

MAPIRANJE POST-TRANSLACIJSKIH MODIFIKACIJ Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Post-translacijske modifikacije proteinov imajo veliko pomembnih vlog v organizmih, zato je pomembno, da vemo, kje so mesta določenih modifikacij ter koliko jih je. Osrednja metoda za mapiranje in kvantifikacijo post-translacijskih modifikacij (PTM) je masna spektrometrija (MS).

Najpogostejša PTM je *fosforilacija*. Kar 1/3 vseh evkariontskih proteinov naj bi bila fosforiliranih. Dodatek fosforilne skupine se detektira kot povčanje mase za 80 Da v aminokislinskem ostanku. Mesto fosforilacije lahko določimo s premiki mas ionskih fragmentov po MS/MS.

Določen PTM ion lahko določimo z MS ali MS/MS, odvisno od reaktivnosti v plinski fazi. Običajno MS/MS izvajamo z nizkoenergetskim CAD. Pri tem načinu CAD molekule z adicijo protonov pridobijo pozitiven naboj. Pri CAD peptidov običajno pride do nukleofilnih reakcij. Mesto cepitve je tako odvisno od zaporedja aminokislin in razporeditve protonov po ogrodju in stranskih skupinah. Drugi fragmentacijski metodi, ki postajata vse bolj popularna je ECD in ETD. Prednost ECD in ETD pred CAD je, da lahko detektira fosforilacijo in ostale PTM, ki so nestabilne pri uporabi MS/MS. Peptidna sekvence pri tem ne vpliva toliko na fragmentacijo. ETD in ECD optimalno delujeta pri analitih z visokim nabojem, CAD pa z nizkim.

Pogost problem pri detekciji fosforilacije je nizka senzitivnost, zato običajno fosfoanalite obogatimo. Prvi tak primer je kovalentna spojitev. Fosforno kislino lahko eliminiramo, da nastane dvojna vez, ki je lahko tarča Michaelove adicije večih nukleofilnih spojin. Problem tega načina je, da lahko ta reakcija poteče tudi na ostalih PTM in jih lahko napačno interpretiramo kot fosforilacija hkrati pa lahko potečejo nezaželene stranske reakcije. Druge strategije so kovalentna vezava z EDC, drug tak primer je nekovalentna obogatitev... Fosfopeptide lahko kvantificiramo na več načinov. Vsi pa vključujejo neke vrste označevanje s stabilnim izotopom (npr. C13 ali N15). Pri tem 2 vzorca ali več označimo, proteoliziramo, kvantificiramo z MS in primerjamo. Lahko pa označimo preko fosfat specifične reakcije ali reaktivne skupine v peptidu. Stehiometrijo lahko določimo na dva načina: 1) brez označevanja in primerjanjem intenzitet fosforiliranih in nefosforiliranih oblik. 2) označevanje z izotopi. Polovico proteina defosforiliramo in nato obe polovici proteoliziramo in karboksilne skupine metilesterificiramo za izotopsko metilno skupino. Polovici nato zmešamo in analiziramo z LC-MS/MS.

Ogromno eksperimentov na tem področju je vodilo k nastanku baz podatkov o PTM proteinov. Te podatki bi morali obravnavati z določeno stopnjo previdnosti. Včasih so metode določevanja PTM in programi iskanja površno zastavljeni ali izvedeni. Natančna določitev mest je pogojena s tem, kakšna je občutljivost MS tehnike.

Acetilacija je dodajanje acetilne funkcionalne skupine na kemijsko spojino. Pri proteinih je acetilacija pogosta na amino skupinah lizinskega ostanka, pojavlja pa se tudi na amino skupinah arginina.

Acetilacija je ena izmed najlažje detektiranih posttranslacijskih modifikacij. Ker je acetilirana lizinska ϵ -amino skupina (tudi N-terminalna skupina) stabilna, lahko za fragmentacijo uporabimo CAD. Analiza s tandemsko MS poda karakterističen masni premik +42.01 Da glede na nemodificirano obliko. Mesta acetilacije se lahko določa s pomočjo protiteles proti acetilizinu.

Ubikvitin in ubikvitinu podobni proteini (UBL)- gre za peptidna povezavo med karboksi skupino na C-koncu ubikvitina in ϵ -amino skupino lizinskega ostanka na tarčnem proteinu. Detekcija modifikacije je zahtevna, saj med proteolizo C-terminalni ostanki ubikvitina in UBL ostanejo kovalentno vezani na lizinskem ostanku tarčnega proteina. Tripsinska proteoliza v tem primeru ni primerna, saj se ne da ločevati med modifikacijo z ubikvitinom in ostalimi UBL-ji. Rešitev je proteoliza z endopeptidazo LysC, saj rezanje z njo prinese daljše in bolj informativne repe. S tako obdelavo lahko nedvoumno določajo za katero modifikacijo gre.

Oksidacija cisteina privede do nastanka kislin R-SOH, R-SO₂H in R-SO₃H, ki imajo karakteristične masne premike +16, +32, +48 Da.

MS *S-nitroziliranih cisteinskih ostankov* proteinov je zahtevna, saj je modifikacija precej nestabilna. Uporablja se metoda »biotin-switch« pri kateri najprej nemodificirane cisteine zavarujejo, nato sledi redukcija SNO modificiranih cisteinov, tako nastale proste tiolne skupine izpostavijo reagentom na katerega je vezan biotin – NO molekula se nadomesti z biotinsko oznako. Sledi tripsinska proteoliza in analiza s pomočjo tandemске MS. Značilen masni premik za za Cys-S-biotin je to 428 Da.

STROKOVNI IZRAZI

CAD- collisionaly activated ionisation. Je mehanizem, ki fragmentira molekulske ione v plinski fazi.

ECD- electron capture dissociation. Je metoda fragmentacije ionov v plinski fazi za MS/MS spektrometrijo. Ta metoda vključuje vstavljanje elektronov z nizko energijo k ionom.

ETD-electron transfer dissociation. Je metoda fragmentacije ionov. Vključuje fragmentacijo kationov (lahko peptidov ali proteinov), tako da jim prenesemo elektrone.