

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ МЕТОДОМ МАЛДИ

Лапшин Г.Д.¹, Винокуров Л.М.², Савицкий А.П.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, Москва, Россия (119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2), e-mail: grigory.lapshin@gmail.com

²Филиал Федерального Государственного Бюджетного Учреждения Науки Института Биоорганической Химии имени Академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской Академии Наук, г. Пуццино, Россия (142290 Московская обл. г.Пуццино, проспект Науки,б)

Химическая модификация аминокислотных остатков является распространённым методом изменения свойств белков. Процесс модификации аминокислот является стохастическим, поэтому выяснение точного положения модифицированной боковой группы относительно аминокислотной последовательности является трудной задачей. Информация о положении модифицированной аминокислоты представляет интерес для последующего направленного мутагенеза по этому положению. В статье предлагается подход по вычислению модифицированных аминокислот с помощью масс-спектрометра MALDI TOF/TOF. В качестве примера описана модификация лизинов флуоресцирующего белка ацилированием янтарным ангидридом. Показан подход к идентификации положения модифицированных аминокислот. Модификация боковой цепи лизина делает невозможным гидролиз полипептидной цепи трипсином после такого лизина. Сравнение масс-спектров триптических пептидов модифицированного и не модифицированного белка позволяет вычислить положение модифицированных аминокислот.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, МАЛДИ-спектрометрия, янтарный ангидрид.

AMINO ACIDS MODIFICATIONS DETECTION WITH MALDI-SPECTROSCOPY

Lapshin G.D.¹, Vinokurov L.M.², Savitsky A.P.¹

¹A.N. Bach Institute of biochemistry RAS, Moscow, Russia (119071, Moscow, Leninsky prospekt, 33 build. 2), e-mail: grigory.lapshin@gmail.com

²Branch of Semyakin & Ovchinnikov Institute (Pushchino, Moscow Region, Russia, 142290)

Chemical amino acids modification is popular method of modification of protein properties. Amino acid modification is stochastic process. Identification of the exact spot of amino acid modification in protein sequence is complex task. Information of amino acid modification position could be used with further direct mutagenesis of an amino acid in this position. Method of amino acid identification with MALDI TOF/TOF mass-spectrometry is proposed. Identification of acylated with succinic acid lysins of fluorescent protein is used as example of such modification identification. Acylation of lysin residue make protein bond cleavage after such lysin with trypsin impossible. Comparison of tryptic proteins of modified and unmodified protein allows to define modification spot.

Keywords: mass-spectrometry, MALDI-spectrometry, succinic acid.

Модификация боковых групп аминокислот применяется исследователями в различных целях [1]. Масс-спектрометрия – это метод исследования вещества, основанный на определении отношения массы к заряду ионов, образующихся при ионизации представляющих интерес компонентов пробы[2].

Многие белки, в частности GFP-подобные флуоресцирующие белки, могут быть подвергнуты химической модификации, например ацилированию янтарным ангидридом[3]. Однако в белке может присутствовать несколько, до нескольких десятков лизинов[4]. И даже при соотношении белок/модифицированная аминокислотная группа 1/1 после ацилирования возникает

вопрос, какие именно остатки лизина были модифицированы поскольку это может сильно повлиять на взаимодействие GFP-подобного белка с другими белками.

Цель исследования

Целью данной работы является на примере кораллового флуоресцирующего белка SAASoti [статья находится в печати] описать метод определения положения модифицированных ацилированием боковых групп лизинов. Для идентификации аминокислот используются метод масс-спектрометрии MALDI TOF/TOF.

Материалы и методы

Масс-спектрометрия

После проведения реакции модификации доступных янтарному ангидриду остатков лизина белка, образцы были очищены на обращенной фазе C18 P10. Для этого к 10 мкл пробы добавляли по 10 мкл 0.1% ТФУ, промывку проводили 5 объемами (по 10 мкл) 0.1% ТФУ, а элюцию - 10 мкл 60% ацетонитрила в 0.1% ТФУ. Далее пробы были подсушены и подвергнуты протеолизу трипсином, для чего к ним добавили по 10 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0.05M NH₄HCO₃ с концентрацией 10 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 5 ч при 37°C, затем остановили протеолиз добавлением 20 мкл 0.5 % ТФУ в 10 % растворе водного ацетонитрила. Этот раствор использовали для получения MALDI-масс-спектров. На масс-спектрометрической мишени смешивали по 1 мкл раствора образца и 0.5 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (Aldrich, 20 мг/мл в 20 % водном ацетонитриле, 0.5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflextreme BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.005 % (50ppm). Спектры получали в диапазоне масс 600-5000 m/z, выбирая мощность лазера, оптимальную для достижения наилучшего разрешения. Для получения спектров фрагментации использовали тандемный режим прибора, точность измерения фрагментных ионов была не хуже 1 Да.

Соотнесение экспериментально полученных и теоретически рассчитанных масс триптических пептидов белка SAASoti осуществляли при помощи программы Mascot [5]. Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия), созданы пик-листы htm формата. При помощи программы Mascot (опция «пептидный фингерпринт») провели формальный поиск в домашней базе данных, куда предварительно были внесены последовательности искомого белка в полноразмерной и процессированной форме. Поиск проводили с указанной выше точностью, с учетом возможных модификаций остатков лизина и аминокислотной группы N-конца белка янтарным

ангидридом, образования гетероцикла в сайте флуорофора и возможного окисления метиониновых остатков кислородом воздуха. Тип протеолиза указывали триптический, но предполагали значительное (до 5-ти подряд) количество пропусков в работе фермента из-за внесенных на остатки лизина SAASoti модификаций. □Для подтверждения наличия либо отсутствия модификаций янтарным ангидридом определенных остатков лизина были получены спектры фрагментации отдельных пептидов. С использованием программного обеспечения Biotoools 3.2 (Bruker Daltonics, Германия) проведен дополнительный анализ данных по объединенным MS+MS/MS результатам.

Результаты и обсуждение

Для того, чтобы установить, какие именно из ε-аминогрупп модифицированы, аликвота с модифицированным SAASoti была трипсинизирована. Триптические пептиды, полученные в результате гидролиза, были проанализированы на MALDI TOF/TOF. Трипсин расщепляет полипептидную цепь после остатков лизина и аргинина. В случае модификации лизина, вместо аминогруппы, боковая цепь лизина будет оканчиваться карбоксильной группой. Трипсин не может расщепить цепь после такого остатка из-за стерических затруднений [6]. В случае модификации ε-аминогруппы янтарным ангидридом, лизин получает добавку к весу 100,7 Да.

В полученном наборе триптических пептидов с помощью MALDI удалось расшифровать 29 пиков масс. Последовательности расшифрованных триптических пептидов представлены на рисунке 1.

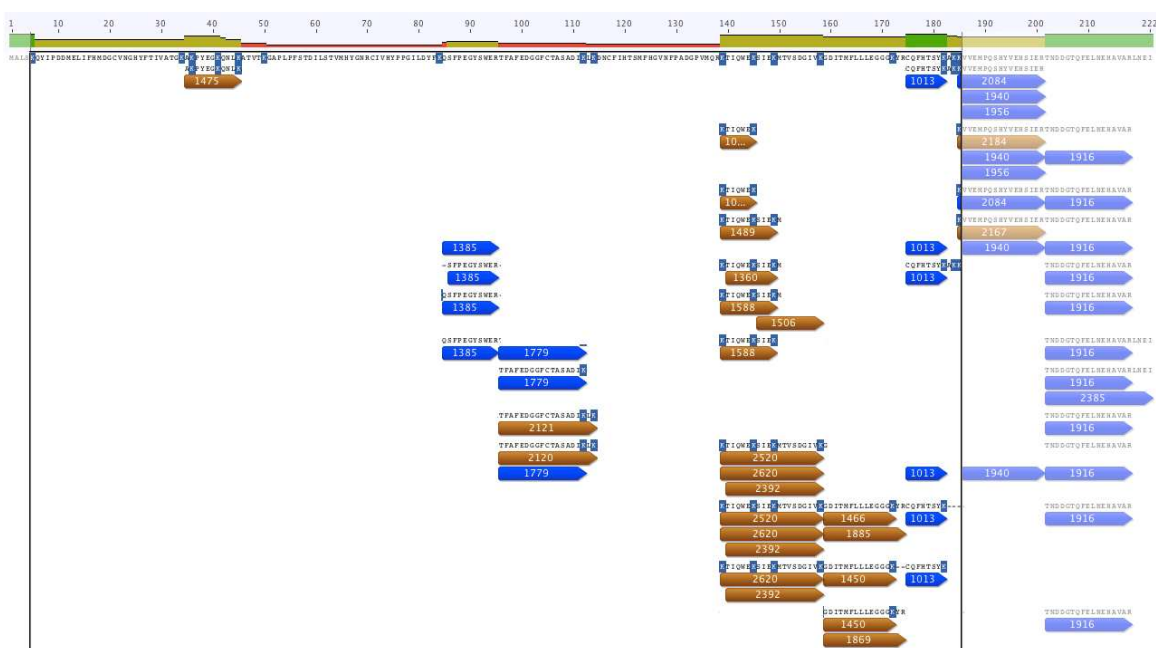


Рисунок 1. Карта расположения пиков масс триптических пептидов относительно последовательности белка SAASoti. В верхней строке отображена последовательность

исходного белка. Лизины контрастированы синим фоном. Триптические пептиды отображены синими и оранжевыми полосками с подписанными на них массами пика в Дальтонах. Массы пиков, отображенных синими полосками, совпадают с расчетными массами. Массы пиков, отображенных оранжевыми полосками, отличаются от расчетных на массу кратную 100,7 Да.

Расшифрованные триптические пептиды содержат 47% последовательности SAASoti, что можно наблюдать на рисунке 2. Однако лизины в последовательности SAASoti распределены неравномерно и 12 из 17 лизинов оказались в триптических пептидах, расшифрованных на МАЛДИ.

В наборе расшифрованных пиков были выделены те, которые имеют прибавку к массе кратную 100,7 Да к теоретической совокупной массе аминокислот. Массы этих пиков также присутствуют в таблице 1. Всего было получено 7 пиков с единичной модификацией лизина, 4 пика с двойной модификацией и 1 с тройной модификацией.

**MALSKQYIPDDMELIFHMDGCVNGHYFTIVATGKAKPYEGKQNLKATVTKGAPLPFSTDILSTVMHYG
NRCIVNHYPPGILDYFKQSFPEGYSWERTFAFEDGGFCTASADIKLKDNCFIHTSMFHGVNFPADGPVM
QRKTIQWEKSIEKMTVSDGIVKGDITMFLLEGGGKYRCQFHTSYKAKKVVEMPQSHYVEHSIERTND
DGTQFELNEHAVARLNEI**

Рисунок 2. Аминокислотная последовательность белка SAASoti. Жирным шрифтом отмечены лизины. Серым фоном отмечены части последовательности расшифрованной с помощью МАЛДИ

Сравнение полученного набора масс с теоретическими весами триптических пептидов позволяет утверждать, что модификации подверглись остатки лизина 36, 41, 112, 139, 145, 149, 172 и 185.

Выводы

Представленный метод идентификации модификации боковой цепи аминокислоты с помощью масс-спектрометра MALDI TOF/TOF может быть использован для практических задач.

Работа выполнена при поддержке ЦКП «Прикладные биотехнологии», идентификатор проекта RFMEFI62114X0002.

Список литературы

1. Baslé E., Joubert N., Pucheault M. Protein chemical modification on endogenous amino acids. // Chem. Biol. 2010. Vol. 17, № 3. P. 213–227.

2. Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules // *Anal. Chem.* 1985. Vol. 57, № 14. P. 2935–2939.
3. A. Darbre M.D.W. *Practical Protein Chemistry: A Handbook.* 1986.
4. Prasher D.C. et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein // *Gene.* 1992. Vol. 111, № 2. P. 229–233.
5. MASCOT// <http://www.matrixscience.com/home.html>.
6. Polgár L. The catalytic triad of serine peptidases. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2005. Vol. 62, № 19-20. P. 2161–2172.

Рецензенты:

Курочкин И.Н., д.х.н., профессор, зав. Лабораторией Экобиокатализа кафедры Химической Энзимологии Химического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, г.Москва;

Капельянц А.С., д.б.н., зав. Лабораторией стрессов микроорганизмов института Биохимии им. А.Н. Баха РАН, г.Москва.