlivější identifikace[11].

4.3. Offline 2D-HPLC-MS-MS

Další možností zvýšení rozlišení systému 2D-HPLC je oddělení frakcionace peptidů na koloně SCX a vlastní chromatografické separace jednotlivých frakcí. Jedno z možných uspořádání je zobrazeno na obr. 9. V této konfiguraci je směs peptidů nanesena na katexovou kolonu a jednotlivé frakce peptidů jsou postupně vymývány rostoucím gradientem soli a frakcionovány sběračem frakcí. Frakce obsahující eluované peptidy jsou sbírány přímo do mikrotitračních destiček. Mikrotitrační destička s frakcemi je pak přenesena do systému 2D-nanoHPLC-MS-MS a jednotlivé frakce z kolony SCX jsou nastřikovány a analyzovány pomocí 2D-HPLC na reverzní fázi[12]. Výhodou tohoto uspořádání je podstatně vyšší rozlišení než v případě online systémů. Je možné provést také frakcionaci na destičky MALDI a provést jejich analýzy libovolným systémem MALDI-MS.

4.4. Offline 2D-nanoLC-MALDI-MS-MS

Ačkoliv je systémem offline dosaženo velmi kvalitních výsledků zejména díky vynikajícímu rozlišení techniky, problémem je omezená kapacita systému MS-MS na bázi iontové pasti. Při koeluci několika peptidů během separace není systém MS-MS na bázi iontové pasti schopen provést dostatečný počet cyklů a identifikovat všechny složky v píku. Proto je výhodnější převod jednotlivých frakcí na MALDI destičky a analýza např. systémem AP-MALDI-IT-MS-MS. Tento proces je ovšem samozřejmě poměrně časově náročný a je také relativně pracný. Proto byla provedena úprava mikrosběrače frakcí pro možnost frakcionace přímo na MALDI destičky[13]. Základním problémem tohoto řešení je nutnost spolehlivé depozice frakce o minimálním objemu (stovky nl) na destičku.



Obr. 10. **Proces depozice frakce na destičku MALDI mikrosběračem frakcí Agilent Technologies**

Na obr. 10. je znázorněn proces depozice frakce na destičku MALDI pomocí mikro sběrače frakcí firmy Agilent Technologies. Klíčovým rysem je pohyb jehly ve vertikálním směru souběžně se zvětšováním velikosti kapky. Tím je zabráněno ulpívání kapky na jehle a zhoršení reprodukovatelnosti frakcionace. Navíc je možné do systému zařadit i zařízení pro online přidávání matrice MALDI do proudu mobilní fáze pístovou pumpou. Posledním krokem je pak pouze vysušení kapek na destičce a přenesení destičky do systému MALDI-MS-MS. Mikrosběrač frakcí je možné použít pro depozici na jakékoli destičky MALDI od různých výrobců systémů MS.

5. Závěr

Cílem tohoto článku bylo představit alternativní techniky ke klasickým technikám používaným v proteomické analýze. Výhodami ionizace AP-MALDI oproti klasické MALDI jsou lepší citlivost, vysoká flexibilita a možnost využití s celou řadou MS systémů. Kombinací systému 2D-HPLC se sběračem frakcí schopným přímé depozice na destičky MALDI je pak možné získat velmi kvalitní data i v případě analýz poměrně složitých směsí peptidů. Velkou výhodou kombinace systémů 2D-nanoHPLC s AP-MALDI je možnost automatizace celého procesu a tím i dosažení vysoké spolehlivosti naměřených dat.

LITERATURA

1. Tanaka K., Ido Y.,Akita S., Yoshida Y., Yoshida T.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *2*, 151 (1998).
2. Karas M., Hillenkamp F.: Anal. Chem. *60*, 229 (1988).
3. Laiko V. V., Burlingame A. L.: U.S. Patent 5965884 (1999).
4. Laiko V. V., Moyer S. C., Cotter R. J.: Anal. Chem. *72*, 5239 (2000).
5. Moyer S. C., Cotter R. J.: Anal. Chem. *74*, 469A (2002).
6. Doroshenko V. M., Laiko V. V., Taranenko N. I., Berkout V. D., Lee H. S.: Int. J. Mass Spectrom. *221*, 39 (2002).
7. Perkins P., Bai J., Lopez-Avila V., Miller C.: Application Note 5988–8625EN, Agilent Technologies, 2003.
8. Yi D., Bai J., Perkins P.: Application Note 5989–1235EN, Agilent Technologies, 2003.
9. Meza J. E., Perkins P. D.: Application Note 5988–7930EN, Agilent Technologies, 2003.
10. Nägele E., Vollmer M., Hörth P.: Application Note 5988–9862EN, Agilent Technologies, 2003.
11. Nägele E.: Application Note 5989–0210EN, Agilent Technologies, 2003.
12. Mortiz R., Vollmer M., Nägele E.: Application Note 5988–9913EN, Agilent Technologies, 2003.
13. Nägele E., Vollmer M.: Application Note 5989–1479EN, Agilent Technologies, 2004.

M. Godula *(HPST Co., Prague):* **Laser Ionization in the Presence of Matrix at Atmospheric Pressure (AP-MALDI) –A New Direction in Peptide and Protein Analysis**

Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) is a popular technique for protein and peptide analysis. Historically, MALDI analyses have been accomplished with the sample under vacuum in combination with time-of-flight (TOF) mass analyzers, MALDI-TOF. More recently, MALDI has been performed at atmospheric pressure (AP-MALDI), in combination with various MS systems. A short overview is given on the advantages and application potential of AP-MALDI in proteomics area.

LINEÁRNÍ IONTOVÁ PAST A JEJÍ APLIKACE V PROTEOMICKÉ ANALÝZE

PETR VERNER

SPECTRONEX Praha, *Černická 19, Praha 10*
verner@spectronex.cz

Došlo 12.9.05, přijato 5.10.05.

Klíčová slova: LC-MS, lineární iontová past, Orbitrap, FT-MS, FT-ICR, hmotnostní spektrometrie, proteomická analýza.

Obsah

1. Úvod
2. Porovnání 2D a 3D iontové pasti
   2.1. Efektivita záchytu iontů
   2.2. Limit prostorového náboje
   2.3. Rozlišení
3. Aplikace 2D iontové pasti v proteomice
4. Spojení 2D iontové pasti s FT-ICR analyzátorem
5. Spojení 2D iontové pasti s FT-MS Orbitrap analyzátorem
6. MALDI za sníženého tlaku (vMALDI) jako iontový zdroj 2D iontové pasti
7. Závěr

1. Úvod

Lineární iontové pasti (2D) jsou již delší dobu využívány pro studium spektroskopických a dalších fyzikálních vlastností iontů. V roce 1997 bylo navrženo použití lineární iontové pasti jako procesoru kvantové informace[1] a později, v kalifornské Jet Propulsion Laboratory, byla iontová past použita jako velmi přesný časový standard, použitelný při kosmických výpravách[2,3]. John D. Prestage ze stejné laboratoře navrhl použití lineární iontové pasti jako hmotnostního analyzátoru pro analýzu plynů, použitelného díky malé hmotnosti, rozměrům a malé spotřebě energie na výzkumných kosmických sondách (více na www.nasatech.com). Uvedené aplikace jsou jen malou ukázkou širokého použití těchto přístrojů ve fyzice, astronomii a dalších oborech.

V hmotnostní spektrometrii byla lineární iontová past použita nejprve jako kolizní cela trojitého kvadrupolu[4], později pak jako součást hybridních systémů s FT-ICR (cit.[5]), TOF (cit.[6]) popř. 3D iontovou pastí[7] či kvadrupolem (Q-Trap).

Výhody 2D proti 3D iontové pasti popsal Syka a spol.[8] a spolu s Bierem také navrhl několik možných uspořádání lineární a prstencové 2D iontové pasti jako hmotnostního analyzátoru[9]. Komerční hmotnostní spektrometr na bázi lineární iontové pasti byl později uveden na trh firmou Finnigan jako Finnigan LTQ.

2. Porovnání 2D a 3D iontové pasti

Teorie a principy fungování *iontových* pastí přesahují rámec této práce a jsou podrobně popsány v řadě prací[10–12]. Omezím se tedy na porovnání některých základních parametrů těchto systémů s ohledem na později uvedené aplikace.

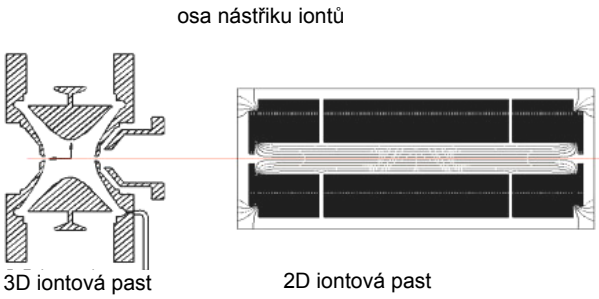
2.1. Efektivita záchytu iontů

Při nástřiku iontů, generovaných v externím zdroji, do 3D iontové pasti dochází k významné ztrátě iontů a jejich diskriminaci podle hmotnosti. Příčinou je skutečnost, že vstupující ionty musí proniknout do poměrně silného RF pole, které existuje ve směru vstupujících iontů a při vstupu mají buď příliš málo či příliš mnoho kinetické energie na to, aby odpovídající množství kolizí s přítomným heliem (buffer gas) snížilo tuto energii na hodnotu umožňující záchyt iontu v iontové pasti. Efektivita záchytu iontů v 3D iontové pasti tak je limitována na cca 5 % (cit.[13]), přičemž při záchytu iontů v širokém rozmezí *m*/*z* dochází k jejich významné diskriminaci.

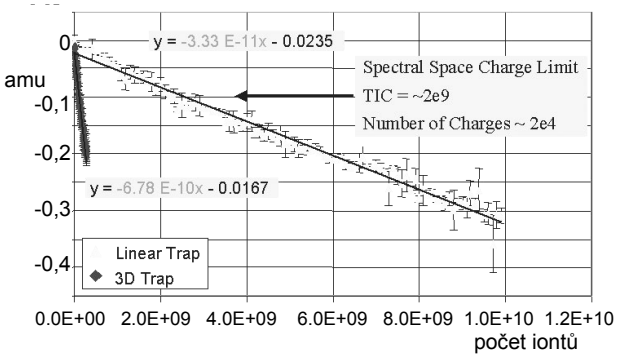
Ve 2D iontové pasti je RF pole ve směru letu (nástřiku) iontů minimální (obr. 1). Efektivita záchytu iontů tak může dosahovat až 100 % (cit.[4]), v praxi se však obvykle pohybuje mezi 50–70 %. Diskriminace iontů v závislosti na jejich *m/z* je minimální.

2.2. Limit prostorového náboje

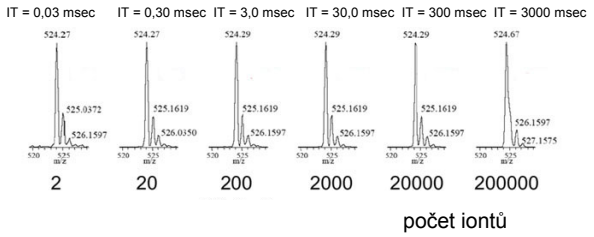
Prostorový náboj závisí na počtu iontů zachycených v iontové pasti a významně limituje vlastnosti všech analyzátorů pracujících na tomto principu, a to jak v průběhu uchování iontů (Storage space charge limit), tak při jejich



Obr. 1. **Porovnání 3D a 2D iontové pasti**



Obr. 2. **Porovnání experimentálně naměřených hodnot posunu měřené hmotnosti na počtu iontů v analyzátoru pro 3D a 2D iontovou past**



Obr. 3. **Rozlišení a posun hmotnosti naměřeného spektra v závislosti na počtu iontů v 2D iontové pasti;** IT – doba nástřiku iontů

Tabulka I
Porovnání některých parametrů u 3D (Finnigan LCQ) a 2D (Finnigan LTQ) iontové pasti

Parametr	Hodnota		
	3D iontová past	2D iontová past	rozdíl
Efektivita záchytu iontů, %	~ 55-70	~ 5	> 10
Efektivita detekce, %	~ 100	~ 50	1–2
Efektivita celkem, %	~ 35-55	~ 2,5	> 10
Kapacita (spektrální), počet iontů	~ 20 000	< 500	> 40
Sken. rychlost – Zoom	1100	267	4
Sken. rychlost – Ultra Zoom	27	NA[a]	NA[a]

[a] NA – nejsou k dispozici

izolaci, aktivaci a získání výsledného hmotnostního spektra (Spectral space charge limit). Posledně jmenovaná hodnota má největší vliv na kvalitu získaného MS spektra (rozlišení, posun naměřené oproti skutečné).

Obr. 2 uvádí provnání experimentálně naměřených hodnot posunu měřené hmotnosti na počtu iontů v analyzátoru pro 3D a 2D iontovou past, obr. 3 pak vzhled naměřeného spektra v závislosti na počtu iontů v 2D iontové pasti.

2.3. Rozlišení

Stejně jako u 3D pastí je možné i u 2D analyzátorů získat spektra s vyšším rozlišením zpomalením rychlosti skenu a amplitudy vypuzujícího napětí. To však vede ke snížení hodnoty spektrálního limitu prostorového náboje a vyžaduje u 3D pastí průměrování několika skenů. Zvýšená kapacita 2D iontových pastí naproti tomu umožňuje akvizici kvalitního spektra s vyšším rozlišením bez tohoto průměrování.

Praktickým výsledkem výše uvedené vlastnosti 2D iontových pastí je jednak rychlejší skenování při jednotkovém rozlišení, jednak vyšší rozlišení při srovnatelné rychlosti skenu.

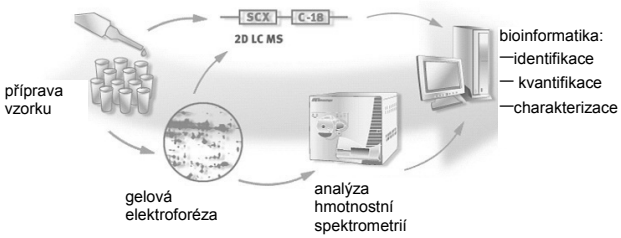
Rozlišení je v 2D iontové pasti výrazně více závislé na přesné geometrii pasti než u 3D analyzátoru. Zatímco ve 3D analyzátoru jsou ionty v době vypuzení do detektoru soustředěny v obláčku s průměrem cca 1 mm, je stejný obláček v 2D pasti „roztažen“ do cca 30 mm délky v axiálním směru. Přesná geometrie kvadrupolu tak hraje velikou roli.

Tabulka I uvádí porovnání některých parametrů u 3D (Finnigan LCQ) a 2D (Finnigan LTQ) iontové pasti.

3. Aplikace 2D iontové pasti v proteomice

Proteomická analýza současnosti usiluje o identifikaci všech proteinů v daném biologickém systému. Vzhledem k nesmírné složitosti těchto systémů a dynamickému rozsahu koncentrací proteinů není zatím možné beze zbytku identifikovat všechny proteiny i v jednoduchých systémech, jako jsou bakterie či kvasinky.

Obr. 4 ukazuje typický postup proteomické analýzy, tabulka II pak porovnává tři běžně používané metody ana-



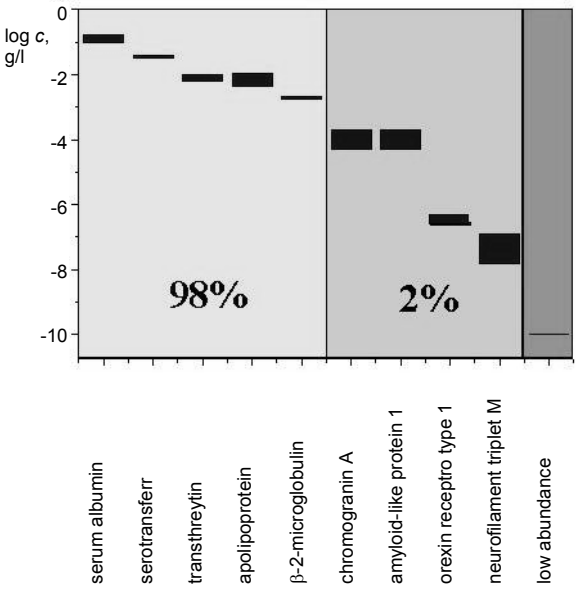
Obr. 4. **Proteomická analýza**

lýzy, přičemž 3D iontové pasti jsou tradičně jedním z nejčastěji používaných MS systémů v proteomické analýze s ohledem na jejich citlivost, robustnost, snadné ovládání a vynikající poměr cena/výkon[14–16].

2D iontové pasti dále rozšiřují možnosti 3D iontových pastí a umožňují např.:

- identifikaci i nízkých koncentrací proteinů v proteomu díky větší citlivosti a většímu dynamickému rozsahu (obr. 5),
- určení počtu nábojů u vícenásobně nabitých iontů díky vyššímu rozlišení (obr. 6),
- možnost vícenásobného MS^n díky většímu množství iontů, jež je možné v iontové pasti akumulovat,
- zrychlení analýz popř. zvýšení množství získaných dat díky možnosti rychlejšího skenování.

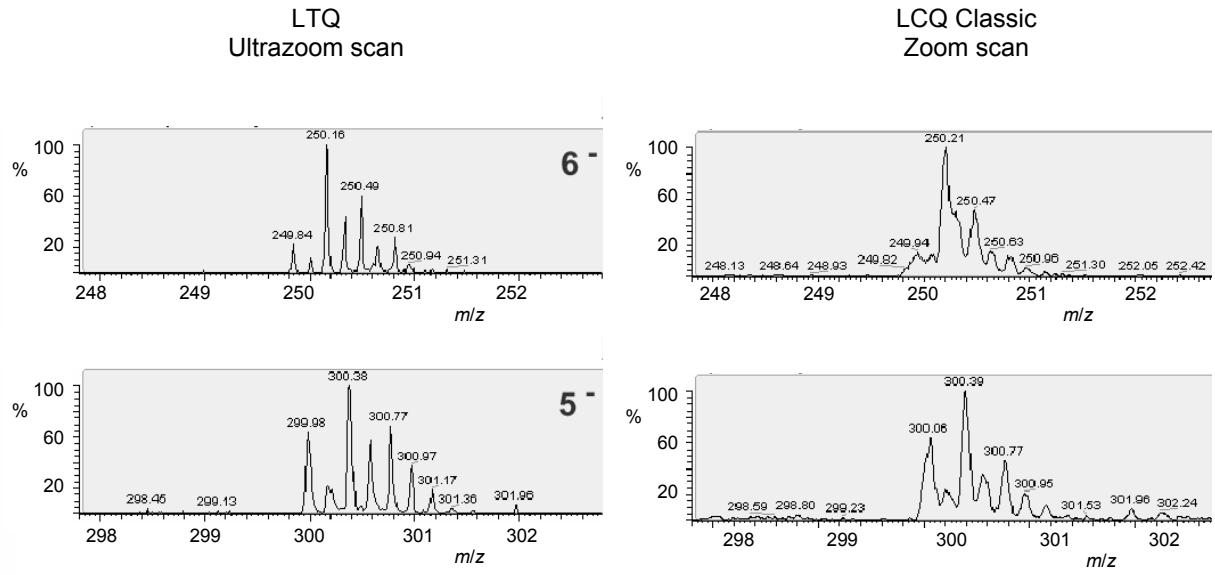
Zrychlení analýzy bylo demonstrováno např. porovnáním 3D iontové pasti (Finnigan LCQ Deca XP Plus) a 2D iontové pasti (Finnigan LTQ) na analýze peptidů vzniklých tryptickým štěpením *Mycoplasma pneumoniae*[17]. Směs peptidů byla nejprve podrobena SCX frakcionaci



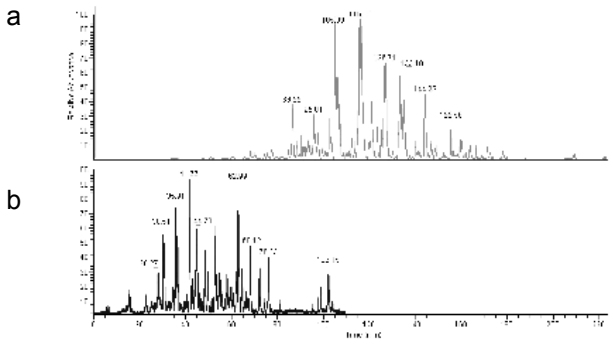
Obr. 5. **Proteiny identifikované v CSF pomocí 2D-HPLC-MS/MS s 2D iontovou pastí**; koncentrační rozsah 7 řádů

Tabulka II
Metody proteomické analýzy

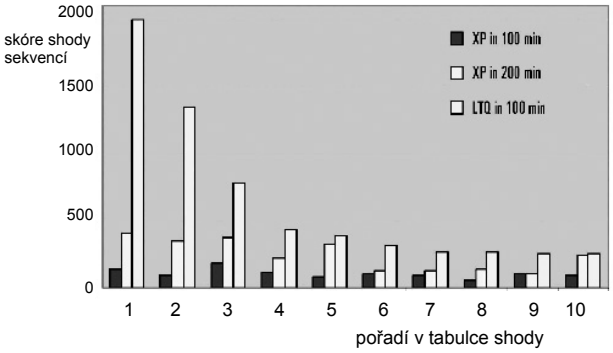
Příprava vzorku	Separace	Detekce
Precipitace ethanolem, alkylace, trypsinolýza	2D Gel IPG (pH 3-10) & 14 % T	gelová extrakce & nanosprej iontová past MS/MS
Ultrafiltrace, alkylace, trypsinolýza	1D LC (obrácená fáze)	nanosprej iontová past MS/MS
Ultrafiltrace, alkylace, trypsinolýza	2D LC (iontová výměna & obrácená fáze)	nanosprej iontová past MS/MS



Obr. 6. **Porovnání rozlišení získaného technikou Zoom Scan (3D iontová past LCQ) a Ultrazoom Scan (2D iontová past LTQ)**



Obr. 7. **Kapilární RP-HPLC-MS/MS analýza frakce 37 na (a) Finnigan LCQ Deca XP Plus**; doba analýzy 200 min, 3D iontová past a **(b) Finnigan LTQ**; doba analýzy 100 min, 2D iontová past

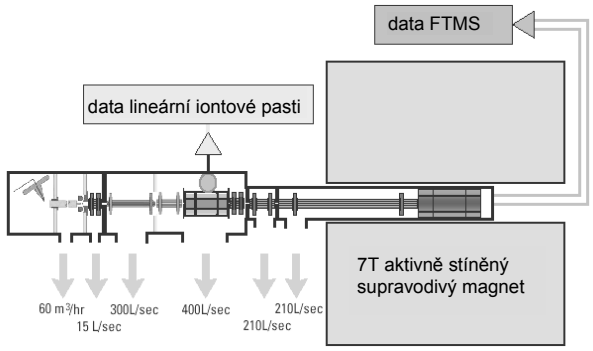


Obr. 8**. Kvalita identifikace proteinů** (prvních 10) **vyjádřená pomocí *Sequest Consensus* Score**; 1 – leucine aminopeptidase, 2 – pyruvate dehydrogenase E1 beta-subunit, 3 – molecular chaperone, 4 – DNA-directed RNA polymerase beta chain, 5 – RNA polymerase beta subunit, 6 – ribosomal protein L1, 7 – conserved hypothetical protein, 8 – PEP-dependent HPr protein kinase phosphoryltransferase, 9 – L-lactate dehydrogenase, 10 – Heat-shock protein GroEL

a jednotlivé frakce analyzovány LC/MS/MS na kapilární koloně s reverzní fází, přičemž podmínky byly zvoleny tak, aby analýza byla dvakrát kratší na LTQ (obr. 7). I při tomto dvojnásobném zrychlení analýzy bylo možné identifikovat přibližně stejné množství proteinů (548 na LTQ vs. 575 na LCQ). Přestože byla pro HPLC separaci při analýze pomocí 2D iontové pasti použita kratší HPLC kolona (5 cm proti 20 cm na 3D pasti), byla kvalita identifikace proteinů vyjádřená parametrem „Sequest Consensus Score" na tomto přístroji výrazně lepší (obr. 8).

4. Spojení 2D iontové pasti s FT-ICR analyzátorem

Jak již bylo uvedeno výše, lineární iontovou past je možné kombinovat s dalšími MS analyzátory. Kombinaci



Obr. 9. **Schéma hybridního hmotnostního spektrometru Finnigan LTQ-FT**

2D pasti s FT-ICR uvedla na trh firma Thermo Electron jako Finnigan LTQ-FT (obr. 9). Oba MS analyzátory v tomto systému mohou pracovat paralelně, přičemž první část poskytuje MS/MS a MS^n spektra, FT-ICR analyzátor pak velmi přesnou hmotnost vybraných iontů. Přesnost měření hmotnosti bývá rutinně pod 1 ppm, rozlišení FT-ICR pak podle rychlosti skenování 100 000 (1 sken s^{-1}) až 500 000 (1 sken na 4 s).

Měření velmi přesné hmotnosti v MS/MS spektrech a vysoké rozlišení se využívá k přesnější identifikaci proteinů pomocí tzv. „top-down" ale i „bottom-up"proteomické analýzy[18].

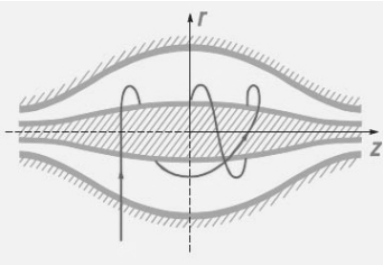
Systém 2D iontová past – ICR je velmi snadno ovladatelný a vhodný pro rutinní měření velkého množství vzorků. Příkladem může být spojení LTQ-FT s robotem Advion NanoMate 100 (automatické dávkování vzorků, ESI chip)[19]. 48 vzorků různých analytů (peptidy, proteiny, polymery, léčiva) různých koncentrací bylo analyzováno duplicitně (96 měření), přičemž doba analýzy vzorku byla cca 1 min. Doba jednoho cyklu (sken 200–2000 amu) byla 1 s a získané rozlišení 100 000 (FWHM) na iontu *m*/*z* 400. Pro měření přesné hmotnosti byla použita 2 dny stará externí kalibrace. Při těchto podmínkách byla přesnost stanovení hmoty ve velké většině případů pod 1 ppm.

Kromě MS/MS spekter získaných kolizí CID v iontové pasti umožňuje hybridní systém 2D iontová past - FT-ICR i další ionizační techniky v cele ICR (ECD, IRMPD) používané při proteomických analýzách a je zástupcem nové třídy přístrojů poskytujících potřebná data (MS/MS, vysoké rozlišení, přesná hmotnost, fragmentace) při zachování jednoduché obsluhy a možnosti rutinních analýz.

5. Spojení 2D iontové pasti s FT-MS Orbitrap analyzátorem

Toto spojení bylo jako komerčně dostupný systém uvedeno firmou Thermo Electron na konferenci ASMS 2005 v San Antonio, když předem publikované výsledky měření[22,23] naznačily potenciál nového MS analyzátoru.

Podobně jako v případě FT-ICR se jedná o FT/MS



Obr. 10. **Schéma Orbitrapu**

analyzátor, tentokrát však s elektrostatickým polem místo magnetického. V analyzátoru jsou ionty zachyceny radiálně a oscilují kolem centrální elektrody, umístěné axiálně v dutině analyzátoru (obr. 10). Oscilace iontů v Orbitrapu jsou závislé na jejich hodnotě *m*/*z* a jsou nedestruktivně měřeny a převedeny Fourierovou transformací na hmotnostní spektra.

Stejně jako v případě spojení s FT-ICR je možné souběžně provádět MS^n experimenty v lineární iontové pasti a měření přesné hodnoty *m*/*z* vybraných iontů v orbitrapu.

Publikované parametry jsou rozlišení 150 000, přesnost měření hodnoty *m*/*z* 2–5 ppm a rozsah *m*/*z* do 6000 amu. Orbitrap zároveň vykazuje velkou kapacitu a dynamický rozsah[24]. Velikou výhodou tohoto analyzátoru je absence rozměrného supravodivého magnetu a tím i nákladného chlazení tekutým heliem a dusíkem. Významnou výhodou může být i jednoduché ovládání.

6. MALDI za sníženého tlaku (vMALDI) jako iontový zdroj 2D iontové pasti

Kombinace MALDI ionizace a 3D iontové pasti byla použita pro rychlou identifikaci bílkovin[20]. Zajímavé možnosti poskytuje spojení 2D iontových pastí s MALDI ionizací za sníženého tlaku (vMALDI) viz tabulka III. Toto spojení umožňuje rychlou a velmi citlivou MS/MS analýzu peptidových štěpů bílkovin po 1D nebo 2D gelové separaci, frakcí peptidů v 96 nebo 384 jamkových destičkách, případně analýzu na BIOCHIPS™ firmy LCI (Fremont, CA). Získaná MS/MS spektra lze použít pro identifikaci bílkovin na základě peptidové sekvence např. programem SEQUEST. Zatímco LC/MS analýza obvykle trvá 30–60 min, analýza vMALDI-2D-IT vyžaduje jednotky minut na vzorek.

Tabulka III
Některé parametry vMALDI-LTQ

Parametr	Hodnota
Rozlišení na vstupu iontů	0,5 Da
Citlivost	250 amol digest (MS/MS s identifikací), 200 amol jeden peptid
Počet stupňů MS/MS	10
Kalibrace	stabilní, provádí se separátně
Rozsah měřených hmotností	do 4000
Přesnost měření *m*/*z*	typicky 15–85 ppm
Rychlost akvizice	1,5 s (3 pulsy laseru × 10 průměrovaných spekter)

Příkladem použití této techniky může být analýza fosforylace mléčných bílkovin (kasein) po jejich separaci na 1D SDS. S využitím Data Dependent MS^3 experimentu, umožňujícího sledování neutrální ztráty 98, která v iontové pasti u většiny peptidů odpovídá ztrátě H_3PO_4 (popř. $HPO_3 + H_2O$) a s využitím prohlížeče SEQUEST™ byly identifikovány všechny čtyři mléčné kaseiny (alfa-kasein S1 a S2, beta-kasein a kappa kasein) a místa jejich fosforylace[21].

7. Závěr

Rychlý vývoj hmotnostních spektrometrů na bázi iontové pasti v posledních letech vede k širokému nasazení těchto systémů v proteomické analýze. Umožňují rychlou a citlivou tandemovou hmotnostní spektrometrii při relativně nízké ceně instrumentace.

Uvedení lineární iontové pasti a její kombinace s ICR-FT-MS a později naprosto nového spojení lineární iontové pasti s analyzátorem na bázi orbitrapu pak ještě zvyšuje potenciál této techniky zvýšením její citlivosti, dynamického rozsahu, možnosti vysokého a velmi vysokého rozlišení a velmi přesného určení hmotnosti. Vývoj v této oblasti zřejmě zdaleka nekončí a iontové pasti budou hrát v budoucnu stále významnější roli.

LITERATURA

1. Steane M.: Appl. Phys. B. *64*, 623 (1997).
2. Prestage J. D., Tjoelker R. L., Maleki L.: *TMO Progress Report 42-143.* (Joseph H. Yuen, ed.). November 15 2000, National Aeronautics and Space Administration 2000.
3. Prestage J. D., Tjoelker R. L., Maleki L.: *Proc. 1999 Joint EFTF/IEEE International Frequency Control Symposium*, str. 121. Besancon 1999.
4. Dolnikowski G. G., Kristo M. J.: Int. J. Mass Spec. Ion Proc. *82*, 1 (1988).
5. Senko M. W., Hendrickson C. L.: J. Am. Soc. Mass Spec. *8*, 970 (1997).
6. Collings B. A., Campbell J. M.: Rapid Comm. Mass Spec. 15, 1777 (2001).
7. Cha B., Blades M. W.: Anal. Chem. 72, 5647 (2000).
8. Schwartz J. C., Senko M. W., Syka J. E. P. A: J. Am. Soc. Mass Spec. 13, 659 (2002).
9. Bier M. E., Syka J. E. P.: US Patent 5,420,425, 1995.
10. Todd J. F. J.: *Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry*. Vol. III. CRC Press, Bocca Raton 1995.
11. March R. E.: J. Mass Spectrom. *32*, 351 (1997).
12. Stafford G. Jr.: J. Am. Soc. Mass Spec. 13, 589 (2002).
13. Quarmby S. T., Yost R. A.: Int. J. Mass Spec.

190/191, 81 (1999).
14. Pegah R. J., Chhabil D.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 18, 1877 (2004).
15. Bondarenko P. V., Chelius D., Shaler T. A.: Anal. Chem. 74, 4741 (2002).
16. Chelius D., Zhang T., Wang G., Shen R. F.: Anal. Chem. 75, 6658 (2003).
17. Bonilla L. E., Thakur R., Guzzetta A., Jaffe J. D.: ; Radically Improved Bottom-Up Protein Identification using a Finnigan LTQ Ion Trap Mass Spectrometer. Chromatography and Mass Spectrometry Application Note AN 328, Thermo Electron Co. San Jose 2005.
18. Sutton J. N.: Top-Down Analysis of the Low Molecular Weight Human Plasma Proteome Using Hybrid Ion Trap-Fourier Transform Mass Spectrometry Application Note AN 344, Thermo Electron Co. San Jose 2005.
19. Griep-Raming J., Metelmann-Strupat W.: *Fully Automated High Throughput Accurate Mass Determination Using FT-ICR Mass Spectrometry*, Application Note AN 30023, Thermo Electron Co. San Jose 2005.
20. Krutchinsky A. N., Kalkum M., Chait B. T.: Anal. Chem. 73, 5066 (2001).
21. Conaway P.-M.C.: *ABRF 2005 February 5-8, 2005, Savannah, GA*. Poster P64-S, abstrakt v J. Biomolecular Techniques *16(1)*, 20 (2005).
22. http://www.chem.purdue.edu/cooks/Orbitrap.htm, staženo 1.9.2005.
23. Hardman M., Makarov A. A.: Anal. Chem. *75(7)*, 1699 (2003).
24. Qizhi Hu: J. Mass Spectrom. 40, 430 (2005).

P. Verner *(Spectronex, Prague):* **Linear Ion Trap and Its Application in Proteomic Analysis**

Linear ion trap (LIT) is a successor of 3D-type ion traps in mass spectrometry. In this article, some features of both types of ion traps are compared as regards their ion capture effectivity, space charge capacity and resolution. Application of LIT in proteomic analysis is disscussed using both ESI and MALDI ionisation. Combination of LIT with both FT-ICR-MS and electrostatic FT-MS (orbitrap) is then given as an example of new development in ion trap mass spectrometry analysis.

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 nejprogresivnějších a nejdynamičtěji 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 nabité částice v cele platí, že magnetická síla daná Lorenzovým zákonem (rovnice *1*)

$$\vec{F}_{\mathrm{mag}} = z\,\vec{v}\cdot\vec{B} \qquad (1)$$

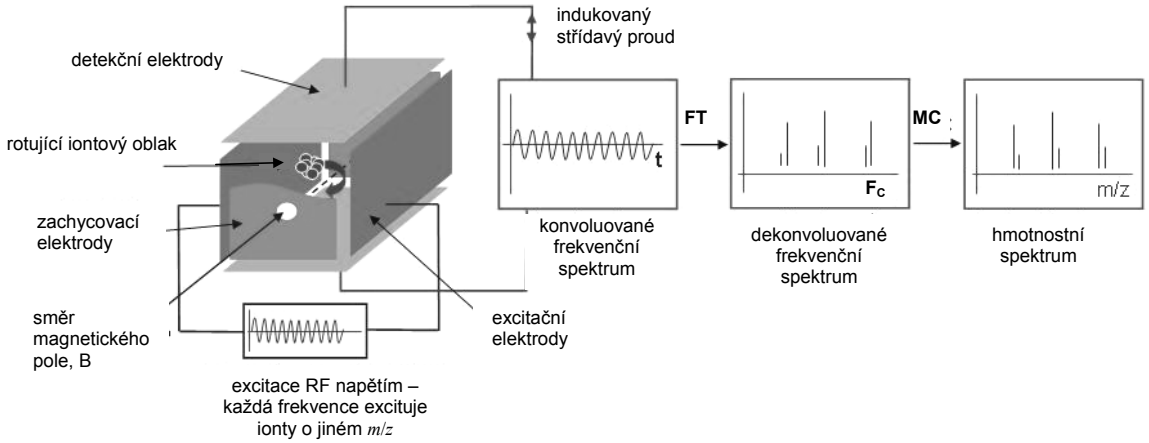
působící na částici o hmotnosti m a náboji z, a pohybující se rychlostí v uvnitř homogenního magnetického pole o magnetické indukci B, je v rovnováze se silou odstředivou. Díky této rovnováze (rovnice *2*) dochází k její radiální stabilizaci a pohybu po spirálovité dráze o poloměru r

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

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 nabité částice rotují po určených drahách s danou frekvencí. Frekvence tohoto cyklotronového pohybu f_c je dána rovnicí *3*

$$f_{\mathrm{c}} = \frac{zB}{2\pi m} = \frac{eB}{2\pi\, m/z} \qquad (3)$$

z je náboj iontu a e je jednotkový náboj. Cyklotronová frekvence iontu je tak nepřímo úměrná hodnotě m/z. Ionty v cele nejprve rotují po nízkých orbitách. Při následné aplikaci rychlého frekvenčního napěťového 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 indukován 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 nákres 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. Této 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 nejrůznější 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].

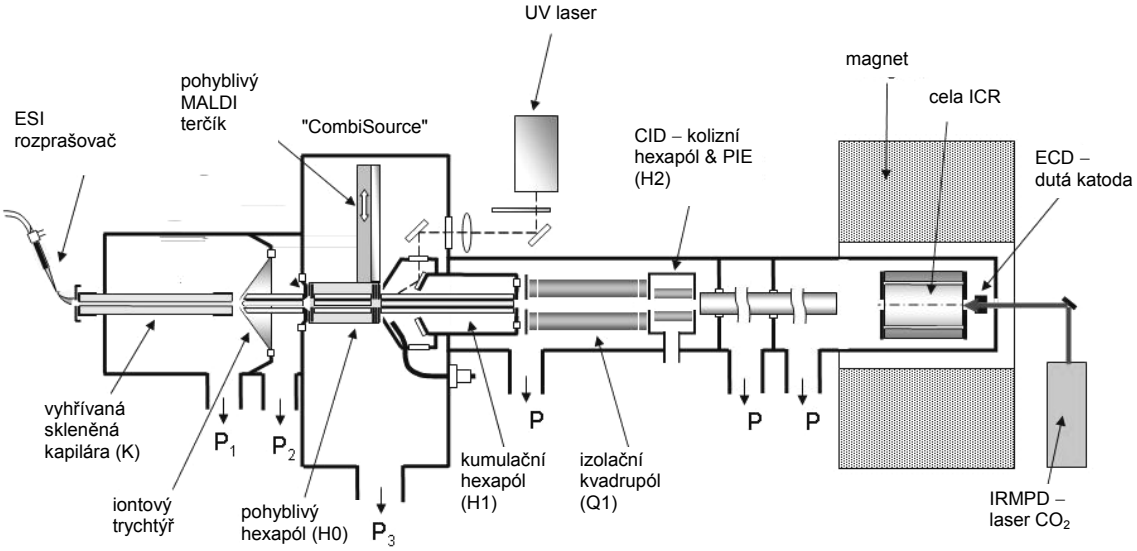
Pro proteomické studie, mezi které patří identifikace proteinů či ověřování jejich sekvence, *de-novo* sekvenování nebo charakterizace post-translačních modifikací (PTM), lze v FTMS s úspěchem využít několik možných fragmentačních technik. Patří mezi ně kolizně indukovaná disociace (CID – z angl. Collision-Induced 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 CombiSource[34]. Plně automatická záměna jednoho iontového zdroje za druhý v daném kombinovaném zdroji pak trvá pouhých 60 sekund.

Obecně platí, že nejrůznější 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 nákres 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 pohybující se platformě, na které je zároveň umístěn i MALDI terčík.

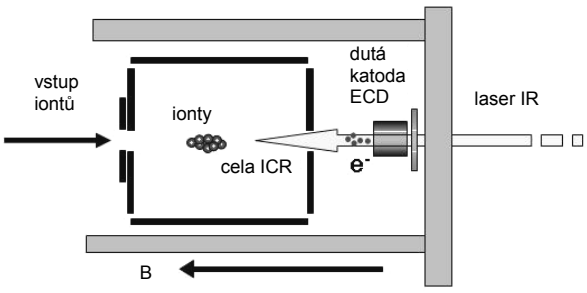
V případě používání MALDI zdroje tak pohybující se platforma odsune hexapól H0 z dráhy a před H1 předsune MALDI terčík. Stejně jako všechny ostatní MALDI přístroje firmy Bruker Daltonics má i přístroj APEX-Q MALDI terčík ve standardním formátu mikrotitračních destiček (MTP, z angl. MicroTiter Plate) s 384 pozicemi pro nanášení vzorků. Také v tomto případě lze kromě klasických ocelových MALDI terčíků využívat patentované technologie AnchorChip, kdy je povrch terčíku pokryt hydrofobní vrstvou a pouze na jednotlivých pozicích jsou místa s hydrofilními kotvičkami, které slouží k lepšímu zkoncentrování a homogennímu usychání vzorku na terčíku. Mezi největší výhody této technologie patří bezesporu zvýšená citlivost a rozlišení přístroje[35]. MALDI terčík 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 pouštěn 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 mimorezonančního radiofrekvenčního urychlovacího napětí, které je obvykle nastaveno o 1–2 kHz nižší než cyklotronová frekvence studovaných iontů[20]. Pokaždé, když je cyklotronová frekvence iontů ve stejné fázi s frekvencí mimorezonančního 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 CO_2 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 z opačné strany než přicházejí ionty (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 k jejich dalším nízkoenergetickým fragmentacím. Z toho důvodu jsou IRMPD fragmentační spektra bohatší na menší fragmenty a jsou tím méně specifická než spektra SORI.



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

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 zahřívaná dávkovací katoda prstencovitého tvaru[38]. Toto uspořádání pak dovoluje provádět vysokorychlostní ECD fragmentaci prstencovitým proudem pomalých elektronů o nízké energii (< 1 eV), který je kolmý na celu 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–Cα. *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 chycených v cele ICR v rámci jednoho FTMS experimentu dovoluje získat vícestupňová 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 autosamplerem Famos a přepínačem mikrokolon Switchos II. Použitý průtok byl 200 nL min^{-1} při 90–120 min gradientu acetonitril/voda. Pro separaci byla použita 75um PepMap kolona od firmy LC Packings.

3. Výsledky a diskuse

3.1. Výhoda robustnosti kombinovaného ionizačního zdroje

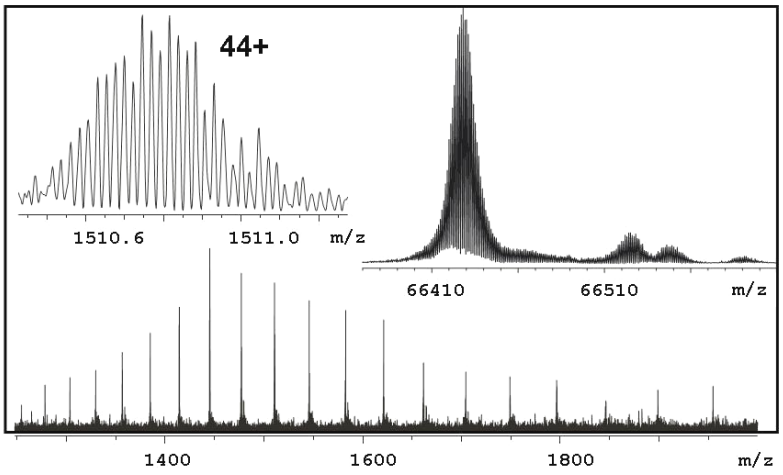
Obrovskou výhodou kombinovaného ESI/MALDI zdroje „CombiSource" je, že během přepínání mezi těmito módy není třeba systém stále kalibrovat ani jinak ladit. Následující experiment ukazuje stabilitu a robustnost systému i při častém automatickém přepínání mezi módy. V tomto experimentu byl pro měření použit 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 změřeno v infúzním experimentu. Protože většina parametrů FTMS přístroje se zlepšuje lineárně nebo kvadraticky se zvyšujícím se polem magnetu[40], je použití FTMS instrumentace s lepšími magnety důležité pro provádění experimentů také na časové škále HPLC (jednotky až desetiny sekund). Obr. 5 ukazuje ESI spektrum 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

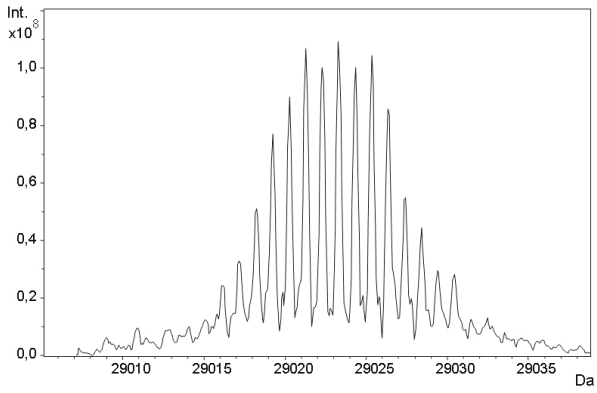
Zdroj	Experimentální hmota [Da]	Přesnost hmot [ppm]
MALDI	1183,56225	1,75
ESI	1183,56342	0,76
MALDI	1183,56312	1,01
ESI	1183,56366	0,56
MALDI	1183,56311	0,85
ESI	1183,56330	0,86
MALDI	1183,56323	0,69
ESI	1183,56334	0,83
MALDI	1183,56323	0,92
ESI	1183,56342	0,76
MALDI	1183,56218	1,81
ESI	1183,56346	0,73
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
Průměr z MALDI	*1183,56292*	*1,18*
Průměr z ESI	*1183,56337*	*0,81*



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

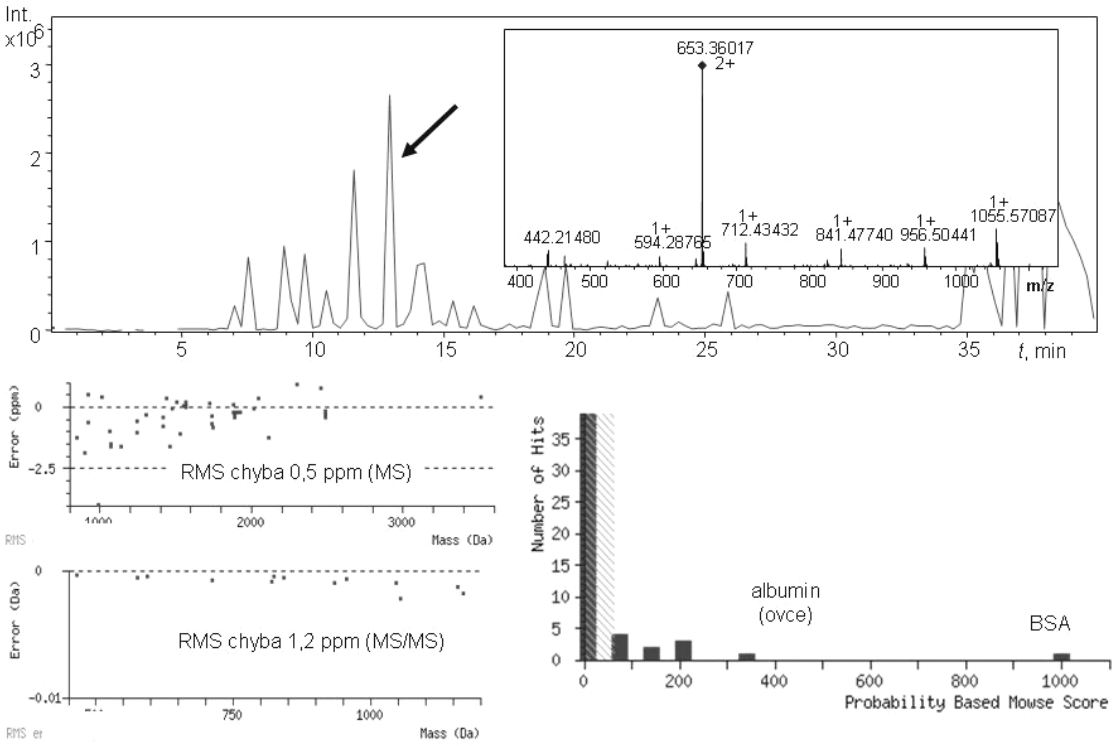
Stejně kvalitní výsledky jako pro celé proteiny o vysokých hmotnostech lze samozřejmě získat i pro proteinové štěpy. Obr. 6 ukazuje BPC (Base Peak Chromatogram) pro albumin hovězího séra (BSA), štěpení a MS/MS spektrum vybraného píku. Jak lze zjistit z vyhledávání v databázi MASCOT, jsou přesnosti měřené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



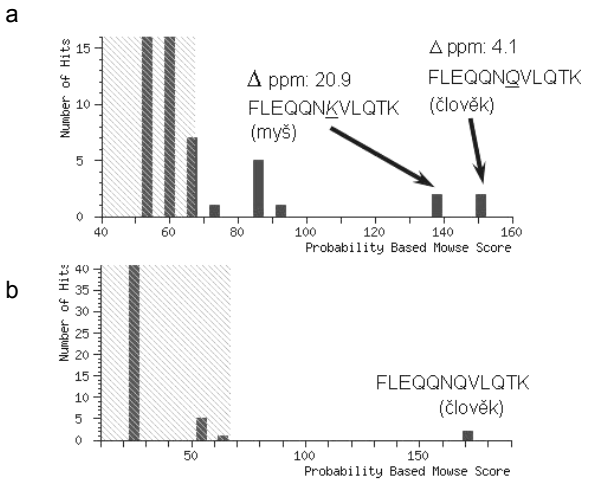
Obr. 5. **Ukázka vysokého rozlišení přístroje na izotopicky rozlišeném ESI spektru pro intaktní protein karbonáthydrolyasu** (MW 29 022 Da)

3.4. Vysoká přesnost hmotností v MS/MS spektrech

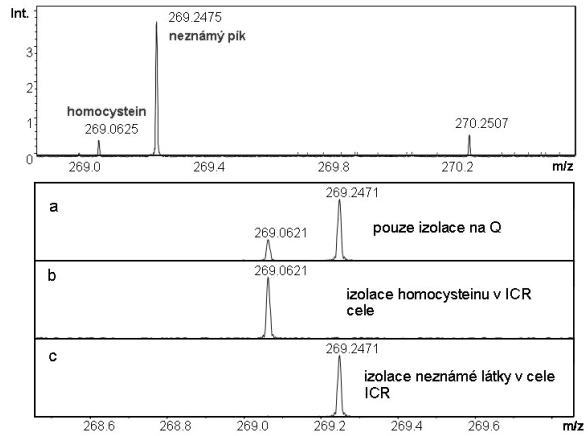
Také pro získaná MS/MS data je velmi důležitá přesnost měřené hmotnosti vzorků. V některých případech totiž může být velmi důležité rozlišovat i malé rozdíly v sekvencích na základě ultrapřesných MS/MS spekter. Obr. 7 ukazuje např. FT MS/MS spektrum ze štěpení proteinu albuminu v lidském séru (HSA – 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

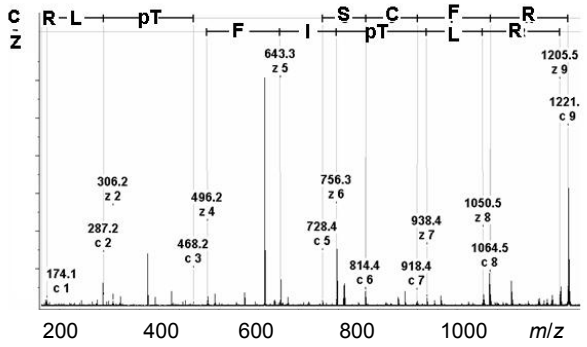
FTMS poskytuje nejen MS/MS data s vysokou přesností hmotností a rozlišením. V případě, že k izolaci a fragmentaci iontů dochází v ICR cele namísto ve vnějším kvadrupólu Q1 a hexapólu H2, je tato izolace před vlastní fragmentací extrémně přesná. Obr. 8 ukazuje tento výhodný způsob izolace na spektru aminokyseliny homocysteinu o *m*/*z* 269,0625. V tomto spektru se kromě píku aminokyseliny vyskytuje také jeden neznámý pík, 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 nabité 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 proteinů[47]. IRMPD pracuje na principu ozáření mateřských (prekurzorových) 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 nejkvalitnější 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. Bezesporu 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., Eyler 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.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

SYSTÉM PRACUJÍCÍ NA PRINCIPU DVOJROZMĚRNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE PROTEINŮ JAKO ALTERNATIVA K DVOJROZMĚRNÉ GELOVÉ ELEKTROFORÉZE

HELENA SKALNÍKOVÁ[a,d], HANA KOVÁŘOVÁ[a,d], JIŘÍ MOOS[b,d], VANDA FILOVÁ[b,d] a PETR HALADA[c,d]

[a] Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky, Rumburská 89, 277 21 Liběchov, [b] Immunotech a.s., Radiová 1, 102 27 Praha 10, [c] Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, [d] Společná proteomová laboratoř ÚŽFG, MBÚ, ÚEM AV ČR a Immunotech, a.s., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, http://pf2d.science-research.net/ skalnikova@iapg.cas.cz, kovarova@iapg.cas.cz, jmoos@beckman.com, halada@biomed.cas.cz

Došlo 2.9.05, přijato 16.11.05.

Klíčová slova: proteomika, kapalinová chromatografie, inhibitor cyklin dependentních kinas

Úvod

Neuspokojivé výsledky léčby nádorových onemocnění silně stimulují výzkum a vývoj nových protinádorových léčiv. Tyto léky jsou obvykle směřovány proti novým cílům, o kterých se domníváme, že hrají důležitou úlohu v maligní transformaci buněk. Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou typickým představitelem takovýchto cílů díky jejich zvýšené aktivitě ve většině nádorových buněk. Synteticky připravené inhibitory CDK jsou tak jedním z perspektivních způsobů protinádorové léčby[1].

Od roku 1994, kdy byl popsán olomoucin jako první inhibitor CDK ze skupiny trisubstituovaných purinů[2], bylo syntetizováno mnoho derivátů odvozených od olomoucinu. Tyto látky zastavují buněčný cyklus na přechodech G1/S a G2/M, jsou velmi cytotoxické pro nádorové buňky v *in vitro* testech a jeden z derivátů, bohemin, je účinný rovněž *in vivo*[3]. Pro porozumění mechanismu účinku daného léku je nutné studovat jeho působení na molekulární úrovni. Analýza proteomu je nepochybně účinnou technikou pro porozumění buněčné odpovědi na úrovni proteinů.

Proteomika představuje nové možnosti nejen pro laboratoře zabývající se studiem proteinů, ale i výzvu pro firmy zabývající se vývojem analytických přístrojů. Obtížnost úkolu vyplývá z velkého počtu analytů – proteinů či peptidů, které musíme separovat a charakterizovat v jedné globální analýze určitého proteomu. Zatímco projekt sekvenace lidského genomu pracoval s desítkami tisíc genů, problém proteomu je mnohem složitější a celkový počet možných proteinů v organismu se odhaduje až v řádu milionů[4]. Proteiny jsou značně různorodé, liší se velikostí, nábojem i hydrofobicitou. Mnohé z nich jsou navíc posttranslačně modifikovány nebo tvoří komplexy s jinými proteiny, či nukleovými kyselinami.

Dvojrozměrná gelová elektroforéza (2DE) je dnes základní metodou separace komplexních proteinových směsí. Proteiny jsou v prvním rozměru rozděleny podle svého izoelektrického bodu, ve druhém rozměru podle molekulové hmotnosti. Přes své nesporné přednosti má 2DE některé nedostatky, např. nízkou účinnost solubilizace membránových proteinů a omezení v dělení hydrofobních proteinů či proteinů o extrémní velikosti nebo náboji[5].

V roce 2003 byl představen systém ProteomeLab™ PF 2D (Beckman Coulter Inc.), který má pomoci problémy 2D elektroforézy alespoň z části překlenout. PF 2D je analyzátor pracující na principu dvojrozměrné HPLC. Proteiny jsou tímto systémem separovány podle svého izoelektrického bodu a následně ve druhém rozměru podle hydrofobicity.

Cílem této studie bylo využití nového proteomického přístupu, dvojrozměrné kapalinové chromatografie PF 2D ke sledování proteinových změn v nádorových buňkách po působení protinádorové látky, bohemina. Bylo provedeno srovnání proteinových map lyzátů CEM buněk (linie buněk T-lymfoblastické leukemie) ošetřených a neošetřených tímto inhibitorem cyklin-dependentních kinas a některé z ovlivněných proteinů byly identifikovány hmotnostní spektrometrií.

Experimentální část

Příprava buněk

Buněčná linie CEM byla kultivována v mediu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) s přídavkem 10% fetálního telecího séra, 50 U ml^{-1} penicilinu a 0,1 mg ml^{-1} streptomycinu. Buňky byly kultivovány při 37 °C v 5% CO_2 v přítomnosti nebo nepřítomnosti 60 μM bohemina po dobu 12 h. Po kultivaci byly buňky opakovaně promyty v ledovém fosfátovém pufru (2,7 mM KCl a 137 mM NaCl v 10 mM fosfátovém pufru, pH 7,3) a zcentrifugovány.

Dvojrozměrná kapalinová chromatografie PF 2D

Buňky CEM byly lyzovány v roztoku obsahujícím 6 M močovinu, 2 M thiomočovinu, 50 mM TRIS, 2% w/v oktylglukosid, 5 mM (2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (TCEP), 10% glycerol a 1 mM koktejl proteasových inhibitorů (Sigma-Aldrich). Po následné centrifugaci byl lyzát odsolen na kolonkách PD 10 (kolonky jsou součástí PF 2D kitu, Beckman Coulter Inc.).

Dvojrozměrná kapalinová separace proteinů byla provedena na systému ProteomeLab™ PF2D podle pokynů výrobce. Kolony a chromatofokusační roztoky jsou dodávány výrobcem PF 2D. Pro analýzu bylo naneseno 0,5 až 1,8 mg celkového proteinu.

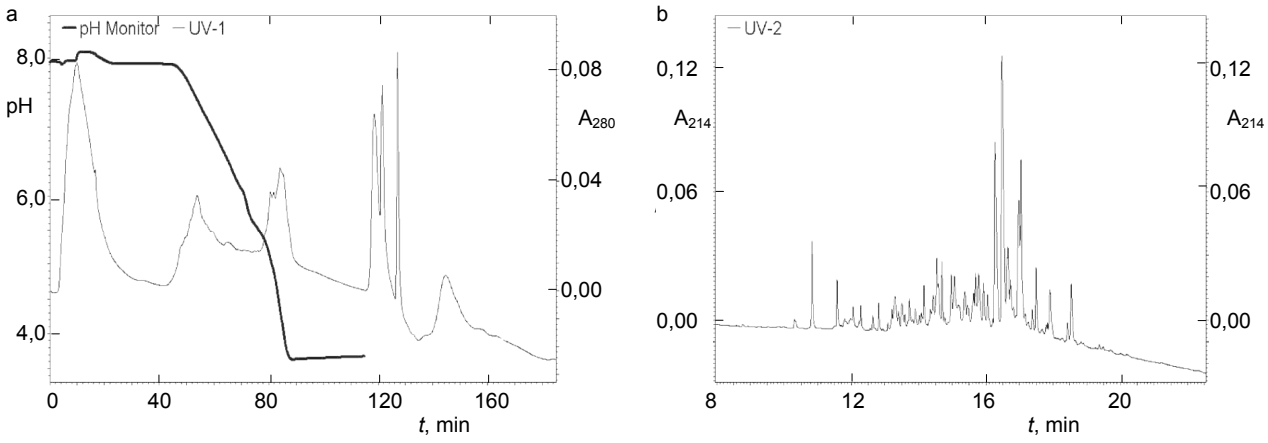
V prvním rozměru byly proteiny separovány na chromatofokusační koloně dle jejich interakce s kolonou v závislosti na pH. Bazické proteiny s pI nad 8,5 nejsou kolonou zachyceny, byly však detegovány a jímány sběračem frakcí. Po vytvoření gradientu pH v rozsahu 8,5–4 byly proteiny z kolony vymývány ve frakcích podle měnící se hodnoty pH. Kyselé proteiny s pI pod 4,0 byly pak vymyty roztokem o vysoké iontové síle (1M NaCl). Frakce separované chromatofokusační kolonou byly monitorovány integrovaným pH metrem s průtočnou elektrodou a UV detektorem při vlnové délce 280 nm. Bazické proteiny, proteiny vymyté gradientem pH i kyselé proteiny byly sbírány v celkem 27 frakcích a přímo automaticky nastřikovány na druhou kolonu.

Proteiny byly ve druhém rozměru separovány pomocí kolony s reverzní fází, kde se proteiny dělí podle hydrofobicity. Náplní je speciálně upravený neporézní silikagel s malým průměrem (1,5 μm) a vysokou uniformitou velikosti částic zajišťující vysokou dělicí schopnost. Separace probíhala 35 min v lineárním gradientu 0–100 % acetonitrilu s přídavkem 0,8–1 % v/v trifluoroctové kyseliny (TFA). Rozdělené proteiny byly kvantifikovány UV detektorem při 214 nm. Interferující materiál neproteinového charakteru putuje při separaci s čelem. Jednotlivé proteinové frakce byly sbírány v intervalech 0,6 min sběračem frakcí FC204 (Gilson) do 96 jamkových mikrotitračních destiček a připraveny pro hmotnostní spektrometrickou analýzu.

Data byla zpracována softwarem ProteoVue. Vytvořené 2D proteinové mapy, znázorňující polohu proteinu v závislosti na pI a hydrofobicitě, byly pak porovnávány pomocí software Delta Vue. Celé softwarové vybavení je součástí systému PF 2D. Proteiny, jejichž hladina se více než dvojnásobně lišila mezi kontrolními a boheminem ošetřenými vzorky ve třech nezávislých opakovaných pokusech, byly vybrány pro identifikaci hmotnostní spektrometrií.

Hmotnostní spektrometrie

Vybrané frakce po druhém rozměru PF 2D byly kompletně vysušeny pomocí SpeedVac koncentrátoru Savant DNA 110–230 (důležité je úplné odstranění TFA). Proteiny byly štěpeny přes noc v 50 μl pufru obsahujícím 0,01% 2-merkaptoethanol, 0,1 M 4-ethylmorfolin acetát, 1 mM $CaCl_2$, 10% acetonitril a 50 ng trypsinu. Získané peptidy byly extrahovány do 40% acetonitrilu/0,1% TFA a měřeny v pozitivním modu na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru BIFLEX II (Bruker). Roztok α-kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny v 30% acetonitrilu/30% methanolu/0,2% TFA (10 mg ml^{-1}) byl použit jako matrice MALDI. Spektrometr byl externě kalibrován pomocí peptidových standardů angiotenzinu II a insulinu.



Obr. 1. **Dvojrozměrná chromatografická separace proteinů ProteomeLab™ PF 2D;** a) průběh separace v prvním rozměru (chromatofokusace). Proteiny lyzátů CEM buněk ošetřených boheminem a neošetřených kontrolních buněk byly separovány v pH gradientu 8 až 4. Frakce byly sbírány v 0,3 pH intervalech, resp. po 1,5 ml objemech v době, kdy se pH nelišilo. b) Separace v druhém rozměru (HPLC s reverzní fází). Proteiny v pI frakcích z první dimenze byly dále separovány podle hydrofobicity. Příklad separace pI frakce č. 18 (pH 6,76-7,06)

Výsledky a diskuse

V naší předchozí práci[6,7] byly metodou 2DE s následnou hmotnostně spektrometrickou analýzou úspěšně identifikovány proteiny, které byly rozdílně exprimovány po působení boheminu na CEM T-lymfoblastické leukemické buňky a na buňky plicního adenokarcinomu linie A549. Pomocí 2DE lyzátů buněk CEM bylo separováno až 2000 proteinových skvrn v jednom gelu, počítačová analýza diferenciální exprese odhalila 9 skvrn s výrazně odlišnou koncentrací v buňkách ošetřených boheminem. Šest z těchto devíti proteinů bylo pak identifikováno hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF.

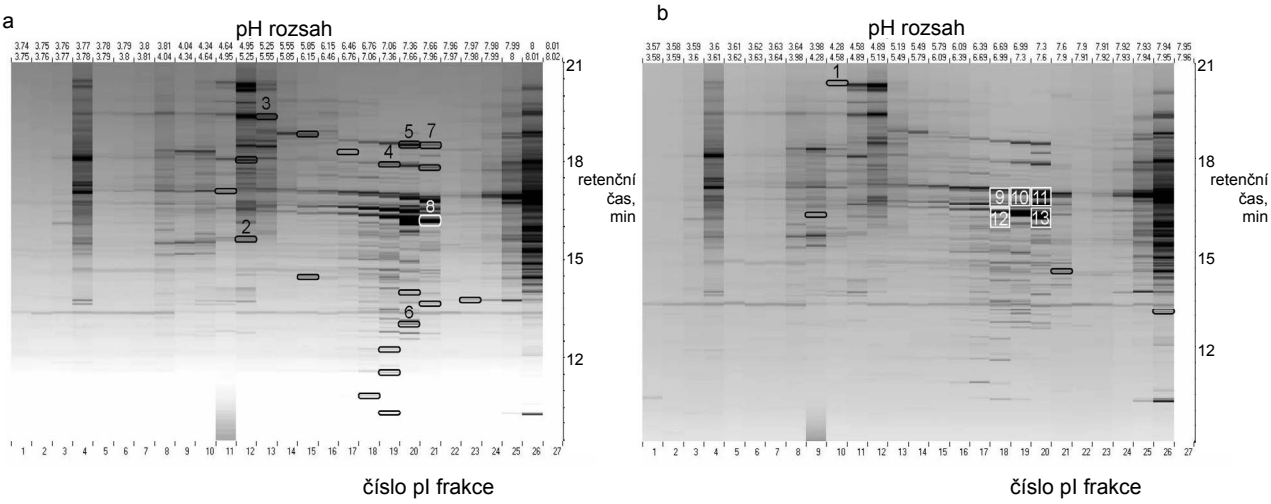
Cílem této studie bylo rozšířit náš předchozí výzkum molekulárních mechanismů doprovázejících účinek boheminu novou technikou PF 2D. Při porovnání vlastního procesu analýzy se jeví výhodou systému PF 2D možnost plně automatické analýzy. Ta je, mimo jiné, umožněna i tím, že proteiny zůstávají po celou dobu analýzy v roztoku. Systém PF 2D má také vyšší kapacitu a můžeme na něj nanášet až 5 mg celkového proteinu, pokud je takové množství snadno dostupné. Z našich dosavadních zkušeností však vyplývá, že PF 2D vykazuje větší ztráty proteinů během analýz než 2DE. U analýz, kde je k dispozici pouze limitované množství vzorku, je pak výhodnější 2DE.

Po separaci buněčných lyzátů dvojrozměrnou kapalinovou chromatografií jsme detegovali 1500–2300 proteinových píků. Během separace v první dimenzi (obr. 1a) bylo sbíráno celkem 27 pI frakcí. Každá z těchto frakcí z prvního rozměru byla reverzně-fázovou chromatografií dále rozdělena do 60–70 píků (obr. 1b). I přes vysoké rozlišení tohoto systému mohou některé proteinové frakce a/nebo proteinové píky obsahovat více než jeden protein. Tato skutečnost je obvykle později prokázána následnou analýzou hmotnostní spektrometrií.

Použití UV detektorů pro detekci separovaných proteinů umožňuje přesnou kvantifikaci (kromě píků obsahujících více než jeden protein) bez potřeby dalšího barvení proteinů. UV absorbance kvantitativně odpovídají množství proteinu. Porovnání kvalitativních a kvantitativních rozdílů mezi dvěma vzorky v dané specifické pI frakci po jejím rozdělení ve druhém směru umožňuje software DeltaVue, který srovnává relativní intenzity UV absorbance. Za významně rozdílné byly považovány proteinové zóny, u nichž se plocha píků lišila minimálně dvojnásobně ve 3 nezávislých opakovaných pokusech.

Většina rozdílně exprimovaných proteinů byla přítomna ve sníženém množství (celkem 20 proteinů) po působení boheminu (obr. 2a), pouze čtyři proteiny byly zvýšeny (obr. 2b). Některé z rozdílně exprimovaných proteinů byly úspěšně identifikovány hmotnostní spektrometrií (označené čísly v obr. 2). Přehled identifikovaných proteinů uvádí tabulka I. Tyto proteiny náleží k různým funkčním skupinám, zejména jaderným proteinům vázajícím DNA a adaptorovým proteinům.

Tři ze sníženě exprimovaných proteinů po působení boheminu, splňující kritérium „jeden protein v jednom píku“, byly identifikovány jako histon H2B.a (protein číslo 8 na obr. 2a a v tabulce I) a histon H3.3 (proteiny č. 4 a 5 na obr. 2a a v tabulce I). Výskyt různých forem histonů v oblasti pI 6,7–7,9 není typický, protože obvyklé pI histonů leží mezi 10 a 12. Nicméně detekce histonu H3 pomocí western blotu se specifickou protilátkou (data nepublikována) prokázala přítomnost tohoto histonu nejen ve frakcích s pH 7–8, ale zejména v pI frakci číslo 26, která obsahuje všechny bazické proteiny s pI > 8,5, které nejsou chromatofokusační kolonou zachyceny. Posun pI histonů



Obr. 2. **Dvojrozměrná proteinová mapa kontrolních buněk (a) a boheminem ošetřených buněk (b) vytvořená softwarem ProteoVue**; rozdílně exprimované proteiny jsou označeny podlouhlými rámečky. Čísla označují proteiny identifikované metodou MS (přehled viz tabulka I). Frakce označené čísly 9-13 obsahující vysoce abundantní proteiny, jejichž exprese se vlivem boheminu neměnila, ale byly identifikovány MS. a) V mapě jsou vyznačené proteiny, jejichž exprese byla nižší v buňkách ošetřených boheminem oproti kontrolním buňkám. b) V mapě jsou v podlouhlých rámečcích proteiny, jejichž exprese byla zvýšená po působení boheminu

Tabulka I
Identifikované rozdílně exprimované proteiny po působení boheminu

Protein [a]	Název proteinu	Číslo v databázi SwissProt	Počet přiřazených peptidů	Pokrytí sekvence [%]	M_W teoret. [kDa]	pI teoret.	Rozdíl B vs C [b]
1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	7	26	61	5,7	+ 2 násobně
2	Crk-like protein	P46109	8	38	34	6,3	– 7 násobně
3	actin, cytoplasmic 1	P60709	8	29	42	5,3	– 4 násobně
	bifunctional purine biosynthesis protein PURH	P31939	7	17	64	6,3	– 4 násobně
4	histone H3.3	P84243	5	26	15	11,3	– 2 násobně
5	histone H3.3	P84243	8	37	15	11,3	– 10 násobně
6	nuclease sensitive element binding protein 1	P67809	10	48	36	9,9	– 7 násobně
7	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	P09012	8	28	31	9,8	nestanoveno
	histone H3.3	P84243	5	23	15	11,3	
8	histone H2B.a	P62807	10	59	14	10,3	– 10 násobně
9	histone H2A.e	Q99878	5	36	14	10,9	–
	histone H4	P62805	6	47	11	11,4	
10	histone H2A.e	Q99878	3	18	14	10,9	–
	histone H4	P62805	3	32	11	11,4	
11	histone H2A.e	Q99878	6	38	14	10,9	–
	histone H4	P62805	5	43	11	11,4	
12	histone H2B.a	P62807	4	27	14	10,3	–
13	histone H2B.a	P62807	3	26	14	10,3	–

[a] Čísla proteinů v tabulce se shodují s číslováním na obrázku 1; [b] změna v hladině exprese proteinu v boheminem ošetřených vzorcích versus neošetřených kontrolách (založeno na ploše píků UV_{214} absorbance)

do kyselejší oblasti může být způsoben jejich posttranslačními modifikacemi. Histon H3.3 může nahrazovat histon H3 v místech aktivní transkripce. Fosforylace *N*-konce histonu H3 na serinu 10 je klíčovou pro přestavbu chromatinu a vstup buňky do mitózy a meiózy. Interakce mezi fosforylací Ser 10 a/nebo acetylací lysinů 9 a 14 může též regulovat transkripci mnoha genů díky změnám ve struktuře chromatinu[8]. Podrobná analýza sekvence a modifikací histonu H3.3 nyní probíhá v našich laboratořích. Jako velmi abundantní proteiny, jejichž hladina se však vlivem boheminu neměnila, byly identifikovány i další formy histonů, jmenovitě histonů H2A.e, H4 (protein č. 9–11 na obr. 2b a v tabulce I) a H2B.a (č. 12 a 13 na obr. 2b a v tabulce I).

Dalšími proteiny, jejichž hladina byla působením boheminu snížena, byly crk-like (crkl) protein a bifunkční protein biosyntézy purinů (bifunctional purine biosynthesis protein, PURH). Rodina crk (c-crkI, c-crkII, c-crkIII a crkl) adaptorových proteinů je součástí mnoha buněčných signalizačních drah. Tyto proteiny obsahují domény SH2 a SH3, které umožňují tvorbu proteinových komplexů a jejich směrování do určitých míst v buňce. Proteiny Crk se účastní přenosu signálu od různých receptorů[9]. Poruchy regulace proteinů crk a mechanismů spojených s kontrolou buněčné migrace a přežívání se mohou podílet na progresi nádorů a jiných onemocněních[10,11]. Snížená exprese proteinu crkl spojená s působením boheminu na nádorové buňky může být novým důležitým ukazatelem vypovídajícím o protinádorovém účinku boheminu.

Výsledky dvojrozměrné kapalinové analýzy změn proteomu po působení boheminu významně doplňují data získaná pomocí gelové 2DE. ProteomeLab™ PF 2D systém je vhodný pro srovnávací proteomické analýzy buněčných proteinových cílů a drah, které jsou zasaženy protinádorovým působením inhibitoru cyklin-dependentních kinas. Identifikované proteiny reprezentují potenciální bioindikátory buněčné odpovědi na léčbu boheminem, jejichž validace vyžaduje další ověření.

LITERATURA

1. Sausville E. A., Johnson J., Alley M., Zaharevitz D, Senderowicz A. M.: Ann. N.Y. Acad. Sci. *910*, 207 (2000).
2. Veselý J., Havlíček L., Strnad M., Blow J. J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D. S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S.: Eur. J. Biochem. *224*, 771 (1994).
3. Hajduch M., Havlíček L., Veselý J., Novotný R., Mihal V., Strnad M.: Adv. Exp. Med. Biol. *457*, 341 (1999).
4. Patterson S. D.: Current Proteomics *1*, 3 (2004).
5. Patterson S. D., Aebersold R. H.: Nature Genetics Suppl. *33*, 311 (2003).
6. Kovářová H., Hajduch M., Kořínková G., Halada P., Krupičková S., Gouldsworthy A., Zhelev N., Strnad M.: Electrophoresis *21*, 3757 (2000).
7. Kovářová H., Halada P., Man P., Dzubak P., Hajduch M.: Technol. Cancer Res. Treat. *1*, 247 (2002).
8. Nowak S. J., Corces V. G.: Trends Genet. *20*, 214 (2004).
9. Feller S. M., Posern G., Voss J., Kardinal C., Sakkab D., Zheng J., Knudsen B. S.: J. Cell Physiol. *177*, 535 (1998).
10. Miller C. T., Chen G., Gharib T. G., Wang H., Thomas D. G., Misek D.E., Giordano T. J., Yee J., Orringer M. B., Hanash S. M., Beer D. G.: Oncogene *22*, 7950 (2003).
11. Chodniewicz D., Klemke R. L.: Biochim. Biophys. Acta *1692*, 63 (2004).

H. Skalníková[a,d], H. Kovářová[a,d], J. Moos[b,d], V. Filová[b,d], P. Halada[c,d] *([a] Institute of AnimalPhysiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Liběchov, [b] Immunotech Co., Prague, [c] Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, [d] Joint Laboratory for Proteome Analysis, Prague):*

A System Based on Principle of Two-Dimensional Liquid Chromatography of Proteins as an Alternative to Two-Dimensional Electrophoresis

New analytical systems alternative to two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-E) of proteins in very complex biological samples have been developed recently. One of them, two-dimensional liquid protein fractionation system PF 2D, has been used in our study and compared with previously used 2DE. PF 2D is based on 2D HPLC technique, where proteins are separated according their isoelectric point and hydrophobicity in the 1st and 2nd dimension, respectively. Fractions are collected in 96-well microplates; proteins remain in liquid phase during the entire separation process. Omitting solid phase is beneficial to subsequent protein identification by mass spectrometry. Separation data are processed using ProteoVue software and the resulting 2D protein maps are compared using DeltaVue software package generating a differential display view of up-regulated and down-regulated proteins. PF 2D approach have been used for interlysate comparison between cultured T-lymphoblastic leukemia CEM cells grown in the presence or absence of new synthetic cyclin-dependent kinase inhibitor, bohemine. The results indicate that both proteomics technologies applied to the same sample provide complementary data. The use of PF 2D contributes to a more complete understanding of the biological system studied.

PROTEOMIKA V MOLEKULÁRNÍ TOXIKOLOGII: IDENTIFIKACE POTENCIÁLNÍCH ČASNÝCH PROTEINOVÝCH BIOMARKERŮ HEPATOKARCINOGENITY U KRYS

KERSTIN FELLA[a], MATTHIAS GLÜCKMANN[b], VOLKER KRUFT[b], PETER-JÜRGEN KRAMER[a] a MICHAELA KRÖGER[a]

[a]Merck KGaA, Institute of Toxicology, Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt, Německo, [b]Applied Biosystems, Darmstadt, Německo
michaela.kroeger@merck.de

Došlo 27.8.05, přijato 5.10.05.

Klíčová slova: MALDI TOF-TOF MS, proteomika, biomarkery, molekulární toxikologie, hepatokarcinogenita

Obsah

1. Úvod
2. Identifikace biomarkerů metodami dvourozměrné elektroforézy a hmotnostní spektrometrie
3. Instrumentace TOF/TOF
4. Biologický význam výsledků získaných 2DE/MS
   4.1. Histopatologická pozorování
   4.2. Analýza akutních toxických efektů
   4.3. Subakutní a chronické toxické účinky
   4.4. Potenciální proteinové biomarkery pro predikci
5. Závěr

1. Úvod

Metody, které jsou užívány v současné tradiční toxikologii ke studiu toxicity nových potenciálních léčiv a jiných chemických látek, jsou založeny zejména na klasických bezpečnostních studiích na zvířatech. Tyto postupy zahrnují rovněž histopatologické a biochemické výsledky. S ohledem na etické aspekty je nutno tradiční toxikologické metody podpořit moderními analytickými technikami, které umožňují postihnout změny na molekulární úrovni dříve, než se projeví morfologicky. Zejména výzkum karcinogenity je založen na dlouhodobých studiích, ve kterých mohou zvířata chronicky strádat. Detekce nových molekulárních biomarkerů už před tím, než se nádor projeví morfologicky, by mohla v budoucnu umožnit zkrácení experimentů.

V molekulární toxikologii, nově se etablujícím oboru, jsou jedním z přístupů k hledání biomarkerů proteomické techniky. Ke studiu molekulárních změn v krysích játrech vyvolaných hepatokarcinogenem jsme proto použili dvourozměrnou elektroforézu (2DE) a poté hmotnostní spektrometrii (MS). Tímto postupem jsme byli schopni detegovat potenciální časné proteinové biomarkery, které mohou do budoucna umožnit brzkou předpověď možných toxických i karcinogenních účinků vybraných látek[1]. Analýza biologické významnosti nám navíc může pomoci objasnit základní fyziologické a patofyziologické mechanismy[2].

2. Identifikace biomarkerů metodami dvourozměrné elektroforézy a hmotnostní spektrometrie

Cílem této studie bylo monitorovat metodou 2DE proteinové změny vyvolané hepatokarcinogenem *N*-nitrosomorfolinem (NNM) v jaterní tkáni krys. Diferenční expresní analýza jater ovlivněných NNM vedla k vytipování proteinů, které pak byly vyříznuty z gelu, proteolyticky naštěpeny a identifikovány jak metodou peptidového mapování (peptide mass fingerprinting, PMF), tak také tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS).

K hledání potenciálních biomarkerů pro předpověď toxicity/karcinogenity jsme použili samce krys kmene Wistar, kteří byli vystaveni vlivu jaterního toxinu NNM (působícího na DNA) v koncentraci 20 mg kg^{-1} tělesné hmotnosti po 7 týdnů následovaných osmnácti týdenním obdobím regenerace. Zvířata byla utracena v různých časových intervalech (po jednom dni, po 3 týdnech a po 25 týdnech), extrahované jaterní proteiny byly separovány metodou 2DE (cit.[3]). Proteiny v gelu byly barveny přes noc 1μM roztokem barviva na bázi komplexu ruthenia v 20% ethanolu a zviditelněny skenováním gelu na fluorescenčním laserovém skeneru Molecular Imager FX (BioRad, Hercules, CA). Diferenční expresní analýza byla provedena s použitím software ProteomWeaver 2.0 (Definiens, Mnichov, Německo). Vybrané proteinové skvrny (landmarks, obr. 1) byly identifikovány ve všech gelech a umožnily tak přesné vzájemné přiřazení jednotlivých obrazových analýz. Proteinové skvrny, které vykazovaly signifikantní regulaci exprese proteinů (hladina významnosti $P \leq 0{,}02$), byly vyříznuty z gelu a přes noc štěpeny trypsinem (Promega, Madison, WA, USA). Peptidové vzorky pro UV-MALDI analýzu byly připraveny standardní metodou „schnoucí kapky“ s matricí 4-hydroxy-α-kyanoskořicové kyseliny (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2 mg ml^{-1} ve směsi acetonitril : 0,1% kyselina trifluoroctová, 1:1 (v/v). MS a MS/MS analýza proběhla na hmotnostním spektrometru Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer MALDI TOF/TOF® (obr. 2) (cit.[4]). Kombinované hledání peptidovým mapováním and tandemovou hmotnostní spektrometrií bylo umožněno prohledávacími algoritmy MASCOT (Matrix Science Ltd., UK) v databázi SWISS-PROT.

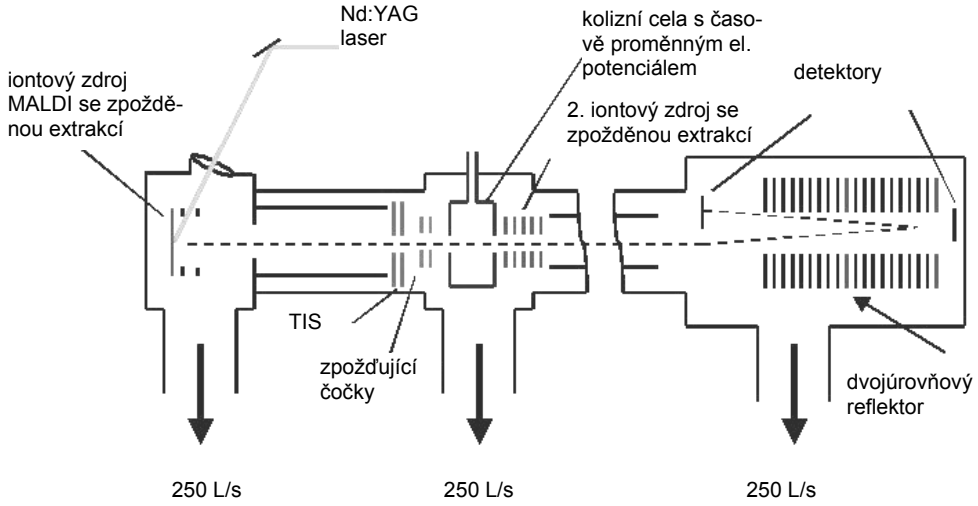
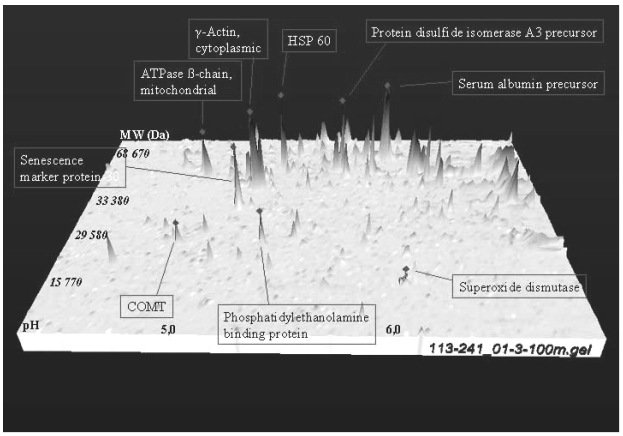


Schéma 1. **MALDI-TOF/TOF instrumentace**



Obr. 1. **2DE separace krysích jaterních proteinů kontrolního jedince**; separace v prvním rozměru proběhla na 24 cm pruhu s imobilizovaným gradientem pH 4-7, pro separaci v druhém rozměru byla použita SDS-PAGE v 10% polyakrylamidovém gelu. Proteiny byly barveny fluorescenčně rutheniem. Identifikované proteiny považované za významné markery (landmarks) jsou zvýrazněny

Obr. 2. **Přístroj 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF™**; patentovaná TOF/TOF optika umožňuje získávat data v lineárním a reflektorovém módu a následující analýzu sekvence v MS/MS módu

3. Instrumentace TOF/TOF

Nejnovější konfigurace přístroje MALDI TOF/TOF je zobrazena na schématu 1 (cit.[4]). Pro odpaření a ionizaci vzorku je v přístroji Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer použit laser v tuhé fázi (diodový Nd:YAG laser) pracující při frekvenci 200 Hz a při vlnové délce λ = 355 nm. Před vstupem do průletového analyzátoru hmotnostního spektrometru jsou ionty urychleny elektrickým polem (MS mód 20kV, MS/MS mód 8kV). Protože všechny ionty jsou urychleny stejným napětím, ionty s odlišným poměrem hmotnost/náboj (*m/z*) budou putovat rozdílnou rychlostí a ionty s vysokou hodnotou *m/z* budou putovat pomaleji než menší ionty. Poměr *m/z* ionizovaných analytů je stanoven měřením času dopadu na dvoukanálový detektor.

Systém přepočítává dobu letu na přesnou molekulovou hmotnost, která pak dovoluje identifikaci nebo charakterizaci testovaného vzorku. Dvoustupňový reflektor umožňuje fokusaci v širokém rozpětí fragmentů v MS/MS módu, aniž snižuje kvalitu dat v MS módu. Prvky iontové optiky, zobrazené v sekci druhého iontového zdroje, umožňují výběr prekurzoru a reakceleraci iontů jeho fragmentů v MS/MS módu (iontové selektory, zpomalovací čočky, kolizní cela a sekundární disociace indukovaná srážkami v oblasti kolizní cely přispívají k intenzitě iontového signálu v MS/MS módu). Obvyklá kolizní energie při MS/MS módu je 1 kV a je dána potenciálovým rozdílem mezi celkovým urychlovacím napětím ve zdroji (8 kV) a napětím v kolizní cele (7 kV). Všechny ionty fragmentů, které vznikly buď samovolným rozpadem nebo disociací

indukovanou srážkami v kolizní cele, přispívají k intenzitě signálu v MS/MS módu.

TOF/TOF optika přístroje Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer spolu s tandemovými průletovými analyzátory umožňuje velmi rychle získat úplnou strukturní informaci o vzorku. Konfigurace přístroje zajišťuje automatický sběr vysoce kvalitních dat za použití MALDI ionizace. TOF/TOF optika navíc poskytuje spektra typická pro vysokoenergetické kolize s důležitou strukturní informací, jako jsou např. immoniové ionty, štěpení v bočních řetězcích a interní fragmenty. Komplexní spektra s konzistentními sériemi iontů dovolují úplnou identifikaci proteinů a jejich kompletní charakterizaci při zachování vysoké rychlosti a přesnosti analýzy.

4. Biologický význam výsledků získaných 2DE/MS

4.1. Histopatologická pozorování

Korelace nových proteomických přístupů s klasickými toxikologickými metodami byla provedena histopatologickou analýzou krysích jater. U krys nebyly po prvním dnu vystavení vlivu *N*-nitrosomorfolinu pozorovatelné ani makroskopické, ani histologické změny, které by mohly být jednoznačně přičítány účinku NNM. Po 3 týdnech expozice NNM vykazovala většina jater granulární povrch kapsuly a zmenšení. Histopatologicky byly zaznamenány akutní degenerativní a subakutní reaktivní léze. Po 7 týdnech vystavení vlivu NNM, která pokračovala osmnácti týdenním obdobím regenerace, vykazovala některá játra změny ve velikosti a barvě. Histopatologická vyšetření odhalila léze s poškozením buněk a oblasti regenerace, buněčné adenomy, a také buněčné karcinomy u 4 krys.

4.2. Analýza akutních toxických efektů

Na rozdíl od histopatologických nálezů odhalila diferenční 2DE analýza krysích jaterních tkání po jednom dni expozice NNM 13 statisticky signifikantních proteinových skvrn při více než 1,7 násobném zvýšení exprese ve srovnání s intenzitami skvrn v kontrolních gelech (významnosti $P \leq 0{,}02$). Všechny proteiny byly identifikovány metodou MS a následnými MS/MS experimenty. Při bližším pohledu na molekulární funkci těchto proteinů (tabulka I) je zřejmé, že se účastní obranných procesů při akutním buněčném stresu. Signifikantně se zvýšila exprese mnoha proteinů nezbytných pro redoxní buněčné regulace. Peroxiredoxin 2 hraje důležitou roli v eliminaci peroxidů prostřednictvím redukce reaktivních forem kyslíku („reactive oxygen species“, ROS) thioredoxinovým systémem[5]. O zvýšeném buněčné stresu vypovídá také indukce superoxiddismutasy, která je známa tím, že odbourává radikály. „Heat shock“ protein 60 (HSP60) je významným proteinem usnadňujícím správné skládání proteinu, které je narušeno stresem. Zvýšená exprese HSP60 navíc indikuje zintenzivnění procesů apoptózy, což představuje sekundární efekt vyvolaný oxidativním poškozením buňky. Všechny iniciované procesy a reakce vedou k různým modifikacím energetického metabolismu, které se projevují zvýšenou expresí aldehyddehydrogenasy, pyrokatechol-*O*-methyltransferasy, prekurzoru transthyretinu a 3-hydroxyanthranilát-3,4-dioxygenasy. Zvýšený metabolismus proteinů odrážejí zvýšené hladiny prekurzoru proteindisulfidisomerasy A3 a také regulační podjednotky 6B proteasy 26S, která se podílí na proteinové degradaci.

4.3. Subakutní a chronické toxické účinky

Po třech týdnech expozice NNM byly ve srovnání se změnami pozorovanými v játrech po prvním dnu působení detegovány mnohé další deregulované proteiny. Změny zahrnuté v buněčné reakci na stres vyvolaný NNM byly ještě ve třetím týdnu detegovatelné, což dokazuje zvýšená exprese HSP60, 71 kDa „heat shock” proteinu příbuzného a „heat shock“ proteinu 90-β (tabulka I).

Po třech týdnech se k proteinovým změnám pozorovaným na počátku studie přidaly procesy vztahující se k obranným mechanismům proti buněčnému stresu, které jsou doprovázeny zvýšenou deregulací anabolismu a katabolismu. Aldehyddehydrogenasa a glycerol-3-fosfátdehydrogenasa byly v této fázi deregulovány. Změněná exprese pyruvátkinasy a fruktosa-1,6-bisfosfatasy (F16P), které obě patří mezi enzymy glykolýzy, upozornila na závažné změny energetického metabolismu. Zejména snížení exprese F16P znamená metabolický posun od glukoneogeneze ke glykolýze, a proto je indikována zvýšená potřeba energie pro regeneraci a proliferaci jaterní buňky. Tento efekt, který je elementární pro karcinogenní procesy, mohl být proteomickým přístupem detegován mnohem dříve než konvenčními metodami dosud užívanými v toxikologii[6].

Po 7 týdnech byla expozice zvířat účinku NNM zastavena a následovalo pozorovací období 18 týdnů bez karcinogenu, poté ve 25. týdnu byla jaterní tkáň analyzována. Histopatologie odhalila, že u většiny krys se v této fázi vytvořily nádory jater. Analýza této tkáně metodou 2DE prokázala deregulaci tumorových specifických markerových proteinů. Rho GDP inhibitor disociace, HSP 60 a prekurzor kaspasy-8 (tabulka I), které hrají klíčovou roli v mitochondriálním řízení apoptózy, vykazovaly sníženou expresi[7,8]. To indikuje inhibici procesů apoptózy a následně podporuje nekontrolovaný růst maligních jaterních buněk. 2DE analýza odhalila, že v této poslední fázi bylo diferenčně exprimováno méně proteinů než ve třetím týdnu (75 signifikantních skvrn ve 3. týdnu versus 45 skvrn ve 25. týdnu). Deregulované proteiny svědčí o tom, že ve 25. týdnu, po 18 týdnech odpočinku a regenerace, už buňka nemusí reagovat na buněčný stres původně vyvolaný NNM. Exprese některých proteinů normálně indukovaných buněčným stresem byla nyní jen lehce snížena, jako např. 71 kDa “heat shock” proteinu příbuzného, jehož exprese byla naproti tomu ve 3. týdnu zvýšena více než dvakrát. Avšak proteiny anabolismu a katabolismu byly ještě deregulovány, jako např. aldehyddehydrogenasa, malátdehydrogenasa, F16P a β-řetězec ATP- synthasy.

Tabulka I
Proteiny, které byly diferenčně exprimovány po 1 dnu, 3 týdnech a 25 týdnech expozice NNM, identifikovány peptidovým mapováním a následnou tandemovou hmotnostní spektometrií. Hladiny významnosti (*P*) byly vypočteny testem podle Mann-Whitneye

Kategorie	Protein	Swiss Prot AN	Násobek změny	Hodnota *P*
den 1				
Buněčný stres	peroxiredoxin 2	P35704	2,05	0,0069
	superoxiddismutasa	P07632	2,37	0,0167
	60 kDa „Heat shock" protein	P19226	2,61	0,0019
Metabolismus	aldehyddehydrogenasa	P11884	2,21	0,0009
	3-Hydroxyanthranilát-3,4-dioxygenasa	P46953	2,13	0,0034
	pyrokatechol O-methyltransferasa	P22734	2,16	0,0060
týden 3				
Buněčný stres	60 kDa „Heat shock" protein	P19226	4,38	0,0000
	71 kDa „Heat shock" protein příbuzný	P08109	2,38	0,0002
	„Heat shock" protein HSP 90-beta	P11499	2,10	0,0000
Metabolismus	aldehyddehydrogenasa	P11884	2,80	0,0000
	pyruvátkinasa	P12928	0,23	0,0000
	prekurzor jaterní karboxylesterasy 10	P16303	0,28	0,0000
	ketohexokinasa	Q02974	0,57	0,0000
	glycerol-3-fosfátdehydrogenasa	O35007	0,58	0,0000
	pyrokatechol O-methyltransferasa	P22734	0,43	0,0000
	fruktosa-1,6-bisfosfatasa	P19112	0,64	0,0000
týden 25				
Tumor specifické	prekurzor kaspasy-8	O89110	0,56	0,0051
	60 kDa „Heat shock" protein	P19226	0,66	0,0005
	Rho GDP inhibitor disociace	Q99PT1	0,73	0,0001
Buněčný stres	71 kDa „Heat shock" protein příbuzný	P19378	0,63	0,0103
Metabolismus	fruktosa-1,6-bisfosfatasa	P19112	0,68	0,0000
	ATP synthasa, β-řetězec	P10719	0,56	0,0005
	aldehyddehydrogenasa	P11884	0,67	0,0001
	malátdehydrogenasa	P14152	0,58	0,0000
	glycerol-3-fosfátdehydrogenasa	O35007	0,62	0,0011
	pyruvátkinasa	P12928	0,57	0,0054

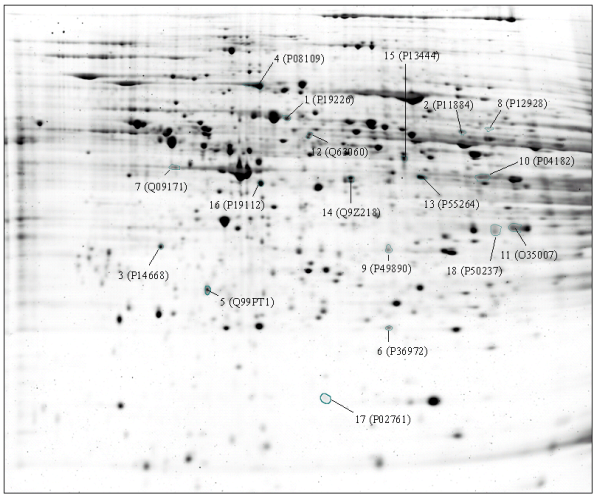
4.4. Potenciální proteinové biomarkery pro predikci

Naším hlavním cílem bylo detegovat časné proteinové biomarkery, které umožňují předpovědět pozdní stadia jaterní karcinogeneze. Tyto proteiny by mohly podpořit a posílit předpověď karcinogenních efektů chemických látek. Proto jsme se zaměřili na proteiny, které byly v jaterních vzorcích signifikantně regulovány jak po 3 týdnech, tak i po 25 týdnech. V poslední fázi jsme se soustředili pouze na tumorovou tkáň. Změny v sacharidovém metabolismu, které byly diskutovány jako významné prekancerogenní změny detegovatelné po 3 týdnech expozice, byly stejným způsobem regulovány i po 25 týdnech (F16P, pyruvátkinasa, glycerol-3-fosfátdehydrogenasa, tabulka I). Oproti tomu absence odpovědi na buněčný stres, stejně jako snížená aktivita vedoucí k apoptóze, vyplývá ze snížené exprese 71 kDa „heat shock" proteinu příbuzného, CH60 a Rho GDP inhibitoru disociace v 25. týdnu, zatímco exprese všech těchto proteinů byla signifikantně zvýšena po 3. týdnu.

Závěrem konstatujeme, že náš přístup odhalil 18 diferenčně exprimovaných proteinů (obr. 3) detegovatelných už po 3 týdnech chemické expozice. Použitelnost těchto proteinů jako biomarkerů pro předpověď hepatokarcinogenity musí být ještě potvrzena dalšími experimenty a v současné době se studuje.

5. Závěr

Naše výsledky ukazují, že postupy dvourozměrné elektroforézy a hmotnostní spektrometrie citlivě detegují změny na molekulární translační úrovni dokonce už po



Obr. 3. **2DE separace proteinů z lyzátu jaterních buněk pocházejících ze 3. týdne (pH 4-7)**; potenciální časné biomarkerové proteiny, které byly diferenčně exprimovány ve 3. týdnu a na konci studie ve 25. týdnu, jsou zvýrazněny

jednom dni působení *N*-nitrosomorfolinu. Po třech dnech jsou tyto akutní projevy doprovázeny různými změnami energetického metabolismu, které mohou mít vztah k časným stadiím hepatokarcinogeneze. Tento typ změn nemůže být klasickými toxikologickými metodami v takovém rozsahu prokázán, čímž se potvrzuje význam proteomických technologií pro zlepšení predikce v toxikologii. Navíc jsme byli schopni nalézt specifické proteinové markery v tumorové jaterní tkáni a také „endpoint" markerové proteiny dokonce po třech týdnech expozice. Posledně uvedené markery mohou fungovat jako užitečné časné proteinové biomarkery pro předpověď hepatocelulárního karcinomu. V budoucnu může tato raná detekce, umožněná zahrnutím proteomických přístupů do rutinních toxikologických studií, nahradit některé studie karcinogenity. Prezentované výsledky jsou příslibem tohoto potenciálu proteomických přístupů pro klasickou a predikční toxikologii.

Tento projekt byl podpořen grantem č. 0312619 německého Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).

LITERATURA

1. Bandara L. R., Kennedy S.: Drug Discovery Today *7*, 411 (2002).
2. MacGregor J. T., Farr S., Tucker J. D.: Fundam. Appl. Toxicol. *26*, 156 (1995).
3. Görg A., Weiss W., v knize: *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods*, (Rabilloud T., ed.), kap.4, str. 57. Springer-Verlag, Wien 2000.
4. Medzihradszky K. F., Campbell J. M., Baldwin M. A.: Anal. Chem. *72*, 552 (2000).
5. Yergey A. L., Coorssen J. R., Backlund P. S. Jr., Blank P. S., Humphrey G. A., Zimmerberg J., Campbell J. M., Vestal M. L.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. *13*, 784 (2002).
6. Miranda-Vizuete A., Damdimopoulos A. E., Spyrou G.: Antioxid. Redox Signal. *2*, 801 (2000).
7. Bannasch P., Hacker H., Klimek F., Mayer D.: Adv. Enzyme Regul. *22*, 97 (1982).
8. Schramek K., Schumacher M., Wilflingseder D.: Am. J. Physiol. *272*, C383-391 (1997).
9. Degterev A., Boyce M., Yan J.: Oncogene *22*, 8543 (2003).

K. Fella[a], M. Glückmann[b], V. Kruft[b], P.-J. Kramer[a] and M. Kröger[a] *([a]Merck KGaA, Institute of Toxicology, [b] Applied Biosystems, Darmstadt, Germany):*
Proteomics in Molecular Toxicology: Identification of Potential Early Protein Biomarkers for Hepatocarcinogenicity in Rats

Modern proteomics technology was used for identification of protein biomarkers for hepatocarcinogenicity. It replaced currently used methods for the studies of toxic effects of drug candidates. The detection of new biomolecular markers can shorten future studies.

CHARAKTERIZACE PROTEOMU BAKTERIOFÁGA 812

ZBYNĚK ZDRÁHAL[a], LUDĚK EYER[b], HANA KONEČNÁ[a] a JAN PREISLER[c]

[a]Laboratoř funkční genomiky a proteomiky, [b] Katedra genetiky a molekulární biologie, [c]Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno
preisler@chemi.muni.cz

Došlo 5.9.05, přijato 26.10.05.

Klíčová slova: bakteriofág, proteom, hmotnostní spektrometrie, gelová elektroforéza, anomální migrace

Úvod

Bakteriofág 812 je polyvalentní fág z čeledi *Myoviridae*, jehož hlavním hostitelem jsou kmeny druhu *Staphylococcus aureus,* avšak atakuje i jiné druhy rodu *Staphylococcus*. Jde o virulentního fága, po jehož adsorpci na povrchu bakteriální buňky a injekci fágové DNA nastává lytický cyklus končící lyzí hostitelské buňky. *Staphylococcus aureus* je původcem závažných onemocnění ptáků a savců, mezi nimi i člověka. Vyvolává především infekce kůže, podkoží a přilehlých struktur, kostí, kloubů a dýchacích cest jako sekundární infekce po virové chřipce. Je hlavním původcem těžkých pooperačních komplikací u pacientů s ortopedickými implantáty, katetry, u pacientů s AIDS a novorozenců. Výše popsané charakteristiky činí fága 812 vhodným kandidátem pro fágovou terapii, při níž jsou bakteriofágy používány pro léčbu bakteriálních infekcí. Dnes se o fágové terapii uvažuje jako o alternativním způsobu léčby infekcí vyvolaných bakteriemi rezistentními k antibiotikům. Fágová terapie nabízí oproti léčbě antibiotiky vyšší specifitu, selektivní aplikaci v místě infekce, absenci nežádoucích účinků a rychlou selekci nových fágů v případě rezistence. O aktuálnosti fágové terapie svědčí např. i nedávné testy přípravků obsahujících fága K (cit.[1]), který je blízký příbuzný fága 812.

Z hlediska účinnosti fágové terapie je nejvýznamnější charakteristikou rozmezí hostitelů; jako slibné se jeví zejména použití virulentních a polyvalentních fágů s širokým rozmezím hostitele. V současné době je studován vztah rozdílů genomu u standardního typu fága 812, jeho mutantů[2,3], příbuzných fágů K (cit.[4]), Twort, SK311, U16, 131 (cit.[3,5]) a listeriového fága A511 (cit.[6]) k jejich odlišnému hostitelskému rozmezí.

Další možnosti studia odlišnosti fágů nabízí proteomická analýza. Tato práce si klade za cíl charakterizovat proteom standardního typu fága 812. Bude tak položen základ pro porovnání standardního typu fága 812 s jeho mutanty a příbuznými fágy na úrovni proteinového komplementu genomu. K analýze proteinů fága 812 je použito jak kombinace jednorozměrné gelové elektroforézy s peptidovým mapováním s použitím MALDI MS (cit.[7,8]), tak i vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s elektrosprejem a tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-ESI MS/MS)[9,10].

Experimentální část

Příprava vzorku bakteriofága

Fágové částice byly izolovány ultracentrifugací fágového lyzátu a čištěním v gradientu CsCl (cit.[11]). Nízkomolekulární látky byly odstraněny dialýzou proti vodě. Fágová DNA, způsobující nadměrnou viskozitu suspenze vzorku, byla odstraněna enzymovým štěpením DNasou I. Po zahuštění na vakuové odparce byly proteiny podrobeny redukci a tepelné denaturaci ve vzorkovém pufru[12].

Separace

Základní technikou použitou k separaci směsi proteinů fága byla jednorozměrná gelová elektroforéza (SDS-PAGE) s následnou analýzou MALDI MS, resp. MALDI TOF/TOF MS. Alternativně byla použita také separace peptidů vzniklých enzymovým štěpením kapilární chromatografií spojenou on-line s ESI MS.

Vertikální SDS-PAGE proběhla na aparatuře Protean II (Bio-Rad) v 15% (resp. 7,5%) gelu za konstantního proudu. Rozměry gelu byly 16 × 20 cm a jeho tloušťka 1 mm. Proteiny byly barveny barvivy Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad) nebo ProteoSilver Plus (Sigma-Aldrich). Gely byly skenovány kalibrovaným densitometrem GS-800 (Bio-Rad).

K separaci HPLC byl použit kapilární chromatograf (LC Packings) skládající se z gradientové pumpy (Ultimate), autosampleru (Famos) a jednotky pro přepínání kolon (Switchos). Vzorek (10 μl) byl nejprve zkoncentrován a odsolen na předkoloně (PepMap C18, 0,3 mm × 1 mm, 5 μm, LC Packings). Průtoková rychlost byla 10 μl min^{-1}. Vlastní separace byla provedena na kapilární koloně (0,32 mm × 175 mm) naplněné sorbentem Jupiter Proteo C12 (4 mm, Phenomenex) dle postupu popsaného v literatuře[13]. Průtoková rychlost separace byla 4 μl min^{-1}. Mobilní fáze A obsahovala 5 % acetonitrilu (ACN) a 0,1 % kyseliny mravenčí (FA), mobilní fáze B pak 80 % ACN a 0,1 % FA. Gradientová eluce začínala na 5 % fáze B po dobu 5 min, pak se podíl fáze B zvyšoval na 50 % od 5. do 53. min a nakonec až na 70 % během dalších 2 min.

Proteolytické štěpení

Vybrané proužky byly vyříznuty skalpelem a proteolyticky naštěpeny trypsinem (Sequencing Grade Modified

Trypsin, Promega) upraveným postupem dle Havliše a spol.[14]. Po odbarvení a vysrážení acetonitrilem byl gel hydratován 45 min při 4 °C v roztoku trypsinu (5 ng μl^{-1}) v 25 mM uhličitanu amonném a poté vystaven proteolýze po dobu 8 h při 37 °C. Po skončení štěpení byl volný roztok oddělen a gel byl extrahován směsí 5% kyseliny mravenčí a acetonitrilu (1 : 1, v/v). Roztok a extrakt byly spojeny. U vzorků určených pro analýzu HPLC-MS/MS byl odstraněn acetonitril centrifugací za vakua. Přídavkem roztoku kyseliny mravenčí (0,1%) bylo upraveno pH vzorku na hodnotu 3,0.

Hmotnostní spektrometrie

Vzorky byly po separaci gelovou elektroforézou štěpeny a analyzovány metodou MALDI MS. Vybrané vzorky, stejně tak jako štěpený vzorek celkové směsi proteinů fága, byly analyzovány pomocí HPLC-MS/MS.

Analýza MALDI MS byla provedena na hmotnostním spektrometru Reflex IV (Bruker). Jako matrice byl použit nasycený roztok 4-hydroxy-α-kyano-skořicové kyseliny ve směsi 50% ACN a 0,1% TFA (aq). Vzorky byly smíchány s matricí v poměru 1 : 3. Na vzorkovací destičku bylo nanášeno 0,6 μl připravené směsi vzorku s matricí. V případě potřeby byly vzorky před analýzou odsoleny na mikrošpičkách ZipTip C18 (Millipore). Hmotnostní spektra byla měřena v pozitivním modu. K externí kalibraci byla použita směs 5 peptidů v hmotnostním rozsahu 660 až 2564 Da. Spektra pak byla vyhodnocena s použitím programů XTOF 1.5 a Biotools 2.0 (Bruker).

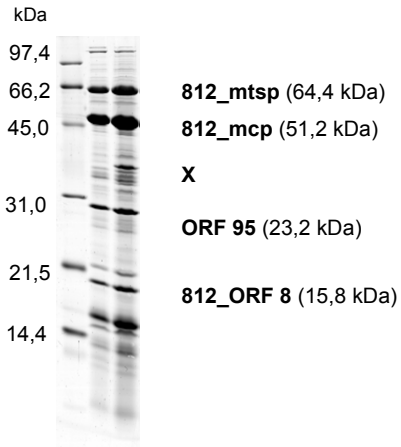
Analýza MALDI TOF/TOF MS byla provedena na hmotnostním spektrometru 4700 Proteomics Analyzer (Applera). Spektra byla měřena v pozitivním modu, jako kolizní plyn byl použit He. Výběr prekurzoru byl omezen na 15 iontů s nejvyšším signálem. Data MS/MS byla vyhodnocena programem GPS Explorer Workstation.

K analýze HPLC-MS/MS byl použit hmotnostní spektrometr s iontovou pastí Esquire 2000 (Bruker) vybavený ortogonálním elektrosprejem. Přístroj pracoval v pozitivním modu za podmínek běžných pro analýzu peptidů. Spektra MS/MS byla měřena v režimu automatického sběru dat Auto MS(n). Data byla zpracována s použitím programů DataAnalysis 3.0 a Biotools 2.0 (Bruker).

Identifikace proteinů pomocí peptidového mapování, resp. MS/MS dat byla provedena programem MASCOT (Matrix Science). Povolená odchylka hmotnosti byla v případě MALDI MS dat v rozsahu 40–100 ppm, pro MS/MS data 1,5 Da pro hmotnost peptidu a 0,8 Da pro fragmenty a pro TOF/TOF data 50 ppm pro hmotnost peptidu a 0,5 Da pro fragmenty. K prohledávání byla použita jednak proteinová databáze vzniklá překladem dostupných úseků DNA fága 812 (cit.[3,11]), jednak proteinová databáze fága K (cit.[4]), která je již v současné době včleněna do databáze NCBInr. Využití databáze fága K k identifikaci proteinů fága 812 umožnil vysoký stupeň podobnosti genomů obou fágů jak na úrovni sekvenční homologie, tak i na úrovni organizace genomu.

Výsledky a diskuse

Genom fága 812 (146 kbp) obsahuje cca 100 putativních otevřených čtecích rámců. Přibližně polovina proteinů není zabudována do struktury fágové částice a tedy pravděpodobně není přítomna v připraveném vzorku. Vzhledem k jednoduchosti systému byla proto zvolena jako základní metoda separace proteinů fága 812 jednorozměrná gelová elektroforéza. Po nezbytné optimalizaci separace a obarvení Coomassie Blue byl získán gel s cca 40 odděle-

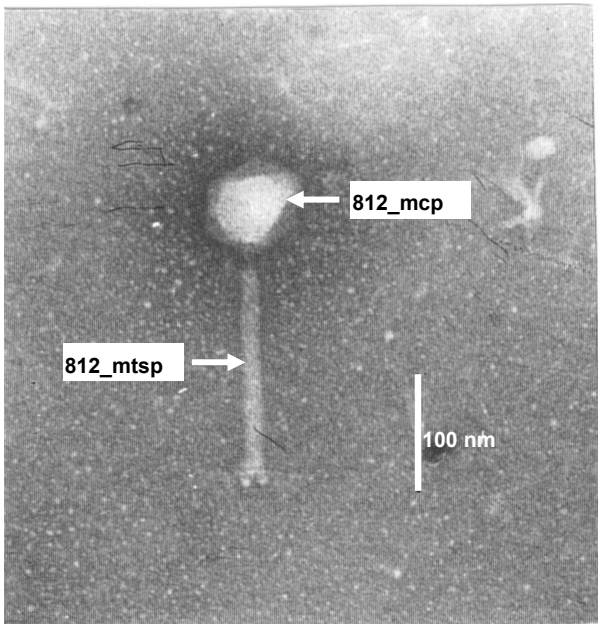


Obr. 1. **Gelová elektroforéza proteinů bakteriofága 812;** popisem jsou označeny majoritní proteiny, které byly identifikovány; X označuje proužek obsahující fragmenty proteinu 812_mtsp (viz diskuse v textu a obr. 4); gel byl obarven Bio-Safe Coomassie G 250

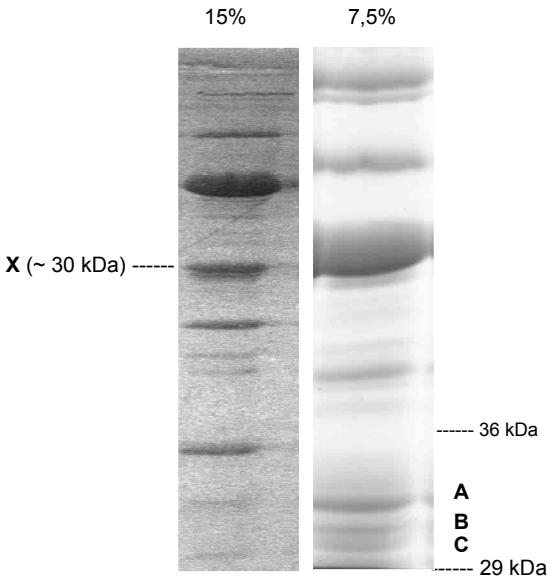
Tabulka I
Identifikované proteiny bakteriofága 812

M [kDa]	Identifikovaný protein		Pokrytí sekvence [%]
	fág 812 [a]	fág K [b]	
143,7		ORF 55	21
129,0		ORF 65	45
64,4	812_mtsp [c]	ORF 49 [c]	59
51,2	812_mcp [c]	ORF 44 [c]	67
50,4		ORF 68	34
39,2		ORF 62	20
23,2		ORF 95 [c]	72
17,8		ORF 96	34
19,2		ORF 64	69
15,9	812_ORF 8 [c]	ORF 50 [c]	87
12,2		ORF 52	23

[a,b] V sloupcích označených fág 812 a fág K jsou uvedeny proteiny podle databáze použité při identifikaci; [c] proteiny identifikované také HPLC-MS/MS ze štěpeného vzorku celkové směsi proteinů fága; *M* – je molekulová hmotnost vypočtená z proteinových databází fágů; pokrytí sekvence bylo získáno peptidovým mapováním



Obr. 2. **Bakteriofág 812;** na snímku získaném elektronovou mikroskopií je znázorněno umístění dvou majoritních proteinů v kapsidu a bičíku fága



Obr. 3. **Srovnání separace fragmentů proteinu 812_mtsp na gelu 7,5% a 15%;** po optimalizaci separace byly získány místo jednoho proužku (X) tři oddělené proužky fragmentů proteinu (A, B, C). Proužek patrný těsně pod proužkem X na gelu 15% patří jinému proteinu; gel byl obarven barvivem Bio-Safe Coomassie G 250

nými proužky v rozmezí 10–150 kDa (obr. 1). Vybrané proužky byly vyříznuty, vystaveny působení trypsinu a získané peptidy byly podrobeny MS analýze. Peptidovým mapováním bylo identifikováno 11 proteinů (tab. I). Vedle dvou majoritních strukturních proteinů, hlavního kapsidového proteinu, 812_mcp, a hlavního proteinu bičíkové pochvy, 812_mtsp (obr. 2), bylo nalezeno dalších 7 proteinů, které lze pravděpodobně zařadit do skupiny strukturních proteinů na základě jejich homologie s proteiny příbuzných fágů. Zbývajícím dvěma nalezeným proteinům nebyla tímto způsobem přiřazena žádná funkce[4]. Pokud byla hodnota skóre při peptidovém mapování s použitím MALDI MS nižší než 80, byla pro potvrzení identity proteinů použita kapalinová chromatografie s on-line analýzou ESI MS/MS. Ve všech případech byly potvrzeny výsledky peptidového mapování.

HPLC-MS/MS byla také použita pro jednorozměrnou separaci a analýzu štěpeného vzorku celkové směsi proteinů fága. Zde se projevila nevýhoda analýzy v reálném čase s automatickou volbou mateřského iontu, kdy jsou přednostně fragmentovány peptidy majoritních proteinů. Metodou HPLC-MS/MS byly s jistotou identifikovány pouze 4 majoritní proteiny (tab. I).

Z obou jednorozměrných separačních technik použitých v této práci se tedy lépe osvědčila instrumentálně méně náročná klasická gelová elektroforéza. V současné době jsou ověřovány možnosti dvourozměrné separace s cílem rozšířit počet identifikovaných proteinů fága 812 zejména o důležité minoritní proteiny, jako je např. lytický enzym.

Vedle proteinů, jejichž polohy na gelu odpovídaly jejich molekulovým hmotnostem, bylo nalezeno několik proužků, ve kterých byly identifikovány proteiny se značně vyšší hmotností. Až na jedinou výjimku bylo možno na základě nalezených peptidů soustředěných do určitých úseků usoudit, že jde o fragmenty těchto proteinů. U proužku v poloze odpovídající hmotnosti cca 30 kDa (obr. 3) byl však opakovaně identifikován celý hlavní protein bičíkové pochvy (812_mtsp) s dvojnásobnou molekulovou hmotností (64,4 kDa). Navíc tento protein byl spolehlivě identifikován v proužku se správnou polohou na gelu. Přestože odchylky v migraci při gelové elektroforéze jsou běžně pozorovány u proteinů, jako jsou např. histony nebo některé posttranslačně modifikované proteiny, odchylka molekulové hmotnosti určená z polohy proužku na gelu od molekulové hmotnosti činící cca 50 %, je neobvyklá. Proto byl tento jev podroben dalšímu studiu. Při separaci na gelu vhodnějším pro studovanou oblast (7,5 %) byly místo jednoho proužku pozorovány tři dobře separované proužky (obr. 3). Na základě peptidového mapování, potvrzeného MALDI TOF/TOF MS analýzou bylo zjištěno, že jde o fragmenty proteinu 812_mtsp o přibližně stejné molekulové hmotnosti (tab. II). V proužku A byly nalezeny peptidy z úseku 299–587, což odpovídá *C*-koncové polovině proteinu. V proužcích B a C byly nalezeny peptidy z úseku 2–257 odpovídající *N*-koncové polovině proteinu. Specifičtější analýza MALDI TOF/TOF MS nepotvrdila u proužku A ani jeden z peptidů pocházejících

Tabulka II
Pokrytí sekvence u fragmentů proteinu 812_mtsp

Vz. A

```
   1 MAVEPFPRRP ITRPHASIEV DTSGIGGSAG SSEKVFCLIG QAEGGEPNTV
  51 YELRNYAQAK RLFRSGELLD AIELAWGSNP NYTAGRILAM RIEDAKPASA
 101 EIGGLKITSK IYGNVANNIQ VGLEKNTLSD SLRLRVIFQD DRFNEVYDNI
 151 GNIFTIKYKG EEANATFSVE HDEETQKASR LVLKVGDQEV KSYDLTGGAY
 201 DYTNAIITDI NQLPDFEAKL SPFGDKNLES SKLDKIENAN IKDKAVYVKA
 251 VFGDLEKQTA YNGIVSFEQL NAEGEVPSNV EVEAGEESAT VTATSPIKTI
 301 EPFELTKLKG GTNGEPPATW ADKLDKFAHE GGYYIVPLSS KQSVHAEVAS
 351 FVKERSDAGE PMRAIVGGGF NESKEQLFGR QASLSNPRVS LVANSGTFVM
 401 DDGRKNHVPA YMVAVALGGL ASGLEIGESI TFKPLRVSSL DQIYESIDLD
 451 ELNENGIISI EFVRNRTNTF FRIVDDVTTF NDKSDPVKAE MAVGEANDFL
 501 VSELKVQLED QFIGTRTINT SASIIKDFIQ SYLGRKKRDN EIQDFPAEDV
 551 QVIVEGNEAR ISMTVYPIRS FKKISVSLVY KQQTLQA
```

Vz. B

```
   1 MAVEPFPRRP ITRPHASIEV DTSGIGGSAG SSEKVFCLIG QAEGGEPNTV
  51 YELRNYAQAK RLFRSGELLD AIELAWGSNP NYTAGRILAM RIEDAKPASA
 101 EIGGLKITSK IYGNVANNIQ VGLEKNTLSD SLRLRVIFQD DRFNEVYDNI
 151 GNIFTIKYKG EEANATFSVE HDEETQKASR LVLKVGDQEV KSYDLTGGAY
 201 DYTNAIITDI NQLPDFEAKL SPFGDKNLES SKLDKIENAN IKDKAVYVKA
 251 VFGDLEKQTA YNGIVSFEQL NAEGEVPSNV EVEAGEESAT VTATSPIKTI
 301 EPFELTKLKG GTNGEPPATW ADKLDKFAHE GGYYIVPLSS KQSVHAEVAS
 351 FVKERSDAGE PMRAIVGGGF NESKEQLFGR QASLSNPRVS LVANSGTFVM
 401 DDGRKNHVPA YMVAVALGGL ASGLEIGESI TFKPLRVSSL DQIYESIDLD
 451 ELNENGIISI EFVRNRTNTF FRIVDDVTTF NDKSDPVKAE MAVGEANDFL
 501 VSELKVQLED QFIGTRTINT SASIIKDFIQ SYLGRKKRDN EIQDFPAEDV
 551 QVIVEGNEAR ISMTVYPIRS FKKISVSLVY KQQTLQA
```

V tabulce jsou uvedeny výsledky jen pro proužek A a B (viz obr. 3). U proužku C byl získán takřka identický výsledek jako pro proužek B. Úseky sekvence získané peptidovým mapováním jsou vyznačeny tučně (MALDI MS) a úseky získané analýzou MS/MS fragmentů peptidů jsou vyznačeny podtržením (MALDI TOF/TOF MS)

z *N*-koncové poloviny proteinu, které byly určeny peptidovým mapováním (tab. II). Navíc byla metodou MALDI TOF/TOF MS ve vzorcích potvrzena přítomnost některých dalších peptidů vzniklých po štěpení trypsinem.

Zjištěné štěpení proteinu přibližně v jeho středu může souviset s jevem, který byl pozorován u proteinu bičíkové pochvy laktobacilového fága LP65. Změny ve struktuře tohoto proteinu mohou souviset s kontrakcí bičíkové pochvy[15]. U některých bakteriofágů bylo též pozorováno posttranslační štěpení strukturních proteinů[16]. Dalšími experimenty je nutno s jistotou vyloučit možný vliv proteas, které mohou být přítomny ve vzorku fága, resp. možnost tvorby fragmentů během izolace a čištění bakteriofágů.

Závěr

Efektivní použití fágové terapie v klinické praxi vyžaduje detailní znalosti fágového genomu a proteomu. V této práci byl poprvé charakterizován proteom standardního typu bakteriofága 812. Celkem bylo identifikováno 11 proteinů. Byly nalezeny všechny 4 proteiny identifikované v práci zabývající se studiem příbuzného fága K (cit.[4]) a 7 dalších proteinů bylo identifikováno poprvé. V devíti případech jde pravděpodobně o strukturní proteiny, ve dvou případech není funkce proteinů známa.

Byla vysvětlena neobvyklá migrace hlavního bičíkového proteinu. Úpravou podmínek separace SDS-PAGE byla původní jediná zóna s migrací cca 30 kDa rozdělena na tři zóny, ve kterých byly nalezeny fragmenty výše uvedeného proteinu s přibližně stejnou molekulovou hmotností. Analýza TOF/TOF MS potvrdila výsledky získané peptidovým mapováním; byly nalezeny další peptidy zvyšující celkové pokrytí sekvence a vyloučeny chybně přiřazené peptidy. Jde pravděpodobně o peptidy pocházející z nespecifického štěpení fragmentů hovězího albuminu, který byl součástí kultivačního media použitého při přípravě vzorku fága.

Při analýze relativně jednoduchého proteomu fága se osvědčila kombinace jednorozměrné gelové elektroforézy a MALDI TOF MS, resp. TOF/TOF MS. Relativně nízký přínos HPLC-ESI MS/MS byl pravděpodobně způsoben neúplnou separací většiny peptidů a nedostatečnou rychlostí výběru mateřského iontu v reálném čase. Zlepšení výsledků HPLC-ESI MS/MS by vyžadovalo opakované experimenty za modifikovaných podmínek sběru dat (např. vyloučení iontů s již známými MS/MS spektry).

Identifikace proteinů položila základ pro budoucí porovnání proteomu fága 812 s jeho blízce příbuznými fágy U16, SK311, 131 a Twort a s jeho mutanty s cílem zjistit, jak pozorované změny souvisejí s jejich odlišným rozmezím hostitele.

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentuře ČR, projekt č. 203/03/0515. Autoři dále děkují prof. Barry L. Kargerovi, Tomáši Rejtarovi a Hsuan-shen Chenovi za možnost měření na TOF/TOF MS a za jejich pomoc s těmito experimenty a L. Valíčkovi z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství za zhotovení snímku fága 812.

LITERATURA

1. O'Flaherty S., Ross R. P., Meaney W., Fitzgerald G. F., Elbreki M. F., Coffey A.: Appl. Environ. Microbiol. *71*, 1836 (2005).
2. Rosypal S., Rosypalová A.: Scripta Fac. Sci. Nat. Univ. Purk. Brun. *2*, 105 (1972).
3. Pantůček R., Rosypalová, A., Doškař J., Kailerová J., Růžičková V., Borecká P., Snopková Š., Horváth R., Götz F., Rosypal S.: Virology *246*, 241 (1998).
4. O'Flaherty S., Coffey A., Edwards R., Meaney W., Fitzgerald G. F., Ross R. P.: J. Bacteriol. *186*, 2862 (2004).
5. Landthaler M., Shub D. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 7005 (1999).
6. Loessner M. J., Scherer S.: J. Bacteriol. *177*, 6601 (1995).
7. Pappin D. J. C., Hojrup P., Bleasby A. J.: Curr. Biol. *3*, 327 (1993).
8. Mann M., Hojrup P., Roepstorff P.: Biol. Mass Spectrom. *22*, 338 (1993).
9. Yates J. R. III., Eng J. K., McCormack A. L., Schieltz D.: Anal. Chem. *67*, 1426 (1995).
10. Lim H., Eng J., Yates J. R. III., Tollaksen S. L., Giometti C. S., Holden J. F., Adams M. W., Reich C. I., Olsen G. J., Hays L. G.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. *14*, 957 2003.
11. Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Kašpárek P., Eyer L., Konečná H., Zdráhal Z., Preisler J.: *11th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections, Charleston, 2004*. Plenary Summaries & Poster Abstracts, str. 201. Charleston 2004.
12. Garfin D. E., v knize: *Guide to Protein Purification*, (Deutscher M. P., ed.) ze série *Methods in Enzymology*, sv. 182, str. 430. Academic Press, San Diego 1990.
13. Planeta J., Karásek P., Vejrosta J.: J. Sep. Sci. *26*, 525 (2003).
14. Havliš J., Thomas H., Šebela M., Shevchenko A.: Anal. Chem. *75*, 1300 (2003).
15. Chibani-Chennoufi S., Dillmann M.-L., Marvin-Guy L., Rami-Shojaei S., Brüssow H.: J. Bacteriol. *186*, 7069 (2004).
16. Laemmli U. K.: Nature *227*, 680 (1979).

Z. Zdráhal[a], L. Eyer[b], H. Konečná[a], and J. Preisler[c] *([a]Laboratory of Functional Genomics and Proteomics, [b]Department of Genetics and Molecular Biology and [c]Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Masaryk University, Brno):* **Characterization of Bacteriophage 812 Proteome**

A lytic bacteriophage 812 ranks among promising candidates for phage therapy, which emerges as an alternative to antibiotics for treatment of staphylococcal infections. Proteome of bacteriophage 812 was analyzed using various mass spectrometry techniques. Eleven proteins were identified, of which seven for the first time. Gel electrophoresis with peptide mass fingerprinting was found the most efficient for overall analysis; HPLC-ESI MS was used for confirmation in dubious cases. Seemingly abnormal migration of main tail sheath protein (812_mtsp) was explained after adjustment of gel electrophoresis conditions and peptide mass fingerprinting combined with MALDI TOF/TOF MS results. Three similarly-sized 812_mtsp fragments, which originally migrated in one band, were separated and identified. Proteome characterization of bacteriophage 812 is a prerequisite for future comparison of the standard-type phage 812 with its mutants and related phages to correlate proteome changes with their different host range.

PROTEOMICKÁ IDENTIFIKACE GLUTENOVÝCH BÍLKOVIN

JIŘÍ ŠALPLACHTA[a], GÜNTER ALLMAIER[b] a JOSEF CHMELÍK[a]

[a] Ústav analytické chemie Akademie věd České republiky, Veveří 97, 611 42 Brno, Česká republika, [b] Ústav chemických technologií a analýz, Technická univerzita Vídeň, Getreidemarkt 9/164, A-1060 Vídeň, Rakousko
salplachta@iach.cz, chmelik@iach.cz, guenter.allmaier@tuwien.ac.at

Došlo 2.9.05, přijato 27.10.05.

Klíčová slova: gluten, proteomická analýza, chymotrypsin, celiakie, MALDI, QIT-TOF, TOF/TOF

Úvod

Celiakie (glutensenzitivní enteropatie) je chronické onemocnění, které postihuje nejen člověka, ale i monogastrická zvířata. Toto metabolické, geneticky podmíněné onemocnění může být definované jako porucha, při které dochází k poškození sliznice tenkého střeva, kde dochází k mizení klků a mikroklků. Tato disfunkce vedoucí k malabsorpci živin je spojená s příjmem potravin, které obsahují bílkovinný komplex pšenice, ječmene, žita a ovsa, nazývaný gluten, a intolerance k němu přetrvává po celý život[1–7]. Toto chronické střevní onemocnění má počátek obvykle v dětství a jeho v současnosti jediná léčba je založena na odstranění potravin obsahujících gluten z jídelníčku.

Gluten (glutenové bílkoviny) je bílkovinný komplex lokalizovaný v endospermu obilného zrna. Podle Codex Alimentarius je gluten definován jako bílkovinná frakce z pšenice, ječmene, žita a ovsa nerozpustná ve vodě a 0,5 M-NaCl. Glutenové bílkoviny jsou zásobní proteiny obilného zrna, kde prolaminy hrají významnou roli při klíčení zrna jako zdroj dusíku, a to díky vysokému obsahu glutaminu (typicky 22–45 % v některých případech až 56 % všech aminokyselin). Prolaminy spolu s gluteliny jsou velmi důležité z technologického hlediska, jelikož mají zásadní vliv na kvalitu a vlastnosti těsta, kde gliadiny jsou odpovědné za viskozitu a roztažnost a gluteniny za elasticitu[8–11].

Glutenové bílkoviny se klasicky dělí na monomerní prolaminy (bílkovinná frakce rozpustná ve vodných roztocích alkoholů) a polymerní gluteliny (bílkovinná frakce rozpustná ve zředěných vodných roztocích kyselin a zásad). V případě pšenice je možno gliadiny (prolaminy pšenice) dále rozdělit na základě rozdílné elektroforetické mobility v polyakrylamidovém gelu při nízkém pH na α-, β-, γ- a ω-gliadiny, kde α-gliadiny mají nejvyšší elektroforetickou mobilitu a ω-gliadiny nejnižší. α-, β- a γ-gliadiny obsahují intramolekulární disulfidové vazby, kdežto ω-gliadiny neobsahují žádné sirné aminokyseliny[12–14]. Gluteniny se dělí na nízkomolekulární (LMW) a vysokomolekulární (HMW) podjednotky, které obsahují intermolekulární disulfidové vazby. Molekulové hmotnosti gliadinů a LMW gluteninů leží zhruba v rozmezí 30–40 kDa, zatímco pro HMW gluteniny je typická molekulová hmotnost v rozmezí 65–90 kDa (cit.[13,14]).

Jak bylo uvedeno výše, některé glutenové bílkoviny jsou toxické pro pacienty trpící celiakií. Vzhledem k tomu, že obilniny představují významnou surovinu pro výrobu potravin, je třeba účinných a spolehlivých analytických metod pro identifikaci těchto toxických bílkovin v potravinách. Nejčastěji používanou metodou pro kontrolu obsahu glutenu v potravinách jsou testy ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) založené na monoklonálních nebo polyklonálních protilátkách schopných rozpoznat toxické složky ve vzorcích potravin[15,16]. Další často používanou metodou je tzv. immunoblotting[3,17]. Obě metody jsou založené na reakci protilátek, což na jedné straně zajišťuje vysokou specifitu a citlivost analýz, ale na druhé straně tyto metody mohou občas poskytnout falešné výsledky (jak pozitivní, tak i negativní reakce). Navíc testy ELISA dávají spolehlivé výsledky v případě analýzy glutenových bílkovin pšenice a žita, méně spolehlivé výsledky v případě ječmene a v případě ovsa nebyla zatím vyvinuta souprava ELISA poskytující spolehlivé výsledky. Z těchto důvodů je třeba vyvíjet další neimunologické metody, jež by byly alternativou k již zavedeným metodám.

V posledních deseti letech se objevilo několik prací zabývajících se možností analýzy glutenových bílkovin hmotnostní spektrometrií, konkrétně se jedná o techniku desorpce a ionizace laserem za přítomnosti matrice s analyzátorem doby letu (MALDI-TOF MS)[1,2,9,12,13,18–21]. V těchto případech byla MALDI-TOF MS použita pro přímou analýzu glutenových bílkovin bez předchozí separace jednotlivých složek analyzované směsi obilných bílkovin. Nicméně kvůli velmi vysoké homologii glutenových bílkovin nelze použít metodu analýzy intaktních bílkovin pro jejich jednoznačnou identifikaci. Spolehlivou metodou pro jednoznačnou identifikaci bílkovin toxických pro pacienty s celiakií by se mohla stát proteomická identifikace, kterou jako první v případě obilovin použil Chmelík a spol.[22,23]. Cílem této práce je zjistit možnosti proteomické analýzy pro jednoznačnou identifikaci glutenových bílkovin s ohledem na identifikaci bílkovin způsobujících celiakii. Vzhledem k vysoké homologii primárních struktur glutenových bílkovin není jejich identifikace na základě techniky zvané „peptide mass fingerprinting“ možná, je nezbytné použít moderních metod využívajících pro identifikaci bílkovin fragmentaci peptidů.

Experimentální část

Materiál

Jako výchozí materiál pro extrakci glutenových bílkovin byla použita pšeničná mouka. Veškeré použité chemikálie byly p.a. produkty Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo), chymotrypsin byl od Roche Diagnostics (Mannheim, Německo). Pro přečištění vzorků byly použity pipetové špičky ZipTip C_{18} (Millipore, Billerica, USA).

Extrakce glutenových bílkovin

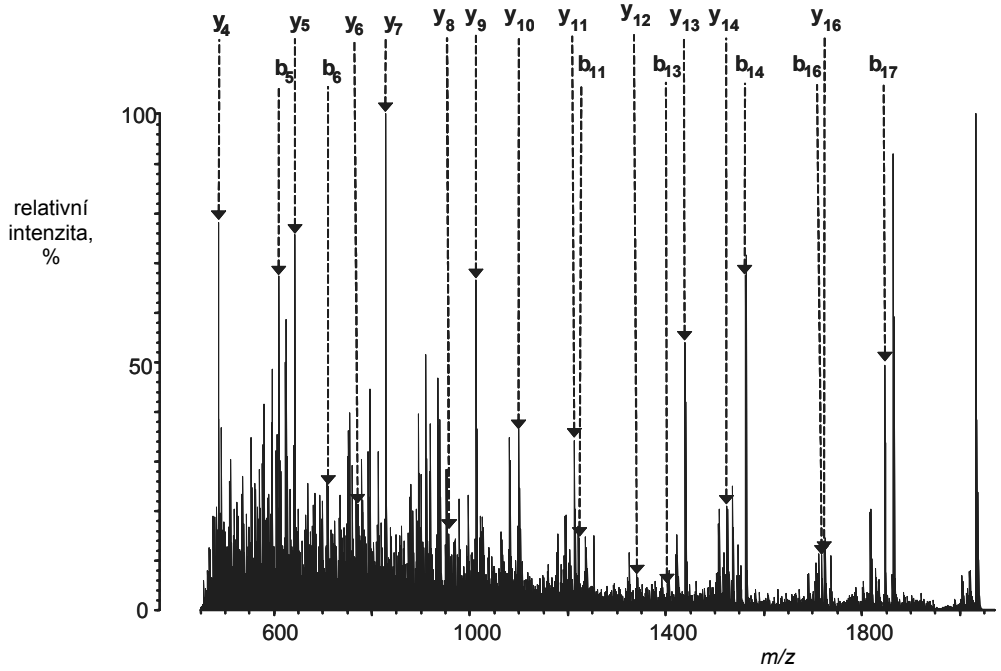
Navážka 50 mg pšeničné mouky byla nejprve extrahována deionizovanou vodou, čímž došlo k odstranění albuminů ze vzorku. Samotné glutenové bílkoviny byly poté extrahovány vodným roztokem 60% ethanolu. Každá extrakce byla provedena dvakrát s 0,5 ml extrakčního činidla na třepačce po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Ethanolové extrakty byly odstředěny při 12 000 g po dobu 10 min. Po odstředění byly oba ethanolové extrakty spojeny a vysušeny ve vakuové odparce.

1-D elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (1-D PAGE)

Vysušené extrakty byly rozpuštěny v roztoku obsahujícím 125 µl vodného roztoku 60% ethanolu a 25 µl 50 mM oktyl-β-D-glukopyranosidu. Vzorek pro gelovou elektroforézu byl připraven smícháním tohoto ethanolového roztoku se vzorkovým pufrem (50 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 4% dodecylsulfát sodný (SDS), 12% glycerol, 2% β-merkaptoethanol, 0,01% bromofenolová modř) v poměru 1:1. Vzorek byl povařen (10 min) a 20 µl takto připraveného vzorku bylo naneseno na polyakrylamidový gel. Pro separaci bílkovin byl použit 12% tris-glycinový gel NOVEX (Invitrogen, Frederick, USA). K barvení bílkovin v gelu bylo použito barvivo Coomassie Brilliant Blue R-250 (fixace bílkovin v gelu byla provedena roztokem obsahujícím 45 % methanolu a 5 % kyseliny octové (1 hodina), barvení bílkovin v gelu roztokem obsahujícím 45 % methanolu, 5 % kyseliny octové a 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (45 min), následné odbarvení gelu bylo provedeno roztokem obsahujícím 5 % methanolu a 7 % kyseliny octové (24 hodin)).

Příprava vzorku pro hmotnostně spektrometrickou analýzu

Po separaci pomocí 1-D PAGE byly jednotlivé skvrny bílkovin z gelu vyříznuty a podrobeny enzymatickému štěpení. Nejprve byly vyříznuté kousky gelu odbarveny roztokem acetonitril/voda (1:1, 2 × 15 min) a poté ještě roztokem acetonitril/0,1 M-NH_4HCO_3 (1:1, 20 min). Bílkoviny byly poté redukovány 10 mM dithiothreitolem a následně alkylovány 55 mM iodoacetamidem. K enzymatickému štěpení bílkovin byl použit chymotrypsin (12,5 ng µl^{-1} chymotrypsinu v 50 mM NH_4HCO_3). Štěpení probíhalo při teplotě 37 °C po dobu 18 h. Výsledné peptidy byly z gelu extrahovány roztokem acetonitril/25 mM NH_4HCO_3 (1:1, 30 min) a 5% kyselinou mravenčí (2 × 15 min), extrakty byly spojeny a vysušeny ve vakuové odpar-



Obr. 1. **Fragmentační spektrum MALDI QIT RTOF peptidu ($[M + H]^+$) o molekulové hmotnosti 2050,3 Da se znázorněnými y- a b-ionty**; ze spektra je možné z neúplných sérií y- a b-iontů vyčíst část sekvence: SPKLSGQGQR(PG)Q, jako kolizní plyn byl použit argon

ce. Pro hmotnostně-spektrometrické analýzy byly vysušené vzorky peptidů rozpuštěny v 15 µl 0,1% kyseliny trifluoroctové a následně přečištěny pomocí ZipTip pipetových špiček C_{18} (cit.[24,25]).

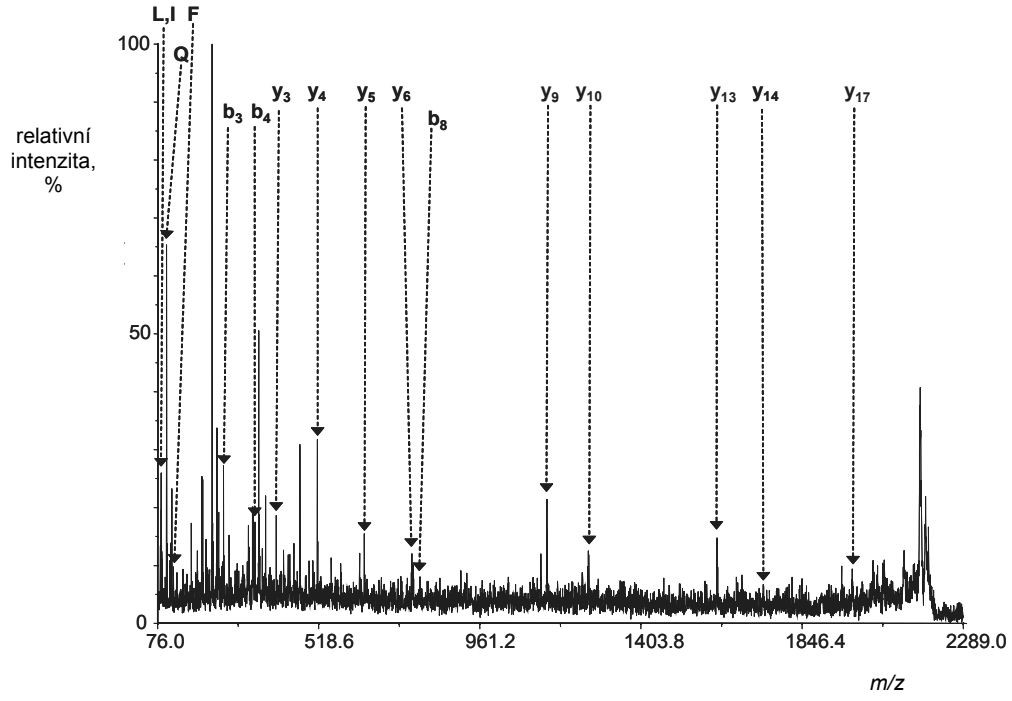
Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru MALDI TOF vybaveném tzv. curved field reflektronem (AXIMA CFR, Shimadzu Biotech Kratos Analytical, Manchester, UK) a na hmotnostním spektrometru MALDI TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Framingham, USA). MS/MS experimenty byly prováděny na přístrojích MALDI QIT RTOF (hybridní hmotnostní spektrometr s kvadrupólovou iontovou pastí, AXIMA QIT, Shimadzu Biotech Kratos Analytical, Manchester, UK) a MALDI TOF/TOF hmotnostním spektrometru. Jako kolizní plyn byl u obou přístrojů použit argon. Pro účely hmotnostní spektrometrie byly použity jako matrice kyselina α-kyano-4-hydroxyskořicová (6 mg ml^{-1} v roztoku acetonitril/0,1% kyselina trifluorooctová, 1:1) a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (15 mg ml^{-1} v methanolu). Vzorek byl smíchán s matricí přímo na destičce v poměru 1:1 a to jak pro MS, tak i pro MS/MS experimenty.

Výsledky a diskuse

Jelikož pšeničná mouka je výchozím materiálem při výrobě mnoha potravin, byla použita pro identifikaci bílkovin toxických pro pacienty s celiakií. Glutenové bílkoviny extrahované vodným roztokem 60% ethanolu byly separovány pomocí 1-D PAGE. Rozdělené bílkoviny byly poté podrobeny enzymatickému štěpení v gelu chymotrypsinem, který štěpí peptidové vazby na *C*-konci tyrosinu, fenylalaninu, tryptofanu, leucinu, methioninu a alaninu (pokud je před některou zmiňovanou aminokyselinou prolin, enzym peptidovou vazbu neštěpí). Díky velmi nízkému obsahu argininu a lysinu ve struktuře glutenových bílkovin nebylo možné použít trypsin, který je nejčastěji používaným enzymem při proteomických analýzách pro svou vysokou specifitu[26].

Vzniklé chymotryptické peptidy byly analyzovány dále hmotnostními spektrometry MALDI. Nejprve bylo změřeno hmotnostní spektrum jednotlivých vzorků, tzv. experimentální „peptide mass fingerprint“. Vyhodnocení takto získaných spekter pomocí volně přístupných vyhledávacích programů a databází bílkovin bohužel v naprosté většině případů nevedlo k identifikaci žádných bílkovin, což je způsobeno jednak velmi vysokou homologií glutenových bílkovin a jednak nedostatečným rozdělením jednotlivých glutenových bílkovin gelovou elektroforézou 1-D. Proto je k jednoznačné identifikaci těchto



Obr. 2. **Fragmentační spektrum MALDI TOF/TOF peptidu ($[M + H]^+$) o molekulové hmotnosti 2182,2 Da se znázorněnými y- a b-ionty a některými imoniovými ionty (nalezené imoniové ionty: P, V, L(I), N, Q, F, R)**; ze spektra lze na základě neúplných sérií y- a b-iontů vyčíst část sekvence: S(V)Q(PQQ)L/I(PQF)EEL/I, jako kolizní plyn byl použit argon

bílkovin nutné použít tandemovou hmotnostní spektrometrii. Za tímto účelem byly vybrané peptidy podrobeny kolizně-indukované fragmentaci a to na přístrojích MALDI QIT RTOF a MALDI TOF/TOF.

Příklad fragmentace peptidu o molekulové hmotnosti 2050,3 Da ($[M + H]^+$) je uveden na obr. 1, který ukazuje, že fragmentace peptidů na přístroji MALDI QIT RTOF vede ke vzniku velkého množství fragmentů, díky nimž není vyhodnocení takových hmotnostních spekter snadné. Většina těchto fragmentů odpovídá interním fragmentům. Nicméně pomocí nalezených y- a b-iontů je možné určit větší část sekvence analyzovaného peptidu (SPKLSGQGQR(PG)Q). Na základě analýzy MS/MS byla zjištěna sekvence peptidu YYPTSPKLSGQGQRPGQW, na jejímž základě byla identifikována bílkovina vysokomolekulární jednotka gluteninu DX5. Obr. 2 je příkladem fragmentace peptidu o molekulové hmotnosti 2182,2 Da ($[M + H]^+$) na přístroji MALDI TOF/TOF, jehož sekvence je AQGSVQPQQLPQFEEIRNL. Výsledné hmotnostní spektrum obsahuje méně fragmentů než v předchozím případě, což je způsobeno zejména sníženou tvorbou interních fragmentů (oblast od 500 Da výše). Nicméně i v tomto hmotnostním spektru byly nalezeny neúplné série y- a b-iontů, ze kterých je možné určit část sekvence analyzovaného peptidu (S(V)Q(PQQ)L/I(PQF)EEL/I). Kromě y- a b-iontů byly v hmotnostním spektru (obr. 2) nalezeny některé imoniové ionty, které poskytují informaci o aminokyselinovém složení peptidu. Vyhodnocením spektra na obr. 2 byla identifikována bílkovina α-gliadin. V případě obou analyzovaných peptidů byl pro vyhodnocení naměřených hmotnostních spekter použit databázový vyhledávací program Mascot a jako databáze bílkovin byla použita databáze NCBInr. Oba analyzované chymotryptické peptidy byly pro identifikované bílkoviny specifické a jejich fragmentace vedla k jednoznačné identifikaci bílkovin.

Závěr

Výsledky uvedené v této práci dokazují, že proteomická analýza je vhodnou metodou pro jednoznačnou identifikaci glutenových bílkovin v potravinách. Pro enzymatické štěpení glutenových bílkovin byl použit chymotrypsin jako vhodný enzym poskytující v případě glutenových bílkovin peptidy o molekulových hmotnostech vhodných pro analýzy hmotnostní spektrometrií MALDI TOF. Navíc chymotrypsin může být použit za zcela stejných experimentálních podmínek a ve stejném množství jako trypsin. Dále bylo zjištěno, že k jednoznačné identifikaci glutenových bílkovin je nutné zejména kvůli jejich vysoké homologii použít tandemovou hmotnostní spektrometrii. Zde popsaný postup proteomické analýzy může být použit jako alternativní metoda k již zavedeným technikám jako jsou např. testy ELISA pro identifikaci bílkovin toxických pro pacienty s celiakií, kdy analýzou MS/MS chymotryptických peptidů glutenových bílkovin je možné nalézt toxické peptidové sekvence v analyzovaném vzorku.

Autoři děkují grantu 1B53002 NAZV a výzkumnému záměru č. Z40310501 za finanční podporu.

LITERATURA

1. Camafeita E., Alfonso P., Acevedo B., Méndez E.: J. Mass Spectrom. *32*, 444 (1997).
2. Camafeita E., Solís J., Alfonso P., López J.A., Sorell L., Méndez E.: J. Chromatogr., A *823*, 299 (1998).
3. Matuz J., Póka R., Boldizsár I., Szerdahelzi E., Hajós G.: Cereal Res. Commun. *28*, 433 (2000).
4. Novák P., Man P., Tučková L., Tlaskalová-Hogenová H., Bezouška K., Havlíček V.: J. Mass Spectrom. *37*, 507 (2002).
5. Singh H., Case S., Duerksen D.: Clin. Nutr. Rounds *3*, (2003).
6. Koning F.: J. Mol. Recognit. *16*, 333 (2003).
7. Jennings J. S. R., Howdle P. D.: Curr. Opin. Gastroenterol. *19*, 118 (2003).
8. Gellrich C., Schieberle P., Wieser H.: Cereal Chem. *80*, 102 (2003).
9. Garozzo D., Cozzolino R., Giorgi S. D., Fisichella S., Lafiandra D.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *13*, 2084 (1999).
10. Masci S., D'Ovidio R., Lafiandra D., Kasarda D. D.: Plant Physiol. *118*, 1147 (1998).
11. Masci S., Egorov T. A., Ronchi C., Kuzmicky D. D., Kasarda D. D., Lafiandra D.: J. Cereal Sci. *29*, 17 (1999).
12. Méndez E., Camafeita E., Sebastián J. S., Valle I., Solís J., Mayer-Posner F. J., Suckau D., Marfisi C., Soriano F.: J. Mass Spectrom. S123 (1995).
13. Dworschak R. G., Ens W., Standing K. G., Preston K. R., Marchylo B. A., Nightingale M. J., Stevenson S. G., Hatcher D. W.: J. Mass Spectrom. *33*, 429 (1998).
14. Cunsolo V., Foti S., Saletti R., Gilbert S., Tatham A. S., Shewry P. R.: J. Mass Spectrom. *39*, 66 (2004).
15. Sorell L., López J. A., Valdés I., Alfonso P., Camafeita E., Acevedo B., Chirdo F., Gavilondo J., Méndez E.: FEBS Lett. *439*, 46 (1998).
16. Denery-Papini S., Nicolas Y., Popineau Y.: J. Cereal Sci. *30*, 121 (1999).
17. Rocher A., Calero M., Soriano E., Méndez E.: Biochim. Biophys. Acta *295*, 13 (1996).
18. Camafeita E., Alfonso P., Mothes T., Méndez E.: J. Mass Spectrom. *32*, 940 (1997).
19. Camafeita E., Méndez E.: J. Mass Spectrom. *33*, 1023 (1998).
20. McComb M. E., Oleschuk R. D., Chow A., Perreault H., Dworschak R. G., Znamirowski M., Ens W., Standing K. G., Preston K. R.: Can. J. Chem. *79*, 437 (2001).
21. Hernando A., Valdes I., Méndez E.: J. Mass Spectrom. *38*, 862 (2003).
22. Chmelík J., Řehulka P., Mayrhofer C., Allmaier G.: Kvasný Prům. *47*, 159 (2001).
23. Chmelík J., Řehulka P., Střelcová M., Kubáň V., Mayrhofer C., Allmaier G.: Rostl. Výroba *48*, 261

(2002).
24. Řehulka P., Šalplachta J., Chmelík J.: J. Mass Spectrom. *38*, 1267 (2003).
25. Šalplachta J., Řehulka P., Chmelík J.: J. Mass Spectrom. *39*, 1395 (2004).
26. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.: Anal. Chem. *68*, 850 (1996).

J. Šalplachta[a], G. Allmaier[b], and J. Chmelík[a]
([a] Department of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, [b] Department of Chemical Technology and Analysis, Technical University Wien, Rakousko): **Proteomic Identification of Gluten Proteins**

Proteomics-based identification strategy for gluten proteins in ethanolic extracts of wheat flour is described in this study. Protein extracts were separated by 1D gel electrophoresis and subjected to in-gel digestion with chymotrypsin which was found an appropriate proteolytic enzyme for the purpose. Based on collision-induced dissociation of selected chymotryptic peptides using MALDI QIT RTOF and MALDI TOF/TOF, the high-molecular-weight glutenin subunit DX5 and α-gliadin were identified. This strategy allows unambiguous identification of proteins toxic for patients with coeliac diseases.

LIBLICE 2005 – DODATKY

Sborník abstraktů

Konference
Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii

40. Konference *18. – 20. listopadu 2005*

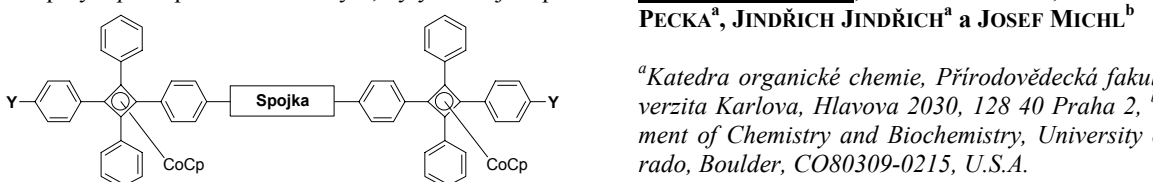
KOBALTOVÉ KOMPLEXY CYKLOBUTADIENU A JEJICH MOŽNÉ VYUŽITÍ V MOLEKULOVÉ ELEKTRONICE

MICHAL VALÁŠEK[a] a JOSEF MICHL[b]

[a]Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2, [b]Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, CO80309-0215, U.S.A.
michalvalasek@hotmail.com

Dikarbonyl(η^5-cyklopentadienyl)kobalt [$CpCo(CO)_2$] má velice široké uplatnění v chemii organokovů posledních 50-ti let[1]. Jedna z možných jeho reakcí je tvorba cyklobutadienových komplexů Rauschovou dimerizací tolanových derivátů[2]. Tyto cyklobutadienové komplexy, díky své čtvercové symetrii, nacházejí široká uplatnění například v molekulové elektronice[3] nebo materiálové chemii[4].

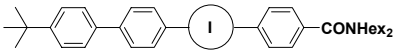
Bude prezentována metoda ke konstrukci kobaltových komplexů substituovaných tetrafenylcyklobutadienů. Takto připravené sendvičové komplexy, mající vhodné funkční skupiny v *para* polohách na fenylu, byly navzájem propojeny pomocí Suzukiho kaplingu[5] a to buď přímo, přes aktivní místa (1,10-fenanthrolin, 2,2´-bipyridyl), čímž vynikají "molekulové nanosenzory" nebo přes "molekulové izolátory" (bicyklo[1.1.1]pentany, bicyklo[2.2.2] oktan, *p*-karborany) (obr. 1). Pro studium a určení nejvhodnějšího izolátoru byla nejprve připravena série izolátorů mající na jedné straně *terc*-butylbifenyl a na druhé straně *N,N*-dihexylbenzamid (obr. 2), které jsou podrobeny spektroskopickému studiu.



Y - H, SMe, S-*terc*-Bu, COOH,...

Spojka - Ph, bifenyl, "molekulové izolátory", 1,10-Fenanthrolin, ...

Obr. 1.



I - Ph, bicyklo[1.1.1]pentany, bicyklo[2.2.2]oktan, 10-vertex and 12-vertex *p*-karborany

Obr. 2.

Dále bude prezentována příprava samoskladného kobaltového komplexu zakončeného karboxylovými kyselinami a mající substituovaný cyklopentadienový kruh vykazující afinitu k povrchu rtuti. Bylo také využito elektrondonorních vlastností cyklobutadienového komplexu pro konstrukci "molekulárních diod".

Tento projekt je financován z grantu GA UK 417/2004.

LITERATURA

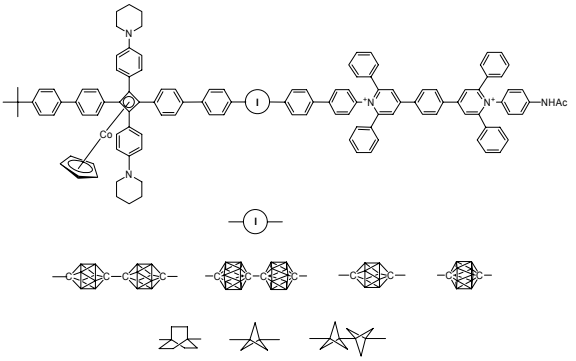
1. Efraty. A.: Chem. Rev. *77*, 691 (1977).
2. Rausch M. D., Genetti R. A.: J. Am. Chem. Soc. *89*, 5502 (1967).
3. Zheng X., Mulcahy M. E., Horinek D., Galeotti F., Magnera T. F., Michl J.: J. Am. Chem. Soc. *126*, 4540 (2004).
4. Bunz U. H. F.: Synlett *10*, 1117 (1997).
5. Miyaura N., Suzuki A.: Chem. Rev. *95*, 2457 (1995).

SYNTÉZA NOVÉHO TYPU „MOLEKULOVÝCH DIOD"

MICHAL VALÁŠEK[a,b], IVANA NOUZOVÁ[a], JAROSLAV PECKA[a], JINDŘICH JINDŘICH[a] a JOSEF MICHL[b]

[a]Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2, [b]Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, CO80309-0215, U.S.A.
michalvalasek@hotmail.com

Bude prezentována příprava nového typu „molekulových diod", které se skádají z elektronově bohatého kobaltového sendviče[1] (donoru) a elektronově chudého



„pyridiniového monomeru“[2] (akceptoru). Při výběru „molekulových odporů“[3] bylo využito alifatických molekul majících vysoký ionizační potenciál. Cyklobutadienový kruh byl vystavěn Rauschovou dimerizací[1] tolanových derivátů s $CoCp(CO)_2$ a dále pomocí Suzukiho kaplingu spojen s „molekulovými odpory“.[4] Piperidinové skupiny, jako laterální substituenty cyklobutadienového kruhu, zvyšují stabilitu oxidované formy sendvičového komplexu. Dále bude ukázána syntéza série „molekulových odporů“, ve kterých je středová jednotka tvořena bicyklo[2.2.2] oktanem, bicyklo[1.1.1]pentany (staffany), 1,10-dikarba-*closo*-dekaborany a 1,12-dikarba- *closo*-dodekaborany. Pyridiniové akceptory byly připraveny známými reakcemi přes příslušné pyryliové soli[2]. Konečné spojení všech tří komponent bylo provedeno pomocí Suzukiho kaplinku boronového esteru kobaltového sendviče s jododeriváty „molekulových odporů” a pyridiniového monomeru[4]. Tyto molekuly jsou studovány měřením rychlosti přenosů náboje přes „molekulové odpory“ pomocí pulzní radiolýzy.

Tento projekt je financován z grantů GA UK 417/2004 a GA ČR 203/04/0921.

LITERATURA

1. Rausch M. D., Genetti R. A.: J. Am. Chem. Soc. *89*, 5502 (1967).
2. Valášek M., Pecka J., Jindřich J., Calleja G., Craig P. R., Michl J.: J. Org. Chem. *70*, 405 (2005).
3. Schwab P. F. H., Levin M. D., Michl J.: Chem. Rev. *99*, 1863 (1999).
4. Miyaura N., Suzuki A.: Chem. Rev. *95*, 2457 (1995).

OBSAH

ÚVODNÍK 882

REFERÁTY

Proteomický průvodce 883
J. Chmelík

Proteomika v postgenomové době 886
H. Kovářová

Proteomika jako komplexní přístup ke studiu fyziologických regulací u bakterií 890
J. Weiser, M. Holub, Š. Nezbedová a S. Bezoušková

Proteolytické enzymy: význam pro proteomiku 896
T. Štosová, J. Havliš, R. Lenobel a M. Šebela

Integrovaná řešení pro proteomické pracovní postupy – Sigma-Aldrich 906
K. Herick

Mikrofluidika: Nový způsob úpravy a vnášení vzorků pro hmotnostní spektrometrii 915
J. Grym a F. Foret

Metodické přístupy současné fosfoproteomové analýzy 922
P. Halada

Ionizace laserem za přítomnosti matrice za atmosférického tlaku (AP-MALDI) – nový směr v analýze peptidů a proteinů 930
M. Godula

Lineární iontová past a její aplikace v proteomické analýze 937
P. Verner

Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR MS) a její využití jako nejflexibilnější hmotnostně spektrometrické metody v proteomice 943
M. Boháč, A. Ingendoh, J. Fuchser a M. Witt

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

Systém pracující na principu dvojrozměrné kapalinové chromatografie proteinů jako alternativa k dvojrozměrné gelové elektroforéze 952
H. Skalníková, H. Kovářová, J. Moos, V. Filová a P. Halada

Proteomika v molekulární toxikologii: Identifikace potenciálních časných proteinových biomarkerů hepatokarcinogenity u krys 957
K. Fella, M. Glückmann, V. Kruft, P.-J. Kramer a M. Kröger

Charakterizace proteomu bakteriofága 812 962
Z. Zdráhal, L. Eyer, H. Konečná a J. Preisler

Proteomická identifikace glutenových bílkovin 967
J. Šalplachta, G. Allmaier a J. Chmelík

LIBLICE 2005 – dodatky 972

CONTENTS

EDITORIAL 882

REVIEW ARTICLES

Proteomic Guide 883
J. Chmelík

Proteomics in Postgenome Era 886
H. Kovářová

Proteomics Represents Complex Approach in Studies of Regulation of Bacterial Physiology 890
J. Weiser, M. Holub, Š. Nezbedová, and S. Bezoušková

Proteolytic Enzymes: Significance for Proteomics 896
T. Štosová, J. Havliš, R. Lenobel, and M. Šebela

Integrated Solutions for Proteomics – Sigma-Aldrich 906
K. Herick

Mikrofluidics: New Method of Treatment and Introduction of Samples for Mass Spectrometry 915
J. Grym and F. Foret

Approaches to Current Phosphoproteomics 922
P. Halada

Laser Ionization in the Presence of Matrix at Atmospheric Pressure (AP-MALDI) – A New Direction in Peptide and Protein Analysis 930
M. Godula

Linear Ion Trap and Its Application in Proteomic Analysis 937
P. Verner

Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry as the Most Precise and Flexible Method in Proteomics and its Application 943
M. Boháč, A. Ingendoh, J. Fuchser, and M. Witt

LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS

A System Based on Principle of Two-Dimensional Liquid Chromatography of Proteins as an Alternative to Two-Dimensional Electrophoresis 952
H. Skalníková, H. Kovářová, J. Moos, V. Filová, and P. Halada

Proteomics in Molecular Toxicology: Identification of Potential Early Protein Biomarkers for Hepatocarcinogenicity in Rats 957
K. Fella, M. Glückmann, V. Kruft, P.-J. Kramer, and M. Kröger

Characterization of Bacteriophage 812 Proteome 962
Z. Zdráhal, L. Eyer, H. Konečná, and J. Preisler

Proteomic Identification of Gluten Proteins 967
J. Šalplachta, G. Allmaier, and J. Chmelík

LIBLICE 2005 – Supplement 972

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 99 (2005), čís./no. 12 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 129, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 115 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT v Praze, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohlav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámostný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/ MANUSCRIPTSIN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; t el/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, simanek@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: http: //chemicke-listy.vscht.cz • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Ráby 14, 533 52 Staré Hradiště; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2005 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 147 Kč, roční plné předplatné 2005 (12 čísel) 1512 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 756 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 80 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 60 EUR (doručování via SCHS), 225 EUR (individuální doručování) • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2005 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Dáno do tisku 30.11.2005.

ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÁ

vydává

CHEMICKÉ LISTY

CHLSAC *99*, 1 – 452 (2005)

Vedoucí redaktor — *Editor*

B. KRATOCHVÍL

Redakční kruh — *Editorial Board*

J. BAREK, Z. BĚLOHLAV, P. DRAŠAR, J. HETFLEJŠ, P. HOLÝ, J. HORÁK, P. CHUCHVALEC, J. PODEŠVA, P. RAUCH, J. VOLKE

Zahraniční a oblastní redaktoři — *Foreign and Regional Editors*

F. ŠVEC (USA), V. VĚTVIČKA (USA), L. OPLETAL (HRADEC KRÁLOVÉ)

Redakční rada — *Advisory Board*

E. BORSIG, M. ČERNÁ, L. ČERVENÝ, E. DIBUSZOVÁ, J. HANIKA, Z. HAVLAS, I. KADLECOVÁ, J. KÁŠ, J. KOUBEK, T. MÍŠEK, J. PACÁK, V. PAČES, O. PALETA, V. RŮŽIČKA, I. STIBOR, V. ŠIMÁNEK, R. ZAHRADNÍK

Výkonná redaktorka — *Editorial Assistant*

R. ŘÁPKOVÁ

Ročník 99 (2005) — Volume 99 (2005)

Listy chemické, ročník 129 – Časopis pro průmysl chemický, ročník 115

Str. 1 – 452

ISSN 0009-2770

Obsah ročníku 99 (2005) — Volume Contents 99 (2005)

Úvodníky — Editorials

Prognóza vývoje evropského chemického průmyslu do roku 2015 *(A. Pálffy)* ... 1
Problémy našich vysokých škol *(I. Stibor)* ... 97
Celoživotní vzdělávání na VŠCHT Praha *(A. Petrášková)* ... 153
Vážené kolegyně, vážení kolegové a čtenáři *(V. Šimánek)* ... 209
Chemická informatika – reklamní slogan nebo vědecký obor? *(M. Nič, J. Jirát)* ... 297
Čeština a angličtina v Chemických listech *(J. Podešva)* ... 401
Současný stav rozvoje ekologického zemědělství a produkce biopotravin ve světě a u nás *(J. Prugar)* ... 453
Antioxidanty ve výživě moderního člověka *(J. Pokorný)* ... 454
Odborná kniha – skripta – elektronické pomůcky aneb Quo vadis učebnice? *(P. Chuchvalec)* ... 569
Polysacharidy, jejich význam a uplatnění *(J. Čopíková, A. Synytsya)* ... 621
Vliv aspektů ochrany životního prostředí na vývoj chemického průmyslu v Evropě *(J. Horák)* ... 673
Vážení čtenáři *(Z. Chvoj)* ... 771
Proč vyšlo toto číslo *(J. Barek)* ... 882

Referáty — Review Articles

P. Stratil a V. Kubáň: Exogenní karcinogeny v potravinách a karcinogeny vznikající při jejich technologickém zpracování ... 3
K. Motyka a P. Mikuška: Přehled stanovení formaldehydu a dalších karbonylových sloučenin v ovzduší ... 13
J. Vinšová a A. Imramovský: Intramolekulární cyklizace využívané k uvolňování účinných látek z proléčiv ... 21
J. Brus: Principy a aplikace vícerozměné NMR spektroskopie tuhého stavu v přírodním izotopovém složení ... 99
D. Babánková, S. Civiš a L. Juha: Chemické projevy laserových jisker ... 109
J. Hanzlík: Strukturální fotografika – nástroj zobrazení a studia anizotropního materiálu ... 116
P. Čížková a P. Mader: Uplatnění elektrochemických metod v certifikačních analýzách referenčních materiálů ... 119
L. Vlková a V. Církva: Chlorované fenoly a způsoby jejich degradace ... 125
L. Bartek, P. Klusoň a L. Červený: Pokroky asymetrické katalýzy v oblasti enantioselektivních hydrogenací ... 157
J. Rudolfová a L. Čurda: Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci ... 168
K. Lang, J. Mosinger a D. M. Wagnerová: Pokroky ve fotochemii singletového kyslíku ... 211
J. Sádecká a J. Polonský: Polyméry s molekulovými odtlačkami v analytickej chémii ... 222
O. Krinke, Z. Novotná, O. Valentová a J. Martinec: Metody měření koncentrace Ca^{2+} iontů použitelné při studiu buněčné signalizace ... 231
J. Hájíček: Trendy v totální syntéze alkaloidů ... 298
M. Astrová, L. Kurc a L. Červený: Oxazolidinové deriváty efedrinu ... 318
E. Benešová, M. Marková, P. Lipovová a B. Králová: Fukosidasy a oligosacharidy obsahující fukosu ... 324
M. Rebroš, M. Rosenberg, Ľ. Krištofíková a R. Stloukal: Mikrobiálna produkcia palivového etanolu: baktérie alebo kvasinky? ... 402
G. Košová: Úloha anorganických a organických látek při syntéze zeolitů ... 411
J. Mosnáček a I. Lukáč: Možnosti prípravy α–diketónov a α–diketónových monomérov ... 421
J. Piterková, K. Tománková, L. Luhová, M. Petřivalský a P. Peč: Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu ... 455
M. Blažková, L. Karamonová, L. Fukal a P. Rauch: *Listeria monocytogenes* – nebezpečný patogen a jeho detekce v potravinách ... 467
J. Lachman, K. Hamouz a M. Orsák: Červeně a modře zbarvené brambory – významný zdroj antioxidantů

v lidské výživě 474
Z. Ciesarová: Minimalizácia obsahu akrylamidu v potravinách 483
T. Vařilová: Stacionární fáze v afinitní chromatografii 570
I. Hagarová a M. Žemberyová: Stanovenie arzénu v biologickom materiáli a vo vzorkách životného prostredia technikami atómovej absorpčnej spektrometrie 578
P. Pavlát, J. Hlaváč a V. Bekárek: Alternativní výklad vlivu bazicity prostředí v koncepci kyselin a zásad 585
J. Harmatha: Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů 622
S. Šurín a P. Šmigáň: Transport látok cez membránu u Archaea: membránové transportné proteíny 633
P. Diviš, H. Dočekalová a V. Smetková: Gelové techniky pro měření *in situ* ve vodách, půdách a v sedimentech 640
L. Hanyšová, P. Kastner a J. Klimeš: Degradační produkty a nečistoty paracetamolu z hlediska jejich detekce 647
M. Tichý, Z. Roth, K. Bláha a A. P. Worth: Alternativní metody testování toxicity chemických látek *in silico* ... 675
K. Dercová, J. Makovníková, G. Barančíková a J. Žuffa: Bioremediácia toxických kovov kontaminujúcich vody a pôdy 682
Peter Horbaj: Niekoľko poznámok o základných parametroch, o určovaní súhrnného vzorca a o spaľovaní tuhého komunálneho odpadu 694
H. Zahradníčková, P. Hartvich a I. Holoubek: Historie a význam chirálních analýz aminokyselin v biologických matricích a v životním prostředí 703
L. Veselá, M. Kubal, J. Kozler a P. Innemanová: Struktura a vlastnosti přírodních huminových látek typu oxihumolitu 711
L. Žáková a J. Jiráček: Biosyntéza, sekrece a degradace insulinu 772
M. Stiborová, J. Patočka, E. Frei a H. H. Schmeiser: Biochemické a toxikologické aspekty etiologie balkánské endemické nefropatie 782
M. Kirchner a E. Matisová: Súčasný stav a perspektívy využitia rýchlej plynovej chromatografie v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou 789
J. Čopíková, M. Uher, O. Lapčík, J. Moravcová a P. Dražar: Přírodní barevné látky 802
J. Chmelík: Proteomický průvodce 883
H. Kovářová: Proteomika v postgenomové době 886
J. Weiser, M. Holub, Š. Nezbedová a S. Bezoušková: Proteomika jako komplexní přístup ke studiu fyziologických regulací u bakterií 890
T. Štosová, J. Havliš, R. Lenobel a M. Šebela: Proteolytické enzymy: význam pro proteomiku 896
K. Herick: Integrovaná řešení pro proteomické pracovní postupy – Sigma-Aldrich 906
J. Grym a F. Foret: Mikrofluidika: nový způsob úpravy a vnášení vzorků pro hmotnostní spektrometrii 915
P. Halada: Metodické přístupy současné fosfoproteomové analýzy 922
M. Godula: Ionizace laserem za přítomnosti matrice za atmosférického tlaku (AP-MALDI) – nový směr v analýze peptidů a proteinů 930
P. Verner: Lineární iontová past a její aplikace v proteomické analýze 937
M. Boháč, A. Ingendoh, J. Fuchser a M. Witt: Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR MS) a její využití jako nejflexibilnější hmotnostně spektrometrické metody v proteomice 943

Nomenklatura a terminologie **Nomenclature and Terminology**

Doporučení IUPAC. Nomenclature of Organic Chemistry *(J. Kahovec)* 185
Doporučení IUPAC. Terminology of Polymers Containing Ionizable or Ionic Groups and of Polymers Containing Ions *(J. Kahovec)* 185
Rovnice, jednotky a veličiny – jak s nimi? *(E. Juláková)* 250
Krystalová mřížka – co s ní? *(B. Kratochvíl)* 258
Klasifikační systém lipidů *(A. Kotyk)* 610
Doporučení IUPAC *(J. Kahovec)* 725

XML-based IUPAC Standard for Experimental, Predicted, and Critically Evaluated Thermodynamic Property Data Storage and Capture (ThermoML) *(J. Kahovec)* 725

Laboratorní přístroje a postupy **Laboratory Equipment and Methods**

M. Matuchová, J. Maixner a V. Lískovec: Návrh laboratorního zařízení pro zonální čištění a pěstování krystalů 30
M. Žemberyová a I. Hagarová: Stanovenie selénu v krvnom sére detí metódou elektrotermickej atómovej absorpčnej spektrometrie 34
M. Douša: Stanovení ionoforových polyetherových monokarboxylových kyselin v krmivech metodou HPLC s postkolonovou derivatizací 40
M. Novotný, F. Opekar a I. Jelínek: Kombinovaný detektor pro kapilární elektroforézu 132
P. Zámostný, Z. Bělohlav a P. Chládek: Možnosti využití mikrokatalytických pulzních reaktorů k testování katalyzátorů 137
M. Kretová a J. Grones: Charakterizácia a identifikácia octových bakterií 144
K. Mazanec a J. Chmelík: Využití MALDI-TOF MS při analýze směsí polymerů 175
H. Krýsová, J. Krýsa, J. Hubáčková, J. Tříska a J. Jirkovský: Odstraňování herbicidu atrazinu z povrchové vody 179
J. Tutsch, M. Kronďák, R. Volf, B. Grüner a V. Král: Nové možnosti využití kobalt bis(dikarbollidového) aniontu jako lipofilního přídavku v membránách iontově-selektivních elektrod 186
J. Petr, V. Maier, J. Horáková, E. Tesařová a J. Ševčík: Jak se neokrást o úspěšnou chirální separaci kapilární elektroforézou 190
M. Lísa a M. Holčapek: Analýza přírodních směsí triacylglycerolů technikou HPLC/MS 195
M. Holbová a P. Lubal: Simultánní speciační spektrofotometrická analýza iontů Fe^{2+} a Fe^{3+} 200
F. Novák, R. Hrabal, I. Bartošová a J. Kalčík: Kvantitativní ^{31}P NMR spektroskopie huminových kyselin 236
R. Hanus, I. Kolaříková, L. Brabec, M. Kočiřík, R. Přikryl, E. Jelínek a A. Zikánová: Přírodní materiály bohaté montmorillonitem: simultánní měření dilatace a sorpce 246
O. Trnka, M. Hartman a V. Veselý: Charakteristika tlakových fluktuací v různých režimech suspenzí plyn-tuhá látka 330
A. Kroupa, I. Víden a S. Vodrážka: Stanovení sorpční kapacity sorbentu Tenax TA pro určení koncentrací vybraných organických látek v ovzduší 339
L. Hendrich, V. Hynek a M. Šípek: Diferenciální permeametr určený k měření propustnosti plynů a par organických látek skrze ploché polymerní membrány 345
E. Jurová, K. Ciahotný a K. Lepková: Testování adsorbentů pro odstraňování organických látek z odpadních plynů 431
D. Oktavec, P. Májek, V. Vrábel a J. Lehotay: Stanovenie stopových množstiev Co^{2+} v podzemných vodách metódami molekulovej a atómovej spektrometrie po prekoncentrácii 437
I. Kolouchová, K. Melzoch, J. Šmidrkal a V. Filip: Obsah resveratrolu v zelenině a ovoci 492
J. Víteček, V. Adam, J. Petřek, P. Babula, P. Novotná, R. Kizek a L. Havel: Aplikace spektrofluorimetrického stanovení esteras v rostlinném materiálu 496
J. Száková, P. Tlustoš, D. Pavlíková a J. Balík: Modifikace standardizované evropské metody postupné extrakce půdy pro hodnocení podílů vybraných prvků přijatelných rostlinou 502
M. Douša: HPLC stanovení robenidinu v krmivech 509
J. Hlušek, M. Jůzl, J. Čepl a T. Lošák: Vliv přidávání sloučenin selenu do půdy na obsah sloučenin selenu v hlízách brambor 515
O. Hegedüs, A. Hegedüsová, J. Gašparík a A. Ivičičová: Hodnotenie metódy stanovenia selénu v zelenine atomovou absorpčnou spektrofotometriou s elektrotermickou atomizáciou a s generovaním hydridov 518
Tomáš Lošák a Ladislav Ducsay: Závislost výnosu a kvality cibule kuchyňské na hnojení sloučeninami síry 525
M. Marounek, A. Synytsya, J. Čopíková a K. Sirotek: Určení dostupnosti amidovaných pektinů pro mikroorganismy tračníku 591
V. Řezáčová-Smetková, B. Dočekal a H. Dočekalová: Použití techniky difuzního gradientu v tenkém filmu při charakterizaci půd 594

P. Jiřík, J. Fischer a J. Barek: Extrakčně-polarografické stanovení stopových množství 2-methyl-4,6-dinitrofenolu 600
M. Mokrý, J. Kušnír, P. Gál, K. Dubayová, M. Synek a J. Sabo: Úprava optosondy luminiscenčného spektrometra Perkin-Elmer LS 55 na meranie fluorescenčných spektier kožných povrchov 653
A. Hejtmánková, M. Vejdová a E. Trnková: Stanovení jodu v biologickém materiálu metodou HPLC s elektrochemickým detektorem 657
O. Mestek, A. Fonverne a J. Polák: Stanovení platiny v půdách hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem 718
L. Jantošová a Ľ. Mátel: Plutónium a amerícium vo vybraných biologických vzorkách životného prostredia 726
M. Kudravá a D. Rúriková: Stanovenie bioprístupných foriem olova a kadmia v podach metódou diferenčnej pulzovej anodickej stripping voltampérometrie 731
Z. Hroch a I. Prokopová: Stanovení kyseliny adipové v průběhu její polykondenzrace s 1,4-diaminobutanem .. 817
A. Trilčová, J. Čopíková, M. A. Coimbra, A. S. Barros, H. Křístková, L. Egert a A. Synytsya: Využití infračervené spektroskopie při sledování kvality kakaového prášku 821
H. Skalníková, H. Kovářová, J. Moos, V. Filová a P. Halada: Systém pracující na principu dvojrozměrné kapalinové chromatografie proteinů jako alternativa k dvojrozměrné gelové elektroforéze 952
K. Fella, M. Glückmann, V. Kruft, P.-J. Kramer a M. Kröger: Proteomika v molekulární toxikologii: Identifikace potenciálních časných proteinových biomarkerů hepatokarcinogenity u krys 957
Z. Zdráhal, L. Eyer, H. Konečná a J. Preisler: Charakterizace proteomu bakteriofága 812 962
J. Šalplachta, G. Allmaier a J. Chmelík: Proteomická identifikace glutenových bílkovin 967

Recenze **Book Reviews**

P. Andrew Evans (ed.): Modern Rhodium-Catalyzed Organic Reactions *(D. Dvořák)* 447
Philip J. Kocienski: Protecting Groups *(P. Drašar)* 447
Ning, Yong-Cheng:Structural Identification of Organic Compounds with Spectroscopic Techniques *(P. Drašar)* 448

Výuka chemie **Education in Chemistry**

SolEq™ (Solution Equilibria) – Softwarový balík pro výuku základů chemických rovnováh a jejich aplikací *(P. Lubal a J. Havel)* 47
Mimoškolní odborná činnost studentů Masarykovy střední školy chemické v Praze *(J. Dudrová)* 605
Praktické úlohy z koloidní chemie *(A. Panáček a L. Kvítek)* 606

Chemický průmysl **Chemical Industry**

L. Novák: Postavení chemického průmyslu v České republice 55
P. Machalík: Šestá mezinárodní technická konference asociace Euro Chlor „Zlepšení zdravotních, bezpečnostních a environmentálních aspektů elektrolytické výroby chloru“ 131
T. Herink, Z. Bělohlav, P. Zámostný, J. Doskočil, J. Lederer a P. Svoboda: Komplexní výzkum pyrolýzy uhlovodíků v Chemopetrolu Litvínov 443
L. Dluhoš a M. Pavelek: Přenos výsledků z laboratoře do provozního měřítka při vývoji reaktoru pro alkylaci anilinu ethanolem 737
A. Pálffy: Využití metody „outsourcingu“ k zvyšování obchodní úspěšnosti chemických podniků 743

Liblice 2004 – dodatky 150

Konference Sigma - Aldrich, V. mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků,
(Devět skal – Žďárské vrchy, 15. – 18. 6. 2005) 351

POLYSACHARIDY 2005 – Konference „Struktura a biologické účinky polysacharidů a jejich derivátů“,
(Praha, 11. 11. 2005) 661

Liblice 2005 (Nymburk, 2005) 827

PMA 2005 & 17th SRC 2005 (Bratislava, 10. – 12. 5. 2005) s1

3th Meeting on Chemistry & Life (Brno, 20. – 22. 9. 2005) s49

Liblice 2005 – dodtaky 972

Diskuse **Discussion**

Několik poznámke k výuce chemie *(P. Pitter)* 260
Poznámky k článku E. Julákové o rovnicích, jednotkách a veličinách *(P. Pitter)* 528
Scientometrie a chemické listy *(R. Kizek)* 615
Anglicky nebo česky? *(R. Zahradník)* 746

Zprávy **News**

ESEAC 2004 *(J. Barek)* 149
Soutěž o cenu firmy Merck 2005 *(J. Barek)* 205

Bulletin Asociace českých chemických společností

Evropský prostor pro vzdělávání v chemii *(L. Gros, W. Zeller, J. Moravcová)* 63
České překlady metrologických termínů *(Z. Plzák)* 65
Co nového v názvoslovném softwaru *(P. Drašar)* 66
Iontové kapaliny – nový směr v „zelené“ chemii *(J. Hanusek)* 265
Syntéza a vlastnosti ornithopteranu – nového člena rodiny porkanů *(J. Patočka a F. Liška)* 268
Jak publikovat a recenzovat odborné chemické články *(B. Štíbr)* 272
Chemický „Eurobakalář“ *(P. Drašar)* 531
„Eurobakalář chemie“ je skutečností. První evropská univerzita získala licenci k udělování titulu
(O. Paleta, P. Drašar) 542
Místo isopropylu *sek*-propyl? *(J. Pacák a H. Klímová)* 749
Renesance balónkové techniky *(V. Horák a J. Vinšová)* 750

Volby do orgánů ČSCH 274
Ze života chemických společností 74, 277, 545, 751
Členská oznámení a služby 279, 556

Evropský koutek 68, 281, 549
Odborná setkání 69, 281, 550, 753
Akce v ČR a v zahraničí 82, 279, 552, 762
Chemik na studiích, cestách 78, 288, 557
Zprávy 79, 286, 561
Střípky a klípky o světových chemicích 82, 285, 552, 758
Technické zajímavosti a služby 759
Zákony, které ovlivní život chemiků 87, 561
Knihy, literatura, informace a web 86, 562, 757
Zajímavosti ze světa vědy a techniky 81
Aprílový klub 288, 560
Bulletin představuje 85, 284, 554, 760
Noví členové ČSCH 89, 288, 762
Osobní zprávy 90, 289, 564, 763
Výročí a jubilea 92, 293, 565, 765

Autorský rejstřík 99 (2005) Autor Index 99 (2005)

(úv) úvodník, (ref) přehledný referát, (nt) nomenklatura a terminologie, (l) laboratorní přístroje a postupy, (ch.p.) chemický průmysl, (rec) recenze, (d) diskuse, (os.zp.) osobní zprávy, (s) odborná setkání, (v.ch.) výuka chemie, (z) zprávy, (b) bulletin

Adam V.: (l) 496
Allmaier G.: (l) 967
Astrová M.: (ref) 318

Babánková D.: (ref) 109
Babula P.: (l) 496
Balík J.: (l) 502
Banýr J.: (b) 545
Barančíková G.: (ref) 682
Barek J.: (l) 600, (s) 282, 72, (úv) 882, (z) 149, 205
Barros A. S.: (l) 821
Bartek L.: (ref) 157
Bartošová I.: (l) 236
Bekárek V.: (ref) 585
Bělohlav Z.: (ch.p.) 443, (l) 137
Benešová E.: (ref) 324
Bezoušková S.: (ref) 890
Bláha K.: (ref) 675
Bláhová M.: (s) 72
Blažková M.: (ref) 467
Boháč M.: (ref) 943
Brabec L.: (l) 246
Brožek J.: (os.zp.) 291, (s) 756
Brus J.: (ref) 99

Ciahotný K.: (l) 431
Ciesarová Z.: (ref) 483
Církva V.: (ref) 125
Civiš S.: (ref) 109
Coimbra M. A.: (l) 821

Čáp L.: (os.zp.) 289
Čáslavský J.: (s) 282
Čepl J.: (l) 515
Černošková E.: (b) 551
Červený L.: (ref) 157, 318, (z) 79
Čížek J.: (os.zp.) 763
Čížková P.: (ref) 119
Čopíková J.: (l) 591, 821, (ref) 802, (úv) 621
Čurda L.: (ref) 168

Chládek P.: (l) 137
Chmelík J.: (l) 967, (ref) 883
Chmelík K.: (l) 175
Chuchvalec P.: (úv) 569
Chvoj Z.: (úv) 771

Dercová K.: (ref) 682
Diviš P.: (ref) 640
Dluhoš L.: (ch.p.) 737
Dočekal B.: (l) 594
Dočekalová H.: (l) 594, (ref) 640
Doskočil J.: (ch.p.) 443
Douša M.: (l) 40, 509
Drahoš J.: (s) 69
Drašar P.: (b) 66, 67, 531, 542, 751, (rec) 447, 448, 562, 563, (ref) 802
Dubayová K.: (l) 653
Ducsay L.: (l) 525
Dudrová J.: (v.ch.)605
Dvořák D.: (rec) 447
Dvořák Z.: (b) 277

Egert L.: (l) 821
Eyer L.: (l) 962

Fella K.: (l) 957
Filip V.: (l) 492
Filová V.: (l) 952
Fischer J.: (l) 600
Fonverne A.: (l) 718
Foret F.: (ref) 915
Frei E.: (ref) 782
Fuchser J.: (ref) 943
Fukal L.: (ref) 467

Gál P.: (l) 653
Gašparík J.: (l) 518
Glückmann M.: (l) 957
Godula M.: (ref) 930
Grones J.: (l) 144
Gros L.: (b) 63
Grüner B.: (l) 186
Grus M.: (b) 78
Grym J.: (ref) 915

Hagarová I.: (l) 34, (ref) 578
Hájíček J.: (ref) 298
Halada P.: (l) 952, (ref) 922
Hamouz K.: (ref) 474
Hanika J.: (b) 281, 753
Hanus R.: (l) 246
Hanusek J.: (b) 265
Hanyšová L.: (ref) 647
Hanzlík J.: (ref) 116
Harmatha J.: (ref) 622
Hartman M.: (l) 330
Hartvich P.: (ref) 703
Havel J.: (v.ch) 47
Havel L.: (l) 496
Havliš J.: (ref) 896
Hegedüs O.: (l) 518
Hegedüsová A.: (l) 518
Hejtmánková A.: (l) 657
Hendrich L.: (l) 345
Herick K.: (ref) 906
Herink T.: (ch.p.) 443
Hlaváč J.: (ref) 585
Hlušek J.: (l) 515
Hocek M.: (z) 81
Holbová M.: (l) 200
Holčapek M.: (l) 195
Holeček J.: (os.zp.) 91
Holoubek I.: (ref) 703
Holub M.: (ref) 890
Horák J.: (b) 68, (úv) 673
Horák V.: (b) 750
Horáková J.: (l) 190
Horbaj P.: (ref) 694
Hrabal R.: (l) 236
Hrabovský J.: (s) 282
Hroch Z.: (l) 817
Hubáčková J.: (l) 179
Hynek V.: (l) 345

Imramovský A.: (ref) 21
Ingendoh A.: (ref) 943
Innemanová P.: (ref) 711
Ivičičová A.: (l) 518

Jandera P.: (s) 69
Janků J.: (s) 756
Jantošová L.: (l) 726
Jelínek E.: (l) 246
Jelínek I.: (l) 132
Jiráček J.: (ref) 772
Jirát J.: (úv) 297
Jiřík P.: (l) 600
Jirkovský J.: (l) 179
John J.: (b) 278
Juha L.: (ref) 109
Juláková E.: (nt) 250
Jurová E.: (l) 431
Jůzl M.: (l) 515

Kahovec J.: (nt) 185, 825
Kalčík J.: (l) 236
Karamonová L.: (ref) 467
Káš J.: (s) 71
Kašička V.: (os.zp.) 292
Kastner P.: (ref) 647
Kefurt K.: (b) 82
Kirchner M.: (ref) 789
Kizek R.: (d) 615, (l) 496
Klimeš J.: (ref) 647
Klímová H.: (b) 749
Klusoň P.: (ref) 157
Kočiřík M.: (l) 246
Kolaříková I.: (l) 246
Kolouchová I.: (l) 492
Konečná H.: (l) 962
Košová G.: (ref) 411
Košťál D.: (os.zp.) 763
Kotyk A.: (nt) 610
Kovářová H.: (l) 952, (ref) 886
Kozler J.: (ref) 711
Král V.: (l) 186
Králová B.: (ref) 324
Kramer P.-J.: (l) 957
Kratochvíl B.: (nt) 258, (os.zp.) 291, (rec) 757
Kretová M.: (l) 144
Krinke O.: (ref) 231
Křístková H.: (l) 821
Krištofíková Ľ.: (ref) 402
Kröger M.: (l) 957
Krombholzová R.: (s) 72
Kronďák M.: (l) 186
Kroupa A.: (l) 339
Kruft V.: (l) 957
Krýsa J.: (l) 179
Krýsová H.: (l) 179
Kubal M.: (ref) 711
Kubáň V.: (ref) 3
Kubová J.: (b) 77

Kudravá M.: (l) 731
Kurc L.: (ref) 318
Kušnír J.: (l) 653
Kvítek L.: (v.ch.) 606, (b) 550

Lachman J.: (ref) 474
Lang K.: (ref) 211
Lapčík O.: (ref) 802
Lederer J.: (ch.p.) 443
Lehotay J.: (l) 437
Lenobel R.: (ref) 896
Lepková K.: (l) 431
Lipová P.: (ref) 324
Lísa M.: (l) 195
Liška F.: (b) 268
Lískovec V.: (l) 30
Lošák T.: (l) 525, (l) 515
Lubal P.: (l) 200, (v.ch.) 47
Ludvík J.: (os.zp.) 564
Luhová L.: (ref) 455
Lukáč I.: (ref) 421

Machalík P.: (ch.p.) 131
Mader P.: (ref) 119
Maier V.: (l) 190
Maixner J.: (l) 30
Májek P.: (l) 437
Makovníková J.: (ref) 682
Marková M.: (ref) 324
Marounek M.: (l) 591
Martinec J.: (ref) 231
Mátel Ľ.: (l) 726
Matisová E.: (ref) 789
Matuchová M.: (l) 30
Mazanec K.: (l) 175
Melzoch K.: (l) 492
Mestek O.: (l) 718
Mikuška P.: (ref) 13
Mokrý M: (l) 653
Moos J.: (l) 952
Moravcová J.: (b) 63, (ref) 802
Mosinger J.: (ref) 211
Mosnáček J.: (ref) 421
Motyka K.: (ref) 13

Nesměrák K.: (b) 560
Nezbedová Š.: (ref) 890
Nič M.: (úv) 297
Novák F.: (l) 236
Novál L.: (ch.p.) 55
Novotná P.: (l) 496
Novotná Z.: (ref) 231
Novotný M.: (l) 132

Oktavec D.: (l) 437
Opekar F.: (l) 132
Opletal L.: (s) 754
Orsák M.: (ref) 474
Otyepka M.: (b) 550

Pacák J.: (b) 749
Paldus J.: (os.zp.) 763
Paleta O.: (b) 74, 75, 542
Pálffy A.: (ch.p.) 743, (úv) 1
Panáček A.: (v.ch.) 606
Patočka J.: (b) 268, (ref) 782
Pavelek M.: (ch.p.) 737
Pavlát P.: (ref) 585
Pavlíková D.: (l) 502
Peč P.: (ref) 455
Petr J.: (l) 190
Petrášková A.: (úv) 153
Petřek J.: (l) 496
Petřivalský M.: (ref) 455
Piterková J.: (ref) 455
Pitter P.: (d) 260, 528
Plzák Z.: (b) 65
Podešva J.: (úv) 401
Pokorný A. G.: (rec) 563, (os.zp.) 90
Pokorný J.: (os.zp.) 289
Polák J.: (l) 718
Polák R.: (os.zp.) 763
Polonský J.: (ref) 222
Potáček M.: (os.zp.) 90
Preisler J.: (l) 962
Přikryl R.: (l) 246
Prokopová I.: (l) 817, (os.zp.) 291

Rádl S.: (b) 557
Rauch P.: (ref) 467
Rebroš M.: (ref) 402
Roda J.: (os.zp.) 291
Rosenberg M.: (ref) 402
Roth Z.: (ref) 675
Rudolfová J.: (ref) 168
Rúriková D.: (l) 731

Řezáčová V.: (ref) 640
Řezáčová-Smetková V.: (l) 594

Sabo J.: (l) 653
Sádecká J.: (ref) 222
Sališová M.: (b) 548
Schmeiser H. H.: (ref) 782
Sirotek K.: (l) 591
Skalníková H.: (l) 952
Sodomka L.: (b) 68
Stárka L.: (rec) 564
Stibor I.: (úv) 97
Stiborová M.: (os.zp.) 90, (ref) 782
Stloukal R.: (ref) 402
Stratil P.: (ref) 3
Svoboda P.: (ch.p.) 443
Synek M.: (l) 653
Synytsya A.: (l) 591, 821, (úv) 621
Száková J.: (l) 502

Šáchová M.: (s) 756
Šalplachta J.: (l) 967
Šebela M.: (ref) 896
Šebestík J.: (s) 753
Ševčík J.: (l) 190
Šimánek V.: (b) 77, (s) 755, (úv) 209
Šípek M.: (l) 345
Šmidrkal J.: (l) 492
Šmigáň P.: (ref) 633
Štíbr B.: (b) 272
Štosová T.: (ref) 896
Šurín S.: (ref) 633

Tesařík B.: (b) 285, 552
Tesařová E.: (l) 190
Tichý M.: (b) 85, (ref) 675
Tlustoš P.: (l) 502
Tománková K.: (ref) 455
Trilčová A.: (l) 821
Tříska J.: (l) 179
Trnka O.: (l) 330
Trnková E.: (l) 657
Tsaparlis G.: (b) 81
Tutsch J.: (l) 186

Uher M.: (ref) 802

Valentová O.: (ref) 231
Valter B.: (z) 81
Vařilová T.: (ref) 570
Vavruch I.: (b) 554
Vejdová M.: (l) 657
Ventura K.: (s) 73
Verner P.: (ref) 937
Veselá L.: (ref) 711
Veselý V.: (l) 330
Víden I.: (l) 339
Vinšová J.: (b) 750, (ref) 21
Víteček J.: (l) 496
Vlková L.: (ref) 125
Vodrážka S.: (l) 339
Volf R.: (l) 186
Vrábel V.: (l) 437
Vymětal J.: (os.zp.) 763

Wagnerová D. M.: (ref) 211
Waisser K.: (rec) 757
Weiser J.: (ref) 890
Witt M.: (ref) 943
Worth A. P.: (ref) 675

Zábranský M.: (rec) 86
Zahradníčková H.: (ref) 703
Zahradník R.: (d) 746
Zámostný P.: (ch.p.) 443, (l) 137
Zdráhal Z.: (l) 962
Zeller W.: (b) 63
Zikánová A.: (l) 246
Zýka J.: (b) 758

Žáková L.: (ref) 772
Žemberyová M.: (l) 34, (ref) 578
Žuffa J.: (ref) 682

ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÁ

vydává

CHEMICKÉ LISTY

CHLSAC *99*, 453 –975 (2005)

Vedoucí redaktor — *Editor*

B. KRATOCHVÍL

Redakční kruh — *Editorial Board*

J. BAREK, Z. BĚLOHLAV, P. DRAŠAR, J. HETFLEJŠ, P. HOLÝ, J. HORÁK, P. CHUCHVALEC, J. PODEŠVA, P. RAUCH, J. VOLKE

Zahraniční a oblastní redaktoři — *Foreign and Regional Editors*

F. ŠVEC (USA), V. VĚTVIČKA (USA), L. OPLETAL (HRADEC KRÁLOVÉ)

Redakční rada — *Advisory Board*

E. BORSIG, M. ČERNÁ, L. ČERVENÝ, E. DIBUSZOVÁ, J. HANIKA, Z. HAVLAS, I. KADLECOVÁ, J. KÁŠ, J. KOUBEK, T. MÍŠEK, J. PACÁK, V. PAČES, O. PALETA, V. RŮŽIČKA, I. STIBOR, V. ŠIMÁNEK, R. ZAHRADNÍK

Výkonná redaktorka — *Editorial Assistant*

R. ŘÁPKOVÁ

Ročník 99 (2005) — Volume 99 (2005)

Listy chemické, ročník 129 – Časopis pro průmysl chemický, ročník 115

Str. 453– 975

ISSN 0009-2770