

VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

TESTING METHODS

STABIL IZOTÓPPAL JELÖLT REAGENSEK ALKALMAZÁSA A KVANTITATÍV PROTEOMIKÁBAN APPLYING STABLE ISOTOPE LABELLING REAGENTS IN THE QUANTITATIVE PROTEOMIC

LOVRITY ZITA, EMMER JÁNOS, JUHÁSNÉ SZALAI ADRIENN, KOSKA PÉTER, FODOR BERTALAN

Kulcsszavak: kvantitatív proteomika, tömegspektrometria, stabil izotóppal jelölt reagensek

Keywords: quantitative proteomics, mass spectrometry, stable isotope labelled reagents

ÖSSZEFOGLALÁS

Az utóbbi néhány évtizedben megvalósult technikai újításoknak köszönhetően a proteomikai kutatások az egyedi proteinkarakterizálástól eljutottak a komplex biológia mechanizmusok kiterjedt kvalitatív és kvantitatív leírásáig. A proteinek mennyiségi meghatározásának egyik lehetséges módszere azok stabil izotópokkal történő jelölése. Több ilyen eljárást alkalmaznak a proteomikai kutatásokban. Ebben az összefoglalóban a legelterjedtebben alkalmazott jelölési módszereket mutatjuk be: sejtkultúrák stabil izotópot tartalmazó aminosavakkal történő jelölése (SILAC); izotóppal kódolt affinitás alapján történő jelölés (ICAT), enzimkatalizált ^{18}O -t tartalmazó reagenssel való jelölés és azonos tömegű oldalláncokat tartalmazó reagensek alkalmazása relatív és abszolút mennyiségi meghatározásra (iTRAQ).

Abstract

Over the last few decades due to the technological innovations proteomic research have led from the single protein characterization methods to the qualitative and quantitative analysis of the complex biological (biochemical) mechanisms. Stable isotope labelling of proteins is one of the possible processes for quantitative determination of proteins. Several methods are used in proteomics research. In this review we will demonstrate the most widely used labelling methods: stable isotope labelling by amino acid (SILAC), isotope coded affinity tag (ICAT), enzyme-catalyzed ^{18}O isotope labelling and isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ).

BEVEZETÉS

Biológiai folyamatokban rendkívül fontos szerepet játszik a sejten belül lévő proteinek dinamikus változása. Komplex biológiai minták kvalitatív és kvantitatív analizésére elsődlegesen alkalmazott módszer a tömegspektrometria (MS Mass Spectrometry). Az utóbbi néhány évtizedben a tömegspektrometriában alkalmazott technika óriási fejlődésen ment keresztül. Megjelentek a piacon a

Lovrity Zita dr., Emmer János dr., Juhászné Szalai Adrienn, Koska Péter, Fodor Bertalan dr.: Miskolci Egyetem, Egészségügyi Kar, Nanobiotechnológiai és Regeneratív Medicina Tanszék

hibrid vagy más néven tandem készülékek (LC/MS/MS Liquid Chromatography/Mass Spectrometry), melyek segítségével aminosav szekvencia és poszt-transzlációs módosítások is meghatározhatók.

A proteinek mennyiségi meghatározása nem egyszerű feladat, mert nehéz használni a mérések során belső sztenderdeket a minta-előkészítés következtében fellépő protein visszanyerések különbözősége miatt. Két alternatív módszert alkalmaznak a kvantitatív proteomikában: a jelölés nélküli reagensek és a stabil izotóppal jelölt reagensek segítségével történő mennyiségi meghatározás.

Az izotópot nem tartalmazó eljárás a vizsgált proteinek megbízhatóan összehasonlítható analízisén alapszik, ami így nagymértékben függ az LC/MS/MS mérések ismételtől [1,2].

Napjainkban a kvantitatív proteomika elsődleges módszere a stabil izotóppal jelölt reagensek alkalmazása tömegspektrometriás analízissel. Többféle módszer terjedt el a gyakorlatban, attól függően, hogy milyen típusú proteineket vizsgálnak. Ezen mérési módszerek azt használják ki, hogy a nagyfelbontású tömegspektrométerek segítségével ugyanazon protein izotóppal jelölt és nem jelölt változata megkülönböztethető. A mennyiségi analízis során egy adott tömegspektrumban a két típusú proteinhez (jelölt és nem jelölt) tartozó csúcsintenzitások relatív arányát határozzák meg. Léteznek abszolút mennyiségi meghatározási módszerek is, amelyek szintetikus peptid belső sztenderdként való alkalmazására épülnek [3,4].

Stabil izotópként ^{13}C -t, ^{15}N -t, ^{18}O -t stb. használnak. A stabil izotópot és izotópot nem tartalmazó vegyületek analitikai módszerekkel nem választhatók szét, de a tömegspektrumban könnyen megkülönböztethetők és mennyiségileg meghatározhatók. A deutérium azonban kivétel, mivel kromatográfián fordított fázisú oszlopon elválik a jelölt és nem jelölt peptid [5].

A relatív mennyiségi meghatározási módszerek két nagy csoportra oszthatók: az *in vivo* és az *in vitro* jelölés. Az *in vivo* jelölések során a sejtkultúrák tenyésztése egy speciális közegben, stabil izotópot tartalmazó aminosavak hozzáadásával

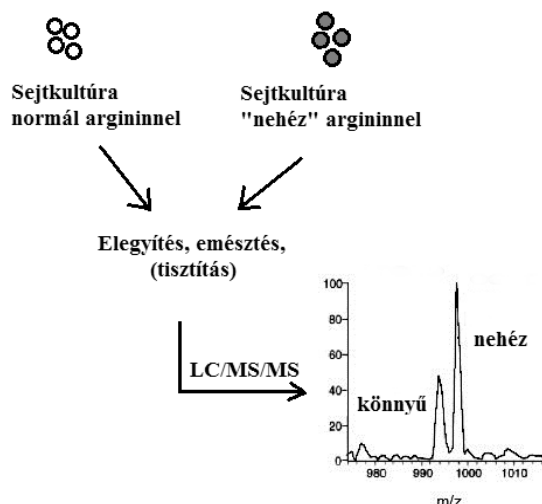
történik. Az első ilyen jellegű kísérletekben baktériumokat tenyésztettek ^{14}N és ^{15}N izotópot tartalmazó közegben [6]. Az in vitro jelölések során az izotópot tartalmazó oldallánc kémiai vagy enzimreakció útján kerül be a peptidláncba.

1. SEJTKULTÚRÁK STABIL IZOTÓPOT TARTALMAZÓ AMINOSAVAKKAL TÖRTÉNŐ JELÖLÉSE (SILAC STABLE ISOTOPE LABELING BY AMINO ACID)

Mann és munkatársai kifejlesztettek egy olyan módszert, melynek során a sejteket egy normál aminosavat és egy jelölt aminosavat tartalmazó kultúrában tenyésztették [7]. A módszer során az aminosavak közül általában a lizint és az arginint jelölik ^{13}C , ^{15}N , ^2H izotópokkal. A nehéz izotópot tartalmazó aminosavak meghatározott idő alatt teljes mértékben beépülnek a sejtekben előállított proteinbe. A következő lépésben a különböző módon jelölt proteineket összekeverik, emésztik, végül tömegspektrometriás módszerrel mérik. A tömegspektrumban lévő, a könnyű és a nehéz izotópot tartalmazó peptidekhez tartozó jelintenzitás arányokból mennyiségi következtetések vonhatók le (1. ábra).

Néhány fontos feltételnek teljesülnie kell a SILAC alkalmazása esetén. A jelölt és a jelöletlen aminosavak tömege között legalább 4 Da eltérésnek kell lenni. Továbbá a sejtek növekedéséhez a módszer során alkalmazott aminosavaknak létfontosságúnak kell lennie.

A módszer előnye a nagy hatékonyságú, kis hibájú jelölés, ezért számos alkalmazási területe létezik [8,9,10] Hátránya viszont a magas költség. Alkalmazhatóságát korlátozza az élő sejt kultúra szükségessége.

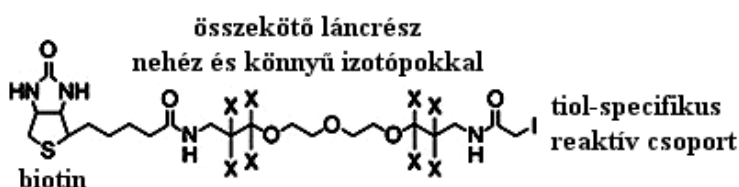


1. ábra. A sejt kultúra in vivo aminosav anyagcseréje

Fig. 1. In vivo amino acid metabolism of cell culture

Izotóppal kódolt affinitás alapján történő jelölés (ICAT Isotope Coded Affinity Tag)

Ez a módszer az egyik legnépszerűbb kémiai származékképzés cisztein tartalmú proteinek vizsgálatára. Az ICAT reagens három részből áll (2. ábra). Tartalmaz egy ún. affinitás oldalláncot, amely arra szolgál, hogy elkülönítse a jelölt peptidet avidin affinitás kromatográfia segítségével. A reagens középső része az összekötő láncrész vagy linker, ami stabil izotópokat tartalmaz. Ezáltal lesz a peptid tömegspektrometriás módszerrel azonosítható. Végül a reaktív csoportot tartalmazó láncvég, amely szelektív tiol-csoportra, így tud reakcióba lépni a cisztein tartalmú peptidekkel.



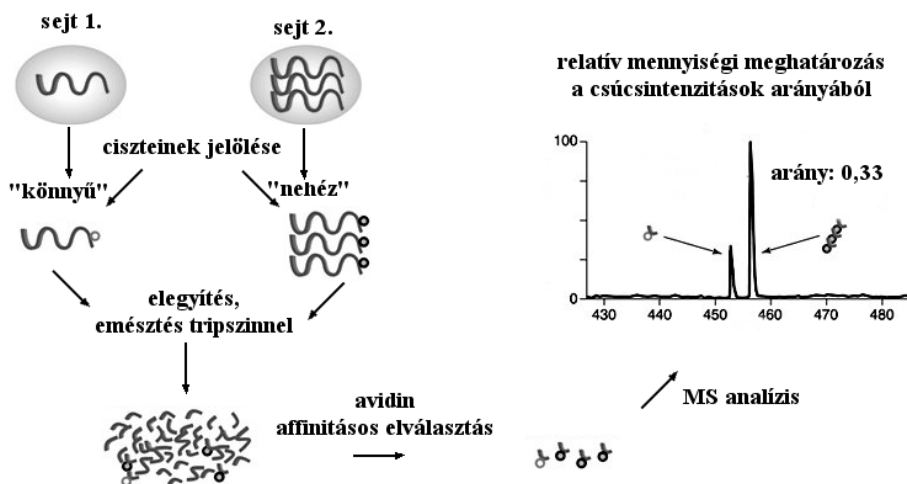
2. ábra. ICAT reagens szerkezete. „Nehéz” reagens: X=deutérium; „könnyű” reagens: X=hidrogén
Fig. 2 Structure of ICAT reagent: „Heavy reagent: X=deuterium; light reagent: X=hydrogen

Eredetileg az ICAT reagensok deutériumot tartalmaztak, de a fordított fázisú folyadékkromatográfiában a könnyű és nehéz izotópot tartalmazó komponensek eltérő retenciós idővel eluálódtak. Ezért a második generációs ICAT reagensok már

^{12}C -, ^{13}C -t tartalmaztak. A legújabb reagensok már egy további csoporttal bővültek. Ez a sav által hasítható csoport a biotin és a jelölt láncrész között található. Így a fragmens ionok szekvenciájának meghatározása egyszerűbbé vált [11,12].

A módszer során sejtkultúrákat hoznak létre elkülönítetten. Majd ezeket denaturálják, redukálják és jelölik a könnyű és nehéz izotópot tartalmazó ICAT reagenssel. Akkor a két sejtcsoportot meghatározott arányban összekeverik és enzimatiskus módszerrel (tripszinnel) hasítják a peptid láncokat.

A jelölt peptideket biotin affinitás kromatográfiával elkülönítik, majd ezt követi a HPLC/MS/MS analízis. A relatív mennyiségi meghatározás a tömegspektrumban lévő ICAT reagenshez tartozó ionintenzitásokból számítható (3. ábra).

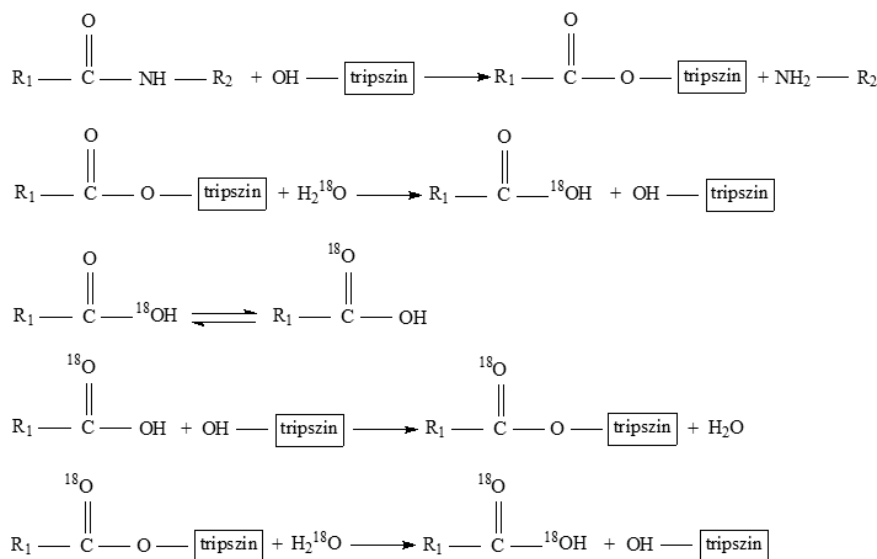


3. ábra. ICAT jelölés [13]
Fig. 3. ICAT labelling [13]

A módszernek számos előnye van. Állati vagy emberi eredetű sejtekből, szövetekből, testnedvekből származó proteinek vizsgálatára alkalmas, az alkilezési reakció nagymértékben specifikus, nem érzékeny sókra, detergensekre. Hátránya a módszernek, hogy a peptidok módosítása megnehezíti az adatbázis alapján történő azonosítást és csak ciszteint tartalmazó proteinekre alkalmazható.

2. ENZIMKATALIZÁLT, ¹⁸O-T TARTALMAZÓ REAGENSSEL VALÓ JELÖLÉS

A módszer során a polipeptid lánc C-terminusán található karboxil-csoport két ¹⁶O-jét cserélik le ¹⁸O-re, ezáltal a jelölt peptid tömege 4Da-nal növekszik. A reakció H₂¹⁸O-t tartalmazó közegben játszódik le, a ¹⁸O a tripszines emésztés után kialakuló észter kötések hidrolízisével kerül a karboxil-csoportba (4. ábra).



4. ábra. ¹⁸O-nel történő jelölés során lejátszódó reakciók
Fig. 4. Reactions of ¹⁸O-labelling

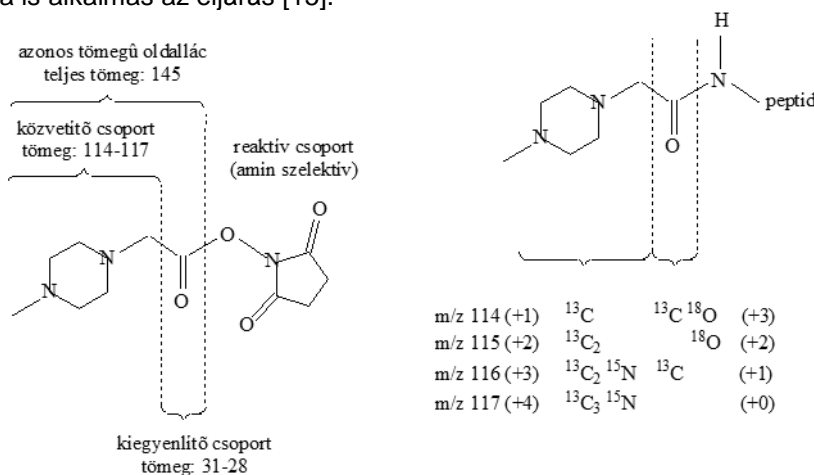
A peptidek majdnem 100%-a jelölhető abban az esetben, ha az enzimatis reakciót 95%-os $H_2^{18}O$ -t tartalmazó közegben hajtják végre. A jelölés hatékonysága függ a pH-tól, az alkalmazott enzim típusától, a peptidek sajátosságaitól, a jelölés időtartamától [14].

A gyakorlatban két módszerrel is megvalósítható ez a típusú jelölés. A közvetlen módszer során az enzimatis emésztés és a jelölési reakció ugyanazon reakció rendszerben történik. Ennek a kivitelezésnek a hátránya, hogy nem teljes mértékben tudnak megjelölni minden karboxil-csoportot. A másik eljárás szerint az emésztési és a jelölési reakciót elkülönítetten hajtják végre. A jelölés hatékonysága nagyobb, mint az előző esetben, viszont időigényesebb, mint a közvetlen jelölés.

A $H_2^{18}O$ -val történő enzimatis jelölés könnyen kivitelezhető, nem igényel különleges reagenseket és előállítási reakciókat. A folyamat független a peptidek aminosav sorrendjétől, ezért poszt-transzlációs módosítások is detektálhatók a módszer segítségével, valamint enzimatis proteolízis vizsgálatára is alkalmas az eljárás [15].

3. AZONOS TÖMEGŰ OLDALLÁNCOKAT TARTALMAZÓ REAGENSEK ALKALMAZÁSA RELATÍV ÉS ABSZOLÚT MENNYISÉGI MEGHATÁROZÁSRA (iTRAQ ISOBARIC TAGS FOR RELATIVE AND ABSOLUTE QUANTIFICATION)

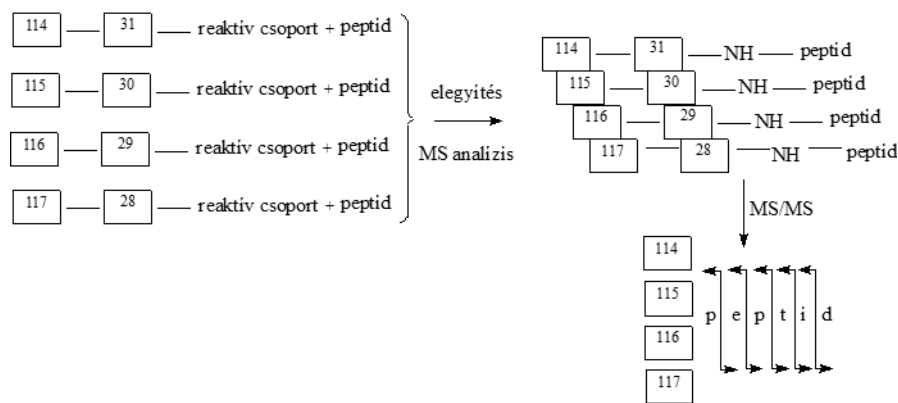
Az izotópos jelölések közül ez a legszélesebb körben, sikeresen alkalmazott módszer. Ezen eljárás során az emésztés után kapott peptid N-terminus és a lizin jelölése történik az iTRAQ reagenssel. A reagens három részre tagolható: a közvetítő (report) csoport, a kiegyenlítő (balanced) csoport és a peptid reaktív csoport (5.ábra). A reaktív csoport reakcióba lép az N-terminális és oldalláncok amino-csoportjával. A közvetítő csoportnak olyan szerkezetűnek kell lennie, hogy legalább 4 különböző tömeggel rendelkezzen. A tömegkülönbséget a nehéz izotópok számának változtatásával érik el. Mindegyik közvetítő csoporthoz tartozik egy meghatározott tömegű kiegyenlítő csoport, hogy biztosítva legyen az oldallánc azonos tömege.



5. ábra. iTRAQ reagens szerkezete [16]
Fig. 5. Structure of iTRAQ reagent

A négy különböző tömegű iTRAQ reagenssel jelölt peptidet összekeverik, az MS analízis során kapott négy m/z érték a különböző tömegű reagenssel jelölt peptidlánchoz tartozik. Majd a következő lépésben, az MS/MS analízis során a közvetítő csoport leszakad a molekuláról, ezek megjelennek négy különböző ionként a tömegspektrumban és a peptid fragmentálódik. A négy peptidlánc relatív koncentrációja számítható a közvetítő ionokhoz tartozó csúcsok intenzitásából.

A módszer mindenképpen tandem (MS/MS) tömegspektrométert igényel, de még így is nehéz a mennyiségi meghatározás a jelöletlen, de azonos tömegű fragmensek jelenléte miatt. Számos alkalmazási területe van ennek a módszernek: plazma protein analízis [17], fibrinopeptidek vizsgálata [18], biomarkerként való alkalmazás rákos sejtek vizsgálatokor [19].



6. ábra. A jelölt peptidek relatív koncentrációjának meghatározása
Fig. 6. Determination of relative concentration of labelled peptides

4. ÖSSZEFOGLALÁS

A proteinek teljes kvalitatív és kvantitatív jellemzése nem egyszerű feladat. Napjainkban a kvantitatív proteomikában az elsődleges módszer a stabil izotópok alkalmazása tömegspektrometriás analízissel. A gyakorlatban alkalmazott eljárásoknak számos előnye és egyben korlátja van. A technika folyamatosan fejlődik, hogy pótolja az eddigi módszerek hiányosságait. A cél az, hogy orvosi biológiai és klinikai gyakorlatban is rutinszerűen alkalmazható legyenek a kvantitatív proteomikai eljárások.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A bemutatott kutató munka a TÁMOP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0001 jelű projekt részeként az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

5. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Haqqani A. S. Kelly J. F. Stanimirovics D. B.: Quantitative protein profiling by mass spectrometry using label-free proteomics. *Methods Mol. Biol.*, 2008, 439, 241-256.
- [2] Andersen J. S. Wilkinson C. J. Mayor T. Mortensen P. Nigg E. A. Mann M.: Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*, 2003, 246, 570-574.
- [3] Kirkpatrick D. S. Gerber S. A. Gygi S. P.: The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modification. *Methods*, 2005, 35, 265-273.
- [4] Brun V. Masselon C. Garin J. Dupuis A.: Isotope dilution for absolute quantitative proteomics. *Proteomics*, 2009, 72, 740-749.
- [5] Ong S. -E. Foster L. J. Mann M.: Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods*, 2002, 29, 124-130.
- [6] Oda Y. Huang K. Cross F. R. Cowburn D. Chait B. T.: Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 6591-6596.
- [7] Ong S. -E. Mann M.: A practical recipe for stable isotope labeling by amino acid in cell culture (SILAC). *Protocol*, 2006, 1(6), 2650-2660.
- [8] Schulze W. X. Mann M.: A novel proteomic screen for peptide protein interaction. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 10756-10764.
- [9] Gruhler A. Olsen J. V. Mohammed S. Mortensen P. et al: Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol. Cell. Proteomics*, 2005, 4, 310-327.
- [10] Ishihama Y. Sato T. Tabata T. Miyamoto N. et al: Quantitative mouse brain proteomics using culture-derived isotope tags as internal standard. *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23, 617-621.
- [11] Zhang H. et al.: Chemical probes and tandem mass spectrometry: a strategy for the quantitative analysis of proteomes and subproteomes. *Current Opinion Chem. Biol.*, 2004, 28, 66-75.
- [12] Li J. Steen H. Gygi S. P.: Protein profiling with cleavable isotope coded affinity tag (cICAT) reagents: the yeast salinity stress response. *Mol. Cell. Proteomics*, 2003, 2, 1198-1204.
- [13] Gygi S. P. Aebersold R.: Using mass spectrometry for quantitative proteomics. *Proteomics: A Trends Guide*, 2000, 31, 36.
- [14] Capelo J. L. Carreira R. J. Frenandes L. et al.: Latest developments in sample treatment for

- ¹⁸O-isotopic labeling for proteomics mass spectrometry-based approaches: A critical review. *Talanta*, 2009, 80, 1476-1486
- [15] Lin-Yi Q. Wan-Tao Y. Xin L. et al.: Establishment and optimization of stable isotope ¹⁸O-labeling strategy for quantitative proteomics research. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2007, 35(2), 161-165.
- [16] Ross P. L. Huang Y. L. N. Marchese J. N. et al.: Multiplex protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics*, 2004, 3, 1154-1169.
- [17] Anderson L. Hunter C. L.: Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol. Cell Proteomics*, 2006, 5, 573-88.
- [18] Enyenihi A. A. Griffiths J. R. Glish G. L.: Tandem mass spectrometric methods for the analysis of iTRAQ labeled peptides in a quadrupole ion trap. *International Journal of Mass Spectrometry Article*, 2011, in press, online available
- [19] Armenta J. M. Perez M. Yang X. et al.: Fast proteomic protocol for biomarker fingerprinting in cancerous cells. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217, 2862-2870.