

Iščitavanje reverzne translacije sekvenciranjem peptida de novo tehnikama tandemne spektrometrije masa

Dodig, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:611174>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ivana Dodig

**SCANNING OF REVERSE TRANSLATION
VIA *DE NOVO* PEPTIDE SEQUENCIG BY
TANDEM MASS SPECTROMETRY**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ivana Dodig

**IŠČITAVANJE REVERZNE TRANSLACIJE
SEKVENCIJIRANJEM PEPTIDA *DE NOVO*
TEHNIKAMA TANDEMNE
SPEKTROMETRIJE MASA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Mario Cindrić, viši znanstveni suradnik

Zagreb, 2016.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ivana Dodig

**SCANNING OF REVERSE TRANSLATION
VIA *DE NOVO* PEPTIDE SEQUENCIG BY
TANDEM MASS SPECTROMETRY**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Mario Cindrić, Senior Research Associate

Zagreb, 2016.

Hvala

...mom mentoru **dr. sc. Mariju Cindriću** na prenesenom znanju, ukazanom povjerenju, te na iznimnom strpljenju i razumijevanju. Ponajviše hvala na odvojenom vremenu za brojne diskusije koje su me poučile analitičkom pogledu na znanost, posao i ljude... na život.

...dr. sc. **Iti Gruić-Sovulj** na velikoj pomoći i susretljivosti, te na pažljivom čitanju rukopisa i korisnim prijedlozima.

...dr. sc. **Predragu Novaku** na kritičkom čitanju rukopisa i korisnim savjetima.

...mojim kolegama na prijateljskoj podršci i pomoći: **Ani Butorac, Ani Marković, Ranku Gaćešiću, Janku Diminiću, Tini Kusalić, Marini Kršić i Danijeli Nožinić.**

...i na kraju, veliko hvala mojoj obitelji bez čije ljubavi, razumijevanja i podrške ne bi bilo ove disertacije:

... **Anti, Karli i Hrvoju...,mami, Luciji, Anti i Andri.**

Za Karlu i Hrvoja

„...Nema ljepšeg zadatka nego što je omogućiti nekom razvitak, proširiti mu poglede na svijet, pomoći čovjeku u njegovoj težnji za usponom...”

Ivo Andrić „Znakovi pored puta“

Sadržaj

SAŽETAK	VIII
ABSTRACT	IX
1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. PROTEOMIKA	6
2.2. ANALITIČKE TEHNIKE U PROTEOMICI	7
2.2.1. Priprema proteina za analizu	7
2.2.1.1. Elektroforetske tehnike	9
2.2.1.2. Tehnike tekućinske kromatografije	17
2.2.2. Spektrometrija masa	22
2.2.2.1. Ionizacija	23
2.2.2.2. Analizatori	26
2.2.2.3. Tandemna spektrometrija masa	32
2.2.2.4. Nomenklatura fragmentnih iona nastalih kolizijom induciranom disocijacijom (CID)	33
2.2.2.5. Mehanizam fragmentacije protoniranih peptida	35
2.2.2.6. Interpretacija MS/MS spektara	37
2.2.2.7. Kemijski aktivirana fragmentacija	38
2.2.3. Identifikacija proteina	43
2.2.3.1. Proteinske baze podataka	43
2.2.3.2. Pretraga baza podataka	45
2.2.3.3. Sekvenciranje peptida <i>de novo</i>	47
3. EKSPERIMENTALNI DIO	50
3.1. KEMIKALIJE, PRIBOR I INSTRUMENTI	51
3.1.1. Kemikalije	51
3.1.2. Pribor	53
3.1.3. Instrumenti i uređaji	53
3.1.4. Programi za upravljanje instrumentima ili obradu podataka	54
3.1.5. PRIPREMA OTOPINA	55
3.2. PROTEISNKI EKSTRAKTI STANIČNIH KULTURA	60
3.2.1. Priprema proteina staničnih lizata	60
3.2.2. Priprema proteinskog ekstrakta	61
3.2.3. Određivanje koncentracije proteina staničnih ekstrakata	62
3.2.3.1. Kvantifikacija proteina prema Warburg-Christian-ovoj metodi	62
3.2.3.2. Kvantifikacija proteina metodom po Bradfordu	63
3.3. RAZDVAJANJE PROTEINA ELEKTROFORETSKIM TEHNIKAMA	64
3.3.1. Razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu uz dodatak natrijevog sulfata (SDS-PAGE)	64
3.3.2. Razdvajanje proteina dvodimenzionalnom elektroforezom u gelu	65
3.3.2.1. Prva dimenzija: izoelektrično fokusiranje	65
3.3.2.2. Druga dimenzija: SDS-PAGE	67
3.3.3. Vizualizacija proteina u gelu	68
3.3.3.1. Vizualizacija proteina Coomassie Brilliant Blue bojom	68
3.3.3.2. Vizualizacija proteina nekoloidnom CBB bojom	68
3.3.3.3. Vizualizacija proteina srebrom	69
3.4. PRIPREMA UZORAKA PROTEINA IZ GELA ZA MS ANALIZU	70
3.4.1. Odbojavanje odabranih proteinskih točki ili vrpca	70
3.4.2. Enzimska odgradnja proteina u gelu	71

3.4.3.	Izolacija triptičkih peptida iz gela	71
3.4.4.	Pročišćavanje peptida tehnikom ZipTip C4.....	72
3.4.5.	Obilježavanje peptida CAF reagensima	72
3.5.	RAZDVAJANJE PEPTIDA TEHNIKOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE	73
3.5.1.	Odgradnja proteina staničnog ekstrakta tripsinom.....	73
3.5.2.	Obilježavanje smjese peptida CAF reagensima	73
3.5.3.	Kromatografski parametri.....	74
3.5.4.	Priprema uzoraka za MS analizu	75
3.6.	ANALIZA PEPTIDA TEHNIKAMA SPEKTROMETRIJE MASA	76
3.7.	IDENTIFIKACIJA PROTEINA	79
3.7.1.	Pretraživanje baza podataka u svrhu identifikacije proteina	79
3.7.2.	CAF ⁻ /CAF ⁺ postupak identifikacije proteina manualnim sekvenciranjem peptida <i>de novo</i>	80
3.7.3.	CAF ⁻ /CAF ⁺ postupak identifikacije proteina automatskim sekvenciranjem peptida <i>de novo</i>	81
3.8.	KARAKTERIZACIJA FRAGMENTACIJSKOG PUTA PEPTIDA OBILJEŽENIH CAF-mm REAGENSOM.....	82
4.	REZULTATI	86
4.1.	SEKVENCIRANJE <i>DE NOVO</i>	87
4.1.1.	Sekvenciranje neobilježenog peptida <i>de novo</i>	90
4.1.2.	Obilježavanje peptida CAF reagensima.....	94
4.1.3.	Sekvenciranje peptida obilježenog CAF-op reagensom <i>de novo</i>	95
4.1.4.	Sekvenciranje peptida obilježenog CAF-mm reagensom <i>de novo</i>	101
4.1.5.	Sekvenciranje peptida obilježenog CAF-mp reagensom <i>de novo</i>	106
4.2.	KARAKTERIZACIJA FRAGMENTACIJSKOG PUTA PEPTIDA OBILJEŽENIH CAF-mm REAGENSOM.....	113
4.3.	IDENTIFIKACIJA PROTEINA SA I BEZ UPOTREBE CAF REAGENSA	121
5.	RASPRAVA	127
5.1.	KEMIJSKI AKTIVIRANA FRAGMENTACIJA (CAF) PEPTIDA OBILJEŽENIH REAGENSIMA SA DVIJE SULFONSKE SKUPINE	129
5.2.	USPOREDBA TRIJU CAF REAGENSA U SVRHU SEKVENCIRANJA PEPTIDA <i>DE NOVO</i>	134
5.3.	KARAKTERIZACIJA FRAGMENTACIJSKOG PUTA PEPTIDA OBILJEŽENIH CAF-mm REAGENSOM.....	140
5.4.	IDENTIFIKACIJA PROTEINA SA I BEZ UPOTREBE CAF REAGENSA	144
6.	ZAKLJUČAK	148
7.	POPIS KRATICA.....	150
8.	LITERATURNI IZVORI.....	156
9.	DODATAK	X
9.1.	DODATAK 1	XI
9.2.	DODATAK 2	XIV
9.3.	DODATAK 3	XV
9.4.	DODATAK 4	XXV
10.	ŽIVOTOPIS.....	XXVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

IŠČITAVANJE REVERZNE TRANSLACIJE SEKVENCIRANJEM PEPTIDA *DE NOVO* TEHNIKAMA TANDEMNE SPEKTROMETRIJE MASA

Ivana Dodig

Centar za proteomiku i spektrometriju masa, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

Sažetak: Sekvenciranje peptida i proteina *de novo* korišteno je kao alat za reverzno iščitavanje translacije. Pri tome je nedvojbeno sekvenciranje *de novo* omogućeno selektivnim obilježavanjem *N*-kraja peptida 5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom prije analize tandemnom spektrometrijom masa.

Opisana kemijska modifikacija usmjerava fragmentaciju peptidnih iona ka disocijaciji peptidne veze prilikom kolizijom inducirane disocijacije u spektrometru masa. Nastali fragmentni ioni *b*-serije detektiraju se u negativnom načinu rada spektrometra masa, a fragmentni ioni *y*-serije detektiraju se u pozitivnom načinu rada spektrometra masa. Stoga je, za isti peptid, aminokiselinski slijed iščitavanjem iz spektra snimljenog u pozitivnom načinu rada spektrometra masa moguće dodatno provjeriti iščitavanjem iz spektra snimljenog pri negativnom načinu rada spektrometra masa (tzv. nedvojbeno sekvenciranje peptida *de novo*). Jedna od primjena ovakvog načina sekvenciranja *de novo* je i identifikacija proteina, koja se provodi pretragom, iz spektra iščitane sekvence peptida, u bazi podataka, odnosno iščitavanjem reverzne translacije.

Disertacija prikazuje primjenjivost, pouzdanost i točnost kao i komparativnu prednost novorazvijene *de novo* tehnike nad klasičnim tehnikama identifikacije proteina.

(163 + XXVIII stranica, 39 tablica, 50 slika, 140 literaturnih navoda, jezik izvornik: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: sekvenciranje *de novo* / identifikacija proteina / kemijski aktivirana fragmentacija / tandemna spektrometrija masa / 5-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina /

Mentor: dr. sc. Mario Cindrić, viši znanstveni suradnik

Ocjenitelji: dr. sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.
dr. sc. Mario Cindrić, v. zn. sur.
dr. sc. Predrag Novak, prof.

Rad prihvaćen: 13. srpnja 2016.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

SCANNING OF REVERSE TRANSLATION VIA *DE NOVO* PEPTIDE SEQUENCING BY TANDEM MASS SPECTROMETRY

Ivana Dodig

The Centre for proteomics and mass spectrometry, Institute Ruder Bošković, Zagreb, Croatia

Abstract: *De novo* peptide and protein sequencing was used as a tool for reverse translation scanning. Unambiguous *de novo* sequencing is achieved by selective derivatization of peptide N-terminus by 5-formyl-1,3-benzendisulfonic acid before tandem mass spectrometry analysis. Described chemical modification of peptide directs fragmentation pathway to the peptide bound dissociation during collision-induced dissociation in the mass spectrometer. The resulting b-series of fragmentation ions is detected in the negative ion mode of the mass spectrometer, and y-series of fragmentation ions is detected in the positive ion mode of the mass spectrometer. Therefore, for the same peptide, amino acid sequence read out from the spectrum recorded in the positive ion mode can be additionally verified by reading out from the spectrum obtained in the negative ion mode of mass spectrometer (the so-called unambiguous *de novo* sequencing).

One application of the described *de novo* sequencing technique is protein identification, which is performed by searching for previously spectral obtained peptide sequence, in the protein database i.e. by scanning of reverse translation.

This thesis presents applicability, reliability and accuracy as well as the comparative advantage of the newly developed *de novo* sequencing technique over the conventional protein identification techniques.

(163 + XXVIII pages, 39 tables, 50 pictures, 140 references, original in Croatian)

Thesis is deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: chemically activated fragmentation / *de novo* sequencing / protein identification / tandem mass spectrometry / 5-formyl-1,3-benzendisulfonic acid/

Mentor: Dr. Mario Cindrić, Senior Research Associate

Reviewers: Dr. Ita Grujić Sovulj, Associate Professor
Dr. Mario Cindrić, Senior Research Associate
Dr. Predrag Novak, Professor

Thesis accepted: 13 July 2016

1. UVOD

Posljednjih dvadesetak godina spektrometrija masa nametnula se kao nezaobilazna tehnika u analizi makromolekula, poglavito proteina, za što je prvenstveno zaslužan razvoj ionizacijskih tehnika prikladnih za analizu proteina i peptida: ionizacije elektroraspršenjem¹ i matricom pomognute ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem², 80-ih godina prošlog stoljeća.

Najučestalija primjena ionizacije elektroraspršenjem i matricom pomognute ionizaciju uz desorpciju laserskim zračenjem u okviru proteomskih istraživanja je sekvenciranje i identifikacija peptida. Početkom ubrzanog razvoja spektrometrije masa eksperimenti sekvenciranja proteina bili su ograničenog dosega i u pravilu su se odnosili na analize pojedinačnih pročišćenih proteina, a izvodili su se kao svojevrsna završna analiza nakon opsežnih biokemijskih i fizioloških eksperimenata. Pojavom javno dostupnih proteinskih baza podataka tehnike spektrometrija masa zamijenile su do tada jedinu tehniku sekvenciranja peptida tzv. Edman-ovu odgradnju.³

U posljednjih petnaestak godina uloga sekvenciranja peptida značajno se promijenila te je danas sekvenciranje peptida rutinski postupak identifikacije proteina koji osim određivanja primarne strukture uključuje i utvrđivanja vrste i postojanja posttranslacijskih modifikacija, mogućih mutacija i sl. Razvojem i usavršavanjem tehnika tandemne spektrometrije masa nadoknađena su ograničenja Edman-ove odgradnje. Nakon dvadeset godina razvoja mogućnosti koje pruža spektrometrija masa su brojne, a primjena tehnologije i dalje ne jenjava, već naprotiv, gotovo neprestano svjedočimo razvoju sve točnijih, pouzdanijih, jednostavnijih i robusnijih tehnika. Sam postupak identifikacije proteina znatno je olakšan ubrzanim i opsežnim sekvenciranjem genoma, a neprestani porast broja sekvenciranih genoma uvelike doprinosi točnosti dobivenih podataka.

Preklapanje ovih donedavno nespojivih područja rezultiralo je ubrzanim razvojem biokemijske grane nazvane proteomika, koja za svrhu ima karakterizaciju ukupnog komplementa proteina eksprimiranih unutar određene stanice, tkiva ili organizma.

Dva su osnovna pristupa u proteomskim istraživanjima: pristup odozdol nagore (engl. *bottom-up*) i pristup odozgor nadolje (engl. *top-down*). Učestaliji pristup odozdol nagore sastoji se u analizi peptida nastalih enzimskom odgradnjom ciljanog ili ciljanih proteina specifičnim proteinazama, dok se rjeđe korišteni pristup odozgor nadolje temelji na analizi intaktnih proteina.

Neovisno o tome da li se radi o analizi peptida ili o analizi intaktnih proteina, upotreba tehnika spektrometrije masa, osobito tandemne spektrometrije masa, gotovo se neizbježno nameće kao nezaobilazno analitičko oruđe zbog visoke osjetljivosti, vremenski kratkih i

istovremeno informativno bogatih eksperimenata i mogućnosti određivanja posttranslacijskih modifikacija.

Poznavanje aminokiselinske sekvence ostaje i dalje početnica proteomskog istraživanja. Zahvaljujući činjenici da je aminokiselinski slijed jedinstven, poznavanje slijeda aminokiselina peptida nastalog enzimskom odgradnjom pojedinog proteina, omogućuje samu identifikaciju proteina. Poznavanje slijeda aminokiselina čitavog proteina ujedno daje uvid u strukturu i funkciju proteina, budući da je primarna struktura proteina temeljni čimbenik razumijevanja proteinskih struktura i funkcija.

Zahtjevi analitičkih metoda kod sekvenciranja peptida su standardizirani i uvelike se preklapaju sa zahtjevima ostalih kvalitativnih analitičkih metoda. Metoda mora biti dovoljno osjetljiva kako bi je bilo moguće izvesti na najčešće pikomolarnoj količini uzorka, dovoljno brza kako bi se u razumnom vremenu očitao čim veći broj slijedova aminokiselinskih sekvenci, te dostatne točnosti kako bi dobivene informacije bile pouzdane. Poželjno je da sam postupak analize, s obzirom na ostale dostupne metode i kvalitetu dobivenih informacija, bude učinkovit, dostupan i jednostavan

Sekvenciranje peptida *de novo* je važan alat suvremenih proteomskih istraživanja budući da osim mogućnosti uvida u sveobuhvatan skup proteina eksprimiranih unutar određene stanice ili tkiva, što je osnova proteomskih istraživanja, pruža i mogućnost iščitavanja eventualnih mutacija pojedinog proteina i karakterizacije posttranslacijskih modifikacija. Posebnu pozornost privlači mogućnost identifikacije proteina organizama čiji genomi nisu sekvencirani. Zato je unapređivanje postojećih i razvoj novih tehnika sekvenciranja peptida *de novo* od iznimne važnosti za napredovanje proteomike, a time i provedbu uspješnih i informacijski važnih biomedicinskih istraživanja.

Cilj rada

Cilj ovog rada bio je razvoj i implementacija univerzalne hibridne tehnike identifikacije proteina koja se temelji na sekvenciranju peptida *de novo* uz identifikaciju proteina iščitavanjem reverzne translacije. Primjenom univerzalne tehnike nedvojbene, brze i točne identifikacije proteina dodatno se olakšava povezivanje genomskih baza podataka sa proteomima. Budući da sekvenciranje peptida *de novo* uključuje iščitavanje aminokiselinskog slijeda, mogućnosti primjene nedvojbenog sekvenciranja su višestruke. Novorazvijenom tehnikom moguće je ustvrditi postojanje mutacija unutar proteina, pogrešaka u anotaciji genoma, vrstu posttranslacijskih modifikacija, te je također moguće identificirati i visokohomologe proteine organizama čiji genomi nisu sekvencirani.

Osnovna razlika novorazvijene tehnike nad postojećim tehnikama identifikacije proteina jest identifikacija proteina temeljena na iščitavanju reverzne translacije, a ne na preklapanju eksperimentalnih i teoretskih rezultata putem pretrage proteinskih baza podataka.

Prednost ove tehnike nad postojećima je nedvosmislena potvrda identificiranog proteina kroz tri načina provjere. Prvi način provjere odnosi se na provjeru utvrđenog slijeda aminokiselina. Mogućnost ove provjere proizlazi iz činjenice da je isti aminokiselinski slijed moguće iščitati pri pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa. Aminokiselinski slijed iščitani pri pozitivnom načinu rada spektrometra masa moguće je provjeriti pri negativnom načinu rada spektrometra masa i obrnuto. Drugi način potvrde moguće je provesti preklapanjem iščitane peptidne sekvence sa dijelom reverzno transliranog genoma, što je ujedno i način identifikacije proteina. Treći način potvrde odnosi se na preklapanje eksperimentalno dobivene vrijednosti omjera mase i naboja (m/z) sekvenciranog peptidnog fragmenta sa teoretski izračunatom vrijednošću m/z peptida sa reverzno transliranog genoma.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. PROTEOMIKA

Nakon što je 2001. godine petnaestogodišnji projekt sekvenciranja ljudskog genoma završen,⁴ središnja točka interesa na području biomedicinskih znanosti prebačena je sa gena i genoma na proteine i proteome, čime je otpočelo razdoblje, već uvriježenog naziva, postgenomska era. Iako je biološki gledano poveznica genoma i proteoma neraskidiva i uzročno posljedična, te je grubo rečeno temelj života svake stanice, tkiva i organizma, sa stajališta razvoja biomedicinskih znanosti preduvjet početka postgenomske ere bio je uspješan završetak genomske ere, čime je omogućeno rutinsko, brzo i točno sekvenciranje genoma raznih organizama. Tako je do danas (svibanj 2016. godine) od 16 125 započetih genomskih projekata, njih 6 744 u potpunosti završeno.⁵

Proteom je sveobuhvatan komplement proteina eksprimiranih unutar određene stanice ili tkiva. Za razliku od genoma, koji predstavlja skup potencijalnih sudionika u staničnim funkcijama, proteom je skup izuzetno aktivnih sudionika staničnog života i staničnih funkcija. Stoga je poznavanje proteoma, odnosno poznavanje proteina eksprimiranih unutar određene stanice ili tkiva, od iznimne važnosti za razumijevanje fenotipa, funkcionalnih razlika među stanicama, ali i načina odgovora stanica ili tkiva na stres, oboljenje i druge unutarnje i vanjske čimbenike.⁶

Kako su proteini strukturne i funkcionalne makromolekule koje predstavljaju medijatore staničnih procesa, za potpuno razumijevanje bioloških sustava nužna je molekularna karakterizacija proteoma.⁷ Potreba za postojanjem koncepta sveukupne proteomske analize uočena je prije više desetljeća, no osnovni preduvjeti za intenzivan razvoj proteomike stvoreni su sredinom devedesetih godina prošlog stoljeća objedinjavanjem elektroforetskih, kromatografskih, spektrometrijskih, spektroskopskih i bioinformatičkih tehnologija.

Pod pojmom proteomska analiza podrazumijeva se analitička obrada bioloških uzoraka, što uključuje izolacijske, razdjelne i kvantifikacijske metode i tehnike, detaljna karakterizacija proteoma u cijelosti kao i njegovih pojedinačnih sastavnica. Karakterizacija proteoma podrazumijeva identifikaciju proteina, utvrđivanje posttranslacijskih modifikacija i protein-protein interakcija, te određivanje substancične lokalizacije i proteinskih izoformi.^{8,9}

Složenost proteomike kao discipline proizlazi iz činjenice da je proteom dinamično svojstvo stanice (tkiva ili organizma), te se razlikuje od stanice do stanice obzirom na staničnu okolinu i unutarstanične procese. Primjerice, unutar jedne eukariotske stanice istovremeno može postojati oko 50 000 proteinskih vrsta,¹⁰ a raspon ekspresije pojedinih proteina može varirati i po osam redova veličine.¹¹ S obzirom na kvalitativnu i kvantitativnu raznolikost

proteoma i dinamičku prirodu bioloških sustava, uspješnost čitavih biomedicinskih istraživanja leži u kvalitetnoj analitičkoj podršci proteomike koja se zasniva na selektivnim, osjetljivim, preciznim točnim i visoko-frekventnim tehnikama.

2.2. ANALITIČKE TEHNIKE U PROTEOMICI

Proteomska analiza spektrometrijom masa može se podijeliti na tri dijela:

- a) priprema i analiza proteina
- b) analiza spektrometrijom masa
- c) bioinformatička obrada dobivenih podataka

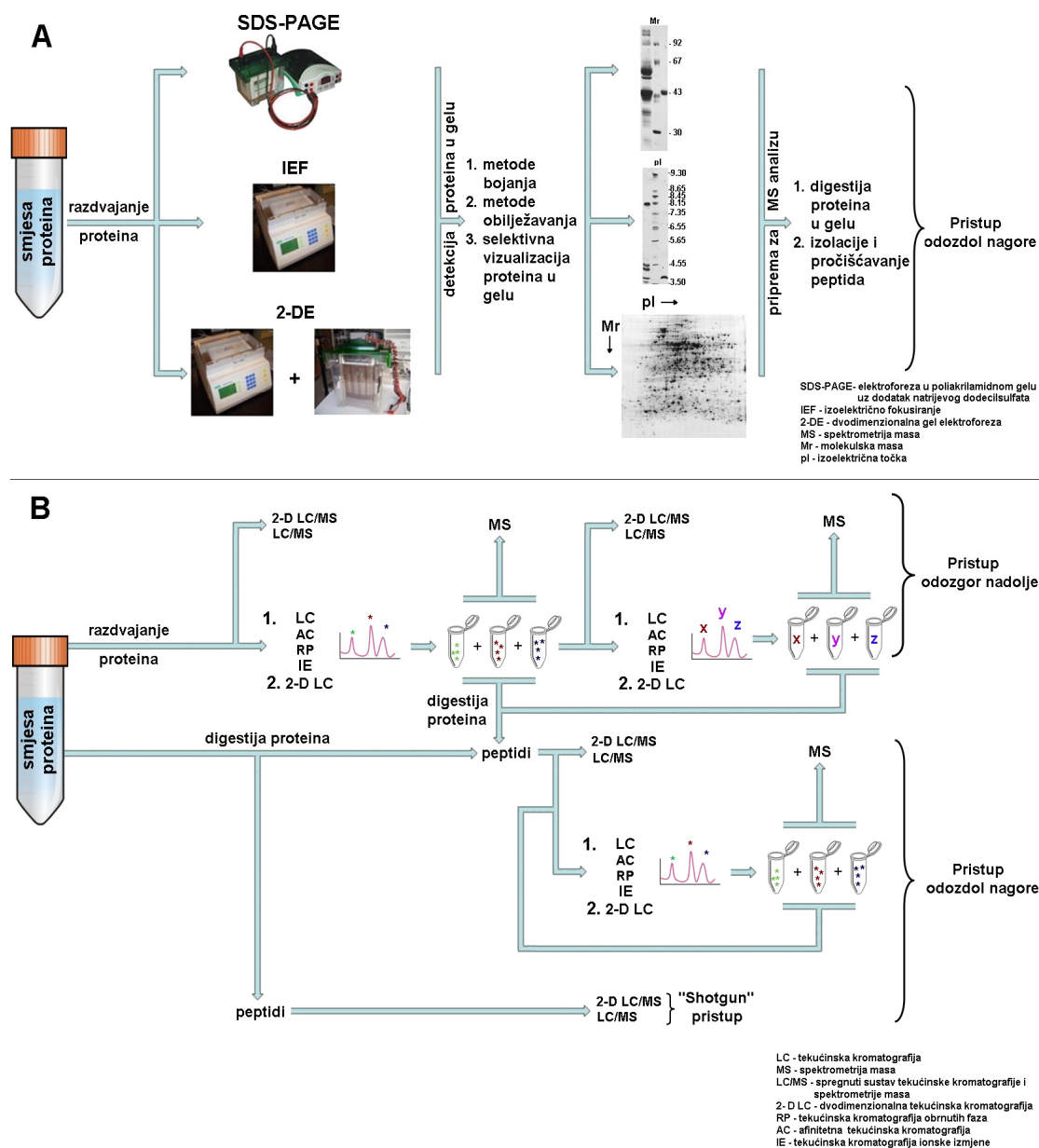
U svakom od tri navedena dijela postoji velik broj različitih analitičkih i bioinformatičkih tehnika i pristupa. Stoga će se svaki koraka proteomskog eksperimenta, sa stajališta trenutno dostupnih analitičkih tehnika i bioinformatičkih alata, razmatrati zasebno.

2.2.1. Priprema proteina za analizu

Izbor strategije za analizu proteina cjelokupnog proteoma izuzetno je važan dio proteomskog istraživanja. U posljednje vrijeme, kada je razvoj tehnika spektrometrije masa (MS, engl. *mass spectrometry*) omogućio visoko frekventno sekvenciranje peptida, ovom području pridaje se premala važnost.⁶

Priprema i analiza proteina, kao prvi korak proteomskog istraživanja, podrazumijeva razdvajanje proteina proteoma stanice, tkiva ili organizma sa svrhom mogućnosti selektiranja proteina. Eukariotska stanica može sadržavati preko 1 bilion proteinskih molekula,¹² oko 50 000 različitih proteina¹⁰ pri čemu su neki od proteina visoko zastupljeni sa do 10 milijuna kopija po stanici, dok postoje i rijetki proteini koji se u stanici pojavljuju sa svega jednom do deset kopija.¹² Obzirom na spomenuta ograničenja do danas nije razvijena tehnika kojom bi bilo moguće razdvojiti i prikazati sve proteine koji sačinjavaju ukupni stanični proteom. Tako je priprema proteina za analizu nakon rapidnog razvoja tehnika spektrometrije masa, poglavito tandemne spektrometrije masa, postala usko grlo proteomskih istraživanja.

Obzirom na izbor separacijske tehnike razdvajanja proteina koji sačinjavaju određeni proteom, dva su osnovna pristupa: razdvajanje proteina elektroforetskim tehnikama (slika 2.1.A) i razdvajanje proteina tehnikama tekućinske kromatografije (slika 2.1.B). Svaki od pristupa zasebno nudi niz različitih postupaka izolacije, razdvajanja i pročišćavanja proteinske ili peptidne smjese.



Slika 2.1. Razdvajanje proteina elektroforetskim tehnikama (A) i razdvajanje proteina i peptida tehnikama tekućinske kromatografije (B).

2.2.1.1. Elektroforetske tehnike

Elektroforeza u gelu

Učestalo korištena tehnika razdvajanja proteina u proteomskim istraživanjima je elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (PAGE, engl. *polyacrylamide gel-electrophoresis*). Poliakrilamidni gel priprema se kopolimerizacijom monomera akrilamida i *N,N*-metilenbisakrilamida (bis-akrilamid) radikalnim mehanizmom. Katalizator reakcije je *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin (TEMED) koji inducira reakciju raspadanja amonijevog persulfata (APS), inicijatora reakcije, čime nastaju persulfatni radikali.¹³ Kopolimerizacijom monomera nastaje trodimenzionalna mrežasta struktura čiju je veličinu pora moguće definirati postotnim udjelom akrilamida i bis-akrilamida.

Elektroforezom u gelu molekule se razdvajaju na temelju njihove elektroforetske pokretljivosti koja ovisi o brojnim čimbenicima, a prvenstveno o električnom naboju, veličini (molekulskoj masi), obliku, koncentraciji te stupnju hidratacije odnosno disocijacije molekule. Razdvajanje se provodi tako što molekule pod utjecajem električne struje putuju kroz trodimenzionalnu mrežu gela, brzinom koja prvenstveno ovisi o njihovom električnom naboju i veličini prema suprotnoj elektrodi (najčešće anodi).

Osim opisane izvedbe elektroforeze u gelu koja se provodi u nativnim uvjetima znatno češće se primjenjuje poseban oblik elektroforeze u gelu koja se provodi u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Pri SDS-PAGE elektroforezi razdvajanje molekula proteina ne provodi se na temelju električnog naboja i veličine, koji ponajviše definiraju električnu pokretljivost, već na temelju molekulske mase proteina. Tehnika se temelji na obradi proteinskog uzorka anionskim deterdžentom natrijevim-dodecilsulfatom (SDS, engl. *sodium dodecyl sulphate*) koji sa svojim dugim ugljikovodičnim lancima okružuje hidrofobne dijelove proteina čime potiče razmatanje i denaturaciju proteina, dok su hidrofilni dijelovi izloženi prema vodenom mediju. Količina vezanog deterdženta u nastalim micelama proporcionalna je veličini proteina, odnosno masi proteina, a naboj novonastalih micela ovisi prvenstveno o količini vezanog deterdženta. Stoga je omjer mase i naboja svih proteina konstantan, te pokretljivost različitih proteina u gelu ovisi samo o njihovoj molekulskoj masi. Pri tome pore poliakrilamidnog gela imaju učinak molekulskog sita te se proteini manje molekulske mase kreću brže kroz pore gela nego proteini veće molekulske mase. Odnos između logaritma molekulske mase i relativne udaljenosti migracije SDS iona i proteinskog kompleksa je linearan.¹⁴

Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje (IEF, engl. *isoelectric focusing*) ili elektrofokusiranje je metoda odjeljivanja proteina na temelju njihovog naboja, odnosno izoelektrične točke u gradijentu pH.¹⁵ Proteini kao amfoliti sadrže i pozitivno i negativno nabijene skupine, te ukupan naboj ovisi o pH vrijednosti medija u kojem se nalaze. Za svaki amfolit postoji vrijednost pH pri kojoj je njegov ukupni naboj jednak nuli, odnosno pri kojoj se amfolit ne giba u električnom polju, a ta se pH vrijednost naziva izoelektrična točka (pI).

U gradijentu pH vrijednosti pod utjecajem električnog polja, molekule proteina se gibaju prema elektrodi suprotnog naboja, te se tokom migracije protoniraju, odnosno deprotoniraju, zbog čega im se ukupni naboj, a time i pokretljivost smanjuje sve do točke u gelu gradijentnog raspona pH vrijednosti, koja odgovara izoelektričnoj točki dotičnog proteina. Ukoliko protein difundira iz područja svog pI, postaje električki nabijen i migrira natrag.

Način uspostavljanja gradijenta pH uvelike određuje kvalitetu i uspješnost IEF separacije proteina. Gradijent pH može se uspostaviti pomoću slobodnih amfolita nosača (CA; engl. *carrier amfolites*) ili imobiliziranog pH gradijenta (IPG, engl. *immobilized pH gradients*).¹⁶ Kao slobodni amfoliti koriste se alifatske oligoamino-oligokarboksilne kiseline relativno malih molekulskih masa i različitih izoelektričnih točaka između 3 i 11 pH jedinica, koje pri pH vrijednosti izoelektrične točke imaju jaki puferški kapacitet. Primjenom električnog polja na smjesu CA dolazi do stvaranja pH gradijenta. Imobilizirani pH gradijent postiže se kovalentnom ugradnjom gradijenta kiselih ili bazičnih puferirajućih grupa imobilina u poliakrilamidni gel neposredno prije polimerizacije. Imobilini ne mogu putovati u električnom polju čime se izbjegava pojava interferencija (nepravilna migracija CA tijekom fokusiranja) i postiže bolja rezolucija i reproducibilnost.¹⁷ Prednost IPG naspram CA načina postizanja pH gradijenta je i mogućnost nanošenja većih količina uzorka (do 5 mg), te komercijalna dostupnost u obliku IPG traka (engl. *IPG strips*) što ponajviše doprinosi reproducibilnosti.¹⁸

Danas su komercijalno dostupni gelovi različitih dimenzija za različite količine uzorka (7, 11, 17, 21, 23 cm i dr.), užeg (npr. pH=4-7, pH=4-8, pH=7-10) ili šireg (pH=3-10) raspona pH jedinica sa linearnim ili nelinearnim promjenama pH vrijednosti duž IPG trake.

Dvodimenzionalna gel elektroforeza

Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) spregnuta je tehnika dviju različitih jednodimenzionalnih elektroforetskih tehnika; izoelektričnog fokusiranja i elektroforeze u gelu, a koristi se za razdvajanja proteina unutar složenih uzoraka kao što su proteomi stanice, tkiva, organizma, tjelesnih tekućina ili drugih bioloških uzoraka. S obzirom na brojne mogućnosti izvedbe svake od pojedine spregnute jednodimenzionalne elektroforetske tehnike multiplicirane su i mogućnosti provedbe 2-DE tehnika, a danas se najčešće izvodi kombinacija izoelektričnog fokusiranja na IPG trakama i SDS-PAGE razdvajanja.

Ovom indirektnom spregom postiže se razdvajanje proteina s obzirom na dva neovisna fizikalno-kemijska svojstva proteina; izoelektričnu točku (pI) i molekulsku masu. Prva dimenzija koja se provodi izoelektričnim fokusiranjem na IPG trakama razdvaja proteine na temelju izoelektrične točke. Proteini odijeljeni na temelju pI vrijednosti potom se razdvajaju na temelju molekulske mase u gelu koji sadrži natrijev-dodecilsulfat (SDS-PAGE) što predstavlja drugu dimenziju.

S obzirom na dužinu IPG trake, te veličinu i debljinu poliakrilamidnog gela, dvodimenzionalnom gel elektroforezom može se razdvojiti više od 5 000 proteina, odnosno može se detektirati i kvantificirati manje od 1 ng proteina po proteinskoj točki (engl. *spot*).¹⁹ Dvodimenzionalna gel elektroforeza se koristi od 1975. godine, kada je na taj način razdvojeno oko tisuću različitih staničnih proteina bakterije *Escherichia coli*.²⁰

Detekcija proteina u gelu

Po završetku razdvajanja proteina nekom od elektroforetskih tehnika (SDS-PAGE, IEF, 2-DE) potrebno je vizualizirati razdvojene proteine kako bi se omogućila selekcija proteina. Metode bojanja i obilježavanja dva su osnovna načina detekcije proteina u gelu.

Osim pristupa u kojem se proteini selektiraju nakon vizualizacije svih razdvojenih proteina postoje i brojne mogućnosti tzv. selektivne vizualizacija grupe proteina ili specifičnog proteina, nakon čega je moguće provesti i vizualizaciju ukupnih proteina.

Metode bojanja

Najčešće metode bojanja su bojanje s Coomassie Brilliant Blue (CBB) bojom, bojanje srebrom, te bojanje fluorescentnim bojama.

CBB boja dolazi u dvije modifikacije: Coomassie R-250 i Coomassie G-250 koje se razlikuju po polarnosti. U kiselom mediju CBB boja se elektrostatskim i hidrofobnim interakcijama veže za amino grupe proteina. CBB G-250 je hidrofobnija od CBB R-250 zahvaljujući dvjema dodatnim metilnim skupinama, zbog čega se može koristiti i kao koloidna boja, čime se povećava osjetljivost vizualizacije. Granica detekcije koloidnog CBB R-250 iznosi 30 ng u linearnim dinamičkim rasponom od 300 ng do 1 µg.²¹

Bojanje srebrom je najosjetljivija neradioaktivna metoda sa granicom detekcije manjom od 1 ng proteina što je osnovna prednost nad CBB bojanjem. Postoji mnoštvo varijacija kod metode bojanja srebrom, za provođenje koje se koriste srebrov nitrat ili srebrov diamin. Glavni nedostaci ove tehnike su mali linearni dinamički raspon (u granicama jednog reda veličine), slaba reproducibilnost intenziteta obojenja među gelovima, znatna degradacija proteinskih uzoraka prilikom samog bojanja, te često i nekompatibilnost sa spektrometrijom masa (ovisno o samom postupku) zbog korištenja fiksativa i razvijaača na bazi aldehida koji uzrokuju unakrsno povezivanje proteina.²²

Fluorescentne boje odlikuju se velikim linearnim dinamičkim rasponom, ponekad i preko četiri reda veličine, što omogućuje pouzdanu kvantifikaciju, a uz to su i osjetljivije od gore spomenutih metoda bojanja. Osnovni nedostatak je činjenica da su znatno skuplje od ostalih metoda bojanja, te da je za vizualizaciju potreban fluorescentni skener. Najčešće korištena fluorescentna boja je SYPRO Ruby koja je po svom sastavu metalni kelat rutenija, a za proteine se veže nekovalentnim, elektrostatskim i hidrofobnim interakcijama. Uz linearni dinamički raspon od tri reda veličine i granicu detekcije oko 1 ng, te potpunu kompatibilnost sa spektrometrijom masa, SYPRO Ruby boja uvelike nadmašuje kvalitetu vizualizacije proteina u gelu metodama bojanja srebrom ili CBB bojom.²³

Osim SYPRO Ruby često se koristi i fluorescentna boja Deep Purple koja sadrži fluorofor epikokonon (engl. *epicocconone*) iz gljive *Epicocconum nigrum*. S granicom detekcije do nekoliko stotina pikograma ovaj je način vizualizacije znatno osjetljiviji i od SYPRO Ruby bojanja.²⁴

Metode obilježavanja

Metode vizualizacije obilježavanjem proteina temelje se na postupku inkorporiranja obilježavajućeg agensa u smjesu proteina prije samog razdvajanja, pri čemu se s obzirom na vrstu obilježivača razlikuju postupci radioobilježavanja proteina i obilježavanja proteina bojom.

Radioobilježavanje, koje se još naziva i metaboličko obilježavanje, se uglavnom koristi kod metabolički aktivnih stanica ili tkiva kako bi se ustanovile razlike u razini ekspresije ciljanih proteina. Stanice ili tkivo inkubiraju sa radioaktivnom aminokiselinom npr. [^{35}S]-metioninom, koja se onda u procesu translacije inkorporira u proteine koji se aktivno sintetiziraju.²⁵ Nakon elektroforetskog razdvajanja smjese proteina izoliranih iz stanice ili tkiva, vizualizacija proteina se provodi upotrebom rendgenskog filma. Ova tehnika je izvrstan način za detekciju brzih promjena u proteomu bakterija i jednostavnih eukariota, međutim poteškoće se javljaju kod primjena na složenijim animalnim modelima.

Tehnika diferencijalne gel elektroforeze (DIGE, engl. *Differential In-Gel Electrophoresis*) datira iz 1997. godine, a temelji se na obilježavanju različitih uzoraka proteina s fluorescentnim cijaninskim bojama 3-(4-karboksimetil)fenilmetil-3'-etiloksakarbocijanin halid *N*-hidroksisukcinimidil ester (Cy2), 1-(5-karboksipentil)-1'-propilindokarbocijanin halid *N*-hidroksisukcinimidil ester (Cy3) i 1-(5-karboksipentil)-1'-metilindodikarbocijanin halid *N*-hidroksisukcinimidil ester (Cy5) prije elektroforeze, pri čemu svaka od boja apsorbira zračenje drugačije valne duljine.²⁶ Samom reakcijom obilježavanja dolazi do kovalentnog vezanja fluorescentne boja na N-kraj proteina. Budući da se boja dodaje u velikom manjku, samo oko 5% proteina je obilježeno, što samu tehniku čini najmanje invazivnom tehnikom detekcije proteina. Analiza se provodi obilježavanjem svakog od triju uzoraka (zdravog i bolesnog tkiva odnosno zdravih i bolesnih stanica, te uzoraka interne kontrole (pomiješane jednake količine zdravog i bolesnog uzorka) različitom fluorescentnom cijaninskim bojom. Nakon obilježavanja, a prije razdvajanja elektroforetskim tehnikama, sva tri uzorka se pomiješaju u ekvimolarnoj količini i nadalje tretiraju kao jedan uzorak. Po razdvajanju proteina, diferencijalno obilježeni proteini vizualiziraju se fluorescentnim skenerom, snimanjem gela na tri različite valne duljine od kojih je svaka specifična za jednu boju (Cy2, Cy3 ili Cy5). Prednosti DIGE tehnike vizualizacije proteina nad ostalim tehnikama vizualizacije su minimalna količina degradiranih proteina uslijed bojanja, nepotrebno odbojavanje izabranih proteinskih točaka uz potpunu kompatibilnost sa spektrometrijom masa. Osim toga DIGE tehnika vizualizacije omogućava istovremeno razdvajanje proteina

zdravog i bolesnog proteoma (na istoj IPG traci, na istom gelu) što omogućuje najpouzdaniju detekciju kvantitativnih i kvalitativnih razlika u ekspresiji proteina.^{27,28}

Metode selektivne vizualizacije proteina

Selektivnom vizualizacijom proteina detektira se samo određena grupa proteina ili specifični protein sa određenim kemijskim svojstvom, koje ujedno omogućuje selekciju. Metode koje se koriste prilikom selektivne vizualizacije proteina su metode bojanja i imunokemijske metode. Ukoliko proteini ili jedan protein od interesa posjeduju određeno kemijsko svojstvo na koje je moguće razviti ili već postoji razvijeno selektivno antitijelo, moguće je imunokemijskim metodama, primjerice bugaćenjem po Western-u, provesti vizualizaciju ciljanih proteina.²⁹ Sama tehnika se zasniva na visoko specifičnoj reakciji primarnog antitijela (prepoznaje određeno svojstvo proteina) i antigena (protein sa određenim svojstvom), a vizualizacija se, ovisno o upotrijebljenom sekundarnom antitijelu, može provoditi na različite načine (kolorimetrijski, kemiluminiscencijski, fluorescencijski, autoradiografski i sl.). Ovo je čest način vizualizacije grupe proteina sa određenom posttranslacijskom modifikacijom (fosforilacija, acetilacija, amidacija, oksidacija i dr.) kao i pojedinačnih proteina na koje postoje specifična antitijela. U početku je osnovni nedostatak ovakvog načina selektivne detekcije bila nekompatibilnost sa tehnikama spektrometrije masa. Danas je enzimsku odgradnju proteina moguće provesti na nitroceluloznim ili poliviniliden-fluoridnim (PVDF) membranama, te je tehnika u potpunosti MS kompatibilna.^{30,31} Iznimna prednost ove tehnike vizualizacije proteina, osim selektivnosti, je i niska granica detekcije koja doseže do 1 pg.³¹

Selektivne metode bojanja uglavnom se odnose se na vizualizaciju grupe proteina sa istom posttranslacijskom modifikacijom, pa su tako najpoznatije selektivne metode vizualizacije fosfoproteina³² i glikoproteina³³ u gelu.

Vizualizacija fosfoproteina najčešće se provodi fluorescentnom bojom Pro-Q Diomond koja omogućava direktnu detekciju fosfatnih skupina aminokiselina tirozina, serina i treonina u gelu, stvarajući metalo komplekse sa fosfatnim skupinama proteina. Za pojedini fosfoprotein intenzitet signala proporcionalan je broju fosfatnih skupina, a granica detekcije iznosi 1-16 ng fosfoproteina uz linearni dinamički raspona kroz tri reda veličine.³⁴

Za selektivnu vizualizaciju glikoproteina u gelu koriste se fluorescentne boje. Detekcija se temelji na kemijskoj reakciji fluorescentne boje (koja je po kemijskoj strukturi Schiff-ova baza) sa glikanima prethodno oksidiranim periodičnom kiselinom. Najpoznatije fluorescentne boja za vizualizaciju glikoproteina u gelu su osjetljivija Pro-Q-Emerald 488 i

standardno upotrebljavana Pararosanilin. Granica detekcije iznosi 5-18 ng, odnosno 50-70 ng, a ovisi o stupnju i vrsti glikozilacije proteina.³³

Izbor i priprema proteina za analizu spektrometrijom masa

Nakon razdvajanja proteina nekom od elektroforetskih tehnika, te vizualizacije razdvojenih proteina u gelu, potrebno je selektirati proteine i pripremiti ih za analizu spektrometrijom masa.

Većina proteomskih istraživanja temelji se na uspostavljanju razlika u razini ekspresije proteina između kontrolnog i ispitivanog uzorka, pa je najčešće upravo razlikovno eksprimirane proteine potrebno identificirati tehnikama spektrometrije masa. Količinu proteina u vrpce (engl. *band*) ili točki moguće je procijeniti prema stupnju obojenja. Gelovi sa razdvojenim i vizualiziranim proteinima kontrolnog i ispitivanog uzorka analiziraju se denzitometrom koji na temelju gustoće boje i veličine vrpce ili točke određuje relativne i međusobne razlike u količini proteina. Izbor diferencijalno (kvalitativno i kvantitativno) eksprimiranih proteina vrši se nakon obrade denzitometrijskih slika specijaliziranim programskim paketima.⁶ Na točnost i pouzdanost postupka izbora razlikovno eksprimiranih proteina ponajviše utječe izbor metode vizualizacije proteina.

Budući da se proteini nalaze se u trodimenzionalnoj mreži gela iz koje teško difundiraju pristup u analizi proteina razdvojenih elektroforetskim tehnikama gotovo uvijek je odozdo nagore, odnosno identifikacija proteina provodi se analizom proteinskih fragmenata nastalih enzimskom ili kemijskom odgradnjom proteina. Nakon izrezivanja proteinskih vrpce ili točki i po potrebi uklanjanja boje korištene za vizualizaciju, proteini se u gelu pocijepaju specifičnim proteinazama, a nastali peptidi se ekstrahiraju iz gela.³⁵ U tablici 2.1. dani su najčešće korišteni proteolitički reagensi u proteomici.³⁶

Tablica 2.1. Proteolitički reagensi za odgradnju proteina. Za označavanje aminokiselina korištene su jednoslovne skraćenice, a X označava bilo koju aminokiselinu. Superskriptima u mjestu cijepanja peptidne okosnice označeni su najčešće mjesto cijepanja (***), rjeđe mjesto cijepanja (**), rijetko mjesto cijepanja (*) ili iznimke kod kojih nema cijepanja (⁰).

Proteinaza	Mjesto cijepanja peptidne okosnice
Arg-C	RX ^{***} , KX [*]
Asp-N	XD ^{***} , XC ^{***} , XE ^{**}
Kimotripsin	FX ^{***} , YX ^{***} , WX ^{**} , LX ^{**} , MX [*] , IX [*] , SX [*] , TX [*] , VX [*] , HX [*] , GX [*] , AX [*] , XP ⁰
Glu-C	EX ^{***} i DX ^{***} u fosfatnim puferima EX ^{***} u NH ₄ HCO ₃ puferu XP ⁰
Lys-C	KX ^{***} , NX [*]
V8	EX ^{***}
Tripsin	KX ^{***} , RX ^{***} , XP ⁰
Kemijski reagens	Mjesto cijepanja peptidne okosnice
Cianogenbromid (CNBr)	XM
Hidroksilamin	NG

X - bilo koja aminokiselinu;

(**) - rjeđe mjesto cijepanja

(*) - rijetko mjesto cijepanja

(0) - iznimke kod kojih nema cijepanja

U proteinskim eksperimentima najčešće se kao proteinaza koristi tripsin zbog visokospecifične i ponovljive reakcije cijepanja proteina u gelu ili u otopini, kojom pretežno nastaju peptidi optimalne dužine za analizu spektrometrijom masa (do 30-ak aminokiselina). S obzirom na mjesto cijepanja peptidne okosnice (tablica 2.1.), tripsinolizom proteina nastaju peptidi sa bazičnim aminokiselinama arginina i lizina na C-kraju peptide (triptički fragmenti) što znatno olakšava analizu MS tehnikama, osobito tehnikama tandemne spektrometrije masa (poglavlja 2.2.2.3. -2.2.2.5.).³⁶ Po završetku proteolitičke reakcije, dobiveni peptidi se prije analize MS tehnikama pročišćavaju (odsoljavaju i ukoncentriravaju) ili se dodatno razdvajaju tekućinskom kromatografijom obrnutih faza.³⁵

2.2.1.2. Tehnike tekućinske kromatografije

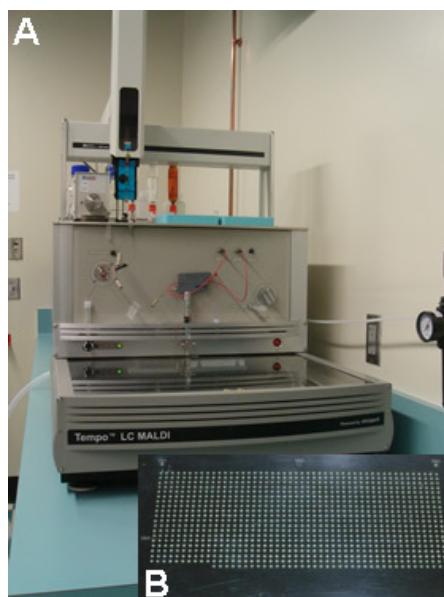
Budući da su proteini u nativnom obliku, kao i peptida nastali kemijskom ili enzimskom razgradnjom proteina, topivi u vodi, tehnike tekućinske kromatografije (LC, engl. *liquide chromatography*) najprikladnije su kromatografske tehnike za njihovu analizu. LC tehnike se u proteomici koriste poglavito za razdvajanje i za pročišćavanje smjese proteina ili peptida. Najčešće se koriste razdjelne LC tehnike kao što su kromatografija obrnutih faza i kromatografija ionske izmjene, i, u specifičnim eksperimentima, afinitetna kromatografija, dok se za pročišćavanje smjese proteina ili peptida uglavnom koristi kromatografija obrnutih faza.

Tekućinska kromatografija obrnutih faza

Kromatografija obrnutih faza (RP, engl. *reverse phase*) najčešći je oblik razdjelne tekućinske kromatografije koja se koristi u više segmenta proteinskog eksperimenta; u pripremi i razdvajanja proteina, u postupku pročišćavanja smjese proteina kao i za pročišćavanje smjese peptida prije analize spektrometrijom masa. Kromatografija obrnutih faza razdvaja proteine po njihovoj hidrofobnosti, a provodi se u sustavu sa nepolarnom nepokretnom fazom i pokretnom fazom gradijentno promjenjive polarnosti. Gradijentna promjena polarnosti pokretne faze postiže se dobavljanjem pokretne faze iz dvaju kanala. Jedan kanal dobavlja pokretnu fazu koja se sastoji od vodene otopine TFA, a drugi pokretnu fazu koja sadrži istu količinu TFA otopljene u organskom otapalu (najčešće acetonitril). Trifluoroctena kiselina (TFA) se dodaje pokretnoj fazi u volumnom udjelu od 0.1% do 1% kako bi se smanjio broj nepoželjnih interakcija bočnih ogranka bazičnih aminokiselina proteina ili peptida sa silanolnim skupinama nepokretne faze. Tokom RP kromatografije hidrofilniji proteini i peptidi prelaze ranije u gradijentu u pokretnu fazu (pri manjem udjelu organskog otapala), dok hidrofobniji proteini i peptidi eluiraju kasnije u gradijentu. Za razdvajanje proteina ili peptida bez direktne sprege sa spektrometrom masa najčešće se koriste analitičke kolone unutarnjih promjera 2.1 do 4.6 mm sa veličinom čestica nepokretne faze od 5 µm i veličinom pora od 30-ak nm, dok se za razdvajanje proteina ili peptida kod direktne sprege sa spektrometrom masa koriste kapilarne kolone i mikrokolone unutrašnjih promjera manjih od 350 µm. Nepokretne faze koje se koriste za analizu proteina tekućinskom kromatografijom obrnutih faza su oktadecilsilicijev dioksid (C₁₈), oktilsilicijev dioksid (C₈) i butilsilicijev dioksid (C₄).

Budući da tehnikama ionizacije koje koriste laser nedostaje kromatografska komponenta, razvijen je poseban oblik RP kromatografije tehnika ZipTip. Tehnika se najčešće upotrebljava za pročišćavanje peptida i proteina prije analize spektrometrom masa kod kojeg se ionizacija analita događa uz matricom pomognutu ionizaciju i desorpciju laserskim zračenjem (MALDI, engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*). ZipTip je malena količina (od nekoliko mg do 1 g) nepokretne faze širokih pora koja se nalazi na kraju plastičnog nastavka pipetora. Uzorak se nanosi na nepokretnu fazu koja se zatim ispire smjesom vode, organskog otapala (najčešće acetonitril) i trifluoroctene kiseline. Razlučljivost ove tehnike je znatno lošija nego razlučljivost koja se postiže na kromatografskim kolonama, ali su na ovaj način ukoncentrirani i odsoljeni analiti pogodni za analizu MALDI tehnikama spektrometrije masa.

Osim uvriježene ZipTip tehnike, u novije vrijeme razvijen je oblik indirektne sprege kapilarnog LC i MALDI tehnike ionizacije. Poseban oblik kolektora omogućava da se eluati sa kapilarne kolone istovremeno sakupljaju i miješaju sa željenom matricom. Potom se nastala smjesa analita i matrice automatski deponira na MALDI pločicu (slika 2.2.), te se prethodno kromatografski razdvojeni proteini ili peptidi nalaze na zasebnim mjestima na MALDI pločici.



Slika 2.2. Prikaz instrumenta LC MALDI (A) i teflonska pločica na koju se nanose eluati sa kromatografske kolone nakon miješanja sa matricom (B)

Tekućinska kromatografija ionske izmjene

Kromatografijom ionske izmjene (IE, engl. *Ion Exchange*) molekule proteina se razdvajaju prema ukupnom naboju koji ovisi o sastavu i pH vrijednosti pokretne faze. Elucija proteina s kolone može se provoditi promjenom pH ili ionske jakosti pokretne faze, čime se mijenja ukupan naboj proteina. Budući da ukupan naboj proteina ovisi o pI točki proteina, kromatografijom ionske izmjene proteini se razdvajaju prema pI vrijednostima. S obzirom na nepokretnu fazu razlikuju se anionska kromatografije IE i kationska kromatografija IE. Najčešće se za razdvajanje proteina koristi kationska kromatografija IE osobito na jakim kationskim izmjenjivačima koji kao nepokretnu fazu imaju na sefarnoj (sulfopropil) ili celuloznoj kovalentno vezane sulfonirane ili karboksilirane funkcionalne skupine.

Afinitetna tekućinska kromatografija

Afinitetna kromatografija (AC, engl. *affinity chromatography*) je razdjelna tehnika koja se temelji na specifičnoj interakciji između imobiliziranog liganda i ciljne molekule. U proteomskim istraživanjima ova se kromatografska tehnika uglavnom koristi kao korak koji prethodi daljnjem razdvajanju proteina (elektroforetskim ili LC tehnikama). Afinitetnom kromatografijom moguće je ukloniti jedan protein ili grupu proteina, odnosno ukoncentrirati slabo zastupljene proteine. Na taj način se u daljnjem razdvajanju smanjuje interferencija visokozastupljenih proteina sa razlučljivošću ostalih proteina. Također je afinitetnom kromatografijom moguće klasificirati ukupne proteine u dvije ili više grupa prije daljnjih razdvajanja. Osim u selektiranju proteina prema određenom svojstvu, afinitetna kromatografija se sve češće koristi u razdvajanju peptida prema nekom kemijskom svojstvu (najčešće posttranslacijske modifikacije) i utvrđivanju protein-protein interakcija. Razvojem sustava i strategija za kemijsko obilježavanje peptida, primjena AC je sve šira.³⁷ Najznačajnija primjena obilježavanja peptida uz upotrebu afinitetne kromatografije je u kvantifikaciji proteina koji sačinjavaju proteome, a koja se provodi obilježavanjem peptida izotop-kodiranim afinitetnim obilježivačem (ICAT, engl. *isotop-coded affinity tag*). ICAT selektivno alkilira cisteinske bočne ogranke peptida osmerostruko deuteriranim (tzv. teški ICAT reagens) ili nedeuteriranim (tzv. lakim reagens). Različito obilježeni uzorci se potom miješaju i cijepaju specifičnim proteinazama, a obilježeni peptidi izoliraju se afinitetnom kromatografijom.³⁸⁻⁴⁰

ICAT tehnika obilježavanja pepetida u svrhu kvantifikacije proteina prije razdvajanja LC tehnikama, komplementarna je DIGE tehnici kvantifikacije i vizualizacije proteina koji se razdvajaju elektroforetskim tehnikama.

Najraširenija primjena afinitetne kromatografije je u postupku ukoncentriravanja slabo zastupljenih proteina. Složenost smjese proteina osim mnoštva raznolikih proteina čini vrlo visoka neujednačenost zastupljenosti pojedinih proteinskih vrsta unutar smjese.¹⁰⁻¹² Ponekad je u proteomskom eksperimentu potrebno ukloniti visoko zastupljene proteine kako bi se omogućilo dostatno razdjeljivanje manje zastupljenih proteina. Jedan od najsloženijih uzoraka u proteomskim istraživanjima, s obzirom na veliku razliku u zastupljenosti među proteinima koji je sačinjavaju, je plazma. Procijene o broju različitih proteina u plazmi počinju sa 10 000, ali zbog mogućnosti višestrukih i različitih posttranslacijskih modifikacija kao i metaboličkih promjena, taj broj može biti i nekoliko redova veličina veći.⁴¹ Međutim, više od 80% ukupnih proteina plazme predstavljanju serumski albumin protein čovjeka (HSA, engl. *Human serum albumin*) i različite forme imunoglobulina (IgGs, engl. *immunoglobulins*),⁴² a uklanjanjem 20 najzastupljenijih proteina plazme ujedno se uklanja preko 98% ukupnih proteina plazme.^{43,44} Danas su komercijalno dostupne kolone koje na čvrstom nosaču imaju kovalentno vezana antitijela na određeni broj visoko zastupljenih proteina plazme (postoje izvedbe kolona sa 2 do 30 različitih antitijela). Pročišćavanje, odnosno uklanjanje visokozastupljenih proteina omogućeno je visokspecifičnom interakcijom između antitijela vezanog na kruti nosač i određenog proteina iz uzorka plazme. Nakon nanošenja uzorka plazme na kolonu visokozastupljeni proteini se zadržavaju na koloni, a ostali proteini bivaju propušteni. Interakcija između imobiliziranih antitijela i antigena iz plazme (visokozastupljeni proteini) se dokida povećanjem ionske jakosti otapala, te se na taj način kolona regenerira za novi ciklus pročišćavanja, odnosno razdvajanja.

Tehnike višedimenzionalne tekućinske kromatografije

Proteine u jednostavnim smjesama moguće je razdvojiti nekom od razdjelnih tehnika tekućinske kromatografije. Međutim složene smjese proteina kao što je proteom stanice, tkiva ili organizma, obično nadmašuju mogućnosti razdvajanja bilo koje tehnike tekućinske kromatografije,^{45,46} pa se proteini složenih proteinskih smjesa razdvajaju ortogonalnim dvodimenzionalnim razdjelnim LC tehnikama koje znatno povećavaju razlučivosti.^{20,47-50} Izradom kromatografskih kolona s miješanim stacionarnim fazama, prvenstveno sa miješanom stacionarnom fazom za kromatografiju IE i kromatografiju RP, omogućen je razvoj višedimenzionalne tehnike identifikacije proteina (MudPIT, engl. *Multidimensional Protein Identification Tehnology*).^{51,52} Osim ovakvom direktnom spregom dvodimenzionalno kromatografsko razdvajanje često se provodi indirektnom spregom kromatografije IE kao prve dimenzije i kromatografije RP kao druge dimenzije. Proteini razdvojeni IE kromatografijom, prema pI točkama sakupljaju se u frakcije, a potom se proteini svake frakcije dodatno razdvajaju prema hidrofobnosti RP kromatografijom koja je obično automatski spregnuta sa spektrometrom masa. Ovo je najčešći oblik proteomskog eksperimenta sa pristupom identifikacije proteina odozgor nadolje (engl. *top-down*), u kojem se provodi razdvajanje i analiza intaktnih proteina složenog sustava. No, znatno češći pristup identifikaciji proteina MUdPIT tehnikom je onaj odozgor nadolje (engl. *bottom up*), koji se provodi na način da se ukupni proteini ili frakcije proteina dobivene po razdvajanju kromatografijom IE, enzimski odgrade specifičnim proteinazama nakon čega se smjesa dobivenih peptida razdvaja RP kromatografijom uz direktnu ili indirektnu spregu sa spektrometrom masa.

Danas se kod većine pristupa odozdo nadolje koristi tzv. *shotgun* pristup koji se provodi cijepanjem ukupnog proteomskog uzorka specifičnom proteinazom nakon čega slijedi razdvajanje nastalih peptida višedimenzionalnom tehnikom tekućinske kromatografije uz direktnu spregu sa spektrometrom masa.^{52,53}

Sustavi za detekciju

Najčešće korišteni i najprikladniji detektori za analizu proteina i peptida tehnikama tekućinske kromatografije su ultraljubičasti detektor sa diodnim nizom (UV-DAD, engl. *ultraviolet diode array detector*) i fluorescencijski detektor (FLD, engl. *fluorescence detector*).

UV-DAD detektorom proteini i peptidi se detektiraju na valnim duljinama apsorpcijskog maksimuma peptidne veze (od 210 nm do 215 nm) ili na valnoj duljini od 280 nm što je apsorpcijski maksimum aminokiselina s benzenskim prstenom unutar bočnih ogranaka (triptofan, tirozin i fenilalanin).⁵⁴

Iste su tri aminokiseline zaslužne za mogućnost detekcije proteina i peptida fluorescencijskim detektorom. Međutim, valne duljine emisijskih i ekscitacijskih maksimuma su za sve tri spomenute aminokiseline različite, a osim toga ovise o sastavu, temperaturi i pH vrijednosti otopine u kojoj se proteini ili peptidi nalaze, pa se FLD detekcija rijetko izvodi rutinski. Međutim FLD detektor se znatno češće koristi za analizu kemijski obilježenih proteina ili peptida budući da se kao obilježivač uglavnom koriste molekule koje fluoresciraju s dobro definiranim valnim duljinama maksimalne ekscitacije i emisije.

2.2.2. Spektrometrija masa

Nakon razdjeljivanja proteina nekom od elektroforetskih tehnika ili tehnikama tekućinske kromatografije, daljnji korak u proteomskom eksperimentu je analiza razdijeljenih proteina ili peptida tehnikama spektrometrije masa. Spektrometrija masa (MS, engl. *Mass Spectrometry*) je analitička tehnika u kojoj se molekule ili atomi ioniziraju, a potom se ioni razdvajaju prema njihovim omjerima mase i naboja (m/z , engl. *mass-to-charge ratio*). Osnovni dijelovi spektrometra masa su: ionski izvor, analizator masa i detektor. Analiza spektrometrijom masa započinje uvođenjem analita u ionski izvor gdje se događa ionizacija. Potom nastali ioni putuju u analizator masa gdje se razdvajaju prema m/z vrijednostima, te u konačnici dolaze do detektora koji registrira broj iona pri svakoj vrijednosti m/z , što rezultira stvaranjem spektra masa.⁵⁵ Mogućnosti izvedbe spektrometra masa, s obzirom na izbor ionizatora, analizatora i detektora, su mnogobrojne.

2.2.2.1. Ionizacija

Kod analize uzoraka tehnikama spektrometrije masa neophodno je prevođenje analita u plinovito stanje i njegova ionizacija. Postoji više različitih načina ionizacije, a izgled spektra neke analizirane vrste često znatno ovisi o izabranoj metodi ionizacije. Ionski izvori dijele se na dvije glavne kategorije: plinske i desorpcijske izvore. Kod plinskih ionskih izvora uzorak se najprije prevodi u plinovito stanje, a potom se ionizira. Ovoj skupini pripadaju kemijska ionizacija (CI, engl. *Chemical Ionization*), ionizacija elektronima (EI; engl. *Electron Ionization*), te ionizacija poljem (FI engl. *Field Ionization*). Kod desorpcijskih metoda ionizacije, kao što su udar ubrzanim atomima (FAB, engl. *Fast-atom Bombardment*), desorpcija plazmom (PD, engl. *Plasma Desorption*), matricom pomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem (MALDI, engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), te elektroraspršenje (ESI, engl. *Electrospray-ionization*), uzorak se direktno iz čvrstog ili tekućeg stanja prevodi u ionizirani plin, što je pogodno za analizu nehalapljivih i termički nestabilnih uzoraka. Ionski izvori se, s obzirom na količinu energije koju tokom ionizacije predaju analitu, još dijele na meke (engl. *soft*) i tvrde (engl. *hard*). Tvrđi ionski izvori predaju analitu velike količine energije, pa prilikom relaksacije molekule dolazi do pucanja veza i nastajanja fragmentnih iona m/z vrijednosti manjih od samog molekulskog iona. Meki ionski izvori uzrokuju neznatnu fragmentaciju analita dajući jednostavnije spektre sa intenzivnim signalom molekulskog iona i malobrojnim dodatnim signalima znatno manjeg intenziteta.⁵⁵

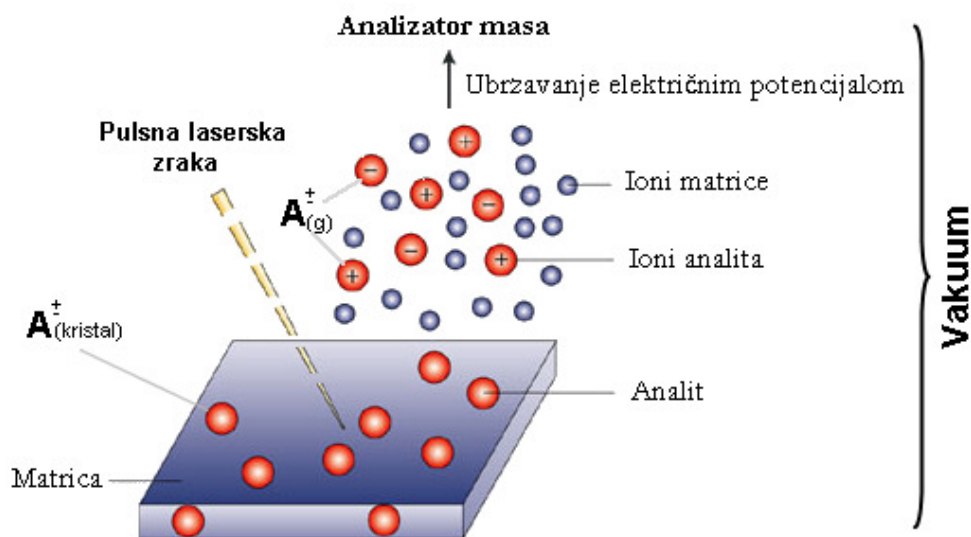
Za ionizaciju proteina i peptida najčešće se koriste desorpcijske metode ionizacije mekim ionskim izvorima i to MALDI¹ i ESI² tehnike ionizacije. Granica detekcije analize tehnikama MALDI i ESI nalazi se između femtomola i pikomola, a ovisi o načinu pripreme i čistoći uzorka.⁵⁶

MALDI ionizacija

MALDI je blaga ionizacijska tehnika koja rezultira formiranjem jednostruko nabijenih iona što uvelike olakšava identifikaciju spektara.

MALDI tehnika temelji se na desorpciji analita prethodno ugrađenog u kristalnu strukturu molekula matrice kojoj slijedi ionizacija. Uzorak se priprema miješanjem s otopinom matrice u smjesi lakohlapljivog otapala i vode. Mali volumen (oko 1 μ l) otopine analita i matrice nanosi se na pločicu od inertnog materijala (najčešće teflon). Sušenjem nastaju kokristali matrice i analita koji se uvode u visoki vakuum. Pulsni visokoenergetski laser (dušikov,

diodni ili IR laser), proizvodi pulsirajuću lasersku zraku, a zahvaljujući apsorpciji emitirane energije od strane molekula matrice dolazi do desorpcije molekula matrice i analita. Pri tom se matrica zagrijava, a uslijed fazne promjene na površini matrice (čvrsto-tekućina pod visokim tlakom ili čvrsto-plin pod visokim tlakom) dolazi do adijabatske ekspanziju u vakuumu. Unutar desorbiranih klastera molekula matrice i molekula analita odvija se ionizacija analita prijenosom protona sa molekula matrice na molekule analita ili obrnuto (slika 2.3.).



Slika 2.3. MALDI ionizacija

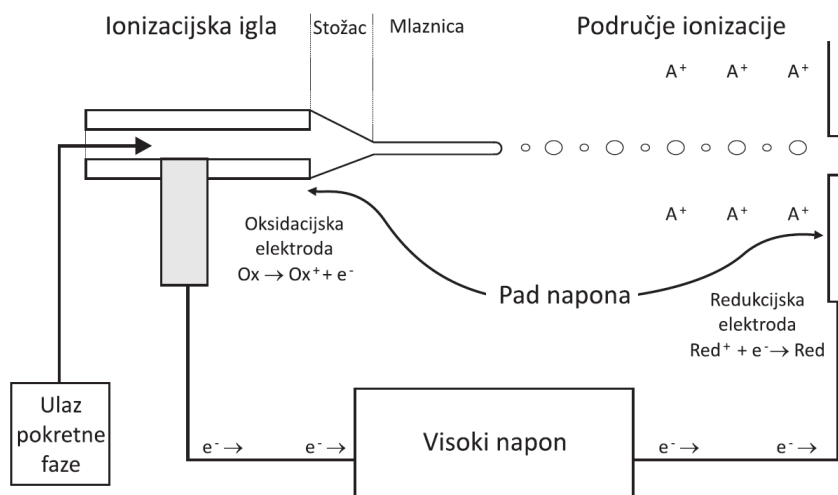
Izbor matrice ponajviše ovisi o korištenom laseru, ali i o vrst analita. Za analizu proteina i peptida koriste se α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (CHCA), 2,4,6-trihidroksiacetofenon (THAP) i diamonijev citrat (DAC).⁵⁷

Kako analizatori za analizu iona nastalih MALDI ionizacijskom tehnikom najčešće se koristi analizator koji mjeri vrijeme leta (TOF, engl. *time-of-flight*) zbog mogućnosti mjerenja velikog raspona m/z vrijednosti, te sinkronizacije rada sa pulsним radom ionskog izvor. Nastali ioni mogu se analizirati i analizatorima koji skladište ione kao što su ionska stupica (IT, engl. *ion trap*) i ionsko-ciklotronska rezonancija uz Fourier-ovu transformaciju (FT ICR, engl. *Fourier-transform ion cyclotron resonance*).⁵⁶

ESI ionizacija

Ionizacija elektroraspršenjem je najzastupljeniji oblik ionizacije u spregnutim sustavima tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (LC-MS engl. *Liquid chromatography coupled to mass spectrometry*). Ovim oblikom ionizacije produciraju se višestruko nabijeni ioni što omogućuje detekciju velikih molekula poput proteina, pa se ESI ionizacija često koristi za identifikaciju intaktnih proteina u proteomskim eksperimentima s pristupom odozgor nadolje.

Analit za ESI ionizaciju je najčešće pomiješan sa smjesom organskog otapala, vode, TFA ili mravlje kiseline. Sama ionizacija događa se pri atmosferskom tlaku pod utjecajem snažnog električnog polja na tekućinu koja protokom od nekoliko μl u minuti, prolazi kroz kapilaru, koja je ujedno i ionizacijska igla. Primjenom napona od 2 do 5 kV na kapilaru stvara se razlika u električnom potencijalu između kapilare i elektrode (engl. *counter-electrode*), a nastalo električno polje potiče nakupljanje naboja na površini tekućine na vrhu kapilare. Propuhivanjem inertnog plina (najčešće dušika) koji pospešuje isparavanje otapala, tekućina se raspršuje u nabijene kapljice pri čemu se ioni analita oslobađaju otapala i ulaze u analizator spektrometra masa (slika 2.4.).



Slika 2.4. ESI ionizacija

Ioni nastali ESI ionizacijom mogu biti višestruko pozitivno ili višestruko negativno nabijeni ovisno o dodatku ili gubitku protona tijekom ionizacije. Protonacijom nastaju višestruko nabijeni ioni formule $[M+nH]^{n+}$, dok deprotonacijom nastaju ioni formule $[M-nH]^{n-}$.

U slučaju višestruko pozitivno nabijenih iona masa analita može se izračunati prema izrazu:

$$M=n(m_+-m_H)$$

a u slučaju višestruko negativno nabijenih iona prema izrazu:

$$M=n(m_-+m_H)$$

gdje je M molekulska masa, n naboj višestruko nabijenog iona, m_+ izmjerena masa višestruko pozitivno nabijenog iona, m_- izmjerena masa višestruko negativno nabijenog iona (m/z vrijednosti), a m_H masa protona koja iznosi 1,00782 Da.⁵⁸

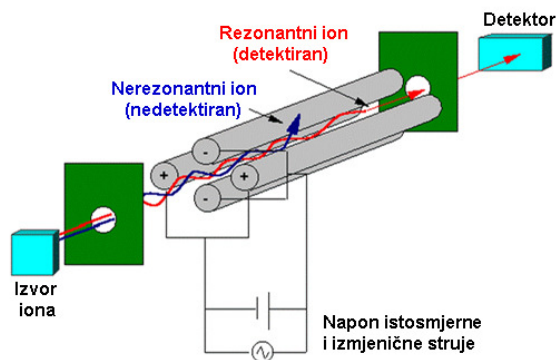
Ioni nastali ESI ionizacijom mogu se razdvojiti različitim analizatorima kao što su kvadrupol (Q, engl. *quadrupole*), ionska stupica ili analizator s magnetskim sektorom.⁵⁶

2.2.2.2. Analizatori

Izvedbe spektrometara masa se, osim tehnikom ionizacije, razlikuju i prema analizatorima. Analizator masa je dio spektrometra masa u kojem se razdvajaju ioni različitog omjera mase i naboja. U proteomici se najčešće upotrebljavaju kvadrupol i TOF analizatori, te hibridni analizatori nastali kao kombinacija istih (TOF-TOF) ili različitih analizatora (Q-TOF) u svrhu postizanja optimalne konfiguracije.⁵⁶

Kvadrupolni analizator masa

Kvadrupolni analizator masa se sastoji od četiri usporedne elektrode dijagonalno električki povezane: jedan par s pozitivnim, a drugi s negativnim polaritetom. Dvije dijagonalno suprotne elektrode su povezane radiofrekventnim modulatorom i izvorom izmjenične struje (slika 2.5.).



Slika 2.5. Shema kvadrupolnog analizatora masa.

Selekcija masa postiže se proporcionalnim promjenama amplitude radiofrekvencije i struje, tako da za svaki par ovih amplituda određeni ioni specifične m/z vrijednosti, postižu rezonanciju i neometanim prolaskom kroz analizator dolaze do detektora. Naime, u ovisnosti o primijenjenim amplitudama, rezonantni ioni, ne sudarajući se ni sa jednim od parova elektroda kvadrupolnog analizatora masa, dolaze do detektora. Istovremeno nerezonantni ioni se sudaraju sa parom elektroda suprotnog im polariteta te se na taj način neutraliziraju. Primjenom različitih kombinacija amplituda moguće je razdvojiti ione čije se m/z vrijednosti ne razlikuju za više od 0,5.

TOF analizator

Analizator koji mjeri vrijeme leta (TOF), nakon ubrzavanja iona električnim poljem, razdvaja ione na temelju njihove brzine putovanja, odnosno vremena leta kroz cijev analizatora. Dulji put leta, odnosno tehnički gledano dulja cijev analizatora, doprinosi razlučljivosti iona na štetu osjetljivosti detekcije. Osim toga, produženo vrijeme leta produžava i vrijeme skeniranja odnosno snimanja spektara, pa u modernim TOF analizatorima duljina cijevi ne prelazi nekoliko metara. Od ionizacijskog izvora do cijevi analizatora ioni se ubrzavaju primjenom konstantnog električnog potencijala, tako da na ulasku u cijev analizatora svi ioni imaju istu kinetičku energiju, odnosno ioni različitih m/z vrijednosti imaju različite brzine. Iz niže navedenih jednadžbi:

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = qV \quad q = ze \quad t = \frac{d}{v} \quad \frac{m}{z} = t^2 \frac{(2Ve)}{d^2}$$

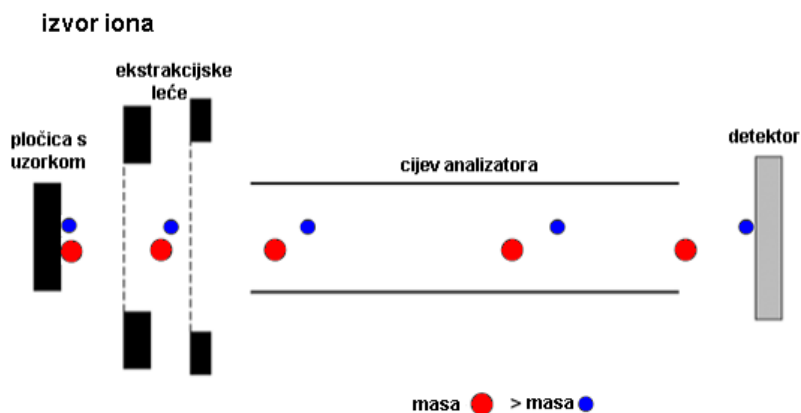
gdje je E_k kinetička energija iona, m masa iona, v brzina leta iona, V primijenjeni električni potencijal, q naboj iona, z ionski broj, e elementarni naboj, d duljina cijevi i t vrijeme leta iona, izvodi se izraz:

$$v \approx \sqrt{\frac{2eV}{m/z}}$$

prema kojem je vidljivo kako je brzina iona obrnuto proporcionalna vrijednosti $\sqrt{m/z}$.

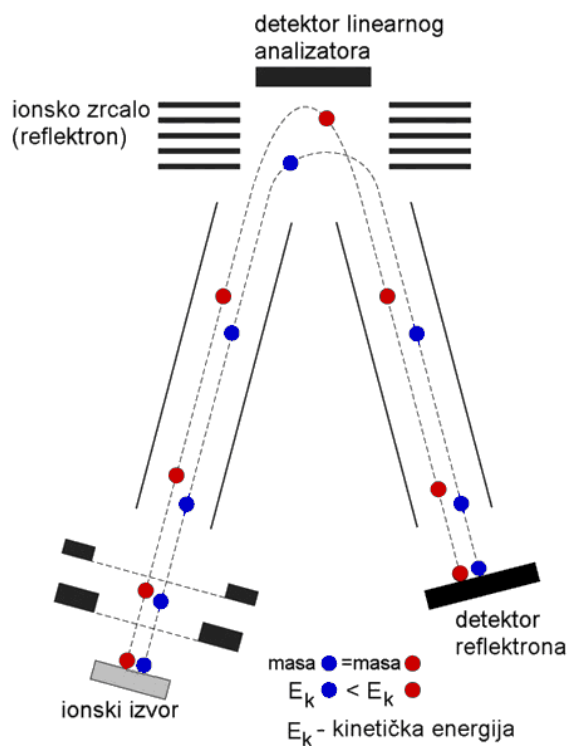
Dakle, ioni manje m/z vrijednosti su brži i dolaze ranije na detektor, dok se ioni većih m/z vrijednost, gibaju sporije i kasnije dolaze do detektora.

Za detekciju iona razdvojenih TOF analizatorom koriste se linearni i reflektorni TOF detektori. Linearni TOF detektor smješten je na kraju analizatora (slika 2.6.).⁵⁶



Slika 2.6. Prikaz principa rada linearnog analizatora

Značajno poboljšanje razlučljivosti TOF analizatora postiže se ugradnjom jednog ili više ionskih zrcala (reflektron). Refleksijom na ionskom zrcalu produljiva se puta iona veće kinetičke energije, te ioni istih m/z vrijednosti, a različitih kinetičkih energija dolaze u isto vrijeme na detektor (slika 2.7.).



Slika 2.7. Prikaz principa rada analizatora s ionskim zrcalom tzv. reflektronom.

Ioni veće kinetičke energije i prema tome veće brzine prodiru dublje u ionsko zrcalo od iona manje kinetičke energije, zbog čega se duže zadržavaju u cijevi analizatora od sporijih iona iste m/z vrijednosti.⁵⁶ Zahvaljujući sustavu ionskih zrcala raspodjela brzine gibanja iona se u

određenom m/z području sužava čime se znatno poboljšava razlučivost i osjetljivost detekcije. Tako danas moderni TOF i TOF-TOF spektrometri masa postižu rezoluciju od 10 000 na više.⁵⁹

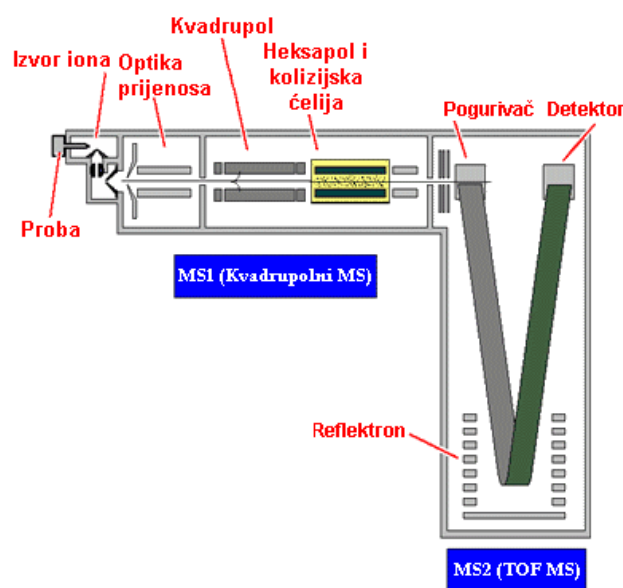
Precizno mjerenje vremena leta s optimalnom razlučivošću m/z vrijednosti iona može se postići samo ako su ioni analita grupirani u nakupine koje količinom neće preopteretiti reflektoron detektora. Potreba za kvantiziranim nakupinama iona kod TOF analizatora potpuno je sinkronizirana sa pulsirajućom produkcijom iona MALDI ionizacijom. Ta se sinkronizacija provodi pogurivačem (engl. *pusher*) koji sakuplja ione u određenom vremenu i zatim ih u pravilnim razmacima otpušta prilikom čega se uključuje i mjerenje vremena leta iona do detektora.

Hibridni analizatori masa

Hibridni analizatori sastoje se od dvaju ili više, istih ili različitih tipova analizatora masa spregnutih u seriju. Između spregnutih analizatora obično se nalazi kolizijska ćelija. Ovakve konfiguracije omogućuju provedbu analiza tehnikama tandemne spektrometrije masa. Najčešće korišteni hibridni analizatori u proteomskim eksperimentima su Q-TOF i TOF-TOF hibridni analizatori masa.

Q-TOF hibridni analizator masa

Q-TOF hibridni analizator masa koristi kvadrupol i TOF analizator u analizi iona nastalih ESI tehnikom ionizacije (slika 2.8.).

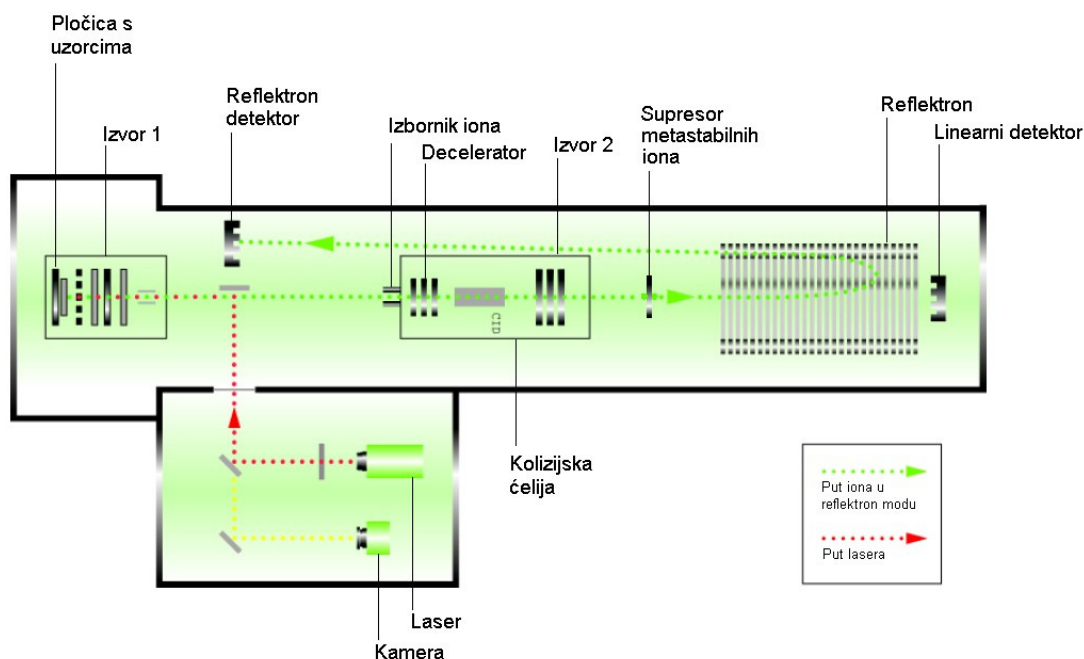


Slika 2.8. Presjek hibridnog analizatora masa Q-TOF

Spektar masa iona analita nastaje tako što svi ioni nastali ESI ionizacijom ulaze u kvadrupol i pri određenoj vrijednosti primijenjene amplitude struje i radiofrekvencije, s obzirom na njihovu vrijednost m/z , bivaju propušteni kroz kvadrupol. Propušteni ioni se potom sakupljaju i u kvantiziranim vremenskim razmacima istovremeno propuštaju kroz TOF analizator u kojem se dodatno razdvajaju na temelju vremena leta. Između pogurivača i kvadrupolnog analizatora smještena je heksapolna kolizijska ćelija unutar koje se propuštanjem inertnog plina (dušik, zrak, argon i sl.) omogućuje fragmentacija izabranog iona prekursora u ione produkte. MS/MS spektar iona prekursora nastaje na način da se propuštanjem svih iona analita nastalih ESI ionizacijom kroz kvadrupolni analizator, na temelju m/z vrijednosti, selektira željeni ion prekursor koji se potom uvodi u kolizijsku ćeliju. Nastali ioni produkti se potom sakupljaju na pogurivaču i analiziraju na temelju vremena leta u TOF analizatoru masa.

TOF-TOF hibridni analizator masa

TOF-TOF hibridni analizator koristi se za razdvajanje iona prekursora nastalih MALDI ionizacijom u jednom eksperimentu ili iona produkata nastalih fragmentacijom iona prekursora u drugom eksperimentu, na temelju vremena leta. Spektar masa iona analita nastaje tako što se svi ioni analita (ioni prekursori) nastali MALDI tehnikom ionizacije sakupljaju i u kvantiziranim vremenskim razmacima istovremeno propuštaju kroz TOF analizator te se detektiraju na linearnom ili reflektoru detektoru. Pri tom se kolizijska ćelija također nalazi u visokom vakuumu, a izbornik iona (TIS, engl. *timed ion selector*) je zatvoren (slika 2.9.).^{60,61} Kako bi se selektirao određeni ion prekursor za daljnju analizu fragmentacijom, ponovno se u zasebnom eksperimentu generiraju svi ioni analita MALDI ionizacijom, a izbornik iona propušta samo selektirani ion prekursor, na temelju m/z vrijednosti, u kolizijsku ćeliju (slika 2.9.).⁶⁰ Na ulazu u kolizijsku ćeliju ioni se usporavaju, a fragmentacija se odvija uz ili bez prisutnosti inertnog plina. Nastali ioni produkti sakupljaju se na zasebnom pogurivaču (izvor 2), te se u kvantiziranim vremenskim razmacima istovremeno propuštaju kroz TOF analizator do reflektora detektora.



Slika 2.9. Presjek TOF-TOF analizatora masa

MALDI/TOF i MALDI/TOF-TOF spektrometrija masa najčešće je korištena tehnika u proteomskim eksperimentima. Na slici 2.10. prikazan je MALDI/TOF-TOF instrument.



Slika 2.10. Instrument MALDI/TOF-TOF

2.2.2.3. Tandemna spektrometrija masa

Određivanje masa peptida, nastalih enzimskom ili kemijskom odgradnjom proteina, kao i određivanja masa čitavog proteina, provodi se MS analizom. Međutim, za strukturnu karakterizaciju peptida, a time i proteina, koja u prvom redu podrazumijeva određivanje slijeda aminokiselina, potrebna je daljnja fragmentacija nastalih peptidnih iona. Način fragmentacije peptida ovisi o vrsti spektrometra masa (ESI/Q-TOF, MALDI/TOF-TOF itd.), o uvjetima ionizacije, vrsti kolizijske ćelije, te korištenom inernom plinu (Ar, N₂, zrak isl.). Neovisno o tome, nužan uvjet za detektibilnost nastalih fragmentnih iona, kao i kod iona prekursora, jest njihova nabijenost. Pozitivno nabijeni ioni obično nastaju dodatkom protona, ali mogu nastati i kao adukti s natrijem, kalijem, amonijakom ili organskom molekulom, dok negativno nabijeni ioni nastaju gubitkom protona.

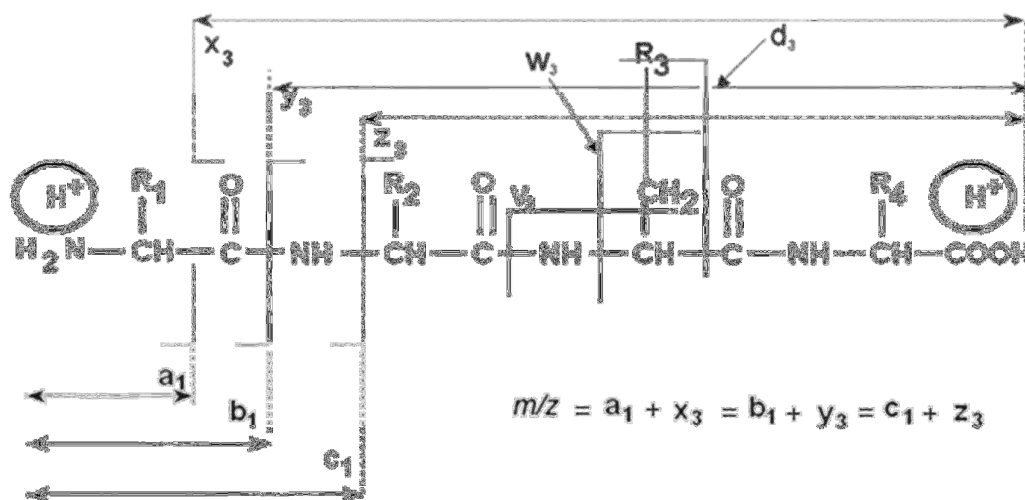
Tandemna spektrometrija masa (MS/MS) podrazumijeva izolaciju i fragmentaciju iona prekursora u ione produkte ili neutralne fragmente (nastaju tzv. neutralnim gubitkom), njihovo razdvajanje na temelju m/z vrijednosti, i detekciju nastalih produktnih iona. MS/MS analiza se često označava i kao MS² eksperiment, dok se MS analiza označava kao MS¹, pri čemu potencija označava generaciju analiziranih iona. Osim ovog tipa eksperimenata u nekim je izvedbama spektrometara masa (npr. QQQ, engl. *triple quadrupole*) moguća i provedba MS³ eksperimenata. U takvim eksperimentima u prvom analizatoru se selektiraju ioni prekursori koji se fragmentiraju u drugom analizatoru koji istovremeno selektira nastale ione produkte za ponovnu fragmentaciju u trećem analizatoru. Međutim, ukoliko se peptidi prije analize kemijski modificiraju ili se primjene posebni uvjeti ionizacije, provedba MS³ eksperimenta, odnosno pseudo MS³ eksperimenta, moguća i u konfiguracijama spektrometara masa koji u pravilu ne omogućavaju ovaj tip analize (npr. MALDI/TOF-TOF). Naime, kod pseudo MS³ eksperimenta ioni produkti druge generacije (MS² ioni) nastaju već za vrijeme MS¹ analize, dakle zajedno sa ionima prve generacije. Izborom takvih iona za daljnju fragmentaciju u klasičnom MS² eksperimentu provodi se pseudo MS³ analiza jer su na ovaj način dobiveni ioni produkti zaista ioni treće generacije.^{60,62,63}

Za produkciju iona produkata u eksperimentima tandemne spektrometrije masa najčešće se koristi kolizijom inducirana disocijacija (CID, engl. *Collision Induced Dissociation*) koja se odvija u kolizijskoj ćeliji hibridnog spektrometra masa u međusobnoj interakciji iona prekursora ili u interakciji iona prekursora s propuštenim inernim plinom (Ar, N₂, zrak i sl.).⁵⁵

Brojne mogućnosti disocijacije iona peptidnih molekula rezultiraju interpretativno složenim MS/MS spektrima.^{6,55}

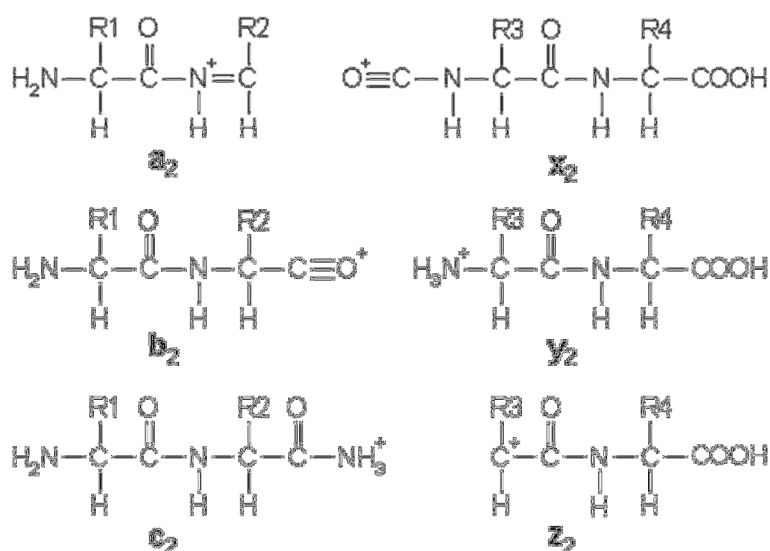
2.2.2.4. Nomenklatura fragmentnih iona nastalih kolizijom induciranom disocijacijom (CID)

Nomenklatura fragmentnih iona prvi je put predložena 1984. godine,⁶⁴ a dorađena verzija iz 1988. godine u upotrebi je i danas.⁶⁵ Nomenklaturom se razlikuju dvije osnovne skupine iona s obzirom na peptidni kraj koji je zadržan unutar ion. Tako razlikujemo serije a_n , b_n i c_n iona koji zadržavaju peptidni N-kraj i serije x_n , y_n i z_n iona koji zadržavaju peptidni C-kraj, gdje je n redni broj aminokiseline u fragmentu s obzirom na udaljenost od N-kraja peptida (slika 2.11.).



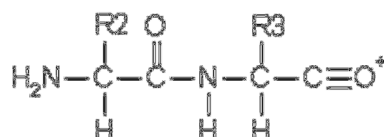
Slika 2.11. Fragmentacija peptida i nomenklatura nastalih fragmentnih iona. Subskript s desna označava redni broj aminokiseline u peptidu.

Strukture jednostruko nabijenih iona produkta kakvi nastaju analizom u MALDI TOF-TOF instrumentu dane su na slici 2.12.



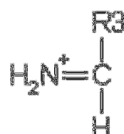
Slika 2.12. Prikaz struktura fragmentnih a-, b-, c-, x-, y- i z-iona nastalih fragmentacijom peptida

Osim jednostrukog cijepanja peptidne okosnice (slika 2.11.), koje rezultira nastankom iona prikazanih na slici 2.12, moguće je i dvostruko fragmentiranje peptidne okosnice što rezultira nastankom internih fragmenata. Interni fragmenti najčešće nastaju kombinacijom b i y tipa fragmentacije (slika 2.13.).



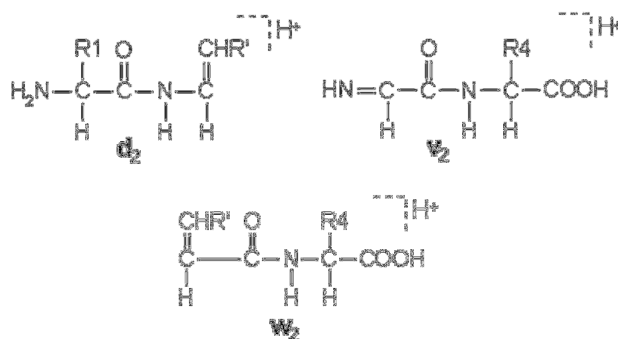
Slika 2.13. Prikaz struktura fragmentnih internih-iona

Često se nastali fragmentni ioni tokom MS/MS eksperimenta dodatno fragmentiraju, a najčešći oblik takve fragmentacije je daljnja fragmentacija a- i y-iona koja rezultira nastankom imonij-iona (slika 2.14.). Imonij-ioni još se nazivaju i dijagnostički-ioni jer njihova prisutnost u MS/MS spektru indikativno za postojanje određene aminokiseline u fragmentiranom peptidu.⁶



Slika 2.14. Prikaz strukture imonij-iona

U plinovitoj fazi pri ekstremnim uvjetima u kolizijskoj ćeliji, kao što je visoki ubrzavajući napon, moguć je nastanak iona pregradnjom, što rezultira detekcijom satelitnih iona u MS/MS spektru (slika 2.15.). Satelitni ioni označavaju se slovima d, v i w, a značajni su za razlikovanje izobarnih aminokiselina (aminokiseline istih rezidualnih masa; tablica 2.2. na str. 38.), te na taj način doprinose pouzdanijoj interpretaciji spektara.



Slika 2.15. Prikaz struktura satelitnih d-, v- i w-iona

2.2.2.5. Mehanizam fragmentacije protoniranih peptida

Razumijevanje strukture nabijenih peptidnih iona i njihovih fragmentacijskih mehanizama ključno je za interpretaciju MS/MS spektara, odnosno spektara fragmentnih (produktnih) iona.

Mehanizam fragmentacije peptida u plinskoj fazi ovisi o različitim parametrima kao što su sastav aminokiselina, veličina peptida, vrsta ionizacije, nabijenosti iona itd.⁶⁶ Sveobuhvatan i opće prihvaćen model kojim se opisuje način disocijacije protoniranih peptida u plinskoj fazi je model pokretnog protona, odnosno model pokretnog naboja (engl. *mobile proton*).^{6,66-70} Fragmentacija protoniranih peptida pod uvjetima niskih kolizijskih energija obično se događa kroz niz nabojem usmjerenih reakcija. Naime, peptidi kao molekule sa više različitih funkcionalnih skupina mogu biti protonirani na velikom broju različitih mjesta kao što su primjerice N-kraj peptida, atomi dušika i kisika iz peptidne okosnice ili bočni ogranci aminokiselina.⁶⁶ Ionizirani peptidi u plinskoj fazi u pravilu zadržavaju pozitivan naboj smještanjem protona na najbazičnije mjesto unutar peptida. Prema bazičnosti unutar peptida razlikujemo dvije skupine bazičnih mjesta: bazičniju koju predstavljaju bočni ogranci aminokiselina arginina, lizina i histidina, i manje bazičnu koju predstavlja N-kraj peptida i amidne skupine peptidne okosnice.⁶

S obzirom na energetska raspodjelu protoniranih peptidnih izomera razlikujemo dvije osnovne skupine peptida.

U prvoj skupini su peptidi kod kojih je jedno ili više mjesta protonacije energetski ili kinetički favorizirano u odnosu na ostala moguća mjesta protonacije, što rezultira fiksiranjem dodanog protona na to mjesto. Ovoj skupini pripadaju protonirani ioni triptičkih fragmenta nastali MALDI ionizacijom ili jednostrukom protonacijom kod ESI ionizacije. Kod takvih peptidnih iona bočni ogranci arginina ili lizina na C-kraju peptida (uslijed cijepanja proteina tripsinom) favorizirana su mjesta protonacije. Za mobilizaciju protona na energetski nepovoljnija protonacijska mjesta unutar peptida potrebna je velika dodatna energija. No, pod CID uvjetima dolazi do dostatnog povećanja interne energije iona kako bi energetski nepovoljna mjesta protonacije postala okupirana. Na taj način nastaju reaktivni međuproducti u reakciji disocijacije peptidne okosnice. Reaktivni međuproducti fragmentacije peptidne okosnice su protonirani peptidni izomeri s protonom na dušikovom atomu peptidne veze. Formiranjem takvih međuproducta dolazi do slabljenja peptidne veze i u konačnici do disocijacije iste. Međutim, nastanak peptidnih izomera s protonom na dušikovom atomu peptidne veze termodinamički je nepovoljniji nego nastanak protoniranih izoformi s protonom na kisikovom atomu peptidne veze (što dovodi do jačanja peptidne veze) ili na amino skupinama N-kraja peptida ili bazičnih aminokiselina.^{71,72} Prema modelu pokretnog protona do fragmentacije peptidne veze, unatoč opisanoj termodinamičkoj diskrepanciji, dolazi na način da proton dodan peptidu tokom CID eksperimenta, uslijed povećanja interne energije iona, migrira na različita protonacijska mjesta. Ukoliko okupira dušikov atom peptidne veze, čime se formira reaktivni međuproduct, u kinetički favoriziranoj reakciji (u donosu na daljnju migraciju protona) dolazi do disocijacije peptidne veze.⁷³ Drugi način fragmentacije ove skupine iona opisuje se modelom udaljenog naboja, odnosno udaljenog protona (CRF, engl. *charge remote fragmentation*). Ovakva vrsta dekompozicijskih reakcija u plinskoj fazi, gdje dolazi do cijepanja veze koja se ne nalazi u blizini naboja, odavno je poznata.^{6,74-76} Fragmentacija po modelu udaljenog protona zapažena je kod peptida koji sadrže asparaginsku ili glutaminsku kiselinu ili Asp-Pro slijed unutar peptida.⁷⁷

Drugoj skupini peptida, s obzirom na energetska raspodjelu protoniranih peptidnih izomera, pripadaju peptidi kod kojih su protonacijska mjesta dostupna u uskom energetskom rasponu. U ovu skupinu pripadaju dvostruko protonirani peptidi nastali ESI ionizacijom. Prema modelu pokretnog protona dvostruko protonirani triptički peptid, tokom CID eksperimenta zadržavaju proton na argininu gotovo fiksiranim. Drugi proton, koji se nalazi na manje bazičnom N-kraju peptida je pokretan, te se prenosi duž peptidne okosnice na amidne

dušikove atome, što rezultira disocijacijom peptidnih veza, te nastankom y-serije fragmentnih iona (zadržan C-kraj peptida).⁶

U gornjem tekstu dan je pregled tumačenja mehanizama fragmentacije peptidnih iona, no način fragmentacije pojedinog peptida teško je predvidjeti jer ovisi o brojnim čimbenicima. Ono što se općenito može zaključiti je da se fragmentacija protoniranih peptida u plinskoj fazi odvija po načelu disocijacije veze najmanje energije, te je stoga disocijacija peptidne veze favoriziran proces, a time su fragmentni ioni b- ili y-serije najzastupljeniji u MS/MS spektrima.

2.2.2.6. Interpretacija MS/MS spektara

Interpretacija i asignacija MS/MS spektra provode se u svrhu iščitavanja aminokiselinskog slijeda fragmentiranog peptida. Interpretativnost MS/MS spektara složena je iz dva razloga. Prvi razlog je loša fragmentabilnost peptidnih iona (osobito jednostruko nabijenih), što rezultira signalima slabog ili neujednačenog intenziteta prema šumu (S/N, engl. *signal to noise*) i time značajnim pogreškama u očitavanju masa. Drugi razlog složenosti MS/MS spektara je neusmjeren put fragmentacije peptidnih iona tokom CID eksperimenta što rezultira nastankom nepotpunih nizova fragmentnih iona različitih serija. Proces pripisivanja signala pojedinom ionu produktu (asignacija spektra) vrlo je kompleksan i gotovo nerješiv bez upotrebe računala. Budući da se do sada niti jedan algoritam za asignaciju spektara nije pokazao potpuno uspješnim, asistencija spektrometričara masa je nužna.⁷⁸

Idealan MS/MS spektar, u smislu mogućnosti nedvojbenog očitavanja slijeda aminokiselina analiziranog peptida, bio bi spektar u kojem bi bili zastupljeni svi produkti ioni isključivo jedne fragmentne serije (npr. ioni b-serije). Očitavanje aminokiselinskog slijeda provelo bi se oduzimanjem m/z vrijednosti susjednih signala. Naime, u MS/MS spektru fragmentnih iona iste serije, razlika između susjednih signala odgovara masi razida aminokiseline na dotičnoj poziciji. Mase rezidua za 20 standardnih aminokiselina dane su u tablici 2.2.

Tablica 2.2. Mase aminokiselinskih rezidua

AMINOKISELINA			Masa rezidua / Da	AMINOKISELINA			Masa rezidua / Da
Glicin	Gly	G	57,0215	Asparaginska kiselina	Asp	D	115,0270
Alanin	Ala	A	71,0371	Glutamin	Gln	Q	128,0586
Serin	Ser	S	87,0320	Lizin	Lys	K	128,0950
Prolin	Pro	P	97,0528	Glutaminska kiselina	Glu	E	129,0426
Valin	Val	V	99,0684	Metionin	Met	M	131,0405
Treonin	Thr	T	101,0477	Histidin	His	H	137,0589
Cistein	Cys	C	103,0092	Fenilalanin	Phe	F	147,0684
Izoleucin	Ile	I	113,0841	Arginin	Arg	R	156,1011
Leucin	Leu	L	113,0841	Tirozin	Tyr	Y	163,0633
Asparagin	Asn	N	114,0429	Triptofan	Trp	W	186,0793

2.2.2.7. Kemijski aktivirana fragmentacija

Kemijski aktivirana fragmentacija (CAF, engl. *Chemically Activated Fragmentation*) ili kemijski pomognuta fragmentacija (CAF, engl. *Chemically Assisted Fragmentation*) je postupak u kojem se uslijed kemijske promjene peptida (obilježavanja) povećava razina fragmentacije peptida i to u predvidljivom fragmentacijskom putu. Na ovaj način dobivaju se MS/MS spektri koji uglavnom sadrže više ili manje cjelovit niz fragmentnih iona iste serije, pa su stoga interpretativno znatno jednostavniji nego li oni dobiveni klasičnim CID eksperimentima.

Kemijski aktivirana fragmentacija prvi je put uočena oksidacijom cisteinskih ogranka triptičkih peptida koji na C-kraju završavaju argininom. Iako su pokusi rađeni kako bi se ustanovio mehanizma fragmentacije peptidnih iona u plinovitom stanju u vakuumu, utvrđeno je da oksidacijom cisteina dolazi do značajnog povećanja intenziteta iona y-serije.⁷⁹

Od svojih početaka, 1990-ih godina, do danas CAF je doživio brojne i različite primjene upotrebom širokog spektra različitih reagensa za obilježavanje peptida. Watson i suradnici naveli su kao karakteristike optimalnog reagensa za obilježavanje: brzu i selektivnu reakciju obilježavanja bez nužnog pročišćavanja smjese peptida prije analize spektrometrijom masa, kompatibilnost reagensa sa tehnikama ionizacije i analizatorima masa, bolju fragmentabilnost i jednostavniji fragmentacijski put obilježenog u odnosu na nativni peptid, te mogućnost detekcije strukturno specifičnih fragmentnih iona.⁸⁰

Sulfonski derivatizacijski reagensi

S obzirom na navedene kriterije do danas su se, u svrhu dobivanja interpretativno jednostavnijih spektara, kao najuspješniji pokazali postupci tzv. sulfonacije N-kraja peptida.

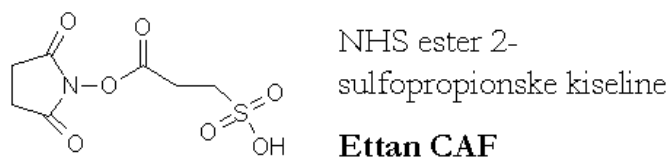
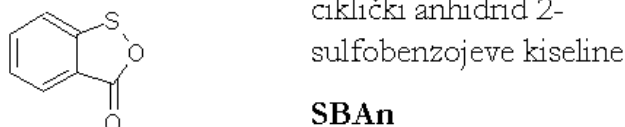
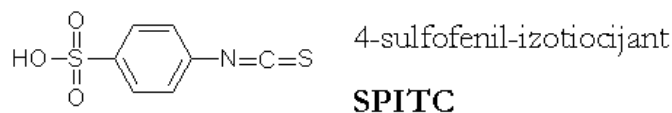
Ovakvom kemijskom promjenom N-kraja triptičkog peptida dobiva se Zwitterion koji u plinovitom stanju na sebi istovremeno nosi pozitivan i negativan naboj, a može se prikazati formulom: $^{-}\text{O}_3\text{S}-\text{R}-\text{A}_1-\text{A}_2-\text{A}_3-\text{A}_4-\text{A}_5-\text{X}^{+}$, gdje R označava ostatak derivatizacijskog reagensa, A bilo koju aminokiselinu, a X lizin ili arginin.⁸¹⁻⁸³

Nakon MALDI ionizacije kemijski obilježenog peptida, izrazito kisela skupina na N-kraju će biti deprotonirana, a izrazito bazične skupine lizina ili arginira protonirane. Fragmentacijom peptida prema modelu pokretnog protona, proton nasumično odabire mjesto protonacije, a kako je najbazičnije mjesto već okupirano (Arg ili Lys na C-kraju), sada su amidne skupine favorizirana mjesta protonacije. Disocijacija peptidne veze, koja rezultira nastankom iona y- i b-serije, na ovaj način postaje dominantan fragmentacijski put. Međutim, nastali ioni b-serije također su Zwitterioni jer je negativni naboj sulfonske skupine neutraliziran pozitivnim nabojem sa C-kraja b-iona, pa stoga b-ioni nisu detektibilni. U konačnici MS/MS spektar derivatiziranog peptida pretežno sadrži signale y-iona bez inkrementa mase, odnosno kao da derivatizacija N-kraja nije niti provedena.^{84,85}

Najpoznatiji reagensi koji sadrže sulfonsku skupinu, a koji se koriste u postupku derivatizacije peptida ili proteina su 2-sulfobenzojeva kiselina⁸¹, *N*-hidroksisukcinimidil ester 2-sulfopropionske kiseline⁸⁶ i 4-sulfofenil-izotiocijanat⁸⁷ koji u vremenski nezahtjevnim reakcijama modificiraju peptide i čine ih pogodnim za CAF.

Tokom CID eksperimenta sulfonskim derivatizacijskim reagensima obilježenog peptida produciraju se uglavnom ioni b- i y-serije, dok se gotovo isključivo detektiraju ioni y-serije, pa je interpretacija dobivenog MS/MS spektra znatno olakšana.

Glavni nedostaci sulfonskih derivatizacijskih reagensa su nespecifičnost reakcije i veća ili manja kemijska degradacija peptida (osobito kod izotiocijanatnih i sukcinamidnih reagensa) uslijed derivatizacije. Oba nedostatka su uvjetovana reaktivnom skupinom reagensa koja diktira uvjete reakcije. Do danas su poznati sulfonski derivatizacijski reagensi bazirani na reaktivnim skupinama: izotiocijano^{87,88}, ciklički anhidrid⁸¹ i *N*-hidroksisukcinimid^{84,86} (slika 2.16.).

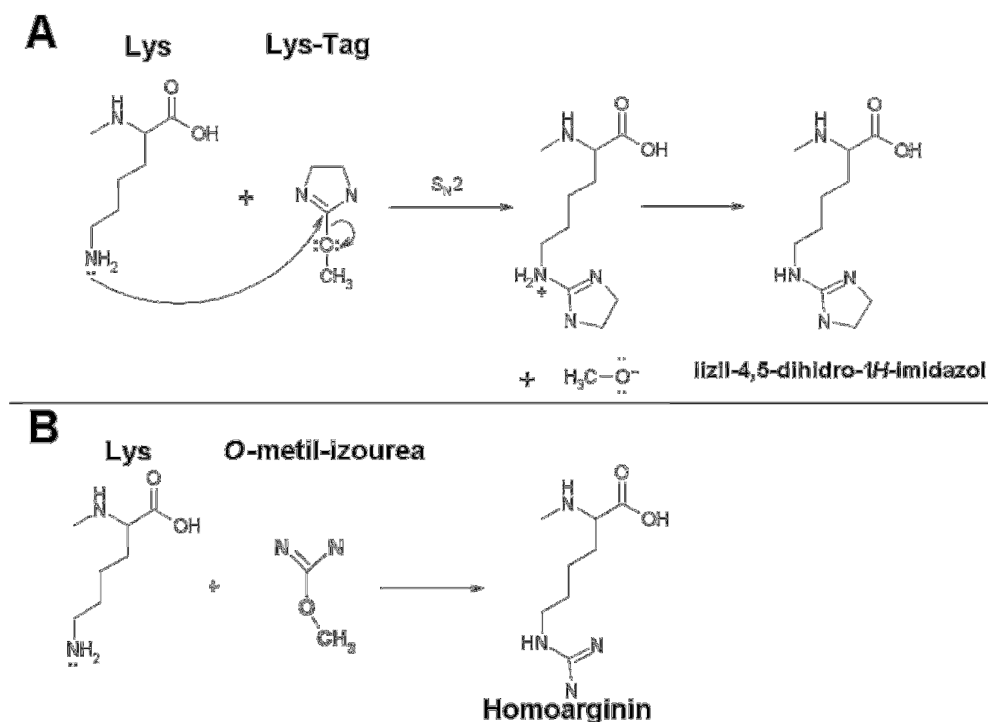


Slika 2.16. Najpoznatiji sulfonski derivatizacijski reagensi s različitim reaktivnim skupinama izotiocijanat (SPITC), ciklički anhidrid (SBA_n) i *N*-hidroksisukcinamidni ester; NHS ester (Ettan CAF)

U nespecifičnoj reakciji obilježavanja peptida sulfonskim derivatizacijskim reagensima osim derivatizacije N-kraja peptida, dolazi i do obilježavanja bočnih ogranaka lizina, što znatno ometa CAF. Stoga se prije derivatizacije sulfonskim reagensima, provodi inaktivacija lizinskih bočnih ogranaka gvanidacijom ili obilježavanjem sa Lys-Tag reagensom (2-metoksi-4,5-dihidro-1*H*-imidazol), a postupci su prikazani na slici 2.17.

Upotrebom gvanidinskih reagensa, primjerice *O*-metil-izourea-hidrogensulfata, lizin se prevodi u homoarginin.⁸⁹ Glavni nedostatak ovog postupka je moguća oksidacija metionina u bazičnim uvjetima.

U reakciji Lys-Tag obilježavanja peptida lizin se prevodi u lizil-4,5-dihidro-1*H*-imidazol. Reakcijom osim obilježavanja lizinskih ogranaka, dolazi i do metilacije cisteina.⁹⁶



Slika 2.17. Obilježavanje lizina Lys-Tag (2-metoksi-4,5-dihidro-1H-imidazol) reagensom (A) i gvanidacijom (B)

Dodatkom sulfonske skupine i općenito negativnog naboja peptidima, znatno se smanjuje osjetljivost detekcije peptidnih iona u pozitivnom načinu rada spektrometra masa,⁹² a gubitak osjetljivost je posebno uočen kod detekcije triptičkih peptida s manje bazičnim lizinom na C-kraju (u odnosu na Arg). Kod peptida sa lizinom na C-kraju je i bez dodatka negativnog naboja derivatizacijom, intenzitet ionizacije smanjen.⁹³ Stoga zaštita lizinskih bočnih ogranka gvanidacijom ili obilježavanjem Lys-Tag reagensom, osim što omogućuje selektivno sulfoniranje N-kraja peptida, povećava bazičnosti lizina, a time i osjetljivost detekcije takvih peptida.⁸⁹ Tako se prevođenjem lizina u homoarginin gvanidacijom poboljšava učinkovitost ionizacije na razinu ionizacije peptida koji na karboksilnom kraju sadrže arginin,⁹⁰ dok se u reakciji Lys-Tag obilježavanja peptida, bazičnost lizinskog ogranka povećava uvođenjem jake neionske baze imidazolnog prstena.⁹¹

Osim toga, u MS/MS spektru peptida sa gvanidiranim ili Lys-Tag obilježenim lizinima dolazi do povećanja intenziteta iona y-serije u odnosu na spektre nativnih peptida, što doprinosi jednostavnijoj asignaciji spektara.⁹²

Dakle, zaštita lizinskih bočnih uzoraka s jedne strane uzrokuje gubitak i degradaciju dijela uzorka kroz postupak obilježavanja i kasnijeg pročišćavanja, te sam CAF postupak čini vremenski zahtjevnim i osjetljivim, ali s druge strane poboljšava ionizaciju i detektabilnost

peptida sa C-krajnjim lizinima, te njihovu fragmentaciju tokom CID eksperimenta, dajući interpretativno jednostavnije MS/MS spektre nego li u slučaju nativnih peptida.

Ostali CAF reagensi

U svrhu kemijske aktivacije fragmentacije, osim sulfonskih derivatizacijskih reagensa, koriste se i drugi obilježivači. Kemijskim obilježavanjem peptida na N-kraju derivatima feniltiokarbamoila (reagens sličan onome koji se koristi kod Edman-ove odgradnje) u CID eksperimentima predominantno se produciraju b_1 -ion i y_{n-1} -ion.⁹³ James i suradnici proveli su obilježavanje peptida na N-kraju nikotinil-*N*-hidroksisukcinamidom koje rezultira supresijom fragmentnih iona y-serije u MALD/TOF-TOF instrumentu.⁹⁴ Acetamidacija N-kraja peptida također utječe na fragmentaciju peptida u CID eksperimentima. U većini eksperimenta primijećen je porast intenziteta signala iona y-serije uz smanjenoj intenziteta signala ostalih iona, dok je u nekim slučajevima uočeno i konsekutivan niz iona b-NH₃-serije.⁹⁵

Osim derivatizacije peptida kemijskim reagensima, peptidi se u svrhu kemijskog aktiviranja fragmentacije obilježavaju i stabilnim izotopima. Obilježavanje pojedinog kraja peptida stabilnim izotopima uglavnom ne doprinosi usmjeravanju fragmentacijskog puta, već pomaže asignaciju spektra. Izotopnim obilježavanjem jednog kraja peptida moguće razlikovati ione koji sadrže N-kraj peptida (ioni a-, b- ili c-serije), od iona koji sadrže C-kraj peptida (ioni x-, y- ili z-serija). Tako esterifikacija C-kraja peptida deuteriranim metanolom uzrokuje pomak u masi y-iona, pa se usporedbom s MS/MS spektrom neobilježenog peptida jednostavno identificira y-serija fragmentnih iona.⁹⁶ Na sličan način moguće je identificirati seriju y-iona nakon O¹⁸ obilježavanja karboksilnog kraja peptida.⁹⁷ Za razlikovanje iona b- i y-serije na temelju prirodne izotopne raspodjele, dakle bez prethodnog obilježavanja stabilnim izotopima, danas se koriste i računalni programski paketi, no njihova je upotreba u začetima, te je stoga vrlo rijetka.⁹⁸

2.2.3. Identifikacija proteina

Dva su osnovna pristupa u identifikaciji proteina: identifikacija proteina putem pretrage baza podataka i identifikacija proteina sekvenciranjem peptida *de novo*.

Glavna razlika između ova dva pristupa jest da se identifikacija proteina pretragom baza podataka temelji na usporedbi eksperimentalno dobivenih podataka, sa teoretskim podatcima u bazama podataka, dok se kod pristupa identifikaciji proteina sekvenciranjem *de novo* eksperimentalno iščitavaju aminokiselinski sljedovi. Identifikacija proteina kod pristupa *de novo* provodi se tražeći iščitanu aminokiselinsku sekvencu u bazi podataka.

2.2.3.1. Proteinske baze podataka

Jedna od najstarijih proteinskih baza podataka, PDB (engl. *The Protein Data Bank*) osnovana je 1971. godine kao glavni centar informacija za trodimenzionalne strukture makromolekula.⁹⁹ Danas je ta baza podataka rezultat međusobne suradnje institucija članica RCSB (engl. *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*). Baza sadrži gotovo sve podatke o strukturi određenog proteina, pripadajućoj DNA (slijed deoksiribonukleotida, engl. *Deoxyribonucleic acid*) i RNA sekvenci (slijed ribonukleotida engl. *Ribonucleic acid*) istog, podatke o poznatim analogima proteina i sl.

Od tada do danas osnovano je mnoštvo različitih proteinskih baza podataka, a u pristupu identifikacije proteina upotrebom tehnikama spektrometrije najčešće se koriste NCBI¹⁰⁰ Swiss-Prot¹⁰¹ baze podataka.

NCBI¹⁰⁰ proteinska baza podataka (engl. *National Center for Biotechnology Information*) objedinjuje podatke o proteinskim sekvencama iz više izvora: GenPept (proteinske sekvence koje odgovaraju translaciji kodirajućih sekvenci iz genomske baze podataka GenBank (engl. *Genome Bank*), RefSeq (engl. *Reference Sequence Project*; proteinske sekvence iz NCBI referentnih projekata sekvenciranja), Swiss-Prot (proteinska baza podataka švicarskog Instituta za bioinformatiku)¹⁰⁰ i PDB (proteinske sekvence dobivene na temelju 3D strukturalne analize proteina)⁹⁹, zbog čega je trenutno najsveobuhvatnija baza podataka. Budući da objedinjavanjem podataka iz različitih izvora često dolazi do preklapajućih unosa, danas NCBI baza postoji i u svom sažetom obliku kao neredundantna NCBI baza (NCBINr, engl. *National Center for Biotechnology Information non-redundant*), odnosno baza nepreklapajućih podataka.

Swiss-Prot je jedna od najpouzdanijih i najiscrpnijih baza podataka s velikom razinom eksperimentalno potvrđenih proteinskih sekvenci, kao i mnoštvom podataka o pojedinom proteinu, kao što su funkcija, lokalizacija u stanici, utvrđene posttranslacijske modifikacije, strukture domena, postojanje izoformi i sl.¹⁰¹ Osim ove baze podataka, švicarski Institut za bioinformatiku posjeduje i TrEMBL (engl. *Translated European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database*)¹⁰¹ bazu podataka koja osim podataka iz Swiss-Prot baze podataka sadrži i računalno predviđene proteinske sekvence EMBL (engl. *European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database*) nukleotidne baze podataka.¹⁰²

Osim spomenutih standardnih baza podataka, postoje i specijalizirane baze podataka, kakva je primjerice Unimod, baza podataka proteinskih modifikacija. Ova se baza pokazala posebno korisna u identifikaciji proteina s posttranslacijskim modifikacijama jer sadrži točne vrijednosti za razlike u masi uslijed prirodnih ili umjetnih modifikacija proteina koje su izvedene iz elementarnog sastava.¹⁰³

Unosi u gotovo sve baze podataka obnavljaju se na mjesečnoj osnovi, a putem Interneta je za pretragu dostupna uvijek najnovija verzija baze podataka.

Izbor baze za pretragu u svrhu identifikacije proteina ovisi o cilju i vrsti eksperimenta. Ukoliko je cilj u kratkom vremenskom roku dobiti najpouzdaniji rezultat, tj. proteinsku sekvencu koja je već do tada bila eksperimentalno potvrđena, uz dobivanje iscrpnih podataka o identificiranom proteinu, optimalan izbor je primjerice Swiss-Prot baza podataka. Pretraga na ovaj način nije vremenski zahtjevnija (jer je baza relativno mala), a količina dobivenih podataka o proteinu je ogromna. No zbog malog broja unesenih proteina u ovu bazu podataka vjerojatnost da protein ne bude identificiran je vrlo velika.

Ukoliko je imperativ eksperimenta identifikacija proteina, a ne pouzdanost identifikacije proteina, u smislu prethodno eksperimentalno provjerenih sekvenci, vrši se pretraga svih trenutno postojeće proteinskih sekvenci, kako onih anotiranih i potvrđenih, tako i do tada eksperimentalno nepotvrđenih, odnosno dobivenih računalnim putem postupkom *in silico* translacije sa kodirajućih sekvenci sekvenciranih genoma, koje su sadržane primjerice u NCBI-nr bazi podataka. Postupak identifikacije proteina ovim putem je uspješniji, jer ukoliko se radi o proteinima organizmima čiji je genom sekvenciran, uspješnost identifikacije isključivo ovisi o eksperimentalnim uvjetima, ali je vremenski zahtjevniji, te su dobiveni podaci o identificiranom proteinu vrlo oskudni.

2.2.3.2. Pretraga baza podataka

Pretraga baza podataka je visokofrekventan postupak identifikacije proteina kod proteomskih istraživanja s pristupom odozdol nagore. Kod takvih se istraživanja kao eksperimentalni podaci koji se u postupku pretrage baza podataka preklapanju s teoretskim podatcima o peptidima i proteinima u bazama podataka, koriste podaci dobiveni analizom smjese peptida nastalih enzimskom odgradnjom proteina tehnikama MS.

Pretraga baze podataka temelji se na činjenici da je svaki MS spektar smjese peptida nastale enzimskom odgradnjom određenog proteina svojevrsan otisak prsta tog proteina, odnosno tom proteinu svojstven podatak. Na isti način je i MS/MS spektar pojedinog peptida svojevrsan otisak prsta tog peptida.

Jedan od prvih načina pretrage baza podataka koji se i danas koristi je metoda otiska prsta mase peptida (PMF, engl. *Peptide mass fingerprinting*)¹⁰⁴⁻¹⁰⁸ kod koje se pomoću posebno razvijenih računalnih programa uspoređuju eksperimentalno dobivene mase peptida nakon odgradnje specifičnim proteinazama (lista pikova iz MS spektra), s teoretskim masama proteolitičkih fragmenata proteina u pretraživanoj bazi podataka. Iako je ovakav način identifikacije proteina znatno pouzdaniji nego identifikacija na temelju pokretljivosti u PAGE eksperimentu ili identifikacija na temelju LC vremena zadržavanja, na ovaj je način moguće identificirati samo proteini koji se nalaze u bazama podataka. Računalni programi koji se najčešće koriste za provedbu PMF eksperimenta su MASCOT¹⁰⁹, ProFound¹¹⁰ i MSFit¹¹¹. Uspješnost identifikacije metodom PMF ovisi o nekoliko čimbenika: S/N u spektru, točnost mjerenja masa, količina i čistoća uzorka, broj različitih proteina u analiziranom uzorku, mogućnost posttranslacijskih modifikacija, točnost algoritma za pretragu, ali i o vještini i iskustvu operatera.¹¹²

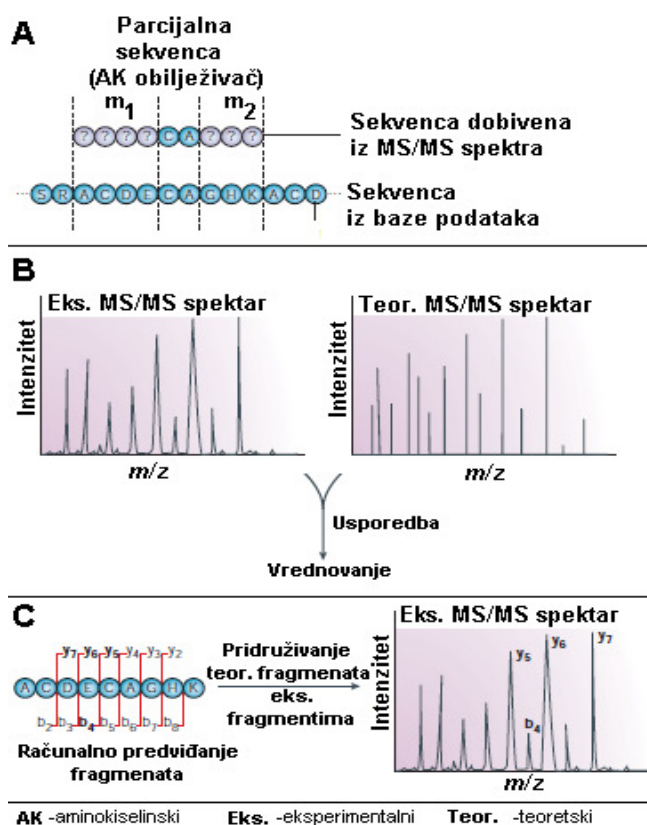
Drugi način pretrage baza podataka temelji se na preklapanju fragmentacijskih otisaka prsta peptida (PFF, engl. *Peptide fragmentation fingerprinting*)⁴⁵ eksperimentalno dobivenih (lista pikova MS/MS spektra) i teoretskih podataka. Ovaj tip pretraživanja provodi se upotrebom različitih algoritama kao što su PeptideSearch¹¹³, Mascot¹¹⁴, Sequest, Sonar MS/MS koji se prema načinu rada mogu podijeliti u tri skupine (slika 2.18.).

Prvi tip algoritama su tzv. obilježivači peptidnog slijeda (engl. *Peptide Sequence Tag*), koji iz MS/MS spektra iščitavaju kratki (3-4 aminokiselinska ostatka) parcijalni slijed aminokiselina (npr. C-A na slici 2.19.A). Pri tome, početna i posljednja masa upotrijebljena za iščitavanje parcijalnog slijeda određuju udaljenost u jedinicama masa od pojedinog kraja peptida (m_1 i m_2 na slici 2.19.A). Na ovaj način formirani konstrukt (m_1 -CA- m_2) služi kao ulazni podatak za

pretragu baze podatak. Prvi algoritam koji se koristio ovakvim tipom pretraživanja je PeptideSearch.¹¹³

Drugi tip algoritama koristi matematičku metodu automatske korelacije. Kvaliteta preklapanje odnosno korelacije između eksperimentalno dobivenog spektra i teoretskih MS/MS spektara, koji su načinjeni za sve peptidne sekvence u bazi podatak, se vrednuje (engl. *scoring*) dajući vjerojatnost za točnost identifikacije pojedinog peptida i proteina (slika 2.18.B). Najpoznatiji algoritam za ovu vrstu pretrage baze podataka PFF metodom je Sequest⁴⁵.

Treći tip algoritama vrši pretragu baze podataka pridružujući teoretski izračunate mase fragmentnih iona (izračunate za sve peptide u bazi podataka) signalima u eksperimentalno dobivenom MS/MS spektru počevši od signala s najvećim intenzitetom u spektru kojima u pravilu pridružuju teoretske mase fragmentnih y- i b-iona. Peptid s najviše pridruženih fragmentnih iona pri tome je identificiran s najvećom vjerojatnošću pronalaska (slika 2.18.C). Na ovom tipu pretraživanja temelji se MASCOT algoritmom za pretragu baza podataka.¹⁰⁹



Slika 2.18. Algoritmi za pretragu baze podataka PFF metodom: A) obilježivači peptidnog slijeda, B) algoritmi automatske korelacije, C) preklapanje na temelju vjerojatnosti.

Najučinkovitija pretraga baze podataka je ona kombinacijom PMF i PFF metodom kod koje se koriste isti algoritmi kao i kod PFF pristupa uz masu peptida kao dodatni kriterij pretrage.^{45,109,115,116}

2.2.3.3. Sekvenciranje peptida *de novo*

Glavna prednost pristupa sekvenciranja peptida *de novo* u identifikaciji proteina, pred klasičnim visokofrekventnim pristupom pretrage baze podataka je mogućnost identifikacije proteina koji se ne nalaze u bazama podataka, te nedvojbeno potvrda proteinskih mutacija ili posttranslacijskih modifikacija proteina. Međutim, zbog potrebe za spektrima visoke kvalitete (veliki omjer intenziteta prema šumu, potpune serije fragmentnih ion i sl.) i istovremeno nepostojanje optimalnog algoritma za sekvenciranje peptida *de novo*, upotreba ovog pristupa u identifikaciji proteina je komplicirana, te se primjenjuje gotovo isključivo u slučajevima kad je to jedini izbor.

Razvoj metoda za sekvenciranje peptida *de novo* započeo je prije nego li su razvijeni algoritmi za pretragu baza podataka, jer je u početku proteomskih istraživanja, prije sistematizacije baza podataka, to bi jedini način identifikacije proteina. Prvi pokušaji rješavanja problema sekvenciranja peptida *de novo* temeljili su se na generiranju svih mogućih kombinacija peptidnih sekvenci, te usporedbi fragmentacijskih spektara tako dobivenih peptida s eksperimentalno dobivenim spektrom. Međutim, ova se metoda pokazala primjenjivom samo na kratkim peptidima, jer se povećanjem dužine peptida eksponencijalno povećava i broj mogućih kombinacija, a time i vrijeme potrebno za sekvenciranje.¹¹⁷ Pokušaji da se metoda poboljša postupkom tzv. čišćenja prefiksa (engl. *prefix pruning*), po kojem se kratki aminokiselinski sljedovi prepoznaju iz samo jednog signala, nisu univerzalno primjenjivi jer detekcija takvog signala često izostaje.¹¹⁸

Drugi pristup u razvoju algoritama za sekvenciranje peptida *de novo* i danas se dodatno unapređuje, a po njemu se iz svakog MS/MS spektra kreira graf spektra (engl. *spectrum graph*) na kojem se onda provode izračuni. Svaki signal iz spektra predstavljen je sa nekoliko čvorišta na grafu, koji odgovaraju različitim tipovima iona koje taj signal može predstavljati. Svaka spojnica na grafu označava razliku u masi između susjednih čvorišta koja s određenom pogreškom u očitavanju odgovara masi aminokiselinskog rezidua (tablica 2.2. na str. 38.), te je spojnica obično označena slovom aminokiseline. Problem sekvenciranja *de novo* na ovaj način se svodi na pronalaženje najduže putanje u grafu.¹¹⁸⁻¹²⁰

Nekoliko je osnovnih nedostataka ovog pristupa rješavanju problema sekvenciranja peptida *de novo*. Prvi i najčešći problem se javlja kada svi tipovi iona za određenu aminokiselinu na poziciji i nedostaju (a_i , b_i , c_i , x_i , y_i i z_i). Naime tada na grafu spektra izostaje putanja koja bi odgovarala aminokiselinskoj sekvenci. Ovaj problem djelomično je riješen dodavanjem spojnice i između čvorišta čija razlika u masama odgovara zbroju dvaju aminokiselinskih rezidua, no ukoliko se radi o izostanku fragmentnih iona za više od jedne aminokiseline ovaj pristup je teško primjenjiv jer se broj kombinacija znatno povećava.¹¹⁸

Drugi problem se javlja zbog prevelikog šuma u MS/MS spektrima, koji je posljedica onečišćenja ili dominantne interne fragmentacije peptida. Računalnim uklanjanjem šuma moguć je gubitak velikog broja signala za fragmentne ione aminokiselina, dok je uzimanjem svih signala u *de novo* analizu povećan broj kombinacija, čime je smanjena vjerojatnost točnog iščitavanja aminokiselinske sekvence.¹¹⁸

Treći problem se javlja zbog mogućnosti interpretacije svakog signala kao iona određene fragmentne serije (obično se radi o ionima b- ili y-serije). Ukoliko je određeni signal u spektru intenzivan, postoji tendencija da će najduža putanja u grafu spektra sadržavati dva čvorišta koja odgovaraju različitoj interpretaciji istog signala (b- i y-ion), što je obično znak da je sekvenca krivo iščitana. Ovaj se problem pokušava izbjeći uvođenjem takozvanih zabranjenih parova iona, no kako jedan signal zaista može predstavljati dva različita fragmentna iona, postoji izgledna mogućnost da se na ovaj način isključe točna rješenja.¹¹⁸

Do danas nije razvijen *de novo* algoritama koji bi istovremeno riješio sva tri opisan problema. Algoritmi koji se danas koriste (Lutefisk¹²¹, SHERENGA¹¹⁸, Peaks¹²² i PepNovo¹²³) za sekvenciranje peptida *de novo* stoga imaju točnost u očitavanje aminokiselinske sekvence manju od 30%, dok je točnost u očitavanju sastava aminokiselina do 73% (tablica 2.3.).

Tablica 2.3. Algoritmi za sekvenciranje *de novo*.

Algoritam	Točnost očitavanja	Točnost očitavanja
	aminokiselinskog sastava / %	aminokiselinske sekvence / %
Lutefisk	56,6	18,9
SHERENGA	69,0	28,9
Peaks	67,3	24,6
PepNovo	72,7	29,6

Nakon sekvenciranja peptida *de novo*, identifikacija proteina može se provesti pretragom baza podataka upotrebom različitih pretraživačkih alata, od kojih se najčešće koristi MS-BLAST (engl. *Mass Spectrometry-Basic Local Alignment Search Tool*) pretraživač.^{124,125}

Povećavanju pouzdanosti identifikacije proteina sekvenciranjem *de novo* danas se osim sa stajališta unaprijeđenija *de novo* algoritama, pristupa i sa stajališta povećanja kvalitete MS/MS spektara, gdje je najveći napredak učinjen implementacijom postupaka kemijski aktivirane fragmentacije.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIČALIJE, PRIBOR I INSTRUMENTI

3.1.1. Kemikalije

Aceton, p. a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
Acetonitril, MeCN, za LC (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, SAD);
Agaroza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
Akrilamid, $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
Albumin goveđeg seruma, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
Amonijev hidrogenkarbonat, NH_4HCO_3 , p. a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
Amonijev persulfat, 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
Amonijev sulfat, p. a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
N,N'-metilenbisakrilamid, minimum 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
Albumin goveđeg seruma, liofilizat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
Bromfenol plavo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
CHAPS (3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-2-hidroksi-1-propansulfonat), $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD);
D,L-Ditiotreitol, DTT, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
Etanol, p. a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
Fenol, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
Fosfatna kiselina, ($\varphi=85\%$), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
Formaldehid, ($\varphi=37\%$), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
4-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina dinatrijeva sol hidrat, 97% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
4-formil-1,2-benzen-di-sulfonična kiselina diamonijeva sol (Institut Ruđer Bošković, ZOKB, Laboratorij za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu, Zagreb, Hrvatska);
5-formil-1,2-benzen-di-sulfonična kiselina diamonijeva sol (Institut Ruđer Bošković, ZOKB, Laboratorij za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu, Zagreb, Hrvatska);
Glicerol, p. a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
Glicin, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);
Inhibitori proteinaza (Roche, Mannheim, Njemačka);
Jodoacetamid, IAA, $>90\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);

Kalijev heksacijanoferat (III), p.a., (Kemika, Zagreb, Hrvatska);

Kalijev hidrogenfosfat, KH_2PO_4 , p.a., (Kemika, Zagreb, Hrvatska);

Klorovodična kiselina HCl, ($\varphi=37\%$), (Kemika, Zagreb, Hrvatska);

Kloroform/Izoamilni alkohol 24/1, v/v, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);

Metanol, p. a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska);

Milli Q voda (predestilirana, pročišćena i deionizirana; otpornost kod 25 °C manja od 18 $\text{M}\Omega\text{cm}^{-3}$, ukupna masena koncentracija organskog ugljika manja od 5 $\mu\text{g dm}^{-3}$)

Mineralno ulje (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD);

Mravlja kiselina, HCOOH , p. a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska);

N,N,N,N'-tetrametiletilendiamin, TEMED, 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);

Natrijev dodecilsulfat, SDS, ~95% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);

Natrijev hidroksid, NaOH , p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska);

Natrijev karbonat, Na_2CO_3 , p.a., (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);

Natrijev tiosulfat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, p.a., (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);

Natrijv cijanoborhidrid, NaBH_3CN , p.a. (Merck, Darmstadt, Njemačka);

n-butanol, p. a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska);

Octena kiselina, ledena, CH_3COOH , ($\varphi=99\%$),. (Kemika, Zagreb, Hrvatska);

2-propanol, p.a. (Merck, Darmstadt, Njemačka);

Smjesa nukleaza (Amersham, Piscataway, NJ, SAD);

Srebrov nitrat, AgNO_3 , p.a., (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Standardi molekulskih masa za SDS-PAGE 10-230 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD);

Tiourea, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);

Trifluorooktenu kiselina, TFA, p. a. (Merck, Darmstadt, Njemačka);

Tripsin izoliran iz svinjskog pankreasa, pročišćen imunoafinitetnom kromatografijom, (Merck, Darmstadt, Njemačka);

Triton X-100, p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);

Trishidroksimetil-aminometan (Tris), $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);

Urea, za elektroforezu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);

α -cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina (CHCA); $>99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);

β -merkaptetanol, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD);

3.1.2. Pribor

Filter papir (Whatman, Maidstone, Velika Britanija);

Pipetni nastavci C₄ ZipTip_{μ-C4} (Millipore, Billerica, MA, SAD);

Pipetni nastavci C₁₈ ZipTip_{μ-C18} (Millipore, Billerica, MA, SAD);

Membrane za dijalizu Centricon 5kDa (Millipore, Billerica, MA, USA);

Membrane za dijalizu Microcon 3kDa (Millipore, Billerica, MA, USA);

Staklene kuglice; dijametar 0,10 - 0,11 mm (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD);

Teflonska pločica za unos uzoraka u spektrometar masa MALDI/TOF-TOF sa 384 položaja (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD);

IPG trake, 17 cm, pH=3-10 nelinearno (NL), (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD);

IPG trake, 17 cm, pH=4-7 linearno, (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD);

Kromatografski stupac, XBridge BEH300, C₄, 3,5μm, 4,6 mm x 150 mm (Milford, Massachusetts, SAD)

3.1.3. Instrumenti i uređaji

Spektrometar masa, model 4800 plus MALDI TOF-TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD)

Sustav za vizualizaciju elektroforetskih gelova, model Versa Doc Imaging System 4000 (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD)

UV/VIS spektrofotometar, model NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)

Preparativni sustav za tekućinsku kromatografiju s UV/VIS detektorom s nizom dioda ; HPLC DAD , model 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD)

pH metar model S20 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)

analitička vaga model 1712 MP8 (Sartorius, Velika Britanija)

Centrifuga model 5415 R (Eppendorf, Hamburg Njemačka)

Centrifuga model 5410 (Eppendorf, Hamburg Njemačka)

Vakuum centrifuga, model Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg Njemačka)

Termomikser, model comfort (Eppendorf, Hamburg Njemačka)

Sustav za 1D gel elektroforezu, Mini Protean 3 Cell i PowerPac 3000 (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD)

Sustav za izoelektrično fokusiranje PROTEAN IEF cell i Power Pac 4000 (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD)

Jedinica za hlađenje sustava za vertikalnu elektroforezu; PROTEAN II XL cell (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD)

Ultrazvučni sonifikator model Ultrasonic cell disruptor XL (Misonix Inc., Farmingdale, NY, SAD),

Spektrofotometar model C 2021 (Cecilinstruments, Peterborough, Ujedinjeno kraljevstvo)

Magnetska miješalica model WMS-400 (IKA, Staufen, Njemačka)

Vibracijska miješalica model MS3 basic (IKA, Staufen, Njemačka)

Pipetori, model Recherche plus (Eppendorf, Hamburg Njemačka)

3.1.4. Programi za upravljanje instrumentima ili obradu podataka

Mascot V 2.1 (Matrix Science, Velika Britanija)

PDQuest SW V 7.4.0 (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD)

4000 Series Explorer software V 3.5.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

ProteinPilot V 4.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Data Explorer V 4.9 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Protein Prospector V 5.16.0 (University of California, CA, San Francisco; SAD)¹²⁶

Protein-protein BLAST (BLASTp algoritam)¹²⁷;

Bioutil peaks (Centar za proteomiku i spektrometriju masa, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska)

Chem Station V B.04.03. (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD)

Protein Reader programski paket za sekvenciranje *de novo* razvijen u suradnji Instituta Ruđer Bošković i Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.¹³⁷

3.1.5. PRIPREMA OTOPINA

50 mmol dm⁻³ amonijev hidrogenkarbonat pufer pH=7,8

Pufer je pripremljen otapanjem 4 g NH₄HCO₃ u 900 mL Milli Q vode. Vrijednost pH otopine je podešena na 7,8 fosfatnom kiselinom ($\varphi=85\%$), te je volumen nadopunjen do 1000 mL sa Milli Q vodom.

25 mmol dm⁻³ amonijev hidrogenkarbonat pufer pH=7,8

Pufer je pripremljen otapanjem 2 g NH₄HCO₃ u 900 mL Milli Q vode. Vrijednost pH otopine je podešena na pH=7,8 s fosfatnom kiselinom ($\varphi=85\%$) te je volumen nadopunjen do 1000 mL sa Milli Q vodom.

Radni pufer

Radni pufer je po sastavu 7 mol dm⁻³ urea, 2 mol dm⁻³ tiourea, 40 g dm⁻³ CHAPS, a pripremljen je otapanjem 4,2 g uree, 1,5 g tiouree i 0,4 g CHAPS u oko 8 ml Milli Q vode u odmjernoj tikvici od 10 ml na magnetskoj miješalici. Po otapanju tikvica je nadopunjena Milli Q vodom na volumen. Ovako pripremljen radni pufer je alikvotiran i skladišten na -20 °C do organoleptičkih promjena.

Radni pufer za kvantifikaciju proteina

Radni pufer za kvantifikaciju proteina je po sastavu 6 mol dm⁻³ urea, 10 mmol dm⁻³ Tris, 5 g dm⁻³ D-sorbitola, a pripremljen je otapanjem 3,6 g uree, 12 mg Tris i 50 mg D-sorbitola u oko 8 ml Milli Q vode u odmjernoj tikvici od 10 ml na magnetskoj miješalici. Po otapanju tikvica je nadopunjena Milli Q vodom na volumen. Ovako pripremljen radni pufer je alikvotiran i skladišten na -20 °C do organoleptičkih promjena.

Smjesa inhibitora proteinaza

Smjesa inhibitora proteinaza priprema se prema preporuci proizvođača (Roche) otapanjem jedne tablete u 5 ml radnog pufera (7 mol dm⁻³ urea, 2 mol dm⁻³ tiourea, 40 g dm⁻³ CHAPS) ili u 5 ml radnog pufera za kvantifikaciju. Ovako pripremljena smjesa inhibitora proteinaza može se alikvotirati i skladištiti na -20 °C do organoleptičkih promjena.

Pufer za lizu proteina

Pufer za lizu proteina (stanica, tkiva ili bioloških tekućina) je po sastavu 25 mmol dm^{-3} amonijev hidrogenkarbonat ($\text{pH}=7,8$) i $0,15 \text{ mmol dm}^{-3}$ Triton X-100.

Pufer je pripremljen otapanjem $2 \text{ g NH}_4\text{HCO}_3$ u 900 mL Milli Q vode. Vrijednost pH otopine je podešena na $\text{pH}=7,8$ s fosfatnom kiselinom ($\varphi=85\%$), potom je dodan 1 g Triton –X 100 i volumen je nadopunjen do 1000 mL sa Milli Q vodom.

Ovako pripremljen pufer skladišten je na $2-8^\circ\text{C}$ do organoleptičkih promjena.

Pufer za kvantifikaciju proteina 1

Pufer za kvantifikaciju proteina 1 (kvantifikacija po metodi Warburg-Christian) je po sastavu 10 g dm^{-3} DTT i smjesa inhibitora proteinaza ($\varphi=0,14$) u radnom puferu za kvantifikaciju proteina, a pripremljen je neposredno prije upotrebe otapanjem 10 mg DTT u $140 \mu\text{l}$ smjese inhibitora proteinaza (pripremljene u radnom puferu za kvantifikaciju) i $860 \mu\text{l}$ radnog pufera za kvantifikaciju.

Pufer za kvantifikaciju proteina 2

Pufer za kvantifikaciju proteina (kvantifikacija po Bradford metodi) je po sastavu 10 g dm^{-3} DTT i smjesa inhibitora proteinaza ($\varphi=0,14$) u radnom puferu, a pripremljen je neposredno prije upotrebe otapanjem 10 mg DTT u $140 \mu\text{l}$ smjese inhibitora proteinaza (pripremljene u radnom puferu) i $860 \mu\text{l}$ radnog pufera.

Pufer za izoelektrično fokusiranje

Pufer za izoelektrično fokusiranje je po sastavu 10 g dm^{-3} DTT, smjesa inhibitora proteinaza ($\varphi=0,14$) otopljenih u radnom puferu i nemjerljivo mala količina bromfenol modrila, a pripremljen je neposredno prije upotrebe otapanjem 10 mg DTT u $140 \mu\text{l}$ smjese inhibitora proteinaza (pripremljene u radnom puferu) i $860 \mu\text{l}$ radnog pufera uz dodatak male količine bromfenol modrila (na vrhu nastavka za pipetor) u smjesu.

Tris-HCl pufer, $1,5 \text{ mol dm}^{-3}$; $\text{pH}=8,8$

Za pripremu $1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pufera; $\text{pH}=8,8$, otopljeno je $18,2 \text{ g}$ Trisa u oko 80 mL Milli Q vode u odmjerne tikvici od 100 mL . pH je podešen na $\text{pH}=8,8$ s 6 mol dm^{-3} HCl (pripremljena miješanjem $51,5 \text{ mL}$ HCl ($\varphi=37\%$) i $48,5 \text{ mL}$ Milli Q vode), te je tikvica nadopunjena Milli Q vodom na volumen.

Ovako pripremljen pufer skladišten je na $2-8^\circ\text{C}$ do organoleptičkih promjena.

Tris-HCl pufer, $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$; $pH=6,8$

Za pripremu $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pufera; $pH=8,8$, otopljeno je 6 g Tris u oko 80 mL Milli Q vode u odmjernoj tikvici od 100 ml uz miješanje na magnetskoj miješalici. pH je podešen na $pH=6,8$ s 6 mol dm^{-3} HCl (pripremljena miješanjem 51,5 ml HCl ($\varphi=37\%$) i 48,5 ml Milli Q vode, te je tikvica nadopunjena Milli Q vodom na volumen.

Ovako pripremljen pufer skladišten je na $2-8^\circ\text{C}$ do organoleptičkih promjena.

Ekvibracijski pufer

Ekvibracijski pufer je po sastavu 75 mmol dm^{-3} Tris-HCl; $pH=8,8$, 6 mol dm^{-3} urea, glicerol ($\varphi=0,3$), 20 g dm^{-3} SDS i nemjerljivo mala količina bromfenol modrila, a priprema se otapanjem 72,1 g uree, 4 g SDS uz dodatak 10 ml $1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl; $pH=8,8$ pufera, 60 ml glicerola i proizvoljno male količine bromfenol modrila (na vrhu nastavka za pipetor) u oko 180 ml Milli Q vode u odmjernoj tikvici od 200 ml uz miješanje na magnetskoj miješalici. Kad je sve otopljeno, tikvica je nadopunjena Milli Q vodom na volumen, a ovako pripremljeni ekvibracijski pufer alikvotiran je i skladišten na -20°C do organoleptičkih promjena.

30%-tna otopina akrilamida i bisakrilamida

Otopina je po sastavu 4 mol dm^{-3} akrilamid i 52 mmol dm^{-3} *N,N'*-metilenbisakrilamid, a pripremljena je otapanjem 146 g akrilamida i 4 g bisakrilamida u 400 ml Milli Q vode na magnetskoj miješalici u odmjernoj tikvici od 500 ml. Nakon otapanja odmjerna tikvica je nadopunjena na volumen, a otopina je profiltrirana kroz filter papir, te je skladištena na $2-8^\circ\text{C}$ do organoleptičkih promjena.

Pufer za elektroforezu

Radni pufer za elektroforezu je po sastavu 25 mmol dm^{-3} Tris, 190 mmol dm^{-3} glicin i 10 g dm^{-3} SDS; $pH=8,3$, a pripremljen je otapanjem 30 g Trisa, 144 g glicina i 10 g SDS u oko 800 ml Milli Q vode u odmjernoj tikvici od 1000 ml uz miješanje na magnetskoj miješalici. Nakon otapanja, odmjerna tikvica je nadopunjena na volumen, a pufer je skladišten na $2-8^\circ\text{C}$ do organoleptičkih promjena.

Pufer za elektroforezu je po sastavu $2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris, $19,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ glicin i $1,0 \text{ g dm}^{-3}$ SDS; $pH=8,3$, a pripremljen je deseterostrukim razrjeđivanjem radnog pufera za elektroforezu

Milli Q vodom, neposredno prije upotrebe, miješanjem 300 ml radnog pufera za elektroforezu i 2700 ml Milli Q vode na magnetskoj miješalici.

Reducirajući pufer za uzorke

Reducirajući pufer za uzorke po sastavu je 120 g dm^{-3} SDS, glicerol ($\varphi=0,3$), 2 g dm^{-3} brom fenol modnilo, $1,7 \text{ mmol dm}^{-3}$ β -merkaptotanol, $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris HCl; pH=6,8, a pripremljen je otapanjem 1,2 g SDS, 20 mg bromfenol modnila, uz dodatak 3 ml glicerola, 1,2 ml β -merkaptotanela, 2 ml $1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl; pH=6,8 pufera i oko 4 ml Milli Q vode u odmjernoj tikvici od 10 ml uz miješanje na magnetskoj miješalici. Tikvica je nadopunjena Milli Q vodom na volumen, a pufer je skladišten na sobnoj temperaturi do organoleptičkih promjena.

Matična otopina tripsina

Matična otopina tripsina je pripremljena dodavanjem 50 μL Milli Q vode u jednu ampulu koja sadrži 50 μg liofiliziranog tripsina. Konačna masena koncentracija tripsina u matičnoj otopini iznosila je 1 g dm^{-3} . Matična otopina alikvotirana je u obroke od po 10 μl i skladištena na -20°C do 3 mjeseca.

Radna otopina tripsina

Radna otopina tripsina po sastavu je 10 mg dm^{-3} tripsin, a pripremljena je miješanjem 10 μl matične otopine tripsina i 990 μl Milli Q vode neposredno prije upotrebe.

3 mmol dm^{-3} kalijev hidrogenfosfatni pufer (pH=4,0).

Pufer je pripremljen otapanjem 200 mg KH_2PO_4 u 500 ml Milli Q vode. pH vrijednost pufera podešena je na pH=4,0 sa fosfatnom kiselinom ($\varphi=85\%$). Pufer je skladišten na $2-8^\circ\text{C}$ do organoleptičkih promjena.

Otopina $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$ natrijev cijanoborhidrid

Otopina natrijevog cijanoborhidrida pripremljena je otapanjem 24 mg natrijevog cijanoborhidrida u 1 ml 3 mmol dm^{-3} kalijev hidrogenfosfatnog pufera (pH=4,0) neposredno prije upotrebe.

Otopine za obilježavanje CAF reagensima 1

Otopine za obilježavanje CAF reagensima 1 pripremaju se za svaki od tri CAF reagens na isti način. Otopine su po sastavu $3,8 \text{ mmol dm}^{-3}$ CAF reagens (CAF-op, CAF-mm ili CAF-mp) i $66,8 \text{ mmol dm}^{-3}$ natrijev cijanoborhidrid u 3 mmol dm^{-3} kalijevom hidrogenfosfatnom puferu (pH=4,0). Otopina se priprema miješanjem 1 mg željenog CAF reagens (CAF-op, CAF-mm ili CAF-mp) s $167 \text{ }\mu\text{l}$ otopine $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$ natrijevog cijanoborhidrida i $833 \text{ }\mu\text{l}$ 3 mmol dm^{-3} kalijevog hidrogenfosfatnog puferu (pH=4,0). Otopine za obilježavanje pripremaju se neposredno prije upotrebe.

Otopina za obilježavanje CAF reagensima 2

Otopine za obilježavanje CAF reagensima 2 pripremaju se za svaki od tri CAF reagens na isti način. Otopine su po sastavu 30 mmol dm^{-3} CAF reagens (CAF-op, CAF-mm ili CAF-mp) i 200 mmol dm^{-3} natrijev cijanoborhidrida u 3 mmol dm^{-3} kalijevom hidrogenfosfatnom puferu (pH=4,0). Otopina se priprema miješanjem 8 mg željenog CAF reagens (CAF-op, CAF-mm ili CAF-mp) s $500 \text{ }\mu\text{l}$ otopine $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$ natrijevog cijanoborhidrida i $500 \text{ }\mu\text{l}$ 3 mmol dm^{-3} kalijevog hidrogenfosfatnog puferu (pH=4,0). Otopine za obilježavanje pripremaju se neposredno prije upotrebe.

Pokretna faza A

Pokretna faza A je po sastavu 13 mmol dm^{-3} trifluoroctena kiselina, a pripremljena je miješanjem 1 ml trifluoroctene kiseline u 1000 ml Milli Q vode. Otopina je skladištena na sobnoj temperaturi do organoleptičkih promjena.

Pokretna faza B

Pokretna faza A je po sastavu $15,1 \text{ mol dm}^{-3}$ acetonitril i 13 mmol dm^{-3} trifluoroctena kiselina, a pripremljena je miješanjem 800 ml acetonitrila, 200 ml Milli Q vode i 1 ml trifluoroctene kiseline. Otopina je skladištena na sobnoj temperaturi do organoleptičkih promjena.

Otopine za pročišćavanje peptida ZipTip tehnikom

Otopina 1 po sastavu je 15,1 mol dm⁻³ acetonitril i 13 mmol dm⁻³ trifluoroctena kiselina, a pripremljena je miješanjem 8 ml acetonitrila, 2 ml Milli Q vode i 10 µl trifluoroctene kiseline. Otopina 2 po sastavu je 9,4 mol dm⁻³ acetonitril i 13 mmol dm⁻³ trifluoroctena kiselina, a pripremljena je miješanjem 5 ml acetonitrila, 5 ml Milli Q vode i 10 µl trifluoroctene kiseline. Otopina 3 po sastavu je 13 mmol dm⁻³ trifluoroctena kiselina, a pripremljena je miješanjem 10 ml Milli Q vode i 10 µl trifluoroctene kiseline.

Sve tri otopine pripremljene su nepotrebno prije upotrebe.

Otopina CHCA matrice

Otopina CHCA matrice po sastavu je 5 g dm⁻³ α-cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina (CHCA) u 9,4 mol dm⁻³ vodenoj otopini acetonitrila, a pripremljena je otapanjem 5 mg CHCA matrice u 500 µl Milli Q vode i 500 µl acetonitrila.

3.2. PROTEISNKI EKSTRAKTI STANIČNIH KULTURA

3.2.1. Priprema proteina staničnih lizata

Stanični lizati pripremani su iz uzgojenih staničnih suspenzija *Arabidopsis thalia*, *Lactobacillus plantarum* i *Escherichia Coli* kao i iz staničnih kultura *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium* i *Pediococcus pentosaceus* uzgojenih na hranjivim podlogama. Uzgoj staničnih suspenzija i kultura na hranjivim podlogama proveden je u suradnji sa Prehrambeno-biotehnološkim fakultetom Sveučilišta u Zagrebu.

Uzgojene stanične suspenzije su centrifugirane 5 min pri 7 000 g na 4 °C. Supernatant je dekantiran, a talog stanica ispran je dva puta u puferu za lizu proteina. Stanice su nakon ispiranja resuspendirane u dostatnom volumenu puferu za lizu proteina i inkubirane na ledu tijekom 5 minuta. Za stanične kulture uzgojne na hranjivim podlogama puna eza stanica resuspendirana je u 100 µl puferu za lizu proteina. Dalje su uzorci bez obzira na podrijetlo uzgoja (stanična suspenzija ili hranjive podloge) pripremani na isti način.

Volumen od 100 µl uzoraka sonificiran je ultrazvučnim sonifikatorom kroz 4 ciklusa od po 30 sekundi s pauzama od po 60 sekundi između ciklusa. Za vrijeme pauza uzorci su inkubirani na ledu. Intenzitet jakosti ultrazvučnog pina podešen je na 30%-50% intenziteta.

Nakon ultrazvučnog razbijanja stanica u uzorak je dodano oko 100 mg staklenih kuglica. Stanice su lizirane mehaničkim miješanjem sa staklenim kuglicama kroz 5 ciklusa od po 30 s vibracijskog miješanja stolnom vibracijskom miješalicom pri 2500 rpm s pauzama od 60 s između ciklusa. Za vrijeme pauza uzorci su inkubirani na ledu.

Supernatant iznad kuglica je odvojen u Eppendorf epruvetu te je centrifugiran 10 min pri 10 000 g na 4 °C. Istaloženi netopivi stanični dijelovi sa dna epruvete su bačeni, a topivi stanični lizat je prebačen u čistu Eppendorf epruvetu.

3.2.2. Priprema proteinskog ekstrakta

Prije razdvajanja ukupnih proteina bakterijskih staničnih kultura 2-D gel elektroforezom provedeno je odvajanje lizata stanice od lipida, soli i DNA ekstrakcijom na međusloju organske i vodene faze.¹²⁸

Izoliranim staničnim proteinima dodan je 1,5 mol dm⁻³ Tris-HCl; pH=8,8 pufer do volumena od 2 ml i 8 ml PCIA smjese u tubici od 12 ml. PCIA smjesa je smjesa fenola, kloroforma i izoamilnog alkohola u volumnom omjeru 25/24/1, v/v/v, a dobivena je miješanjem 50 ml zaluženog fenola (50 ml fenola + 100 µl 5 mol dm⁻³ NaOH) i 50 ml smjese kloroforma i izoamilnog alkohola u volumnom omjeru 24/1. Tubica je potom vorteksirana i ostavljena stajati 5 min dok se faze nisu počele razdvajati, a potom su uzorci centrifugirani 30 min na 7 000 g pri 4 °C, kako bi se faze u potpunosti razdvojile.

Nastavkom za pipetor pažljivo je uklonjena gornja vodena faza u kojoj je otopljen DNA, te je bijeli talog proteina, nastao ekstrakcijom na međusloju organske i vodene faze, sakupljen u novu tubicu. Talogu proteina dodan je oko osam puta veći volumen (od volumena taloga) acetona ohlađenog na -20 °C. Smjesa je potom vorteksirana 30-ak s i ostavljena na -20 °C preko noći kako bi se uklonile eventualno zaostale ionske nečistoće i lipidi, a proteini ukoncentrirali taloženjem. Nakon što su se proteini istaložili, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 4 °C i 10 000 g. Aceton je uklonjen, a talog je kratko posušen na zraku, te mu je dodan pufer za kvantifikaciju proteina 2 (10 g dm⁻³ DTT i smjesa inhibitora proteinaza (φ=0,14) u radnom puferu za kvantifikaciju proteina), u volumenu koji omogućava potpuno otapanje proteinskog taloga (oko 300 µl). Otapanje je pospješeno inkubacijom smjese na termomiješalici (~600 rpm) pri 30 °C 15-ak min. Nakon otapanja uzorci su kratko centrifugirani (~1 min na 10 000 g) kako bi se ustanovilo postojanje eventualno neotopljenog taloga, koji je potom otopljen dodavanjem dodatnog volumena radnog pufer za kvantifikaciju

proteina 2 smjesi i inkubacijom na termomiješalici (~600 rpm) pri 30 °C do potpunog otapanja taloga.

3.2.3. Određivanje koncentracije proteina staničnih ekstrakata

Ovisno o pripremi uzorka, odnosno o puferu u kojem su otopljeni ukupni proteini, kvantifikacija proteina provedena je spektrofotometrijski: Warburg-Christian-ovom metodom (uzorci otopljeni u puferu za kvantifikaciju 1) ili metodom po Bradfordu (uzorci otopljeni u puferu za kvantifikaciju 2).

3.2.3.1. Kvantifikacija proteina prema Warburg-Christian-ovoj metodi

Određivanje koncentracije proteina prema Warburg-Christian-ovoj metodi provedeno je na specijaliziranom spektrofotometru (nanoDrop) koji ima mogućnost očitavanja apsorbancije na valnim duljinama UV-VIS područja iz vrlo malog volumena uzorka (nekoliko μl).

Mjerenje je provedeno stavljanjem 2 μl uzorka na konusno stakalce spektrofotometra (nanoDrop), a kao slijepa proba (čije se spektr automatski oduzima od spektra uzorka) korišten je pufer u kojem su uzorci otopljeni (puferu za kvantifikaciju 1).

Očitanjem apsorbancije na valnim duljinama 280 nm i 260 nm, masena koncentracija proteina izračunata je prema Warburg-Christian-ovoj jednadžbi:

$$\gamma/(mg/ml) = (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$$

gdje je γ masena koncentracija proteina, A_{280} iznos apsorbancije uzorka na valnoj duljini 280 nm, A_{260} iznos apsorbancije uzorka na valnoj duljini 260 nm, a 1,55 i 0,76 su korekcijski faktori.¹³¹

Za točno i pouzdano određivanje masene koncentracije proteina ovom metodom potrebno je da pufer u kojem su proteini otopljeni ne sadrži kemikalije koje interferiraju sa apsorbancijom DNA i proteina na valnim duljinama 260 nm, odnosno 280 nm. Za uzorke koji ne zadovoljavaju ovaj uvjet, kvantifikacija proteina je provedena metodom po Bradfordu.

3.2.3.2. Kvantifikacija proteina metodom po Bradfordu

U uzorcima kod kojih je uklanjanje DNA provedeno ekstrakcijom, smjesom fenola kloroforma i izoamilnog alkohola, pouzdanu kvantifikaciju nije bilo moguće provesti gore opisanom metodom. Naime, tragovi fenola u uzorku ometaju očitavanje apsorbancije na valnim duljinama 260 i 280, budući da je molarni ekstinkcijski koeficijent fenola pri 270,75 nm $2,340 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$.¹³²

Za uzorke kojima je taloženjem u acetonu dobiveno vrlo malo taloga (vizualna procjena), pa su stoga odmah nakon taloženja otopljeni u puferu za kvantifikaciju 2 (jer ne sadrži kemikalije koje bi ometale izoelektrično fokusiranje), koncentraciju također nije bilo moguće odrediti spektrofotometrijski, iz apsorbancije na valnim duljinama 280 nm i 260 nm, uslijed interferencije izazvane CHAPS apsorbancijom pri 270 nm.

U takvim je uzorcima koncentracija proteina određena metodom po Bradfordu.

Metoda određivanja koncentracije proteina po Bradfordu temelji se na svojstvu da se apsorbcijski maksimum anionske boje Coomassie Brilliant Blue G-250, uslijed vezanja proteina, u kiseloj otopini, pomiče sa 465 nm na 595 nm.¹³³

Za konstruiranje baždarnog pravca, od otopine proteina BSA koncentracije 1 g dm^{-3} , razrjeđivanjem s Milli Q vodom, priređene su standardne otopine koncentracija $0,01 \text{ g dm}^{-3}$, $0,02 \text{ g dm}^{-3}$, $0,04 \text{ g dm}^{-3}$, $0,06 \text{ g dm}^{-3}$, $0,08 \text{ g dm}^{-3}$, $0,10 \text{ g dm}^{-3}$, $0,10 \text{ g dm}^{-3}$, $0,20 \text{ g dm}^{-3}$, $0,30 \text{ g dm}^{-3}$, $0,40 \text{ g dm}^{-3}$ i $0,50 \text{ g dm}^{-3}$. Po $100 \mu\text{l}$ svake od standardne otopine pomiješano je sa 1 ml Bradford-ova reagensa (maseni udijeli: 0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7 % etanol, 8,5 % fosfatna kiselina) te im je nakon 30 min izmjerena apsorbancija pri $\lambda=595 \text{ nm}$. Na isti način izmjerena je apsorbancija različitih volumena otopina proteina (ovisno o koncentraciji proteina) te im je koncentracija očitana sa konstruiranog baždarnog pravca.

3.3. RAZDVAJANJE PROTEINA ELEKTROFORETSKIM TEHNIKAMA

Razdvajanje proteina provedeno je jednodimenzionalnom i dvodimenzionalnom elektroforezom u gelu.

3.3.1. Razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu uz dodatak natrijevog sulfata (SDS-PAGE)

Za SDS-PAGE pripremljen je 9% poliakrilamidni gel debljine 1 mm, širine 8 cm i visine 7,3 cm. Gel za razdvajanje (engl. *separating gel*) pripremljen je miješanjem 6 ml Milli Q vode, 3,5 ml Tris-HCl pufera koncentracije $1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ (pH=8,8), 140 μl SDS koncentracije 100 g dm^{-3} , 4,2 ml 30%-tne otopine akrilamida i bisakrilamida, 70 μl amonijevog persulfata (APS) koncentracije 100 g dm^{-3} i 14 μl TEMED. Gel je izliven u prethodno pripremljena stakla na stalku za izlijevanje gelova, te je prekriven sa 1 ml n-butanola i polimeriziran. Nakon što su gelovi polimerizirali, n-butanol je uklonjen s površine gelova višekratnim ispiranjem s destiliranom vodom, a površina gela je posušena filter papirom. Gel za sabijanje (engl. *stacking gel*) pripremljen je miješanjem 4,2 ml Milli Q vode, 1,9 ml Tris-HCl pufer koncentracije $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ (pH=6,8), 75 μl SDS koncentracije 100 g dm^{-3} , 1,25 ml 30%-tne otopine akrilamida i bisakrilamida, 37,5 μl amonijevog persulfata (APS) koncentracije 100 g dm^{-3} i 7,5 μl TEMED. Gel za sabijanje izliven je na netom polimerizirani gel za razdvajanje, nakon čega je između stakala umetnut češalj koji formira jažice, te je potom gel ostavljen polimerizirati. Na volumen koji odgovara količini od 20 μg svakog uzorka, dodano je 4 μl reducirajućeg pufera, te je smjesa (ukoliko je potrebno) nadopunjena do 16 μl Milli Q vodom i inkubirana 10 min pri temperaturi od 97 °C uz protresanje na 500 rpm na termomiješalici. Smjesa standarda molekulskih masa pripremljena je miješanjem 1 μl otopine standarda molekulskih masa i 4 μl reducirajućeg pufera za uzorke. Gelovi su preneseni u komoru za elektroforezu, dodan je pufer za elektroforezu, uzorci i standard molekulskih masa su raspoređeni u jažice, te je pokrenuta elektroforeza pri uvjetima navedenim u tablici 3.1.

Tablica 3.1. Uvjeti pri kojima je vođena jednodimenzionalna SDS poliakrilamidna gel elektroforeza

Korak	U / V	Tajenje / min
1	80	30
2	120	~ 60 (do kraja gela)

3.3.2. Razdvajanje proteina dvodimenzionalnom elektroforezom u gelu

Razdvajanje ukupnih proteina dobivenih lizom staničnih kultura provedeno je dvodimenzionalnom gel elektroforezom (2-DE), provođenjem izoelektričnog fokusiranja u prvoj i SDS-PAGE u drugoj dimenziji razdvajanja.

3.3.2.1. Prva dimenzija: izoelektrično fokusiranje

Na poznati volumen uzorka (s obzirom na koncentraciju proteina, analizirane su količine uzorka od 75 µg do 800 µg ukupnih proteina) dodan je pufer za izoelektrično fokusiranje do ukupnog volumena 350 µl. Otopljenom uzorku dodano je bromfenol modriilo, te je uzorak odpipetiran uzduž kanala kadice za fokusiranje (engl. *focusing tray*). Zatim je na uzorak pažljivo položena IPG traka (17 cm, pH=3-10 nelinearno ili 17 cm pH=4-7 linearno) sa gradijentnim gelom okrenutim prema dolje, te su svi nastali mjehurići zraka uklonjeni laganim podizanjem i spuštanjem trake u kanal. Kako bi se spriječilo isušivanje i kontaminacija, na IPG trake dodano je nekoliko ml (2-4) mineralnog ulja. Eventualne male ionske nečistoće (prvenstveno soli) uklonjene su elektroforetski, prije ulaska uzorka (a time i nečistoća) u gradijentni gel IPG trake (rehidratacija) aktiviranjem njihove akumulacije na anodi, odnosno katodi. Naime, primjenom napona od 200 V u trajanju od 45 min, proteini kao znatno veće, a time i elektroforetski tromije molekule, gotovo ne migriraju u otopini, dok se ioni soli gibaju i akumuliraju na anodi ili katodi, gdje se zadržavaju čitavo vrijeme rehidratacije i fokusiranja. Potom su trake ostavljene na aktivnu rehidrataciju u trajanju od 14 sati (PROTEAN IEF cell) pri 50 V na 20 °C kako bi proteini ravnomjerno ušli u gel. Nakon rehidratacije ispod svake trake su na obje elektrode položeni navlaženi filter papiri, te je dalje provođeno izoelektrično fokusiranje prema uvjetima navedenim u tablici 3.2. i tablici 3.3.

Tablica 3.2. Uvjeti izoelektričnog fokusiranja za IPG trake pH=3-10 NL (nelinearno), 17 cm

Korak	Porast napona	Ostvareni napon / V	Trajanje / min	Trajanje / Vh
1	brzi	200	75 min	/
2	brzi	500	15 min	/
3	spori	500	60 min	/
4	brzi	1000	15 min	/
5	spori	1000	60 min	/
6	brzi	7000	240 min	/
7	spori	7000	/	90 000 Vh
8	spori	500	1440 min	/

Tablica 3.3. Uvjeti izoelektričnog fokusiranja za IPG trake pH=4-17 L (linearno), 17 cm

Korak	Porast napona	Ostvareni napon / V	Trajanje / min	Trajanje / Vh
1	brzi	200	75 min	/
2	brzi	500	15 min	/
3	spori	500	60 min	/
4	brzi	1000	15 min	/
5	spori	1000	60 min	/
6	brzi	7000	240 min	/
7	spori	7000	/	30 000 Vh
8	spori	500	1440 min	/

Nakon završetka izoelektričnog fokusiranja trake su ocijeđene od mineralnog ulja, i pohranjene na -20 °C do daljnje analize.

Ekvilibracija IPG traka

IPG trake koje su nakon izoelektričnog fokusiranja pohranjene na -20 °C, izvađene su iz hladnjaka i temperirane su na sobnoj temperaturi ili su odmah po završetku izoelektričnog fokusiranja izvađene iz kade za fokusiranje i ocijeđene od ostatka mineralnog ulja. Trake su potom uronjene u epruvete s ekvibracijskim puferom (75 mmol dm^{-3} Tris-HCl, pH=8,8, 6 mol dm^{-3} urea, glicerol ($\varphi=0,3$), 20 g dm^{-3} SDS, bromfenol modriilo) kojem je dodano ditiotreitola (DTT) do konačne koncentracije 10 g dm^{-3} , te su lagano protresane 15 minuta. Zatim je postupak ponovljen u novim epruvetama s ekvibracijskim puferom kojem je dodano jodoacetamida (IAA) do konačne koncentracije 25 g dm^{-3} . DTT služi za redukciju disulfidnih mostova, a IAA alkilira redukcijom nastale i već postojeće slobodne tiolne

skupine cisteinskih bočnih ogranka, te na taj način sprječava njihovu ponovnu oksidaciju tijekom elektroforeze kao i moguće nepoželjne interakcije, što je izuzetno važno za daljnju identifikaciju proteina spektrometrijom masa.

Nakon ekvibracije trake su spremne za razdvajanje proteina drugom dimenzijom, SDS-PAGE.

3.3.2.2. Druga dimenzija: SDS-PAGE

Po razdvajanju proteina izoelektričnim fokusiranjem, nastavljeno je sa SDS-PAGE razdvajanjem u drugoj dimenziji. Pripremljena je smjesa za 12 %-tni poliakrilamidni gel, debljine 1 mm, visine 20 cm i širine 18 cm miješanjem 34 mL destilirane vode, 25 mL Tris-HCl pufera koncentracije $1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ (pH=8,8), 1 mL otopine SDS koncentracije 100 g dm^{-3} , 40 mL 30% smjese akrilamida i bisakrilamida, 500 μl amonijevog persulfata koncentracije 100 g dm^{-3} (APS) i 50 μl TEMED. Smjesa je pažljivo izlivena u prethodno složena stakla za gelove i potom prekrivena n-butanolom da bi se spriječila oksidacija na površini gela. Nakon što su gelovi polimerizirali, n-butanol je uklonjen s površine gelova višekratnim ispiranjem s destiliranom vodom. Staklene ploče s gelovima su zatim pričvršćene na jedinicu za hlađenje sustava za vertikalnu elektroforezu (PROTEAN II XL cell) i umetnute u komoru za elektroforezu. S površine gelova uklonjena je preostala voda, te su između stakala umetnute IPG trake koje su prethodno ekvilibrirane, a nakon toga kratko isprane u puferu za elektroforezu (25 mmol dm^{-3} Tris, 192 mmol dm^{-3} glicin, 10 g dm^{-3} SDS, pH=8,3). Prilikom umetanja IPG traka je lagano prislonjena na površinu gela tako da je plastični dio trake prijanjao uz staklo, te su se laganim pritiskom uklonili svi zaostali mjehurići zraka. Trake su zatim prelivene s otopinom agaroze koja je pripremljena otapanjem 0,5 g agaroze i $200 \mu\text{l}$ $2 \times 10^{-6} \text{ g dm}^{-3}$ bromfenol modrila u 100 ml pufera za elektroforezu. Kad je agarozna polimerizirala, u komoru je dodan pufer za elektroforezu, jedinica za hlađenje je spojena na vodu, te je pokrenuta elektroforeza pri uvjetima navedenim u tablici 3.4.

Tablica 3.4. SDS poliakrilamidna gel elektroforeza

Korak	I / mA	Trajanje / min	Trajanje / Vh
1	15	60	/
2	20	/	600
3	30	~300 (do kraja gela)	/

3.3.3. Vizualizacija proteina u gelu

Nakon 2-DE razdvajanja proteina, proteini su vizualizirani bojanjem koloidnom Coomassie Brilliant Blue G-250 bojom (ako je ukupna količina proteina bila veća od 300 µg) ili bojanjem srebrovim nitratom (za gelove gdje je količina ukupno razdvojenih proteina manja od 300 µg). Proteini razdvojeni jednodimenzionalnim tehnikom SDS-PAGE vizualizirani su bojanjem Coomassie Brilliant Blue R-250 bojom.

3.3.3.1. Vizualizacija proteina Coomassie Brilliant Blue bojom

Bojanjem gelova Coomassie Brilliant Blue bojom vizualizirani su proteini razdvojeni 2-DE tehnikom (CBB G-250) i SDS-PAGE razdvojeni proteini (CBB R-250).

Pripremljena je matična otopina koloidne Coomassie boje sastava: 1 g dm⁻³ Coomassie Brilliant Blue G-250, fosfatna kiselina ($\varphi=0,02$) i 100 g dm⁻³ amonijevog sulfata, otapanjem 2 g CBB G-250, 200 g amonijevog persulfata, uz dodatak 47 ml 85% H₃PO₄ i 1500 ml Milli Q vode u odmjernoj tikvici od 2000 ml, miješanjem na magnetskoj miješalici. Po otapanju tikvica je nadopunjena na volumen.

Za bojanje gelova pripremljena je radna otopina boje miješanjem matične otopine i metanola u omjeru 4/1 v/v, u kojoj su potom gelovi istovremeno fiksirani i bojani preko noći uz lagano protresivanje, nakon čega je višak boje otklonjen višekratnim ispiranjem destiliranom vodom. Gelovi su potom pohranjeni na 2-8 °C u 0,34 mol dm⁻³ vodenoj otopini ledene octene kiseline pripremljenoj miješanjem 20 ml ledene octene kiseline sa 980 ml Milli Q vode.

3.3.3.2. Vizualizacija proteina nekoloidnom CBB bojom

Nakon SDS-PAGE razdvajanja proteina gelovi su fiksirani inkubacijom u otopini za fiksiranje (pripremljena je miješanjem 250 ml metanola, 50 ml ledene octene kiseline i 200 ml Milli Q vode) 1 h uz protresivanje na sobnoj temperaturi. Potom su gelovi prebačeni u otopinu za bojanje, gdje su inkubirani 10 min uz protresivanje na sobnoj temperaturi. Otopina za bojanje (0,5 g dm⁻³ Coomassie Brilliant Blue R-250 u otopini za fiksiranje) pripremljena je otapanjem 0,125 g CBB R-250 u 250 ml otopine za fiksiranje.

Suvišak boje otklonjen je inkubacijom gelova u otopini za odbojavanje (pripremljena miješanjem 10 ml metanola, 7 ml ledene octene kiseline i 83 ml Milli Q vode) 2 h na sobnoj temperaturi uz protresivanje. Gelovi su potom višestruko isprani destiliranom vodom i pohranjeni na 2-8 °C u 0,34 mol dm⁻³ vodenoj otopini ledene octene kiseline pripremljenoj miješanjem 20 ml ledene octene kiseline sa 980 ml Milli Q vode.

3.3.3.3. Vizualizacija proteina srebrom

Vizualizacija proteina uzoraka razdvojenih 2-DE tehnikom, kod kojih je ukupna količina proteina bila manja od 300 µg, provedena je bojanjem srebrom.

Po završetku 2-DE gelovi su preko noći inkubirani uz protresivanje u otopini za fiksiranje koja je pripremljena miješanjem 400 ml etanola, 100 ml ledene octene kiseline i 500 ml Milli Q vode. Nakon uklanjanja vršne otopine, gelovi su isprani inkubiranjem dva puta po 20 min u vodenoj otopini etanola ($\phi=0,3$) koja je pripremljena miješanjem 600 ml etanola i 1400 ml Milli Q vode, nakon čega su isprani inkubiranjem 20 min uz protresivanje u Milli Q vodi. Kako bi se uklonile eventualne nečistoće, koje bi mogle rezultirati nespecifičnim bojanjem, gelovi su inkubirani 2 min u otopini 1,2 mmol dm⁻³ natrijevog tiosulfata (pripremljena otapanjem 0,2 g natrijevog tiosulfata na ukupni volumen od 1000 ml Milli Q vode), nakon čega su isprani inkubiranjem u Milli Q vodi tri puta po 1 min. Bojanje je provedeno inkubacijom u 11,8 mmol dm⁻³ vodenoj otopini srebrovog nitrata (pripremljena otapanjem 2 g srebrovog nitrata na ukupni volumen od 1000 ml Milli Q vode), te su potom isprani od suviška boje inkubiranjem u Milli Q vodi tri puta po 1 min. Otopina za razvijanje (8,7 mmol dm⁻³ natrijev karbonat i 22 mmol dm⁻³ formaldehid) pripremljena je neposredno prije upotrebe otapanjem 60 g natrijevog karbonata u 1000 ml Milli Q vode uz dodatak 2 ml otopine formaldehida ($\phi=37\%$) u odmjernoj tikvici od 2000 ml. Nakon otapanja tikvica je nadopunjena Milli Q vodom na volumen. Gelovi su inkubirani u otopini za razvijanje uz protresivanje do zamućenja otopine, nakon čega je otopina bačena te je dodana nova količina otopine za razvijanje do željenog obojenja proteinskih točaka. Kako bi se reakcija razvijanja boje zaustavila, gelovi su nakon ispiranja, inkubiranjem 1 min u Milli Q vodi, prebačeni u kadu s otopinom za zaustavljanje razvijanja boje (0,3 mmol dm⁻³ dinatrijev etilendiamintetraacetat) koja je pripremljena otapanjem 15 g dinatrijevog etilendiamintetraacetata u 800 ml Milli Q vode u odmjernoj tikvici od 1000 ml na magnetskoj miješalici, a nakon otapanja odmjerna tikvica je nadopunjena na volumen. Zaustavljene

bojanja provedeno je inkubacijom 10 min uz protresivanje, a potom su gelovi, nakon uklanjanja otopine za zaustavljanje, višestruko isprani destiliranom vodom i pohranjeni na 2-8 °C u 0,34 mol dm⁻³ vodenoj otopini ledene octene kiseline pripremljenoj miješanjem 20 ml ledene octene kiseline sa 980 ml Milli Q vode.

3.4. PRIPREMA UZORAKA PROTEINA IZ GELA ZA MS ANALIZU

Identifikacija proteina provedena je pristupom odozdol nagore tj. očitavanje slijeda aminokiselina proteinu pripadajućih peptida. Analizirani su proteolitički peptidni fragmenti dobiveni enzimskom odgradnjom pojedinačnih proteina nakon elektroforetskog razdvajanja u gelu (poglavlje 3.3.).

Nakon bojanja, gelovi su snimljeni i denzitometrijski analizirani uređajem za analizu gelova (VersaDoc Imaging System, model 4000). Vrijeme ekspozicije iznosilo je 10 sekundi. Budući da će se u disertaciji razmatrati učinak kemijskih reagensa na fragmentaciju peptida u CID eksperimentima, izbor proteinskih točaka ili vrpca je bio nasumičan.

Proteinske točke (iz 2-D gela) ili proteinske vrpce (iz 1-D gela) ručno su izrezane iz gela, te su potom komadići gela odbojani.

3.4.1. Odbojavanje odabranih proteinskih točki ili vrpca

Odstranjivanje CBB boje

Izrezani komadići gela obojanog CBB bojom (G-250 ili R-250) inkubirani su u čiste 1,5 ml plastične epruvete sa 300 µl otopine za odbojavanje pripremljene miješanjem 100 ml ledene octene kiseline, 400 ml metanola i 500 ml Milli Q vode. Odbojavanje je provedeno inkubacijom 3h (ili do nestanka plavog obojenja) na termomiješalici uz protresivanje na 1000 rpm pri temperaturi od 40 °C.

Odstranjivanje srebra

Izrezani komadići gela obojanog srebrovim nitratom inkubirani su u čiste 1,5 ml plastične epruvete sa 300 µl otopine za odbojavanje pripremljene otapanjem 400 mg kalijevog heksacijanoferata i 1000 mg natrijevog sulfata u 80 ml Milli Q vode. Komadići su inkubirani

5 min u otopini za odbojavanje, odnosno do potpunog nestanka smeđeg obojenja i pojavljivanje žute boje gela. Potom su komadići višekratno ispirani Milli Q vodom do potpunog nestanka žute boje.

3.4.2. Enzimska odgradnja proteina u gelu

Nakon odbojavanja (od CBB boje ili srebrovog nitrata) otopina za odbojavanje (ukoliko se radi o gelovima bojanim CBB bojom) ili Milli Q voda (ukoliko se radi o gelovima bojanim srebrovim nitratom) je uklonjena pomoću pipete. U epruvetu s komadićem gela dodano je 300 μl otopine amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mmol dm^{-3} , ($\text{pH}=7,8$), te je sve inkubirano na sobnoj temperaturi 5 minuta uz protresanje na 700 rpm, u termomiješalici. Otopina je uklonjena pipetom, te je postupak ponovljen još dva puta, s time da je po zadnjem dodatku otopine, uzorak inkubiran 30 minuta.

Zatim je vršna otopina uklonjena, te je svakom uzorku dodano 300 μl otopine 50 mmol dm^{-3} NH_4HCO_3 i acetonitrila volumnih omjera 1:1 (pripremljena miješanjem 200 ml amonijevog hidrogenkarbonata koncentracije 50 mmol dm^{-3} , ($\text{pH}=7,8$) i 200 ml acetonitrila), te su uzorci inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi u termomiješalici, uz protresivanje na 700 rpm. Nakon uklanjanja otopine, uzorcima je dodano po 10 μl acetonitrila, te su inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi u termomiješalici, uz protresanje na 700 rpm, nakon čega se komadić gela skupio i pobijelio. Otopina je uklonjena, a komadići gela osušeni su uparivanjem na vakuumskoj centrifugi.

Komadići gela prebačeni su u plastične epruvete te im je dodano 10 μl otopine tripsina koncentracije 0,02 mg dm^{-3} u 25 mmol dm^{-3} amonijevom hidrogenkarbonatu ($\text{pH}=7,8$) koja je pripremljena otapanjem matične otopine tripsina koncentracije 1 mg dm^{-3} u 25 mmol dm^{-3} amonijevom hidrogenkarbonatu ($\text{pH}=7,8$). Uzorci su inkubirani 18 h na 37 °C u termomiješalici uz protresivanje na 400 rpm.

3.4.3. Izolacija triptičkih peptida iz gela

Nakon proteolize u gelu, 10 μl proteolitičkog pufera prebačeno je u čiste 1,5 ml plastične epruvete i upareno na vakuumskoj centrifugi. Na komadiće gela dodano je po 10 μl ekstrakcijske otopine (pripremljena miješanjem 500 μl 650 mmol dm^{-3} vodene otopine trifluoroctene kiseline i 500 μl acetonitrila), te su komadići gela inkubirani 30 min u sonikacijskoj kupelji na 25 °C. Zatim su ostavljeni u termomiješalici 15 minuta na sobnoj temperaturi uz protresivanje na 600 rpm. Ekstrakcijska otopina dodana je na pripadajući

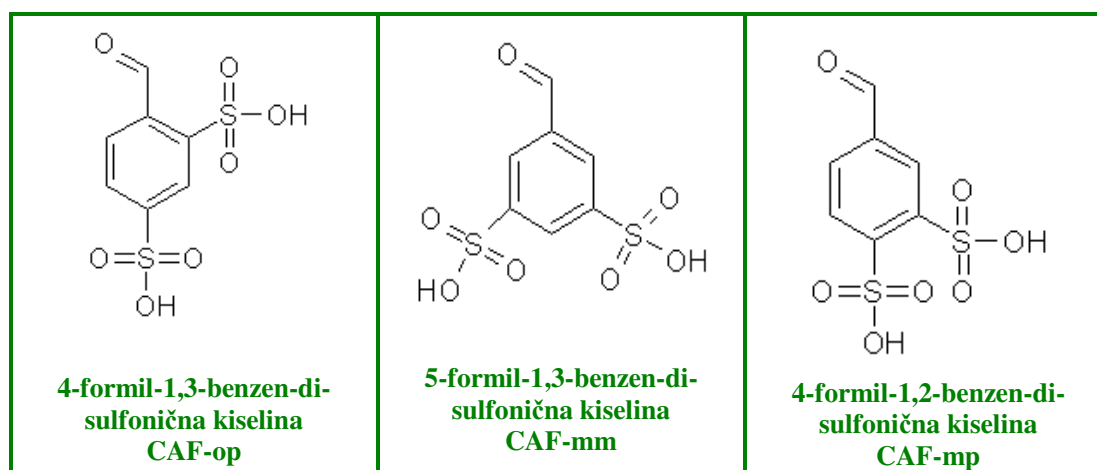
upareni proteolitički puferi, te je sve zajedno upareno na vakuumskoj centrifugi. Nakon sušenja uzorci su otopljeni u 10 μl 13 mmol dm^{-3} vodene otopine trifluoroctene kiseline.

3.4.4. Pročišćavanje peptida tehnikom ZipTip C4

Nastavak ZipTip C₄ kolone stavljen je na pipetor i ispran tri puta sa po 10 μl otopine 1, (15,1 mol dm^{-3} acetonitril i 13 mmol dm^{-3} trifluoroctena kiseline), zatim tri puta sa po 10 μl otopine 2 (9,4 mol dm^{-3} acetonitril i 13 mmol dm^{-3} trifluoroctena kiseline), te na kraju tri puta sa po 10 μl otopine 3 (13 mmol dm^{-3} trifluoroctena kiseline). Zatim su proteini iz uzorka vezani na kolonu ispiranjem ZipTip nastavka sa po 10 μl uzorka razrijeđenog u 13 mmol dm^{-3} vodene otopine trifluoroctene kiseline (otopina 3). Onečišćenja i soli koja su se također s proteinima vezala na kolonu uklonjena su ispiranjem pet puta sa po 10 μl otopine 3. Zatim su proteini isprani s kolone sa 10 μl otopine 3 u čistu 1,5 ml plastičnu epruvetu, te je peptidni eluat potom osušen u vakuumskoj centrifugi.

3.4.5. Obilježavanje peptida CAF reagensima

Obilježavanje N-kraja peptida provedeno je sa tri različita reagensa. Od toga je jedan komercijalno dostupna 4-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina dinatrijeva sol hidrat (CAF-op), a dva su sintetizirana u Laboratorij za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković: 5-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina (CAF-mm) i 4-formil-1,2-benzen-di-sulfonična kiselina (CAF-mp). Prikaz struktura CAF reagensa dan je na slici 3.1.



Slika 3.1. Kemijske strukture CAF reagensa: CAF-op, CAF-mm i CAF-mp Obilježavanje peptida sa svakim od tri reagensa sa aldehidnom reaktivnom skupinom (CAF-op, CAF-mm i CAF-mp) provedeno je na jednak način.^{134, 135}

Na smjesu do suha uparenih odsoljenih i ukoncentriranih peptida dodano je 20 μl otopine za obilježavanje. Otopina za obilježavanje sadrži 1 g dm^{-3} pojedinog reagensa (CAF-op, CAF-mm ili CAF-mp) i 4 g dm^{-3} natrijevog cijanoborhidrida u 10 mmol dm^{-3} kalijevom hidrogenfosfatnom puferu (pH=4,0).

Takva smjesa peptida potom je inkubirana 24 h na temperaturi od 2-8 °C, nakon čega je smjesa peptida pročišćena tehnikom ZipTip C4 tehnikom (poglavlje 3.4.4.).

3.5. RAZDVAJANJE PEPTIDA TEHNIKOM TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE

3.5.1. Odgradnja proteina staničnog ekstrakta tripsinom

Nakon određivanje koncentracije proteina u staničnim ekstraktima (priprema opisana u poglavlju 3.2.1.), količini od oko 100 μg ukupnih proteina dodano je 4 μl matične otopine tripsina masene koncentracije 1 mg dm^{-3} . Smjesa je inkubirana 3 h u termomiješalici na 37 °C uz protresivanje na 750 rpm.

3.5.2. Obilježavanje smjese peptida CAF reagensima

Obilježavanje N-kraja peptida provedeno je sa dva različita reagensa. To su 4-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina dinatrijeva sol hidrat (CAF-op reagens) i 5-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina (CAF-mm reagens).

Obilježavanje peptida sa oba reagensa provedeno je na jednak način.

Nakon tripsinolize ukupnih proteina staničnih lizata (poglavlje 3.5.1.) u 20 μl nastale smjese peptida dodano je 100 μl otopine za obilježavanje CAF reagensima 2. Otopina je po sastavu 30 mmol dm^{-3} željenog CAF reagens (CAF-op ili CAF-mm reagens) i 200 mmol dm^{-3} natrijevog cijanoborhidrida u 3 mmol dm^{-3} kalijevom hidrogenfosfatnom puferu (pH=4,0).

3.5.3. Kromatografski parametri

Razdvajanje i pročišćavanje peptida dobivenih tripsinolizom ukupnih proteina stanične kulture provedeno je kromatografijom obrnutih faza na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (RP-HPLC, engl. *Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography*). Detaljni kromatografski parametri dani su u tablici 3.5.

Tablica 3.5. Kromatografski parametri za razdvajanje smjese peptida tekućinskom kromatografijom obrnutih faza

Uzorak	1. smjese peptida nastalih tripsinolizom staničnog ekstrakta proteina 2. smjese peptida (nastalih tripsinolizom staničnog ekstrakta proteina) obilježenih CAF reagensima		
Volumen injektirana uzorka / μl	40		
Temperatura uzoraka / $^{\circ}\text{C}$	5		
Kromatografski stupac	Waters XBridge BEH300, punilo: C4, dimenzije: ID=4,6 mm, l=50 mm		
Temperatura kromatografskog stupca / $^{\circ}\text{C}$	30		
Pokretna faza A	13 mmol dm ⁻³ trifluoroctena kiselina		
Pokretna faza B	15,1 mol dm ⁻³ acetonitril, 13 mmol dm ⁻³ trifluoroctena kiselina		
Protok pokretne faze / ml min⁻¹	0,8		
Prikaz promjene gradijenta u vremenu	Vrijeme / min	% pokretne faze A	% pokretne faze B
	0	95	5
	5	95	5
	20	39	61
	35	0	100
	40	95	5
	45	95	5
Detekcija	neobilježeni peptidi – UV/VIS-DAD, Apsorbancija pri $\lambda=280$ nm peptidi obilježeni CAF-reagensima – UV/VIS-DAD, Apsorbancija pri $\lambda=254$ nm		

Kolona nepokretne faze C4 proizvođača Waters, tipa kolone XBridge BEH300 i veličinom čestica punila od 3,5 μm te dimenzijama stupca 4,6 mm, unutarnjeg promjera i 150 mm duljina stupca.

Na kromatografski stupac nanese 40 μl uzorka smjese peptida nastalih tripsinolizom proteinskog ekstrakta stanice (poglavlje 3.5.1.) ili 40 μl uzorka smjese peptida, koji su nakon tripsinolize proteinskog ekstrakta stanice obilježeni CAF reagensima (poglavlje 3.5.2.).

Razdvajanje i elucija peptida provedeno je gradijentno, korištenjem smjese različitih omjera pokretnih faza A i B. Pokretna faza A je po sastavu 13 mmol dm^{-3} trifluorooktana kiselina, a pokretna faza B je po sastavu 15,1 mol dm^{-3} acetonitril i 13 mmol dm^{-3} trifluorooktana kiselina. Kromatografski uvjeti gradijentnog razdvajanja dani su u tablici 3.5. (gradijentna tablice) zajedno sa ostalim kromatografskim parametrima.

Razdvajanje i elucija provedeni su uz nepromijenjen protok pokretne faze od 0,8 ml min^{-1} . Prilikom kromatografskog razdvajanja stacionarna faza kromatografskog stupca temperirana je na stalnoj temperaturi od 30 $^{\circ}\text{C}$, a uzorci na stalnoj temperaturi od 5 $^{\circ}\text{C}$.

Detekcija kromatografskih pikova neobilježenih peptida izvršena je mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 280 nm. Prilikom detekcije definirana je širina vrpce od 4 nm, a kao referentni signal mjerena je apsorbancija pri $\lambda=450$ nm uz širinu vrpce od 80 nm.

Detekcija kromatografskih pikova peptida obilježenih CAF reagensima izvršena je mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini 254 nm. Prilikom detekcije definirana je širina vrpce od 4 nm, a kao referentni signal mjerena je apsorbancija pri $\lambda=450$ nm uz širinu vrpce od 80 nm.

3.5.4. Priprema uzoraka za MS analizu

Automatski sakupljač frakcija podešen je na način da sakuplja frakcije eluata nakon prolaska kroz kromatografski stupac i ćeliju detektora od 14. do 29. minute razdvajanja i to svakih 12 sekundi. Volumen svake frakcije je iznosio 160 μl .

Na ovaj način je od jednog uzorka proteinskog ekstrakta stanice dobiveno deset uzoraka smjese peptida nastalih tripsinolizom proteinskog ekstrakta stanice.

Svaka od deset frakcija uparena je do suha korištenjem vakuum centrifuge.

3.6. ANALIZA PEPTIDA TEHNIKAMA SPEKTROMETRIJE MASA

Na smjesu do suha uparenih i ukoncentriranih peptida (obilježenih ili neobilježenih) dodano je 2 μ l otopine CHCA matrice te je smjesa nanescena na MALDI pločicu i ostavljena da se osuši na zraku.

Postupci pripreme do suha uparenih i ukoncentriranih peptida opisani su u poglavljima 3.4.4., 3.4.5., i 3.5.4.

Peptidi su analizirani MALDI/TOF-TOF instrumentom (Applied Biosystems model 4800 plus), koji je opremljen pulsnim Nd:YAG laserom (Nd:YAG, engl., *neodymium-doped: yttrium aluminium garnet*; $Nd:Y_3Al_5O_{12}$; neodimij ugrađen u kristal itrij aluminij garnet) s frekvencijom pulsa od 200 Hz i emitiranom svjetlošću valne duljine 355 nm.

MS i MS/MS analize neobilježenih peptida provedene su samo u pozitivnom načinu rada spektrometra masa.

MS i MS/MS analize peptida obilježenih CAF reagensima provedene su u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa.

Za internu kalibraciju MS spektara snimljenih u pozitivnom načinu rada spektrometra masa korišteni su signali peptida nastalih autolizom tripsina (tablica 3.6.).

MS spektri u pozitivnom načinu rada snimljeni su u m/z području od 800 do 4 000.

Tablica 3.6. Interni MS kalibranti u pozitivnom načinu rada spektrometra masa.

Signali peptida nastalih autolizom tripsina	
Teoretski izračunata monoizotopna masa [M + H] ⁺ iona / Da	Molekulska formula
842,5094	C44H73N11O17S2
1045,5636	C50H82N14O22S2
2211,1040	C103H157N27O39S2
3161,4957	C142H223N35O52S5

MS spektri u negativnom načinu rada spektrometra masa snimljeni su samo za smjese peptida obilježenih nekim od triju CAF reagensa. Sva tri CAF reagensa imaju jednaku molekulsku formulu (C7H6O7S2), te nakon postupka obilježavanja bilo kojim od CAF reagensa, peptidi dobivaju inkrement mase od 249,9611 Da. Za internu kalibraciju MS spektra snimljenih u

negativnom načinu rada spektrometra masa korišteni su signali nekog od CAF reagensa obilježenih peptida nastalih autolizom tripsina (tablici 3.7.).

Tablica 3.7. MS kalibranti u negativnom načinu rada spektrometra masa.

Signali peptida nastalih autolizom tripsina	
Teoretski izračunata monoizotopna masa [M - H] ⁻ iona / Da	Molekulska formula
1090,4544	C ₄₄ H ₇₃ N ₁₁ O ₁₇ S ₂
1293,5086	C ₅₀ H ₈₂ N ₁₄ O ₂₂ S ₂
2459,0490	C ₁₀₃ H ₁₅₇ N ₂₇ O ₃₉ S ₂
3409,4407	C ₁₄₂ H ₂₂₃ N ₃₅ O ₅₂ S ₅

Kao eksterni kalibrant za kalibraciju MS/MS spektara korištena je smjesa peptida nastalih autolizom tripsina, točnije MS/MS spektar triptičkog autolitičkog fragmenta T3 (slijed aminokiselina: LGEHNIDVLEGNEQFINAAK). Eksterna kalibracija provedena je svaki put prije i nakon seta uzastopnog snimanja 200 MS/MS spektara snimanjem MS/MS spektara kalibranta.

Kao ion prekursor za MS/MS analizu u pozitivnom načinu rada korišten je m/z 2211 (u slučaju rada sa neobilježenim peptidima), koji odgovara jednostruko protoniranom molekulskom ionu neobilježenog triptičkog autolitičkog fragmenta T3 ili m/z 2461 (u slučaju rada sa CAF reagensom obilježenim peptidima), koji odgovara jednostruko protoniranom molekulskom ionu triptičkog autolitičkog fragmenta T3 obilježenog CAF reagensom.

Kao ion prekursor za MS/MS analizu u negativnom načinu rada korišten je m/z 2459, koji odgovara jednostruko deprotoniranom molekulskom ionu triptičkog autolitičkog fragmenta T3 obilježenog CAF reagensom.

U tablici 3.8. dani su signali korišteni za provedbu eksterne kalibracije u svakom od tri specifična slučaja.

Tablica 3.8. MS/MS kalibranti u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa.

Triptički autolitički fragment T3 – sekvenca: LGEHNIDVLEGNEQFINAAK		
Prekursori MS/MS pozitiv - 2211 $[M + H]^+$ ili 2461 $([M_{CAF} + H])^+$		
Prekursor MS/MS negativ - 2459 $[M_{CAF} - H]^-$		
Teoretski izračunata monoizotopna masa iona / Da (ion)		
MS/MS pozitiv prekursor m/z 2211	MS/MS pozitiv prekursor m/z 2461	MS/MS negativ prekursor m/z 2459
551,2572 (b_5)	663,3824 (y_6)	548,1003 (b_4)
663,3824 (y_6)	1091,5480 (y_{10})	912,2862 (b_7)
1091,5480 (y_{10})	1333,6747 (y_{12})	1239,4657 (b_{10})
1120,5633 (b_{10})	1774,8970 (y_{16})	1796,6738 (b_{15})
1808,8814 (b_{16})	2098,0200 (y_{19})	2170,8692 (b_{18})

Za eksternu kalibraciju MS/MS spektara u pozitivnom načinu rada korišteni su signali b- i y-iona neobilježenog triptičkog fragmenta T3 (tablica 3.8.)

Za eksternu kalibraciju MS/MS spektara u negativnom načinu rada korišteni su signali CAF reagensom obilježenih b-iona triptičkog fragmenta T3 (tablica 3.8.)

MS/MS analiza peptida u pozitivnom načinu rada provedena je uz prisutnost inertnog plina, koji pospešuje koliziju peptidnih iona u kolizijskoj ćeliji (engl. *CID on*) i uz energiju kolizije od 1 keV.

MS/MS analiza u negativnom načinu rada provedena je bez prisutnosti inertnog plina u kolizijskoj ćeliji (engl. *CID off*) uz kolizijsku energiju od 1 keV.

Detaljni pregled parametara analize peptida spektrometrom masa MALDI TOF/TOF dani su u tablici 3.9.

Tablica 3.9. Parametri MALDI TOF/TOF analize

Tip analize	MS	MS	MS/MS	MS/MS
Parametar	pozitiv	negativ	pozitiv	negativ
Detekcija iona	Pozitivna	Negativna	Pozitivna	Negativna
Ionsko zrcalo	Reflektron	Reflektron	Reflektron	Reflektron
Broj snimaka po spektru	1000	1000	2000	2000
Raspon masa / Da	800-4000	800-4000	9-3833	9-3833
Vrijeme odziva / ns	500	500	400	400
Kolizijska energija /keV	/	/	1	1
Zrak u kolizijskoj ćeliji	/	/	DA	NE

3.7. IDENTIFIKACIJA PROTEINA

Identifikacija proteina provedene je pretragom NCBIInr baze podataka i sekvenciranjem *de novo*.

3.7.1. Pretraživanje baza podataka u svrhu identifikacije proteina

Na temelju dobivenih MS i MS/MS spektara, NCBIInr baza podataka pretraživana je uporabom specijaliziranog pretraženog algoritma MASCOT (v 2.1), koji je ugrađen u ProteinPilot programski paket (v 4.5).

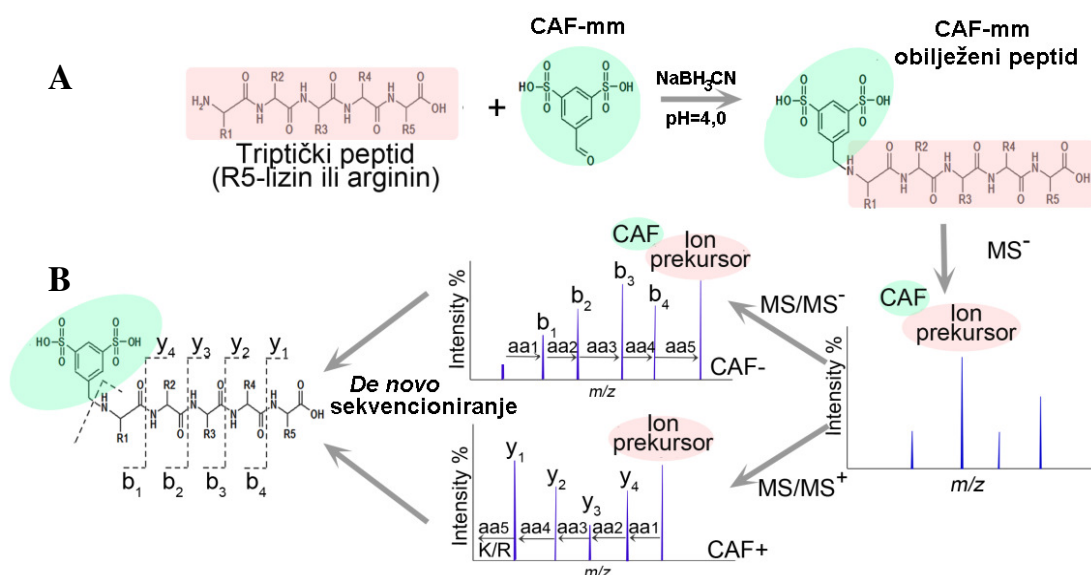
Pretraga baze podataka je klasičan postupak identifikacije proteina. Pretraga se vrši usporedbom liste pikova dobivene MS i MS/MS analizom sa *in silico* načinjenim listama pikova.

Proteomska baza podataka općenito se može definirati kao dvije *in silico* načinjene liste. To su *in silico* MS lista i *in silico* MS/MS lista pikova. *In silico* MS lista sadrži teoretske mase peptida nastalih enzimskom odgradnjom svih proteina u bazi podataka. *In silico* MS/MS lista sačinjena je od svih teoretskih masa produktnih iona nastalih fragmentacijom pojedinog *in silico* peptida (nastao *in silico* enzimskom odgradnjom svih proteina u bazi podataka).

MASCOT algoritam daje kao rezultat, postotak preklapanja eksperimentalne liste pikova sa *in silico* listom pojedinih proteina, uz statističke značajke signifikantnosti navedenog preklapanja. Odnosno, za svaki pronađeni protein daje vrijednost vjerojatnosti pronalaska tzv. *score*. *Score* je definiran kao $-10 \times \log(P)$ gdje je P vjerojatnost da je nađeni protein tj. nađeno preklapanje slučajan događaj. Statistički značajni rezultati (p vrijednost $< 0,05$) su pronalasci sa *score* vrijednostima većim od 58, a moguća je i redefinicija minimalne vrijednosti *score* u ovisnosti o kvaliteti ulaznih podataka.¹¹⁴

3.7.2. CAF⁻/CAF⁺ postupak identifikacije proteina manualnim sekvenciranjem peptida *de novo*

Metoda CAF-/CAF+ uključuje obilježavanje peptide ili proteina s reagensima koji sadrže dvije ili više sulfonske skupine i reaktivnu grupu koja ima sposobnost vezanja na amino grupu N-kraja proteina/peptida (slika 3.2.A.).¹³⁶ Postupak obilježavanja opisan je u poglavljima 3.4.5. i 3.5.2.



Slika 3.2. Iščitanje peptidne sekvence *de novo* tehnikom CAF⁻/CAF⁺ nakon analize spektrometrijom masa; A) Obilježavanje triptičnih peptida s 5-formil-1,3 di-sulfoničnom kiselinom (reduktivna aminacija) pod kontroliranim uvjetima pH (pH=4,0) selektivne redukcije (NaBH₃CN); B) Sekvenciranje peptida *de novo* iz MS/MS negativnog spektra (MS/MS⁻; ioni b-serije) i MS/MS pozitivnog spektra (MS/MS⁺; ioni y-serije)¹³⁶

Određivanje aminokiselinskog slijeda peptida provedeno je ručnom interpretacijom MS/MS spektara CAF reagensima obilježenih peptida (slika 3.2.B).

Iz spektara MS/MS spektara snimljenih u negativnom i pozitivnom načinu rada instrumenta iščitano je slijed aminokiselina na temelju razlike u masama između konsekvativnih signala istovrsne serije uzimajući u obzir monoizotopne mase aminokiselinskih rezidua (tablica 2.2 na str. 38). Izbor konsekvativnih signala proveden je vizualno prema kriteriju najintenzivnijih signala. Za interpretaciju spektra korišten je i specijalizirani novorazvijeni računalni algoritam

Bioutil. Algoritam daje kombinaciju aminokiselina koja odgovara određenoj rezidualnoj masi što je osobito korisno u slučajevima kada izostaje fragmentni ion za određenu aminokiselinu. Smjerom iščitavanja od N- prema C-kraju peptida dobiva se niz aminokiselina s lijeva na desno u MS/MS spektru u negativnom načinu rada spektrometra masa, odnosno s desna na lijevo u MS/MS spektru u pozitivnom načinu rada spektrometra masa.

Nakon iščitavanja aminokiselinskih sekvenci peptida *de novo*, sekvence dobivene iz MS/MS negativ i MS/MS pozitiv spektara su preklapljene. Uz pomoć preklapljenih dijelova aminokiselinskih sljedova (slijed očitani u negativu i potvrđeni u pozitivu), pretražena je baza podataka NCBIInr uz korištenje programskog alata BLASTp (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*), koji je dostupan na <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.¹²⁷

Ukoliko je u slijedu iščitana aminokiselina, odnosno masa rezidue 113, što može odgovarati aminokiselinama izoleucin i leucin, u BLASTp pretraživač upisano je X.

Pretraživanje se vršilo na potpunoj NCBIInr bazi podataka.

Proteini koji sadrže slijed koji se u potpunosti preklapa sa slijedom iščitanim iz MS/MS spektra su se uzimali u obzir za daljinu provjeru i identifikaciju. Za svaki peptid s potpunim preklapanjem iščitane sekvence sa sekvencom peptida unutar pronađenog proteina u bazi podataka dodatno je provjereno da li masa teoretskog proteolitičkog fragmenta odgovara eksperimentalno dobivenoj masi peptida, odnosno masi iona prekursora. Protein koji zadovoljava sve navedene uvjete je uzet kao pozitivan pronalazak.

Ukoliko niti jedan protein ne sadržava iščitanu aminokiselinsku sekvencu, pokušale su se utvrditi mutacije ili pogreške u anotaciji genomske sekvence.

3.7.3. CAF/CAF⁺ postupak identifikacije proteina automatskim sekvenciranjem peptida *de novo*

Za automatsko sekvenciranje peptida *de novo* obilježenih CAF reagensima razvijen je programski paket ProteinReader u suradnji Instituta Ruđer Bošković i Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.¹³⁷

Ovaj specijalizirani programski paket posjeduje poseban *de novo* algoritam. *De novo* algoritam je opcija ProteinReader programskog paketa, koja u potpunosti zamjenjuje manualan način identifikacije proteina *de novo*. Algoritam najprije računa sve moguće međusobne razlike m/z detektiranih signala u spektru i to za sve signale s omjerom signala prema šumu većim od 3; ($S/N > 3$). Za svaki signal $S/N > 3$ algoritam će izračunati razlike m/z

izabranog signala sa signalima detektiranim unutar m/z prozora ± 186 (najveća masa aminokiselinskog rezidua; triptofan). Dobivenim razlikama algoritam pripisuje aminokiselinu na temelju masa aminokiselinskih rezidua (tablica 2.2. na str. 38).

Između različitih mogućih iščitanih sljedova aminokiselina algoritam provodi vrednovanje na temelju relativnih intenziteta signala koji su upotrjebljeni za iščitavanje sekvence. Najvjerojatnija sekvenca, odnosno sekvenca kojoj algoritam dodjeljuje najveći *score* je ona kojoj je zbroj relativnih intenziteta signala uzetih za iščitavanje sekvence najveći.

Kada očita sekvence iz MS/MS negativa i MS/MS pozitivna algoritam pretražuje NCBIInr bazu putem BLASTp algoritma (koji je ugrađen u Protein Reader programski paket), tražeći slijed aminokiselina koji je očitani i u pozitivu i u negativu, ali i tražeći sljedove očitane zasebno u MS/MS spektru u pozitivnom i zasebno u MS/MS spektru u negativnom načinu rada spektrometra masa.

3.8. KARAKTERIZACIJA FRAGMENTACIJSKOG PUTA PEPTIDA OBILJEŽENIH CAF-mm REAGENSOM

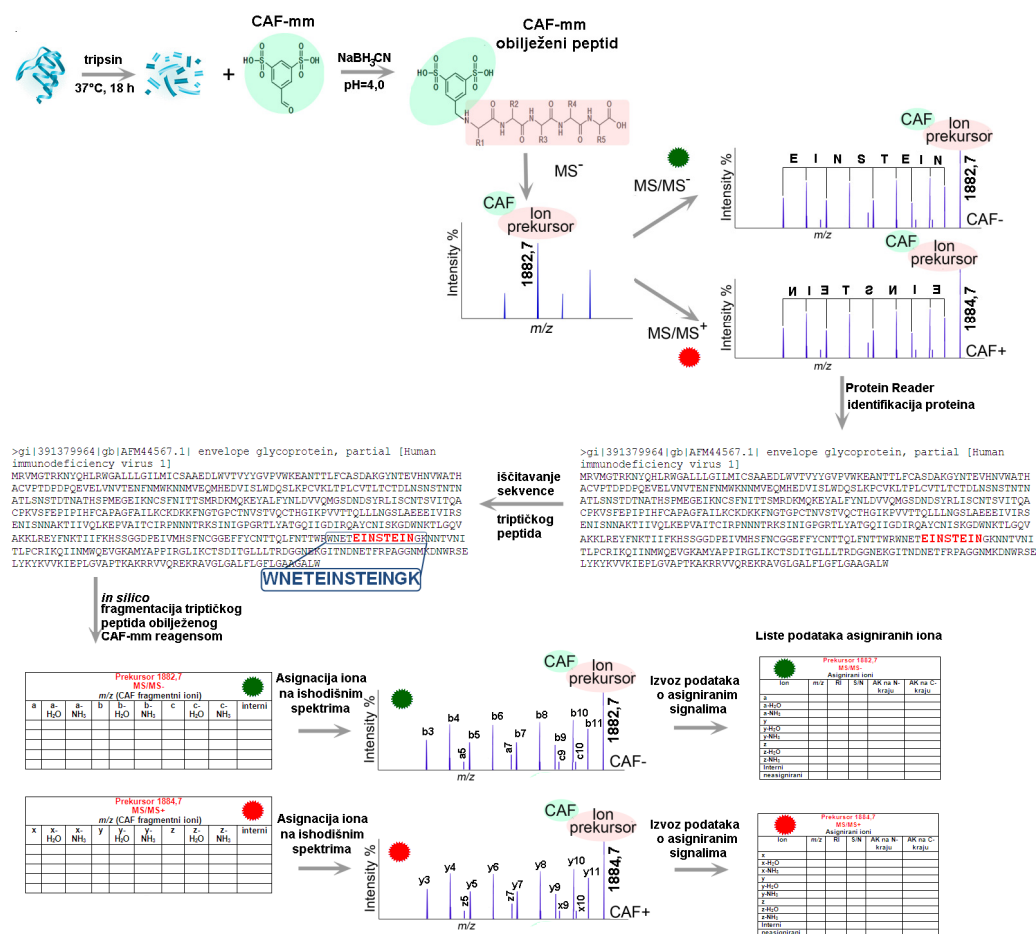
Nakon provedene identifikacije proteina CAF/CAF⁺ postupkom identifikacije proteina uz upotrebu Protein Reader programskog paketa za sekvenciranje peptida *de novo* (postupak opisan u poglavlju 3.7.3.), za svaki učitani MS/MS spektar (u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa), iščitana je potpuna aminokiselinska sekvenca za korišteni ion prekursor.

Naime, pretraga NCBIInr baze podataka (korištenjem BLAST-p algoritma ugrađenog u Protein Reader programski paket) provedena je tražeći slijed aminokiselina očitani u dva spektra (MS/MS⁺ i MS/MS⁻). Očitani slijed najčešće nije potpuna sekvenca peptida, ali je dostatan za identifikaciju proteina. Postupkom iščitavanja iz baze podataka dolazi se do potpunog slijeda aminokiselina u analiziranom triptičkom peptidu (slika 3.2.).

Za iščitavanje sekvence *de novo* dovoljna je prisutnost konsektivnih signala, koji čine seriju fragmentnih ioni y-serije u pozitivnom načinu rada spektrometra masa, odnosno slijed konsektivnih signala koji odgovaraju seriji fragmentnih ioni b-serije u negativnom načinu rada spektrometra masa.

Kako bi se ustanovio fragmentacijski put peptida obilježenih CAF-mm reagensom potrebno je u obzir uzeti sve detektirane signale u MS/MS spektrima snimljenim u pozitivnom (MS/MS⁺) i negativnom (MS/MS⁻) načinu rada spektrometra masa.

Razvijen je programski paket koji provodi *in silico* fragmentaciju triptičkih peptida obilježenih CAF-mm reagensom, te asignaciju *in silico* dobivenih iona sa signalim detektiranim u MS/MS spektrima. Programski paket automatski izvozi dobivene podatke o asigniranim kao i o preostalom neasigniranim signalima iz MS/MS spektara. Također je programski paket u potpunosti povezan sa Protein Reader programskim paketom. Zato je cijeli postupak, od identifikacije proteina i iščitavanja čitave sekvence triptičkog peptida, preko *in silico* fragmentacije iščitane sekvence do mapiranja *in silico* dobivenih fragmenata sa signalima iz ishodišnih MS/MS spektara i izvoženja podataka o asigniranim i neasigniranim signalima potpuno automatiziran. Postupak je detaljno prikazan na slici 3.3.



Slika

3.3. Shematski prikaz postupka asignacije signala u MALDI-TOF MS/MS spektrima (MS/MS⁺; označeno crvenim krugom i MS/MS⁻; označeno zelenim krugom) peptida obilježenih CAF-mm reagensom.

Razvijeni programski paket asignira signale u MS/MS spektrima peptida poznatih sekvenci obilježenih CAF-mm reagensima, pripisujući im vrstu signala i redni broj signala.

Program računa sve teoretske mase iona koje mogu nastati fragmentacijom peptida sekvence S koji se sastoji od aminokiselina $a_1, a_2, a_3 \dots$ do a_n . Za bilo koji fragmentni ion koji sadrži originalni N-kraj peptida (fragmentni a-, b- i c-ion) i završava na poziciji k (k je broj od 1 do $n-1$ i označava redni broj aminokiseline u sekvenci peptida S) masa ion M_k^N računa se prema izrazu:

$$M_k^N = \sum_{i=1}^k m(a_i) \pm H + 247,9499 + \Delta$$

Gdje je k redni broja serije iona sa originalnim N-krajem (a-, b- ili c-ion), $m(a_i)$ je masa aminokiselinskog rezidua na poziciji i , H je masa vodika (1,0078 Da) koju je potrebno oduzeti ukoliko se asigniraju ioni iz MS/MS^- spektra, odnosno dodati za signale iz MS/MS^+ spektra, 247,9499 je inkrement mase zbog obilježavanja CAF-mm reagensom i Δ dodatak mase za pojedini tip iona. Tako je za b-ione $\Delta=0$, za a-ione $\Delta=-27,995$, a za c-ione $\Delta=17,0265$.

Za fragmentni ion koji sadrži originalni C-kraj peptida (fragmentni x, y i z-ioni) i završava na poziciji j (j je broj od 2 do n i označava redni broj aminokiseline u sekvenci peptida S) masa ion M_j^C računa se prema izrazu:

$$M_j^C = \sum_{i=2}^j m(a_i) \pm H + O + \Delta$$

Gdje je j redni broja serije iona sa originalnim C-krajem (x-, y- ili z-ion), $m(a_i)$ je masa aminokiselinskog rezidua na poziciji i , H je masa vodika (1,0078 Da) koju je potrebno oduzeti ukoliko se asigniraju ioni iz MS/MS^- spektra, odnosno dodati za signale iz MS/MS^+ spektra, O je masa kisika (16,0010 Da) i Δ dodatak mase za pojedini tip iona. Tako je za y-ione $\Delta=2,0156$, za x-ione $\Delta=27,995$, a za z-ione $\Delta=-12,995$.

Masa internih-iona nastalih unutarnjom fragmentacijom peptida koji počinju na poziciji j ($j=2, \dots, n-2$) i završavaju na poziciji h ($h=3, \dots, n-1$) računa se prema izrazu:

$$M_{j..h}^I = \sum_{i=j}^h m(a_i) \pm H$$

Gdje je j redni broja aminokiseline s kojom ion započinje (N-kraj ion) a j redni broj s kojom interni ion završava (C-kraj ion), $m(a_i)$ je masa aminokiselinskog rezidua na poziciji i , H je

masa vodika (1,0078 Da) koju je potrebno oduzeti ukoliko se asigniraju ioni iz MS/MS⁻ spektra, odnosno dodati za signale iz MS/MS⁺ spektra.

Za svaki navedeni tip iona (fragmentni a-, b-, c-, x-, y-, z-ioni i interni-ioni) dodatno su još izračunate i mase fragmentnih iona koji nastaju nakon neutralnih gubitaka vode i amonijaka od originalnih fragmentnih iona oduzimajući mase 17,0265 Da i 18,0105 Da redom.

Mase imonij-iona izračunate su oduzimanjem 26,99 Da od svake pojedinačne rezidualne mase aminokiseline.

Asignacija signala na MS/MS spektrima izvršena je za signale detektirane s omjerom signala prema šumu većim od 3 (S/N>3). Lista teoretskih masa fragmentnih iona dobivena *in silico* fragmentacijom triptičkog peptida uspoređena je s listom signala detektiranim s S/N>3 u MS/MS spektru. Signal kojem je očitana masa unutar 0,3 Da od teoretske mase fragmentnog iona asigniran je kao fragmentni ion. Ukoliko su teoretske mase za više različitih fragmentnih iona unutar 0,3 Da u odnosu na detektiranu masu, asignacija je vršena prema do sada objavljenim podacima o učestalosti detekcije fragmentnih iona i to redom: y-, b-, y-NH₃-, y-H₂O-, b-NH₃-, b-H₂O-, a-, a-NH₃-, a-H₂O-, interni-, interni-NH₃, interni-H₂O-ioni.¹³⁷

4. REZULTATI

4.1. SEKVENCIRANJE *DE NOVO*

Kao modelni peptid za opis postupka sekvenciranja *de novo* upotrijebljen je triptički autolitički fragment T3 (slijed aminokiselina: LGEHNIDVLEGNEQFINAAK).

Provedena su četiri zasebna eksperimenta sekvenciranja *de novo* i to na:

1. intaktnom tj. neobilježenom peptidu
2. peptidu koji je prethodno obilježen sa CAF-op reagensom (4-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina)
3. peptidu koji je prethodno obilježen sa CAF-mm reagensom (5-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina), te
4. peptidu koji je prethodno obilježen sa CAF-mp reagensom (4-formil-1,2-benzen-di-sulfonična kiselina)

U tablici 4.1. dani su rezultati *in silico* izračuna mase triptičkih iona nastalih nakon autolize tripsina, koja je provedena upotrebom programskog paketa *Protein Prospector v5.16.0*.¹²⁶

Rezultati uključuju informacije o aminokiselinskim sekvencama autolitičkih fragmenata u nereducirajućim uvjetima, te teoretskim masama jednostruko protoniranih molekulskih iona neobilježenih $[M + H]^+$ peptidnih fragmenta, teoretskim masama jednostruko protoniranih iona peptidnih fragmenta obilježenih CAF reagensom $[M_{CAF} + H]^+$ i teoretskim masama jednostruko deprotoniranih iona peptidnih fragmenta obilježenih CAF reagensom $[M_{CAF} - H]^-$. Podebljano u tablici je označen modelni peptid, triptički autolitički fragment T3.

Tablica 4.1. *In silico* izračun mase triptičkih iona nastalih autolizom tripsina u nereducirajućim uvjetima

Peptidi nastali autolizom tripsina u nereducirajućim uvjetima				
Fragment	Aminokiselinska sekvenca	<i>m/z</i> / Da		
		$[M + H]^+$	$[M_{CAF} + H]^+$	$[M_{CAF} - H]^-$
T1	SR	262,1510	512,1116	510,0959
T2	IQVR	515,6368	765,2906	763,2749
T6	VATVSLPR	842,5094	1092,4700	1090,4544
T5	NKPGVYTK	906,5043	1156,4649	1154,4493
T5	LSSPATLNSR	1045,5636	1295,5242	1293,5086
T3	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK	2211,1040	2461,0646	2459,0490
T4	IITHPNFNGNTLDNDIMLIK	2283,1802	2533,1408	2531,1251
T2,3	APVLSDSCK/SSYPGQITG NMICVGFLEGGK	3161,4957	3411,4558	3409,4407

Kako sva tri CAF reagensa (4-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina, 5-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina i 4-formil-1,2-benzen-di-sulfonična kiselina) imaju istu bruto molekulsku formulu ($C_7H_6O_7S_2$), mase derivatiziranih fragmenata su, bez obzira na korišteni reagens, u sva tri slučaja jednake (tablica 4.1.).

U tablici 4.2. dani su teoretski m/z za nativni triptički autolitički fragment i to za jednostruko protonirani i neobilježeni $[M + H]^+$ i jednostruko deprotonirani i neobilježeni molekulski ion $[M - H]^-$. Također su prikazane i teoretske vrijednosti m/z triptičkih autolitičkih fragmenta T3 obilježenih CAF reagensom (CAF-op, CAF-mm, CAF-mp); i to za jednostruko protonirani $[M_{CAF} + H]^+$ i jednostruko deprotonirani molekulski ion $[M_{CAF} - H]^-$. Tablica daje i prikaz fragmentacije neobilježenog i obilježenog triptičkog autolitičkog fragmenta T3 za dvije osnovne serije fragmentnih iona; b- i y-seriju.

Obilježavanje peptida provodi se na N-kraju peptida zbog čega ioni y-serije koji zadržavaju originalni C-kraj peptida nisu nosioci CAF reagensa i stoga nema razlike u m/z y-iona obilježenog i neobilježenog peptida (tablica 4.2.). S druge strane, kemijskom promjenom peptida na N-kraju obilježeni peptidi dobivaju inkrement mase od 249,9611 m/z . Fragmentacijom nastali b-ioni zadržavaju CAF reagens (CAF-op, CAF-mm ili CAF-mp) na N-kraju. Razlika u jednostruko protoniranog b-iona neobilježenog peptida i jednostruko deprotoniranog b-iona peptida obilježenog CAF reagensima iznosi 247,9499.

Za sve analize korištena je ista smjesa peptida dobivenih autolizom tripsina. Autoliza tripsina provedena je inkubacijom otopine tripsina koncentracije 0,02 mg dm⁻³ u 25 mmol dm⁻³ amonijevom hidrogenkarbonatu (pH=7,8) u trajanju od 18 h na 37 °C u termomiješalici uz protresivanje na 400 rpm. Nakon autolize smjesa autolitičkih produkata razrijeđena je 100 puta Milli Q vodom. Po jedan alikvot od 10 µl (ukupno 4) pročišćen je za svaku analizu Zip Tip tehnikom, te je uparen do suha.

Tablica 4.2. Teoretske mase iona b- i y-serije neobilježenog triptičkog autolitičkog fragmenta T3 (neobilježeni) i triptičkog autolitičkog fragmenta T3 obilježenog sa CAF reagensom (CAF-op, CAF-mm ili CAF-mp)

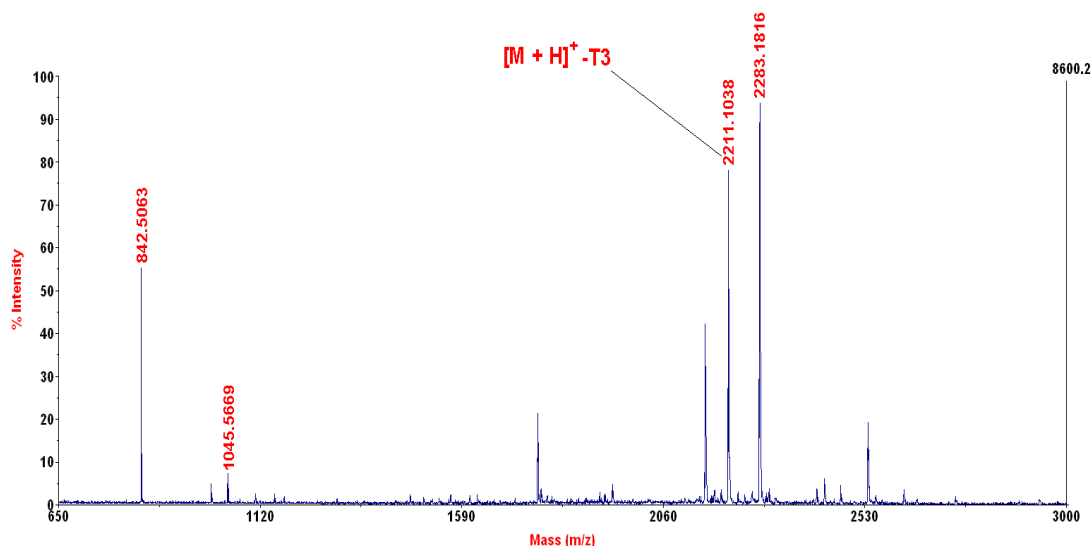
Triptički autolitički fragment T3 – sekvenca: LGEHNIDVLEGNEQFINAAK								
Neobilježeni - $[M + H]^+ - 2211,1040 \text{ Da}$; $[M - H]^- 2209,0884 \text{ Da}$								
Obilježeni - CAF $[M_{\text{CAF}} + H]^+ - 2461,0646 \text{ Da}$; $[M_{\text{CAF}} - H]^- - 2459,0490 \text{ Da}$								
b-ioni <i>m/z</i> $[M+H]^+ / \text{Da}$	Redni broj b-iona	Aminokiselina	Redni broj y-iona	*y-ioni <i>m/z</i> $[M+H]^+ / \text{Da}$	Redni broj y-iona	Aminokiselina	Redni broj b-iona	b-ioni <i>m/z</i> $[M_{\text{CAF}}-H]^- / \text{Da}$
114,0914	1	L	20	2211,1040	20	L	1	362,0363
171,1128	2	G	19	2098,0200	19	G	2	419,0577
300,1554	3	E	18	2040,9985	18	E	3	548,1003
437,2143	4	H	17	1911,9559	17	H	4	685,1592
551,2572	5	N	16	1774,8970	16	N	5	799,2022
664,3413	6	I	15	1660,8541	15	I	6	912,2862
779,3682	7	D	14	1547,7700	14	D	7	1027,3132
878,4367	8	V	13	1432,7431	13	V	8	1126,3816
991,5207	9	L	12	1333,6747	12	L	9	1239,4657
1120,5633	10	E	11	1220,5906	11	E	10	1368,5082
1177,5848	11	G	10	1091,5480	10	G	11	1425,5297
1291,6277	12	N	9	1034,5265	9	N	12	1539,5726
1420,6703	13	E	8	920,4836	8	E	13	1668,6152
1548,7289	14	Q	7	791,4410	7	Q	14	1796,6738
1695,7973	15	F	6	663,3824	6	F	15	1943,7422
1808,8814	16	I	5	516,3140	5	I	16	2056,8263
1922,9243	17	N	4	403,2300	4	N	17	2170,8692
1993,9614	18	A	3	289,1870	3	A	18	2241,9063
2064,9985	19	A	2	218,1499	2	A	19	2312,9434
2193,0935	20	K	1	147,1128	1	K	20	2441,0385

*Mase fragmentnih iona y-serije jednake su za obilježeni (CAF) i neobilježeni peptid

4.1.1. Sekvenciranje neobilježenog peptida *de novo*

Analiza smjese peptida dobivenih autolizom tripsina provedena je prema eksperimentalnim uvjetima danim u poglavlju 3.6.- *Analiza peptida tehnikama spektrometrije masa*.

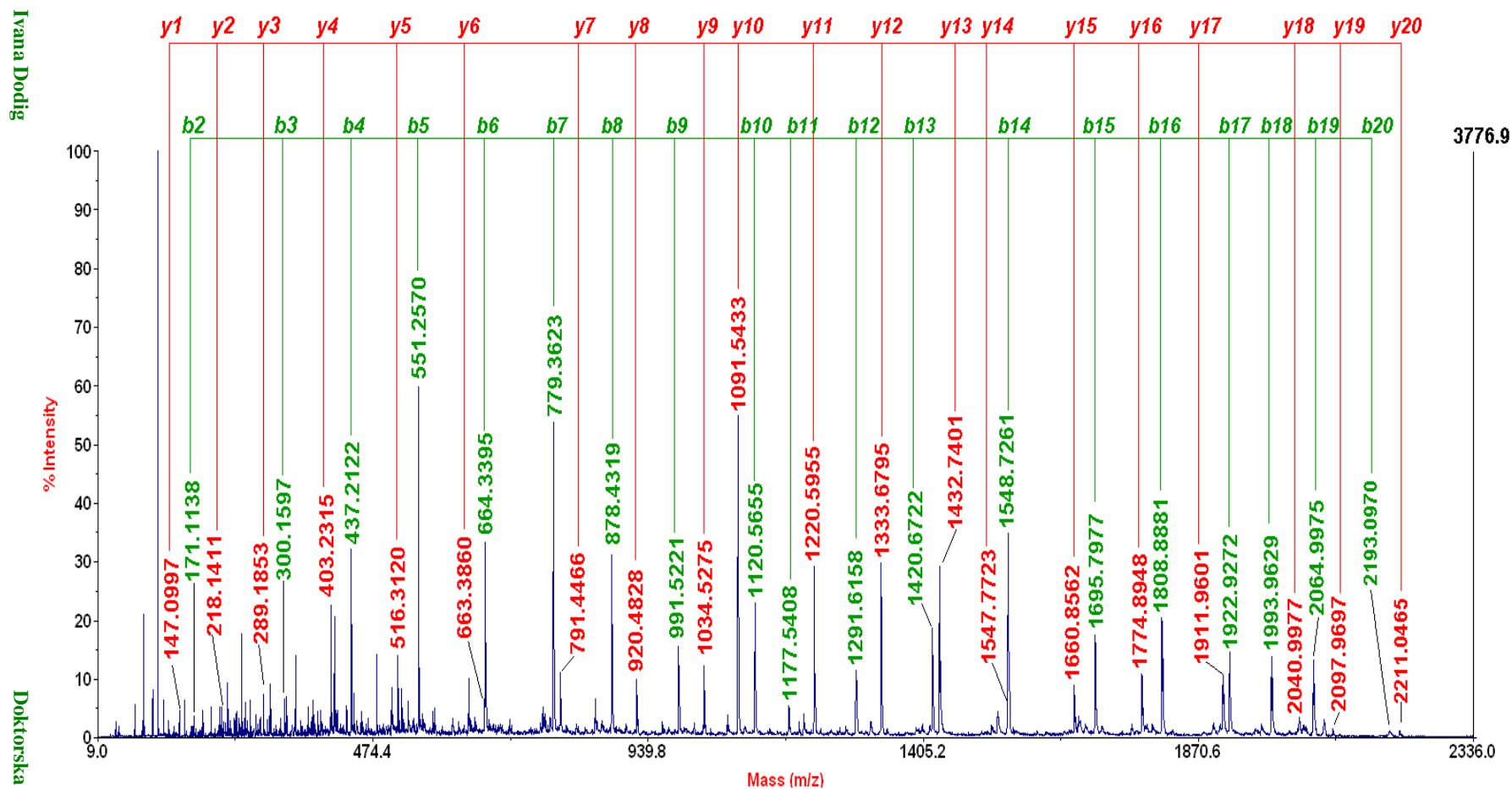
Spektar masa (MS spektar) snimljen MALDI-TOF spektrometrom masa za smjesu peptida nastalih autolizom tripsina u nareducirajućim uvjetima dan je na slici 4.1. Spektar je snimljen u pozitivnom načinu rada spektrometra masa. U spektru je posebno označen signal na m/z 2211,1038 koji odgovara triptičkom autolitičkom fragmentu T3.



Slika 4.1. MALDI-TOF MS spektar smjese peptida nastalih autolizom tripsina u nareducirajućim uvjetima

Ion koji odgovara triptičkom autolitičkom fragmentu T3 (m/z 2211,1038) uzet je kao prekursor ion za MS/MS analizu.

Na slici 4.2. prikazan je MALDI-TOF MS/MS spektar neobilježenog T3 fragmenta autolize tripsina snimljen u pozitivnom načinu rada s asigniranim ionima b- i y-serije. U spektru su detektirani svi ioni y-serije (y_1 - y_{20}), a iz b-serije iona nije detektiran samo b_1 ion. Podaci o omjeru signala prema šumu (S/N) i relativnom intenzitetu (RI) asigniranih signala dani su u tablici 4.3.



Slika 4.2. MALDI-TOF MS/MS spektar neobilježenog T3 fragmenta autolize tripsina snimljen u pozitivnom načinu rada s asigniranim ionima b- (označeni zelenom bojom) i y-serije (označeni crvenom bojom)

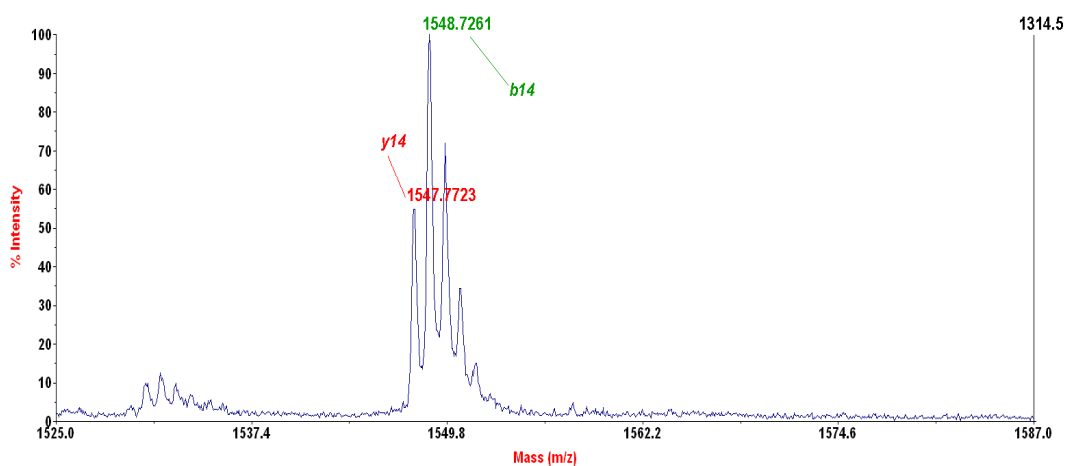
Tablica 4.3. Asignirani y- i b-ioni u MALDI-TOF MS/MS spektru T3 fragmenta autolize tripsina snimljenom u pozitivnom načinu rada spektrometra masa (slika 4.2.)

Fragmentni ion	m/z [M+H] ⁺ teoretski	m/z [M+H] ⁺ nađeno	Pogreška očitanja / ppm	Relativni intenzitet (RI)	Omjer signala prema šumu (S/N)
y ₁	147,1128	147,0997	89,0	3,93	41,34
b ₂	171,1128	171,1138	5,8	3,13	33,21
y ₂	218,1499	218,1411	40,3	4,49	47,68
y ₃	289,1870	289,1853	5,9	6,27	46,66
b ₃	300,1554	300,1597	14,3	4,08	27,79
y ₄	403,2300	403,2315	3,7	20,77	136,59
b ₄	437,2143	437,2122	4,8	29,09	185,79
y ₅	516,3140	516,3120	3,9	12,18	73,26
b ₅	551,2572	551,2570	0,4	58,32	354,04
y ₆	663,3824	663,3860	5,4	11,02	62,57
b ₆	664,3413	664,3395	2,7	32,08	171,71
b ₇	779,3682	779,3623	7,6	51,11	307,31
y ₇	791,4410	791,4466	7,1	10,50	60,22
b ₈	878,4367	878,4319	5,5	30,40	191,57
y ₈	920,4836	920,4828	0,9	9,47	62,00
b ₉	991,5207	991,5221	1,4	15,39	99,70
y ₉	1034,5265	1034,5275	1,0	12,04	85,73
y ₁₀	1091,5480	1091,5433	4,3	54,49	417,73
b ₁₀	1120,5633	1120,5655	2,0	21,45	154,00
b ₁₁	1177,5848	1177,5408	3,4	5,46	38,42
y ₁₁	1220,5906	1220,5955	4,0	28,46	233,11
b ₁₂	1291,6277	1291,6158	9,2	11,05	90,61
y ₁₂	1333,6747	1333,6795	3,6	29,06	252,25
b ₁₃	1420,6703	1420,6722	1,3	17,92	145,78
y ₁₃	1432,7431	1432,7401	2,1	27,77	252,42
y ₁₄	1547,7700	1547,7723	1,5	19,52	187,69
b ₁₄	1548,7289	1548,7261	1,8	35,15	173,56
y ₁₅	1660,8541	1660,8562	1,3	8,31	67,08
b ₁₅	1695,7973	1695,7977	0,2	17,09	144,90
y ₁₆	1774,8970	1774,8948	1,2	10,82	113,17
b ₁₆	1808,8814	1808,8881	3,7	19,61	193,38
y ₁₇	1911,9559	1911,9601	2,2	8,96	97,06
b ₁₇	1922,9243	1922,9272	1,5	10,58	125,01
b ₁₈	1993,9614	1993,9629	0,8	10,47	136,91
y ₁₈	2040,9985	2040,9977	0,4	3,11	40,55
b ₁₉	2064,9985	2064,9975	0,5	10,90	162,01
y ₁₉	2098,0200	2097,9697	24,0	1,26	11,46
b ₂₀	2193,0935	2193,0970	1,6	1,10	5,50
y ₂₀	2211,1040	2211,0465	26,0	1,29	14,14

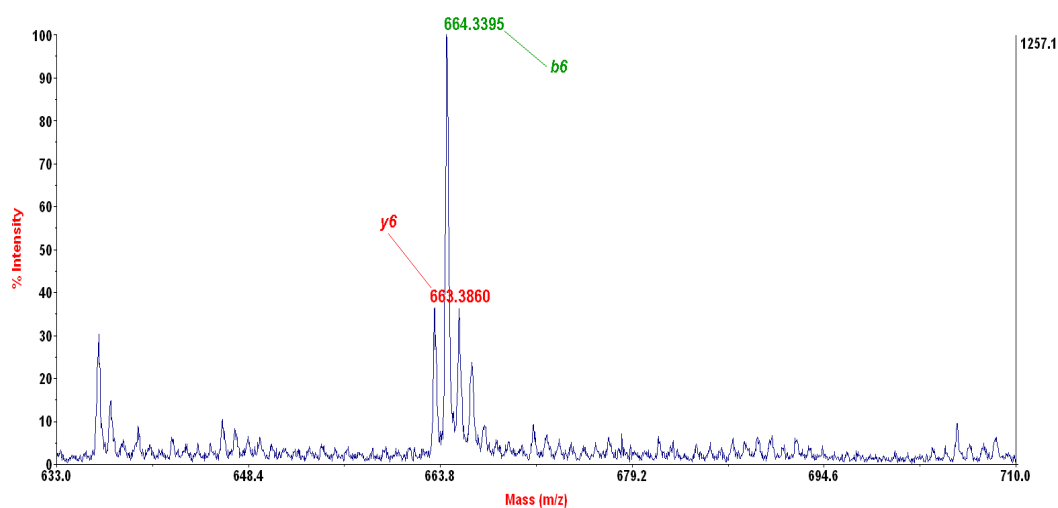
Iz tablice 4.3. i sa slike 4.2. uočava se kako su isti parovi iona b- i y-serije (y_n i b_n ioni) detektirani sa relativnim intenzitetima (RI) razlike manje od 10 % i podjednakim omjerima signala prema šumu (S/N). Osim toga, ne uočava se pravilo prema kojem bi signali iona pojedine serije (b- ili y-serije) uvijek bili detektirani sa većim RI ili S/N. Stoga RI i S/N nisu kriteriji za distinkciju među b- i y-ionima.

Detekcija je dodatno otežana preklapanje pojedinih signala koji proizlaze iz različitih serija iona. Tako se u slučaju triptičkog autolitičkog fragmenta T3 m/z iona b_{14} i y_{14} , odnosno iona b_6 i y_6 razlikuju za samo 1 Da (slika 4.3.).

A



B

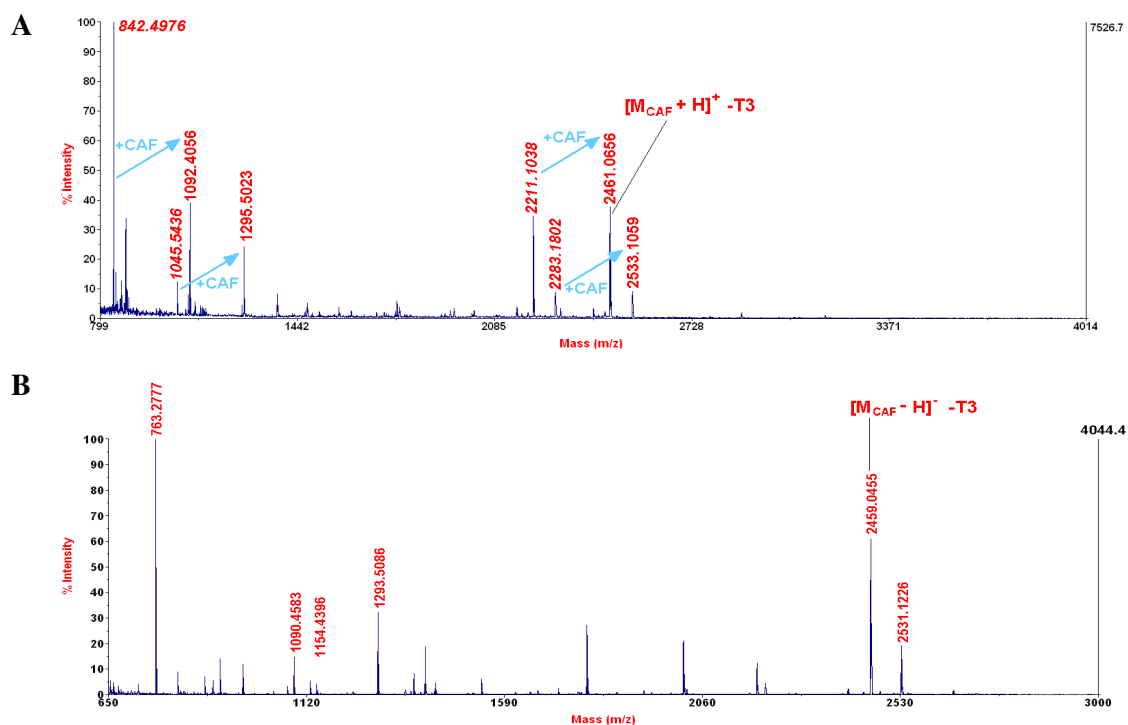


Slika 4.3. MALDI-TOF MS spektar masa kod kojeg su prikazani fragmentni ioni y_{14} i b_{14} (A) odnosno y_6 i b_6 nastali fragmentacijom triptičkog autolitičkog peptida T3. Preklapanje masa iona različitih fragmentnih serija dodatno otežava postupak sekvenciranja *de novo*.

4.1.2. Obilježavanje peptida CAF reagensima

Obilježavanje autolitičkog produkta tripsina CAF reagensima (CAF-op, CAF-mm i CAF-mp) provedeno je na pročišćenoj i do suha uparenoj smjesi peptida dobivenih autolizom tripsina prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.5. - *Obilježavanje peptida CAF reagensima*. MALDI-TOF MS i MS/MS analize provedene su prema eksperimentalnim uvjetima danim u poglavlju 3.6. - *Analiza peptida tehnikama spektrometrije masa*.

Kako sva tri korištena reagensa imaju istu reaktivnu skupinu i istu molekulsku formulu bez obzira na izbor reagensa mehanizam reakcije obilježavanja i molekulske formule nastalih obilježenih peptida su jednake. Zbog jednostavnosti prikaza kao tipičan CAF reagens za prikaz spektra masa obilježene smjese peptida nastalih autolizom tripsina uzet je CAF-op reagens (slika 4.4.). U spektrima su označeni signali koji odgovaraju triptičkom autolitičkom fragmentu T3 obilježenom sa CAF-op reagensom.



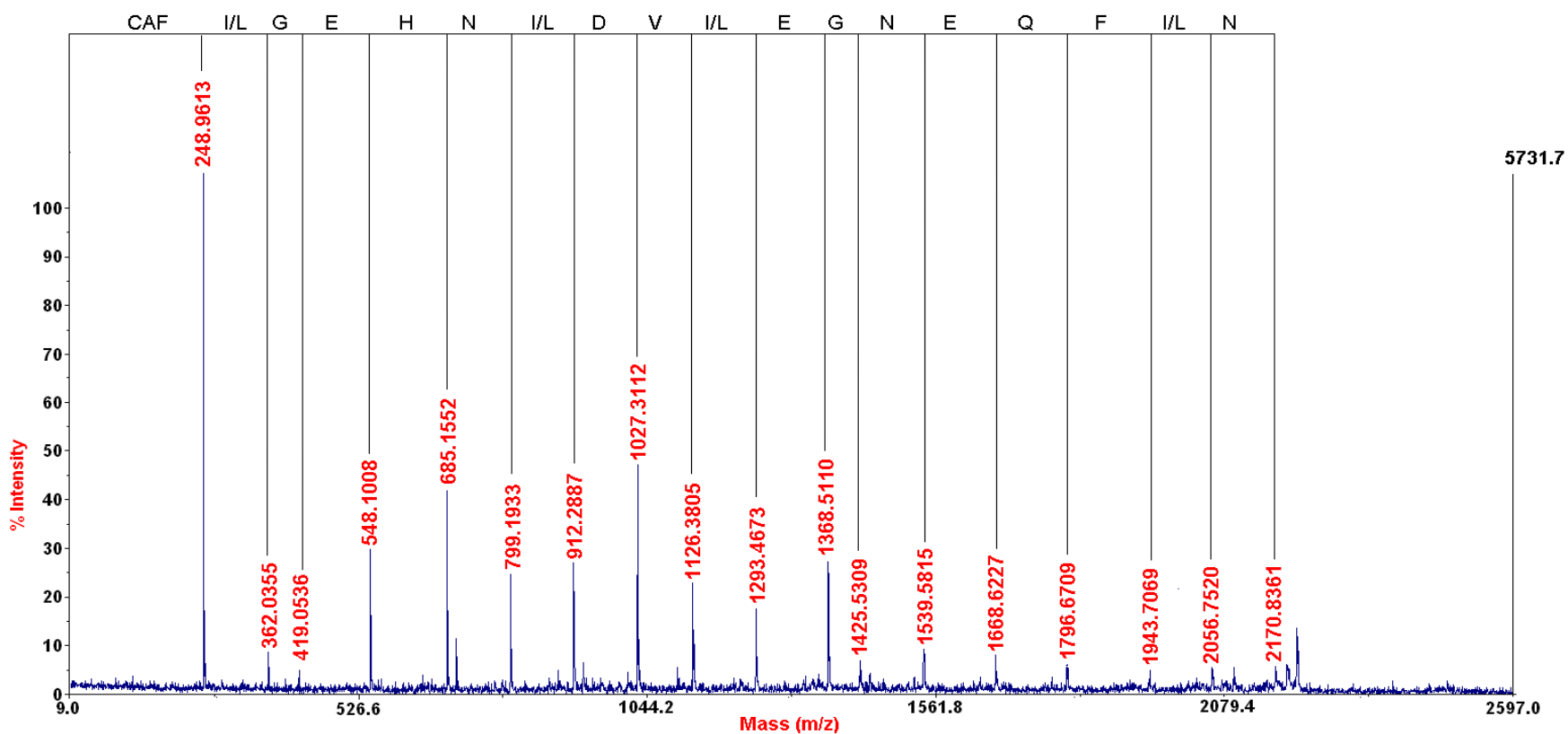
Slika 4.4. MALDI-TOF MS spektar smjese peptida nastalih autolizom tripsina u nareducirajućim uvjetima obilježenih CAF-op reagensom snimljen u pozitivnom načinu rada (A) i negativnom načinu rada spektrometra masa (B). U spektru na slici A plava strelica (+CAF) povezuje signale koji odgovaraju peptidima prije i nakon obilježavanja.

Izostanak signala koji bi omjerom mase i naboja odgovara dvostruko obilježenim peptidima (inkrement mase 499,92 Da) potvrđuje selektivnost reakcije obilježavanja.

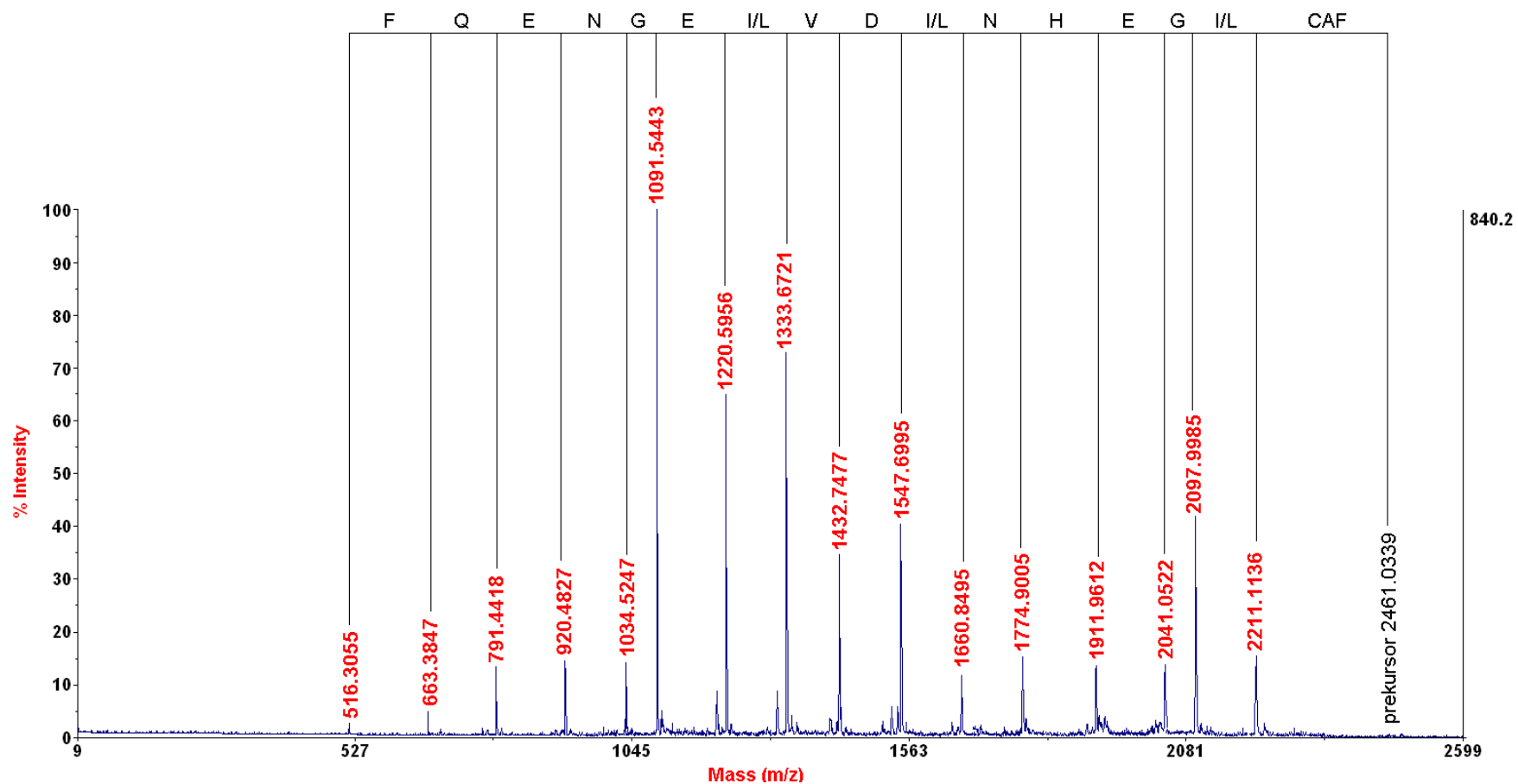
4.1.3. Sekvenciranje peptida obilježenog CAF-op reagensom *de novo*

Smjesa peptida nastalih autolizom tripsina obilježena je CAF-op reagensom prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.5.

MALDI-TOF MS/MS analiza provedena je u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa prema eksperimentalnim uvjetima danim u poglavlju 3.6. - *Analiza peptida tehnikama spektrometrije masa*. Dobiveni spektri dani su na slikama 4.5. i 4.6.



Slika 4.5. MALDI-TOF MS/MS spektar fragmentnih iona autolitičkog triptičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-op reagensom snimljen u negativnom načinu rada spektrometra masa. Asignirani su ioni b-serije korišteni za iščitavanje sekvence *de novo*



Slika 4.6. MALDI-TOF MS/MS spektar fragmentnih iona autolitičkog triptičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-op reagensom snimljen u pozitivnom načinu rada spektrometra masa. Asignirani su ioni y-serije korišteni za iščitavanje sekvence *de novo*

Osnova za uspješno iščitavanje aminokiselinske sekvence je točan izbor signala, koji čine konsekutivni niz iona iste serije. U slučaju MS/MS spektara prikazanih na slikama 4.5. i 4.6. izbor signala koji čine konsekutivni niz iona olakšan je upotrebom CAF-op reagensa sa dvije sulfonske skupine. Naime, uslijed opisane kemijske promjene peptida dolazi do selektivne ionizacije y-serije iona u pozitivnom MS/MS spektru i b-serije iona u negativnom spektru. Tako su u MS/MS spektru u pozitivnom načinu rada spektrometra masa predominantno zastupljeni ioni y-serije, dok su MS/MS spektru u negativnom načinu rada spektrometra masa gotovo isključivo zastupljeni ioni b-serije.

Činjenica da su fragmentni ioni komplementarnih serija iona (y-ioni koji zadržavaju originalni peptidni C-kraj i b-ioni koji zadržavaju originalni peptidni N-kraj peptida obilježen CAF-op reagensom) razdvojeni na dva spektra, nedvojbeno određuje smjer iščitavanja redosljeda aminokiselina (od N-kraja prema C-kraju) na spektrima u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa (tablice 4.4. i 4.5.). Osim toga, iščitavanje je olakšano i zbog činjenice da su fragmentni ioni y- i b-serije zastupljeni intenzivnijim omjerom signala prema šumu u odnosu na neobilježene ione peptida (tablice 4.4. i 4.5.), pa je izbor signala koji potencijalno čine konsekutivni niz pojednostavljen u probiru.

Iščitavanje aminokiselinskog slijeda na oba spektra (slike 4.5. i 4.6.) provedeno je na jednak način. Nakon izbora potencijalnih signala konsekutivnog niza (na temelju vizualne procjene S/N i RI) izračunata je međusobna razlika m/z te je dobivenoj razlici pridružena aminokiselina sukladno tablici 2.2. (str. 38.).

Postupak iščitavanja aminokiselinske sekvence iz MS/MS spektra na slici 4.5. detaljno je opisan u tablici 4.4., a postupak iščitavanja aminokiselinske sekvence MS/MS spektra na slici 4.6. u tablici 4.5.

Tablica 4.4. Iščitavanje aminokiselinske sekvence autolitičkog triptičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-op reagensom iz MALDI-TOF MS/MS spektra snimljenog u negativnom načinu rada spektrometra masa (slika 4.5.)

b-ion	Asignirani m/z [M-H] ⁻	RI* / %	S/N**	Izračun mase rezidua	Masa rezidua / Da	AK
0	248,9613	91,08	412,48	/	/	/
1	362,0355	7,61	31,86	b ₁ -b ₀ = (362,0355-248,9613)	113,0742	I/L
2	419,0536	5,92	22,63	b ₂ -b ₁ = (419,0536-362,0355)	57,0181	G
3	548,1008	26,15	124,49	b ₃ -b ₃ = (548,1008-419,0536)	129,0472	E
4	685,1552	35,91	181,55	b ₄ -b ₃ = (685,1552-548,1008)	137,0544	H
5	799,1933	20,64	101,07	b ₅ -b ₄ = (799,1933-685,1552)	114,0381	N
6	912,2887	23,39	118,21	b ₆ -b ₅ = (912,2887-799,1933)	113,0954	I/L
7	1027,3112	42,86	238,40	b ₇ -b ₆ = (1027,3112-912,2887)	115,0225	D
8	1126,3805	19,16	100,79	b ₈ -b ₇ = (1126,3805-1027,3112)	99,0693	V
9	1239,4673	14,36	64,85	b ₉ -b ₈ = (1239,4673-1126,3805)	113,0868	I/L
10	1368,5110	23,45	98,5	b ₁₀ -b ₉ = (1368,5110-1239,4673)	129,0437	E
11	1425,5309	4,78	20,10	b ₁₁ -b ₁₀ = (1425,5309-1368,511)	57,0199	G
12	1539,5815	7,28	32,01	b ₁₂ -b ₁₁ = (1539,5815-1425,5309)	114,0506	N
13	1668,6227	5,67	23,43	b ₁₃ -b ₁₂ = (1668,6227-1539,5815)	129,0412	E
14	1796,6709	4,08	8,41	b ₁₄ -b ₁₃ = (1796,6709-1668,6227)	128,0482	Q
15	1943,7069	2,74	7,98	b ₁₅ -b ₁₄ = (1943,7069-1796,6709)	147,0360	F
16	2056,7520	4,92	8,93	b ₁₆ -b ₁₅ = (2056,7520-1943,7069)	113,0451	I/L
17	2170,8361	3,59	8,66	b ₁₇ -b ₁₆ = (2170,8361-2056,7520)	114,0841	N
18	/	/	/	/	/	/
19	/	/	/	/	/	/
20	/	/	/	/	/	/

*relativni intenzitet; ** omjer signala prema šumu

SMJER ČITANJA

Tablica 4.5. Iščitanje aminokiselinske sekvence autolitičkog triptičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-op reagensom iz MALDI-TOF MS/MS spektra snimljenog u pozitivnom načinu rada spektrometra masa (slika 4.6.)

y-ion	Asignirani m/z [M+H] ⁺	RI* / %	S/N**	Izračun mase rezidua	Masa rezidua / Da	AK
1	/	/	/	/	/	/
2	/	/	/	/	/	/
3	/	/	/	/	/	/
4	/	/	/	/	/	/
5	516,3055	2,03	34,02	/	/	/
6	663,3847	4,34	75,69	y ₆ -y ₅ (=663,3847-516,3055)	147,0792	F
7	791,4418	12,89	169,22	y ₇ -y ₆ (=791,4418-663,3847)	128,0571	Q
8	920,4827	14,23	161,62	y ₈ -y ₇ (=920,4827-791,4418)	129,0409	E
9	1034,5247	13,53	155,92	y ₉ -y ₈ (=1034,5247-920,4827)	114,0420	N
10	1091,5443	99,67	1449,6	y ₁₀ -y ₉ (=1091,5443-1034,5247)	57,0195	G
11	1220,5956	64,49	874,63	y ₁₁ -y ₁₀ (=1220,5956-1091,5443)	129,0513	E
12	1333,6721	72,61	952,54	y ₁₂ -y ₁₁ (=1333,6721-1220,5956)	113,0765	I/L
13	1432,7477	34,30	465,28	y ₁₃ -y ₁₂ (=1432,7477-1333,6721)	99,0756	V
14	1547,6995	40,07	545,66	y ₁₄ -y ₁₃ (=1547,6995-1432,7477)	114,9518	N
15	1660,8495	11,48	139,87	y ₁₅ -y ₁₄ (=1660,8495-1547,6995)	113,1500	I/L
16	1774,9005	14,85	129,17	y ₁₆ -y ₁₅ (=1774,9005-1660,8495)	114,0510	N
17	1911,9612	12,84	139,52	y ₁₇ -y ₁₆ (=1911,9612-1774,9005)	137,0607	H
18	2041,0522	11,94	139,85	y ₁₈ -y ₁₇ (=2041,0522-1911,9612)	129,0910	E
19	2097,9985	34,70	559,72	y ₁₉ -y ₁₈ (=2097,9985-2041,0522)	56,9463	G
20	2211,1136	12,57	181,86	y ₂₀ -y ₁₉ (=2211,1136-2097,9985)	113,1151	I/L

*relativni intenzitet; ** omjer signala prema šumu

Na triptičkom autolitičkom fragmentu T3, koji je prije analize tandemnom spektrometrijom masa obilježen CAF-op reagensom iščitan je slijed od prve do sedamnaeste aminokiseline, tj. asignirani su ioni b₁-b₁₇ (slika 4.5. i tablica 4.4.) u negativnom načinu rada spektrometra masa.

Na istom uzorku u pozitivnom načinu rada spektrometra masa, iščitan je slijed od prve do petnaeste aminokiseline, tj. asignirani su ioni y₅-y₂₀ (slika 4.6. i tablica 4.5.).

Ukupno je preklapanjem (presjekom) rezultata iščitavanja dvaju spektara (pozitivnog i negativnog spektra masa) potvrđen slijed od prve do petnaeste aminokiseline, (asignirani su ioni b₆-b₁₇ i y₅-y₁₇), a sekvenciranjem *de novo* je iščitan slijed od prve do sedamnaeste aminokiseline.

4.1.4. Sekvenciranje peptida obilježenog CAF-mm reagensom *de novo*

Smjesa peptida nastalih autolizom tripsina obilježena je CAF-mm reagensom prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.5.

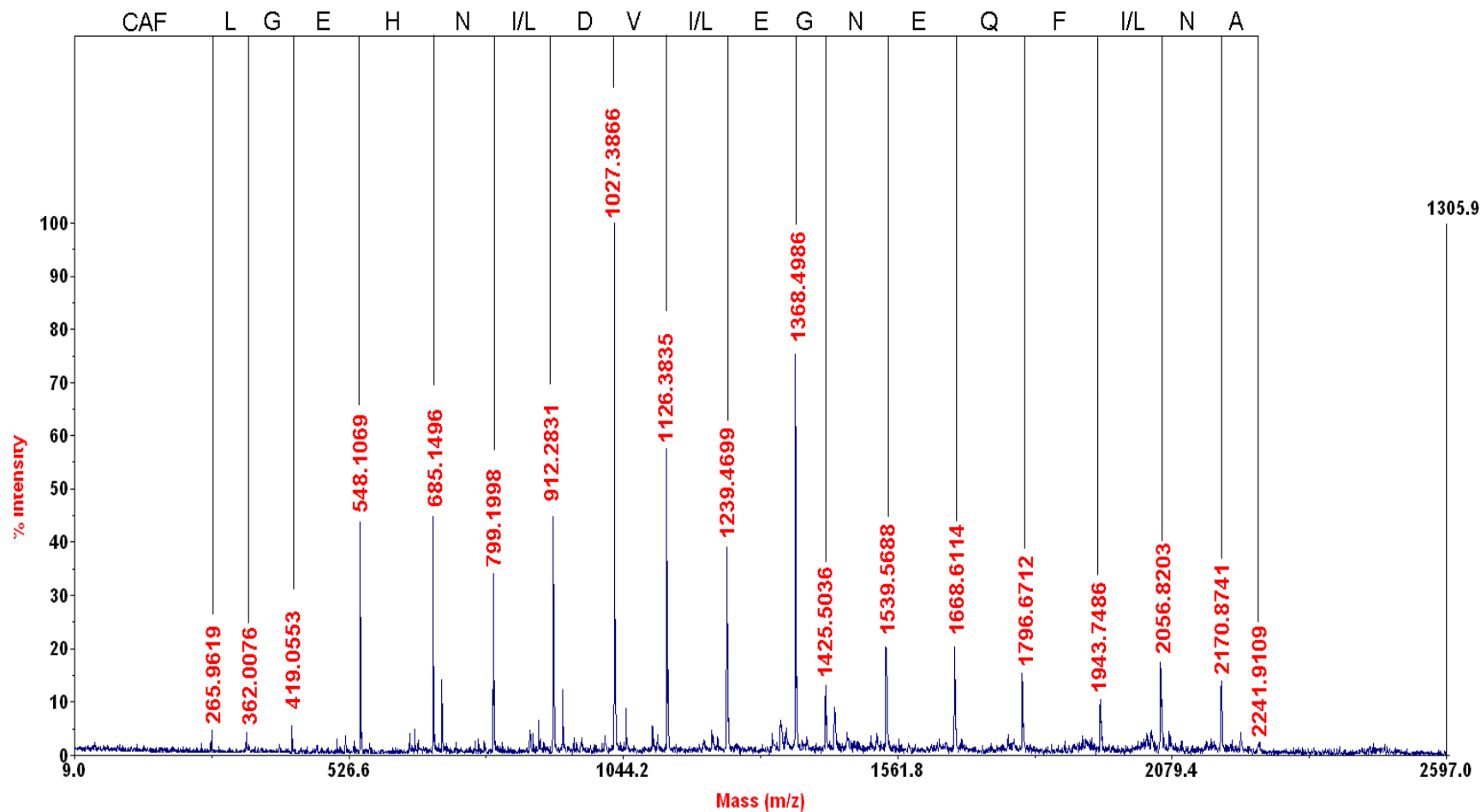
MS/MS analiza provedena je u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa prema eksperimentalnim uvjetima danim u poglavlju 3.6. - *Analiza peptida tehnikama spektrometrije masa*. Dobiveni spektri dani su na slikama 4.7. i 4.8.

Slično kao i kod CAF-op derivatizacijskog reagensa, uslijed kemijske promjene N-kraja peptida došlo je do razdvajanja y- i b-iona na dva spektra. Tako su u MS/MS spektru u negativnom načinu rada (slika 4.7.) predominantno zastupljeni samo ioni b-serije, dok su u MS/MS spektru, u pozitivnom načinu rada (slika 4.8.) predominantno zastupljeni samo ioni y-serije.

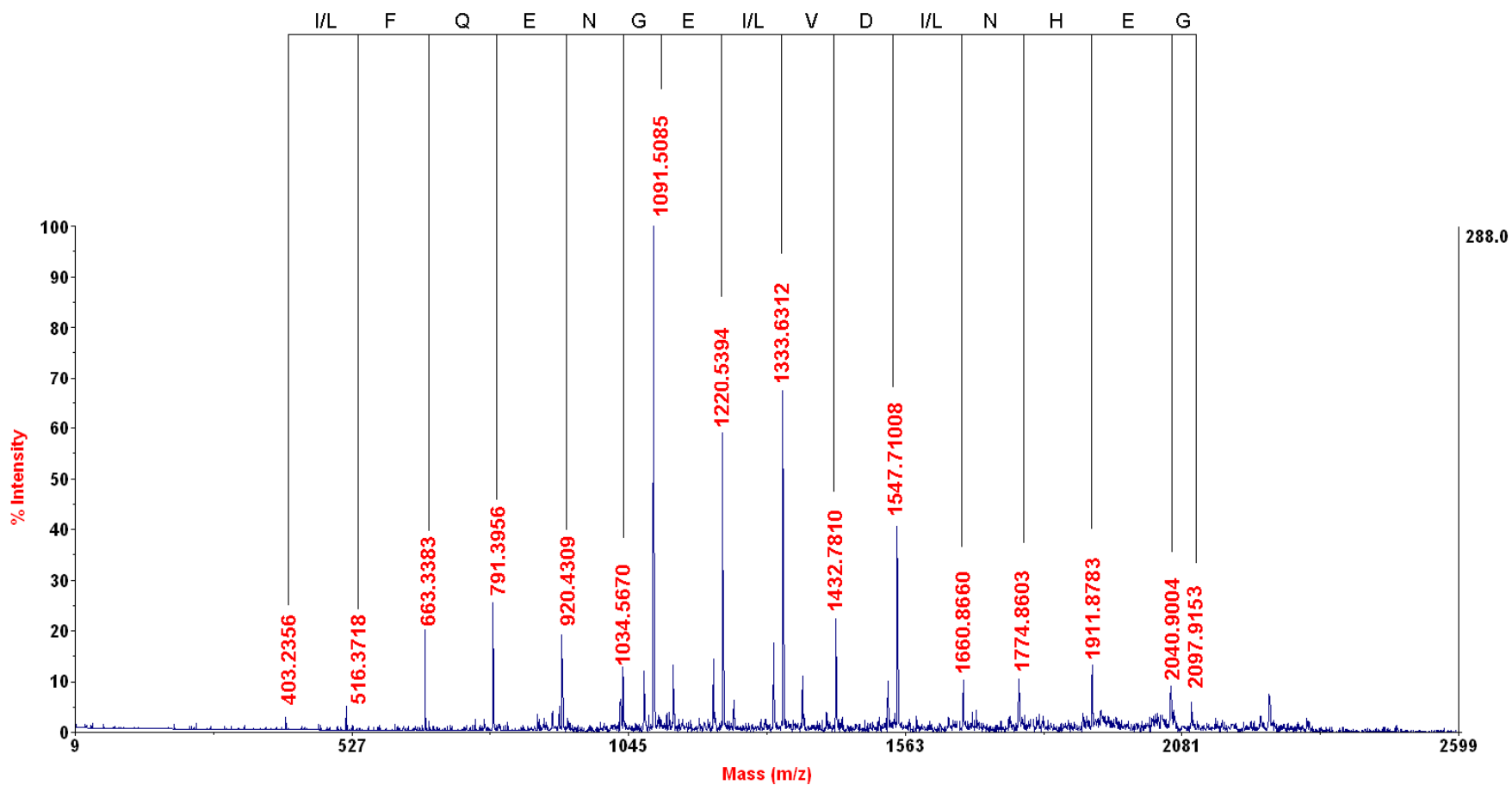
Vrijednost omjera signala prema šumu (S/N) i relativnih intenziteta (RI) signala koji čine konsekutivni slijed iona b-serije (za spektar na slici 4.7.) i iona y-serije (za spektar na slici 4.8.), dane su u tablicama 4.6. i 4.7. redom.

Upotrebom CAF-mm reagensa u negativnom načinu rada iščitani su slijed od prve do osamnaeste aminokiseline, tj. asignirani su ioni b_1 - b_{18} (slika 4.7. i tablica 4.6.). Na istom uzorku u pozitivnom načinu rada spektrometra masa iščitani su slijed od prve do šesnaeste aminokiseline, tj. asignirani su ioni y_4 - y_{20} (slika 4.8. i tablica 4.7.).

Ukupno je nedvojbeno potvrđen slijed od prve do šesnaeste aminokiseline u peptidu (presjekom iščitanih spektara asignirani su ioni b_1 - b_{16} i y_4 - y_{20}), a kombinacijom dvaju spektara iščitani su prvih 18 aminokiselina.



Slika 4.7. MALDI-TOF MS/MS spektar fragmentnih iona autolitičkog triptičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-mm reagensom snimljen u negativnom načinu rada spektrometra masa. Asignirani su ioni b-serije korišteni za iščitavanje sekvence *de novo*



Slika 4.8. MALDI-TOF MS/MS spektar fragmentnih iona autolitičkog triptičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-mm reagensom snimljen u pozitivnom načinu rada spektrometra masa. Asignirani su ioni b-serije korišteni za iščitavanje sekvence *de novo*

Tablica 4.6. Iščitanje aminokiselinske sekvence triptičkog autolitičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-mm reagensom iz MALDI-TOF MS/MS spektra snimljenog u negativnom načinu rada (slika 4.7.)

b-ion	Asignirani m/z [M-H] ⁻	RI* / %	S/N**	Izračun mase rezidua	Masa rezidua / Da	AK
0	265,9619 [#]	5,46	32,56	/	/	/
1	362,0076	5,26	23,66	b ₁ -b ₀ (=362,0076-248,9279*)	113,0797	I/L
2	419,0553	5,46	25,97	b ₂ -b ₁ (=419,0553-362,0076)	57,0477	G
3	548,1069	47,34	230,62	b ₃ -b ₂ (=548,1069-419,0553)	129,0516	E
4	685,1496	47,58	289,92	b ₄ -b ₃ (=685,1496-548,1069)	137,0427	H
5	799,1998	36,94	237,72	b ₅ -b ₄ (=799,1998-685,1496)	114,0502	N
6	912,2831	44,88	354,89	b ₆ -b ₅ (=912,2831-799,1998)	113,0833	I/L
7	1027,3866	100,00	650,69	b ₇ -b ₆ (=1027,3866-912,2831)	115,1035	D
8	1126,3835	61,18	507,26	b ₈ -b ₇ (=1126,3835-1027,3866)	98,9969	V
9	1239,4699	38,97	712,73	b ₉ -b ₈ (=1239,4699-1126,3835)	113,0864	I/L
10	1368,4986	77,89	533,64	b ₁₀ -b ₉ (=1368,4986-1239,4699)	129,0287	E
11	1425,5036	12,44	86,83	b ₁₁ -b ₁₀ (=1425,5036-1368,4986)	57,0050	G
12	1539,5688	20,56	140,19	b ₁₂ -b ₁₁ (=1539,5688-1425,5036)	114,0652	N
13	1668,6144	22,26	150,74	b ₁₃ -b ₁₂ (=1668,6144-1539,5688)	129,0456	E
14	1796,6712	16,25	107,80	b ₁₄ -b ₁₃ (=1796,6712-1668,6144)	128,0568	Q
15	1943,7486	9,69	53,92	b ₁₅ -b ₁₄ (=1943,7486-1796,6712)	147,0774	F
16	2056,8203	16,56	101,66	b ₁₆ -b ₁₅ (=2056,8203-1943,7486)	113,0717	I/L
17	2170,8741	7,72	51,24	b ₁₇ -b ₁₆ (=2170,8741-2056,8203)	114,0538	N
18	2241,9109	2,20	15,47	b ₁₈ -b ₁₇ (=2241,9109-2170,8741)	71,0368	A
19	/	/	/	/	/	/
20	/	/	/	/	/	/

*relativni intenzitet; ** omjer signala prema šumu

[#]Masa b₀ iona izračunata je oduzimanjem 17,034 (NH₃) od asigniranog c₀ iona

S M J E R Č I T A N J A

Tablica 4.7. Iščitanje aminokiselinske sekvence autolitičkog triptičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-mm reagensom iz MALDI-TOF MS/MS spektra snimljenog u pozitivnom načinu rada (slika 4.8.)

y- ion	Asignirani m/z [M+H] ⁺	RI* / %	S/N**	Izračun mase rezidua	Masa rezidua / Da	AK
1	/	/	/	/	/	/
2	/	/	/	/	/	/
3	/	/	/	/	/	/
4	403,2356	2,98	7,87	/	/	/
5	516,3718	5,20	17,60	y ₅ -y ₄ (=516,3718-403,2356)	113,1362	I/L
6	663,3383	20,47	84,52	y ₆ -y ₅ (=663,3383-516,3718)	146,9665	F
7	791,3956	24,98	105,96	y ₇ -y ₆ (=791,3956-663,3383)	128,0573	Q
8	920,4309	18,68	86,31	y ₈ -y ₇ (=920,4309-791,3956)	129,0353	E
9	1034,5670	13,13	60,56	y ₉ -y ₈ (=1034,5670-920,4309)	114,1361	N
10	1091,5085	99,83	456,39	y ₁₀ -y ₉ (=1091,5085-1034,5670)	56,9415	G
11	1220,5394	57,92	289,21	y ₁₁ -y ₁₀ (=1220,5394-1091,5085)	129,0309	E
12	1333,6312	68,39	343,90	y ₁₂ -y ₁₁ (=1333,6312-1220,5394)	113,0918	I/L
13	1432,7810	22,68	124,85	y ₁₃ -y ₁₂ (=1432,7810-1333,6312)	99,1498	V
14	1547,7108	41,04	203,00	y ₁₄ -y ₁₃ (=1547,7108-1432,7810)	114,9298	N
15	1660,8660	8,44	48,13	y ₁₅ -y ₁₄ (=1660,8660-1547,7108)	113,1552	I/L
16	1774,8603	9,90	54,08	y ₁₆ -y ₁₅ (=1774,8603-1660,8660)	113,9943	N
17	1911,8783	11,31	50,31	y ₁₇ -y ₁₆ (=1911,8783-1774,8603)	137,018	H
18	2040,9004	6,92	30,54	y ₁₈ -y ₁₇ (=2041,9004-1911,8783)	129,0221	E
19	2097,9153	5,20	25,94	y ₁₉ -y ₁₈ (=2097,9153-2041,9004)	57,0149	G
20	2211,1067 [#]	/	/	y ₂₀ -y ₁₉ (=2211,1067-2097,9153)	113,1914	I/L

*relativni intenzitet; ** omjer signala prema šumu

[#]Masa prekursor iona

SMJER ČITANJA

4.1.5. Sekvenciranje peptida obilježenog CAF-mp reagensom *de novo*

Smjesa peptida nastalih autolizom tripsina obilježena je CAF-mm reagensom prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.5.

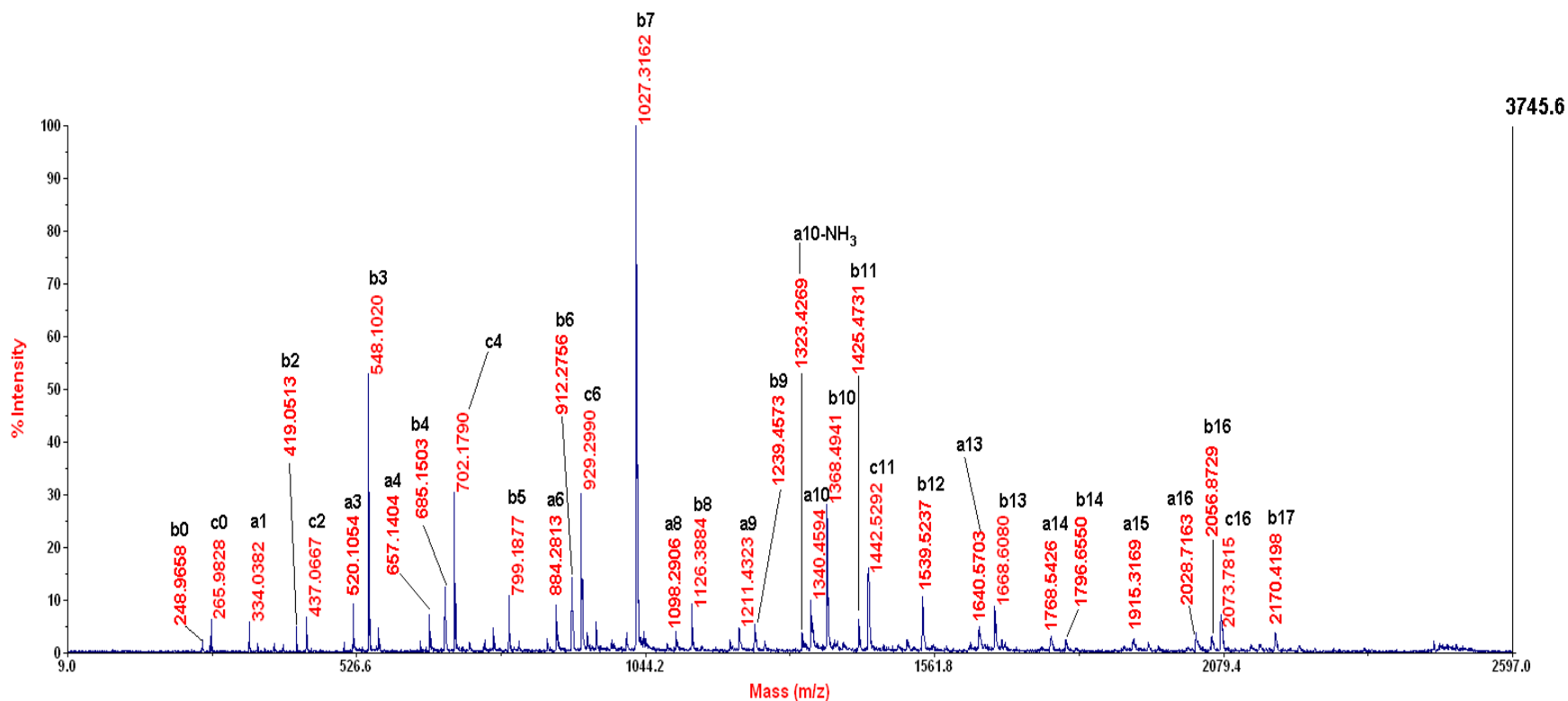
MS/MS analiza triptičkog autolitičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-mp reagensom provedena je u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa prema eksperimentalnim uvjetima danim u poglavlju 3.6. - *Analiza peptida tehnikama spektrometrije masa*. Dobiveni spektar prikazani su na slikama 4.9. i 4.10.

Osnova za uspješno iščitavanje aminokiselinske sekvence je točan izbor signala koji čine konsekvativnu seriju istovrsnih iona.

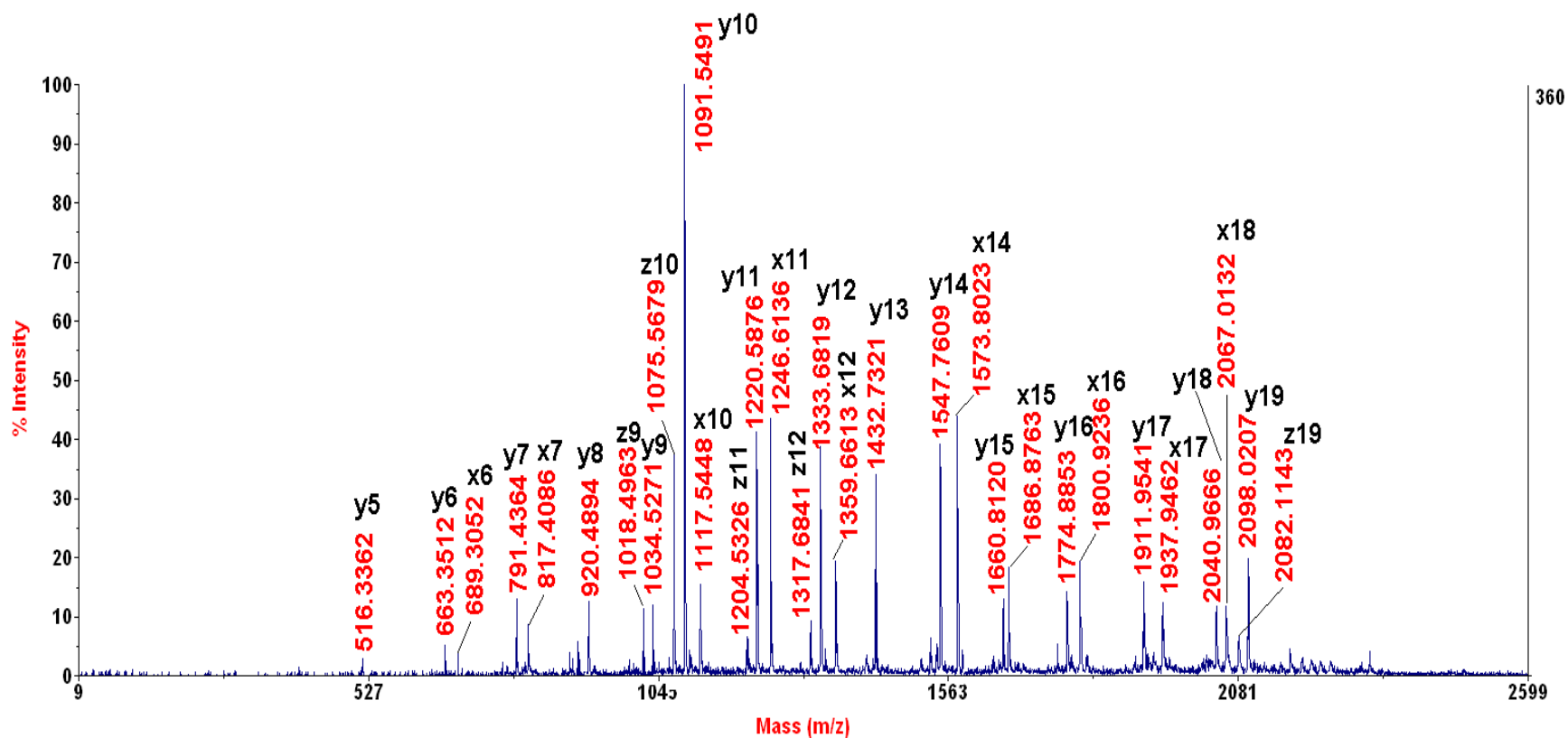
Popisi asigniranih signala koji uključuju m/z , S/N i RI signala u spektrima na slikama 4.9. i 4.10. dani su redom u tablicama 4.8. i 4.9.

Iz priloženih tablica i spektara s asigniranim signalima vidljivo je da su za asignaciju jedne aminokiseline u slijedu često prisutni signali serija a-, b- i c- odnosno x-, y-, i z-, pri čemu signali serija b- i y- nisi uvijek asignirani s najvećim relativnim intenzitetom i/ili omjerom signala prema šumu.

Stoga se izbor konsekvativnih signala istovrsnih iona u spektrima peptida obilježenog CAF-mp reagensom (slike 4.9. i 4.10.) ne može provesti prema kriteriju najvećeg relativnog intenziteta signala kao što je to slučaj u spektrima peptida obilježenog CAF-op i CAF-mm reagensima.



Slika 4.9. MALDI-TOF MS/MS spektar fragmentnih iona triptičkog autolitičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-mp reagensom snimljen u negativnom načinu rada spektrometra masa. Asignirani su ioni koji pripadaju a-, b- i c-seriji fragmentnih iona



Slika 4.10. MALDI-TOF MS/MS fragmentnih iona triptičkog autolitičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-mp reagensom snimljen u pozitivnom načinu rada spektrometra masa. Asignirani su ioni koji pripadaju x-, y- i z-seriji fragmentnih iona.

Tablica 4.8. Iščitanje aminokiselinske sekvence autolitičkog triptičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-mm reagensom iz MALDI-TOF MS/MS spektra snimljenog u pozitivnom načinu rada (slika 4.9.)

Fragmentni ion	Asignirani m/z [M-H] ⁺	Relativni intenzitet (RI)	Omjer signala prema šumu (S/N)	AK
b₀	248,9658	1,79	32,17	I/L
c₀	265,9828	5,86	78,68	
a₁	334,0382	5,46	25,97	G
b₂	419,0513	4,95	61,19	E
c₂	437,0667	6,27	77,18	
a₃	520,1054	8,57	116,20	H
b₃	548,1020	50,48	674,97	
a₄	657,1404	7,19	69,17	N
b₄	685,1503	12,53	138,25	
c₄	702,1790	30,14	364,18	
b₅	799,1877	10,67	106,00	I/L
a₆	884,2813	8,50	73,18	D
b₆	912,2756	14,28	136,12	
c₆	929,2990	30,46	332,81	
b₇	1027,3162	99,95	1024,59	V
a₈	1098,2906	3,93	35,98	I/L
b₈	1126,3884	7,71	67,06	
a₉	1211,4323	4,51	31,36	E
b₉	1239,4573	5,46	44,11	
a₁₀-NH₃	1323,4269	3,59	35,53	G
a₁₀	1340,4594	10,24	84,59	
b₁₀	1368,4941	27,55	263,14	
b₁₁	1425,4731	5,69	37,51	N
c₁₁	1442,5292	14,42	149,86	
b₁₂	1539,5237	5,25	54,87	E
a₁₃	1640,5703	3,70	36,76	Q
b₁₃	1668,6080	7,82	66,16	
a₁₄	1768,5426	2,60	23,09	F
b₁₄	1796,6550	2,29	22,36	
a₁₅	1915,3169	2,31	11,08	I/L
a₁₆	2028,7163	2,10	14,73	N
b₁₆	2056,8729	2,63	13,84	
c₁₆	2073,7815	4,59	52,03	
b₁₇	2170,4198	3,48	28,21	A

S M J E R Č I T A N J A

Tablica 4.9. Popis asigniranih fragmentnih iona x-serije, y-serije i z-serije triptičkog autolitičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-mp reagensom na MALDI-TOF MS/MS spektra snimljenom u pozitivnom načinu rada spektrometra masa (slika 4.9.)

Fragmentni ion	Asignirani m/z [M-H] ⁻	Relativni intenzitet (RI)	Omjer signala prema šumu (S/N)	AK
y ₅	516,3362	2,55	21,21	F
y ₆	663,3512	4,79	30,98	
x ₆	689,3052	3,81	25,57	
y ₇	791,4364	13,22	90,96	Q
x ₇	817,4086	9,87	52,12	E
y ₈	920,4894	12,24	76,17	
z ₉	1018,4963	11,73	69,17	
y ₉	1034,5271	11,98	69,33	N
z ₁₀	1075,5679	60,04	387,51	G
y ₁₀	1091,5491	101,06	653,56	
x ₁₀	1117,5448	13,45	75,12	
z ₁₁	1204,5326	6,50	25,13	E
y ₁₁	1220,5876	62,13	445,61	
x ₁₁	1246,6136	64,82	332,81	
z ₁₂	1317,6841	8,50	73,18	I/L
y ₁₂	1333,6819	14,28	136,12	
x ₁₂	1359,6613	10,05	48,77	
y ₁₂	1333,6819	63,01	297,15	V
x ₁₂	1359,6613	20,11	89,16	D
y ₁₃	1432,7321	32,44	218,41	
y ₁₄	1547,7609	38,99	275,64	
x ₁₄	1573,8023	40,12	288,63	I/L
y ₁₅	1660,8120	11,90	65,38	N
x ₁₅	1686,8763	13,56	87,12	
y ₁₆	1774,8853	12,68	83,80	
x ₁₆	1800,9236	15,72	102,53	H
y ₁₇	1911,9541	15,93	91,15	E
x ₁₇	1937,9462	12,33	79,56	
y ₁₈	2040,9666	11,95	70,01	
x ₁₈	2067,0132	11,99	75,63	G
z ₁₉	2082,1143	7,17	21,06	I/L
y ₁₉	2098,0207	18,52	123,66	


 SMJER ČITANJA

U tablici 4.8. žutom, zelenom i crvenom bojom su označeni podaci redom za fragmentne ione a-, b- i c-serije. Slično su aminokiseline za čiju je asignaciju kao najintenzivniji signal (najveći RI i S/N) detektiran a-, b- ili c-ion označeni redom žutom, zelenom i crvenom bojom. Za asignaciju 11 aminokiselina kao najintenzivniji signal detektiran je b-ion, za 3 aminokiseline a-ion, te je c-ion detektiran kao najintenzivniji za 4 aminokiseline. Ukupno je očitana sekvenca od prve do sedamnaeste aminokiseline od ukupno 20 aminokiselina triptičkog autolitičkog fragmenta T3.

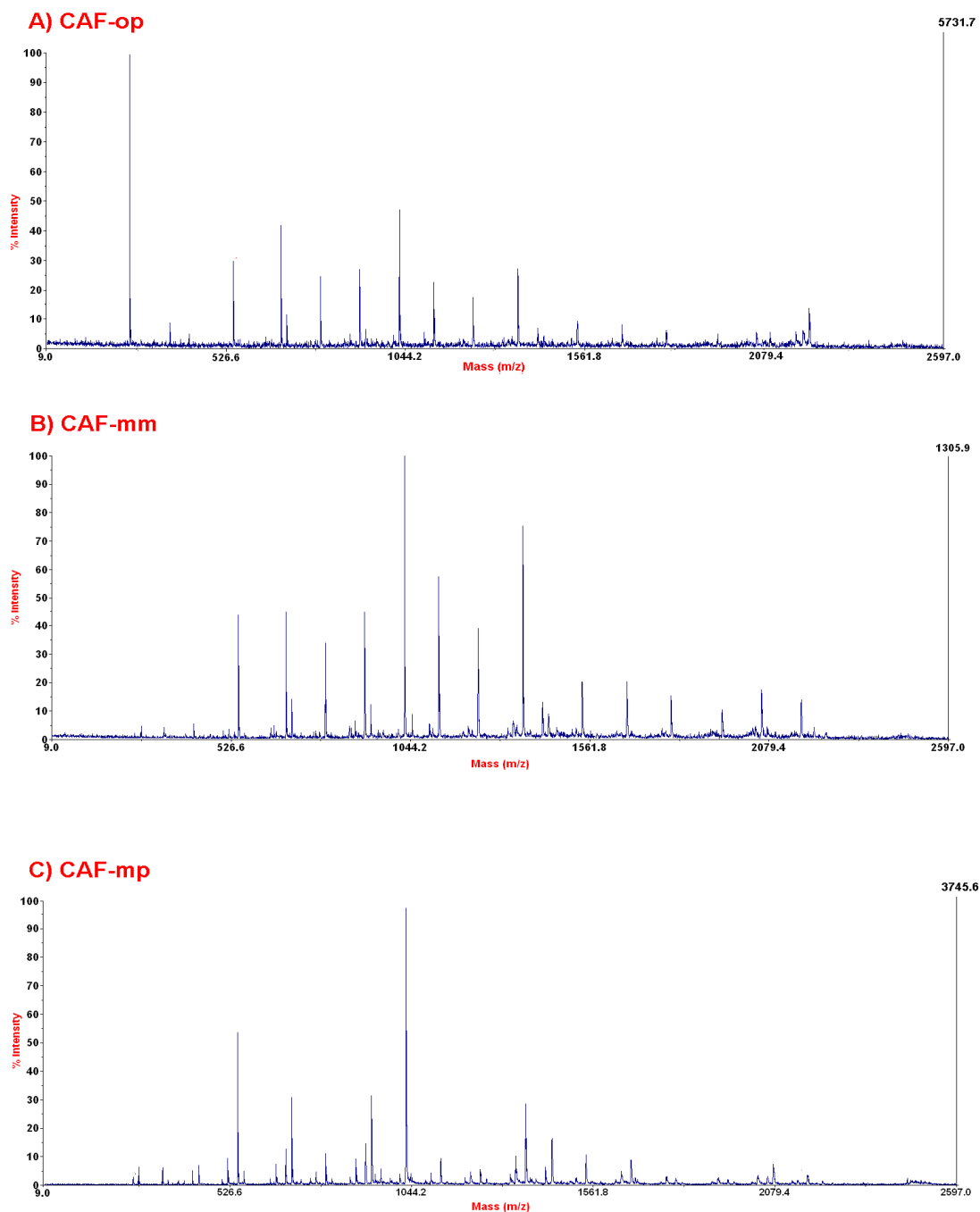
U tablici 4.9. crvenom, zelenom i žutom bojom su označeni podaci redom za fragmentne ione x-serije, y-serije i z-serije. Slično su aminokiseline za čiju je asignaciju kao najintenzivniji signal (najveći RI i S/N) detektiran x-, y- ili z-ion označene redom kao crvene, zelene i žute. Za asignaciju 11 aminokiselina kao najintenzivniji signal detektiran je y-ion, a za 4 aminokiseline je x-ion detektiran kao najintenzivniji signal. Ukupno je očitana sekvenca od prve do petnaeste aminokiseline od ukupno 20 aminokiselina triptičkog autolitičkog fragmenta T3.

U spektrima triptičkog autolitičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-mp reagensom nije moguće izdvojiti signale konsektivnog slijeda istovrsne serije fragmentnih iona na temelju kriterija najvećeg RI i S/N (slike 4.9. i 4.10. i tablice 4.8. i 4.9.). Istovremena prisutnost signala fragmentnih iona a-, b- i c- serije, odnosno x-, y- i z-serije sa međusobno sličnim RI i S/N, ukazuje na zaključak da obilježavanje peptida CAF-mp reagensom ne usmjerava fragmentacijski put obilježenog peptida, što u konačnici dovodi do interpretativno složenih MS/MS spektra.

Već se i vizualnom usporedbom spektara triptičkog autolitičkog fragmenta T3, obilježenog CAF-op, CAF-mm i CAF-mp reagensima snimljenih u negativnom načinu rada spektrometra masa (slika 4.11.), uočavaju razlike s obzirom na relativne intenzitete i broj prisutnih signala. U MS/MS spektrima peptida obilježenog CAF-op i CAF-mm reagensima, izbor potencijalnih konsektivnih signala istovrsne serije proveden je primjenom kriterija vizualne procjene najvećeg relativnog intenziteta i omjera signala prema šumu. Na ovaj način izabran je konsektivni slijed signala koji čine b-seriju iona.

Interpretacija MS/MS spektra peptida obilježenog CAF-mp reagensom nedvojbeno je znatno složenija nego li u slučaju spektara peptida obilježenih CAF-op i CAF-mm reagensima. Međutim, čak su i spektri peptida obilježenog CAF-mp reagensom pogodniji za iščitavanje sekvence *de novo* u odnosu na spektre neobilježenih peptida (slika 4.1.). Dvije sulfonske skupine u strukturi CAF-mp reagensa (kao i kod CAF-op i CAF-mm reagensa) odgovorne su za efekt detektiranja fragmentnih iona s N-krajem peptida (a-, b- i c-ioni) u negativnom načinu

rada, te fragmentnih ioni sa originalnim C-krajem peptida (x-, y- i z-ioni) u pozitivnom načinu rada spektrometra masa. S druge strane se u slučaju neobilježenog peptida svi fragmentni ioni detektiraju na istom spektru u pozitivnom načinu rada spektrometra masa.



Slika 4.11. MALDI-TOF MS/MS spektri triptičkog autolitičkog fragmenta T3 obilježenog CAF reagensima snimljeni u negativnom načinu rada spektrometra masa: A) obilježen CAF-op reagensom, B) obilježen CAF-mm reagensom i C) obilježen CAF-mp reagensom.

4.2. KARAKTERIZACIJA FRAGMENTACIJSKOG PUTA PEPTIDA OBILJEŽENIH CAF-mm REAGENSOM

Proteinski ekstrakt iz staničnih suspenzija i kolonija stanica *Lactobacillus brevis*, *Arabidopsis thalia*, *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia Coli*, *Enterococcus faecium* i *Pediococcus pentosaceus*, pripremljeni su prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.

Proteinski ekstrakt stanica uzoraka *Arabidopsis thalia*, *Lactobacillus plantarum* i *Escherichia Coli* razdvojeni su 2-D gel elektroforezom, a triptički digesti proteina lizata stanica uzoraka *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium* i *Pediococcus pentosaceus* razdvojeni su tekućinskom kromatografijom obrnutih faza.

Bez obzira na način razdvajanja u konačnici je dobiveno 350 uzoraka smjese triptičkih peptida (150 uzoraka nakon odgradnje proteina iz gela i 200 uzoraka razdvojenih tekućinskom kromatografijom), koji su potom obilježeni CAF-mm reagensom.

Direktna usporedba fragmentacijskog puta CAF-mm reagensom obilježenih peptida i fragmentacijskog puta neobilježenih peptida provedena je na 50 uzoraka triptičkih peptida dobivenih odgradnjom proteina iz gela. Iz spomenutih 50 uzoraka uzet je alikvot direktno za MALDI analizu bez prethodnog obilježavanja CAF-mm reagensom. Naime, iako postoje literaturni podaci karakterizacije fragmentnog puta neobilježenih peptida tokom MALDI analize¹³⁸, ovim pristupom osigurala se istovjetna usporedba karakterizacije fragmentnog puta obilježenih i neobilježenih peptida.

Analiza peptida provedena je prema postupku opisanom u poglavlju 3.6. - *Analiza peptida tehnikama spektrometrije masa*.

Snimljeno je ukupno 6752 MS/MS spektara CAF-mm reagensom obilježenih peptida od čega 3376 MS/MS spektara u pozitivnom načinu rada spektrometra masa (MS/MS^+) i 3376 MS/MS spektara u negativnom načinu rada spektrometra masa (MS/MS^-). Također je snimljeno i 448 MS/MS spektara (u pozitivnom načinu rada) neobilježenih peptida.

Postupak sekvenciranja *de novo* i identifikacije proteina proveden je upotrebom Protein Reader programskog paketa za MS/MS spektre obilježenih peptida, dok je za MS/MS spektre neobilježenih peptida identifikacija proteina i iščitavanje sekvence peptida provedeno klasičnim pute upotrebom ProteinPilot programskog paketa.

Iz 5746 MS/MS spektara CAF-mm reagensom obilježenih peptida (polovicu čine MS/MS^- spektri, a polovicu MS/MS^+ spektara), iščitane su sekvence za 2873 peptida. Za 1006 MS/MS spektara (503 MS/MS^- spektara + 503 MS/MS^+ spektara) iščitavanje slijeda od najmanje 5 aminokiselina nije bilo moguće provesti iz oba MS/MS spektra jer jedan ili oba spektra

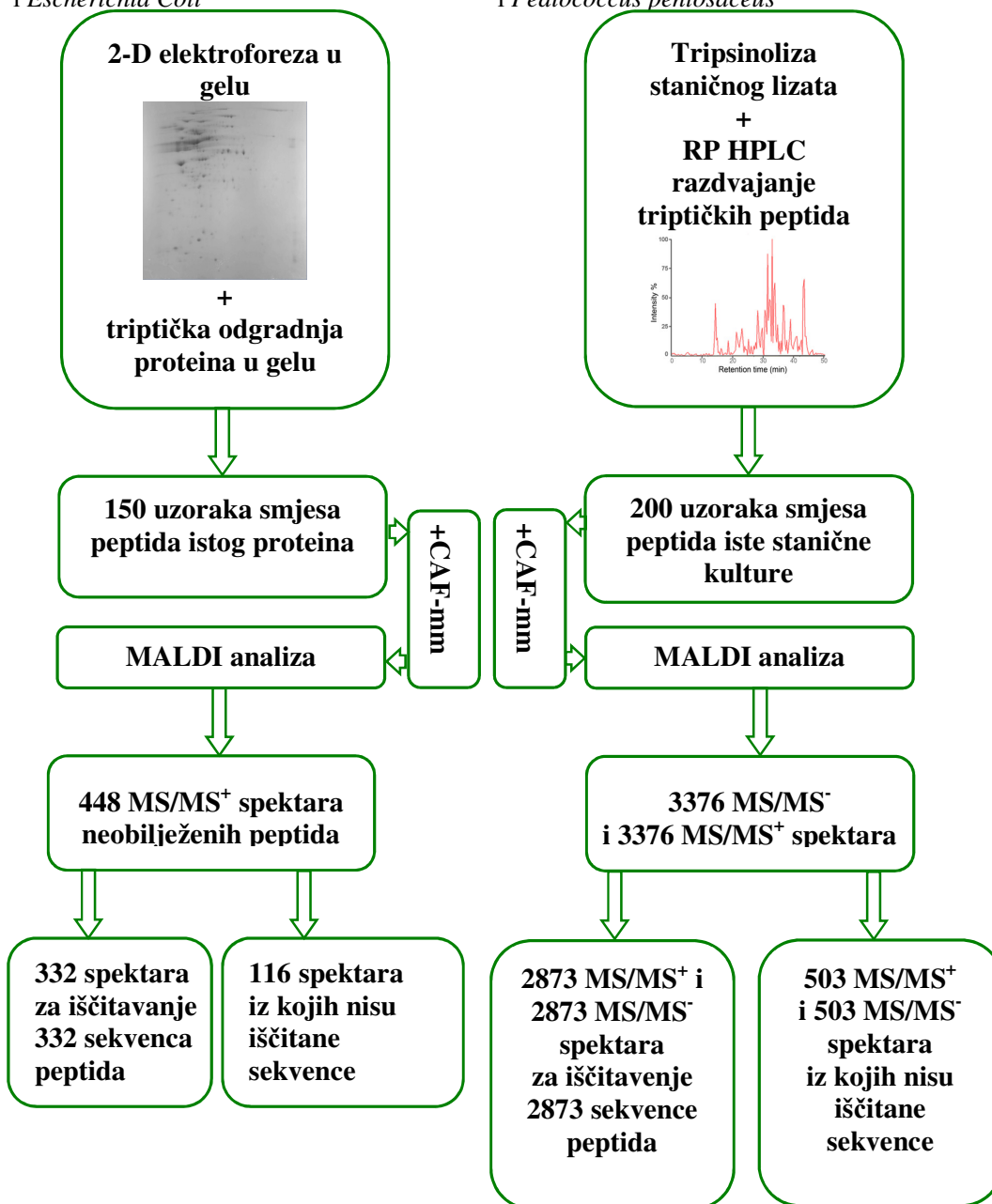
(MS/MS⁺ i MS/MS⁻) su sadržavali signale niskog intenziteta (S/N signala manji od 3). Iz 332 MS/MS spektra neobilježenih peptida iščitana je sekvenca za 232 peptida, dok je iz preostalih 116 MS/MS iščitavanje slijeda od najmanje 5 aminokiselina bilo nemoguće provesti. Detaljan opis provedenog eksperimenta prikazan je na slici 4.12.

Proteini lizata staničnih kultura :

Arabidopsis thaliana, *Lactobacillus plantarum*
i *Escherichia Coli*

Proteini lizata staničnih kultura :

Lactobacillus brevis, *Enterococcus faecium*
i *Pediococcus pentosaceus*



Slika 4.12. Shematski prikaz slijeda eksperimenta za karakterizaciju fragmentacijskog puta peptida obilježenih CAF-mm reagensom i neobilježenih peptida.

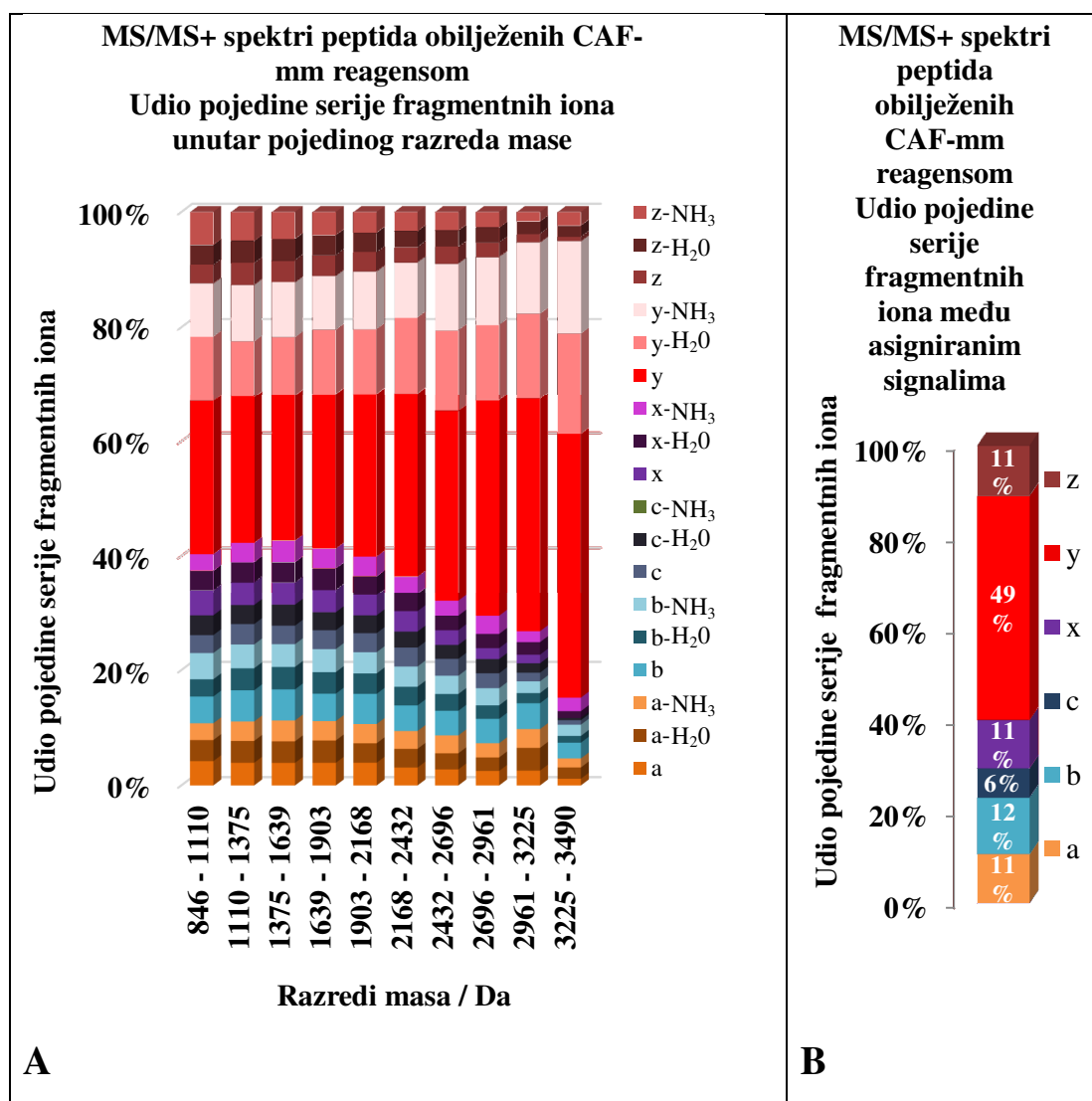
Signali u svim MS/MS spektrima iz kojih su iščitani sljedovi minimalno 5 aminokiselina (5746 MS/MS spektara CAF-mm obilježenih peptida i 332 M/SM spektra neobilježenih peptida) asignirani su kao fragmentni ioni jedne od 18 serija: a, a-NH₃, a-H₂O, b, b-NH₃, b-H₂O, c, c-NH₃, c-H₂O, x, x-NH₃, x-H₂O, y, y-NH₃, y-H₂O, z, z-NH₃, z-H₂O prema postupku opisanom u poglavlju 3.8. – *Karakterizacija fragmentacijskog puta peptida obilježenih CAF-mm reagensom.*

Asignirani signali su klasificirani u 10 jednakih razreda s obzirom na detektirane molekulske mase u ukupnom rasponu od 846 Da do 3490 Da (raspon molekulskih masa se odnosi na masu peptida bez inkrementa uslijed obilježavanja CAF-mm reagensom).

Za svaki od tri vrste snimljenih MS/MS spektara; MS/MS⁺ spektri CAF-mm reagensom obilježenih peptida, MS/MS⁻ spektri CAF-mm reagensom obilježenih peptida, i MS/MS⁺ spektri neobilježenih peptida, dani su prikazi raspodjele udjela pojedine serije fragmentnih iona među asigniranim signalima unutar pojedinog razreda mase i to redom na slikama 4.13.A, 4.14.A i 4.15.A.

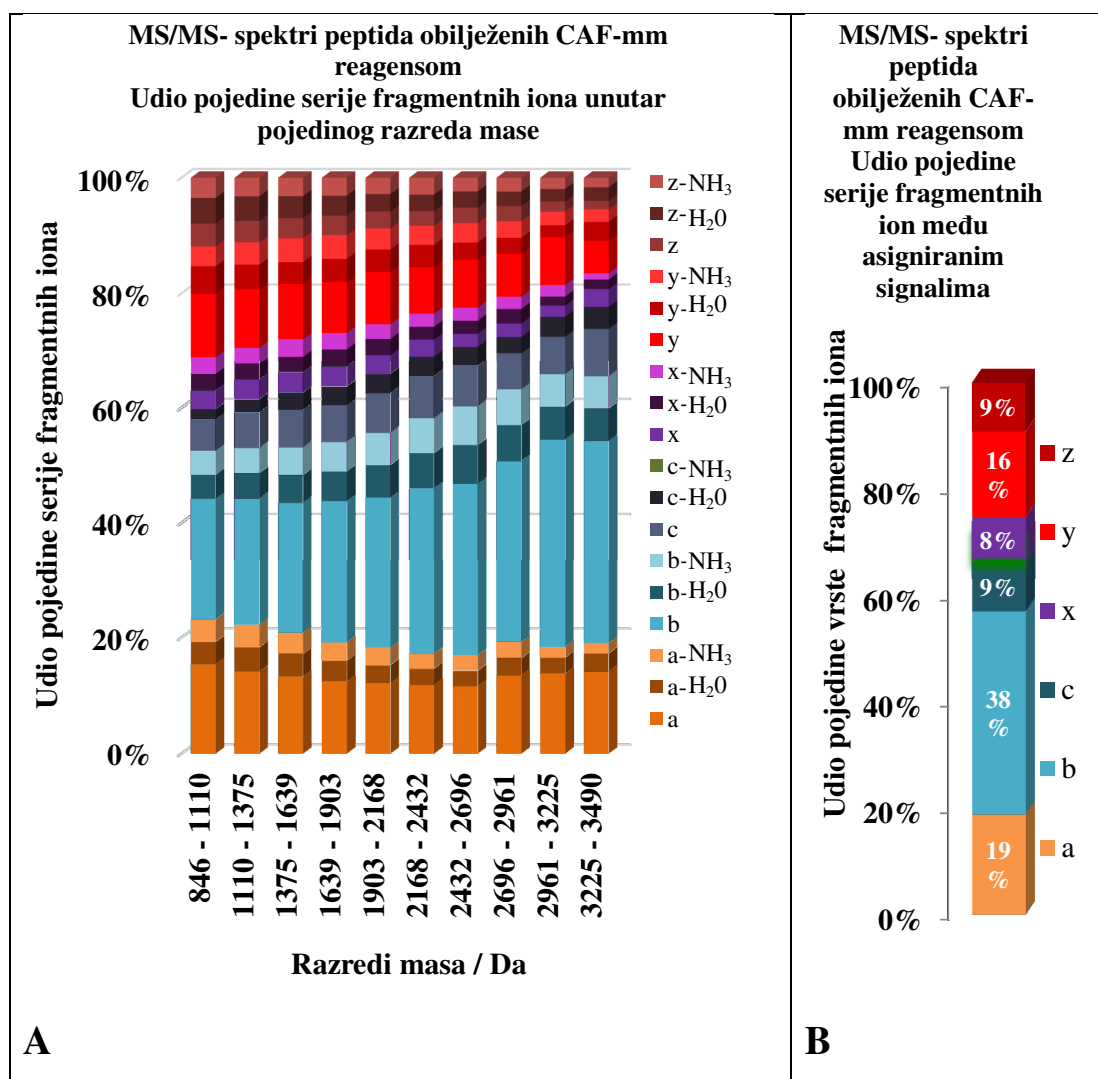
Zbog jednostavnosti prikaza na slikama i 4.13.B, 4.14.B i 4.15.B dani su sumarni prikazi udjela pojedine od šest osnovnih serija fragmentnih iona (a-, b-, c-, x-, y- i z-ioni) među svim asigniranim signalima i to redom za MS/MS⁺ spektre CAF-mm reagensom obilježenih peptida, MS/MS⁻ spektre CAF-mm reagensom obilježenih peptida, i MS/MS⁺ spektre neobilježenih peptida. Asignirani signali raspoređeni su u šest osnovnih serija fragmentnih iona na način da je udio iona u svakoj osnovnoj seriji fragmentnih iona (npr. f) definirana kao zbroj udjela osnovne serije fragmentnih iona (f) i serija fragmentnih iona nastalih neutralnim gubitcima od osnovnog iona (npr. f-NH₃ i f-H₂O). Tako je, primjerice udio fragmentnih iona serije a (na slikama 4.13.B, 4.14.B i 4.15.B) definiran kao zbroj udjela fragmentnih a-, a-NH₃- i a-H₂O-iona itd.

Tablični prikazi podataka sa slika 4.13., 4.14. i 4.15. dani su u dodatku 1.



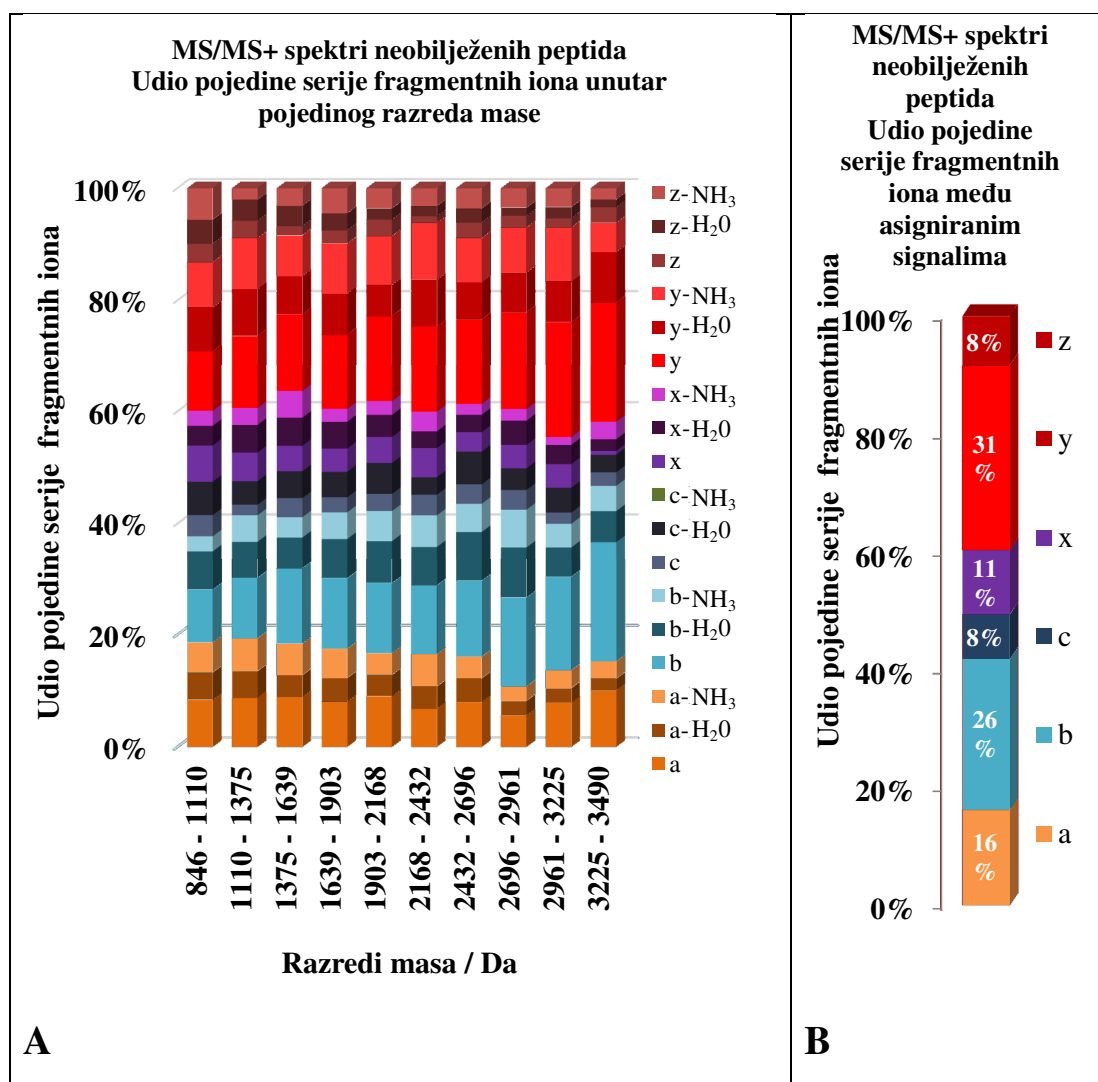
Slika 4.13. Udio pojedine serije fragmentnih iona u MALDI-TOF MS/MS spektrima snimljenim u pozitivnom načinu rada spektrometra masa na triptičkim peptidima obilježenim 5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom

A) raspodjela udjela pojedine od 18 vrsta fragmentnih iona u svakom od 10 razreda detektirane mase, B) raspodjela udjela pojedine od 6 osnovnih (a (=a+a-NH₃+a-H₂O), b (=b+b-NH₃+b-H₂O) c (=c+c-NH₃+c-H₂O), x(=x+x-NH₃+x-H₂O), y(=y+y-NH₃+y-H₂O) i z(=z+z-NH₃+z-H₂O) vrsta fragmentnih iona među svim asigniranim signalima.



Slika 4.14. Udio pojedine serije fragmentnih iona u MALDI-TOF MS/MS spektrima snimljenim u negativnom načinu rada spektrometra masa na triptičkim peptidima obilježenim 5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom

A) raspodjela udjela pojedine od 18 vrsta fragmentnih iona u svakom od 10 razreda detektirane mase, B) raspodjela udjela pojedine od 6 osnovnih ($a (=a+a-NH_3+a-H_2O)$, $b (=b+b-NH_3+b-H_2O)$ $c (=c+c-NH_3+c-H_2O)$, $x (=x+x-NH_3+x-H_2O)$, $y (=y+y-NH_3+y-H_2O)$ i $z (=z+z-NH_3+z-H_2O)$) vrsta fragmentnih iona među svim asigniranim signalima.



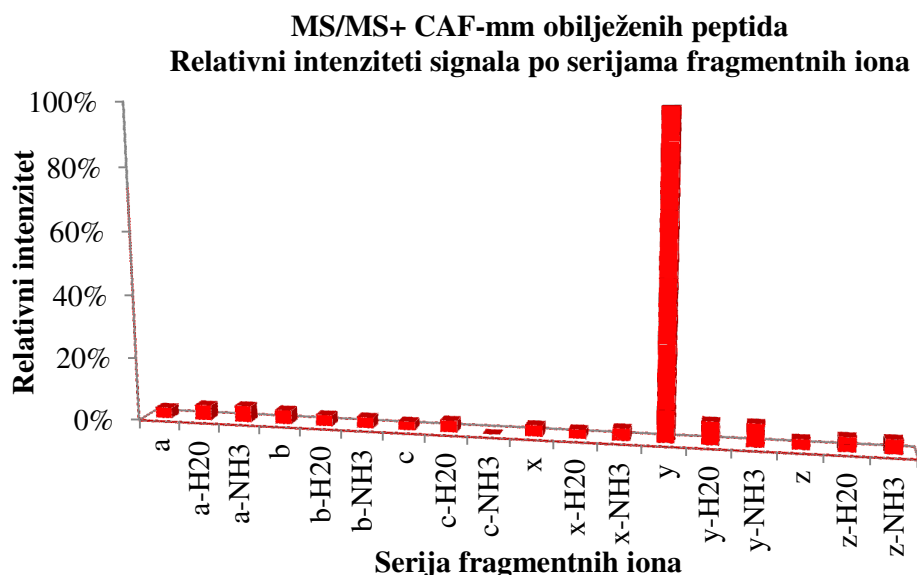
Slika 4.15. Udio pojedine serije fragmentnih iona u MALDI-TOF MS/MS spektrima snimljenim u pozitivnom načinu rada spektrometra masa na neobilježenim triptičkim peptidima

A) raspodjela udjela pojedine od 18 vrsta fragmentnih iona u svakom od 10 razreda detektirane mase, B) raspodjela udjela pojedine od 6 osnovnih (a (=a+a-NH₃+a-H₂O), b (=b+b-NH₃+b-H₂O) c (=c+c-NH₃+c-H₂O), x(=x+x-NH₃+x-H₂O), y(=y+y-NH₃+y-H₂O) i z(=z+z-NH₃+z-H₂O) vrsta fragmentnih iona među svim asigniranim signalima.

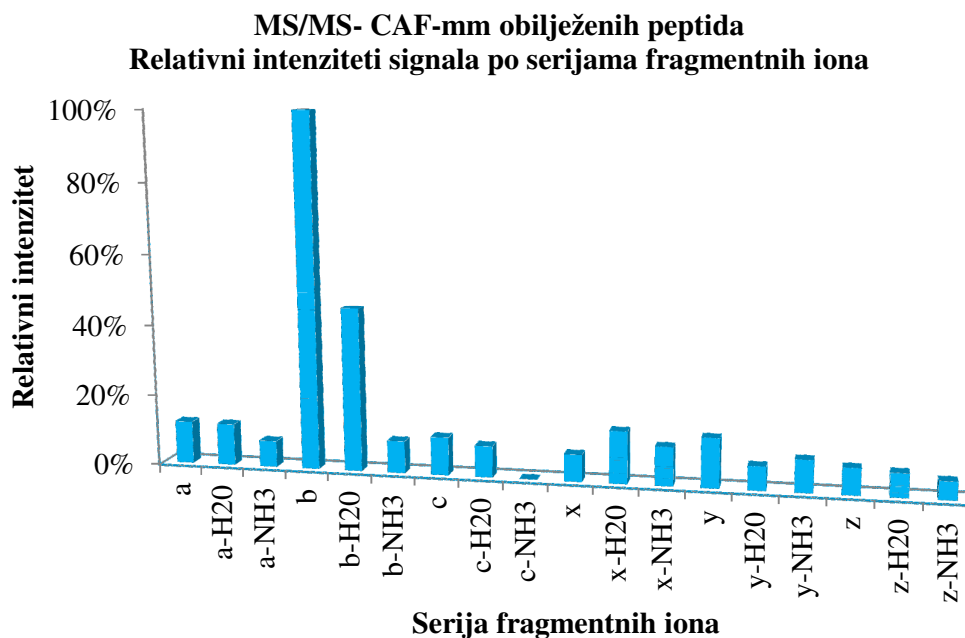
Osim izračuna raspodjele udjela pojedine vrste fragmentnih iona među asigniranim signalima, izračunata je i raspodjela asigniranih signala fragmentnih iona po relativnim intenzitetima. Za sve asignirane signale jedne fragmentne serije zbrojeni su relativni intenziteti signala iz pojedinačnih MS/MS spektara. Protein Reader koristi listu signala sa podacima koje obrađuje Data Explorer programski paket. Data Explorer programski paket za svaki signal u MS/MS spektru računa relativni intenzitet prema najintenzivnijem ionu u spektru, kojem onda pridružuje relativni intenzitet 100%.

Slično je postupkom zbrajanja relativnih intenziteta signala po fragmentnim serijama za fragmentnu seriju s najvećim zbrojem pojedinačnih relativnih intenziteta ($\text{Max}\sum(\text{RI})$) definiran relativni intenzitet od 100%. Za ostale fragmentne serije relativni intenzitet izražen je kao postotak količnika zbroja pojedinačnih relativnih intenziteta svih signala pojedine serije i zbroja pojedinačnih relativnih intenziteta fragmentne serije sa najvećim zbrojem istih ($\text{Max}\sum(\text{RI})$).

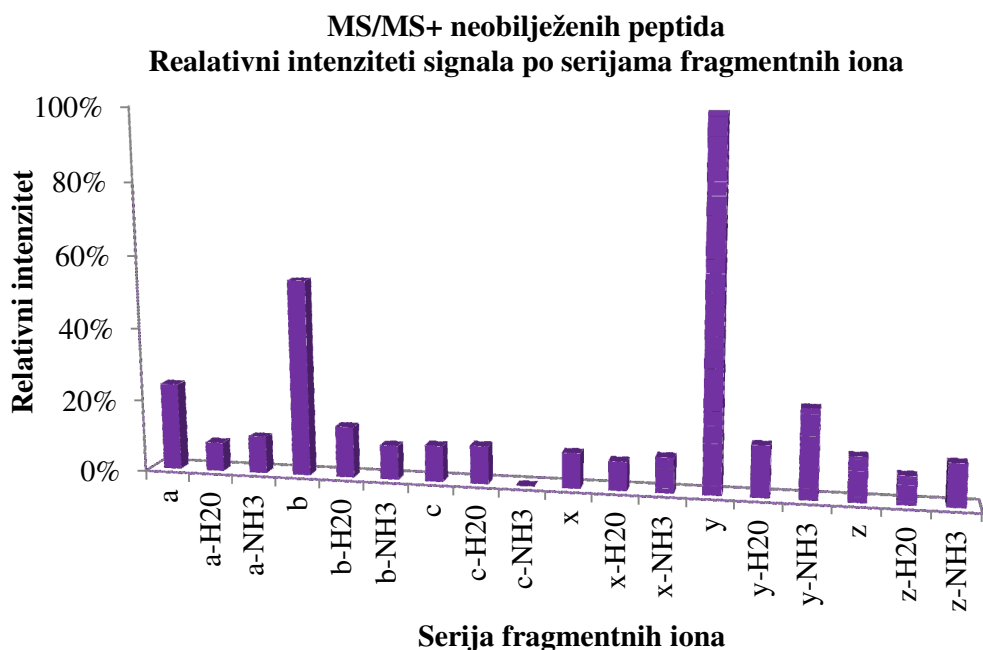
Za svaki od tri vrste snimljenih MS/MS spektara; MS/MS⁺ spektri CAF-mm reagensom obilježenih peptida, MS/MS⁻ spektri CAF-mm reagensom obilježenih peptida, i MS/MS⁺ spektri neobilježenih peptida, dani su prikazi relativnih intenziteta serija fragmentnih iona i to redom na slikama 4.16., 4.17. i 4.18. Tabličan prikaz podataka sa slika 4.16., 4.17. i 4.18. dan je u dodatku 2.



Slika 4.16. Relativni intenziteti asigniranih signala serija fragmentnih iona u MALDI-TOF MS/MS spektrima snimljenim u pozitivnom načinu rada spektrometra masa na triptičkim peptidima obilježenim 5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom (MS/MS⁺ CAF-mm).



Slika 4.17. Relativni intenziteti asigniranih signala serija fragmentnih iona u MALDI-TOF MS/MS spektrima snimljenim u negativnom načinu rada spektrometra masa na triptičkim peptidima obilježenim 5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom (MS/MS⁻ CAF-mm).



Slika 4.18. Relativni intenziteti asigniranih signala serija fragmentnih iona u MALDI-TOF MS/MS spektrima snimljenih u pozitivnom načinu rada spektrometra masa na neobilježenim triptičkim peptidima (MS/MS⁺ neobilježeni).

4.3. IDENTIFIKACIJA PROTEINA SA I BEZ UPOTREBE CAF REAGENSA

Pripremljeni su lizati stanica iz stanične suspenzije *Lactobacillus brevis* L62 (proizvedene na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu) prema postupku opisanom u poglavlju 3.2. – *Uzorci staničnih kultura*.

Proteini ekstrahirani iz staničnog lizata razdvojeni su 2-D gel elektroforezom prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.

Za potrebe jezgrovitog prikaza eksperimenta usporedbe klasičnog postupka identifikacije proteina i identifikacije proteina upotrebom CAF reagensa će se prikazati na 10 reprezentativnih uzoraka, iako je postupak proveden na skupu od 70 uzoraka.

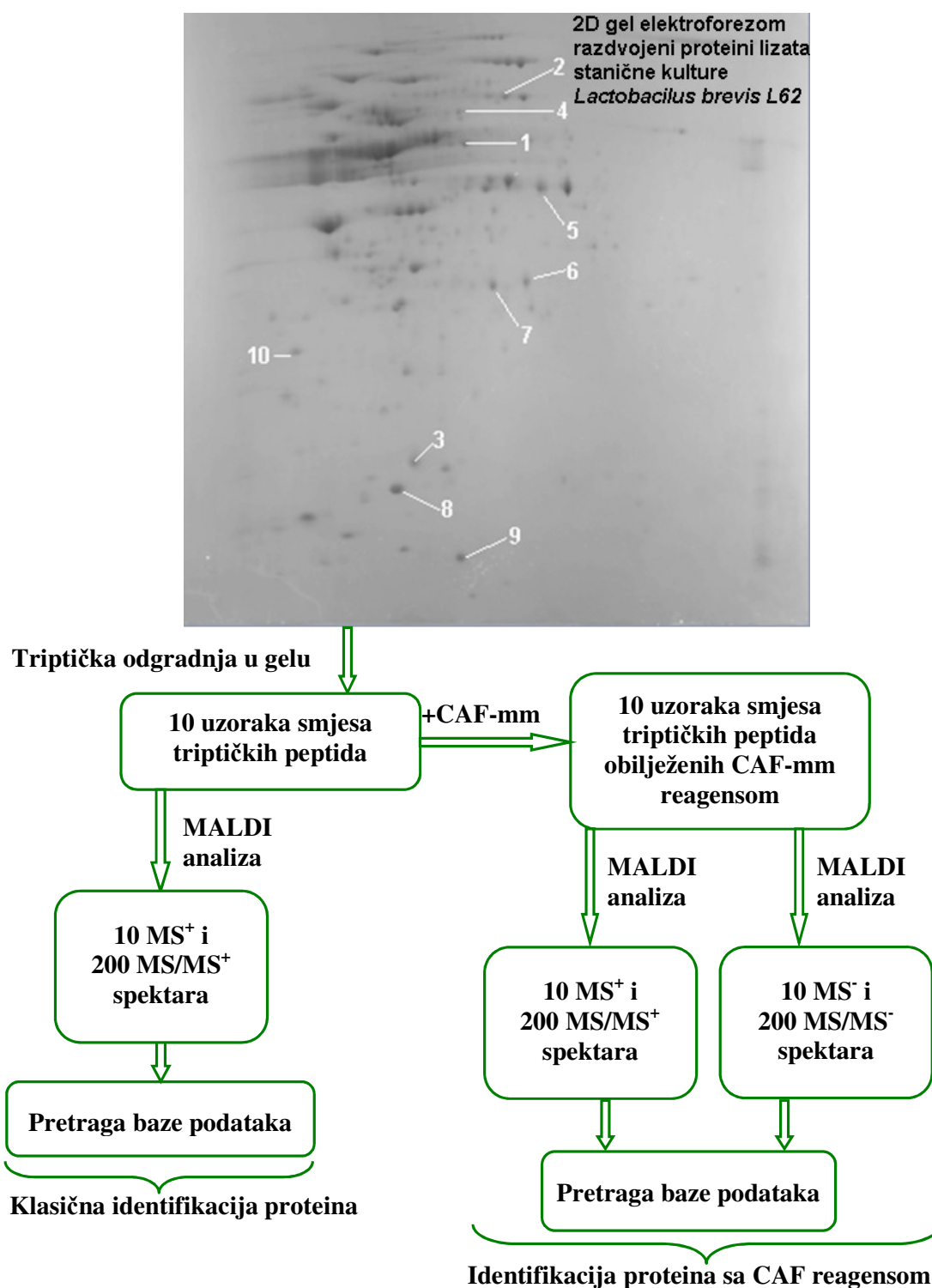
Iz dobivenog 2-D gela izrezano je 10 proteinskih točaka (slika 4.19.), te je postupkom triptičke odgradnje proteina u gelu (postupak opisan u poglavlju 3.4.) dobiveno 10 uzoraka, od kojih svaki predstavlja smjesu triptičkih peptida jedne proteinske točke vizualizirane nakon razdvajanja proteinskog ekstrakta staničnog lizata 2-D gel elektroforezom.

Polovica dobivene količine svakog uzorka direktno je podvrgnuta analizi spektrometrijom masa, a druga polovica količine uzorka je prije analize spektrometrijom masa obilježena CAF-mm reagensom (5-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina) prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.5.

Za neobilježene smjese peptida provedene su MS i MS/MS analize u pozitivnom načinu rada spektrometra masa, dok su MS i MS/MS analize uzoraka smjesa peptida obilježenih CAF-mm reagensom provedene u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa. Ioni prekursori za sve MS/MS analize izabrani su kao 20 najintenzivnijih signala u MS spektru.

Identifikacija proteina je za obilježene i neobilježene uzorke provedena jednako i to klasičnim putem uz upotrebu ProteinPilot programskog paketa za pretragu NCBI-nr baze podataka. Za pretragu spektara dobivenih nakon obilježavanja peptida CAF-mm reagensom uvedena je stalna modifikacija N-kraja definirana kao inkrement mase od 247,9499 (uslijed obilježavanja CAF-mm reagensom). Kao ulazni skup podataka za pretragu baze podataka kod sva tri tipa eksperimenata korišteni su MS (10 spektara) i MS/MS (200 spektara) spektri.

Shematski prikaz eksperimenta dan je na slici 4.19.



Slika 4.19. Shematski prikaz slijeda eksperimenta za identifikaciju proteina klasičnim načinom i uz upotrebu CAF reagensa

Za svaki od tri skupa ulaznih podataka (MS^+ i MS/MS^+ neobilježenih peptida, MS^+ i MS/MS^+ CAF-mm reagensom obilježenih peptida i skup MS^- i MS/MS^- CAF-mm reagensom obilježenih peptida), dana je lista identificiranih proteina u tablici 4.10. Popis u tablici sadrži prvi identificirani protein za kojeg je dobiven najveći *Mascot MS score*, tj. navedeni protein je identificiran s najvećom vjerojatnošću za svaku od 10 proteinskih točaka označenih na 2-D gelu (slika 4.19.).

Tablica 4.10. Popis identificiranih proteina stanične kulture *Lactobacillus brevis*. Postupak pripreme i načina identifikacije za svaku od 10 točaka (uzoraka) opisan je na slici 4.19.

Eksperiment Točka	Neobilježeni peptidi	CAF-mm reagensom obilježeni peptidi	
	MS^+ i MS/MS^+	MS^+ i MS/MS^+	MS^- i MS/MS^-
1	adenylosuccinate lyase <i>Gemella haemolysans</i> ATCC 10379	DNA-directed RNA polymerase subunit beta <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	DNA-directed RNA polymerase subunit beta <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367
2	putative phosphoketolase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	putative phosphoketolase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	putative phosphoketolase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367
3	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367
4	pyruvate kinase <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	pyruvate kinase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	pyruvate kinase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367
5	chaperone GroEL <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	chaperone GroEL <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	chaperone GroEL <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367
6	NAD(FAD)-dependent dehydrogenase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	NAD(FAD)-dependent dehydrogenase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	NAD(FAD)-dependent dehydrogenase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367
7	acetoin dehydrogenase complex, E1 component, alpha subunit <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	acetoin dehydrogenase complex, E1 component, alpha subunit <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	acetoin dehydrogenase complex, E1 component, alpha subunit <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367
8	elongation factor Tu <i>Lactobacillus</i> sp. 1.142	elongation factor Tu <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	elongation factor Tu <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367
9	alcohol dehydrogenase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	alcohol dehydrogenase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	alcohol dehydrogenase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367
10	aldo/keto reductase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	aldo/keto reductase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	aldo/keto reductase <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367

Vrsta identificiranih proteina, u smislu funkcionalnosti proteina, se podudara u 9 od 10 uzoraka (za sve osim uzorka 1). Međutim, u slučaju eksperimenata sa peptidima obilježenim CAF reagensom za svih 10 proteina identificiran je protein koji zaista pripada proteomu *Lactobacillus brevis*, dok je u slučaju klasičnog pristupa za 4 proteina identificiran protein druge srodne bakterijske vrste ili soja. Svih 10 identificiranih proteina pripadaju skupinama proteina sa visokokonzerviranim slijedom aminokiselina, gdje su razlike u slijedu aminokiselina među bakterijskim vrstama minimalne. Stoga su dobiveni rezultati u skladu sa postavljenom hipotezom istraživanja da se jedino iščitavanjem aminokiselinskog slijeda jednoznačno može odrediti protein i biološka vrsta iz koje protein proističe.

Identifikacija proteina pokrenuta je Mascot algoritmom korištenjem istovremeno MS i MS/MS spektara (tzv. MS+MS/MS analiza). Za ovakav način pretrage algoritam računa kvalitetu pronalaska proteina (tj. točnost identifikacije proteina), dodjeljujući svakom pronalasku određeni broj bodova (engl. *score*) i to iz MS i MS/MS spektara. Tako se kao rezultat pretrage baze podataka osim identificiranih proteina dobiju i vrijednosti koje govore o kvaliteti identifikacije, a to su *MS score* i *MS/MS score*. *MS score* je broj bodova koji istovremeno govori o kvaliteti preklapanja liste pikova iz MS spektra s *in silico* MS listom pikova (PMF, engl. *Peptide mass fingerprinting*) i liste pikova iz MS/MS spektara s *in silico* listom pikova fragmentnih iona peptida (PFF, engl. *Peptide fragmentation fingerprinting*). *MS/MS score* je broj bodova koji govori samo o kvaliteti preklapanja liste pikova iz MS/MS spektara s *in silico* listom pikova fragmentnih iona peptida (PFF). Zato su *MS score* vrijednosti uvijek veće nego li *MS/MS score* vrijednosti. Vrijednost *MS/MS score* 0 ukazuje da niti jedna dobivena lista MS/MS spektara (20 lista po uzorku) nije preklapljen sa *in silico* listom fragmentnih iona peptida proteina identificiranog iz MS spektra.

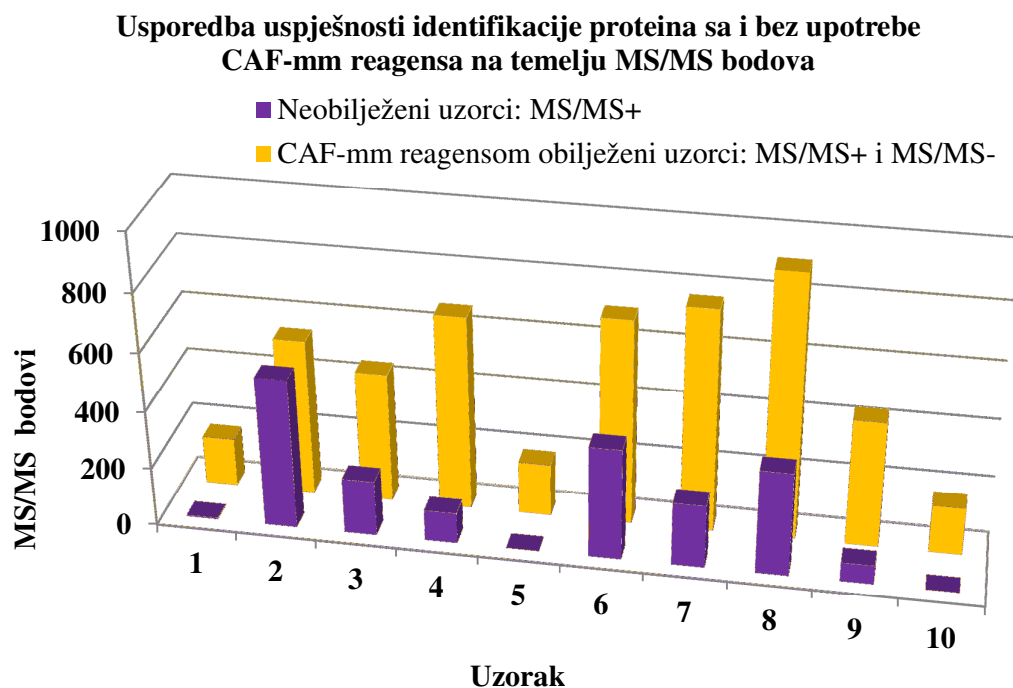
Pojednostavljeno gledano *Mascot MS/MS score* prikazuje koliko je *in silico* fragmentnih iona peptida pronađeno u eksperimentalno dobivenom MS/MS spektru. Obilježavanjem peptida sa CAF reagensom dolazi do razvrstavanja serija fragmentnih iona na dva spektra, jer su serije fragmentnih iona s originalnim N-krajem peptida zastupljene u MS/MS⁻ spektru, a one s originalnim C-krajem u MS/MS⁺ spektru. Mascot nije prilagođen da zbraja signale iz MS/MS⁻ i MS/MS⁺ spektara i promatra ih kao jedan MS/MS spektar. Stoga je za uzorke obilježene CAF reagensom potpuno opravdano promatrati zbroj MS/MS bodova dobivenih za eksperimente u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa kao MS/MS bodove za obilježene peptide.

Na slici 4.20. dana je prikaz MS/MS bodova za eksperiment proveden na neobilježenom uzorku i CAF-mm reagensom obilježenom uzorku za svaki od 10 uzoraka. Za prikaz su

korišten MS/MS bodovi za CAF obilježene uzorke izračunat kao zbroj MS/MS bodova u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa.

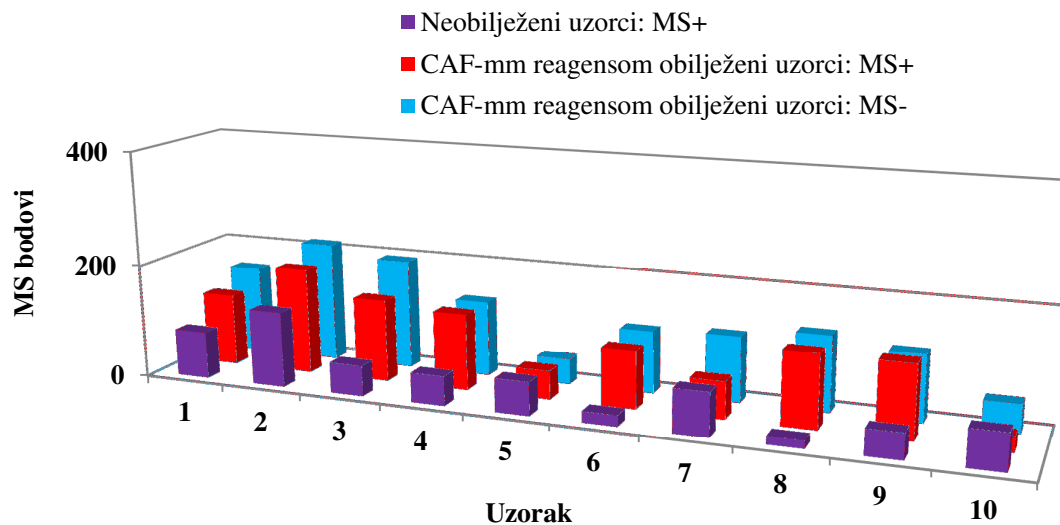
Na slici 4.21. dan je prikaz MS bodova za eksperiment proveden na neobilježenom uzorku i CAF-mm reagensom obilježenom uzorku za svaki od 10 uzoraka. Za CAF obilježene uzorke posebno je prikazana usporedba MS bodova dobivenih identifikacijom iz MS spektara snimljenih u pozitivnom načinu, a posebno iz MS spektara snimljenih u negativnom načinu rada spektrometra masa.

Detaljne liste identificiranih proteina sa MS i MS/MS bodovima (*Mascot MS i MS/MS score*) za svaki od 10 uzoraka dane su u dodatku 3 (tablice 9.5 9.14). Tablični prikaz podataka sa slike 4.20. i. 4.21. dan je u tablici 9.15. dodatka 3.



Slika 4.20. Usporedba MS/MS bodova kao pokazatelja kvalitete pronalaska identificiranog proteina za neobilježene uzorke (oznaka ljubičastom bojom) i uzorke obilježene CAF-mm reagensom (oznaka žute boje). MS/MS bodovi za CAF-mm reagensom obilježene uzorke izračunati su kao zbroj MS/MS bodova dobivenih za MS/MS⁺ i MS/MS⁻ spektre.

Kvaliteta pronalaska identificiranog proteina sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa na temelju MS bodova



Slika 4.21. Usporedba MS bodova kao pokazatelja kvalitete pronalaska identificiranog proteina za neobilježene uzorke (oznaka ljubičaste boje) i uzorke obilježene CAF-mm reagensom (oznake crvene i plave boje). MS bodovi dobiveni identifikacijom na temelju MS spektara snimljenih u pozitivnom načinu rada spektrometra masa CAF-mm obilježenih uzoraka prikazani su crvenom bojom, a MS bodovi dobiveni identifikacijom na temelju MS spektara snimljenih u negativnom načinu rada spektrometra masa CAF-mm obilježenih uzoraka prikazani su plavom bojom.

5. RASPRAVA

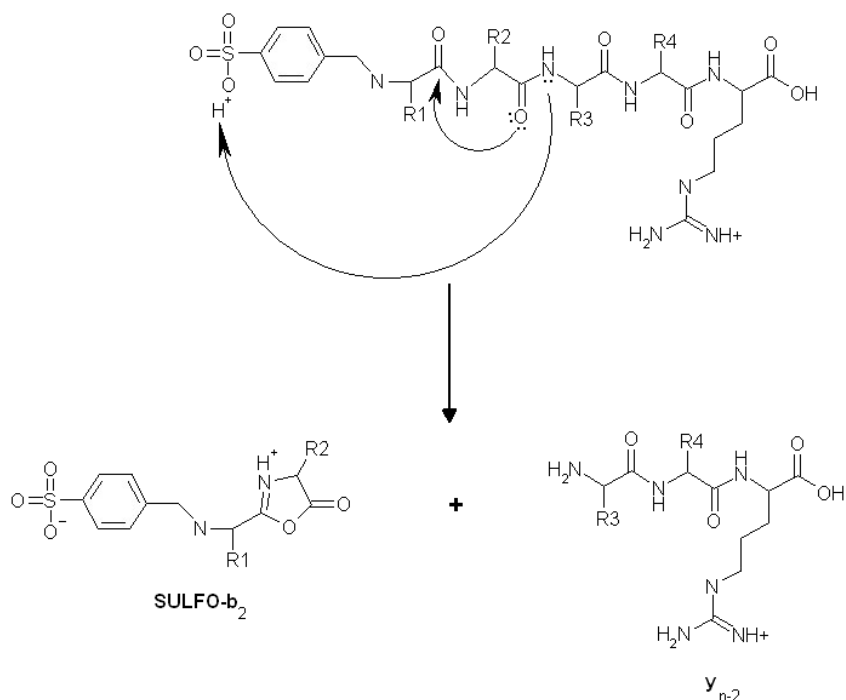
Nedvojbeno interpretacija spektra fragmentnih iona peptida okosnica je uspješnosti postupka sekvenciranja peptida i proteina *de novo*. Gledano sa stajališta spektrometrije masa, sekvenciranje peptida *de novo* predstavlja iščitavanje aminokiselinske sekvence iz MS/MS spektra peptida bez upotrebe proteinskih i peptidnih baza podataka.

Klasičnom MS/MS analizom dobiva se interpretativno vrlo složen spektar fragmentnih iona. Interpretativnost MS/MS spektara složena je iz više razloga. Jedan od njih je i fragmentabilnost peptidnih iona (osobito jednostruko nabijenih), što rezultira signalima slabog ili neujednačenog omjera signala prema šumu (S/N), a time i značajnim pogreškama u očitavanju masa. Nadalje, kompleksnost MS/MS spektara uvjetuje neusmjeren put fragmentacije peptidnih iona tijekom fragmentacije u kolizijskoj ćeliji, koji vodi ka nastanku nepotpunih nizova fragmentnih iona različitih serija. Budući da fragmentacijski put peptida ovisi o instrumentalnim uvjetima, ali i o sastavu i redoslijedu aminokiselina pojedinog peptida, sigurno i nedvojbeno prepoznavanje fragmentacijskog puta nepoznatog peptida je nemoguće. Međutim, određene kemijske modifikacije peptida mogu pospješiti predominantno usmjeravanje fragmentacijskog puta. Postupak u kojem se uslijed kemijske promjene peptida (derivatizacije) povećava razina usmjerene fragmentacije peptida u predvidljivom fragmentacijskom putu, naziva se kemijski aktivirana fragmentacija (CAF, engl. *Chemically Activated Fragmentation*) ili kemijski pomognuta fragmentacija (CAF, engl. *Chemically Assisted Fragmentation*). CAF omogućava dobivanje MS/MS spektara koji uglavnom sadrže više ili manje cjeloviti niz fragmentnih iona iste serije, pa su stoga interpretativno znatno jednostavniji nego li oni dobiveni klasičnim putem.

U ovom radu napravljena je detaljna studija upotrebe novosintetiziranih CAF reagensa u svrhu sekvenciranja peptida *de novo*. Novi reagens za kemijski aktiviranu fragmentaciju zamišljen je na način da bude dvostruko CAF aktivan, tj. da daje dominantnu seriju jednog tipa iona u pozitivnom načinu rada spektrometra masa, te drugog tipa iona u negativnom načinu rada spektrometra masa. Obzirom na ostala kemijska svojstva, zamišljeno je da postupak derivatizacije bude selektivan, tj. da se obilježavanje provodi samo na N-kraju peptida te da reakcijom ne dolazi do znatne degradacije uzorka. Sve spomenute zahtjeve zadovoljavaju reagensi sa dvije sulfonske skupine i aldehidnom reaktivnom skupinom.

5.1. KEMIJSKI AKTIVIRANA FRAGMENTACIJA (CAF) PEPTIDA OBILJEŽENIH REAGENSIMA SA DVIJE SULFONSKE SKUPINE

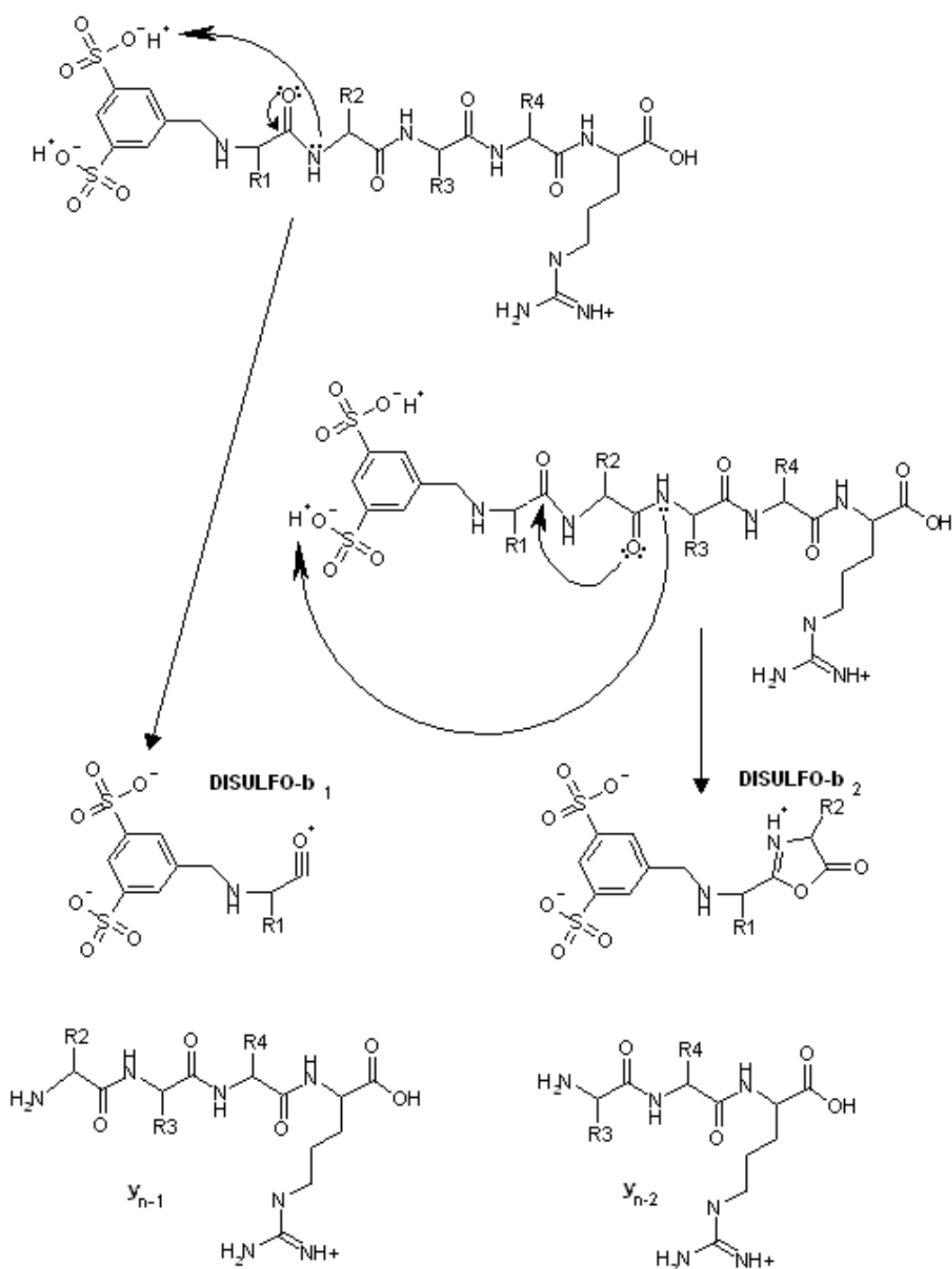
U dosadašnjim istraživanjima N-sulfoniranje peptida je pokazalo najučinkovitiji doprinos cijepanju peptida u spektrometriji masa jer se uvođenjem sulfonske skupine na N-kraj peptida postiže usmjereno cijepanje peptidnih iona. Naime, sulfonska skupina kao nositelj negativnog naboja omogućava nastanak nedetektabilnih Zwitteriona fragmentnih serija sa zadržanim N-krajem peptida (a-, b- i c-serije), što rezultira nastankom spektra pročišćenim od iona a-, b- i c-serije, odnosno spektrom u kojem su predominantno prisuti ioni x-, y- i z-serija. Najčešće korišteni reagens sa sulfonskom skupinom je SPITC (4-sulfofenil-izotiocijanat) reagens. Mehanizam fragmentacije triptičkog peptida obilježenog SPITC dan je na slici 5.1. Kako je najbazičnija skupina peptida (lizin ili arginin na C kraju triptičkog peptida) već protonirana, sljedeće pogodno protonacijsko mjesto je amidni dušik peptidne okosnice (na slici 5.1. protoniran je amidni dušik peptidne okosnice). Stoga je fragmentacija usmjerena ka disocijaciji peptidne veze, što rezultira nastankom iona b- i y-serije. Pri tome sulfonska skupina donira labilni proton amidnom dušiku peptidne okosnice. Posljedično, nukleofilnim napadom karbonilnog kisika peptidne veze na amidni ugljik uz protonirani amidni dušik, dolazi do nastanka oksazolon derivata (b-ion) i krnjeg peptidnog iona (y-ion), kako je prikazano na slici 5.1.



Slika 5.1. Mehanizam fragmentacije SPITC obilježenog triptičkog peptida

Na slici 5.1. prikazan je mehanizam nastanka b_2 - i y_{n-2} -iona, gdje je proton sulfonske skupine doniran drugom amidnom dušiku peptidne okosnice. Prema navedenom mehanizmu proton se može donirati bilo kojem od amidnih dušika peptidne okosnice, što pospješuje nastanak b- i y-iona. Nastali oksazolon derivati (fragmentni ioni b-serije) su Zwitterioni te kao takvi nisu detektabilani u spektrometru masa. Posljedično, u spektru fragmentnih iona SPITC obilježenih triptičkih peptida, y-serija iona ima najveću zastupljenost. Kako ioni y-serije zadržavaju C-kraj peptida te stoga nisu SPITC obilježeni, u spektru fragmentnih iona nema zamjetnih promjena vezanih uz inkremente masa y-serije iona. Drugim riječima, iako su peptidni ioni SPITC obilježeni, osim davanju na izražaju y-serije iona u odnosu na ostale ionske serije, nema nikakvih drugih zamjetnih promjena nastalih uslijed SPITC obilježavanja. U konačnici, SPITC obilježavanje peptida rezultira pročišćenim te stoga interpretativno jednostavnijim spektrom fragmentnih iona.

Uzimajući u obzir ove spoznaje, bilo je za očekivati da bi uvođenje još jedne sulfonske skupine u strukturu reagensa za obilježavanje peptida, doprinijelo još izražajnijim učinkom usmjerenja cijepanja peptidnih iona u smjeru nastanka y-serije iona u pozitivnom načinu rada spektrometra masa te b-serije iona u negativnom načinu rada spektrometra masa. Prema prethodnom mehanizmu (slika 5.1.), predviđena je i fragmentacija triptičkog peptida obilježenog reagensom sa dvije sulfonske skupine. Kao primjer je na slici 5.2. dan shematski prikaz fragmentacije triptičkog peptida obilježenog sa 5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom, odnosno CAF-mm reagensom.



Slika 5.2. Mehanizam fragmentacije triptičkog peptida obilježenog CAF reagensom. Primjer je dan za 5-formil-1,3 benzen-di-sulfoničnu kiselinu (CAF-mm reagens)

Labilni protoni sulfonskih skupina su donirani amidnim dušicima ili karbonilnom kisiku peptidne okosnice jer su bazičnija mjesta peptida (bočni ogranci lizina ili arginina na C-kraju) već protonirana. Uvođenjem dvije sulfonske skupine u strukturu reagensa za obilježavanje

peptida udvostručio se broj labilnih protona. Na slici 5.2. prikazan je mehanizam nastanka b_1 - i y_{n-1} -, te b_2 - i y_{n-2} - iona. Bilo koji od dvaju protona dviju sulfonskih skupina može biti doniran amidnom dušiku peptidne okosnice.

Nukleofilnim napadom karbonilnog kisika na amidni ugljik protonirane peptidne veze, (kako je prikazano na slici 5.2.), dolazi do nastanka oksazolon iona. U slučaju nastanka b_1 -iona kada ne postoji raspoloživi karbonilni ugljik, proton ostaje zadržan na karbonilnom kisiku.

Sa dvije deprotonirane sulfonske skupine i pozitivnim nabojem na karbonilnom kisiku b_1 ion je ukupno negativno nabijen. Shodno nastanku b_1 -iona, dvije deprotonirane sulfonske skupine i proton na amidnom dušiku čine i b_2 - b_n - ione ukupno negativno nabijenima. Zbog navedenih razloga, cjelokupnu b-seriju iona je moguće detektirati u negativnom načinu rada spektrometra masa.

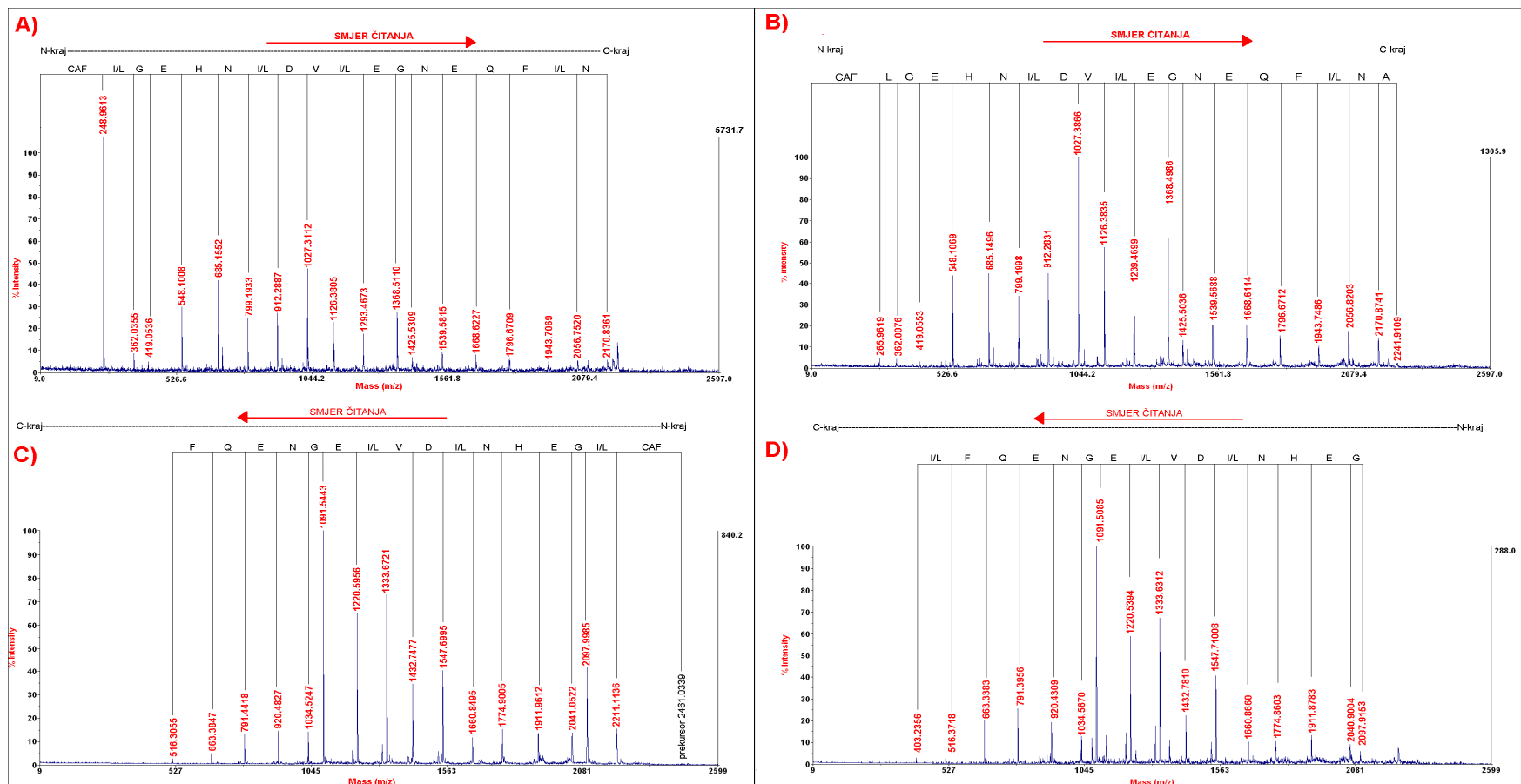
Nastali ioni y-serije, koji zadržavaju pozitivan naboj na bočnim ograncima lizina ili arginina sa C-kraja vidljivi su u pozitivnom načinu rada spektrometra masa.

Ioni b-serije, za razliku od iona y-serije u svojoj strukturi zadržavaju CAF reagens. Unatoč povećanju mase peptidnog b-iona uslijed obilježavanja CAF reagensom, razlike masa susjednih signala ostaju jednake. Zato modifikacija N-kraja peptida ne utječe na postupak iščitavanja aminokiselinskog slijeda *de novo*.

Točnost hipoteze prema kojoj dvije sulfonske skupine omogućavaju nastanak negativno nabijenih iona b-serije i pozitivno nabijenih iona y-serije, potkrepljuju spektri fragmentnih iona triptičkog peptida obilježenog CAF reagensom u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa (spektar triptičkog autolitičkog fragmenta T3 obilježenog CAF-op derivatizacijskim reagensom i CAF-mm derivatizacijskim reagensom prikazani su na slici 5.3.).

Oduzimanjem m/z signala konsektivne b-serije iona iz spektara snimljenih u negativnom načinu rada spektrometra masa (slika 5.3.A i 5.3.B), u smjeru čitanja s lijeva na desno, iščitava se aminokiselinska sekvenca peptida sa N- prema C-kraju.

Istovremeno se čitajući s desna na lijevo oduzimanjem m/z signala konsektivne y-serije iona iz spektra snimljenog u pozitivnom načinu rada spektrometra masa (slika 5.3.C i 5.3.D) također iščitava aminokiselinska sekvenca peptida sa N- prema C-kraju.



Slika 5.3. Sekvenciranja peptida obilježenih CAF reagensima *de novo* iz MALDI-TOF MS/MS spektara. A) MS/MS⁺ spektar peptida obilježenog CAF-op reagensom, B) MS/MS⁺ spektar peptida obilježenog CAF-mm reagensom, C) MS/MS⁻ spektar peptida obilježenog CAF-op reagensom, B) MS/MS spektar peptida obilježenog CAF-mm reagensom.

5.2. USPOREDBA TRIJU CAF REAGENSA U SVRHU SEKVENCIRANJA PEPTIDA *DE NOVO*

Za usporedbu triju CAF reagensa (CAF-op, CAF-mm i CAF-mp) u svrhu sekvenciranja peptida *de novo* provedeno je iščitavanje na peptidu poznatog slijeda aminokiselina.

Kao modelni peptid za potrebe ovog rada uzet je triptički autolitički fragmenta T3 te je nakon obilježavanja reagensima provedeno ručno sekvenciranje *de novo* iz spektara fragmentnih iona snimljenih u pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa. Spektri su dani na slikama 4.5.- 4.10.

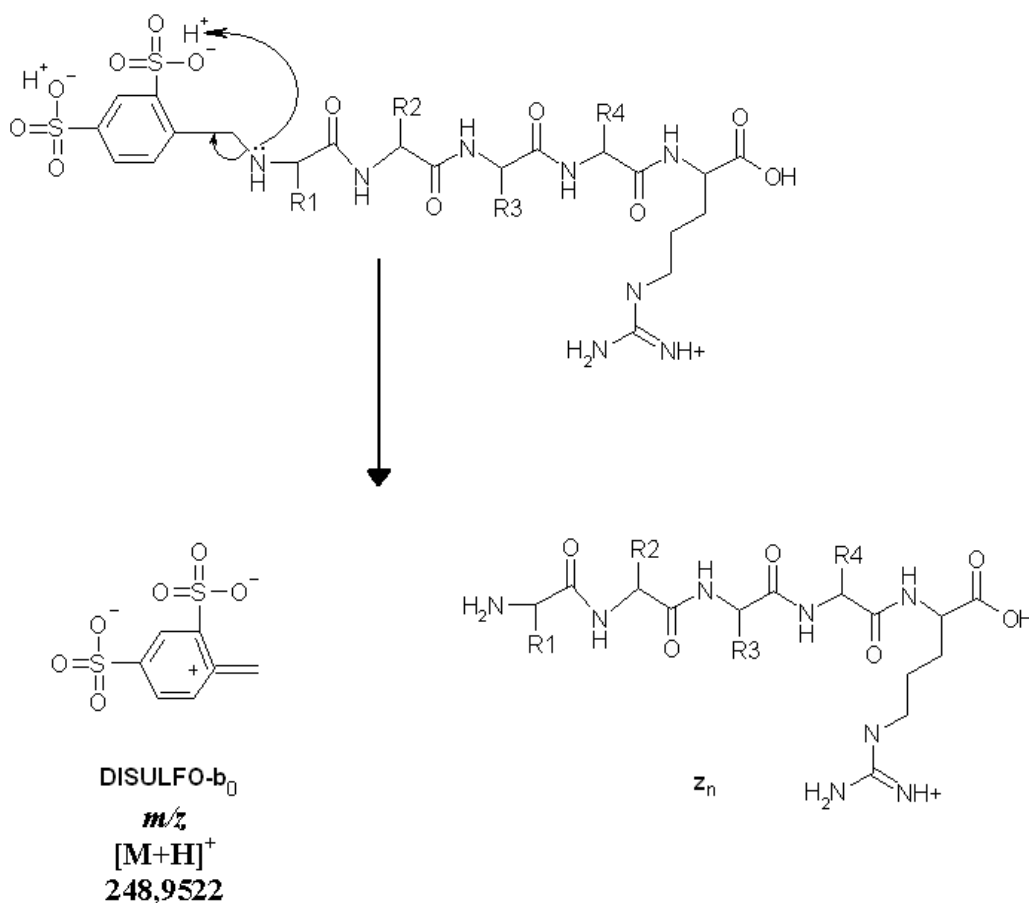
Obradom spektara uočeno je kako se aminokiselinska sekvenca iščitava jednoznačno izračunom uz pomoć razlike masa susjednih signala (iona), koje odgovaraju masama pojedinih aminokiselina. Takav način iščitavanja vrijedi za spektre u negativnom i pozitivnom načinu rada spektrometra masa, u slučaju peptida obilježenog sa CAF-op i CAF-mm derivatizacijskim reagensom. Međutim u slučaju peptida obilježenog sa CAF-mp derivatizacijskim reagensom, spektri fragmentnih iona u pozitivnom, a osobito u negativnom načinu rada spektrometra masa, sadrže intenzivne signale, koji se ne mogu jednoznačno asignirati kao ioni određene fragmentne serije (slike 4.9. i 4.10.). Stoga gotovo nije moguće prepoznati koji signali pripadaju konsektivnom slijedu iste serije fragmentnih iona, pa je i iščitavanje aminokiselinske sekvence otežano i podložno pogreškama.

Analizom spektara fragmentnih iona snimljenih u pozitivnom i negativnom načinu rada peptida obilježenog sa CAF-mp reagensom uočeno je postojanje znatnog broja fragmentnih iona a-, b- i c-serija (u negativnom načinu rada), te x-, y- i z-serija (u pozitivnom načinu rada), kako je prikazano u tablicama 4.8. i 4.9. Postojanje navedenih iona upućuje na zaključak da se fragmentacija triptičkog peptida obilježenog CAF-mp reagensom ne odvija samo po mehanizmu opisanom na slici 5.2., odnosno da fragmentacija nije usmjerena isključivo ka disocijaciji peptidne veze. Razlog se vjerojatno nalazi u činjenici da dvije sterički bliske sulfonske skupine na benzenskom prstenu formiraju persulfat. Poznato je da pri uvjetima MALDI eksperimenta dolazi do fotodisocijacije i termičkog raspada persulfata te formiranja persulfatnog radikala.⁶² Persulfatni radikal koji se formira uslijed laserskog zračenja uzrokuje nasumično cijepanje peptidne ali i drugih veza unutar peptida, te su stoga u spektru prisutni ioni različitih serija.

Zbog neusmjerenog fragmentacijskog puta uslijed nastanka persulfatnog radikala, 4-formil-1,2-benzen-di-sulfonična kiselina (CAF-mp reagens) nema poželjna svojstva reagensa za kemijski aktiviranu fragmentaciju.

Kod CAF-op reagensa uočena je znatna degradacija obilježenog uzorka primjenom uvjeta MALDI eksperimenta, dok sličan efekt nije uočene za uzorke obilježene CAF-mm reagensom. Naime, prilikom primjene laserskog zračenja kod MALDI eksperimenta, kamera koja snima mjesto na pločici gdje je uzorak nanesen u suvišku matrice omogućila je vizualno opažanje utroška uzorka primjenom laserske zrake. Sulfonske skupine na obilježenim peptidima čine uzorak pogodnijim za MALDI ionizaciju jer ne dolazi do čvrste hidrofobne interakcije peptida i MALDI pločice, kao što je to uobičajeno kod neobilježenih peptida. Primjenom laserskog zračenja povećana količina uzorka se desorbira, odnosno nepovratno gubi. Efekt je manje uočljiv na uzorcima obilježenim CAF-mm reagensom jer simetričan raspored sulfonskih skupina uz njihovu veću steričku udaljenost od peptida omogućava veći broj hidrofobnih interakcija peptida i MALDI pločice, odnosno bolje prijanjanje uzorka za pločicu.

U MS/MS spektrima snimljenim u negativnom načinu rada kod peptida obilježenih sa CAF-op reagensom, uočava se dominantan i često najintenzivniji signal u spektru sa m/z 248,95 koji odgovara b-ionu samog CAF-op reagensa (b_0 ion). Struktura i mehanizam nastanka b_0 CAF-op i y_n iona dani su na slici 5.4.

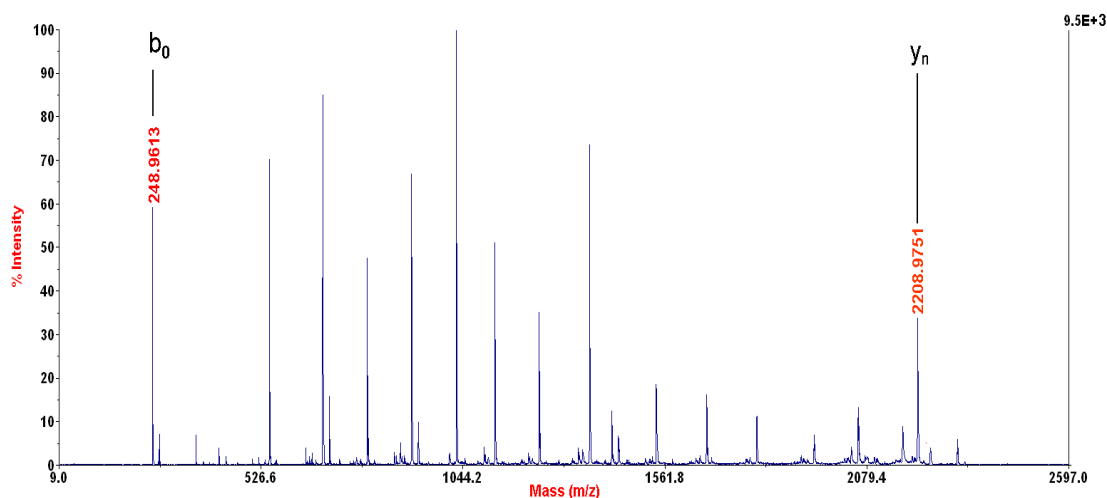


Slika 5.4. Mehanizam fragmentacije triptičkog peptida obilježenog CAF-op reagensom – disocijacija CAF-op reagensa sa obilježenog peptida

Prilikom fragmentacije izabranog iona prekursora u kolizijskoj ćeliji dolazi do disocijacije energetski najslabije veze. Zbog *orto*, *para* rasporeda sulfonskih skupina u odnosu na reaktivnu skupinu CAF-op reagensa, kovalentna veza nastala između peptida i reagensa je energetski destabilizirana jer sulfonska skupina u *orto* položaju sterički pogoduje protonaciji obližnjeg amina i time odcjepljenju reagensa, dok istovremeno sulfonska skupina u *para* položaju dobro stabilizira nastali pozitivan naboj.

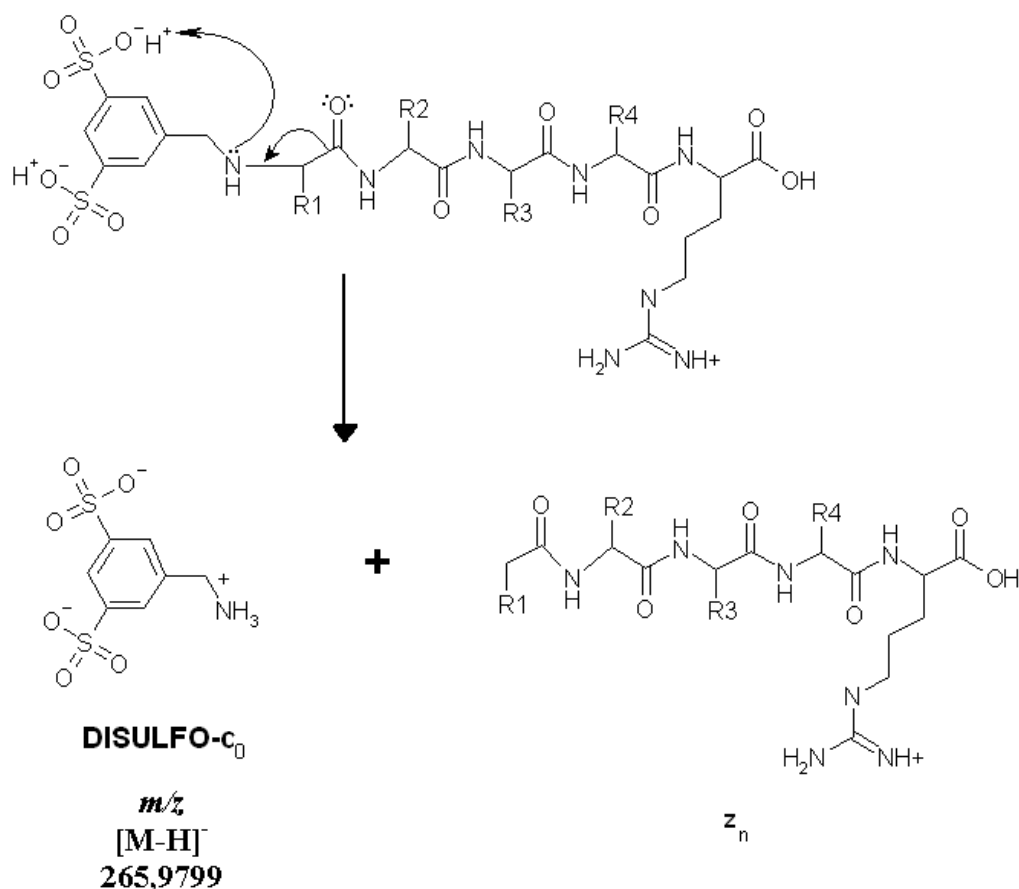
U prilog predloženom mehanizmu ide i činjenica da se u MS/MS spektru negativnih iona peptida obilježenog CAF-op reagensom, osim signala m/z 248,95 koji odgovara b_0 - ionu uočava i intenzivan signal koji po m/z odgovara y_n -ionu, odnosno ionu prekursora. Detektiranje y -iona u MS/MS spektru negativnih fragmentnih iona posljedica je izrazite labilnosti veze između peptida i reagensa zbog koje je fragmentacija spomenute veze te nastanak b_0 - i y_n -iona favorizirana. Kao primjer su na slici 5.5. u MS/MS spektru negativnih fragmentnih iona triptičkog autolitičkog peptida T3 obilježenog CAF-op reagensom označeni

b_0^- (m/z 248,95) i y_n -ion (m/z 2209,09). U danom primjeru b_0 -ion zastupljen je sa relativnim intenzitetom 56,2%, dok je y_n -ion zastupljen sa relativnim intenzitetom 27,2%.



Slika 5.5. MALDI-TOF MS/MS spektar fragmentacije triptičkog peptida obilježenog CAF-op reagensom. Asignacija b_0^- i y_n -iona fragmentnih iona u spektru snimljenom u negativnom načinu rada spektrometra masa ukazuje na visoke udjele iona prekursora i b_0 iona u odnosu na ostale fragmentne ione.

Kod peptida obilježenih sa CAF-mm reagensom u MS/MS spektru negativnih iona izostaje intenzivan signal na m/z 248,95, a umjesto njega se sporadično u spektrima pojavljuje signal znatno manjeg intenziteta na m/z 265,98 (na oko 10% relativnog intenziteta). Naime, *meta*, *meta* raspored sulfonskih skupina u odnosu na reaktivnu aldehydnu skupinu CAF-mm reagensa stabilizira kovalentnu vezu između peptida i reagensa. Sterički (zbog nepostojanja sulfonske skupine u *orto* položaju) je nepovoljna protonacija prvog amidnog dušika peptidne okosnice. Ako i dođe do njegove protonacije zbog nepostojanja sulfonske skupine u *para* položaju, koja bi stabilizirala pozitivan naboj na benzenskom prstenu, naboj ostaje zadržan na dušikovom atomu odnosno nastaje c_0 -ion (m/z 265,98) i z_n -ion (slika 5.6.).



Slika 5.6. Mehanizam fragmentacije triptičkog peptida obilježenog CAF-mm reagensom – disocijacija CAF-mm reagensa sa obilježenog peptida

Relativno nizak intenzitet ili potpuni izostanak signala c₀-iona uz nepostojanje signala b₀-iona u MS/MS spektrima negativnih fragmentnih iona peptida obilježenih CAF-mm reagensom ukazuju na zaključak da disocijacija CAF-mm reagensa nije dominantan fragmentacijski put, odnosno da je kovalentna veza između CAF-mm reagensa i peptida stabilizirana pogodnim rasporedom sulfonskih skupina na benzenskom prstenu.

Upravo iz ovog razloga uspješnost iščitavanja aminokiselinske sekvence iz MS/MS spektara snimljenih u negativnom načinu rada peptida obilježenih sa CAF-mm reagensom je veća nego li u slučaju peptida obilježenih CAF-op reagensom.

Usporedbom MS/MS spektara snimljenih u negativnom načinu rada triptičkog autolitičkog fragmenta T3 obilježenog sa CAF-op i CAF-mm reagensom (slika 5.3.A i 5.3.B), uočava se kako su omjeri signala prema šumu za signale b-iona udaljenijih za 10 i više peptidnih veza od N-kraja peptida (koji je nositelj CAF reagensa) u slučaju CAF-mm reagensa znatno veći nego li u slučaju CAF-op reagensa (tablica 5.1.)

Tablica 5.1. Usporedba omjera signala prema šumu (S/N) za signale koji odgovaraju aminokiselinama na položaju 10 i više nakon obilježavanja triptičkog autolitičkog fragmenta T3 CAF-op i CAF-mm reagensom

b-ion <i>m/z</i>	Aminokiselina	Redni broj aminokiseline (od N-kraja)	Izmjereni omjer signal prema šumu (S/N)	
			CAF-op	CAF-mm
1368	E	10	98,5	533,6
1425	G	11	20,1	86,8
1539	N	12	32,0	140,2
1668	E	13	23,4	150,7
1796	Q	14	8,4	107,8
1943	F	15	8,0	53,9
2056	I	16	8,9	101,7
2170	N	17	8,7	51,2
2241	A	18	/	15,5

Svi dobiveni rezultati potvrđuju zaključak da meta, meta raspored sulfonskih skupina na benzenskom prstenu u strukturi CAF-mm reagensa (5-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina) najviše pogoduje uspješnosti sekvenciranja *de novo* zbog optimalnog steričkog rasporeda sulfonskih skupina. Stoga prilikom analize spektrometrijom masa ne dolazi do odcjepljenja reagensa s N-kraja, te je učinak CAF reagensa potpun. Signali b-iona koji nastaju fragmentacijom udaljenijih aminokiselina (udaljenijih od N-kraja peptida tj. od mjesta obilježavanja) zastupljeni su u spektru kao intenzivni i dobro razlučivi od šuma.

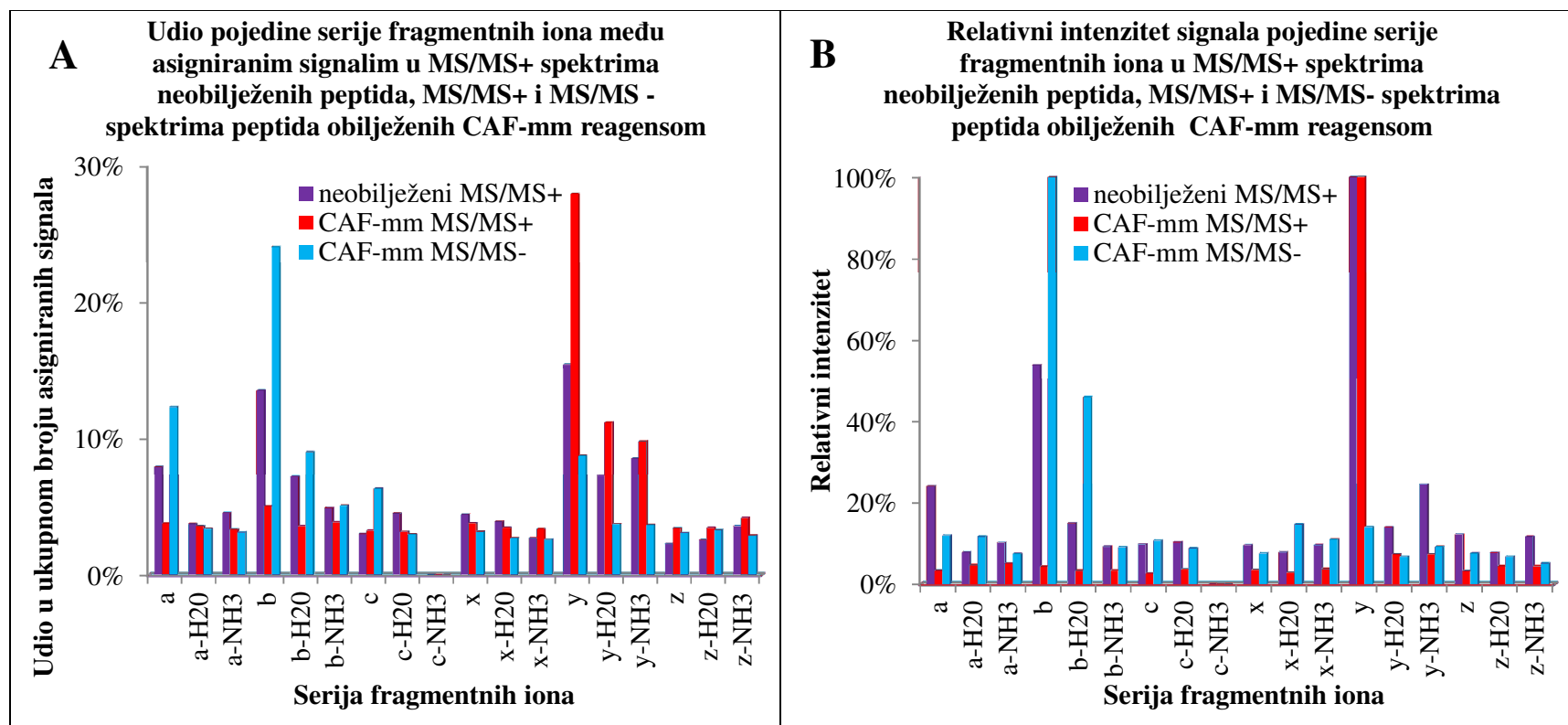
5.3. KARAKTERIZACIJA FRAGMENTACIJSKOG PUTA PEPTIDA OBILJEŽENIH CAF-mm REAGENSOM

Eksperimentalna karakterizacija fragmentacijskog puta provodi se detaljnom obradom MS/MS spektra. Detaljna obrada uključuje asignaciju detektiranih signala, tj. razvrstavanje detektiranih signala po serijama fragmentnih iona. Obradom reprezentativnog skupa istovjetnih MS/MS spektara, moguće je izvesti zaključke o fragmentacijskom putu na temelju raspodjele asigniranih signala po fragmentnim serijama, te raspodjele relativnih intenziteta asigniranih signala po serijama fragmentnih iona.¹³⁸

Na opisani način, neovisno su obrađeni skup od 332 MS/MS spektara neobilježenih triptičkih peptida snimljenih u pozitivnom načinu rada spektrometra masa (neobilježeni MS/MS⁺) i skup od 5746 MS/MS spektara triptičkih peptida obilježenih CAF-mm reagensom, od kojih je polovica snimljena u pozitivnom (CAF-mm MS/MS⁺), a polovica u negativnom načinu rada spektrometra masa (CAF-mm MS/MS⁻). Obradom spomenutih skupova spektara provedena je eksperimentalna karakterizacija fragmentacijskih putova CAF-mm obilježenih triptičkih peptida i neobilježenih triptičkih peptida.

Zajednička raspodjela asigniranih signala po 18 serija fragmentnih iona, te relativni intenzitet signala pojedine fragmentne serije za sva tri skupa MS/MS spektara: MS/MS⁺ spektri, CAF-mm reagensom obilježenih triptičkih peptida, MS/MS⁻ spektri CAF-mm reagensom obilježenih triptičkih peptida i MS/MS⁺ spektri neobilježenih triptičkih peptida dani su na slikama 5.7.A i 5.7.B redom.

U spektrima neobilježenih triptičkih peptida (označeni na slikama 5.7.A i 5.7.B ljubičastom bojom) dominantno su zastupljeni ioni y-serije i b-serije sa 15,5 % , odnosno 13,5% od ukupnih asigniranih signala (relativni intenzitet izračunat prema najintenzivnijem ionu u spektru). Pri tome su ioni y-serije najintenzivniji ioni u spektru (relativni intenzitet 100%), a ioni b-serije detektirani su s relativnim intenzitetom od 53,9% (slika 5.7.B). Ioni ostalih fragmentnih serija zastupljeni su u manjim udjelima (od 2,3 % za z-ione do 8,6% za y-NH₃-ione) i manjim relativnim intenzitetima (od 7,7% za c-ione do 23,9% za a-ione). Dobiveni rezultati ukazuju da je predominantan fragmentacijski put triptičkih peptida pod uvjetima kolizijom inducirane disocijacije (CID, engl. *Collision-induced dissociation*) upravo disocijacija peptidne veze, kojom nastaju fragmentni ioni b-serije i y-serije. Idući nalaz je i ranije literaturno objavljen kada je provedena eksperimentalna karakterizacija fragmentnog puta neobilježenih peptida tokom MALDI analize.¹³⁸



Slika 5.7. Karakterizacija fragmentacijskog puta neobilježenih i CAF-mm reagensom obilježenih peptida. A) Udio pojedine serije fragmentnih iona i B) relativni intenzitet signala pojedine serije fragmentnih iona u MALDI-TOF MS/MS spektrima. Ljubičastom bojom su označene fragmentne serije u MS/MS spektrima neobilježenih triptičkih peptida, crvenom bojom su označene fragmentne serije u MS/MS spektrima triptičkih peptida obilježenih CAF-mm reagensom snimljenih u pozitivnom načinu rada spektrometra masa, a plavom bojom su označene fragmentne serije u MS/MS spektrima triptičkih peptida obilježenih CAF-mm reagensom snimljenih u negativnom načinu rada spektrometra masa.

U MS/MS spektrima triptičkih peptida obilježenih 5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom (CAF-mm reagens) snimljenim u pozitivnom načinu rada (MS/MS⁺ CAF-mm), predominantno su zastupljeni ioni y-serije sa 28,0%, a slijede ih ioni proširene skupine y-iona: y-NH₃ i y-H₂O sa 11,2% odnosno 9,8%, što ukupno čini 49% svih asigniranih signala. Ioni ostalih fragmentnih serija zastupljeni su sa udjelima manjim od 5,0% (slika 5.7.A). Pri tome su signali koji pripadaju y-ionima najintenzivniji signali u spektru (relativni intenzitet 100%), budući da sljedeći relativni intenziteti pripada y-NH₃-ionima i iznosi tek 7,3%.

Dobiveni rezultati pokazuju kako je i kod triptičkih peptida obilježenih CAF-mm reagensom dominantan fragmentacijski put pod uvjetima CID eksperimenta disocijacija peptidne veze. Međutim, u pozitivnom načinu rada spektrometra masa detekcija iona b-serije, koji također nastaju fragmentacijom peptidne veze, gotovo u potpunosti izostaje te su ioni b-serije detektirani tek sa relativnim intenzitetom od 4,3% u udjelu od 5,0%.

U MS/MS spektrima triptičkih peptida obilježenih 5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom (CAF-mm reagens) snimljenim u negativnom načinu rada (MS/M⁻ CAF-mm), predominantno su zastupljeni ioni b-serije sa 24,1%. Zajedno sa ionima proširene skupine b-iona; b-NH₃-ioni i b-H₂O-ioni čine 38% svih asigniranih signala (slika 5.7.A). Signali asignirani kao b-ioni najintenzivniji su signali u spektru (relativni intenzitet 100%), a slijede ih signali b-serije-NH₃ s relativnim intenzitetom 45,9%.

Već je CID eksperimentom uz detekciju u pozitivnom načinu rada spektrometra masa pokazano kako peptidi obilježeni CAF-mm reagensom preferiraju fragmentacijski put disocijacije peptidne veze, pri čemu nastaju fragmentni ioni b-serije i y-serije. Rezultati dobiveni CID eksperimentom uz detekciju u negativnom načinu rada spektrometra masa potvrđuju prijašnji nalaz. Pri tome su u negativnom načinu rada spektrometra masa fragmentni ioni y-serije, koji također nastaju fragmentacijom peptidne veze (istovremeno sa b-ionima), zastupljeni tek sa udjelom od 8,7% i detektirani sa relativnim intenzitetom od 13,9%.

Dobiveni rezultati pokazuju kako je i kod triptičkih peptida obilježenih CAF-mm reagensom dominantan fragmentacijski put pod uvjetima CID eksperimenta disocijacija peptidne veze.

Međutim, za razliku od neobilježenih peptida, fragmentacijom peptida obilježenih CAF-mm reagensom nastaju opozitno detektabilni produkti ioni. Jedni su fragmentni ioni sa originalnim C-krajem peptida (primarno ioni y-serije), koji nisu nosioci CAF-mm reagensa te su primarno detektabilni u pozitivnom načinu rada spektrometra masa. Drugi, opozitni tip produktnih iona su fragmentni ioni s originalnim N-krajem peptida (primarno ioni serije v),

koji, budući da na N-kraju posjeduju kovalentno vezan CAF-mm reagens, postaju gotovo isključivo detektabilni u negativnom načinu rada spektrometra masa.

Naime, dvije sulfonske skupine kao dobri proton donori u strukturi CAF-mm reagens (kao i CAF-op i CAF-mp reagens) čine ukupan naboj peptida, a kasnije i fragmentnog iona negativnim. Zato su fragmentni ioni sa zadržanim N-krajem, odnosno zadržanim CAF reagensom na N-kraju pogodni za detekciju u negativnom načinu rada.

Da bi se fragmentni ioni sa zadržanim CAF reagensom na N-kraju detektirali u pozitivnom načinu rada spektrometra masa, potrebno je donirati protone sulfonskim skupinama, pa je stoga razumljiv mali udio fragmentnih iona a-, b- i c-serije u pozitivnom načinu rada spektrometra masa.

Dobiveni rezultati eksperimentalna su potvrda predviđenog mehanizma fragmentacija CAF-mm obilježenih triptičkih peptida (slika 5.2.), po kojem kolizija prvenstveno inducira disocijaciju peptidne veze, što rezultira nastankom negativno nabijenih b-iona (detektabilnih gotovo isključivo u negativnom načinu rada spektrometra masa) i pozitivno nabijenih y-iona, primarno detektabilnih u pozitivnom načinu rada spektrometra masa.

Osim što CAF reagensi usmjeravaju fragmentaciju ka disocijaciji peptidne veze i pri tome potpuno razdvajanje detekcije fragmentnih y-iona i b-iona na dva MS/MS spektra pozitivnih i negativnih iona, relativni intenziteti detektiranih signala y-iona i b-iona su najintenzivniji u negativnim, odnosno pozitivnim spektrima (RI 100%). Sumarno, ioni svih ostalih fragmentnih serija su zastupljeni s relativnim intenzitetima ispod 20% (slika 5.7.B). Upravo zahvaljujući ovoj činjenici, izbor konsekvativnih signala iste serije fragmentnih iona uvelike se olakšava.

Tri su osnovna povoljna učinka reagensa sa dvije sulfonske skupine i aldehidnom reaktivnom kupinom (CAF reagensa):

- usmjeravanje fragmentacija ka disocijaciji peptidne veze i dominantnom nastanku fragmentnih iona y-serije i b-serije,
- razdvajanje detekcije fragmentnih iona y-serije i b-serije na dva MS/MS spektra; detekcija y-iona u pozitivnom načinu rada spektrometra masa (MS/MS^+) i b-iona u negativnom načinu rada spektrometra masa (MS/MS^-),
- detekcija iona y-serije u MS/MS^+ i iona b-serije u MS/MS^- spektrima najveće relativne zastupljenosti.

Kombinacija ova tri učinka čine CAF-reagense izvrsnim inovativnim alatom za uspješno i točno iščitavanja aminokiselinske sekvence *de novo*.

5.4. IDENTIFIKACIJA PROTEINA SA I BEZ UPOTREBE CAF REAGENSA

Klasični pristup identifikacije proteina tehnikama spektrometrije masa podrazumijeva pretragu baza podataka sačinjenih od proteinskih sekvenci, koje su dobivene reverznom translacijom sekvenciranih genoma.

Pretraga proteinskih baza podataka vrši se usporedbom liste pikova dobivene samo MS analize ili te MS i MS/MS analize enzimski odgrađenih proteina s *in silico* načinjenim listama pikova. Dvije *in silico* liste pikova sačinjavaju proteomsku bazu podataka: *in silico* MS lista i *in silico* MS/MS lista pikova. *In silico* MS lista sadrži teoretske mase peptida nastalih enzimskom odgradnjom svih proteina u bazi podataka. *In silico* MS/MS lista sačinjava sve teoretske mase produktnih iona nastalih fragmentacijom pojedinog *in silico*.

Pretraga baze podataka vrši se upotrebom specijaliziranih algoritama, koji osim liste identificiranih proteina donose i rezultat kvalitete pojedinog pronalaska pridružujući svakom pronalasku određeni broj bodova (engl. *score*). Dobiveni broj bodova proporcionalna je sa vjerojatnošću točnosti identifikacije proteina.

Za proteine koji su zastupljeni u bazi podataka kvaliteta pronalaska, odnosno broj bodova ovisi o kvaliteti ulaznih podataka; MS i MS/MS spektrima.

U eksperimentu usporedbe uspješnosti identifikacije proteina sa i bez CAF reagensa, priprema uzoraka je bila istovjetna, s razlikom da je polovica količine uzoraka identificirana bez obilježavanja (klasičan postupak), a druga polovica uz obilježavanje 5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom (CAF-mm reagensom).

Na ovaj način su definirani istovjetni eksperimentalni uvjeti vezani uz analizu jednakih količina analiziranih peptida.

U ovom eksperimentu CAF reagens nije korišten u svrhu iščitavanja sekvence *de novo*, već u svrhu identifikacije proteina klasičnim putem pretrage baza podataka.

Prema Mascot algoritmu statistički značajnim rezultatima smatraju se proteini identificirani sa brojem bodova (engl. *Score*) većim od 58.¹¹⁴

U slučaju pretrage baze podataka za neobilježene uzorke uspješno je identificirano 6 proteina sa MS brojevima bodova u rasponu od 58 do 649. Za preostala 4 proteina nije pronađeno preklapanje u MS/MS spektrima (MS/MS broj bodova je 0), te su u 3 slučaja identificirani homologni proteini iz organizma srodnog *Lactobacillus brevis*, a u četvrtom slučaju nije identificiran homologni protein niti protein iz *Lactobacillus brevis*.

U svakoj od ukupno 20 pretraga za uzorke obilježene CAF-mm reagensom (10 skupova podataka snimljenih u pozitivnom, kao i 10 skupova podataka snimljenih u negativnom

načinu rada spektrometra masa) uspješno su kao prvi pronalasci s najvećim brojem bodova (MS broj bodova u rasponu od 76 do 751) identificirani proteini iz *Lactobacillus brevis*.

Dobiveni rezultati identifikacije proteina pokazuju da su u slučaju korištenja CAF-mm reagensa uspješnost i točnost identifikacije nedvojbeno povećani sa 60% na 100%.

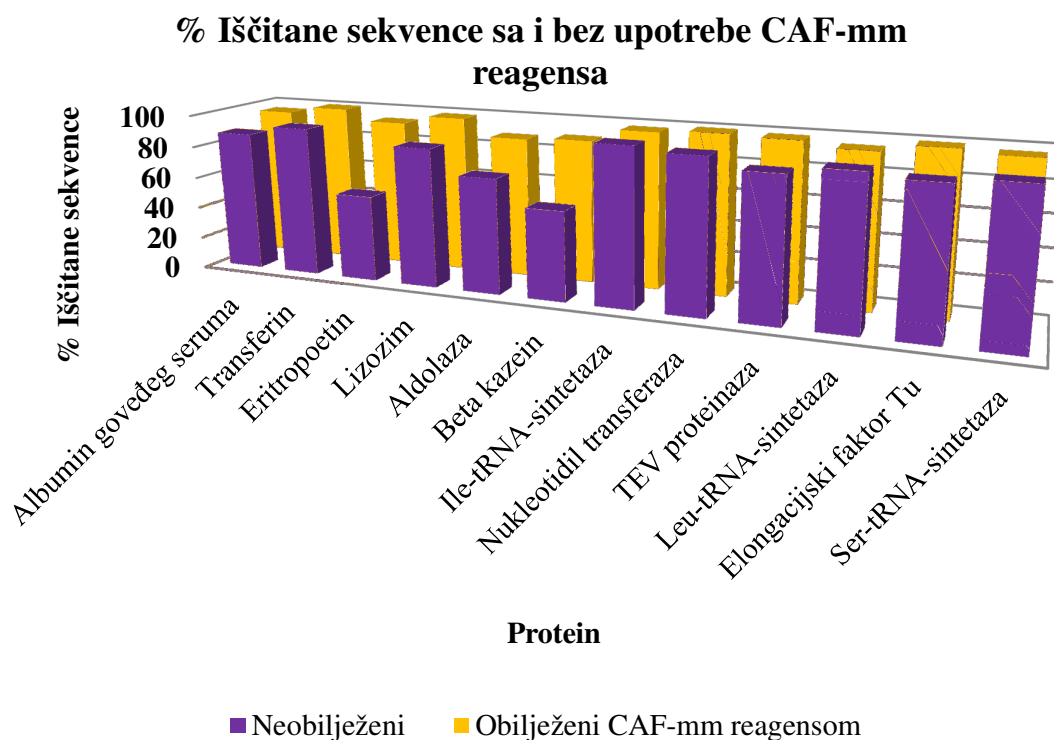
Doprinos CAF reagensa posebno je zanimljiv u slučaju kada se klasičnim putem identificiraju homologni proteini iz srodnog organizma. Naime, kako su MS/MS spektri CAF obilježenih peptida cjelovitiji, tako algoritam može prepoznati razliku u kvaliteti preklapanja sa *in silico* MS/MS spektrima peptida jednoznačnog proteina, u odnosu na *in silico* MS/MS spektre peptida homolognog proteina.

Korištenjem CAF reagensa dolazi se do interpretativno jednostavnih, bogatih i jednoznačnijih spektara fragmentnih iona, kako u pozitivnom, tako i u negativnom načinu rada spektrometra masa. Interpretativna jednostavnost spektra osigurana je razdvajanjem serija fragmentnih iona na dva spektra MS/MS^+ i MS/MS^- . Bogatstvo spektra proizlazi iz činjenice da su zastupljene gotovo cjelovite serije fragmentnih iona predominantno za b-seriju i y-seriju (svaka u ovisnosti o načinu rada spektrometra masa, negativnom ili pozitivnom). Visoki relativni intenziteti i dobro razlučeni signali od šuma omogućuju precizno i točno očitavanje m/z fragmentnih iona, što osigurava nedvojbenost preklapanja sa *in silico* listama.

Usporedbom MS broja bodova (slika 4.21.) između CAF obilježenih peptida (snimljenih u negativnom i u pozitivnom načinu rada spektrometra masa) i neobilježenih peptida, moguće je procijeniti utjecaj reakcije obilježavanja na degradaciju uzorka. Naime, uslijed degradacije uzorka u MS spektru obilježenih uzoraka može doći do smanjenja intenziteta i potpunog izostanka detekcije signala pojedinih peptida. MS broj bodova, koji govori o kvaliteti preklapanja MS liste pikova eksperimentalno dobivenih spektara sa *in silico* MS listama pikova, za obilježene i neobilježene uzorke dobar je pokazatelj utjecaja reakcije obilježavanja na degradaciju uzorka. Degradiranom uzorku algoritam bi pretragom baze podataka dodijelio niži broj MS bodova, u odnosu na uzorak s više detektiranih peptida identificiranog proteina u spektru. MS broja bodova za obilježene uzorke snimljene i u pozitivnom i u negativnom načinu rada spektrometra masa u pravilu je veći nego li za neobilježene uzorke.

Osim ovog indirektnog dokaza da reakcijom obilježavanja peptida CAF reagensima ne dolazi do degradacije uzorka, izveden je i direktan eksperimentalni dokaz istoga.¹⁴⁰ Provedena je identifikacija 12 poznatih proteina sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa upotrebom ProteinPilot programskog paketa. Nakon identifikacije, za svaki protein izračunat je postotak pokrivenosti sekvence. Postotak pokrivenosti sekvence je postotni udio iščitanih aminokiselina u ukupnom broju aminokiselina proteina. Iščitanim aminokiselinama se

smatraju sljedovi triptičkih peptida za koje je u MS spektru pronađen odgovarajući signal, a u MS/MS spektru iščitana aminokiselinska sekvenca istoga. Na slici 5.8. i u dodatku 4 dani su rezultat postotka pokrivenosti sekvenca identificiranog proteina sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa.¹⁴⁰ Za svih 12 proteina obilježavanjem peptida CAF-mm reagensom povećan je postotak iščitane aminokiselinske sekvenca proteina (zabilježeno je povećanje od 0,4% za Ile-tRNA-sintetazu do 42,8% za Eritropoetin) u odnosu na identifikaciju provedenu bez upotrebe CAF-mm reagensa.



Slika 5.8. Usporedba postotka iščitane sekvenca iz MALDI TOF MS i MS/MS spektara sa (oznaka kolona narančastom bojom) i bez (oznaka kolona ljubičastom bojom) upotrebe CAF-mm reagensa. Postotak iščitane sekvenca za CAF-mm obilježene peptide dan je kao unija triptičkih sekvenci iščitanih pri pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa.¹⁴⁰

Reakcija obilježavanja peptida CAF reagensom ne utječe na uspješnost identifikacije proteina metodom otiska prsta mase peptida (PMF, engl. *Peptide mass fingerprinting*), što je vidljivo usporedbom MS brojeva bodova (slika 4.21.) ali i direktno usporedbom postotaka iščitane sekvenca, sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa (slika 5.8.)

Međutim, reakcija obilježavanja peptida višestruko doprinosi točnosti identifikacije proteina metodom otiska prsta fragmentnih iona peptida (PFF, engl. *Peptide fragmentation fingerprinting*), na što jasno ukazuju vrijednosti MS/MS bodova (slika 4.20.).

Obilježavanje peptida CAF reagensom povećava se uspješnost identifikacije proteina sa standardnih 60% na 100%, ukoliko se pretraga vrši neselektivno, tj. nad čitavom bazom podataka, odnosno sa 90 % na 100%, ukoliko se pretraga vrši selektivno na određeni skup organizama u bazi podataka.

Obilježavanje peptida CAF reagensom omogućuje jednoznačnu i točnu identifikaciju proteina i biološke vrste iz koje protein proističe.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih rezultata, literaturnih referenci i rasprave doneseni su zaključci po cjelinama.

Reagensi sa aldehidnom reaktivnom skupinom i dvije sulfatne skupine na benzenskom prstenu pokazali su se najučinkovitijim poznatim inicijatorima kemijski aktivirane fragmentacije. Njihova upotreba u svrhu iščitavanja peptidne sekvence *de novo* primjerena je iz sljedećih razloga:

- reakcija obilježavanja reagensima provodi se selektivno samo na N-kraju peptida te ne uzrokuje degradaciju uzoraka,
- usmjeravaju fragmentaciju ka disocijaciji peptidne veze i dominantnom nastanku fragmentnih iona y-serije i b-serije,
- omogućuju razdvajanje fragmentnih iona na dva MS/MS spektra,
- fragmentni ioni sa N-krajem peptida (ponajprije b-ioni, uz a- i c-ione), detektiraju se u negativnom načinu rada spektrometra masa (tzv. MS/MS⁻),
- fragmentni ion sa C-krajem peptida (ponajprije y-ioni, uz x- i z-ione), detektiraju se u pozitivnom načinu rada spektrometra masa (tzv. MS/MS⁺),
- ioni y-serije u MS/MS⁺ spektru zastupljeni su sa 49% i pripada im 69% relativnog intenziteta u odnosu na ione svih ostalih fragmentnih serija,
- ioni b-serije u MS/MS⁻ spektru zastupljeni su sa 38% i pripada im 54% relativnog intenziteta u odnosu na ione svih ostalih fragmentnih serija,
- u MS/MS spektrima dobivenim klasičnim postupkom kolizijom inducirane fragmentacije ioni y-serije zastupljeni su sa 31% i pripada im 25% relativnog intenziteta u odnosu na ione svih ostalih fragmentnih serija. Istovremeno su, u istom spektru, ioni b-serije zastupljeni sa 26% i pripada im 14% relativnog intenziteta u odnosu na ione svih ostalih fragmentnih serija,
- sekvenciranje *de novo*, koje se provodi preklapanjem iščitanih aminokiselinskih slijedova iz MS/MS⁻ i MS/MS⁺ spektra (tzv. CAF/CAF⁺ postupkom), je nedvojbeno, za razliku od klasičnog postupka sekvenciranja *de novo*, kod kojeg ne postoji pouzdan način potvrde iščitano slijeda.

Sekvenciranje peptida *de novo* najuspješnije se provodi korištenjem 5-formil-1,3-benzen-di-sulfonične kiseline (CAF-mm reagensa), nešto manje uspješno korištenjem 4-formil-1,3-benzen-di-sulfonične kiseline (CAF-op reagens), a najmanje uspješno korištenjem 4-formil-1,2-benzen-di-sulfonične kiseline (CAF-mp reagens).

7. POPIS KRATICA

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
AC	Affinity chromatography	Afinitetna kromatografija
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool for proteins	Alat za pretraživanje na osnovi sličnosti slijeda
BLASTp	Basic Local Alignment Search Tool for proteins	Alat za pretraživanje proteinskih baza podataka na osnovu sličnosti primarnog slijeda aminokiselina
C ₄	Butylsilyl silica gel	Butilsilicijev dioksid
C ₁₈	Octadecylsilyl silica gel	Oktadecilsilicijev dioksid
CA	Carrier amfolites	Nosači amfolita
CAF	Chemically Activated Fragmentation; Chemically Assisted Fragmentation	Kemijski aktivirana fragmentacija; Kemijski pomognuta fragmentacija
CAF reagens	Chemically Activated Fragmentation reagents	Reagens koji kemijski aktivira fragmentaciju, a u svojoj strukturi ima dvije sulfonske skupine, te aldehidnu reaktivnu skupinu
CAF-mm reagens	5-formyl-1,3-benzen- disulphonic acid	5-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina
CAF-mp reagens	4-formyl-1,2-benzen- disulphonic acid	4-formil-1,2-benzen-di-sulfonična kiselina
CAF-op reagens	4-formyl-1,3-benzen- disulphonic acid	4-formil-1,3-benzen-di-sulfonična kiselina
CBB	Coomassie Brilliant Blue	Coomassie briljant plavo
CHCA	α -cyano-4- hydroxycinnamic acid	α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina
CI	Chemical Ionization	Kemijska ionizacija
CID	Collision-induced dissociation	Kolizijom inducirana disocijacija
CRF	Charge remote fragmentation	Fragmentacija po modelu udaljenog naboja
Da	Dalton	Dalton

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
DIGE	Differential In-Gel Electrophoresis	Diferencijalna gel elektroforeza
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoksiribonukleinska kiselina
EI	Electron Ionization	Ionizacija elektronima
EMBL	European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database	Baza podataka sekvenci nukleotida Europskog laboratorija za molekularnu biologiju
ESI	Electrospray-ionization	Ionizacija elektroraspršenjem
FAB	Fast-atom Bombardment	Udar ubrzanim atomima
FI	Field Ionization	Ionizacija poljem
FLD	Fluorescence detector	fluorescencijski detektor
FT ICR	Fourier-transform ion cyclotron resonance	Ionsko-ciklotronska rezonancija uz Fourierovu transformaciju
GenBank	Genom Bank	Genomska baza
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HSA	Human serum albumin	Albumin iz ljudskog seruma
ICAT	Isotope-coded affinity tag	Izotop kodirano afinitetno obilježavanje
IE	Ion Exchange	Ionska izmjena
IEF	Isoelectric focusing	Izoelektrično fokusiranje
IPG	Immobilized pH gradients	Imobilizirani pH gradijent
IT	Ion trap	ionska stupica
LC	Liquid chromatography	Tekućinska kromatografija
LC-MS	Liquid chromatography coupled to mass spectrometry	Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa
LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry	Tekućinska kromatografija spregnuta s tandemnom spektrometrijom masa

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionisation	Matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
MS	Mass spectrometry	Spektrometrija masa
MS-BLAST	Mass Spectrometry-Basic Local Aligment Search Tool	Alat za pretraživanje proteinskih baza podataka na osnovu sličnosti primarnog slijeda iz podataka dobivenih analizom tehnikama spektrometrije masa
MS/MS	Tandem mass spectrometry	Tandemna spektrometrija masa
MS spectra	Mass spectra	Spektar masa
MS ⁺	Mass spectra obtained in the positive ion mode of mass spectrometer	Spektar masa snimljen u pozitivnom načinu rada spektrometra masa
MS ⁻	Mass spectra obtained in the negative ion mode of mass spectrometer	Spektar masa snimljen u negativnom načinu rada spektrometra masa
MS/MS spektar	Fragmentation spectrum	Spektar fragmentnih iona
MS/MS ⁺	Fragmentation spectrum obtained in the positive ion mode of mass spectrometer	Spektar fragmentnih iona snimljen u pozitivnom načinu rada spektrometra masa
MS/MS ⁻	Fragmentation spectrum obtained in the negative ion mode of mass spectrometer	Spektar fragmentnih iona snimljen u negativnom načinu rada spektrometra masa
MudPIT	Multidimensional Protein Identification Tehnology	višedimenzionalne tehnike identifikacije proteina
<i>m/z</i>	Mass-to-charge ratio	Omjer mase i naboja
NCBI _{nr}	National Center for Biotechnology Information non-redundant	Proteinska baza bez preklapajućih unosa Nacionalnog centra za biotehnoške informacije
Nd:YAG	Neodymium-Doped: Yttrium Aluminium Garnet	Neodimij ugrađen u kristal itrij aluminij garnet

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu
PD	Plasma Desorption	Desorpcija plazmom
PDB	The Protein Data Bank	Proteinska baza podataka
PFF	Peptide fragmentation fingerprinting	Metoda otisaka prsta fragmentacije peptida
PMF	Peptide mass fingerprinting	Metoda otiska prsta mase peptida
PSD	Post-source decay	Poslijeionizacijska fragmentacija
Q	Quadrupole	Kvadrupol
QQQ	Triple quadrupole	Trostruki kvadrupol
Q-TOF	Hybrid quadrupole – time of flight	Hibrid kvadrupola i analizatora koji mjeri vrijeme leta
RefSeq	Reference Sequence Project	Referentni projekti sekvenciranja
RI	Relative intensity	Relativni intenzitet
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleinska kiselina
RP	Reverse phase	Kromatografija obrnutih faza
RP-HPLC	Reverse phase – high performance liquid chromatography	Kromatografijom obrnutih faza na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti
SDS	Sodium dodecyl sulphate	Natrijev dodecilsulfat
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis	Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu uz natrijev dodecilsulfat
S/N	Signal to noise	Omjer visina signala i šuma
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamin	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamin
TEV	Tobacco Etch Virus	Duhanu urezani virus
TFA	Trifluoroacetic acid	Trifluoroctena kiselina
TIS	Timed ion selector	Izbornik iona
TOF	Time-of-flight	Analizator koji mjeri vrijeme leta

Kratica	Engleski naziv	Hrvatski naziv
TrEMBL	Translated European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database	Baza podataka translatiranih sekvenci nukleotida Europskog laboratorija za molekularnu biologiju
tRNA	Transfer Ribonucleic acid	Prijenosna ribonukleinska kiselina
UV/VIS-DAD	Ultraviolet/Visible -Diode Array Detector	Detektor sa diodnim nizom za ultraljubičastom i vidljivom području

8. LITERATURNI IZVORI

1. C. M. Whitehouse, R.N. Dreyer, M. Yamashita, J.B. Fenn, *Anal. Chem.* **57** (1985) 675-679.
2. M. Karas i F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **60** (1988) 2299-3201.
3. P. Edman, *Acta Chem. Scand.* **4** (1950) 283-293.
4. J. C. Venter *et al.*, *Science* **291** (2001) 1304-1251.
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/gpstat.html>.
6. M. Kinter, N. E. Sherman, “*Protein Sequencing And Identification Using Tandem Mass Spectrometry*“ John Wiley & Sons, Inc., New York, USA (2000).
7. M. R. Wilkins, C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J. C. Sanchez, J. X. Yan, A. A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith, K. L. Williams, D. F. Hochstrasser, *Biotechnology* **14** (1996) 61-65.
8. A. Pandey, M. Mann, *Nature* **405** (2000) 837-846.
9. E. Phizicky, P. I. Bastianes, H. Zhu, M. Snyder, S. Fields, *Nature* **422** (2000) 208-215.
10. S. M. Hanash, *Electrophoresis* **21** (2000) 1202-1209.
11. S. Beranova-Giorgianni, *Trends Analyt Chem* **22** (2003) 273-281.
12. M. P. Waashburn, J. R. Yates, *Curr. Opin. Microbiol.* **3** (2000) 292-297.
13. D. Garfin, S. Ahuja, *Handbook of Isoelectric Focusing and Proteomics*, Elsevier Inc., Amsterdam, 2005, str. 128-129.
14. K. Weber, M. Osborn, *J. Biol. Chem.* **244** (1969) 4406-4412.
15. J. M. Walker. *Methods in molecular Biology, Vol. 32: Basic Protein and Peptide Protocols*. Human Press Inc., Totowa, NJ, USA, 1994, str. 17-34 i 59-66.
16. J. J. Kopchick, E. O. List, D. T. Khon, G. M. Keidan, L. Qiu, S. Okada, *Endocrinology* **143** (2002) 1990-1994.
17. B. Bjellqvist, K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Görg, R. Westermeier, W. Postel, *J. Biochem. Biophys. Methods* **6** (1982) 317-339.
18. M. P. Molloy, *Anal. Biochem.* **280** (2000) 1-10.
19. A. Görg, W. Weiss, M. J. Dunn, *Proteomics* **4** (2004) 3665-3685.
20. P. H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.* **250** (1975) 4007-4021.
21. W. Patton, *J. Chromatogr.* **771** (2002) 3-31.
22. T. Rabilloud, *Anal. Chem.* **72** (2000) 48A-55A.
23. K. Berggren, E. Chernokalskaya, T. H. Steinberg, C. Kemper, M. F. Lopez, Z. Diwu, R. P. Haugland, W. F. Patton, *Electrophoresis* **21** (2000) 2509-2521.
24. J. A. Mackintosh, H.-Y. Choi, S.-H. Bae, D. A. Veal, P. J. Bell, B. C. Ferrari, D. D. Van Dyk, N. M. Verrills, Y.-K. Paik, P. Karuso, *Proteomics* **3** (2003) 2273-2288.

25. R. J. Beynon, J. M. Pratt, *Molecular and Cellular Proteomics* **4** (2005) 857-872.
26. M. Unlü, M. E. Morgan, J. S. Minden, *Electrophoresis* **18** (1997) 2071-2077.
27. J. X. Yan, A. T. Devenish, R. Wait, T. Stone, S. Lewis, Sue Fowler, *Proteomics* **2** (2002) 1682-1698.
28. A. Alban, S. O. David, L. Bjorkesten, C. Andersson, E. Sloge, S. Lewis, I. Currie, *Proteomics* **3** (2003) 36-44.
29. W. N. Burnette, *Analytical Biochemistry* **112** (1981) 195-203.
30. J. Fernandez, M. DeMatt, D. Atherton, S. M. Mische, *Anal Biochem.* **201** (1992) 255-264.
31. W. V. Bienvenut, J. C. Sanchez, A. Karmime, V. Rouge, K. Rose, P. A. Binz, D. F. Hochstrasser, *Anal Chem* **71** (1999) 4800-4807.
32. B. Schuldenberg, T. N. Goodman, R. Aggeler, R. A. Capaldi, W. F. Patton, *Electrophoresis* **25** (2004) 2526-2532.
33. C. Hart, B. Schuldenberg, T. H. Steinberg, W. Y. Leung, W. F. Patton, *Electrophoresis* **24** (2003) 588-598.
34. T. H. Steinberg, B. J. Agnew, K. R. Gee, W. Y. Leung, T. Goodman, B. Schuldenberg, J. Hendrickson, J. M. Beechem, R. P. Haugland, W. F. Patton *Proteomics* **3** (2003) 1128-1144.
35. A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havliš, J. V. Olsen I M. Mann, *Nature Protocols* **1** (2007) 2856-2860.
36. G. L. Corthals, S. P. Gygi, R. Aebersold, S. D. Patterson, *2-D Gel Electrophoresis and Detection Methods. In Proteome Research*, Springer, New York, USA, 1999 str. 197-231.
37. W. C. Lee i K. H. Lee, *Analytical Biochemistry* **324** (2004) 1-10.
38. S. P. Gygi, R. Beate I R. Aebersold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **11** (2000) 396-401.
39. S. P. Gygi, B. Rist, S.A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelib I R. Aebersold, *Nature Biotechnol* **17** (1999) 994-999.
40. T. J. Griffin, S. P. Gygi, B. Rist, R. Aebersold, A. Loboda, A. Jilkin, W. Ens, I K. G. Standing, *Anal. Chem.* **73** (2001) 978-986.
41. L. A. Huber, *Nature Reviews/Molecular Cell Biology* **4** (2003) 74-80.
42. K. Bjorhall, T. Miliotis, P. Davidsson, *Proteomics* **5** (2005) 307-317.
43. L. A. Echan, H. Y. Tan, N. Ali-Khan, K. Lee, D. W. Speicher, *Proteomics* **5** (2005) 3442-3453.

44. R. S. Tirumalai, K. C. Chan, D. A. Prieto, H. J. Isaaq, T. Conrads i T. D. Venstra, *Mol. Cell Proteomics* **2** (2003) 1096-1103.
45. J. K. Eng, A. L. McCormack i J. R. Yates, *J. Amer. Soc. Mass. Spectrom.* **5** (1994) 976-989.
46. A. J. Link, E. Carmack i J. R. Yates, *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Proc.* **160** (1997) 303-316.
47. J. C. Goiddings, High Pesol. *Chromatogr. Commun.* **10** (1987) 319-323.
48. N. Lundell i K. Markides, *Chromatographia* **34** (1992) 369-375.
49. N. Takahashi, N. Ishioka, Y. Takahashi i F. W. Putnam, *J. Chromatogr.* **326** (1985) 407-418.
50. G. J. Opiteck, K. C. Lewis i J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.* **69** (1997) 1518-1524.
51. A. J. Link, J. Eng, D. M. Schieltz, E. Caramasc, G. J. Mize, D. R. Moris, B. M. Garvik i J. R. Yates, *Nat. Biotechnol.* **17** (1999) 676-682.
52. M. P. Washburn, D. Wolters, J. R. Yates, *Nat. Biotechnol.* **19** (2001) 242-247.
53. D. A. Wolters, M. P. Washburn, J. R. Yates, *Anal. Chem.* **73** (2001) 5683-5690.
54. M. P. Deutscher, J. N. Abelson, „*Guide to Protein Purification*“, Academic Press, San Diego, USA (1990).
55. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Saunders College Publishing, Orlando, USA, 1998, str. 499-533.
56. E. De Hoffmann, V. Stroobant, „*Mass Spectrometry – Principles and Applications*“. John Wiley & Sons, Inc., West Sussex, UK, 2007.
57. F. Hillenkamp, M. Karas, R.C. Beavis, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **63** (1991) 1193A-1203A.
58. J. R. de Laeter, J. K. Böhlke, P. D. Bievre, H. Hidaka, H. S. Peiser, K. J. R. Rosman, P.D. P. Taylor, *Pure Appl. Chem.* **75** (2003) 683-799.
59. M. Cindrić. N. Galić, *Kem. Ind.* **57** (2008) 231-243.
60. K. F. Medzihradszky, J. M. Campbell, M. A. Baldwin, A. M. Falik, P. Juhsaz, M. L. Vestal, A. L. Burlingame, *Anal. Chem.* **72** (2000) 552- 558.
61. R. J. Cotter, W. Griffith, C. Jelinek, *Journal of Chromatography B* **855** (2007) 2-13
62. A. Horvatić, I. Dodig, T. Vuletić, D. Pavoković, Z. Hameršak, A. Butorac, M. Cindrić, *Anal. Chem.* **85** (8) (2013) 3940-3947.
63. M. W. F. Nielen, *Mass. Spectrom. Rev.* (1999) **18** 309-304.
64. P. Roepstroff, J. Fohlman, *Biomed. Mass. Spectrom.* **11** (1984) 601-601.
65. K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* **16** (1988) 99-111.

66. B. Paizs, S. Suhai, *Mass Spectrometry Reviews* **24** (2005) 508-548.
67. R. S. Johnson, S. A. Martin, K. Bienmann, *Int. J. Mass Spectrom* **86** (1988) 137-154.
68. O. Burlet, C. Y. Yang, S. J. Kaskell, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **3** (1992) 337-344.
69. V. H. Wysocki, G. Tsaprailis, L. L. Smith, L. A. Breci, *J. Mass. Spectrom.* **35** (2000) 1399-1406.
70. A. G. Harrison, T. Yalcin, *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Procesess* **165** (1997) 339-347.
71. A. L. McCormack, Á. Somogyi, A. R. Dongré, V. H. Wysocki, *Anal. Chem.* **65** (1993) 2859-2872.
72. Á. Somogyi, V. H. Wysocki, I. Mayer, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **5** (1994) 704-717.
73. A. R. Dongré, J. L. Jones, Á. Somogyi, V. H. Wysocki, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 8365-8374.
74. P. Chaurand, E. Luetzenkirchen, B. Spengler, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10** (1999) 91-103.
75. M.R.M. Ihmingues, M.G.O.S. Marques, C.A.M. Vale, M.G. Neves, J.A.S. Cavaleiro, A.J. Ferrer-Correia, O.V. Nemirovskiy, M.L. Gross, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10** (1999) 217-223.
76. M. L. Gross, *J. Mass. Spectrom.* **200** (2000) 611-624.
77. W. Yu, J. E. Vath, M. C. Huberty, S. A. Martin, *Anal. Chem.* **65** (1993) 3015-3023.
78. R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **422** (2003) 198-207.
79. K. A. Cox, S. J. Gaskell, M. Moriss, A. Whitting, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7** (1996) 522-531.
80. K. D. W. Roth, Z. H. Huang, N. Sadagopan, J. T. Watson, *J. T. Mass Spectrom. Rev.* **17** (1998) 255-274.
81. T. Keough, R. S. Youngquist, M. P. Lacey, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** (1999) 7131-7136
82. J. Flensburg, A. Tangen, M. Prieto, U. Hellman, and H. Wadensten, *Mol. Cell. Proteomics* **4** (2005) 1550-1557.
83. T. Keough, M. P. Lacey, R. S. Youngquist, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14** (2000) 2348-2356.
84. P. Conrotto, U. Hellman, *J. Bioml. Tech.* **16** (2005) 441-452.
85. P. Conrotto, U. Hellman, *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **22** (2008) 1823-1833.
86. W. L. Alley, Y. Mechref, I. Klouckova, M. V. Novotny, *J. Proteome Res.* **6** (2007) 124-132.
87. T. Keough, M. P. Lacey, R. S. Youngquist, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14** (2000) 2348-2356.

88. P. Chen, S. Nie, W. Mi, X. Wang, S. Liang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18** (2004) 191-198.
89. P. Reynaud, J. D. Brion, C. Davrinche, P. C. Dao, *J. Heterocycl. Chem.* **17** (1980) 1789-1792.
90. R. L. Beardsley, J. P. Reilly, *Anal. Chem.* **74** (2002) 1884-1890.
91. E. C. Peters, D. M. Horn, D. C. Tully, A. Brock, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15** (2001) 2387-2392.
92. M. Cindric, T. Cepo, A. Skrlin, M. Vuletic, L. Bindila, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20** (2006) 694-702.
93. S. G. Summerfield, H. Steen, M. O'Malley, S. J. Gaskell, *Int. J. Mass Spectrom.* **188** (1999) 95-103.
94. M. Münchbach, M. Quadroni, M. Giovanni, P. James, *Anal. Chem.* **72** (2000) 4047-4057.
95. R. L. Beardsley, J. P. J. Reilly, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **14** (2004) 158-167.
96. D. R. Goodlett, A. Keller, J. D. Watts, R. Newitt, E. C. Yi, S. Purvine, J. K. Eng, P. Haller, R. Aebersold, E. Kolker, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15** (2001) 1221-1224.
97. J. Quin, C. J. Herring, X. Zhang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12** (1998) 209-216.
98. R. Cannon, K. D. Jarman, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17** (2003) 1793-1801.
99. <http://www.rcsb.org/pdb>.
100. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
101. <http://www.expasy.ch/sprot>.
102. <http://www.ebi.ac.uk/embl/>.
103. D. M. Creasy, J. S. Cottrell, *Proteomics* **4** (2004) 1534-1536.
104. D. J. Pappin, P. Hojrup, A. J. Bleasby, *Curr. Biol.* **3** (1993) 327-322.
105. W. J. Henzel, T. M. Billeci, J. T. Stults, S. C. Wong, C. Grimley, C. Watanabe, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90** (1993) 5011-5055.
106. M. Mann, P. Højrup, P. Roepstroff, *Biol. Mass. Spectrom.* **22** (1993) 338-345.
107. P. James, M. Quadroni, E. Carafoli, G. Gonnet, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195** (1993) 58-64.
108. J. R. Yates, S. Speicher, P. R. Griffin, T. Hunkapiller, *Anal. Biochem.* **214** (1993) 397-408.
109. D. N. Perkins, D. J. C. Pappin, D. M. Creasy, J. S. Cottrell, *Electrophoresis* **20** (1999) 3551-3567.
110. W. Zhang, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **72** (2004) 2482-2489.

111. K. R. Clauser, P. Baker, A. R. Burlingame, *Anal. Chem.* **71** (1998) 2871-2882.
112. T. Rögngvaldsson, J. Häkkinen, C. Lindberg, G. M. Varga, F. Potthast, J. Samuelsson, *J. Chromatogr. B* **807** (2002) 209-215.
113. M. Mann, M. S. Willim, *Anal. Chem.* **66** (1994) 4390-4399.
114. <http://www.matrixscience.com>.
115. L. Y Geer, S. P. Markey, J. A. Kowalak, L. Wagner, M. Xu, D. M. Maynard, X. Yang, W. Shi, S. H. Bryant, *J. Proteome Res.* **3** (2004) 958- 964.
116. R. Craig, R. C. Beavis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17** (2003) 2310-2316.
117. T. Sakurai, T. Matsuo, H. Matsuda, I. Katakuse, *Biomed.Mass Spectrom.* **11** (1984) 396–399.
118. V. Dančik, T. Addona, K. Clauser, J. Vath, P.P. Vzner, *J. Comp. Biol.* **6** (1999) 327–341.
119. C. Bartels, *Biomed.En viron.Mass Spectrom.* **19** (1990) 363–368.
120. T. Chen, M. Y. Kao, M. Tepel, J. Rush, G. Church, *J.Comp.Biol.* **8** (2001) 325–337.
121. J. A. Taylor, R. S. Johnson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11** (1997) 1067-1075.
122. B. Ma, K. Zhang, C.Liang, *Journal of Computer and System Sciences* **70** (2005) 418–430.
123. A. Franck, P. Pevzner, *Anal. Chem.* **77** (2005) 964-973.
124. D. Tessier, P. Yclon, I. Jacquemin, I. Larre, H. Rogniaux, *Proteomics* **10** (2010) 1794–801.
125. S. F. Altschul, W. Gish, .W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, *J Mol. Biol.* **215** (1990) 403–410.
126. <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>
127. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome
128. P. Antonioli, A. Bachi, E. Fasoli, P. G.Righetti, *Journal of Chromatography A*, **1216** (2009) 3606–3612.
129. T. Pisitkun, R. F. Shen, M. A. Knepper, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **101** (2004) 13368–13373.
130. A. Kentsis, F. Monigatti, K. Dorff, F. Campagne, R. Bachur, H. Steen, *Proteomics Clin. Appl* **3** (2009)1052–1061.
131. O. Warburg, W. Christian *Biochem. Z.*, **310** (1941) 384 – 421.
132. I. B. Berlman, *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, Academic Press, New York, USA, 1971.

133. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-254.
134. M. Cindrić, P. S. Kraljević, A. Horvatić, I. Dodig, (2010) Mass spectrometry-based protein identification. Patent PCT Int. Appl. WO 2011089453. Sažetak A2:2011078.
135. M. Cindrić, Z. Hameršak, I. Dodig, (2012) Method of detection of amino acid sequence and/or identification of peptides and proteins, by use of a new derivatization reagent and synthesis of 5-formyl-benzene-1,3-disulphonicacid as derivatization reagent. Appl. WO 2012/156764 A1
136. I. Dodig, A. Butorac, V. Bačun-Družina, A. Tishbee, J. Mrvčić, K. Hock, J. Diminić, M. Cindrić, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **27** (2013) 1045-1054.
137. <http://rapidcell.proteinreader.com/>
138. J. Khatun, K. Ramkisson, M. C. Giddings, *Anal. Chem.* **79** (8) (2007) 3032-3040
139. <http://bioinfo.unc.edu/glabsoftware/StartPackage/index.html>
140. <http://rapidcell.proteinreader.com/applications/>

9. DODATAK

9.1. DODATAK 1

Tablica 9.1. Udio zupojedine serije fragmentnih iona u MS/MS spektrima snimljenim u pozitivnom načinu rada spektrometra masa na triptičkim peptidima obilježenim 5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom

% Fragmentnih iona sa originalnim N-krajem peptida									
Razred mase / Da	a	a-H ₂ O	a-NH ₃	b	b-H ₂ O	b-NH ₃	c	c-H ₂ O	c-NH ₃
846 - 1110	4,2	3,7	2,9	4,6	3,0	4,6	3,1	3,4	0,0
1110 - 1375	3,9	3,8	3,4	5,4	3,8	4,1	3,5	3,3	0,0
1375 - 1639	3,9	3,7	3,6	5,4	3,9	4,0	3,2	3,6	0,0
1639 - 1903	3,9	3,9	3,4	4,8	3,7	4,0	3,3	3,1	0,0
1903 - 2168	3,9	3,4	3,3	5,2	3,5	3,7	3,3	3,1	0,0
2168 - 2432	3,1	3,2	3,1	4,4	3,2	3,5	3,3	2,8	0,0
2432 - 2696	2,8	2,8	3,1	4,3	2,9	3,2	2,9	2,4	0,0
2696 - 2961	2,5	2,3	2,5	4,2	2,3	3,0	2,6	2,5	0,0
2961 - 3225	2,6	3,9	3,3	4,5	1,8	2,0	1,5	1,6	0,0
3225 - 3490	1,2	2,0	1,6	2,7	1,2	2,0	0,8	0,4	0,0
UKUPNO 846-3490	3,8	3,6	3,3	5,0	3,6	3,8	3,2	3,2	0,0
UKUPNO 846-3490	a			b			x		
	10,7			12,4			6,4		

% Fragmentnih iona sa originalnim C-krajem peptida									
Razred mase / Da	x	x-H ₂ O	x-NH ₃	y	y-H ₂ O	y-NH ₃	z	z-H ₂ O	z-NH ₃
846 - 1110	4,5	3,4	2,9	26,8	11,3	9,2	3,2	3,5	5,7
1110 - 1375	4,1	3,6	3,3	25,5	9,7	9,8	3,8	3,9	5,0
1375 - 1639	4,0	3,6	3,7	25,5	10,1	9,5	3,8	3,7	4,7
1639 - 1903	4,0	3,8	3,4	27,1	11,2	9,4	3,6	3,5	4,0
1903 - 2168	3,6	3,4	3,4	28,5	11,3	10,0	3,3	3,4	3,6
2168 - 2432	3,6	3,2	3,0	32,1	13,2	9,6	2,6	2,8	3,3
2432 - 2696	2,6	2,5	2,6	33,3	14,1	11,6	2,9	2,8	3,2
2696 - 2961	1,9	2,5	3,2	37,8	13,1	11,8	2,5	2,6	2,7
2961 - 3225	1,5	2,2	1,9	40,8	14,8	12,4	1,5	2,2	1,6
3225 - 3490	0,0	1,2	2,3	46,1	17,6	16,0	0,8	2,0	2,3
UKUPNO 846-3490	3,8	3,4	3,3	28,0	11,2	9,8	3,4	3,4	4,2
UKUPNO 846-3490	x			y			z		
	10,5			49,0			11,0		

Tablica 9.2. Udio pojedine serije fragmentnih iona u MS/MS spektrima snimljenim u negativnom načinu rada spektrometra masa na triptičkim peptidima obilježenim 5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom

% Fragmentnih iona sa originalnim N-krajem peptida									
Razred mase / Da	a	a-H ₂ O	a-NH ₃	b	b-H ₂ O	b-NH ₃	c	c-H ₂ O	c-NH ₃
846 - 1110	14,9	3,7	3,8	20,4	7,0	4,1	5,2	1,8	0,0
1110 - 1375	13,8	4,1	3,8	21,4	6,9	4,3	6,0	2,2	0,0
1375 - 1639	12,8	3,8	3,5	21,8	8,4	4,7	6,3	2,9	0,0
1639 - 1903	11,9	3,4	3,0	23,7	8,9	5,0	6,0	3,2	0,0
1903 - 2168	11,5	3,0	2,9	24,9	10,2	5,4	6,6	3,2	0,0
2168 - 2432	11,3	2,7	2,5	27,6	10,0	5,8	7,0	3,4	0,0
2432 - 2696	11,1	2,6	2,6	28,5	10,8	6,5	6,7	3,3	0,0
2696 - 2961	12,8	2,8	2,7	29,8	11,2	5,9	6,1	2,6	0,0
2961 - 3225	12,8	2,6	1,8	33,6	12,3	5,3	6,2	3,2	0,0
3225 - 3490	13,2	2,9	1,7	32,8	12,0	5,2	7,8	3,6	0,0
UKUPNO 846-3490	12,3	3,4	3,1	24,1	9,0	5,1	6,3	2,9	0,0
UKUPNO 846-3490	a			b			x		
	18,8			38,2			9,2		

% Fragmentnih iona sa originalnim C-krajem peptida									
Razred mase / Da	x	x-H ₂ O	x-NH ₃	y	y-H ₂ O	y-NH ₃	z	z-H ₂ O	z-NH ₃
846 - 1110	3,1	2,9	2,9	10,7	4,6	3,3	3,9	4,3	3,4
1110 - 1375	3,3	2,7	2,8	9,9	4,1	3,8	3,6	4,1	3,1
1375 - 1639	3,4	2,7	3,0	9,2	3,6	4,0	3,4	3,6	3,1
1639 - 1903	3,4	3,0	2,7	8,5	3,8	3,9	3,2	3,3	3,0
1903 - 2168	3,2	2,7	2,4	8,6	3,7	3,4	2,8	2,8	2,7
2168 - 2432	2,9	2,1	2,2	7,7	3,7	3,2	2,4	2,7	2,8
2432 - 2696	2,2	2,2	2,2	7,9	2,8	3,2	2,6	2,7	2,2
2696 - 2961	2,2	2,4	2,0	7,1	2,6	2,7	2,5	2,4	2,3
2961 - 3225	1,8	1,4	1,9	7,7	1,9	2,2	1,6	2,0	1,8
3225 - 3490	2,9	1,5	1,0	5,2	3,0	2,0	1,4	2,2	1,5
UKUPNO 846-3490	3,2	2,7	2,6	8,7	3,7	3,6	3,1	3,3	2,9
UKUPNO 846-3490	x			y			z		
	8,4			16,1			9,3		

Tablica 9.3. Udio pojedine serije fragmentnih iona u MS/MS spektrima snimljenim u pozitivnom načinu rada spektrometra masa na neobilježenim triptičkim peptidima

% Fragmentnih iona sa originalnim N-krajem peptida									
Razred mase / Da	a	a-H ₂ O	a-NH ₃	b	b-H ₂ O	b-NH ₃	c	c-H ₂ O	c-NH ₃
846 - 1110	8,4	4,9	5,4	9,4	7,0	2,7	3,8	5,9	0,0
1110 - 1375	8,7	4,7	5,9	10,8	6,6	4,7	1,9	4,2	0,0
1375 - 1639	8,9	3,9	5,7	13,4	5,7	3,6	3,4	4,8	0,0
1639 - 1903	8,1	4,2	5,3	12,6	7,2	4,8	2,7	4,5	0,0
1903 - 2168	9,0	3,8	3,9	12,5	7,7	5,4	3,0	5,5	0,0
2168 - 2432	6,8	3,9	5,8	12,3	7,1	5,6	3,7	3,1	0,0
2432 - 2696	7,9	4,3	3,9	13,5	8,9	5,0	3,5	5,8	0,0
2696 - 2961	5,6	2,6	2,6	15,9	9,1	6,7	3,5	3,8	0,0
2961 - 3225	7,8	2,6	3,2	16,7	5,4	4,2	2,0	4,4	0,0
3225 - 3490	10,0	2,1	3,1	21,5	5,5	4,5	2,4	3,1	0,0
UKUPNO 846-3490	8,0	3,7	4,5	13,5	7,2	4,9	3,0	4,5	0,0
UKUPNO 846-3490	a			b			x		
	16,2			25,6			7,5		

% Fragmentnih iona sa originalnim C-krajem peptida									
Razred mase / Da	x	x-H ₂ O	x-NH ₃	y	y-H ₂ O	y-NH ₃	z	z-H ₂ O	z-NH ₃
846 - 1110	6,5	3,5	2,7	10,8	7,8	8,1	3,2	4,3	5,7
1110 - 1375	5,1	4,9	3,0	13,1	8,3	9,1	3,0	3,8	2,1
1375 - 1639	4,5	5,0	4,8	13,9	6,8	7,3	1,6	3,6	3,2
1639 - 1903	4,2	4,8	2,3	13,4	7,3	8,9	2,3	3,1	4,5
1903 - 2168	4,6	3,9	2,5	15,4	5,5	8,7	2,9	2,0	3,6
2168 - 2432	5,2	3,0	3,5	15,4	8,3	10,2	1,1	1,8	3,2
2432 - 2696	3,5	3,1	1,9	15,3	6,6	7,9	2,7	2,5	3,7
2696 - 2961	4,2	4,3	2,1	17,5	7,1	8,0	2,1	1,4	3,5
2961 - 3225	4,2	3,4	1,4	20,7	7,2	9,6	1,6	2,0	3,4
3225 - 3490	0,7	2,1	3,1	21,5	9,0	5,2	2,8	1,4	2,1
UKUPNO 846-3490	4,4	3,9	2,7	15,5	7,3	8,6	2,3	2,6	3,6
UKUPNO 846-3490	x			y			z		
	11,0			31,3			8,4		

9.2. DODATAK 2

Tablica 9.4. Udio pojedine serije fragmentnih iona u MS/MS spektrima snimljenim u negativnom načinu rada spektrometra masa na triptičkim peptidima obilježenim 5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom (CAF-mm reagensom)

% Relativnog intenziteta fragmentnih iona sa originalnim N-krajem peptida									
Spektar	a	a-H ₂ O	a-NH ₃	b	b-H ₂ O	b-NH ₃	c	c-H ₂ O	c-NH ₃
¹ MS/MS ⁺ neobilježenih triptičkih peptida	23,9	7,8	10,1	53,9	14,9	9,2	9,7	10,3	0,0
² MS/MS ⁺ ³ CAF-mm reagensom obilježenih triptičkih peptida	3,3	4,7	5,1	4,3	3,4	3,3	2,6	3,6	0,0
¹ MS/MS ⁻ ³ CAF-mm reagensom obilježenih triptičkih peptida	11,9	11,6	7,3	100,0	45,9	9,0	10,7	8,8	0,0

% Relativnog intenziteta fragmentnih iona sa originalnim C-krajem peptida									
Spektar	x	x-H ₂ O	x-NH ₃	y	y-H ₂ O	y-NH ₃	z	z-H ₂ O	z-NH ₃
¹ MS/MS ⁺ neobilježenih triptičkih peptida	9,5	7,8	9,6	100,0	13,9	24,5	12,1	7,7	11,6
² MS/MS ⁺ ³ CAF-mm reagensom obilježenih triptičkih peptida	3,5	2,8	3,8	100,0	7,2	7,3	3,2	4,5	4,5
¹ MS/MS ⁻ ³ CAF-mm reagensom obilježenih triptičkih peptida	7,6	14,6	10,9	13,9	6,7	9,1	7,5	6,7	5,2

¹MS/MS⁺ - spektar fragmentnih iona (MS/MS) snimljen u pozitivnom načinu radu spektrometra masa

²MS/MS⁻ - spektar fragmentnih iona (MS/MS) snimljen u negativnom načinu radu spektrometra masa

³CAF-mm – 5-formil.1,3- benzen-di-sulfonična kiselina

9.3. DODATAK 3

Za svaki od 10 uzoraka u tablicama 7.5.-7.14. redom su dane liste identificiranih proteina dobivena Mascot pretragmo NCBIInr baze podataka MS i MS/MS spektara na neobilježenom uzoraku kao i liste dobivene pretragom MS i MS/MS spektara uzoraka obilježenih 5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom (CAF-mm reagensom).

Liste su dane kao prvih 5 identificiranih proteina ili do prvog proteina za koji je MS/MS broj bodova 0. MS bodovi rezultat su kombinirane MS i MS/MS pretrage.

Tablica 9.5. Usporedba rezultata Mascot pretrage NCBIInr baze podataka za uzorak proteinske točke 1 na 2-D gelu staničnog lizata *Lactobacillus brevis* (slika 4.19.) dobivenih sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa

Pronalazak	Protein	Vrsta i soj	Pristupni broj (gi)	MS bodovi	MS/MS bodovi
Neobilježeni uzoraka					
1	adenylosuccinate lyase	<i>Gemella haemolysans</i> ATCC 10379	241889904	82	0
2	domain of unknown function DUF1738	<i>Thiomonas intermedia</i> K12	296136429	73	0
3	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334276	71	4
4	conserved hypothetical protein	<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2	257870567	70	4
5	chromosome partitioning ATPase protein	<i>Renibacterium salmoninarum</i> ATCC 33209	163841256	68	0
CAF+ analiza (MS i MS/MS pozitiv) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116332681	196	69
2	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	<i>Lactobacillus reuteri</i> JCM 1112	184154057	88	30
3	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit	<i>Lactobacillus reuteri</i> 100-23	194466962	88	28
4	DNA-directed RNA polymerase MM4-1A	<i>Lactobacillus reuteri</i>	227531519	88	28
5	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	304385423	72	28
CAF- analiza (MS i MS/MS negativ) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116332681	253	97
2	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	304385423	112	61
3	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	<i>Clostridium perfringens</i> SM101	110801957	98	35
4	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	<i>Lactobacillus reuteri</i> JCM 1112	184154057	75	35
5	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit	<i>Lactobacillus reuteri</i> 100-23	194466962	72	35

Tablica 9.6. Usporedba rezultata Mascot pretrage NCBIInr baze podataka za uzorak proteinske točke 2 na 2-D gelu staničnog lizata *Lactobacillus brevis* (slika 4.19.) dobivenih sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa

Pronalazak	Protein	Vrsta i soj	Pristupni broj (gi)	MS bodovi	MS/MS bodovi
Neobilježeni uzoraka					
1	putative phosphoketolase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333142	649	517
2	putative phosphoketolase	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403	15673484	135	128
3	phosphoketolase	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	281492061	134	128
4	phosphoketolase	<i>Weissella paramesenteroides</i> ATCC 33313	241895257	124	62
5	putative phosphoketolase	<i>Oenococcus oeni</i> PSU-1	116491770	115	100
CAF+ analiza (MS i MS/MS pozitiv) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	putative phosphoketolase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333142	653	466
2	phosphoketolase	<i>Weissella paramesenteroides</i> ATCC 33313	241895257	165	130
3	putative phosphoketolase	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	81427904	117	93
4	Phosphoketolase	<i>Roseburia intestinalis</i> M50/1	291535641	112	93
5	xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase	<i>Roseburia intestinalis</i> L1-82	257413435	111	93
CAF- analiza (MS i MS/MS negativ) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	putative phosphoketolase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333142	284	72
2	phosphoketolase	<i>Weissella paramesenteroides</i> ATCC 33313	241895257	52	14
3	conserved exported hypothetical protein	<i>Oscillatoria sp.</i> PCC 6506	300867849	50	0

Tablica 9.7. Usporedba rezultata Mascot pretrage NCBIInr baze podataka za uzorak proteinske točke 3 na 2-D gelu staničnog lizata *Lactobacillus brevis* (slika 4.19.) dobivenih sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa

Pronalazak	Protein	Vrsta i soj	Pristupni broj (gi)	MS bodovi	MS/MS bodovi
Neobilježeni uzoraka					
1	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	28379892	290	237
1	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	227510823	238	190
3	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	254558031	238	190
4	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpL	<i>Pediococcus acidilactici</i> 7_4	270291243	180	158
5	ATP-dependent Clp protease	<i>Aerococcus viridans</i> ATCC 11563	295398327	175	132
CAF+ analiza (MS i MS/MS pozitiv) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	227510823	463	318
2	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	28379892	357	279
3	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	254558031	341	279
4	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL	<i>Enterococcus faecalis</i> TX1322	229546325	296	249
5	ATP-dependent Clp protease	<i>Enterococcus faecalis</i> T1	255971055	295	249
CAF- analiza (MS i MS/MS negativ) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	227510823	322	128
2	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	28379892	195	92
3	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	254558031	190	92
4	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpL	<i>Enterococcus faecalis</i> TX1322	229546325	146	79
5	ATP-dependent Clp protease	<i>Enterococcus faecalis</i> T1	255971055	140	79

Tablica 9.8. Usporedba rezultata Mascot pretrage NCBIInr baze podataka za uzorak proteinske točke 4 na 2-D gelu staničnog lizata *Lactobacillus brevis* (slika 4.19.) dobivenih sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa

Pronalazak	Protein	Vrsta i soj	Pristupni broj (gi)	MS bodovi	MS/MS bodovi
Neobilježeni uzoraka					
1	pyruvate kinase	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	28378548	286	235
2	pyruvate kinase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333412	136	105
3	trigger factor	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333990	134	83
4	pyruvate kinase	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	81428643	109	97
5	pyruvate kinase	<i>Enterococcus casseliflavus</i> EC30	257867603	106	96
CAF+ analiza (MS i MS/MS pozitiv) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	pyruvate kinase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333412	594	460
2	trigger factor	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333990	245	208
3	Pyruvate kinase	<i>Lactobacillus salivarius</i> CECT 5713	300214579	150	109
4	pyruvate kinase	<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 25644	227526904	139	109
5	pyruvate kinase	<i>Selenomonas ruminantium</i>	6729356	123	129
CAF- analiza (MS i MS/MS negativ) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	pyruvate kinase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333412	341	208
2	pyruvate kinase	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	81428643	111	97
3	pyruvate kinase	<i>Lactobacillus hilgardii</i> ATCC 8290	227524452	106	93
4	Pyruvate kinase	<i>Lactobacillus salivarius</i> CECT 5713	300214579	97	62
5	pyruvate kinase	<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 25644	227526904	84	62

Tablica 9.9. Usporedba rezultata Mascot pretrage NCBIInr baze podataka za uzorak proteinske točke 5 na 2-D gelu staničnog lizata *Lactobacillus brevis* (slika 4.19.) dobivenih sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa

Pronalazak	Protein	Vrsta i soj	Pristupni broj (gi)	MS bodovi	MS/MS bodovi
Neobilježeni uzoraka					
1	chaperone GroEL	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 368	116333267	58	0
CAF+ analiza (MS i MS/MS pozitiv) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	chaperone GroEL	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 368	116333267	169	119
2	chaperone GroEL	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254	227431122	161	115
3	dihydrolipoamide dehydrogenase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334009	158	132
4	F0F1-type ATP synthase, alpha subunit chaperone GroEL	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333890	157	115
5	60 kDa chaperonin	<i>Leuconostoc gasicomitatum</i> LMG	300172724	149	115
CAF- analiza (MS i MS/MS negativ) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	chaperone GroEL	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 368	116333267	105	61
2	chaperonin GroEL	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	116492224	93	31
3	60 kDa heat shock protein	<i>Lactobacillus brevis</i>	33312964	75	18
4	GroEL	<i>Lactobacillus brevis</i>	38018485	65	18
5	60 kDa heat shock protein	<i>Lactobacillus brevis</i>	33312964	65	18

Tablica 9.10. Usporedba rezultata Mascot pretrage NCBIInr baze podataka za uzorak proteinske točke 6 na 2-D gelu staničnog lizata *Lactobacillus brevis* (slika 4.19.) dobivenih sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa

Pronalazak	Protein	Vrsta i soj	Pristupni broj (gi)	MS bodovi	MS/MS bodovi
Neobilježeni uzoraka					
1	NAD(FAD)-dependent dehydrogenase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334141	401	382
2	NADH oxidase	<i>Lactobacillus brevis</i>	22653411	392	382
3	unknown	<i>Paracoccus denitrificans</i>	482820	63	0
CAF+ analiza (MS i MS/MS pozitiv) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	NAD(FAD)-dependent dehydrogenase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334141	628	527
2	sulfate adenylyltransferase	<i>Silicibacter lacuscaerulensis</i> ITI-1157	260432866	64	0
CAF- analiza (MS i MS/MS negativ) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	NAD(FAD)-dependent dehydrogenase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334141	288	179
2	EAL domain protein	<i>Listeria seeligeri</i> serovar 1/2b str.SLCC3954	289435263	49	0

Tablica 9.11. Usporedba rezultata Mascot pretrage NCBIInr baze podataka za uzorak proteinske točke 7 na 2-D gelu staničnog lizata *Lactobacillus brevis* (slika 4.19.) dobivenih sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa

Pronalazak	Protein	Vrsta i soj	Pristupni broj (gi)	MS bodovi	MS/MS bodovi
Neobilježeni uzoraka					
1	acetoin dehydrogenase complex, E1 component, alpha subunit	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334012	291	216
2	kinetoplast DNA-associated protein	<i>Nocardioides</i> sp. JS614	119718473	73	0
CAF+ analiza (MS i MS/MS pozitiv) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	acetoin dehydrogenase complex, E1 component, alpha subunit	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334012	688	623
2	putative phage tail protein	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Newport</i> str. SL254	194445074	65	0
CAF- analiza (MS i MS/MS negativ) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	acetoin dehydrogenase complex, E1 component, alpha subunit	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334012	258	143
2	beta tubulin, autoregulation binding site	<i>Citricella</i> sp.SE45	260426824	51	0

Tablica 9.12. Usporedba rezultata Mascot pretrage NCBIInr baze podataka za uzorak proteinske točke 8 na 2-D gelu staničnog lizata *Lactobacillus brevis* (slika 4.19.) dobivenih sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa

Pronalazak	Protein	Vrsta i soj	Pristupni broj (gi)	MS bodovi	MS/MS bodovi
Neobilježeni uzoraka					
1	elongation factor Tu	<i>Lactobacillus</i> sp. 1.142	283483494	375	356
2	elongation factor Tu	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333991	370	356
3	putative elongation factor Tu	<i>Lactobacillus brevis</i>	22266068	368	356
4	enlongation factor Tu	<i>Lactobacillus parabrevis</i>	238015782	230	218
5	enlongation factor Tu	<i>Lactobacillus hammesii</i>	238015784	228	218
CAF+ analiza (MS i MS/MS pozitiv) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	elongation factor Tu	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333991	751	623
2	elongation factor Tu	<i>Lactobacillus</i> sp. 1.142	283483494	512	375
3	putative elongation factor Tu	<i>Lactobacillus brevis</i>	22266068	345	232
4	enlongation factor Tu	<i>Lactobacillus hammesii</i>	238015784	334	232
5	6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116332769	184	60
CAF- analiza (MS i MS/MS negativ) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	elongation factor Tu	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333991	418	286
2	elongation factor Tu	<i>Lactobacillus</i> sp. 1.142	283483494	272	132
3	putative elongation factor Tu	<i>Lactobacillus brevis</i>	22266068	214	101
4	enlongation factor Tu	<i>Lactobacillus parabrevis</i>	238015782	169	93
5	6-phosphogluconate dehydrogenase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116332769	121	84

Tablica 9.13. Usporedba rezultata Mascot pretrage NCBI-nr baze podataka za uzorak proteinske točke 9 na 2-D gelu staničnog lizata *Lactobacillus brevis* (slika 4.19.) dobivenih sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa

Pronalazak	Protein	Vrsta i soj	Pristupni broj (gi)	MS bodovi	MS/MS bodovi
Neobilježeni uzoraka					
1	acetoin dehydrogenase complex, E1 component, beta subunit	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334011	110	65
2	lactate dehydrogenase related 2-hydroxyacid dehydrogenase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333957	68	34
3	ribosomal protein S2	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333955	66	61
4	putative long-chain-fatty-acid--CoA ligase	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> A2-165	257440302	62	0
CAF+ analiza (MS i MS/MS pozitiv) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	acetoin dehydrogenase complex, E1 component, beta subunit	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334011	471	344
2	lactate dehydrogenase related 2-hydroxyacid dehydrogenase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333957	217	172
3	pyruvate dehydrogenase subunit beta	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> HZ	88607662	94	88
4	ribosomal protein S2	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333955	94	41
5	hypothetical protein bpr_I2656	<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> B316	302672011	72	0
CAF- analiza (MS i MS/MS negativ) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	acetoin dehydrogenase complex, E1 component, beta subunit	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334011	206	90
2	lactate dehydrogenase related 2-hydroxyacid dehydrogenase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333957	126	76
3	ribosomal protein S2	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333955	62	0

Tablica 9.14. Usporedba rezultata Mascot pretrage NCBI-nr baze podataka za uzorak proteinske točke 10 na 2-D gelu staničnog lizata *Lactobacillus brevis* (slika 4.19.) dobivenih sa i bez upotrebe CAF-mm reagensa

Pronalazak	Protein	Vrsta i soj	Pristupni broj (gi)	MS bodovi	MS/MS bodovi
Neobilježeni uzoraka					
1	aldo/keto reductase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334538	64	0
	poly E-rich protein	<i>Helicobacter pylori</i> J99	15611374	59	0
3	conserved domain protein	<i>Vibrio cholerae</i> 1587	153213644	58	0
4	4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur binding domain protein	<i>Clostridium carboxidivorans</i> P7	255527518	58	0
5	hypothetical protein plu4177	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> TTO1	37528015	58	0
CAF+ analiza (MS i MS/MS pozitiv) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	aldo/keto reductase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334538	165	138
2	phosphoglycerate dehydrogenase-like protein	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334222	96	76
3	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333292	93	55
4	2,5-didehydrogluconate reductase	<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	254823456	87	62
5	oxidoreductase	<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	83643335	75	62
CAF- analiza (MS i MS/MS negativ) uzoraka obilježenog CAF-mm reagensom					
1	aldo/keto reductase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116334538	76	26
2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	116333292	47	0

Tablica 9.15. Usporedba MS i MS/MS bodova (dobivenih Mascot pretragom NCBI nr baze podataka) kao pokazatelja kvalitete pronalaska identificiranog proteina za neobilježene uzorke i uzorke obilježene CAF-mm reagensom (5-formil-1,3-benzen-di-sulfoničnom kiselinom). Podebljano su označeni podaci korišteni za prikaz na slici 4.20., a koso za prikaz na slici 4.21.

Eksperiment Točka	Neobilježeni peptidi		CAF-mm reagensom obilježeni peptidi				
	MS ⁺ i MS/MS ⁺		MS ⁺ i MS/MS ⁺		MS ⁻ i MS/MS ⁻		/
	#MS bodovi	MS/MS bodovi	#MS bodovi	MS/MS bodovi	#MS bodovi	MS/MS bodovi	*MS/MS bodovi (kumulativno)
1	82	4	127	69	156	97	166
2	132	517	187	466	212	72	538
3	53	190	145	318	194	128	446
4	51	105	134	460	133	208	668
5	58	0	50	119	44	61	180
6	19	382	101	527	109	179	706
7	75	216	65	623	115	143	766
8	14	356	128	623	132	286	909
9	45	65	127	344	116	90	434
10	64	0	27	138	50	26	164

#prikazani su MS brojevi bodova koji su rezultat pretrage samo MS spektara

* MS/MS bodovi za CAF-mm reagensom obilježene uzorke izračunati kao zbroj MS/MS bodova dobivenih pretragom po MS/MS⁺ i MS/MS⁻ spektrima CAF-mm reagensom obilježenih uzoraka

9.4. DODATAK 4

Tablica 9.16. Usporedba% iščitane sekvence iz MALDI TOF MS i MS/MS spektara sa (obilježeni CAF-mm reagensom) i bez (neobilježeni) upotrebe CAF-mm reagensa. Postotak iščitane sekvence za CAF-mm obilježene peptide dan je kao unija sekvence iščitane pri pozitivnom i negativnom načinu rada spektrometra masa.¹⁴⁰

Protein	% Iščitane sekvence	
	Neobilježeni	Obilježeni CAF-mm reagensom
<i>Albumin goveđeg seruma</i>	87,81	95,72
<i>Transferin</i>	93,84	100,00
<i>Eritropoetin</i>	53,37	93,26
<i>Lizozim</i>	87,07	98,64
<i>Aldolaza</i>	71,98	88,19
<i>Beta kazein</i>	55,36	89,73
<i>Ile-tRNA-sintetaza</i>	97,33	97,76
<i>Nukleotidil transferaza</i>	94,42	99,51
<i>TEV proteinaza</i>	87,6	98,35
<i>Leu-tRNA-sintetaza</i>	92,02	94,88
<i>Elongacijski faktor Tu</i>	89,09	99,24
<i>Ser-tRNA-sintetaza</i>	91,95	96,93

10. ŽIVOTOPIS

ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Ime i prezime:	Ivana Dodig (rođena Mijić)
Datum i mjesto rođenja:	18.12.1983. / Metković

OBRAZOVANJE

2007.-	Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij kemije; smjer biokemija Kemijski odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
2002.-2006.	Diplomirani inženjer kemije Kemijski odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu Diplomski rad naslova: "Priprava i funkcionalna analiza ljudskih S-adenozilhomocistein-hidrolaza (SAHH), izoforme SAHH-2 i SAHH-3" izrađen pod vodstvom dr. sc. Olivera Vugreka i mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Waygand-Đurašević
1998.-2002.	Prirodoslovno-matematička gimnazija u Metkoviću

RADNO ISKUSTVO:

05/2011-...	Hospira Zagreb d.o.o. – Kontrola kvalitete Ekspert za kromatografske analize u odjelu Analitičke podrške
06/2009-05/2011	Institut Ruđer Bošković – Zavod za molekularnu medicinu Znanstveni novak u Laboratoriju za sistemsku biomedicinu
12/2006-04/2009	Pliva - Istraživanje i razvoj Istraživač analitičar u Laboratoriju za tekućinski kromatografiju u odjelu Bioanalitike.

IZVORNI ZNANSTVENI I PREGLEDNI RADOVI U ČASOPISIMA KOJE OBRAĐUJE BAZA PODATAKA "WEB OF KNOWLEDGE – CORE COLLECTION":

1. I. Dodig, A. Butorac, V. Bračun Družina, A. Tishbee, J. Mrvčić, K. Hock, J. Diminić, M. Cindrić, *Rapid communications in mass spectrometry* **27** (2013) 9 1045-1054
2. I. Dodig, A. Horvatić, T. Vuletić, D. Pavoković, Z. Hameršak, A. Butorac, M. Cindrić *Analytical chemistry*. **85** (2013) 8 3940-3947
3. D. Majhen, J. Richardson, B. Vukelić, I. Dodig, M. Cindrić, K. Benihoud, A. Ambriović-Ristov, *Journal of gene medicine*. **14** (2012) 12 788-797
4. R. Pavišić, I. Dodig, A. Horvatić, L. Mijić, M. Sedić, M. Rajić Linarić, I. Gruić Sovulj, Ita, T. Preočanin, M. Bukvić Krajačić, M. Cindrić *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. **76** (2010) , 3; 357-365
5. R. Pavišić, K. Hock, I. Mijić, A. Horvatić, M. Gecan, M. Sedić, M. Bukvić Krajačić, M. Cindrić, *International journal of pharmaceuticals*. **387** (2010) 110-119
6. M. Cindrić, T. Čepo, S. Marinc, I. Paškvan, I. Mijić, L. Bindila, J. Peter-Katalinic *Journal of separation science*. **31** (2008) , 20; 3489-3496
7. K. Fumić, R. Belužić, M. Čuk, T. Pavkov, D. Kloor, I. Barić, I. Mijić, O. Vugrek *European journal of human genetics*. **15** (2007) , 3; 347-351

SAŽECI U ZBORNICIMA SKUPOVA:

1. A. Butorac, K. Perica, I. Dodig, M. Bubonja Šonje, M. Abram, J. Ašanin, D. Mišić, K. Aksentijević, I. Kosalec, V. Bačun-Družina, M. Cindrić, *Book of Abstracts Croatian Microbiological Society*, (2012) 42-42
2. D. Majhen, J. Richardson, B. Vukelić, I. Dodig, M. Cindrić, K. Benihoud, A. Ambriović-Ristov, *Book of Abstracts of the 3rd Congress of Croatian Geneticists with international participation* (2012).
3. D. Majhen, J. Richardson, B. Vukelić, I. Dodig, M. Cindrić, K. Benihoud, A. Ambriović-Ristov, *5th Croatian Congress of Microbiology Croatian Microbiological Society* (2012) 35-35
4. A. Butorac, I. Dodig, M. Cindrić, A. Tishbee, J. Mrvčić, K. Hock, T. Stehlik, V. Bračun Družina, *10th Symposium on lactic acid bacteria - Federation of European Microbiological Societies* (2011) A 001-A 001
5. A. Butorac, I. Dodig, M. Cindrić, A. Tishbee, J. Mrvčić, K. Hock, T. Stehlik, V. Bračun Družina, *Programme and abstracts / Power of microbes in industry and environment - Croatian Microbiological Society* (2010) 33-33
6. A. Horvatić, I. Dodig, A. Marković, V. Bačun-Družina, A. Butorac, D. Pavoković, M. Krsnik-Rasol, M. Cindrić, *4th Summer School of Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, Book of Abstracts* (2010)
7. D. Majhen, J. Richardson, B. Vukelić, D. Vujaklija, I. Dodig, M. Cindrić, A. Ambriović-Ristov, *Book of Abstract HDIR-1 From Bench to Clinic* (2010)

PATENTI:

1. M. Cindrić, S. Kraljević Pavelić, A. Horvatić, I. Dodig, *Mass spectrometry - based protein identification*, WO 2011/089453 A4 (2011)
 2. M. Cindrić, Z. Hameršak, I. Dodig, *Method of detection of amino acid sequence and/or identification of peptides and proteins, by use of a new derivatization reagent and synthesis of 5-formyl-benzene-1, 3-disulphonic acid as derivatization reagent*, WO 2012/156764 A1 (2012)
-