

SPEKTROMETRIA MAS W ANALIZIE BIAŁEK I PEPTYDÓW: ZNACZNIKI JONIZACYJNE

MASS SPECTROMETRY IN ANALYSIS OF PEPTIDES AND PROTEINS: IONIZATION MARKERS

**Remigiusz Bąchor, Monika Biernat, Marek
Cebrat, Monika Kijewska, Alicja Kluczyk*,
Mariola Kuczer, Aneta Paluch, Mateusz Waliczek,
Magdalena Wierzbicka, Piotr Stefanowicz,
Zbigniew Szewczuk**

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: alicja.kluczyk@chem.uni.wroc.pl

Pracę dedykujemy pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Spektrometria mas w badaniu białek i peptydów
2. Znaczniki izotopowe w proteomice ilościowej
3. Modyfikacje potranslacyjne; 3.1. Fosforylacja; 3.2. Glikacja i glikozylacja
4. Syntetyczne znaczniki jonizacyjne; 4.1 Czwartorzędowe sole amoniowe; 4.2. Sole azoniaspiranowe; 4.3. Sole pirydyniowe
5. Zastosowanie znaczników jonizacyjnych w analizie bibliotek kombinatorycznych
6. Znaczniki jonizacyjne w badaniu markerów chorobowych

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Zespół Chemii i Stereochemii Peptydów i Białek Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego skupia chemików, zajmujących się projektowaniem i syntezą biologicznie aktywnych peptydów i ich pochodnych organicznych, poszukiwaniem nowych metod syntezy peptydomimetyków i koniugatów peptydowych oraz wykorzystaniem spektrometrii mas do badania struktury biopolimerów.

Badania naukowe Kierownika Zespołu, **prof. dr hab. Zbigniewa Szewczuka** oraz **dr hab. Piotra Stefanowicza**, prof. UWr. koncentrują się wokół zastosowań zaawansowanych metod spektrometrii mas do rozwiązywania problemów biochemicznych. **Dr hab. Mariola Kuczer** specjalizuje się w chemii peptydów owadzych, **dr Alicja Kluczyk** zajmuje się syntezą koniugatów peptydowych ze związkami heterocyklicznymi, **dr Monika Kijewska** prowadzi prace nad wykrywaniem zaawansowanych produktów glikacji, **dr Monika Biernat** bada dimeryczne analogi biologicznie aktywnych peptydów, **dr Marek Cebrat** syntezuje koniugaty peptydów z safirynami, **dr Remigiusz Bąchor** analizuje biblioteki kombinatoryczne peptydów, **dr Mateusz Waliczek** opracowuje nowe izobaryczne znaczniki jonizacyjne do analizy peptydów, **mgr Magdalena Wierzbicka** pracuje nad otrzymywaniem peptydów o złożonych strukturach drugorzędowych, **mgr Aneta Paluch** studiuje zateżanie modyfikowanych potranslacyjnie peptydów na nośniku stałym.

ABSTRACT

High sensitivity, accuracy, and ability to provide structural information makes mass spectrometry (MS) the method of choice for both qualitative and quantitative analysis in proteome research. Peptide sequencing by tandem mass spectrometry (MS/MS) was successfully applied to discover new peptide sequences and modifications. Insufficient ionization of some peptides is one of the main limitations of MS-based peptide identification. The development of sensitive detection techniques for the efficient analysis of such samples is very important. Differences in ionizability cause difficulties in quantification studies, which could be overcome by derivatization of peptides to improve both the detectability and the selectivity of an analysis. Incorporation of ionization markers and isotopic labels (particularly the isobaric tags) is often used for this reason. Isobaric labeling reagents (including commercially available iTRAQ, TMT, DiLeu and DiART) have found a wide application in quantitative proteomics.

Mass spectrometry is a very good tool for the determination of posttranslational modifications (PTMs), but the modified proteins are usually present in low concentrations. The development of ionization tags specific to a particular PTM and suitable for sensitive analysis of the modified proteins is required. For the analysis of phosphorylated peptides, a combination of β -elimination and the reaction of resulting α,β -dehydroamino acid residues with the nucleophilic thiol group could be used to detect a labile PTM. Such reaction may be used to introduce derivatizing reagents at the original site of phosphorylation, to enhance ionization in MS analysis. Glycation and glycosylation of proteins are other very important PTMs associated with many natural processes as well as diseases. We have designed and synthesized bifunctional quaternary ammonium salt derivatives of phenylboronic acids for selective detection of carbohydrates and peptide-derived Amadori products by ESI-MS.

The attachment of a fixed charge (e.g. in a form of a quaternary ammonium salt) to the amino groups in peptides leads to the enhancement of a precursor ion signal in mass spectra. We have developed several new QAS-containing ionization reagents including bicyclic tags with DABCO, ABCO or azoniaspiro groups. It is worth noting that 2,4,6-substituted pyrylium salts react with amino groups in peptides introducing a stable positive charge and improve peptide detection by MS.

The newly developed ionization tags were successfully applied for the analysis of OBOC combinatorial libraries as well as for studying possible biomarkers of pre-eclampsia, a pregnancy disorder.

Keywords: mass spectrometry, posttranslational modifications, ionization markers, phosphorylation, glycation, combinatorial libraries

Słowa kluczowe: spektrometria mas, modyfikacje potranslacyjne, znaczniki jonizacyjne, fosforylacja, glikacja, biblioteki kombinatoryczne

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

| | |
|--------------|---|
| ABCO | – grupa 1-azoniabicyklo[2.2.2]oktyloamoniowa |
| AGE | – zaawansowane produkty glikacji (ang. <i>advanced glycation endproducts</i>) |
| CID | – dysocjacja zderzeniowa (ang. <i>collision induced dissociation</i>) |
| DABCO | – grupa 4-aza-1-azoniabicyklo[2.2.2]oktyloamoniowa |
| DiART, DiLeu | – izotopowe znaczniki <i>N,N</i> -dimetyloleucynowe (ang. <i>Deuterium isobaric Amine-Reactive Tag</i>) |
| ESI, ESI-MS | – jonizacja typu elektrosprej, spektrometria mas z elektrosprejowym źródłem jonów (ang. <i>electrospray ionization</i>) |
| FAB | – bombardowanie szybkimi atomami (ang. <i>fast atom bombardment</i>) |
| HILIC | – chromatografia oddziaływań hydrofilowych (ang. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>) |
| iTRAQ | – znaczniki izobaryczne do względnej i bezwzględnej analizy ilościowej (ang. <i>isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation</i>) |
| LC-MS | – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. <i>liquid chromatography mass spectrometry</i>) |
| MALDI | – jonizacja/desorpcja laserowa wspomagana matrycą (ang. <i>matrix assisted laser desorption and ionization</i>) |
| MRM | – monitorowanie reakcji wielokrotnych, monitorowanie reakcji prekursor/produkt (ang. <i>multiple reaction monitoring</i>) |
| MS/MS | – tandemowa spektrometria mas |
| OBOC | – biblioteki kombinatoryczne typu jedno ziarno jeden związek (ang. <i>one-bead one-compound</i>) |
| ODS | – wypełnienie krzemionkowe modyfikowane grupami oktadecylowymi (ang. <i>octadecylsilane stationary phase</i>) |
| PE | – stan przedrzucawkowy, preeklampsja (ang. <i>preeclampsia</i>) |
| PTMs | – modyfikacje potranslacyjne (ang. <i>posttranslational modifications</i>) |
| QAS | – czwartorzędowe sole amoniowe (ang. <i>quaternary ammonium salts</i>) |
| SRM | – monitorowanie wybranych reakcji (ang. <i>selected reaction monitoring</i>) |
| TEA | – trietyloamina |
| TMT | – izobaryczny znacznik fragmentacyjny (ang. <i>tandem mas tag</i>) |
| TOF | – analizator czasu przelotu (ang. <i>time of flight</i>) |

WPROWADZENIE

Spektrometria mas jest jedną z podstawowych metod badania białek. Dostarcza nie tylko informacji o ich budowie, ale pozwala na analizę oddziaływań międzybiałkowych oraz monitorowanie stężeń białek w różnych stanach fizjologicznych. Prace prowadzone od wielu lat w Zespole Chemii i Stereochemii Peptydów i Białek Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego koncentrują się na problemach zwiększania czułości pomiarów poprzez chemiczną modyfikację analizowanych związków. Projekty badawcze dotyczą poszukiwania metod selektywnej detekcji modyfikacji potranslacyjnych w białkach, projektowania i syntezy znaczników jonizacyjnych i opracowania nowych metod znakowania analitów do oznaczeń ilościowych metodą rozcieńczenia izotopowego za pomocą tandemowej spektrometrii mas. Uzyskane wyniki, prezentowane w poniższym opracowaniu, stanowią przegląd nowoczesnych zastosowań spektrometrii mas w analizie peptydów i białek.

1. SPEKTROMETRIA MAS W BADANIU BIAŁEK I PEPTYDÓW

Spektrometria mas jeszcze do końca lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia była wykorzystywana głównie do badania mało polarnych, lotnych substancji, których masy cząsteczkowe nie przekraczały 2000 Da. Pierwszą metodą jonizacji, która pozwoliła na uzyskanie widm mas białek i polipeptydów, była technika FAB (ang. *fast atom bombardment*). Zastosowanie tej metody pozwalało na pomiary mas cząsteczkowych peptydów i niewielkich białek, jednak czułość detekcji była niezadowalająca, a zakres pomiarowy ograniczony [1].

Rutynowe zastosowanie spektrometrii mas do analizy białek stało się powszechne dopiero w latach osiemdziesiątych XX wieku, po wprowadzeniu miękkich metod jonizacji ESI i MALDI. Opracowanie efektywnych technik jonizacji białek zostało uhonorowane Nagrodą Nobla, którą w roku 2002 otrzymali John Fenn i Koishi Tanaka [2].

Bezpośrednia analiza białek techniką spektrometrii mas jest obecnie powszechnie wykorzystywana w badaniach biochemicznych i biotechnologicznych [3] (zgodne z oczekiwaniami widmo ESI-MS pozwala na potwierdzenie tożsamości białka i określenie stopnia jego czystości), jak również w kontroli jakości białkowych preparatów farmaceutycznych, takich jak przeciwciała [4]. Obecnie, pomimo dużych postępów, jakie dokonały się w spektrometrii mas białek, uzyskanie dobrych widm mas tych substancji napotyka trudności. Częstym problemem jest mikroheterogeniczność próbki, wynikająca z częściowej hydrolizy białek przez egzopeptydazy, a także obecność soli nieorganicznych, tworzących addukty z badanymi białkami, co zmniejsza czułość ich detekcji. Uzyskanie danych dotyczących sekwencji białka możliwe jest dwiema metodami – przez bezpośrednią fragmentację w fazie gazowej (*top down*) i z wykorzystaniem hydrolizy enzymatycznej połączonej z analizą uzyskanych fragmentów techniką LC-MS (*bottom up*) [5]. Ze względu na trudno-

ści związane z fragmentacją białek w fazie gazowej, obecnie dominuje podejście *bottom up*.

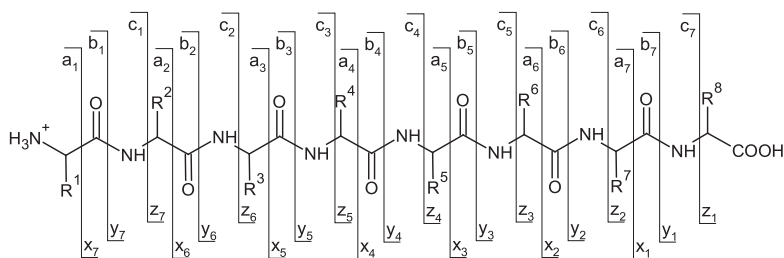
Ponieważ metoda ta jest obecnie powszechnie stosowana w proteomice, wykrywanie i oznaczanie peptydów techniką LC-MS stało się bardzo istotne w badaniach biochemicznych i klinicznych zarówno w odniesieniu do produktów proteolizy białek, jak i w analizie peptydów endogennych. Wiele naturalnych peptydów wykazuje aktywność biologiczną (neuropeptydy, hormony peptydowe) [6], tak więc ich wykrywanie i oznaczanie ma rosnące znaczenie w naukach przyrodniczych [7]. Zastosowanie techniki LC-MS pozwala analizować próbki o bardzo dużej złożoności i wykrywać peptydy w ilościach nano- a nawet attomolowych [8].

Pomimo bardzo szybkiego rozwoju spektrometrii mas, nadal istotny problem stanowi niewystarczająca czułość metody w analizie śladowych ilości substancji, spowodowana niską wydajnością jonizacji analitów peptydowych. W eksperymencie ESI-MS poziom jonizacji peptydów zależy od właściwości kwasowo-zasadowych tworzących je reszt aminokwasowych. Jony powstają głównie w wyniku protonowania lub deprotonowania odpowiednich grup funkcyjnych, a ich źródłem są przede wszystkim *N*-końcowa grupa aminowa peptydu oraz grupy aminowe łańcuchów bocznych aminokwasów, a w przypadku deprotonacji – grupy karboksylowe. Wyjątkowo podatne na protonację są peptydy zawierające reszty lizyny (pKa 10) lub argininy (pKa 12), a sygnały odpowiadające takim peptydom na widmie MS są wielokrotnie wyższe od pochodzących od peptydów niezasadowych. Ponadto, porównując intensywność sygnałów pochodzących od peptydów zawierających resztę argininy lub lizyny, można zaobserwować ponad 10-krotnie wyższą intensywność tych pierwszych [9]. Obecność argininy powoduje supresję pozostałych jonów, co sprawia, że sygnały pochodzące od innych peptydów są trudne do identyfikacji. Na intensywność otrzymywanych sygnałów ma również wpływ długość oraz struktura drugorzędowa peptydów [10], a także ich hydrofobowość, która determinuje zdolność cząsteczki do przemieszczania się na powierzchnię tworzącej się kropli w procesie jonizacji ESI [11].

Chociaż masy cząsteczkowe peptydów powstających w wyniku hydrolizy enzymatycznej białka mogą być wykorzystane do jego identyfikacji, w bardziej skomplikowanych przypadkach należy uwzględnić fragmentację peptydów. Eksperyment prowadzony techniką MS/MS polega na wyodrębnieniu jonu prekursorowego peptydu za pomocą kwadrupolowego filtra mas. W wyniku zderzenia z atomami gazu obojętnego jon ulega aktywacji prowadzącej do otrzymania produktów fragmentacji (jonów potomnych). Analiza uzyskanych fragmentów umożliwia określenie sekwencji badanego peptydu.

Fragmentacja peptydów prowadzi do powstania kilku charakterystycznych serii jonów [12], których nazewnictwo przedstawiono na Rysunku 1. Która z tych serii okaże się dominująca, zależy nie tylko od sekwencji peptydu, ale także od zastosowanej metody fragmentacji. Najczęściej wykorzystuje się metodę CID (ang. *collision induced dissociation*), w której – po nadaniu jonowi energii kinetycznej –

poddawany jest on kolizji z obojętnym gazem (zwykle z argonem) [13]. Powoduje to wzrost energii oscylacyjnej zjonizowanego peptydu, a w konsekwencji rozpad na jony potomne. Zastosowanie umiarkowanych energii kolizji (kilkadziesiąt eV) prowadzi do utworzenia głównie serii jonów *b* i *y* (Rys. 1). Zwiększenie energii kolizji do kilku tysięcy elektronowoltów sprawia, że na widmie pojawia się więcej serii jonów (dodatkowo *a*, *c*, *z* oraz *x*). Odmiennie przebiega fragmentacja jonów peptydów z wykorzystaniem aktywacji elektronami. Metoda ta może być stosowana wyłącznie do jonów o ładunku większym niż 1+. Oddziaływanie wielokrotnie naładowanego peptydu bezpośrednio z niskoenergetycznymi elektronami (energia kilku eV) lub z cząsteczkami, które są przenośnikami elektronów, prowadzi do aktywacji peptydu i rozpadu na jony potomne. W metodzie tej powstają głównie jony typu *c* oraz nieparzystoelektronowe jony (*z*+1), o strukturze podobnej do jonów *z* [14].



Rysunek 1. Nomenklatura jonów powstających w wyniku fragmentacji peptydów (na podstawie [15, 16])
Figure 1. Nomenclature of peptide fragment ions (according to [15, 16])

Interpretacja widm fragmentacyjnych peptydów o wysokich masach cząsteczkowych napotyka trudności, gdyż w widmach tych występują różne typy jonów fragmentacyjnych. Przebieg fragmentacji peptydu można jednak znacząco zmienić stosując odpowiednią modyfikację chemiczną (np. umieszczenie grupy funkcyjnej o trwałym, dodatnim lub ujemnym ładunku na C- lub N-końcu peptydu). Taka modyfikacja pozwala na uzyskanie widm, w których przeważa seria jonów *y* lub *b*, co bardzo upraszcza przeprowadzenie analizy sekwencji.

Zarówno białka, jak i peptydy odgrywają kluczową rolę w różnych procesach biologicznych, a większość dotychczas zidentyfikowanych biomarkerów procesu chorobowego to białka lub ich fragmenty, które fizjologicznie występują w surowicy w wysokich stężeniach, jak na przykład fibrynogen i fibrynopeptydy, hemoglobina, amyloid A czy apolipoproteina A. Ich analiza może ułatwić wczesną diagnostykę stanów chorobowych, pomóc w monitorowaniu procesu leczenia lub zapobieganiu chorobom [17, 18].

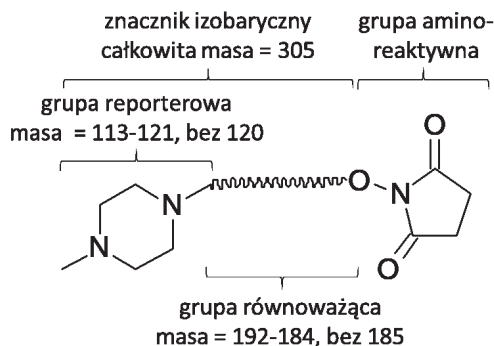
2. ZNACZNIKI IZOTOPOWE W PROTEOMICE ILOŚCIOWEJ

Pomimo znacznej czułości pomiarów metodą spektrometrii mas, wciąż występują problemy z wykryciem i ilościowym oznaczeniem białek, zwłaszcza przy niskich stężeniach. Jedną z możliwych metod rozwiązania tego problemu jest chemiczna modyfikacja peptydów ukierunkowana na zwiększenie intensywności sygnału MS tych związków [19]. Podobne problemy pojawiają się przy analizie ilościowej białek. Jednym z podstawowych zagadnień w badaniach procesów biochemicznych jest śledzenie zmian stężenia poszczególnych białek w danym układzie biologicznym pod wpływem określonych czynników. Porównanie stężeń białek w stanie fizjologicznym i patologicznym pozwala na identyfikację białek bezpośrednio związanych z rozwojem danej choroby, co z kolei może wskazać nowe kierunki poszukiwania molekularnego podłoża chorób i doprowadzić do uzyskania nowych leków i terapii.

Zastosowanie spektrometrii mas do analizy ilościowej białek jest możliwe dzięki temu, iż intensywność sygnału na widmie MS jest proporcjonalna do ilości danej substancji w próbce. Badania ilościowe utrudnia jednak fakt, że intensywność sygnałów zależy także od innych czynników, na przykład od efektywności jonizacji lub składu badanej mieszaniny i oddziaływania jej składników. Najskuteczniejszym sposobem na ograniczenie negatywnego wpływu tych czynników na wyniki analizy ilościowej jest zastosowanie wzorców wewnętrznych, a jedną z możliwych strategii jest znakowanie próbki trwałymi izotopami (ang. *stable isotope labeling*), takimi jak ^2H , ^{13}C , ^{15}N lub ^{18}O . Cząsteczki o zmienionym składzie izotopowym doskonale nadają się do roli wzorca wewnętrznego, gdyż z jednej strony mają praktycznie identyczne właściwości fizykochemiczne (w tym parametry rozdziału chromatograficznego i efektywność jonizacji), a z drugiej strony, ze względu na różnice mas analitu i wzorca wewnętrznego, są one łatwe do rozróżnienia przez spektrometr mas [20].

Niektóre strategie analizy ilościowej wykorzystujące znakowanie trwałymi izotopami, przewidują takie zaprojektowanie znaczników, by różnica ich mas ujawniała się dopiero po procesie fragmentacji, czyli na widmie MS/MS. Na takim założeniu opiera się między innymi strategia iTRAQ (ang. *isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*) [21]. Tego typu reagenty składają się z dwóch zasadniczych elementów: grupy reporterowej (ang. *reporter group*) i grupy równoważącej (ang. *balance group*), połączonych wiązaniem, które łatwo ulega rozpadowi w spektrometrze mas. Znacznik występuje w kilku wariantach różniących się składem izotopowym grupy reporterowej i równoważącej, przy czym sumaryczna nominalna masa całego znacznika jest w każdym przypadku praktycznie taka sama, co oznacza, że związek znakowany tymi znacznikami daje zazwyczaj pojedynczy sygnał na widmie masowym. W wyniku fragmentacji, powstają różniące się masą cząsteczkową jony reporterowe, których stosunek intensywności pozwala na określenie różnic ilościowych między próbkami znakowanymi różnymi wariantami znacznika. Obecna wersja znaczników iTRAQ obejmuje zestaw 8 izobarycznych wariantów (m/z dla jonów reporterowych wynosi 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 i 121), a więc pozwala na równoczesne porównanie nawet ośmiu różnych próbek (Rys. 2). Znaczniki te

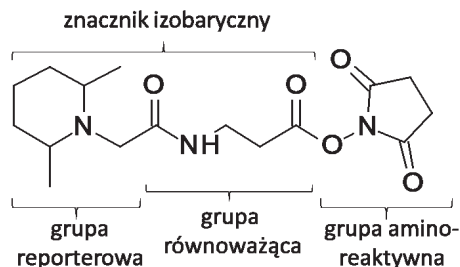
dostępne są w postaci estrów *N*-hydroksysukcynimidowych, które efektywnie reagują z pierwszorzędowymi grupami aminowymi peptydów i białek.



Rysunek 2. Struktura znaczników iTRAQ (wersja oktapleks). Dzięki wykorzystaniu różnych izotopów węgla, azotu i tlenu, wszystkie warianty znacznika mają tę samą masę całkowitą (305), ale różne masy grupy reporterowej i równoważcej

Figure 2. Structure of iTRAQ reagents (octaplex version). The molecular weight of the whole marker is the same (305), but the reporter and balance groups differ in mass due to the presence of different isotopes of carbon, nitrogen and oxygen

Na podobnej zasadzie zbudowane są znaczniki TMT (ang. *tandem mass tag*) [22], które w obecnej wersji pozwalają na równoczesne badanie do 10 różnych próbek [23]. Podobnie jak znaczniki iTRAQ, TMT reagują z pierwszorzędowymi grupami aminowymi, co pozwala na efektywne znakowanie peptydów powstałych w wyniku enzymatycznej hydrolizy białek (Rys. 3).

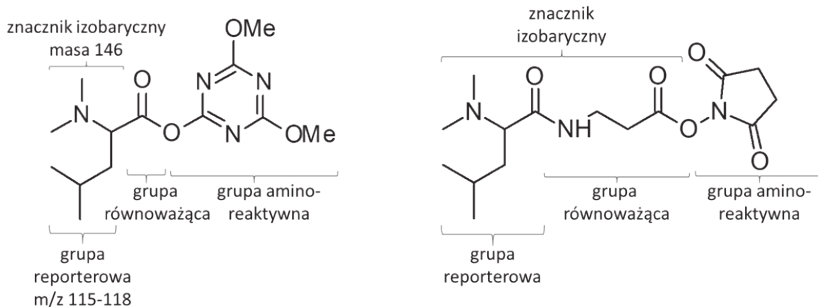


Rysunek 3. Struktura znaczników TMT

Figure 3. Structure of the TMT reagents

Inny znacznik izobaryczny, DiLeu, jest pochodną leucyny podwójnie metylowanej na grupie α -aminowej [24]. Jony reporterowe, powstające w wyniku fragmentacji tego znacznika, w trakcie pomiarów MS/MS mają strukturę jonów immonioowych i posiadają masy nominalne 115, 116, 117 i 118. Przy zastosowaniu wysokorozdzielczego spektrometru mas, możliwe jest rozróżnienie jonów izobarycznych o tych samych masach nominalnych, co w przypadku znacznika DiLeu pozwala uzyskać do 12 różnych jonów reporterowych [25]. Podobnie jak iTRAQ

i TMT, znaczniki DiLeu reagują z grupami aminowymi, przy czym grupą aktywną w tym przypadku jest ester dimetoksytriazynowy (Rys. 4).



Rysunek 4. Struktura znaczników DiLeu i DiART
Figure 4. Structure of the DiLeu and DiART reagents

Znaczniki iTRAQ, TMT i DiLeu wykorzystują ciężkie izotopy węgla, azotu i tlenu (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O), aby zapobiec separacji chromatograficznej izotopomerów, zdarzającej się, gdy w miejsce protonu podstawiony zostanie deuter. Ten niekorzystny efekt podstawienia deuterem można jednak zminimalizować ograniczając liczbę wprowadzanych atomów ^2H oraz umieszczając je w obrębie grup hydrofiliowych. Na podstawie tej obserwacji, Zhang i in. opracował znakowane deuterem (a przez to tańsze) znaczniki DiART (ang. *Deuterium isobaric Amine-Reactive Tag*) [26]. Znacznik ten stosowany jest w postaci estru *N*-hydroksysukcynimidowego. W wyniku fragmentacji MS/MS, uzyskuje się jony reporterowe o masach 114–119, co pozwala na równoczesną analizę 6 próbek.

Dużą zaletą metod wykorzystujących opisane wyżej znaczniki izobaryczne jest to, że znakowanie nie ma wpływu na pozostałe fragmenty cząsteczki, co pozwala na wykorzystanie tego samego widma MS/MS i do identyfikacji, i do ilościowej analizy peptydu. Interpretacja wyników ilościowych jest bardzo prosta, gdyż polega na bezpośrednim porównaniu intensywności sygnałów dla jonów reporterowych uzyskanych dla danej cząsteczki. Metody te nie są jednak pozbawione wad. Ponieważ analiza ilościowa opiera się na śledzeniu jonów reporterowych, powstających w wyniku fragmentacji MS/MS, metody te są dużo wolniejsze od opartych o zwykły pomiar MS, a ponadto wymagają spektrometrów zdolnych do rejestracji widm MS/MS z bardzo wysoką częstotliwością. Niskie masy uzyskiwanych jonów reporterowych, w porównaniu z masą całego peptydu, utrudniają wykorzystanie do tego typu pomiarów powszechnie używanych spektrometrów z pułapką jonową.

3. MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE

Modyfikacje potranslacyjne (PTMs) są to modyfikacje chemiczne, którym ulegają białka po procesie translacji. Polegają na kowalencyjnym przyłączeniu określonych grup funkcyjnych do łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych budujących białka, zmieniając ich właściwości fizykochemiczne, stabilność oraz aktywność biologiczną. PTMs wpływają zatem na funkcje białek, przez co pełnią ważną rolę w wielu procesach biologicznych [27]. W ostatnich latach PTMs cieszą się dużym zainteresowaniem wśród biologów i biochemików [28], a do najczęściej badanych modyfikacji należą fosforylacja, glikozylacja, glikacja, acylacja, amidacja, hydroliza i utlenianie [29].

Spektrometria mas jest obecnie główną metodą analityczną stosowaną do identyfikacji i detekcji PTMs, ponieważ wprowadzenie nowej grupy funkcyjnej powoduje zmianę masy cząsteczkowej białka, co można zaobserwować na widmie masowym [30]. Niestety, metoda ta, pomimo wielu zalet, posiada również pewne ograniczenia podczas identyfikacji PTMs. Wynikają one głównie z niewielkiej ilości, w jakiej PTMs występują w próbkach biologicznych, w porównaniu z białkami niemodyfikowanymi, co może powodować efekt supresji w analizie MS. Dlatego też wciąż poszukiwane są nowe metody ich wzbogacenia i analizy.

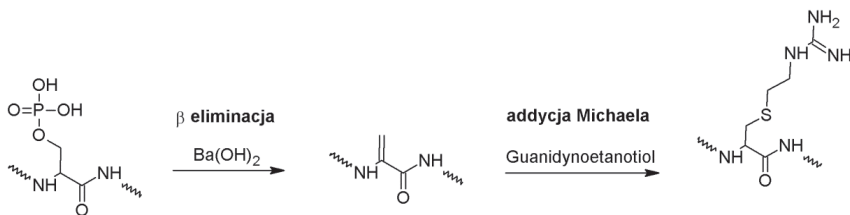
3.1. FOSFORYLACJA

Fosforylacja polega na przyłączeniu grupy γ -fosforanowej z cząsteczki ATP do łańcucha bocznego odpowiedniej reszty aminokwasowej, najczęściej seryny, treoniny lub tyrozyny. Reakcja jest katalizowana enzymatycznie za pomocą kinaz białkowych. Odłączenie grupy fosforanowej zachodzi na drodze reakcji hydrolizy (defosforylacji), w wyniku działania enzymów zwanych fosfatazami.

Fosforylacja należy do jednej z najważniejszych modyfikacji potranslacyjnych, jednak identyfikacja miejsca fosforylacji jest utrudniona, ze względu na śladowe ilości fosforylowanych białek w próbkach biologicznych, niestabilność grupy fosforanowej w warunkach pomiaru MS oraz tłumienie jonizacji w trybie jonów dodatnich, spowodowane obecnością anionowej grupy fosforanowej, co powoduje zmniejszenie intensywności sygnałów na widmach masowych [31].

Do identyfikacji fosforylowanych peptydów i białek stosuje się modyfikację chemiczną, polegającą na reakcji β -eliminacji grupy fosforanowej w środowisku silnie zasadowym. W wyniku tej reakcji, powstaje α,β -dehydroaminokwas, który następnie może ulegać addycji Michaela ze związkami zawierającymi grupę tiolową oraz znacznik umożliwiający zwiększenie wydajności jonizacji w analizie MS. Taką metodę zastosowali między innymi Ahn i in. [32]. Identyfikacji miejsca fosforylacji dokonali przeprowadzając reakcję β -eliminacji z jednoczesną derywatyzacją za pomocą guanidynoetanotolu (Rys. 5). Otrzymane związki poddano analizie

MALDI-TOF MS. Na uzyskanych widmach masowych zaobserwowano znacznie intensywniejsze sygnały dla tak zmodyfikowanych peptydów.



Rysunek 5. Reakcja β -eliminacji grupy fosforanowej i addycja guanidynoetanotiolu do układu nienasyconego reszty α,β -dehydroaminokwasu [32]

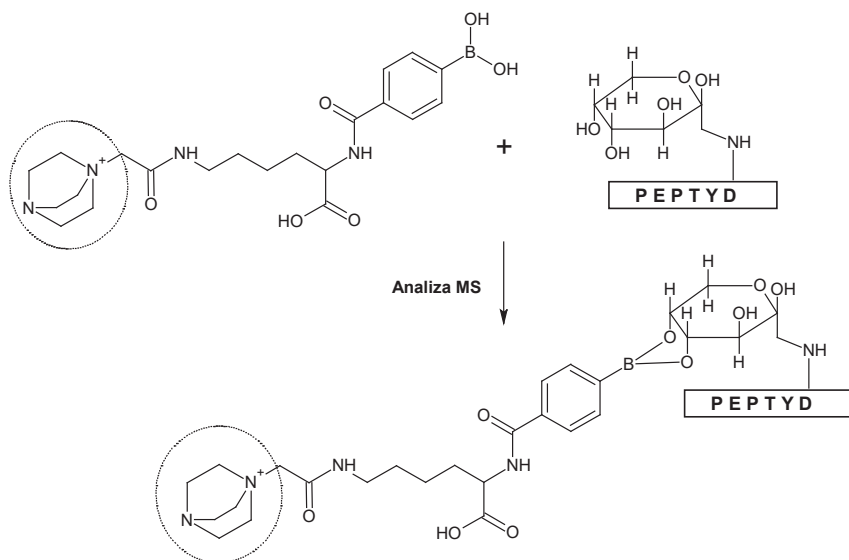
Figure 5. Phosphate group β -elimination and addition of guanidinoethanethiol to the resulting α,β -dehydro amino acid residue [32]

3.2. GLIKACJA I GLIKOZYLACJA

Glikozylacja jest jedną z najczęstszych modyfikacji potranslacyjnych, której ulega znaczna część białek powierzchniowych i wydzielniczych komórki [33]. Skład glikanów zależy od aktywności enzymów (glikozylotransferaz i glikozydaz) odpowiedzialnych za syntezę oligosacharydów oraz od stanu fizjologicznego komórek, a także działania czynników zewnętrznych. Glikozylacji podlegają kluczowe białka komórek układu odpornościowego. Na istotne znaczenie tego procesu w układzie odpornościowym wskazują wyniki licznych badań zmian glikozylacji w różnych stanach patologicznych układu immunologicznego [34]. Analiza glikozylowanych peptydów za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas, sprzężonej z chromatografią ciekłą (LC-MS), jest utrudniona ze względu na niewystarczającą jonizację tych peptydów oraz niestabilność reszt cukrowych w warunkach pomiarów fragmentacyjnych (MS/MS). Niezwykle użyteczne w analizie sacharydów/oligosacharydów za pomocą MS okazały się pochodne hydrazyny [35]. Dostępny handlowo odczynnik Girarda T, jest rutynowo wykorzystywany jako odczynnik derywatyzujący do analizy małych oligosacharydów metodą MALDI-MS [36]. Bereman i in. [37] opracowali nowy hydrazyd kationowy zwiększający hydrofobowość, a tym samym ułatwiający jonizację glikanów w warunkach analizy ESI-MS. Jednakże odczynniki hydrazydowe mogą reagować tylko z glikanami zawierającym cukier redukujący na końcu łańcucha, co utrudnia bezpośrednią analizę wszystkich glikozylowanych peptydów występujących w mieszaninie, nie można więc uznać tej metody za uniwersalną.

Przykładem modyfikacji potranslacyjnej, zachodzącej bez udziału enzymów, jest reakcja glikacji. Glikacja jest wieloetapową reakcją polegającą na przyłączeniu cząsteczki cukru redukującego do pierwszorzędowej grupy aminowej biomolekuł (białek, peptydów) [38]. Spośród białek podlegających nieenzymatycznej glikacji duże znaczenie w przypadku cukrzycy odgrywają białka krwi – hemoglobina, albu-

mina oraz białka o długim okresie życia – kolagen i krystalina. Analityczne oznaczenie glikowanych białek (szczególnie albuminy i hemoglobiny) jest wykorzystywane w diagnostyce hiperglikemii do monitorowania postępów leczenia cukrzycy, gdyż może dostarczać informacji na temat wyrównania metabolizmu cukrów [39, 40]. Ponadto, produkty reakcji glikacji mogą być także przyczyną starzenia oraz chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera [41]. Nasze badania skupiały się na peptydowym produkcie przegrupowania Amadoriego (pochodne *N*-(1-amino-1-deoksyfruktozy), gdyż związek ten jest kluczowym produktem pośrednim w tworzeniu zaawansowanych produktów glikacji (AGE). Analiza glikowanych białek osocza krwi jest trudna, ze względu na niskie stężenie glikowanych peptydów, skomplikowaną matrycę oraz niedostateczny stopień jonizacji peptydów. Zaprojektowaliśmy i zsyntetyzowaliśmy więc znacznik, będący pochodną czwartorzędowej soli amoniowej oraz kwasu fenyloboronowego [42], w celu selektywnej detekcji i możliwości wzmocnienia jonizacji glikowanych peptydów (Rys. 6). Otrzymany znacznik w niewielkim stopniu zwiększa jonizację produktu Amadoriego, ale przede wszystkim stabilizuje aminofruktozę w analizie fragmentacyjnej tych związków. Charakterystyczne jony, powstające w wyniku strat neutralnych podczas analizy MS/MS mają znacznie mniejszą intensywność, co zdecydowanie ułatwia sekwencjonowanie i wskazanie miejsca modyfikacji w łańcuchu peptydowym. Dodatkowo znaczniki te zastosowano do detekcji oligosacharydów, które wcześniej można było analizować tylko jako jony ujemne, co w analizie MS bywa kłopotliwe. Wprowadzenie ładunku dodatniego oraz wzmocnienie jonizacji zdecydowanie ułatwiło analizę [43], o czym będzie mowa w kolejnym rozdziale.



Rysunek 6. Zastosowanie bifunkcyjnego reagentu do selektywnego wychwytu peptydowych produktów przegrupowania Amadoriego

Figure 6. The application of bifunctional reagent for selective capture of peptide-linked Amadori products

4. SYNTETYCZNE ZNACZNIKI JONIZACYJNE

4.1. CZWARTORZĘDOWE SOLE AMONIOWE

Jedną z metod zwiększania jonizowalności próbki jest derywatyżacja grup aminowych, podczas której analizowany związek jest przeprowadzany w pochodne czwartorzędowych soli amoniowych (ang. *quaternary ammonium salts*, QAS). Obecność w cząsteczce trwałego ładunku dodatniego powoduje wielokrotny wzrost wydajności jonizacji, a tym samym wzrost czułości analiz wykonywanych metodą ESI-MS.

W pierwszej metodzie syntezy pochodnych QAS, Kidwell i in. zastosowali bezpośrednią reakcję peptydu z jodkiem metylu, podczas której grupę aminową zmodyfikowano do soli trimetyloamoniowej (Rys. 7A). Chociaż obecność stabilnego ładunku dodatniego w badanym peptydzie pozwalała na analizę pikomolowych ilości substancji za pomocą spektrometrii mas, ze względu na niską wydajność reakcji, metoda ta okazała się mało użyteczna [44].

Kolejna metoda syntezy była oparta na reakcji dwuetapowej. W pierwszym kroku, *N*-końcową grupę aminową acetylowano przy użyciu chlorku chloroacetylu, a w kolejnym - atom chloru podstawiano trietyloaminą (Rys. 7B) [45]. Ograniczeniem w obu przypadkach był brak selektywności wobec *N*-końcowej grupy aminowej.

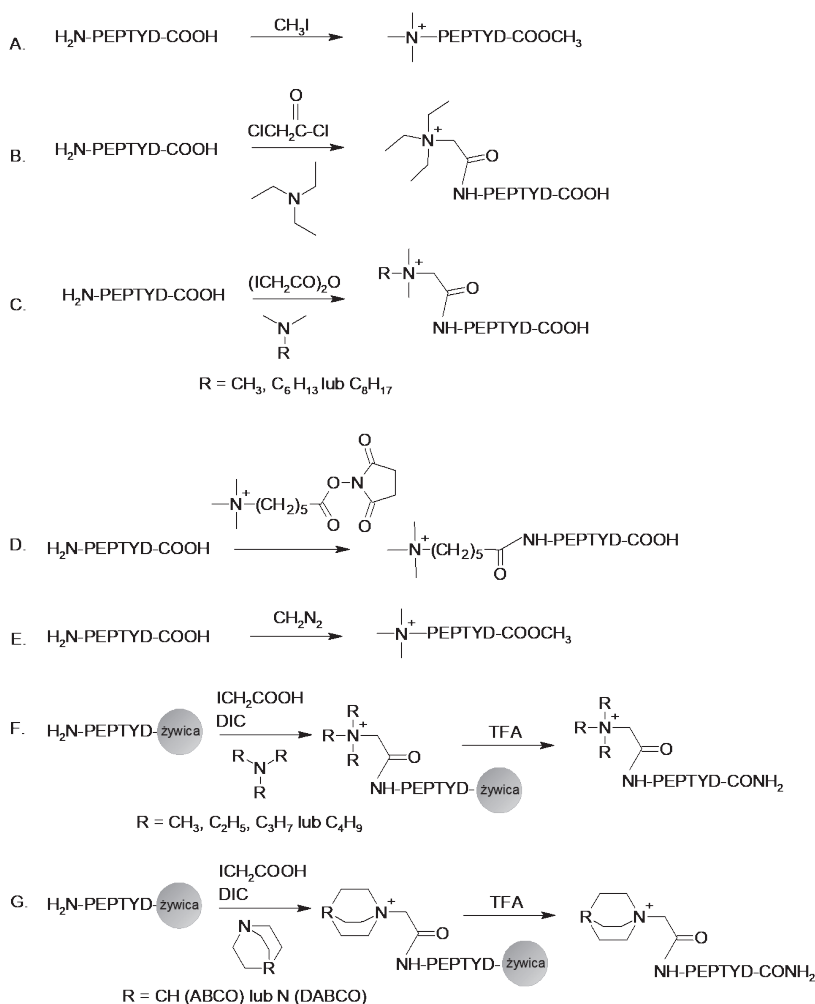
W 1993 r. Stults i in. zaproponowali również procedurę dwuetapową, z użyciem bezwodnika kwasu jodooctowego i amin trzeciorzędowych (Rys. 7C) [46]. W metodzie tej, wykorzystując różnice w wartościach pK_a, można było selektywnie zmodyfikować *N*-końcową grupę α -aminową, w obecności grupy ϵ -aminowej łańcucha bocznego lizyny. Ponadto, wprowadzenie ugrupowania dimetyloheksyloamoniowego lub dimetylooktyloamoniowego do peptydu powodowało ponad trzykrotny wzrost wydajności jonizacji, a także ułatwiło analizę danych uzyskanych z eksperymentu MS/MS.

W 1997 r. Bartlet-Jones i in. opracowali jednoetapową metodę derywatyżacji, polegającą na bezpośrednim przyłączeniu do peptydu pochodnej trimetyloamoniowej estru *N*-hydroksysukcynimidowego (Rys. 7D). Wykorzystując tę procedurę, można było oznaczyć 50 femtomolową ilość peptydu przy użyciu MALDI MS [47].

Zaproponowana modyfikacja grup aminowych z wykorzystaniem pochodnych estrów *N*-hydroksysukcynimidowych znalazła szerokie zastosowanie do modyfikowania peptydów w roztworze, przede wszystkim w badaniach proteomicznych, do oznaczeń ilościowych [48, 49].

Inną procedurę syntezy koniugatów peptydowych czwartorzędowych soli amoniowych opracował Wasslen i in. (Rys. 7E) [50]. Derywatyżację grup aminowych peptydów immobilizowanych na żywicy kationowej przeprowadzono za pomocą eterowego roztworu diazometanu. Zastosowana modyfikacja pozwoliła na uzyskanie *N,N,N*-trimetylowanych pochodnych peptydowych, które zwiększały jonizację

analizowanych peptydów, ułatwiając ich oznaczenie w rozpuszczalnikach aprotycznych. Dodatkowo, ze względu na powstawanie w eksperymentach MS/MS charakterystycznego fragmentu a_2 , zaproponowany sposób derywatywacji ułatwił analizę danych uzyskanych z pomiarów ilościowych w trybie MRM (ang. *multiple reaction monitoring*).



Rysunek 7. Wybrane reakcje otrzymywania pochodnych peptydowych zawierających czwartorzędowe sole amoniowe. N- i C-końcowe grupy funkcyjne zostały wyodrębnione w celu uproszczenia równań reakcji

Figure 7. Selected methods of formation of quaternary ammonium salt derivatives of peptides. The terminal functional groups were presented as separated to simplify the reaction schemes

Opracowaliśmy metodę syntezy na nośniku stałym koniugatów peptydowych zawierających QAS (Rys. 7F i 7G) [51–53] i określiliśmy wpływ wydłużenia łań-

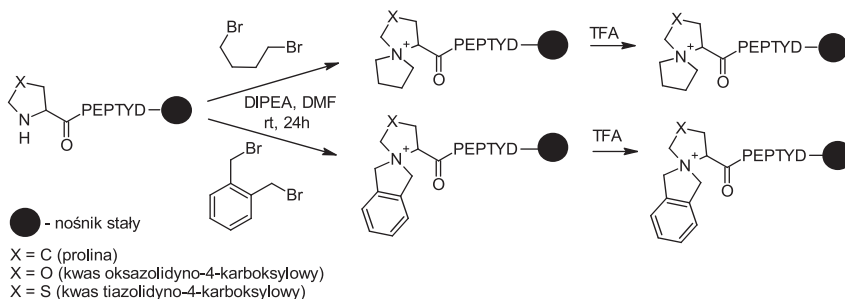
cuchów alkilowych przy czwartorzędowym atomie azotu na wydajność jonizacji [51] oraz mechanizmy fragmentacji otrzymanych cząsteczek [52]. Niestety, w trakcie eksperymentów MS/MS pochodnych peptydowych zawierających alifatyczne czwartorzędowe sole amoniowe zachodziła eliminacja aminy trzeciorzędowej lub eliminacja Hofmanna, prowadząca do powstania alkeny [52].

W kolejnych badaniach do derywatywacji grupy aminowej w peptydach zaproponowaliśmy bicykliczne sole amoniowe: 4-aza-1-azoniabicyklo[2.2.2]oktyloamoniową (DABCO) oraz 1-azoniabicyklo[2.2.2]oktyloamoniową (ABCO) [51, 53]. Wyniki pomiarów MS wykazały, iż bicykliczne czwartorzędowe sole amoniowe nie ulegają rozpadowi podczas eksperymentów MS/MS [53]. Ponadto, przeprowadzone na peptydach modyfikacje pozwoliły na obniżenie granicy ich wykrywalności, co umożliwiło oznaczenia substancji w ilościach femtomolowych.

4.2. SOLE AZONIASPIRANOWE

Układy azoniaspiranowe cechują się połączeniem dwóch cyklicznych układów alkilowych za pomocą czwartorzędowego, dodatnio naładowanego atomu azotu. Zgodnie z badaniami przeprowadzonymi dla znaczników bicyklicznych ABCO, układy te nie ulegają eliminacji Hofmanna [53], a ponadto są odporne na utratę aminy trzeciorzędowej, obserwowaną dla układów ABCO w eksperymentach MS/MS.

W chemii peptydów tego typu układy mogą być syntezowane jako pochodne proliny [54]. Zsyntezowane zostały układy: 5-azoniaspiro[4.4]nonylowy (ASN⁺-CO) i 7,8-benzo-5-azoniaspiro[4.4]nonylowy (BASN⁺-CO) z wykorzystaniem reakcji substytucji nukleofilowej *N*-końcowej reszty proliny z 1,4-dibromobutanem lub dibromoortoksylenem, w aprotycznym rozpuszczalniku organicznym na nośniku stałym (Rys. 8). Podobnie, otrzymano znaczniki: 2-oksa-5-azoniaspiro[4.4]nonylowy (2-oxa-ASN⁺-CO) oraz 2-tia-5-azoniaspiro[4.4]nonylowy (2-thia-ASN⁺-CO) [55], wychodząc od kwasu tiazolidyno-4-karboksylowego (Thz) oraz oksazolidyno-4-karboksylowego (Oxa), pochodnych odpowiednio tia- oraz oksaproliny (Rys. 8).



Rysunek 8. Schemat syntezy znaczników azoniaspiranowych

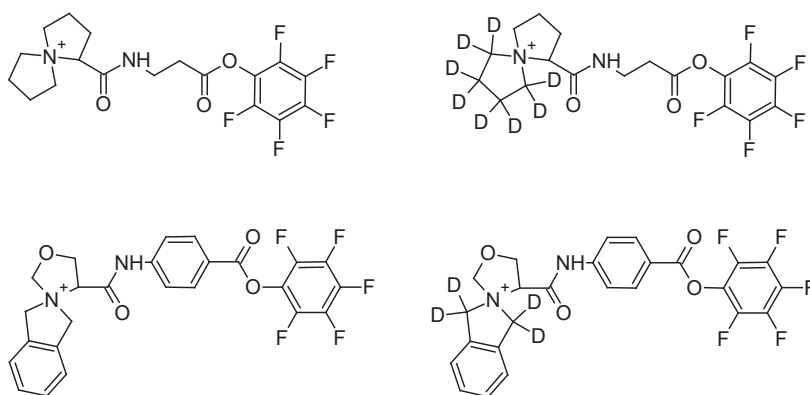
Figure 8. The synthesis of azoniaspiro derivatives

Znaczniki $\text{ASN}^+\text{-CO}$ oraz $\text{BASN}^+\text{-CO}$ zwiększają od 10 do 100-krotnie efektywność jonizacji peptydów. Za pomocą LC-ESI-MRM, dla znakowanych w ten sposób peptydów wyznaczono granicę wykrywalności na poziomie subfemtomolowym, aż do attomolowego [54, 55]. Sole azoniaspiranowe są bardzo stabilne w eksperymentach MS/MS, dzięki czemu mogą być potencjalnie stosowane do identyfikacji i sekwencjonowania *de novo* śladowych ilości peptydów i hydrolizatów białek [56]. Znaczniki 2-oxa- $\text{ASN}^+\text{-CO}$ oraz 2-thia- $\text{ASN}^+\text{-CO}$ umożliwiają również powstanie stabilnych jonów reporterowych w ilościowych eksperymentach SRM (ang. *selected reaction monitoring*) [55].

Znaczniki azoniaspiranowe, podobnie jak inne pochodne betainy [57, 58] łatwo ulegają podstawieniu wodoru-deuteru na atomie $\alpha\text{-C}$ modyfikowanej reszty proliny, w środowisku 1% TEA w D_2O , a wymiana ta jest trwała w środowisku kwasowym, natomiast wymiana zwrotna zachodzi przy użyciu 1% TEA w H_2O [59, 60]. Czyni to z niej więc szybką i tanią metodę otrzymywania deuterowanych izotopologów do celów proteomiki ilościowej, tym bardziej że zaobserwowano koelucję obydwu analogów podczas rozdzielania HPLC na kolumnach HILIC oraz ODS.

Badania nad wymianą wodoru-deuteru pozwoliły zaobserwować po raz pierwszy racemizację modyfikowanej reszty proliny w warunkach wymiany [60]. Obydwa izotopologi soli $\text{BASN}^+\text{-CO-Abu-OEt-BPh}_4$ wykazują odmienne skręcalności optyczne. Mechanizm racemizacji poprzez płaską formę enolanu został zaproponowany na podstawie doniesień Richarda i in. [61].

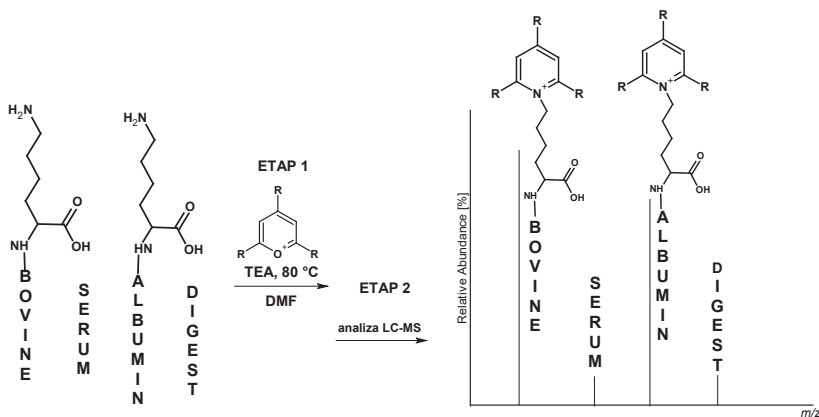
Zalety znaczników azoniaspiranowych, ze względu na wysoką wydajność jonizacyjną, stabilność w eksperymentach MS/MS, łatwość otrzymywania izotopologów i ich koelucję, zostały wykorzystane do stworzenia nowej wersji odczynnika iTRAQ, którego analogi: lekki oraz ciężki, zostały przedstawione na Rysunku 9. Znacznik, w formie pentafluorofenyowego estru aktywnego, można łatwo wprowadzić do grup aminowych i tiolowych peptydów [54, 55].



Rysunek 9. Pary lekkich i ciężkich izotopologów azoniaspiranowych do oznaczeń ilościowych
Figure 9. The pairs of heavy and light azoniaspiro isotopologues for quantitative analysis

4.3. SOLE PIRYDINIOWE

Sole piryliowe są heterocyklicznymi cząsteczkami, podobnymi do pirydyny, i zawierają sześcioczłonowy pierścień aromatyczny, w którym jeden atom węgla jest zastąpiony przez dodatnio naładowany atom tlenu. Pionierami w syntezie soli piryliowych byli Balaban oraz Dimroth, którzy w latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia opublikowali metody syntezy soli piryliowych. Jedna z nich, pozwalająca na syntezę różnych symetrycznych soli piryliowych, polega na kondensacji chlorków acylowych z alkoholem *tert*-butylovym [62]. Dimroth i in. opublikowali metodę pozwalającą na otrzymanie soli 2,4,6-trifenylpiryliowej w oparciu o dwuetapową syntezę. Pierwszy etap polegał na kondensacji aldolowej acetofenonu i benzaldehydu [63]. Otrzymany benzoacetofenon został w kolejnym etapie poddany kondensacji z acetofenonem, z użyciem kwasu trifluorometanosulfonowego. Na szczególną uwagę zasługuje reakcja soli piryliowych z aminami. Produktem reakcji tych związków z I-rzędowymi aminami są sole pirydiniowe. 2,4,6-Trójpodstawione sole piryliowe reagują z I-rzędowymi grupami aminowymi aminokwasów, szczególnie z grupami niezatłoczonymi sterycznie, np. grupą α -aminową glicyny lub ϵ -aminową lizyny. Prowadzone przez nas badania wykazały, że reakcja ta jest szczególnie selektywna względem grupy ϵ -aminowej reszt lizyny. Skutkiem takiej modyfikacji jest wprowadzenie stałego ładunku dodatniego do cząsteczki peptydu, dzięki czemu sole pirydiniowe znalazły zastosowanie jako wzmacniacze jonizacyjne w analizie peptydów metodą spektrometrii mas [64]. Na Rysunku 10 pokazano schemat derywatywacji amin za pomocą 2,4,6-trójpodstawionej soli piryliowej.



Rysunek 10. Derywatywacja peptydów za pomocą 2,4,6-trójpodstawionej piryliowej
Figure 10. The application of 2,4,6-trisubstituted pyrylium salt for derivatization of peptides

Derywatyzację tę przeprowadza się w obecności nadmiaru 2,4,6-trójpodstawionej soli piryliowej, równoważnikowej ilości trietyloaminy (w stosunku do odczynnika derywatyzującego) przez 20 min, w *N,N*-dimetyloformamidzie (DMF), w temperaturze 70°C. Ze względu na opisaną powyżej regioselektywność reakcji soli

piryliowych, są one szczególnie użyteczne w derywatywacji peptydów pochodzących z hydrolizy enzymatycznej katalizowanej trypsyną, która prowadzi do powstania mieszaniny peptydów zawierających reszty lizyny lub argininy na C-końcu. Badania wykazały, że peptydy zawierające znacznik 2,4,6-trifenylopirydyniowy wykazują znaczący wzrost intensywności sygnałów na widmie masowym, w porównaniu z peptydami niemodyfikowanymi. Ponadto, dla dipeptydu glicyloleucyny zawierającego znacznik pirydiniowy zostało zarejestrowane widmo masowe na poziomie 1 attomola (1×10^{-18}), w trybie MRM (ang. *multiple reaction monitoring*). Na widmach MS/MS peptydów zawierających znacznik jonizacyjny na C-końcu łańcucha peptydowego występuje charakterystyczna seria jonów typu γ , co znacznie ułatwia sekwencjonowanie i analizę widm masowych peptydów [43].

5. ZASTOSOWANIE ZNACZNIKÓW JONIZACYJNYCH W ANALIZIE BIBLIOTEK KOMBINATORYCZNYCH

Peptydowe biblioteki kombinatoryczne typu jedno ziarno jeden związek (ang. *one-bead one-compound*, OBOC), stanowią niezastąpione narzędzie w analizie specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych, odgrywających kluczową rolę w funkcjonowaniu szlaków sygnalizacyjnych, powstawaniu infekcji i stanów zapalnych, apoptozie, krzepnięciu krwi oraz kontrolowaniu cyklu komórkowego [65]. Dotychczas prowadzone badania umożliwiły zaprojektowanie specyficznych substratów, inhibitorów oraz markerów pozwalających monitorować aktywność wielu enzymów w testach *in vivo* i *in vitro* [66]. Syntezę bibliotek peptydowych OBOC przeprowadza się na nośniku stałym, a identyfikacji aktywnych produktów dokonuje się bezpośrednio na ziarnach żywicy lub w roztworze.

Jedną z najczęściej wykorzystywanych metod analitycznych w chemii kombinatorycznej jest spektrometria mas ESI-MS [67]. Pomimo szybkiego rozwoju tej techniki w ostatnich latach, jej podstawowym ograniczeniem jest śladowa ilość substancji uwolnionej z pojedynczego ziarna żywicy, często niewystarczająca do pełnej analizy. Z uwagi na zbyt małą wydajność jonizacji niektórych peptydów, ich analiza sekwencyjna metodą MS/MS wymaga zastosowania większej ilości peptydów od tej, która znajduje się na pojedynczym ziarnie żywicy. Rozwiązaniem tego problemu może okazać się zaprojektowana przez nas [68, 69] wydajna derywatywacja komponentów bibliotek OBOC znacznikiem jonizacyjnym w postaci czwartorzędowej grupy amoniowej, która zwiększa jonizowalność śladowych ilości analitów uzyskanych z pojedynczych ziaren OBOC, ułatwiając ich jednoznaczne sekwencjonowanie metodą ESI-MS/MS. Wprowadzenie takiej modyfikacji wymagało zaprojektowania nowego typu bibliotek kombinatorycznych OBOC, w których peptydy przyłączone były do żywicy za pomocą linkera, zawierającego grupę umożliwiającą selektywne uwolnienie związku, wysięgnik zwiększający odległość od powierzchni żywicy oraz grupę funkcyjną umożliwiającą wprowadzenie znacznika jonizacyjnego. Po syntezie bibliotek peptydowych na żywicy wyposażonej w tak zaprojektowany linker, N-koń-

cowe grupy aminowe sekwencji peptydowych zostały zablokowane przez acetylację. Hydroliza enzymatyczna wiązania peptydowego powoduje utworzenie wolnych grup aminowych. Do ich identyfikacji zaproponowaliśmy znany w chemii, barwny test Kaisera, bazujący na reakcji I-rzędowej grupy aminowej z ninhydryną i prowadzący do utworzenia purpury Ruhemana [70].

W celu potwierdzenia użyteczności zaproponowanej metody w analizie bibliotek kombinatorycznych OBOC, zsyntezowano modelowe biblioteki dla chymotrypsyny, katepsyny G oraz kaspazy 3 i 7 [71]. Po hydrolizie enzymatycznej i reakcji ninhydrynowej, ziarna zabarwione na kolor fioletowy (zawierające aktywne, hydrolizowane przez enzym sekwencje peptydowe) oddzielono od ziaren niezabarwionych, a następnie produkty uwolnione z pojedynczych ziaren żywicy poddano analizie ESI-MS/MS. Uzyskane wyniki badań są w pełni zgodne ze znanymi specyficznościami substratowymi enzymów proteolitycznych zastosowanych w tych eksperymentach, co wskazuje na użyteczność zaproponowanej metody w analizie kombinatorycznej.

Z uwagi na niską wydajność hydrolizy enzymatycznej peptydów osadzonych na nośniku stałym i acetylację reszt aminokwasowych *N*-końca, w zaproponowanych bibliotekach kombinatorycznych analiza fragmentu peptydu uwolnionego do roztworu po hydrolizie enzymatycznej nie była możliwa. Dlatego w toku dalszych badań zaproponowaliśmy nowy typ bibliotek peptydowych OBOC, w których znacznik jonizacyjny znajdował się na *N*-końcu peptydów przyłączonych do żywicy za pomocą odpowiedniego wysięgnika. Po hydrolizie enzymatycznej, do roztworu uwalniany jest peptyd modyfikowany grupą zwiększającą jonizowalność i umożliwiającą ultraczułą analizę metodą ESI-MS. Dodatkowo, obecność znacznika jonizacyjnego we fragmencie uwalnianym do roztworu pozwala na monitorowanie aktywności enzymatycznej i szybkości hydrolizy wiązania peptydowego na nośniku stałym. Przydatność tego typu bibliotek kombinatorycznych w badaniach enzymatycznych została sprawdzona na przykładzie modelowych substratów peptydowych dla kaspazy 3 i 7. Uzyskane wyniki pozwoliły potwierdzić znaną specyficzność substratową tych proteaz i dowodzą, że zaproponowane biblioteki mogą stanowić nowe narzędzie analityczne w badaniach szybkości reakcji enzymatycznych na nośniku stałym.

6. ZNACZNIKI JONIZACYJNE W BADANIU MARKERÓW CHOROBYCH

Stan przedrzucawkowy (preeklampsja, ang. *preeclampsia*, PE) jest zespołem objawów chorobowych, który może się pojawić po 20 tygodniu ciąży, charakteryzującym się nadciśnieniem tętniczym oraz objawami uszkodzenia narządów wewnętrznych, zwłaszcza nerek i wątroby [72, 73]. Dotyczy on dużej liczby kobiet ciężarnych (3–7%) i bywa często przyczyną śmierci matki oraz jej nienarodzonego dziecka. PE wiąże się z wysokim ryzykiem wystąpienia komplikacji przedporodo-

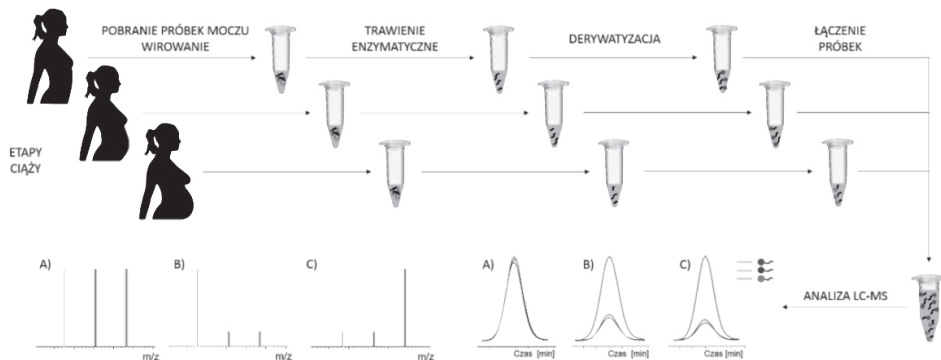
wych, przedwczesnego porodu, poważnych objawów niedorozwoju fizycznego i psychicznego a nawet śmierci noworodka. Dlatego tak ważna jest wczesna diagnostyka PE oraz odpowiednia opieka przedporodowa, umożliwiająca kobietom cierpiącym na PE urodzenie zdrowego dziecka. Niestety, diagnoza PE na etapie bezobjawowym jest niemożliwa, z uwagi na niedostateczną czułość współczesnych metod badawczych. PE związana jest z uszkodzeniem podocytów, co w konsekwencji prowadzi do upośledzenia funkcji nerek. Obecnie uważa się, że wykrycie podocytów w moczu (podocytouria) u ciężarnych kobiet świadczy o PE, co umożliwia prognozowanie dalszego rozwoju tej choroby.

W 2013 roku Garovic i in. zaproponowali zastosowanie spektrometrii mas w trybie monitorowania reakcji wielokrotnych (MRM, ang. *multiple reaction monitoring*), połączonej z rozdzielaniem chromatograficznym mieszaniny peptydów tryptycznych uzyskanych po proteolizie próbek moczu pochodzących od kobiet ciężarnych ze zdiagnozowaną preeklampsją [74]. Podejście to bazowało na oznaczeniu tryptycznego fragmentu podocyny o sekwencji $^{39}\text{H-QEAGPEPSGSGR-OH}^{50}$, w oparciu o identyfikację powstałych z niego jonów fragmentacyjnych w metodzie MRM. Takie podejście w analizie proteomicznej daje jednoznaczne potwierdzenie obecności danego białka w badanej mieszaninie, a dodatkowo przedstawiony tryb pracy znacznie zwiększa czułość prowadzonych analiz. Zaproponowana sekwencja peptydowa jest charakterystyczna dla ludzkiej podocyny, a dzięki obecności reszty argininy na C-końcu, modelowy peptyd charakteryzuje się wysoką wydajnością jonizacji w analizie MS, co pozwala na jego czułą identyfikację. Przeprowadzone badania wykazały korelację między obecnością modelowego peptydu wybranego do badań i występującymi w moczu pacjentek podocytami, których obecność potwierdzono metodami immunologicznymi.

W roku 2014 Simon i in. zasugerowali, że N-końcowa reszta aminokwasowa (glutamina) w sekwencji peptydowej, zaproponowanej przez Garovic i in. [74], może w warunkach eksperymentu MS/MS ulegać cyklizacji do kwasu piroglutaminowego, co może wpływać na wiarygodność wykonanych analiz [75]. W związku z tym, zaproponowano kolejny tryptyczny fragment podocyny o sekwencji $^{59}\text{H-APA-ATVVDVDEVR-OH}^{71}$, mogący stać się peptydem diagnostycznym umożliwiającym identyfikację podocyny w próbkach moczu. Obecność modelowego peptydu także wykazano w próbkach moczu pochodzących od pacjentek ze zdiagnozowaną preeklampsją.

Zaproponowane podejście do analizy peptydowych fragmentów podocyny w tryptycznych hydrolizatach moczu bazuje na identyfikacji peptydów zawierających silnie jonizujące się reszty argininy, podczas gdy hydroliza enzymatyczna przy udziale tripsyny prowadzi także do utworzenia peptydów zawierających na C-końcu resztę lizyny. Peptydy takie często charakteryzują się niższą wydajnością jonizacji, przez co ich identyfikacja w złożonych próbkach biologicznych jest utrudniona. Opracowaliśmy metodę derywatywacji tryptycznych hydrolizatów osadów moczu, polegającą na wprowadzeniu znacznika jonizacyjnego w formie grupy

2,4,6-trifenylopirydyniowej na łańcuch boczny reszty lizyny (Rysunek 11). Taka modyfikacja pozwoliła na ultraczułą analizę peptydów na poziomie attomolowym [76]. Zaproponowaliśmy także inne sekwencje peptydowe stanowiące fragmenty tryptyczne podocyny, które mogą okazać się dobrymi peptydami diagnostycznymi, których identyfikacja w hydrolizacie osadu moczu pozwoli na stwierdzenie obecności podocyny we wczesnym etapie rozwoju preeklampsji. Metoda ta umożliwiła stwierdzenie obecności podocyny w badanych próbkach moczu, co zostało także potwierdzone innymi technikami diagnostyki medycznej.



Rysunek 11. Schemat analizy proteomicznej białek obecnych w moczu pochodzącym od tej samej pacjentki w różnych stadiach PE. Próbkę pobrane w różnym czasie są modyfikowane znacznikami o różnym składzie izotopowym, łączone i analizowane techniką LC-MS

Figure 11. Proteomic analysis of proteins present in patient's urine during various stages of preeclampsia. The samples were labeled with isotopic markers, pooled and analysed using LC-MS

UWAGI KOŃCOWE

Znaczniki jonizacyjne wyraźnie zwiększają czułość analizy peptydów za pomocą spektrometrii mas [77]. Różnorodność obecnie stosowanych reagentów pozwala na wprowadzenie znaczników jonizacyjnych do wielu grup funkcyjnych analizowanych substancji. Można oczekiwać, że znaczniki jonizacyjne umożliwią zidentyfikowanie nowych biomarkerów, do tej pory nieodkrytych z uwagi na niedostateczną czułość współczesnych metod analitycznych.

Szczególne nadzieje można wiązać z izobarycznymi znacznikami jonizacyjnymi [78], gdyż umożliwiają ilościowe badania porównawcze analitów występujących w ilościach śladowych.

PODZIĘKOWANIA

Przygotowanie publikacji było możliwe dzięki wynikom uzyskanym w trakcie realizacji projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (UMO-2016/23/B/ST4/01036 i UMO-2015/17/D/ST5/01329).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Barber, R.S. Bordoli, G. J. Elliott A.N. Tyler J.C. Bill, B.N. Green, *Biomed. Mass Spectrom.*, 1984, **11**, 182.
- [2] https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/index.html, [data dostępu 17.05.2018]
- [3] B. Domon, R. Aebersold, *Science*, 2006, **312**, 212.
- [4] Z. Zhang, H. Pan, X. Chen, *Mass Spectrom. Rev.*, 2009, **28**, 147.
- [5] N.L. Kelleher, H.Y. Lin, G.A. Valaskovic, D.J. Aaserud, E.K. Fridriksson, F.W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 806.
- [6] A.B. Hummon, A. Amare, J.V. Sweedler, *Mass Spectrom. Rev.*, 2006, **25**, 77.
- [7] K.F. Medzihradsky, R.J. Chalkley, *Mass Spectrom. Rev.*, 2015, **34**, 43.
- [8] R. Bąchor, P. Mielczarek, M. Rudowska, J. Silberring, Z. Szewczuk, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2014, **362**, 32.
- [9] E. Krause, H. Wenschuh, P. Jungblut, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 4160.
- [10] H. Wenschuh, P. Halada, S. Lamer, P. Jungblut, E. Krause, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1998, **12**, 115.
- [11] T. Nishikaze, M. Takayama, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **20**, 376.
- [12] I.A. Papayannopoulos, *Mass Spectrom. Rev.*, 1995, **14**, 49.
- [13] V.H. Wysocki, G. Tsapralis, L.L. Smith, L.A. Breci, *J. Mass Spectrom.*, 2000, **35**, 1399.
- [14] *Spektrometria mas*, P. Suder, A. Bodzoń-Kuślakowska, J. Silberring (Red.), Wydawnictwo AGH, Kraków 2016.
- [15] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.*, 1984, **11**, 601.
- [16] K. Biemann, *Methods Enzymol.*, 1990, **193**, 886.
- [17] D.L. Chappell, M.E. Lassman, T. McAvoy, M. Lin, D.S. Spellman, O.F. Laterza, *Bioanalysis*, 2014, **6**, 1843.
- [18] E.F. Petricoin, L.A. Liotta, *Clin. Chem.*, 2003, **49**, 533.
- [19] P. Stefanowicz, A. Kluczyk, Z. Szewczuk, *Amino Acids, Peptides and Proteins*, 2016, **40**, 36.
- [20] T. Higashi, S. Ogawa, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, **130**, 181.
- [21] S. Wiese, K.A. Reidegeld, H.E. Meyer, B. Warscheid, *Proteomics*, 2007, **7**, 340.
- [22] A. Thompson, J. Schafer, K. Kuhn, S. Kienle, J. Schwarz, G. Schmidt, T. Neumann, C. Hamon, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 1895.
- [23] T. Werner, G. Sweetman, M.F. Savitski, T. Mathieson, M. Bantscheff, M.M. Savitski, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 3594.
- [24] F. Xiang, H. Ye, R.B. Chen, Q. Fu, L. J. Li, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 2817.
- [25] D.C. Frost, T. Greer, L.J. Li, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 1646.
- [26] J. Zhang, Y. Wang, S. Li, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 7588.
- [27] C. Choudhary, M. Mann, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, **11**, 427.
- [28] W.P. Heal, E.W. Tate, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 731.
- [29] G.A. Houry, R.C. Baliban, C.A. Floudas, *Sci. Rep.*, 2011, **1**, 90.

- [30] F.Y. Meng, A.J. Forbes, L.M. Miller, N.L. Kelleher, *Mass Spectrom. Rev.*, 2005, **24**, 126.
- [31] K. Kowalewska, P. Stefanowicz, T. Ruman, T. Frączyk, W. Rode, Z. Szewczuk, *Biosci. Rep.*, 2010, **30**, 433.
- [32] Y.H. Ahn, E.S. Ji, J.Y. Lee, K. Cho, J.S. Yoo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007, **21**, 2204.
- [33] M. Ząbczyńska, E. Pocheć, *Post. Bioch.*, 2015, **61**, 129.
- [34] G.A. Rabinovich, Y. van Kooyk, B.A. Cobb, *Ann NY Acad. Sci.*, 2012, **1253**, 1.
- [35] E. Lattova, H. Perreault, *Mass Spectrom. Rev.*, 2013, **32**, 366.
- [36] J.W. Gouw, P.C. Burgers, M.A. Trikoupi, J.K. Terlouw, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, **16**, 905.
- [37] M.S. Bereman, D.L. Comins, D.C. Muddiman, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 237.
- [38] S.J. Cho, G. Roman, F. Yebo, Y. Konishi, *Curr. Med. Chem.*, 2007, **14**, 1653.
- [39] C. Weykamp, W.G. John, A. Mosca, *J. Diabetes. Sci. Technol.*, 2009, **3**, 439
- [40] R. Kisugi, T. Kouzuma, T. Yamamoto, S. Akizuki, H. Miyamoto, Y. Someya, J. Yokoyama, I. Abe, N. Hirai, A. Ohnishi, *Clin. Chim. Acta*, 2007, **382**, 59
- [41] A. Lapolla, P. Traldi, D. Fedele, *Clin. Biochem.*, 2005, **38**, 103
- [42] M. Kijewska, A. Kuc, A. Kluczyk, M. Waliczek, A. Man-Kupisinska, J. Łukasiewicz, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2014, **25**, 966.
- [43] M. Waliczek, M. Kijewska, M. Rudowska, B. Setner, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 37720.
- [44] D.A. Kidwell, M.M. Ross, R.J. Colton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 2220.
- [45] J.E. Vath, K. Biemann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, 1990, **100**, 287.
- [46] J.T. Stults, J. Lai, S. McCune, R. Wetzelt, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 1703.
- [47] M. Bartlet-Jones, W.A. Jeffery, H.F. Hansen, D.J.C. Pappin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1994, **8**, 737.
- [48] B. Spengler, F. Luetzenkirchen, S. Metzger, P. Chaurand, R. Kaufmann, W. Jeffery, M. Bartlet-Jones, D.J.C. Pappin, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, 1997, **70**, 127.
- [49] Y. He, J.P. Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 2463.
- [50] K.V. Wasslen, L.H. Tan, J.M. Manthorpe, J.C. Smith, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 3291.
- [51] M. Cydzik, M. Rudowska, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *J. Pept. Sci.*, 2011, **17**, 445.
- [52] M. Cydzik, M. Rudowska, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2011, **22**, 2103.
- [53] B. Setner, M. Rudowska, E. Klem, M. Cebzat, Z. Szewczuk, *J. Mass Spectrom.*, 2014, **49**, 995.
- [54] B. Setner, M. Rudowska, A. Kluczyk, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Anal. Chim. Acta*, 2017, **986**, 71.
- [55] B. Setner, Z. Szewczuk, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, **410**, 1311.
- [56] M. Wierzbicka, B. Setner, Z. Szewczuk, *Acta Phys. Pol. B, Proc. Suppl.*, 2016, **9**, 345.
- [57] M. Rudowska, D. Wojewska, A. Kluczyk, R. Bąchor, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2012, **23**, 1024.
- [58] R. Bąchor, A. Kluczyk, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 6557.
- [59] B. Setner, M. Wierzbicka, L. Jerzykiewicz, M. Lisowski, Z. Szewczuk, *J. Pept. Sci.*, 2016, **22**, S74.
- [60] B. Setner, M. Wierzbicka, M. Lisowski, Z. Szewczuk, *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 825.
- [61] G. Williams, E.P. Maziarz III, T.L. Amyes, T.D. Wood, J.P. Richard, *Biochemistry*, 2003, **42**, 8354.
- [62] A.T. Balaban, C.D. Nenitzescu, *Org. Synth.*, 1964, **44**, 98.
- [63] K. Dimroth, C. Reichardt, K. Vogel, *Org. Synth.*, 1969, **49**, 114.
- [64] M. Waliczek, M. Kijewska, M. Rudowska, B. Setner, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 37720.
- [65] M. Poręba, M. Drąg, *Curr. Med. Chem.*, 2010, **17**, 3968.
- [66] E. Deu, M. Verdoes, M. Bogyo, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2012, **19**, 9.
- [67] D.B. Kassel, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 255.

- [68] R. Bąchor, M. Cydzik, M. Rudowska, A. Kluczyk, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Mol. Divers.*, 2012, **16**, 613.
- [69] R. Bąchor, A. Kluczyk, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Mol. Divers.*, 2013, **17**, 605.
- [70] E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger, P.I. Cook, *Anal. Biochem.*, 1970, **34**, 595.
- [71] R. Bąchor, A. Kluczyk, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *J. Pept. Sci.*, 2016, **22**, S54.
- [72] K. Panek-Laszczyńska, A. Konieczny, E. Milewska, K. Dąbrowska, R. Bąchor, W. Witkiewicz, Z. Szewczuk, *Biomarkers*, 2018, **23**, 207
- [73] E.V. Kuklina, C. Ayala, W.M. Callaghan, *Obstet. Gynecol.* 2009, **113**, 1299
- [74] V.D. Garovic I.M. Craici, S.J. Wagner, W.M. White, B.C. Brost, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2013, **28**, 1555.
- [75] R. Simon, J. Lemoine, C. Fonbonne, A. Jaffuel, J.F. Léonard, J.C. Gautier, O. Pasquier, A. Salvador, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, **94**, 84.
- [76] M. Waliczek, M. Kijewska, M. Rudowska, B. Setner, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Sci. Reports*, 2016, **6**, 37720.
- [77] A. Leitner, *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1000**, 2.
- [78] B. Setner, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *J. Mass Spectrom.*, 2018, **53**, 115.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 lipca 2018

