

Peptidek LC-MS/MS karakterisztikájának javítása fluoros kémiai módosítással, proteomikai alkalmazásokhoz

Steckel Arnold¹, Berta Máté², Sármay Gabriella³, Vékey Károly⁴, Hudecz Ferenc^{1,5}, Rábai József², Schlosser Gitta¹

¹ MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, ELTE Kémiai Intézet, ² Szerves Fluorvegyületek Laboratóriuma, Szerves Kémiai Tanszék, ELTE Kémiai Intézet, ³ Immunológiai Tanszék, ELTE Biológiai Intézet, ⁴ MTA Természettudományi Kutatóközpont, ⁵ Szerves Kémiai Tanszék, ELTE Kémiai Intézet

A pályázók bemutatkozása:



Schlosser Gitta, Ph.D.

tudományos munkatárs
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, ELTE Kémiai Intézet

Kutatási területe a tömegspektrometriás módszerek kidolgozása és alkalmazása fehérjék és peptidek szerkezetvizsgálatára, fehérjék poszttranszlációs módosításainak meghatározására, proteomikai és klinikai diagnosztikai kutatások.



Rábai József, Ph.D., D.Sc.

egyetemi tanár
Az ELTE Szerves Fluorvegyületek Laboratóriumának vezetője

A szerves fluor kémia nemzetközileg elismert kutatója, a magyar fluor kémiai iskola megteremtője. A fluoros kétfázisú katalízis módszerének társtulajdonosa. Szakmai aktivitása kénorganikus és más vegyületek szintézisére, optikailag aktív vegyületek előállítására és a fluor kémia módszereinek fejlesztésére irányul.



Sármay Gabriella, Ph.D., D.Sc.

egyetemi tanár
Immunológiai Tanszék, ELTE Biológiai Intézet

Kutatási területe a B sejt immunválasz szabályozása, a B sejteken kifejeződő receptorok által stimulált jelátviteli folyamatok és a receptorok közötti "párbeszéd" tanulmányozása. B sejt funkciók és autoreaktív ellenanyagok vizsgálata rheumatoid arthritisben.



Vékey Károly, Ph.D., D.Sc.

tudományos tanácsadó
MTA Természettudományi Kutatóközpont Műszercentrumának vezetője

Kutatási területe az analitikai és fizikai kémia, tömegspektrometria, kromatográfia. Szerkezetvizsgálatok (szerves és bioorganikus vegyületek, biopolimerek); proteomika; klinikai-kémia (tömegspektrometrián alapuló új diagnosztikai eljárások kifejlesztése); gyógyszerkutatás (metabolitkutatás, farmakokinetika, szennyezésprofil meghatározása); élelmiszeranalitika. A tömegspektrométerben lejátszódó fragmentációs folyamatok elméleti modellezése.

A műszerek:

- Bruker Esquire 3000+ ioncsapda típusú tandem tömegspektrométer ESI és APCI ionforrásokkal. HPLC-vel kapcsolható. Elérhetőség: MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, ELTE Szerves Kémiai Tanszék

- Waters Q-TOF Premier, nagyfelbontású kvadrupol-repülési idő típusú tandem tömegspektrométer ESI, MALDI és nanospray ionforrásokkal. UPLC-vel kapcsolható. Elérhetőség: MTA Természettudományi Kutatóközpont, Műszercentrum.

A kutatási téma bemutatása, célkitűzése:

A fehérjék tömegspektrometriás azonosításához, részletes szerkezetvizsgálatához az intakt fehérjét általában kisebb peptidekre bontják enzimek (például tripszin) segítségével. Egyes fehérjék tripszines emésztésekor azonban nagy számban keletkeznek olyan kis tagszámú, erősen poláris peptidek, amelyek a szokványos mintaelőkészítési és kromatográfiai (LC-MS/MS) megoldások során nem azonosíthatók. A Rheumatoid arthritisben is szerepet játszó filaggrin fehérje egyike azon különleges szekvenciájú, argininben gazdag fehérjéknek, amelyek hatékony tömegspektrometriás vizsgálatát hátráltatja a tripszines hasítás során keletkező peptidek polaritása és kis tag száma.

A közös munka célja poláris, kis tag számú peptidek LC-MS/MS karakterisztikájának javítása. A kísérletek során fluoros reagenseket használunk a peptidek retenció idejének és fragmentációs viselkedésének optimalizálására. Bár az irodalomban alkalmaznak szerves acilezőszereket peptidek módosítására, sok esetben az ezekkel elérhető kromatográfiai javulás nem elegendő a peptidek hatékony azonosításához. Célunk így a hagyományos szerves acilezőszerek mellett olyan új fluoros vegyületek szintézise, alkalmazása és összehasonlító vizsgálata, amelyekkel várhatóan nagymértékben nő a jelölt peptidek retenció ideje, és javulhat a peptid- ill. fehérjeazonosításhoz szükséges MS/MS fragmentáció minősége is.

Az eddigi kísérletek során vizsgált reagensek: Anhidridek

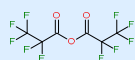
Propionsav-anhidrid – PAA



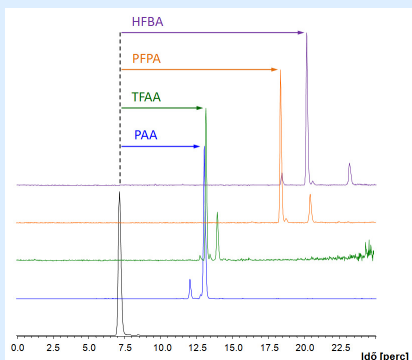
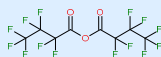
Trifluorecetsav-anhidrid – TFAA



Pentafluorpropionsav-anhidrid – PFPA

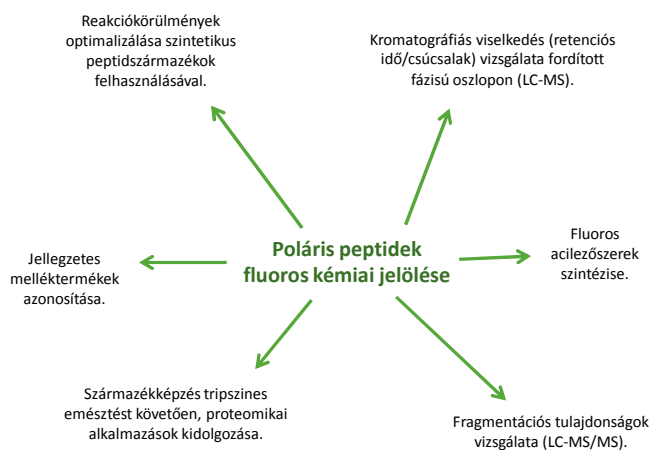


Heptafluorbutánsav-anhidrid – HFBA



1. ábra: A H-TIT-oh peptid retenció idejének változása kémiai módosítás hatására. A kromatogramok a kiindulási peptid (fekete) valamint a monoacilezett származékok (színes) LC-MS szelektív ionkromatogramjai.

Fontos kísérleti irányok:



Irodalom:

Jennifer L. Frahm, Ibrahim D. Bori, Daniel L. Comins, Adam M. Hawkrige, David C. Mudimana:
Achieving Augmented Limits of Detection for Peptides with Hydrophobic Alkyl Tags.
Anal. Chem. 2007, 79, 3989-3995

Sidoli S, Yuan ZF, Lin S, Karch K, Wang X, Bhanu N, Arnaldo AM, Britton LM, Cao XJ, Gonzales-Cope M, Han Y, Liu S, Molden RC, Wein S, Afjehi-Sadat L, Garcia BA:
Drawbacks in the use of unconventional hydrophobic anhydrides for histone derivatization in bottom-up proteomics PTM analysis.
Proteomics. 2015, 15, 1459-69

Köszönetnyilvánítás:

A kutatás az OTKA NK 105898 támogatásával valósult meg. Dr. Schlosser Gitta munkáját az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatta.