

Fehérjék poszttranszlációs módosulásainak felderítése nagyfelbontású tandem tömegspektrometria alkalmazásával

MedInProt Fehérjetudományi Kiválósági Együttműködési Program

2015. november 14.

Budapest

Nagyfelbontású tömegspektrometriás méréseket igénylő fehérjeanalitikai vizsgálatok

MedInProt gépidő
felhasználási pályázat

A pályázók:



Vékey Károly, Ph.D., D.Sc.

tudományos tanácsadó

MTA Természettudományi Kutatóközpont Műszercentrum



Sármay Gabriella, Ph.D., D.Sc.

egyetemi tanár

Immunológiai Tanszék, ELTE Biológiai Intézet



Schlosser Gitta, Ph.D.

tudományos munkatárs

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, ELTE Kémiai Intézet

Az immunológia és a tömegspektrometria találkozása:

Célpontban az „elromlott” fehérjék

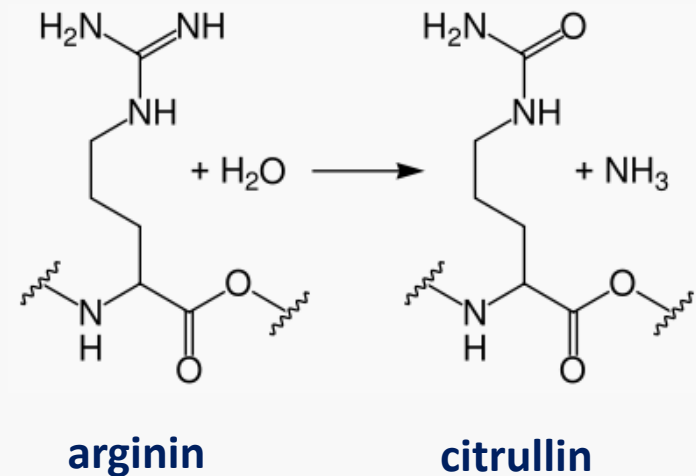
Rheumatoid arthritis (RA, reumás ízületi gyulladás):

- autoimmun, ízületeket érintő gyulladásos betegség
- a népesség 1 %-át érinti
- jelentős életminőség-romlással jár

A citrullináció diagnosztikai jelentősége:

- Számos fehérje esetén kimutatható (pl. filaggrin, fibrin, vimentin, kollagén)
- Autoantitestek, ACPA ellenanyagok termelődnek.
- Az ACPA ellenanyagok jelenlétének vizsgálata jelenleg a legspecifikusabb és legérzékenyebb diagnosztikai megoldás.

Fehérjék citrullinációja:



Kísérleti irányok

Az enzimkatalizált citrullináció vizsgálata modellpeptidekkel és fehérjékkel

Epitóp-specifikus ellenanyagok izolálása, szerkezeti jellemzése (glikozilációs mintázat)

Új, biodegrábilis nanogyöngyökre épülő terápiás megoldások kidolgozása

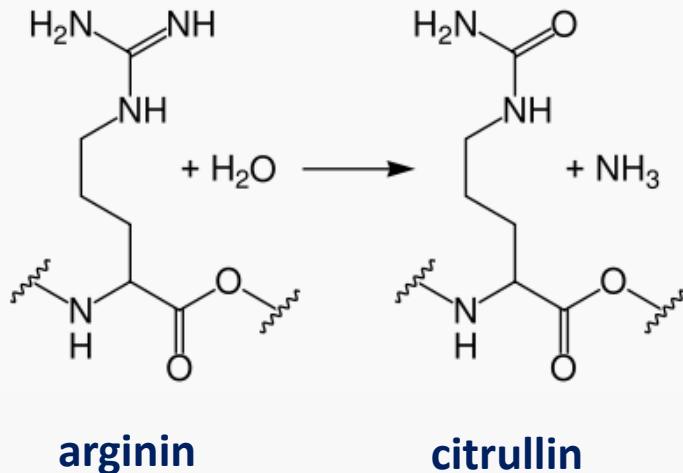
A Rheumatoid arthritis molekuláris hátterének felderítése, új diagnosztikai és terápiás módszerek fejlesztése

Citrullintartalmú peptidek tömegspektrometriás vizsgálata: A detektálás optimalizálása és új lehetőségek kifejlesztése

Kromatográfiás és tömegspektrometriás módszerek fejlesztése, optimalizálása fehérjék glikozilációjának tanulmányozására. Fehérjék glikozilációs mintázatának meghatározása

Citrullintartalmú peptidek tömegspektrometriás vizsgálata

Fehérjék citrullinációja:



Tömegspektrometriás szempontból „szerencsétlen” módosulás:

- Hasonló molekulatömeg (csupán 1 Da tömegkülönbség)
- Egy jól ionizálódó aminosav „elvesztése”
- Egy triptikus hasítási hely „elvesztése”

A klasszikus proteomikai módszerek nem elég hatékonyak a fehérjecitrullináció nagy érzékenységű kimutatására!

Citrullintartalmú peptidek tömegspektrometriás vizsgálata

Célkitűzés: Citrullinra specifikus mérési technikák vizsgálata, optimalizálása

Összetett biológiai minták vizsgálata során nem elég csupán a tömegkülönbség detektálása!



Nagy érzékenységű detektálás

ÉS

Hatékony MS/MS fragmentáció

Új lehetőség: A citrullintartalmú peptidek azonosítása semleges vesztés alapján.

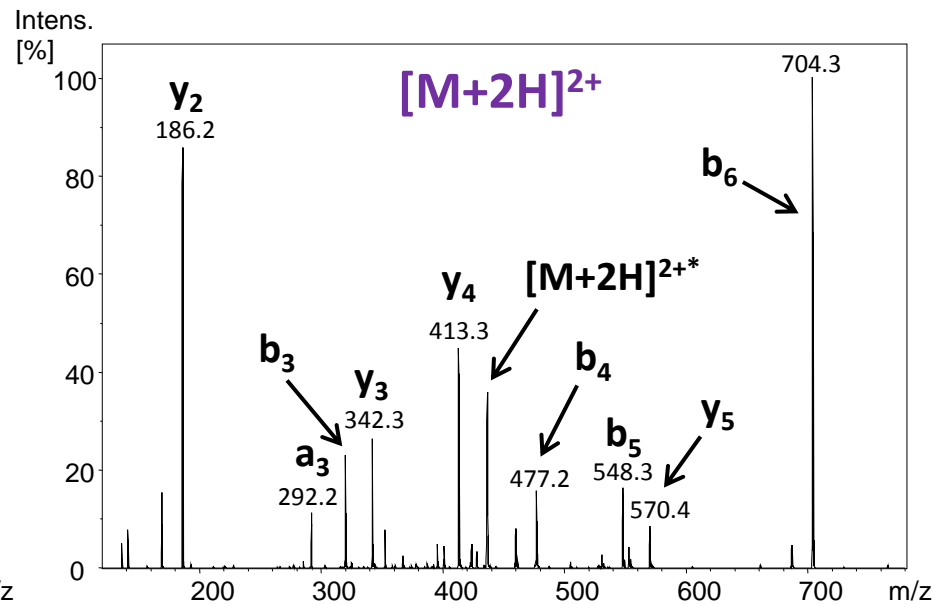
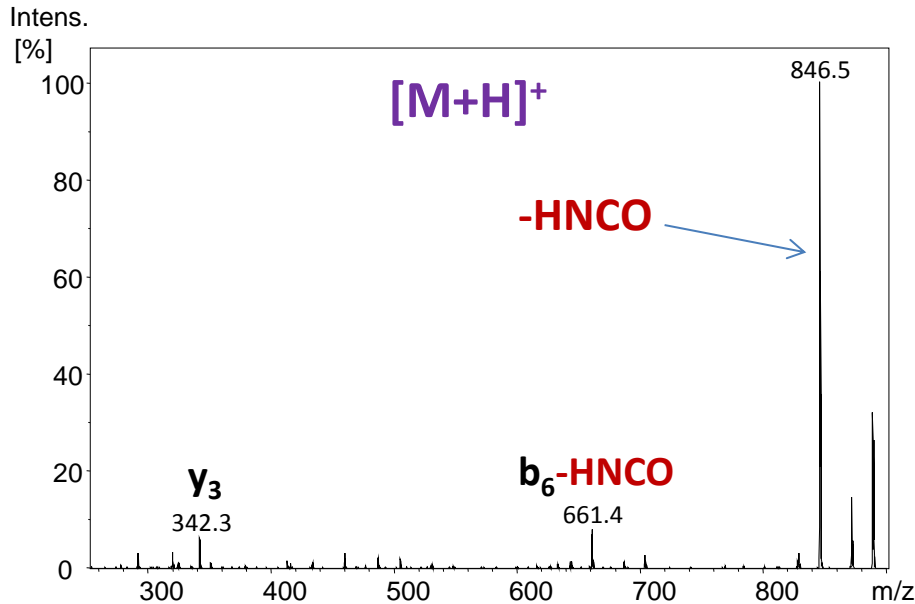
Gang Hao et al: Neutral Loss of Isocyanic Acid in Peptide CID Spectra: A Novel Diagnostic Marker for Mass Spectrometric Identification of Protein Citrullination.

J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2009, 20, 723–727

Citrullintartalmú peptidok tömegspektrometriás vizsgálata

HNCO semlegesvesztés vizsgálata modellpeptidekkel:

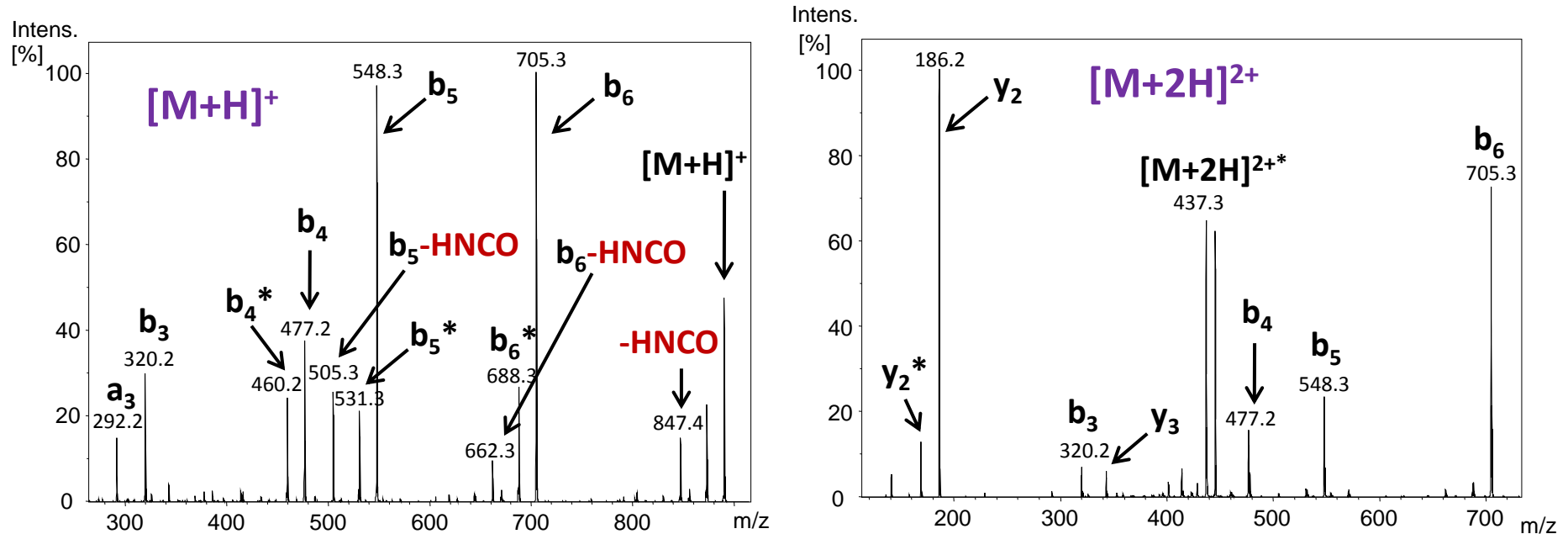
Az Ac-GGYXARPA-NH₂ peptid két ionjának MS/MS spektruma:



- a semlegesvesztés csak *egyszer protonált* ion esetén detektálható
→ azonban ekkor csekély mennyiségű fragmension
- a két töltésű ion részletgazdag MS/MS spektrummal rendelkezik
→ azonban hiányoznak a semlegesvesztést jelző ionok

Citrullintartalmú peptidek tömegspektrometriás vizsgálata

Az Ac-GGYXAXPA-NH₂ peptid két ionjának MS/MS spektruma:



A semlegesvesztés kulcsfontosságú lehet a citrullinációs helyek azonosításában!

→ De csak az MS/MS technikák megfelelő optimalizálásával és kombinációjával válhat sikeres megoldássá!

Köszönetnyilvánítás

ELTE Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék:

Szarka Eszter
Pozsgay Judit

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport:

Prof. Hudecz Ferenc
Magyar Anna
Uray Katalin
Babos Fruzsina
Steckel Arnold

MTA Természettudományi Kutatóközpont:

Bazsó Fanni
Ozohanics Olivér

- **Bolyai János Kutatási Ösztöndíj**
- **OTKA**