

**Poszt-transzlációs módosítások vizsgálata tömegspektrometriával:
foszforiláció és O-GlcNAc módosítás analízise**

Ph.D. értekezés tézisei

Klement Éva

Témavezető: Dr. Penke Botond

Konzulens: Dr. Medzihradzky F. Katalin

Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Vegytani Intézet
Szegedi Biológiai Központ, Proteomikai Kutatócsoport

Szeged

2009

Bevezetés

A biológiai folyamatok megértéséhez azok fehérjeszintű vizsgálata szükséges. Ez magában foglalja a folyamatban résztvevő fehérjék azonosítását, az egymással kölcsönható partnerek feltérképezését, a különböző fejlődési állapotok során fellépő vagy a külső hatásokra bekövetkező változások követését, de kiterjed a fehérjék poszt-transzlációs módosításainak jellemzésére is, mivel azok jelentősen befolyásolják a fehérjék szerkezetét, funkcióját és aktivitását. A különböző módosítások szerkezetükre, méretükre és komplexitásukra nézve nagy változatosságot mutatnak, emellett eltérések vannak sztöchiometriájukat és lokalizációjukat tekintve is.

A tömegspektrometria érzékenységének és sokoldalúságának köszönhetően a fehérjeanalitikai kutatások elengedhetetlen eszköze. A fehérjeazonosítás mellett számos egyéb feladat megoldására alkalmas, így a poszt-transzlációs módosítások jellemzésére is. A módosítások tömegspektrometriai analíziséhez azonban – főként alacsony sztöchiometriájú módosítások esetén – a módosított peptideket szelektíven fel kell dúsítani, amihez megfelelő eljárások kidolgozására van szükség. Értekezésem két poszt-transzlációs módosítás, a foszforiláció és az oxigénhez kötött β -N-acetil-glükózamin (O-GlcNAc) vizsgálatát, a módosított molekulák dúsítását és tömegspektrometriai analízisét tárgyalja.

Biológiai jelentősége miatt a foszforiláció az egyik legintenzívebben vizsgált poszt-transzlációs módosítás. A foszforiláció a jelátvitelben és más folyamatok szabályozásában is kulcsfontosságú. Tömegspektrometriai analízisére az ad módot, hogy a foszfopeptidek tömege a módosítatlan peptidekhez képest 80 Da-nal eltolódik. Ezenkívül a foszfopeptidek jellegzetes fragmentációs képet mutatnak az ütközéses aktiválással kiváltott disszociáció során: szerinen vagy treoninon módosított peptidek esetén általában jelentős foszforsav veszteség (-98 Da) figyelhető meg a prekursor ionból és a módosítást hordozó fragmensekből egyaránt, míg a tirozinon foszforilált peptidek esetén ilyen semleges veszteség nem tapasztalható, itt a foszfortirozin immóniumionja (216 Da) jelzi a módosítást. A foszforilációs helyek feltérképezését azonban nehezíti, hogy a módosítás dinamikus és gyakran alacsony sztöchiometriával fordul elő. Továbbá a foszforilált peptidek a módosítatlan peptidekhez képest gyengébben detektálhatók, ezért a módosított peptideket dúsítani kell. Erre több módszert is kidolgoztak, melyek többnyire fémion-affinitás kromatográfián vagy kémiai derivatizáláson alapulnak, de használnak ioncsere kromatográfiát is. Munkám során a fémion-affinitás kromatográfián alapuló dúsítási módszereket alkalmaztam. Ebbe a csoportba sorolható az immobilizált fémion-affinitás kromatográfia és a fém-oxidon (titán-dioxid vagy

cirkónium-dioxid) történő dúsítás. Az immobilizált fémion-affinitás kromatográfia során a szilárd hordozóhoz kovalensen kapcsolt kelátképző által koordinált fémion köti meg a foszfopeptideket. A titán-dioxidon történő foszfopeptid dúsítás pedig azon alapszik, hogy a foszfopeptidek erősen savas közegben szelektíven kötődnek a fém-oxidhoz, majd a módosítatlan peptidek eltávolítása után ammónia oldattal eluálhatók. Ez utóbbi módszer egyszerű és igen szelektív, ezért egyre nagyobb tért hódít a foszfopeptidek vizsgálatában.

Az O-GlcNAc módosítás a foszforilációhoz hasonlóan szabályozó funkcióval bír. Citoszólikus és sejtmagi fehérjéken található, szerin vagy treonin oldalláncához kapcsolódva. Mivel ez a módosítás is alacsony sztöchiometriával fordul elő, ezért vizsgálata szintén megfelelő dúsítást igényel. Bár a módosítás izolálására több módszert leírtak már (kemoenzimatis jelölés, kémiai derivatizáció, lektin-affinitás kromatográfia), az eddig feltérképezett O-GlcNAc módosítások száma messze elmarad az ismert foszforilációs helyek számától. Ebben nemcsak a kevésbé hatékony dúsítási eljárások játszanak szerepet, hanem az is, hogy tömegspektrometriai szempontból az O-GlcNAc módosítás vizsgálata nehezebb, mint a foszforilációé, mivel az O-glikozidos kötés az ütközéses aktiválás során sokkal könnyebben elhasad, mint a peptidgerincet alkotó amid kötések. Ennek megfelelően az O-GlcNAc módosított peptidek intenzív jelet adnak az oxóniumionnak, valamint a prekursor ion cukorvesztett fragmensének megfelelő m/z értéknél, a peptid-fragmentációból adódó jelek azonban jóval gyengébbek, főleg ioncsapda készülékek esetén. Ezenkívül egy gázfázisú átrendeződés következtében a cukor-módosítás úgy hasad le a peptidről, hogy nem hagy maga után nyomot a módosított aminosavon. Tehát az O-GlcNAc módosított peptidek fragmentációs spektrumából a glikoziláció ténye könnyen megállapítható, azonban a peptid-azonosítás jóval nehezebb, és a módosítás helyét többnyire nem lehet megállapítani.

Céltűzés

Foszforilációval kapcsolatos kísérleteink során célunk volt, hogy

- megvizsgáljuk a különböző fémionok hatékonyságát és szelektivitását immobilizált fémion-affinitás kromatográfia alapú foszfopeptid dúsításnál,
- megvizsgáljuk a felkötési és mosási körülményeket, hogy az egyes fémionoknak megfelelő optimális dúsítási körülményeket megtaláljuk,
- feltérképezzük a tubulin polimerizációját elősegítő fehérje (TPPP/p25) *in vitro* (humán rekombináns) és *in vivo* (marha) foszforilációs helyeit,

- meghatározzuk a lucerna RRK1 kináz autofoszforilációs helyeit, valamint a kináz aktivátorának, a ROP6 GTPáznak a foszforilációs helyeit,
- azonosítsuk az *ecetmuslica kalpain B* *in vitro* és *in vivo* foszforilációs helyeit.

Az *O-GlcNAc* módosítással kapcsolatos kísérleteink során célunk az volt, hogy az N-glikozilált fehérjékre kidolgozott, perjodát oxidációt követő hidrazid-gyantán történő dúsítás lépéseinek módosításával a módszert az *O-GlcNAc* módosított fehérjék dúsítására is alkalmassá tegyük.

Módszerek

A fehérjék tripszines emésztése gélben vagy oldatban történt a diszulfidhidak redukálása és a szulfhidril-csoportok alkilálása után.

Az immobilizált fémion-affinitás kromatográfia optimalizálását a különböző fémionokra NTA gyöngyön végeztük: Ni-NTA gyöngyön a Ni^{2+} ionokat a vizsgált fémionokra cseréltük le, a foszfopeptidek felkötését és a nemfoszforilált peptidek eltávolítását különböző pH-jú ecetsav/acetát pufferben végeztük, majd a foszfopeptideket foszforsav/acetonitril oldattal eluáltuk. A vizsgálatokhoz szintetikus foszfopeptideket és fetuin emésztményt használtunk.

A TPPP/p25, RRK1 kináz, ROP6 GTPáz és kalpain B fehérjék foszfopeptidjeit titán-dioxidon, valamint metil-észteresítés után Fe-NTA gyöngyön dúsítottuk. A savkatalizált észteresítést sósav/metanol oldattal végeztük, majd a mintát víz/metanol/acetonitril elegyében kötöttük fel a Fe-NTA gyöngyre. A titán-dioxidon történő dúsításhoz a módosított Larsen-féle eljárást alkalmaztuk: a foszfopeptideket trifluorecetsav/acetonitril oldatban kötöttük fel a titán-dioxidra, a nemfoszforilált peptidek eltávolítása után pedig ammónia oldattal eluáltuk.

Az *O-GlcNAc* dúsítás lépéseinek kidolgozását egy peptid standardon (TAPTgSTIAPG) végeztük, majd a módszert α -krisztallinnal, valamint α -krisztalin:BSA keverékével optimalizáltuk. A perjodát oxidációt eltérő hőmérsékleten és eltérő pH-jú oldatokban vizsgáltuk. A hidrazon-képzést oldatban benzoecsv-hidraziddal, szilárd fázison pedig agaróz és szilika alapú hidrazid-gyantán végeztük. A hasításhoz nátrium-hidroxidot, perjodátot, hangyasavat vagy hidroxilamint használtunk.

A MALDI-TOF méréseket Bruker Reflex III tömegspektrométerrel, az LC-MS/MS analíziseket Waters Q-TOF, valamint Agilent és Thermo ioncsapda készülékkel végeztük.

Az adatbázis-lekeresést Mascot és ProteinProspector programcsomaggal végeztük az NCBI fehérje adatbázisán.

Eredmények

1. Fehérje foszforiláció

1.1. Immobilizált fémion-affinitás kromatográfia optimalizálása különböző fémionokra

1.1.1. Az átmeneti fémionok közül az Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} és Fe^{3+} ionokat, az alkáliföldfém-ionok közül a Ca^{2+} , Mg^{2+} és Ba^{2+} ionokat, továbbá az Al^{3+} és Pb^{2+} ionokat vizsgáltuk, hogy alkalmasak-e immobilizált fémion-affinitás kromatográfián alapuló foszfopeptid dúsításra. Szintetikus foszfopeptideknél mutatott hatékonyságukat, valamint fetuin emésztmény esetén a foszfopeptidekre mutatott szelektivitásukat figyelembe véve a fémionokat az alábbi csoportokba soroltuk:

- a) A Fe^{3+} és a Cu^{2+} ionok mind a négy szintetikus foszfopeptidet megkötötték, a fetuin emésztményében azonban nemcsak a foszfopeptidek, de nemfoszforilált savas peptidek is dúsultak. A két fémion között a pH optimumban mutatkozott némi eltérés.
- b) Az Al^{3+} és Pb^{2+} ionok szintén megkötötték valamennyi szintetikus foszfopeptidet, emellett a fetuin emésztményénél is jó szelektivitást mutattak a foszfopeptidekre. Az Al^{3+} jól működött a párhuzamos kísérletekben, az Pb^{2+} ionokkal kapott eredmények azonban nem voltak reprodukálhatók.
- c) A többi fémion is viszonylag jó szelektivitást mutatott fetuin emésztményénél a foszfopeptidekre, azonban ezekkel a fémionokkal gyengébb jeleket kaptunk, és a négy szintetikus foszfopeptidből is csak hármat kötöttek meg.

1.1.2. A pH az immobilizált kelátképző és a fémion közötti komplex stabilitásán, valamint a foszfopeptid töltésén keresztül befolyásolja a dúsítás hatékonyságát. A Fe^{3+} nagy komplex stabilitási állandója révén ($\lg K_{\text{Fe-NTA}}=15,8$) alacsonyabb pH-n is használható, a többi fémionnál magasabb pH-t kellett alkalmazni. Ugyanakkor alacsony pH-n csak a savas peptidek dúsultak jól, a semleges és bázikus foszfopeptidek pozitív töltésük miatt kevésbé kötődtek a szilárd fázishoz. A különböző fémionoknál a felkötés optimális pH-ja 4-6.5 közé tehető. Ugyanakkor a pH változtatása módot adhat a foszfopeptidek frakcionálására, amit a későbbiekben tovább fogunk vizsgálni.

1.1.3. A felkötő és mosó pufferhez adott szerves oldószernek a szelektivitásra gyakorolt hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy a mosásnál alkalmazott szerves adalék (30% acetonitril) jelentősen csökkentette a nemfoszforilált peptidek szilárd hordozóhoz történő aspecifikus kötődését.

1.1.4. A nemfoszforilált savas peptidek aspecifikus kötődését a karboxil-csoportok metil-észterezésével lehet kiküszöbölni. Ezt a reakciót főként a Fe^{3+} és Cu^{2+} ionok esetén célszerű

alkalmazni, mert ott tapasztaltuk leginkább a savas nemfoszforilált peptidek aspecifikus kötődését. Azonban olyan peptideknél, amelyek sok savas aminosavat tartalmaztak, az észterezés nem volt teljes, ezenkívül az aszparagin és glutamin oldallánca a reakció körülményei között részben elhidrolizált és észtereződött. Mindezek a mellékreakciók megosztották a detektálható jelet, ami az érzékenységet csökkentette.

1.1.5. A vizsgált fémionok közül az Al^{3+} működött a legjobban, ezért hatékonyságát fetuin:BSA keverékeken is teszteltük. Bár aspecifikusan kötődő BSA peptideket is detektáltunk, a fetuin foszfopeptidek hatékonyan feldúsultak az eluátumban.

1.2. TPPP/p25 in vitro és in vivo foszforilációs helyeinek meghatározása

1.2.1. TPPP/p25 *in vitro* foszforilációját humán rekombináns fehérjén vizsgáltuk ERK2, CDK5 és PKA kinázokkal. Az ERK2 és a CDK5 kináz a TPPP/p25 fehérjét a Ser-18 és Ser-160 oldalláncon foszforilálta, ezenkívül a CDK5 a Thr-14 oldalláncon is, a PKA pedig a Ser-32, Thr-92 és Ser-159 aminosavakat módosította.

1.2.2. A TPPP/p25 *in vivo* foszforilációs helyeit marha agyból izolált fehérjén határoztuk meg. Foszforilációt találtunk a Thr-12, a Ser-16 és Ser-30 oldalláncaiban, ami megfelel a humán fehérjén talált *in vitro* foszforilációs helyeknek.

1.3. Lucerna RRK1 kináz autofoszforilációs helyeinek, valamint a kináz aktivátora, a ROP6 GTPáz foszforilációs helyeinek feltérképezése

Ezekben a foszforilációs kísérletekben His-tag-gel kifejeztetett rekombináns fehérjéket vizsgáltunk. Az RRK1 kinázon foszforilációt igazoltunk a Thr-6 és a Ser-8 oldalláncon, valamint a His-tag szekvencián is. A ROP6 GTPáz-t többféle N- és C-terminális His-tag konstrukcióval is vizsgáltuk, foszforilációt azonban csak az N-terminális His-tag-en találtunk, a natív ROP6 GTPáz szekvencián nem.

1.4 Ectmuslica kalpain B in vitro és in vivo foszforilációs helyeinek meghatározása

1.4.1. Rekombináns kalpain B *in vitro* foszforilációs helyeit PKA, ERK1 és ERK2 kináz kezelést követően azonosítottuk. PKA-foszforilációt két aminosavon, a Ser-240 és a Ser-845 oldalláncon találtunk. A két ERK kináz esetében csak a Thr-747 foszforilációját tudtuk igazolni, bár autoradiográfia alapján a fehérje N-terminális részén is történik foszforiláció.

1.4.2. *In vivo* foszforilációt EGF kezelést követően azonosítottuk, ami az ERK foszforilációs utat aktiválja. Azonban nemcsak az *in vitro* kísérletek során talált ERK foszforilációs hely, a Thr-747 módosult *in vivo*, hanem az egyik PKA foszforilációs hely is (Ser-240). Ez utóbbi vélhetően az ERK aktiválástól független folyamat eredménye.

2. O-GlcNAc glikoziláció

2.1. Az O-GlcNAc dúsítás lépéseinek kidolgozása oldatban

2.1.1. A vicinális transz-diolt tartalmazó O-GlcNAc módosítás a perjodát oxidációban renyhe reaktivitást mutatott, azonban 37 °C-on a reakció 4-6 h alatt teljesen végbement, az O-GlcNAc gyűrű a megfelelő dialdehyd származékká alakult. Mellékreakcióként a peptid N-terminálisán található treonin is oxidálódott glioxilillé.

2.1.2. Enyhén savas közegben a cukor-dialdehyd a hidrazid vegyülettel hidrazont képzett, az N-terminális glioxilil-csoport pedig attól függően, hogy a perjodát reakciót milyen mennyiségű szulfittal állítottuk le, hidrazont képzett vagy részben kiredukálódott glikolillá. Ez utóbbi átalakulás a hidrazidok redukáló tulajdonságához köthető.

2.1.3. A hasításhoz kétféle megközelítést próbáltunk ki. Az egyik a lúgos közegben lejátszódó β -elimináció, ami a cukorszármazékot hasítja le a peptidről, egy kettős kötést hátrahagyva. A másik pedig a hidrazon kötés hasítása, amit háromféleképpen, perjodáttal, savval és hidroxilaminnal végeztünk el. A négy reakció közül oldatban az utóbbi három, azaz a hidrazon kötés hasítása működött jól, bár a savas hasításnál részleges cukorvesztést is tapasztaltunk.

2.2. Szilárd fázison történő dúsítás optimalizálása

2.2.1. Miután az emésztés során nagy valószínűséggel keletkeznek olyan peptidok, melyek szerinrel vagy treoninnal kezdődnek, ezért a dúsítást fehérjeszinten végeztük. A dúsítás lépései: i) perjodát oxidáció, ii) kapcsolás a hidrazid gyantához, iii) nemglikozilált fehérjék eltávolítása, iv) emésztés, v) nemglikozilált peptidok eltávolítása és vi) hasítás.

2.2.2. A fehérjék oldására detergensként 6 M guanidin hidrokloridot és SDS-t használtunk. Utóbbival sokkal jobb eredményeket kaptunk, amit a detergens és a szilárd fázis közötti elektrosztatikus kölcsönhatással magyarázhatunk. Ugyanakkor az aspecifikus kötődés is megnőtt SDS használatakor, ezért hatékonyabb mosási körülményeket kerestünk. Fehérjeszinten nem sikerült az aspecifikus kötődést hatékonyan lecsökkenteni, peptidszinten azonban egy kombinált mosási ciklussal jelentősen csökkentettük az aspecifikusan kötődő peptidok mennyiségét.

2.2.3. Hasításhoz az oldatban is tesztelt négyféle reakciót használtuk. A perjodátos hasítás szilárd fázison nem működött. A β -eliminációs módszer (Michael-addícióval kiegészítve) alacsony hatásfokú volt, a savas hasítás hatékonyságát pedig itt is a részleges cukorvesztés csökkentette. A négy módszer közül a hidroxilaminnal történő hasítás bizonyult a legjobbnak.

2.2.4. A módszer hatékonyságát α -krisztallin:BSA 1:20 (w/w) arányú keverékén teszteltük. Az α -krisztallin A és B láncának glikopeptidjeit egyaránt detektáltuk a MALDI-TOF és/vagy LC-MS/MS analízis során.

2.3. Az *O*-GlcNAc módosított peptidek oximszármazékainak ütközéses aktiválásra bekövetkező fragmentációja

Az oximszármazékok fragmentációját a krisztallin egyik glikopeptidjének példáján jellemeztük. A perjodát oxidáció következtében felnyílt cukorgyűrűben a karbonil C két oldalán lévő C-O kötés hasadásával két jellegzetes veszteséget figyeltünk meg. Az egyik hasadás megfelelt az általános O-glikozidos kötéshasadásnak: a cukorszármazékhoz rendelhető oxóniumiont m/z 232 Da-nál, a cukorvesztett peptidet pedig a prekuzorral azonos töltéssel (semleges veszteség) vagy eggyel kevesebb töltéssel (töltött veszteség) detektáltuk. A másik C-O kötés hasadásának eredménye egy 105 Da-nak megfelelő semleges veszteség volt, miközben egy 126 Da tömegű cukorfragszmaradt a módosított aminosavon, ami lehetőséget adhat a módosítás helyének meghatározására. Az m/z 127 Da-nál detektált cukorfragszmar a Q-TOF készülékekre jellemző többszörös hasadás következménye.

Tudományos közlemények

Az értekezéshez kapcsolódó elfogadott közlemények:

- I. Hlavanda E*, **Klement E***, Kókai E, Kovács J, Vincze O, Tokési N, Orosz F, Medzihradszky KF, Dombrádi V, Ovádi J. Phosphorylation Blocks the Activity of Tubulin Polymerization-promoting Protein (TPPP): IDENTIFICATION OF SITES TARGETED BY DIFFERENT KINASES. *Journal of Biological Chemistry* 282 (40): 29531-9 (2007)
(*Első szerzők.)
- II. Dorjgotov D, Jurca ME, Fodor-Dunai C, Szucs A, Otvös K, **Klement E**, Bíró J, Fehér A. Plant Rho-type (Rop) GTPase-dependent activation of receptor-like cytoplasmic kinases in vitro. *FEBS Letters* 583 (7):1175-82 (2009)
- III. Kovács L, Alexa A, **Klement E**, Kókai E, Tantos Á, Gógl G, Sperka T, Medzihradszky KF, Tözsér J, Dombrádi V, Friedrich P. Regulation of calpain B from *Drosophila melanogaster* by phosphorylation. *FEBS Journal* 276 (17): 4959-72. (2009)

Az értekezéshez kapcsolódó benyújtott közlemény:

- IV. **Klement E**, Lipinszki Z, Kupihár Z, Udvardy A, Medzihradzky KF. Enrichment of O-GlcNAc modified proteins by the periodate oxidation – hydrazide resin capture approach

Az értekezéshez kapcsolódó előadások:

- I. **Klement E**, Lipinszki Z, Kupihar Z, Udvardy A, Medzihradzky KF: Enrichment of O-GlcNAc modified proteins by the periodate oxidation – hydrazide resin capture approach. 3rd Central and Eastern European Proteomics Conference, Budapest, 2009.
- II. **Klement E**, Medzihradzky KF: Phosphopeptide analysis – comparison of IMAC and TiO₂ enrichment in practice. 25th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Nyíregyháza-Sóstó, 2007
- III. **Klement E**, Orosz G, Medzihradzky KF: Determination of protein phosphorylation by mass spectrometry. Straub napok, Szeged, 2006.

Az értekezéshez kapcsolódó konferencia poszterek:

- I. **Klement E**, Lipinszki Z, Kupihar Z, Udvardy A, Medzihradzky KF: Enrichment of O-GlcNAc modified proteins by the periodate oxidation – hydrazide resin capture approach. 9th International Symposium on Mass Spectrometry in the Health and Life Sciences: Molecular and Cellular Proteomics, San Francisco, California, USA, 2009.
- II. **Klement E**, Maltby DA, Hunyadi-Gulyas E, Medzihradzky KF: Which way to go? Phosphopeptide fragmentation in different MS/MS methods. Post-translational modifications: Detection and physiological evaluation, Granlibakken, USA, 2008.
- III. **Klement E**, Medzihradzky KF: Foszforiláció tömegspektrometriás vizsgálata – a mintaelőkészítéstől az adatok értelmezéséig. Biokémiai Vándorgyűlés, Szeged, 2008.
- IV. **Klement E**, Darula Z, Medzihradzky KF: Phosphopeptide analysis – comparison of IMAC and TiO₂ enrichment. 2nd Conference of the Hellenic Proteomics Society, Crete, Greece, 2007
- V. **Klement E**, Orosz G, Medzihradzky KF: Phosphopeptide Enrichment by IMAC with Different Complexing Metal Ions. 17th International Mass Spectrometry Conference Prague, Czech Republic , 2006