

PROTEOMICKÁ IDENTIFIKACE GLUTENOVÝCH BÍLKOVIN

JIŘÍ ŠALPLACHTA^a, GÜNTER ALLMAIER^b
a JOSEF CHMELÍK^a

^a Ústav analytické chemie Akademie věd České republiky, Veveří 97, 611 42 Brno, Česká republika, ^b Ústav chemických technologií a analýz, Technická univerzita Vídeň, Getreidemarkt 9/164, A-1060 Vídeň, Rakousko
salplachta@iach.cz, chmelik@iach.cz,
guenter.allmaier@tuwien.ac.at

Došlo 2.9.05, přijato 27.10.05.

Klíčová slova: gluten, proteomická analýza, chymotrypsin, celiakie, MALDI, QIT-TOF, TOF/TOF

Úvod

Celiakie (glutensenzitivní enteropatie) je chronické onemocnění, které postihuje nejen člověka, ale i monogastriká zvířata. Toto metabolické, geneticky podmíněné onemocnění může být definované jako porucha, při které dochází k poškození sliznice tenkého střeva, kde dochází k mizení klků a mikrokloků. Tato disfunkce vedoucí k malabsorpci živin je spojená s příjmem potravin, které obsahují bílkovinný komplex pšenice, ječmene, žita a ovsu, nazývaný gluten, a intolerance k němu přetrvává po celý život^{1–7}. Toto chronické střevní onemocnění má počátek obvykle v dětství a jeho v současnosti jediná léčba je založena na odstranění potravin obsahujících gluten z jídelníčku.

Gluten (glutenové bílkoviny) je bílkovinný komplex lokalizovaný v endospermu obilného zrna. Podle Codex Alimentarius je gluten definován jako bílkovinná frakce z pšenice, ječmene, žita a ovsu nerozpustná ve vodě a 0,5 M-NaCl. Glutenové bílkoviny jsou zásobní proteiny obilného zrna, kde prolaminy hrají významnou roli při klíčení zrna jako zdroj dusíku, a to díky vysokému obsahu glutaminu (typicky 22–45 % v některých případech až 56 % všech aminokyselin). Prolaminy spolu s gluteliny jsou velmi důležité z technologického hlediska, jelikož mají zásadní vliv na kvalitu a vlastnosti těsta, kde gliadiny jsou odpovědné za viskozitu a roztážnost a gluteniny za elasticitu^{8–11}.

Glutenové bílkoviny se klasicky dělí na monomerní prolaminy (bílkovinná frakce rozpustná ve vodných roztocích alkoholů) a polymerní gluteliny (bílkovinná frakce rozpustná ve zředěných vodných roztocích kyselin a zá-

sad). V případě pšenice je možno gliadiny (prolaminy pšenice) dále rozdělit na základě rozdílné elektroforetické mobility v polyakrylamidovém gelu při nízkém pH na α -, β -, γ - a ω -gliadiny, kde α -gliadiny mají nejvyšší elektroforetickou mobilitu a ω -gliadiny nejnižší. α -, β - a γ -gliadiny obsahují intramolekulární disulfidové vazby, kdežto ω -gliadiny neobsahují žádné sirmé aminokyseliny^{12–14}. Gluteniny se dělí na nízkomolekulární (LMW) a vysokomolekulární (HMW) podjednotky, které obsahují intermolekulární disulfidové vazby. Molekulové hmotnosti gliadinů a LMW gluteninů leží zhruba v rozmezí 30–40 kDa, zatímco pro HMW gluteniny je typická molekulová hmotnost v rozmezí 65–90 kDa (cit.^{13,14}).

Jak bylo uvedeno výše, některé glutenové bílkoviny jsou toxické pro pacienty trpící celiakií. Vzhledem k tomu, že obilniny představují významnou surovinu pro výrobu potravin, je třeba účinných a spolehlivých analytických metod pro identifikaci těchto toxických bílkovin v potravinách. Nejčastěji používanou metodou pro kontrolu obsahu glutenu v potravinách jsou testy ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) založené na monoklonálních nebo polyklonálních protilátkách schopných rozpoznat toxické složky ve vzorcích potravin^{15,16}. Další často používanou metodou je tzv. immunoblotting^{3,17}. Obě metody jsou založené na reakci protilátek, což na jedné straně zajišťuje vysokou specifitu a citlivost analýz, ale na druhé straně tyto metody mohou občas poskytnout falešné výsledky (jak pozitivní, tak i negativní reakce). Navíc testy ELISA dávají spolehlivé výsledky v případě analýzy glutenových bílkovin pšenice a žita, méně spolehlivé výsledky v případě ječmene a v případě ovsu nebyla zatím vyvinuta souprava ELISA poskytující spolehlivé výsledky. Z těchto důvodů je třeba vyvíjet další neimunologické metody, jež by byly alternativou k již zavedeným metodám.

V posledních deseti letech se objevilo několik prací zabývajících se možností analýzy glutenových bílkovin hmotnostní spektrometrií, konkrétně se jedná o techniku desorpce a ionizace laserem za přítomnosti matrice s analyzátozem doby letu (MALDI-TOF MS)^{1,2,9,12,13,18–21}. V těchto případech byla MALDI-TOF MS použita pro přímou analýzu glutenových bílkovin bez předchozí separace jednotlivých složek analyzované směsi obilných bílkovin. Nicméně kvůli velmi vysoké homologii glutenových bílkovin nelze použít metodu analýzy intaktních bílkovin pro jejich jednoznačnou identifikaci. Spolehlivou metodou pro jednoznačnou identifikaci bílkovin toxických pro pacienty s celiakií by se mohla stát proteomická identifikace, kterou jako první v případě obilovin použil Chmelík a spol.^{22,23}. Cílem této práce je zjistit možnosti proteomické analýzy pro jednoznačnou identifikaci glutenových bílkovin s ohledem na identifikaci bílkovin způsobujících celiakii. Vzhledem k vysoké homologii primárních struktur glutenových bílkovin není jejich identifikace na základě techniky zvané „peptide mass fingerprinting“ možná, je nezbytné použít moderních metod využívajících pro identifikaci bílkovin fragmentaci peptidů.

Experimentální část

Materiál

Jako výchozí materiál pro extrakci glutenových bílkovin byla použita pšeničná mouka. Veškeré použité chemikálie byly p.a. produkty Sigma-Aldrich (Schnellendorf, Německo), chymotrypsin byl od Roche Diagnostics (Mannheim, Německo). Pro přečištění vzorků byly použity pipetové špičky ZipTip C₁₈ (Millipore, Billerica, USA).

Extrakce glutenových bílkovin

Navážka 50 mg pšeničné mouky byla nejprve extrahována deionizovanou vodou, čímž došlo k odstranění albuminů ze vzorku. Samotné glutenové bílkoviny byly poté extrahovány vodným roztokem 60% ethanolu. Každá extrakce byla provedena dvakrát s 0,5 ml extrakčního činidla na třepače po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Ethanolové extrakty byly odstředěny při 12 000 g po dobu 10 min. Po odstředění byly oba ethanolové extrakty spojeny a vysušeny ve vakuové odparce.

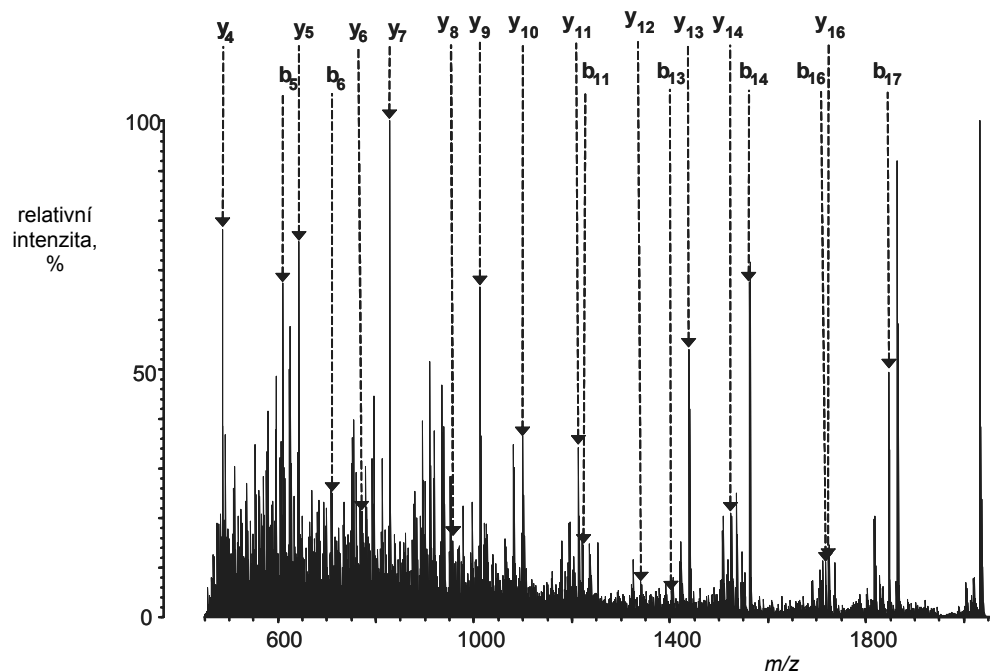
1-D elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (1-D PAGE)

Vysušené extrakty byly rozpuštěny v roztoku obsahujícím 125 μ l vodného roztoku 60% ethanolu a 25 μ l 50 mM oktyl- β -D-glukopyranosidu. Vzorek pro gelovou elektroforézu byl připraven smícháním tohoto ethanolového roztoku se vzorkovým pufrům (50 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 4% dodecylsulfát sodný (SDS), 12% glycerol,

2% β -merkaptoethanol, 0,01% bromofenolová modř) v poměru 1:1. Vzorek byl povařen (10 min) a 20 μ l takto připraveného vzorku bylo naneseno na polyakrylamidový gel. Pro separaci bílkovin byl použit 12% tris-glycinový gel NOVEX (Invitrogen, Frederick, USA). K barvení bílkovin v gelu bylo použito barvivo Coomassie Brilliant Blue R-250 (fixace bílkovin v gelu byla provedena roztokem obsahujícím 45 % methanolu a 5 % kyseliny octové (1 hodina), barvení bílkovin v gelu roztokem obsahujícím 45 % methanolu, 5 % kyseliny octové a 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (45 min), následné odbarvení gelu bylo provedeno roztokem obsahujícím 5 % methanolu a 7 % kyseliny octové (24 hodin)).

Příprava vzorku pro hmotnostně spektrometrickou analýzu

Po separaci pomocí 1-D PAGE byly jednotlivé skvrny bílkovin z gelu vyříznuty a podrobeny enzymatickému štěpení. Nejprve byly vyříznuté kousky gelu odbarveny roztokem acetonitril/voda (1:1, 2 \times 15 min) a poté ještě roztokem acetonitril/0,1 M-NH₄HCO₃ (1:1, 20 min). Bílkoviny byly poté redukovány 10 mM dithiothreitem a následně alkylovány 55 mM iodoacetamidem. K enzymatickému štěpení bílkovin byl použit chymotrypsin (12,5 ng μ l⁻¹ chymotrypsinu v 50 mM NH₄HCO₃). Štěpení probíhalo při teplotě 37 °C po dobu 18 h. Výsledné peptidy byly z gelu extrahovány roztokem acetonitril/25 mM NH₄HCO₃ (1:1, 30 min) a 5% kyselinou mravenčí (2 \times 15 min), extrakty byly spojeny a vysušeny ve vakuové odpar-



Obr. 1. Fragmentační spektrum MALDI QIT RTOF peptidu ($[M + H]^+$) o molekulové hmotnosti 2050,3 Da se znázorněnými y- a b-ionty; ze spektra je možné z neúplných sérií y- a b-iontů vyčíst část sekvence: SPKLSGQGQR(PG)Q, jako kolizní plyn byl použit argon

ce. Pro hmotnostně-spektrometrické analýzy byly vysušené vzorky peptidů rozpuštěny v 15 μl 0,1% kyseliny trifluorooctové a následně přečištěny pomocí ZipTip pipetových špiček C_{18} (cit.^{24,25}).

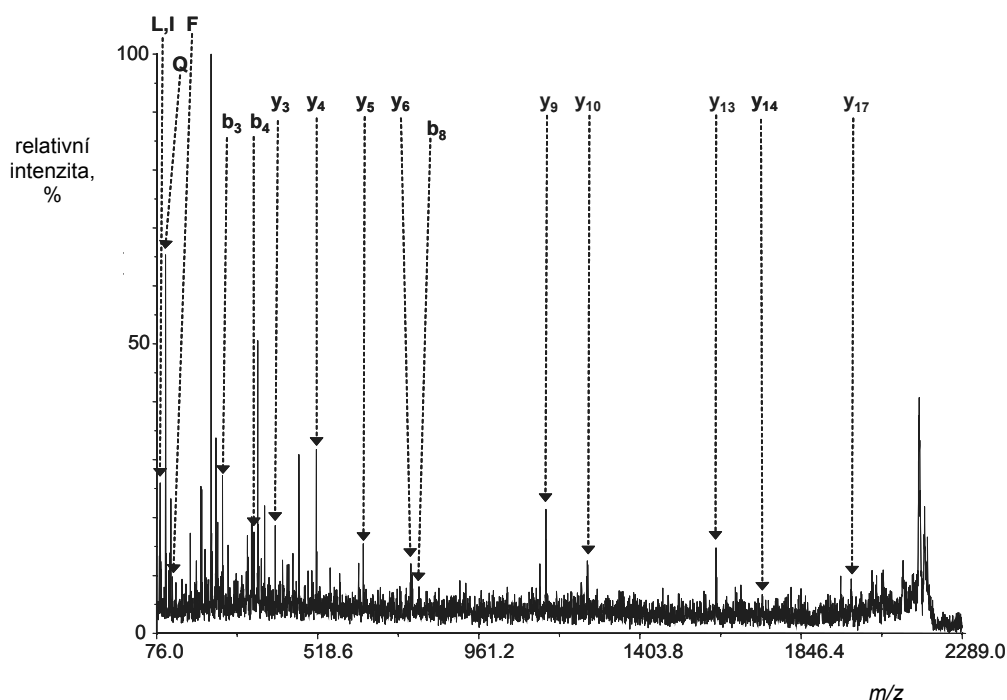
Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru MALDI TOF vybaveném tzv. curved field reflektorem (AXIMA CFR, Shimadzu Biotech Kratos Analytical, Manchester, UK) a na hmotnostním spektrometru MALDI TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Framingham, USA). MS/MS experimenty byly prováděny na přístrojích MALDI QIT RTOF (hybridní hmotnostní spektrometr s kvadrupólovou iontovou pastí, AXIMA QIT, Shimadzu Biotech Kratos Analytical, Manchester, UK) a MALDI TOF/TOF hmotnostním spektrometru. Jako kolizní plyn byl u obou přístrojů použit argon. Pro účely hmotnostní spektrometrie byly použity jako matrice kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (6 mg ml^{-1} v roztoku acetonitril/0,1% kyselina trifluorooctová, 1:1) a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (15 mg ml^{-1} v methanolu). Vzorek byl smíchán s matricí přímo na destičce v poměru 1:1 a to jak pro MS, tak i pro MS/MS experimenty.

Výsledky a diskuse

Jelikož pšeničná mouka je výchozím materiálem při výrobě mnoha potravin, byla použita pro identifikaci bílkovin toxických pro pacienty s celiakií. Glutenové bílkoviny extrahované vodným roztokem 60% ethanolu byly separovány pomocí 1-D PAGE. Rozdělené bílkoviny byly poté podrobeny enzymatickému štěpení v gelu chymotrypsinem, který štěpí peptidové vazby na C-konci tyrosinu, fenylalaninu, tryptofanu, leucinu, methioninu a alaninu (pokud je před některou zmiňovanou aminokyselinou prolin, enzym peptidovou vazbu neštěpí). Díky velmi nízkému obsahu argininu a lysinu ve struktuře glutenových bílkovin nebylo možné použít trypsin, který je nejčastěji používaným enzymem při proteomických analýzách pro svou vysokou specifitu²⁶.

Vzniklé chymotryptické peptidy byly analyzovány dále hmotnostními spektrometry MALDI. Nejprve bylo změřeno hmotnostní spektrum jednotlivých vzorků, tzv. experimentální „peptide mass fingerprint“. Vyhodnocení takto získaných spekter pomocí volně přístupných vyhledávacích programů a databází bílkovin bohužel v naprosté většině případů nevedlo k identifikaci žádných bílkovin, což je způsobeno jednak velmi vysokou homologií glutenových bílkovin a jednak nedostatečným rozdělením jednotlivých glutenových bílkovin gelovou elektroforézou 1-D. Proto je k jednoznačné identifikaci těchto



Obr. 2. Fragmentační spektrum MALDI TOF/TOF peptidu ($[M + H]^+$) o molekulové hmotnosti 2182,2 Da se znázorněnými y- a b-ionty a některými imoniiovými ionty (nalezené imoniiové ionty: P, V, L(I), N, Q, F, R); ze spektra lze na základě neúplných sérií y- a b-iontů vyčíst část sekvence: S(V)Q(PQQ)L/I(PQF)EEL/I, jako kolizní plyn byl použit argon

bílkovin nutné použít tandemovou hmotnostní spektrometrii. Za tímto účelem byly vybrány peptidy podrobeny kolizně-indukované fragmentaci a to na přístrojích MALDI QIT RTOF a MALDI TOF/TOF.

Příklad fragmentace peptidu o molekulové hmotnosti 2050,3 Da ($[M + H]^+$) je uveden na obr. 1, který ukazuje, že fragmentace peptidů na přístroji MALDI QIT RTOF vede ke vzniku velkého množství fragmentů, díky nimž není vyhodnocení takových hmotnostních spekter snadné. Většina těchto fragmentů odpovídá interním fragmentům. Nicméně pomocí nalezených y- a b-iontů je možné určit větší část sekvence analyzovaného peptidu (SPKLSGQGQR(PG)Q). Na základě analýzy MS/MS byla zjištěna sekvence peptidu YYPTSPKLSGQGQRPGQW, na jejímž základě byla identifikována bílkovina vysokomolekulární jednotka gluteninu DX5. Obr. 2 je příkladem fragmentace peptidu o molekulové hmotnosti 2182,2 Da ($[M + H]^+$) na přístroji MALDI TOF/TOF, jehož sekvence je AQS SVQPQQLPQFEEIRNL. Výsledné hmotnostní spektrum obsahuje méně fragmentů než v předchozím případě, což je způsobeno zejména sníženou tvorbou interních fragmentů (oblast od 500 Da výše). Nicméně i v tomto hmotnostním spektru byly nalezeny neúplné série y- a b-iontů, ze kterých je možné určit část sekvence analyzovaného peptidu (S(V)Q(PQQ)L/I(PQF)EEL/I). Kromě y- a b-iontů byly v hmotnostním spektru (obr. 2) nalezeny některé imoniové ionty, které poskytují informaci o aminokyselinovém složení peptidu. Vyhodnocením spektra na obr. 2 byla identifikována bílkovina α -gliadin. V případě obou analyzovaných peptidů byl pro vyhodnocení naměřených hmotnostních spekter použit databázový vyhledávací program Mascot a jako databáze bílkovin byla použita databáze NCBI nr. Oba analyzované chymotryptické peptidy byly pro identifikované bílkoviny specifické a jejich fragmentace vedla k jednoznačné identifikaci bílkovin.

Závěr

Výsledky uvedené v této práci dokazují, že proteomická analýza je vhodnou metodou pro jednoznačnou identifikaci glutenových bílkovin v potravinách. Pro enzymatické štěpení glutenových bílkovin byl použit chymotrypsin jako vhodný enzym poskytující v případě glutenových bílkovin peptidy o molekulových hmotnostech vhodných pro analýzy hmotnostní spektrometrií MALDI TOF. Navíc chymotrypsin může být použit za zcela stejných experimentálních podmínek a ve stejném množství jako trypsin. Dále bylo zjištěno, že k jednoznačné identifikaci glutenových bílkovin je nutné zejména kvůli jejich vysoké homologii použít tandemovou hmotnostní spektrometrii. Zde popsaný postup proteomické analýzy může být použit jako alternativní metoda k již zavedeným technikám jako jsou např. testy ELISA pro identifikaci bílkovin toxických pro pacienty s celiakií, kdy analýzou MS/MS chymotryptických peptidů glutenových bílkovin je možné nalézt toxické peptidové sekvence v analyzovaném vzorku.

Autoři děkují grantu IB53002 NAZV a výzkumnému záměru č. Z40310501 za finanční podporu.

LITERATURA

1. Camafeita E., Alfonso P., Acevedo B., Méndez E.: *J. Mass Spectrom.* 32, 444 (1997).
2. Camafeita E., Solís J., Alfonso P., López J.A., Sorell L., Méndez E.: *J. Chromatogr., A* 823, 299 (1998).
3. Matuz J., Póka R., Boldizsár I., Szerdahelzi E., Hajós G.: *Cereal Res. Commun.* 28, 433 (2000).
4. Novák P., Man P., Tučková L., Tlaskalová-Hogenová H., Bezouška K., Havlíček V.: *J. Mass Spectrom.* 37, 507 (2002).
5. Singh H., Case S., Duerksen D.: *Clin. Nutr. Rounds* 3, (2003).
6. Koning F.: *J. Mol. Recognit.* 16, 333 (2003).
7. Jennings J. S. R., Howdle P. D.: *Curr. Opin. Gastroenterol.* 19, 118 (2003).
8. Gellrich C., Schieberle P., Wieser H.: *Cereal Chem.* 80, 102 (2003).
9. Garozzo D., Cozzolino R., Giorgi S. D., Fisichella S., Lafiandra D.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13, 2084 (1999).
10. Masci S., D'Ovidio R., Lafiandra D., Kasarda D. D.: *Plant Physiol.* 118, 1147 (1998).
11. Masci S., Egorov T. A., Ronchi C., Kuzmicky D. D., Kasarda D. D., Lafiandra D.: *J. Cereal Sci.* 29, 17 (1999).
12. Méndez E., Camafeita E., Sebastián J. S., Valle I., Solís J., Mayer-Posner F. J., Suckau D., Marfisi C., Soriano F.: *J. Mass Spectrom.* S123 (1995).
13. Dworschak R. G., Ens W., Standing K. G., Preston K. R., Marchylo B. A., Nightingale M. J., Stevenson S. G., Hatcher D. W.: *J. Mass Spectrom.* 33, 429 (1998).
14. Cunsolo V., Foti S., Saletti R., Gilbert S., Tatham A. S., Shewry P. R.: *J. Mass Spectrom.* 39, 66 (2004).
15. Sorell L., López J. A., Valdés I., Alfonso P., Camafeita E., Acevedo B., Chirido F., Gavilondo J., Méndez E.: *FEBS Lett.* 439, 46 (1998).
16. Denery-Papini S., Nicolas Y., Popineau Y.: *J. Cereal Sci.* 30, 121 (1999).
17. Rocher A., Calero M., Soriano E., Méndez E.: *Biochim. Biophys. Acta* 295, 13 (1996).
18. Camafeita E., Alfonso P., Mothes T., Méndez E.: *J. Mass Spectrom.* 32, 940 (1997).
19. Camafeita E., Méndez E.: *J. Mass Spectrom.* 33, 1023 (1998).
20. McComb M. E., Oleschuk R. D., Chow A., Perreault H., Dworschak R. G., Znamirovski M., Ens W., Standing K. G., Preston K. R.: *Can. J. Chem.* 79, 437 (2001).
21. Hernando A., Valdes I., Méndez E.: *J. Mass Spectrom.* 38, 862 (2003).
22. Chmelík J., Řehulka P., Mayrhofer C., Allmaier G.: *Kvasný Prům.* 47, 159 (2001).
23. Chmelík J., Řehulka P., Střelcová M., Kubáň V., Mayrhofer C., Allmaier G.: *Rostl. Výroba* 48, 261

- (2002).
24. Řehulka P., Šalplachta J., Chmelík J.: *J. Mass Spectrom.* 38, 1267 (2003).
 25. Šalplachta J., Řehulka P., Chmelík J.: *J. Mass Spectrom.* 39, 1395 (2004).
 26. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.: *Anal. Chem.* 68, 850 (1996).

J. Šalplachta^a, G. Allmaier^b, and J. Chmelík^a
(^a *Department of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno,* ^b *Department of Chemical Technology and Analysis, Technical University Wien, Rakousko*): **Proteomic Identification of Gluten Proteins**

Proteomics-based identification strategy for gluten proteins in ethanolic extracts of wheat flour is described in this study. Protein extracts were separated by 1D gel electrophoresis and subjected to in-gel digestion with chymotrypsin which was found an appropriate proteolytic enzyme for the purpose. Based on collision-induced dissociation of selected chymotryptic peptides using MALDI QIT RTOF and MALDI TOF/TOF, the high-molecular-weight glutenin subunit DX5 and α -gliadin were identified. This strategy allows unambiguous identification of proteins toxic for patients with coeliac diseases.