

VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE NA PRINCIPU MALDI-TOF PRO STUDIUM PROSTOROVÉ STRUKTURY PROTEINŮ

VOJTĚCH KADLČÍK, MILAN KODÍČEK
a MARTIN HASSMAN

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: kadlcikv@email.cz, milan.kodicek@vscht.cz,
martin.hassman@vscht.cz

Došlo dne 11.IV.2002

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, MALDI-TOF MS, prostorová struktura proteinů

Obsah

1. Hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF
2. Charakterizace proteinů proteolytickým štěpením
3. Výměna vodíkových a deuteriových iontů
4. Specifické modifikace aminokyselinových zbytků
5. Identifikace posttranslačních modifikací
6. Disulfidová struktura proteinů
7. Přímá detekce nekovalentních komplexů
8. Závěr

1. Hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF

V současné době dochází k prudkému nárůstu využití nových metod hmotnostní spektrometrie v oblasti biochemie. Jednou z nejvýznamnějších je v tomto směru metoda na principu MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight – MALDI-TOF MS).

Vzorek pro MALDI-TOF hmotnostní analýzu se připravuje smícháním analytu s přebytkem matrice, což je obvykle slabá organická kyselina. Směs se pak nanese na desku, která se po vysušení vzorku zasune do evakuovaného MALDI-TOF přístroje (obr. 1). K desorpci a ionizaci vzorku dochází ozářením krystalů směsi laserovým pulzem. Význam matrice spočívá v tom, že silně absorbuje laserové záření; teplotní relaxace excitovaných molekul matrice vede k jejímu vypařování, čímž dochází i k přechodu netěkavých molekul analytu do plynné fáze. Zároveň matrice působí jako ionizační činidlo, jelikož protonuje nebo deprotonuje analyt; nejčastěji přitom vznikají molekuly analytu s jednotkovým nábojem. Matrice i intenzita laserového záblesku jsou voleny tak, aby nedocházelo k fragmentaci molekul analytu.

Hmotnost iontu může být obecně určena změřením jeho rychlosti po urychlení v elektrickém poli. V TOF spektrometru se měří čas letu iontu převážně v oblasti s nulovým elektrickým polem po dodání definované kinetické energie. Pulzní laser používaný v MALDI je přitom ideální pro spojení s TOF spektrometrem, neboť přesně určuje okamžik vzniku iontu.

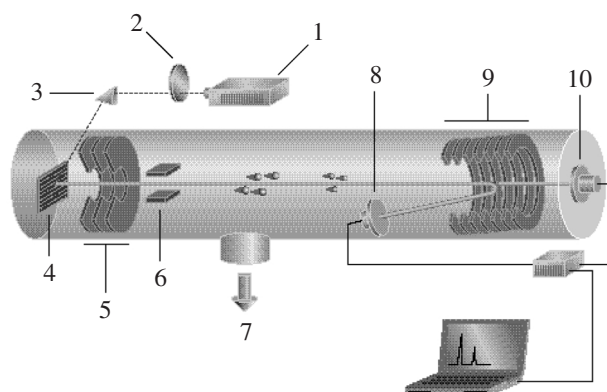
Detektor umístěný na konci separátoru pak měří čas letu každého iontu. Vzhledem k tomu, že částicím se stejným nábojem je urychlením v elektrickém poli dodána stejná kinetická energie, pohybují se lehčí ionty rychleji než těžké. Vztah mezi dobou letu a hmotností iontu je popsán v rovnici (1), kde t je doba letu, U urychlovací napětí, z náboj iontu a m hmotnost iontu. Ze vztahu vyplývá, že skutečně měřenou veličinou není hmotnost, ale poměr hmotnost/náboj pro každý iont. Konstanta v rovnici (1) je pro každé měření určena kalibrací.

$$t = konst. \times \sqrt{\frac{m/z}{U}} \quad (1)$$

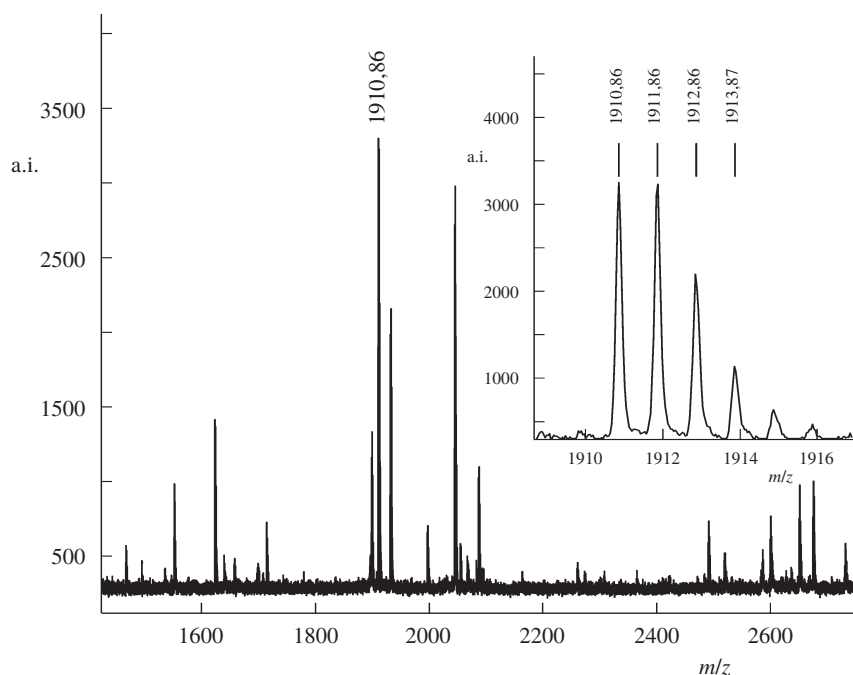
Současné MALDI-TOF spektrometry obsahují další prvky, které významně zvětšují rozlišení přístroje: zpožděnou extrakci iontů (delayed ion extraction) a reflektor. Zpožděná extrakce iontů, která spočívá v malém časovém posunu mezi desorpci vzorku (zábleskem laseru) a aplikací urychlovacího napětí, do značné míry vyrovnává rozdíly v původních rychlostech iontů, které vznikají v průběhu desorpce. Optimální časový posun ovšem závisí na hmotnosti iontu, proto nelze celý hmotnostní rozsah měřit najednou s maximálním rozlišením.

Reflektor využívá elektrostatického pole pro odrazení iontů na druhý detektor v malém úhlu k původnímu směru letu. Rozlišení se zvyšuje jednak prodloužením dráhy letu, jednak zaostřovacím efektem, neboť ionty se stejným poměrem hmotnost/náboj, ale vyšší kinetickou energií, proniknou hlouběji do reflektoru, čímž se prodlouží doba letu vůči iontům s nižší kinetickou energií. Měření v reflektorovém módu je velmi vhodné zejména pro detekci peptidů s molekulovou hmotností menší než 5000 Da. Dosahuje se zde fascinující přesnosti, dovolující bezpečně rozlišit molekuly lišící se např. o jeden neutron (izotopové rozlišení, obr. 2).

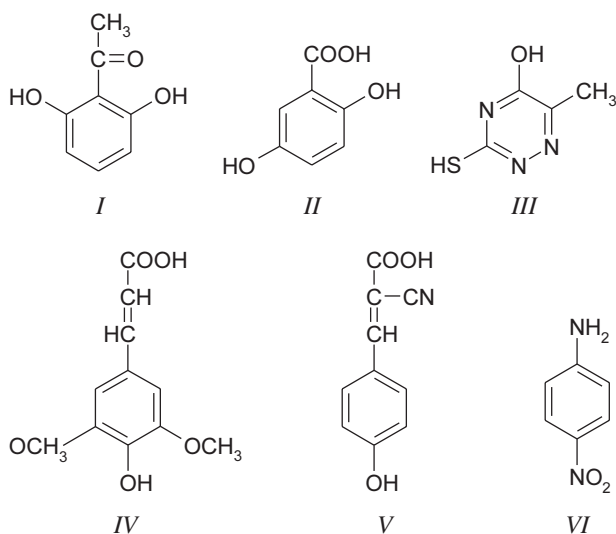
Zrod techniky MALDI-TOF MS lze datovat do roku 1989, kdy spojení ionizátoru MALDI a hmotnostního separátoru



Obr. 1. Schéma MALDI-TOF hmotnostního spektrometru; 1 – laser, 2 – regulační filtr, 3 – optický hranol, 4 – deska se vzorkem, 5 – urychlovací napětí, 6 – deflektor, 7 – vakuové pumpy, 8 – reflektorový detektor, 9 – reflektor, 10 – lineární detektor



Obr. 2. Příklad MALDI-TOF hmotnostního spektra. Lidský sérový albumin po redukcí disulfidových můstků, zablokování thiolových skupin jodacetamidem a štěpení trypsinem. Ve výřezu izotopové rozlišení peptidového iontu (MH⁺) o hmotnosti 1910,86 Da



Obr. 3. Strukturální vzorce matricí zmiňovaných v tomto článku; 2,6-dihydroxyacetofenon (I), 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (II), 6-aza-2-thiothymin (III), 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-skořicová kyselina (IV), α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (V), *p*-nitroanilin (VI)

TOF poprvé použili R. Beavis a B. Chait. Historie obou komponent je ale mnohem delší. Spektrometry TOF se začaly používat v 50. letech, ale kvůli špatnému rozlišení nebyly dále rozvíjeny, a na vývoji techniky MALDI začali její autoři F. Hillenkamp a M. Karas pracovat v roce 1971 (cit.¹). Jejich snaha byla motivována cílem vytvořit hmotnostní spektrometr pro měření spekter proteinů. Původní návrh, vypařování plazmy organického vzorku vysoce výkonným laserem, byl opu-

těn. V roce 1980 ale autoři poprvé upozorovali vliv matrice, když se podařilo současně zaznamenat spektrum alaninu a tryptofanu za podmínek, kdy očekávali pouze desorpci tryptofanu. Ten v dané směsi ovšem fungoval jako matrice pro alanin. Další vývoj šel cestou hledání nejvhodnější kombinace frekvence laseru a matricí, přičemž dnes nepoužívanější dusíkový laser s vlnovou délkou 337 nm se v přístrojích objevil až po roce 1989; struktury matricí, o nichž je zmínka v tomto přehledu, jsou uvedeny na obrázku 3. Zvyšování rozlišení separátoru TOF bylo umožněno rozvojem digitální techniky, přelomovým okamžikem pak bylo znovuobjevení a využití zpožděné extrakce iontů v roce 1995.

V oblasti biologických věd je MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie v současné době využívána především k detekci a identifikaci proteinů², sekvenaci DNA (cit.³), identifikaci bodových mutací⁴, sekvenaci peptidů⁵ a identifikaci bakteriálních kmenů⁶.

Ke studiu prostorové struktury proteinů byla zpočátku technika MALDI-TOF MS využívána pouze ojediněle, avšak postupně bylo vyvinuto několik metod, přičemž téměř každou z nich lze použít ke studiu několika úrovní struktury proteinů (např. struktura aktivního místa enzymu nebo vazebného místa proteinu, posttranslační modifikace, stabilita proteinů, odhad prostorové struktury, tvorba nekovalentních komplexů). Z tohoto důvodu je následující přehled tříděn převážně podle principu metody s příklady jednotlivých použití.

2. Charakterizace proteinů proteolytickým štěpením

Základem pro identifikaci bílkoviny nebo získání podrobnějších informací o její struktuře pomocí MALDI-TOF MS je

specifické enzymové nebo chemické štěpení proteinu a měření hmotnostních spekter proteolytických štěpů. Jednotlivým píčkům ve spektru pak lze přiřadit sekvenční peptidy, a to porovnáním hmotností štěpů získaných experimentálně s hmotnostmi odvozenými na základě znalosti primární struktury proteinů a štěpicích míst. Z tohoto důvodu je proteolytické štěpení součástí téměř všech dále uvedených metod. Nicméně už z průběhu samotného štěpení lze získat – vzhledem k jednoduchosti postupu – velmi zajímavé poznatky o stabilitě a konformaci proteinů. Nativní bílkoviny jsou obvykle odolné proti proteolýze, ale odolnost významně klesá již při částečném rozbalení molekuly^{7,8}. Studium časové závislosti proteolýzy lysozymu a cytochromu c v různých koncentracích guanidinydrochloridu bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací denaturačního činidla se nejen urychluje proteolýza, ale mění se také složení uvolňovaných fragmentů⁹. To umožňuje zřetelné rozlišení denaturačních stavů i při malých změnách koncentrace denaturačního činidla.

Obdobná metoda byla využita pro studium konformace Cdk inhibitoru p21 (cit.¹⁰), kdy bylo zjištěno, že koncentrace denaturačního činidla nemá vliv na průběh proteolýzy, a protein tudíž nemá rigidní strukturu. Omezením popsanych metod je samozřejmě stabilita proteolytického enzymu při denaturačních podmínkách, případně je nutné zohlednit pokles jeho aktivity.

Metody proteolytického štěpení bylo také využito při detekci konformačních změn UDP-N-acetylglukosaminolpyruvyltransferasy při vazbě substrátu¹¹, kdy dochází ke zvýšení odolnosti vůči štěpení způsobeném snížením flexibility proteinu.

Poněkud odlišnou aplikací této metody je mapování epitopu antigenu limitovanou proteolýzou komplexu antigen–protilátka¹². Protilátka blokuje přístup k epitopu, peptid tvořící epitop proto není na rozdíl od zbytku molekuly štěpen. Po odstranění proteolytických fragmentů a disociaci komplexu lze peptidy, účastnící se na výstavbě antigenní determinanty, s výhodou analyzovat technikou MALDI-TOF MS.

3. Výměna vodíkových a deuteriových iontů

Isotopová výměna se běžně používá při získávání informací o struktuře peptidů a bílkovin. Principem této metody je skutečnost, že amidové protony proteinu se mohou vyměňovat s protony rozpouštědla. Pokud rozpouštědlo obsahuje deuteriové ionty, dochází k izotopové výměně, ta je přitom rychlejší v povrchových amidových skupinách. Kromě NMR je hlavní detekční technikou výměny hmotnostní spektrometrie na principu elektropray ionizace (ESI MS). MALDI-TOF MS byla pro detekci výměny vodíkových iontů za deuteriové použita poprvé v roce 1998, modelovým proteinem byla cAMP-dependentní proteinkinasa¹³. Deuterace byla provedena přidávkou D₂O a po okyselení roztoku byl protein štěpen pepsinem. V kyselém prostředí je omezena zpětná výměna izotopů, která snižuje reprodukovatelnost experimentu, a díky tomu se podařilo detegovat zastoupení deuteria v jednotlivých proteolytických fragmentech, a tak odhadnout intezitu kontaktu jednotlivých částí molekuly proteinu s rozpouštědlem. Jiným přístupem k omezení zpětné výměny je použití deuterované matrice¹⁴. Metody výměny H/D bylo také použito pro detekci konformačních změn peptidů bradykininu, melittinu a hormo-

nu stimulujícího α -melanocyty při přidávku D₂O do roztoků uvedených peptidů v různých organických rozpouštědlech¹⁵. S rostoucí polaritou rozpouštědla docházelo k rozvolňování struktury peptidů, a tím i k intenzivnější izotopové výměně.

Stejně výsledky jako výměna H/D poskytuje postup opačný, kdy je protein plně deuterován za denaturačních podmínek a po renaturaci dochází k výměně D/H. Výhodou této metody je, že zpětná výměna neovlivňuje negativně výsledek, ale na druhou stranu je omezena na proteiny s vratnou denaturací¹⁴. Výměny D/H bylo využito k identifikaci vazebných míst pro ATP a inhibitor cAMP-dependentní proteinkinasy¹⁶. Protein je deuterován, zpětná výměna probíhá za přítomnosti ligandů. Po okyselení je protein štěpen pepsinem a proteolytické fragmenty analyzovány MALDI-TOF MS. Části peptidového řetězce, které se účastní vazby, jsou méně přístupné rozpouštědlu, zpětná výměna probíhá pomaleji a obsah deuteria v nich zůstane vyšší.

4. Specifické modifikace aminokyselinových zbytků

Použití MALDI-TOF MS pro detekci chemických reakcí představuje rychlou a efektivní metodu pro určování prostorové struktury proteinů. Obecný postup lze popsat následujícími kroky¹⁷: chemická modifikace proteinů, odstranění přebytku modifikačního činidla, štěpení proteinu specifickou proteasou, měření hmotnostních spekter proteolytických fragmentů a určení míst modifikace, interpretace dat ve vztahu k prostorové struktuře proteinu.

Modifikace histidinových zbytků v rhM-CSF- β (Recombinant Human Macrophage Colony-Stimulating Factor β) pomocí diethylpyrokarbonátu bylo využito ke zjištění úlohy histidinů v interakci ligand–receptor¹⁸. Tryptické štěpy rhM-CSF- β byly identifikovány MALDI-TOF MS, správnost identifikace byla ověřena Edmanovým odbouráváním po rozdělení na HPLC. Modifikace histidinových zbytků byla doprovázena 80–90 % ztrátou vazebné aktivity, což dokázalo účast histidinových zbytků ve vazebné interakci. Reaktivita jednotlivých histidinových zbytků s modifikačním činidlem se zvyšovala s jejich povrchovou dostupností vypočtenou na základě krystalografických údajů. Modifikační specifita diethylpyrokarbonátu a vliv reakčních podmínek pak byly testovány na inzulinu a angiotensinu II (cit.¹⁹). Studie ukázala, že již v malé molekule inzulinu jsou významné rozdíly v reaktivitě histidinových zbytků, které lze vysvětlit rozdílnými strukturálními povrchovými rysy. K detekci modifikací byla kromě MALDI-TOF MS použita ESI MS.

Chemické modifikace lysinových zbytků pomocí anhydridu kyseliny jantarové a jejich detekce MALDI-TOF MS bylo využito pro rozlišení konformačních stavů nativního a ve vodě rozpuštěného porinu *Rhodobacter capsulatus*^{20,21}. Bylo zjištěno, že při modifikaci nativního porinu dochází k sukcinylaci tří lysinových zbytků na vnitřní straně kanálu, zatímco modifikace ve vodě rozpuštěného porinu vede k sukcinylaci tří jiných lysinových zbytků, které jsou v nativním proteinu nepřístupné. Rentgenovou krystalografií bylo ověřeno, že modifikace nezpůsobuje změnu prostorové struktury porinu.

MALDI-TOF MS byla také testována pro detekci peptidů obsahujících nitrovaný tyrosin²². Předchozí výzkumy ukázaly, že hladina nitrovaných proteinů se zvyšuje při některých one-

mocněních, např. při Alzheimerově chorobě a atherosklerose. Modelové peptidy byly vytvořeny tryptickým štěpením hovězího sérového albuminu nitrovaného tetranitromethanem. Ukázalo se, že nitrované peptidy poskytují při měření specifickou sérii iontů, jejichž vznik je dán chemickými přeměnami nitrofenolu během desorpce a ionizace.

Informaci o vzájemných vzdálenostech povrchových aminokyselin lze získat použitím bifunkčních činidel, která vedou k prokřížení aminokyselinových zbytků. Bifunkční činidla pro lysin byla použita např. pro získání informací o struktuře CMP-NeuAc syntetasy, HIV-1 integrasy¹⁷ a acetylcholinového receptoru²³. Jako bifunkční činidlo byl použit bissulfosukcinimidylsuberát, respektive dimethylsuberimát. Bifunkční činidla mohou vytvářet i mezimolekulové vazby, přítomnost náhodně spojených peptidů by ovšem ztěžovala hmotnostní analýzu. Proto byla po modifikaci reakční směs přečištěna gelovou chromatografií²³.

Jako bifunkční činidla pro cysteinové zbytky byly testovány deriváty arsenitých kyselin²⁴ (melarsen oxid, 4-aminofenylarsenitá kyselina a pyridinyl-3-arsenitá kyselina), a to na redukovaném hovězím pankreatickém inhibitoru trypsinu a redukovaném peptidu oxytocinu. Proteolytické štěpení po modifikaci bylo provedeno přímo na MALDI-TOF terči přidáním roztoku enzymu. Nejlepším z použitých činidel se ukázal být melarsen oxid z důvodů vysoké rozpustnosti a také poměrně vysoké molekulové hmotnosti.

Obdobně lze MALDI-TOF MS použít pro určení míst modifikace u proteinů, které byly pro další použití stabilizovány prokřížením. Příkladem je identifikace míst modifikace oxyhemoglobinu, ve kterém byly lysinové zbytky prokříženy bis(3,5-dibromosalicyl) sukcinátem²⁵. Význam takto upravených hemoglobinů spočívá v možném využití jako krevní náhrady.

Metodu detekce chemických modifikací pomocí MALDI-TOF MS lze, podobně jako metodu proteolytického štěpení, využít k mapování epitopů²⁶. Výhodou metody modifikačních reakcí však je, že umožňují charakterizaci konformačních epitopů, nikoliv pouze lineárních. Jako modelový systém byl použit lysozym vaječného bílku a odpovídající monoklonální protilátka typu IgM. Použitými modifikačními reakcemi byla jodace tyrosinu, acetylace lysinu a modifikace argininu 1,2-cyklohexandionem. Epitop byl identifikován na základě rozdílů mezi modifikací komplexu antigen–protilátka, ve kterém jsou aminokyselinové zbytky epitopu chráněny proti modifikaci protilátkou, a modifikací samotného lysozymu. Přesnost vymezení epitopu je dána hustotou modifikovaných aminokyselin na povrchu proteinu a počtem provedených modifikací.

5. Identifikace posttranslačních modifikací

MALDI-TOF MS je také využívána k detegování proteinů modifikovaných *in vivo*, tedy k identifikaci posttranslačních modifikací. Určení míst posttranslačních modifikací pak přispívá k poznatkům o prostorové struktuře proteinů. Nutnou podmínkou je opět znalost primární struktury proteinů. MALDI-TOF MS a ESI MS byly použity k určení míst fosforylace a glykosylace hovězího chromograninu A z dřeneš nadledvinek²⁷ na základě porovnání hmotností proteolytických štěpů nativního a defosforylovaného nebo deglykosylovaného chromograninu A. Směs tryptických štěpů proteinu byla vzhledem

k velkému počtu štěpicích míst pro jednoznačnou identifikaci peptidů příliš složitá, proto bylo nejprve provedeno štěpení bromkyanem, rozdělení na koloně s reverzní fází a poté tryptické štěpení. Takto zjednodušené směsi bylo již možné přímo analyzovat hmotnostní spektrometrií.

Fosforylační místa kaseinomakropeptidu byla identifikována MALDI-PSD-MS (PSD – post source decay) (cit.²⁸). Ukázalo se, že fosforylované serinové zbytky jsou během PSD nestabilní, ztrácejí fosfátovou skupinu a fosfoserin se mění na dehydroalanin, který je ve spektru detegován. To je rozdíl oproti fosfotyrosinu, který je při PSD stabilní. Jiným příkladem je porovnání fosforylace parafusinu *in vivo* a *in vitro* peptidovým mapováním proteinu pomocí MALDI-TOF MS (cit.²⁹).

Jako příklad využití MALDI-TOF MS pro studium glykosylace lze uvést určení míst N-glykosylace a velikosti oligosacharidů kvasničné invertasy³⁰ nebo studium heterogenity glykosylace lidského interferonu γ (cit.³¹).

6. Disulfidová struktura proteinů

Disulfidová struktura proteinů je součástí jejich kovalentní struktury, ale zároveň vypovídá o prostorovém uspořádání proteinů, zejména u proteinů s velkým počtem disulfidových můstků. Disulfidovou strukturu proteinů s malým počtem cysteinových zbytků lze pomocí MALDI-TOF MS určit na základě analýzy proteolytických štěpů. Takto byly například identifikovány tři disulfidové můstky lidské β -hexosaminidasy B (cit.³²). Při vyhodnocování spekter proteolytických štěpů je ovšem nutné brát v úvahu zvláštní chování disulfidových vazeb během ionizace. Při použití α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny a 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny jako matric a při vyšších intenzitách laseru totiž dochází ke štěpení disulfidových vazeb a příslušné peptidy pak svými hmotnostmi odpovídají redukovaným³³.

Pro proteiny s velkým počtem disulfidových vazeb lze k jejich identifikaci využít kombinaci MALDI-TOF MS a N-koncové sekvenace peptidů. Touto metodou byla určena disulfidová struktura extracelulární domény lidského epidermálního receptoru pro růstový faktor, která obsahuje 25 disulfidových vazeb³⁴. Izolovaná doména byla štěpena bromkyanem a sérií proteas; po každém štěpení byly fragmenty izolovány pomocí HPLC a identifikovány hmotnostní spektrometrií a sekvenováním. Znalost disulfidové struktury umožnila navrhnout prostorový model domény.

7. Přímá detekce nekovalentních komplexů

MALDI-TOF MS byla dlouhou dobu považována za nevhodnou techniku pro detekci nekovalentních komplexů, a proto byla k tomuto účelu použita až v roce 1995 (cit.³⁵). Postupně se však metoda podařilo aplikovat k detekci komplexů protein–sulfonové barvivo^{36,37}, protein–kovový iont³⁵, protein–peptid^{35,38} a protein–protein^{38,39}. Hlavním problémem je zajistit, aby komplexy, které se tvoří v roztoku, byly zachovány i po vykrytalizování směsi vzorek–matrice na terči. Jak bude blíže popsáno dále, nejdůležitější obměnou standardního postupu přípravy vzorku je použití neutrální matrice nebo kyselá matrice neutralizovaná přidáním vzorku. Pro úspěšnou

detekci specifických komplexů protein–protein a protein–peptid je předpokladem zachování terciární struktury proteinu.

Komplexy několika modelových peptidů a proteinů se sulfonovými barvivy (Cibacron blue F3GA a Direct Yellow 50) byly detegovány pomocí MALDI-TOF MS za použití *p*-nitroanilinu jako matrice³⁶. Bylo dokázáno, že v komplexu interagují sulfonátový anion a kladně nabitě (bazické) postranní řetězce aminokyselin. Počet navázaných molekul barviva odpovídal počtu dostupných bazických skupin modelových molekul, a metodu je proto možno využít ke zjištění počtu povrchových bazických skupin proteinů. V návazné studii byla testována celá řada dalších sulfonátů³⁷. Zajímavé byly jednodušší sulfonáty (např. naftalen-1,5-disulfonová kyselina), které se vázaly pouze k argininu a kterých je tedy možné použít jako specifických „modifikačních“ činidel.

Neutrální roztok α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny byl použit jako matrice pro detekci komplexu zinečnatých iontů a zinek vázících peptidů (zinc finger peptides)³⁵. V kyselém prostředí totiž dochází k vytěsnění zinečnatého iontu z komplexu protony rozpouštědla. Ve stejné studii bylo použito neutrálního roztoku 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicové kyseliny jako matrice pro detekci komplexu enzym–substrát (aminopeptidasa I a peptid).

Další možností je použití 6-aza-2-thiothyminu jako matrice bez dalších organických rozpouštědel³⁸; pomocí níž byly detegovány nekovalentní komplexy RNasy S a dimerů některých peptidů (leucine zipper polypeptides).

Možnosti MALDI-TOF MS pro měření nekovalentních komplexů protein–protein byly studovány u proteinů tvořících v roztoku homooligomery (streptavidin, kvasničná alkoholdehydrogenasa a hovězí jaterní katalasa)³⁹. Jako nejvhodnější matrice se v tomto případě ukázal být 2,6-dihydroxyacetofenon rozpuštěný v tetrahydrofuranu (byl ale použit laser o vlnové délce 355 nm). Podařilo se detegovat tetramery všech tří proteinů, přičemž intenzita píku komplexu byla vždy větší než intenzita píku monomerů. Právě poměr intenzit je důležitý pro odlišení přirozených komplexů a aduktů, které běžně vznikají při měření. Intenzita píků těchto aduktů totiž bývá daleko menší než intenzita píku monomeru. Velmi zajímavou, ale těžko vysvětlitelnou skutečností, byla závislost charakteru spektra na způsobu měření. Pík komplexu byl totiž intenzivní jen při první stře laseru do jednoho místa; při dalších střelách jeho intenzita významně klesala. Přes úspěšnost detekce uvedených komplexů nelze popsání postup považovat za univerzálně použitelný, což lze ilustrovat skutečností, že se autorům nepodařilo detegovat velmi silný komplex streptavidin–biotin.

MALDI-TOF MS je také využívána k detekci komplexů protein–DNA. Jako matrice byly použity např. 6-aza-2-thiothymin⁴⁰ a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina⁴¹. Vzhledem k iontové povaze interakce protein–DNA je pro tvorbu komplexů opět určující zvolené pH (cit.⁴¹).

8. Závěr

Z uvedených příkladů vyplývá, že MALDI-TOF MS lze využít pro řešení širokého spektra problémů prostorové struktury proteinů. Výhodou těchto metod je zejména jejich rychlost a jednoduchost. Na druhé straně byly popsány metody často použity pouze pro omezený počet modelových proteinů

a aplikace na reálné problémy, případně spojení jednotlivých metod pro komplexní charakterizaci proteinů s neznámou strukturou, stále zůstává zajímavou výzvou.

Práce vznikla s podporou grantu Grantové agentury České republiky 203/02/0922.

LITERATURA

- Hillenkamp F., Karas M.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 200, 71 (2000).
- Lamer S., Jungblut P. R.: *J. Chromatogr., B* 752, 311 (2001).
- Wang B. H., Hopkins C. E., Belenky A. B., Cohen A. S.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 169/170, 331 (1997).
- Griffin T. J., Smith L. M.: *Trends Biotechnol.* 18, 77 (2000).
- Franzen J., Frey R., Holle A., Krauter K.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 206, 275 (2001).
- Baar B.: *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 193 (2000).
- Yang H. J., Tsou C. L.: *Biochem. J.* 305, 379 (1995).
- Fontana A., Zamboni M., Laureto P. P., Filippis V., Clementi A., Scaramella E.: *J. Mol. Biol.* 266, 223 (1997).
- Yang H. H., Li X. C., Amft M., Grottemeyer J.: *Anal. Biochem.* 258, 118 (1998).
- Kriwacki R. W., Wu J., Tennant L., Wright P. E., Siuzdak G.: *J. Chromatogr., A* 777, 23 (1997).
- Krekel F., Oecking C., Amrhein N., Macherous P.: *Biochemistry* 38, 8864 (1999).
- Water J., Deininger S. O., Macht M., Przybylski M., Gersgwin M. E.: *Clin. Immunol. Immunopathol.* 85, 229 (1997).
- Mandell J. G., Falick A. M., Komives E. A.: *Anal. Chem.* 70, 3987 (1998).
- Villanueva J., Canals F., Villegas V., Querol E., Avilés F. X.: *FEBS Lett.* 472, 27 (2000).
- Figueroa I. D., Russell D. H.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 719 (1999).
- Mandell J. G., Falick A. M., Komives E. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14705 (1998).
- Gibson B. W., Kuntz I. D., Tang N., Dollinger G., Oshiro C. M., Hempel J. C., Taylor E.: *PCT Int. Appl. WO* 2000-072004; *Chem. Abstr.* 134, 27293 (2001).
- Gocker M. O., Kalkum M., Yamamoto R., Schreurs J.: *Biochemistry* 35, 14625 (1996).
- Kalkum M., Przybylski M., Glocker M. O.: *Bioconjugate Chem.* 9, 226 (1998).
- Buhler S., Schnaible V., Glocker M. O., Michels J., Zeth K., Walte W., Przybylski M.: *Adv. Mass Spectrom.* 14, C017030/1 (1998).
- Walte W., Diederchs K., Przybylski M., Glocker M. O., Benz R., Breed J.: *NATO ASI Ser., Ser. C* 510, 239 (1998).
- Sarver A., Scheffler N. K., Shetlar M. D., Gibson B. W.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 439 (2001).
- Watty A., Weise C., Dreger M., Franke P., Hucho F.: *Eur. J. Biochem.* 252, 222 (1998).
- Happersberger H. P., Przybylski M., Glocker M. O.: *Anal. Biochem.* 264, 237 (1998).

25. Yang T., Horejsh D. R., Mahan K. J., Zaluzec E. J., Throck J. W., Gage D. A.: *Anal. Biochem.* 242, 55 (1996).
26. Fiedler W., Borchers C., Macht M., Deininger S. O., Przybylski M.: *Bioconjugate Chem.* 9, 236 (1998).
27. Bauer S. H. J., Zhang X., Dongen W., Clayes M., Przybylski M.: *Anal. Biochem.* 274, 69 (1998).
28. Talbo G. H., Suckau D., Malkoski M., Reynolds E. C.: *Peptides* 22, 1093 (2001).
29. Kussmann M., Hauser K., Kissmehl R., Brees J., Plattner H., Roepstorff P.: *Biochemistry* 38, 7780 (1999).
30. Zeng C., Biemann K.: *J. Mass Spectrom.* 34, 311 (1999).
31. Harmon B. J., Gu X., Wang D. I.: *Anal. Chem.* 68, 1465 (1996).
32. Schuette C. G., Weisgerber J., Sandhoff K.: *Glycobiology* 11, 549 (2001).
33. Patterson S. D., Katta V.: *Anal. Chem.* 66, 3727 (1994).
34. Abe Y., Odaka M., Inagaki F., Schlessinger J., Kohda D.: *J. Biol. Chem.* 273, 11150 (1998).
35. Woods A. S., Buchsbaum J. C., Worrall T. A., Berg J. M., Cotter R. J.: *Anal. Chem.* 67, 4462 (1995).
36. Salih B., Zenobi R.: *Anal. Chem.* 70, 1536 (1998).
37. Friess S. D., Zenobi R.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, 810 (2001).
38. Glocker M. O., Bauer S. H. J., Kast J., Volz J., Przybylski M.: *J. Mass Spectrom.* 31, 1221 (1996).
39. Cohen L. R. H., Strupart K., Hillenkamp F.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8, 1046 (1997).
40. Lin S., Cotter R. J., Woods A. S.: *Proteins Suppl.* 2, 12 (1998).
41. Tang X., Callahan J. H., Zhou P., Vertes A.: *Anal. Chem.* 67, 4542 (1995).

V. Kadlčík, M. Kodíček, and M. Hassman (*Department of Environmental Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Utilization of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Study of Spatial Structure of Proteins**

MALDI-TOF MS, a technique developed in the late 1980's, is today a routine method for detection and identification of proteins but its utilization for study of spatial structure of proteins is ever-growing. The main approaches are detection of chemical and post-translational modifications of proteins, characterization of protein structure by proteolysis, detection of protium-deuterium ion exchange, characterization of the disulfide structure of proteins and direct detection of non-covalent complexes. MALDI-TOF is thus the technique that can replace some much more time-consuming and experimentally demanding methods but it can also afford information inaccessible by other methods.