

## PROTEOLYTICKÉ ENZYMY: VÝZNAM PRO PROTEOMIKU

TAJÁNA ŠTOSOVÁ<sup>a</sup>, JAN HAVLIŠ<sup>b</sup>, RENÉ  
LENOBEL<sup>c</sup> a MAREK ŠEBELA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, <sup>b</sup>Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, <sup>c</sup>Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého a Ústav experimentální botaniky AV ČR, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc  
sebela@prfholnt.upol.cz

Došlo 2.9.05, přijato 27.10.05.

Klíčová slova: peptid, peptidasa (proteasa), predikce štěpení, proteolýza, proteomika

### Obsah

1. Úvod – proteolytické enzymy a jejich úloha v proteomice
2. Reakce katalyzovaná proteolytickými enzymy
3. Zdroje a klasifikace proteolytických enzymů
4. Stručný přehled vlastností vybraných enzymů
5. Trypsin a jeho výjimečné postavení v proteomice
6. Měření proteolytické aktivity
7. Počítačová predikce štěpných peptidů
8. Varianty procesu proteolýzy používané v proteomice
9. Modifikace proteolytických enzymů (modulace funkčnosti a termostability)
10. Závěr – perspektivy proteolýzy v moderní proteomice

### 1. Úvod – proteolytické enzymy a jejich úloha v proteomice

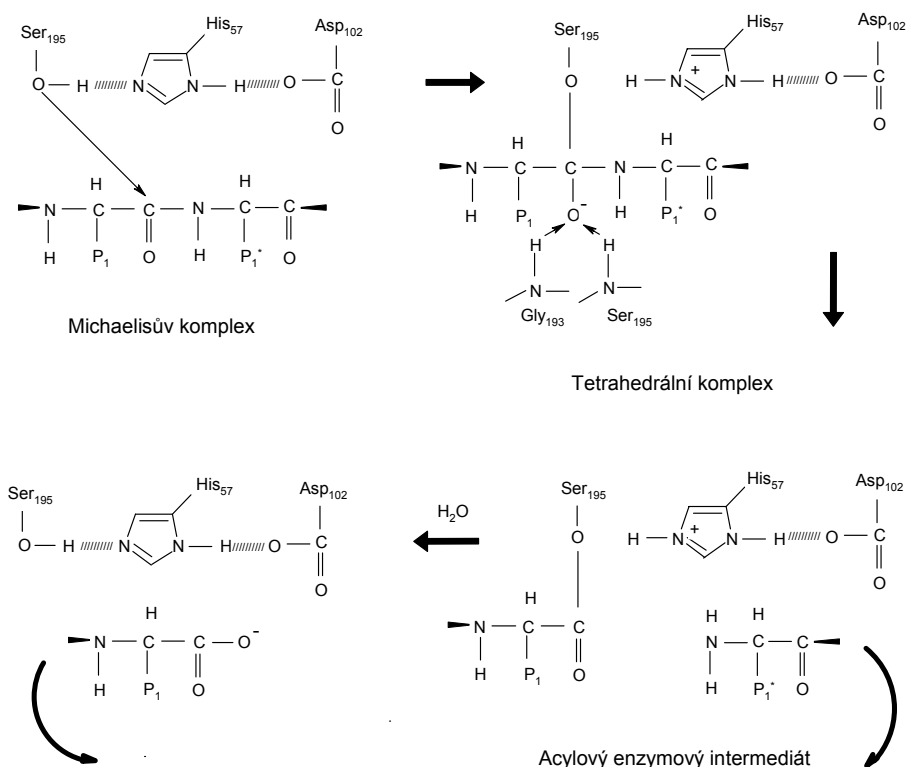
Proteomika je vědecká disciplína, která zkoumá proteom, tedy soubor všech proteinů produkovaných určitou buňkou, tkání nebo organismem. Definuje rovněž vzájemné interakce těchto proteinů<sup>1</sup>. Využívá metod s vysokou výkonností (high throughput) jako jsou dvourozměrná (2D) elektroforéza, kapalinová chromatografie (LC) a hmotnostní spektrometrie (MS) s ionizací MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization tj. laserová desorpce a ionizace s účastí matrice) nebo ESI (electrospray ionization tj. ionizace elektrosprejem)<sup>2</sup>. S rozvojem instrumentace MS používané v proteomice se klíčovým stal způsob aplikace proteinového vzorku<sup>1</sup>. Nej-

běžnější strategie pro identifikaci proteinu vychází z jeho počátečního štěpení na peptidy, které se děje buď enzymovou nebo chemickou cestou. Molekulová hmotnost peptidových fragmentů se pak měří na hmotnostním spektrometru s vysokou přesností<sup>3</sup>. Proteolýza se již v rámci proteomiky stala rutinní záležitostí, neboť je komerčně dostupná celá řada enzymů, které lze volit a aplikovat na základě požadavků kladených na výslednou peptidovou směs. Nabízí několik praktických výhod: vysokou specifitu, minimalizované vedlejší reakce a dobrou účinnost štěpení<sup>1</sup>. Důležitá je přitom optimalizace složení a pH reakčního pufru, poměru enzym/substrát, teploty a doby inkubace. Ze všech dostupných proteolytických enzymů se v proteomice nejčastěji využívá trypsin. Má definovanou a poměrně úzkou substrátovou specifitu a poskytuje peptidy o velikosti vhodné pro MS analýzu, které mají navíc na C-konci zbytky bazických aminokyselin argininu a lysinu<sup>1,4</sup>. Pokud je třeba štěpit jiným enzymem, děje se tak zpravidla v omezeném množství případů. Příkladem může být studium posttranslačních modifikací proteinu (fosforylace, glykosylace aj.), neboť trypsinové štěpení nemusí vždy poskytovat peptidy o vhodné velikosti obsahující modifikované místo<sup>1</sup>.

Chemické metody štěpení proteinů se používají pouze jako doplňkové, nejsou tedy tak běžné jako metody enzymové. Chemie nachází uplatnění zejména tam, kde není možné ve specifickém případě provádět proteolýzu<sup>1</sup>. Příkladem může být použití BrCN tj. bromkyanu pro štěpení ve vodě nerozpustných nebo membránových proteinů (specifické působení činidla na zbytky methioninu)<sup>5</sup>. Podobně můžeme pro štěpení zbytků tryptofanu využít BNPS-skatolu tj. 3-brom-3-methyl-2-[(2-nitrofenyl)merkaptol]-3H-indolu<sup>6</sup>. Poměrně šetrná je hydrolyza proteinů zředěnou kyselinou mravenčí, která působí v místě zbytků kyseliny asparagové a zároveň je dobrým rozpouštědlem pro řadu proteinů<sup>7</sup>.

### 2. Reakce katalyzovaná proteolytickými enzymy

Proteolytické enzymy katalyzují exergonní hydrolyzu peptidových vazeb v proteinech a peptidech (obr. 1). Synonymní název *proteasy* se používá od konce 19. století<sup>8</sup>. Kolem roku 1930 již bylo známo mnoho enzymů tohoto typu a nezávisle se vytvořily dva způsoby klasifikace. V Německu zavedli Grassmann a Dyckerhoff pojmy *proteinas* a *peptidas*<sup>9</sup>: proteinasa působí na proteiny, kdežto peptidasa na malé oligopeptidy. Příčina přednostního působení některých enzymů na malé peptidy byla vysvětlena při použití peptidových substrátů s blokovanými či volnými koncovými skupinami<sup>8</sup>. Ukázalo se, že proteinasy nevyžadují přítomnost volných konců substrátů. Naopak



Obr. 1. Hydrolytické štěpení peptidové vazby trypsinem; Upraveno podle textu Dunn B. M., v knize: *Proteolytic Enzymes. A Practical Approach* (Beynon R., Bond J. S., Eds.), str. 79, Oxford University Press, Oxford 2001. Na str. 80-84 lze v uvedené knize najít i reakční mechanismy ostatních typů peptidas

enzymy působící na krátké oligopeptidy vyžadují alespoň jeden konec volný – v blízkosti místa štěpení. Bergmann a Ross použili poprvé pojem *peptidasa* v širším slova smyslu, tedy pro všechny enzymy, které hydrolyzují peptidové vazby<sup>10</sup>. V závislosti na místě působení na polypeptidovém řetězci byly peptidas rozděleny na dvě skupiny. První skupinu tvoří *endopeptidas*, které katalyzují hydrolyzu peptidových vazeb uvnitř řetězce a tvoří tak štěpné peptidy o rozmanité délce. Druhou skupinou jsou *exo-peptidas*, které katalyzují hydrolytické odštěpení koncové aminokyseliny. Mohou být proto klasifikovány jako *N*-koncové exopeptidas (aminopeptidas) nebo *C*-koncové exopeptidas (karboxypeptidas)<sup>11,12</sup>. Použití pojmu *peptidasa* (ekvivalentně *peptidhydrolasa*) v úzkém i širším slova smyslu se tak stalo zavádějícím. Podle doporučení International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB, Mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii) by měla být dána přednost používání v širším významu<sup>8</sup>. Pro enzymy působící na oligopeptidy (nikoli na celé proteiny) by se pak mělo užívat odvozených výrazů *exo-peptidasa*, kde specifita vyžaduje volné koncové skupiny nebo *oligo-peptidasa*, je-li specifita vázána na délku oligopeptidu (dipeptidasa, tripeptidasa apod.)<sup>8</sup>.

### 3. Zdroje a klasifikace proteolytických enzymů

Nejběžnější endopeptidas se získávají z orgánů trávicího traktu obratlovců (pankreas – elastasa, enterokinasa, chymotrypsin, trypsin; žaludek – pepsin), z krve (thrombin), sleziny (kathepsiny), rostlinného materiálu (bromelain, ficain, papain) či z kultur mikroorganismů (Glu-C, Pronase, subtilisin, thermolysin). Aminopeptidas a karboxypeptidas se izolují z pankreatu, rostlin a mikroorganismů<sup>12</sup>.

Aktivní místo peptidas se obvykle nachází v rýze na povrchu molekuly mezi dvěma přilehlými strukturálními doménami<sup>8</sup>. Specifita enzymu je tak dána vlastnostmi vazebných míst umístěných podél rýhy u místa, kde probíhá hydrolyza peptidové vazby<sup>8</sup>. Při postupném zohledňování aktuálních poznatků o podstatě katalytického místa se nakonec ustálily čtyři charakteristické skupiny peptidas: serinové, cysteinové (thiolové), aspartátové a dále peptidas obsahující kovový ion jako kofaktor<sup>8,13</sup>. K nim pak nedávno přibyla skupina threoninových peptidas<sup>14</sup>. Tato v podstatě již historická klasifikace se dodnes objevuje v tzv. systému EC, na němž je založeno názvosloví enzymů<sup>8</sup>. Pro diskusi evolučních a strukturálních vztahů mezi

## Tabulka I

Klasifikace proteolytických enzymů v Enzyme Nomenclature<sup>17,18</sup>.

Endopeptidasy s dosud neznámým mechanismem katalýzy tvoří podpodtřídu EC 3.4.99.

Podpodtřída	Souhrnný název	Typický příklad	Poznámka
EC 3.4.11	aminopeptidasy	leucylaminopeptidasa, EC 3.4.11.1	zahrnuje i bývalé EC 3.4.1
EC 3.4.13	dipeptidasy	Glu-Glu dipeptidasa, EC 3.4.13.7	zahrnuje i bývalé EC 3.4.3
EC 3.4.14	dipeptidylpeptidasy, tripeptidylpeptidasy	dipeptidyl-dipeptidasa I, EC 3.4.14.1	zahrnuje i bývalé EC 3.4.4
EC 3.4.15	peptidyl-dipeptidasy	peptidyl-dipeptidasa A, EC 3.4.15.1	
EC 3.4.16	serinové karboxypeptidasy	karboxypeptidasa C, EC 3.4.16.5	zahrnuje i bývalé EC 3.4.12
EC 3.4.17	metalokarboxypeptidasy	karboxypeptidasa A, EC 3.4.17.1	zahrnuje i bývalé EC 3.4.2, EC 3.4.12
EC 3.4.18	cysteinové karboxypeptidasy	kathepsin X, EC 3.4.18.1	
EC 3.4.19	$\omega$ -peptidasy	pyroglutamylpeptidasa I, EC 3.4.19.3	zahrnuje i bývalé EC 3.4.12
EC 3.4.21	serinové endopeptidasy	trypsin, EC 3.4.21.4	
EC 3.4.22	cysteinové endopeptidasy	papain, EC 3.4.22.2	zahrnuje i bývalé EC 3.4.4
EC 3.4.23	aspartátové endopeptidasy	pepsin A, EC 3.4.23.1	zahrnuje i bývalé EC 3.4.4
EC 3.4.24	metaloendopeptidasy	thermolysin, EC 3.4.24.27	zahrnuje i bývalé EC 3.4.4
EC 3.4.25	threoninové endopeptidasy	komplex endoproteinas proteasomu, EC 3.4.25.1	

peptidasami je důležitý princip homologie, tedy zjišťování podobnosti, která není náhodná, na základě porovnání (alignment) aminokyselinových sekvencí<sup>15</sup>. Vyčerpávající informace o peptidasách a jejich proteinových inhibitech jsou k dispozici v databázi MEROPS, která je přístupná on-line na <http://merops.sanger.ac.uk/> (cit.<sup>16</sup>).

Proteolytické enzymy jsou v katalogu Enzyme Nomenclature<sup>17</sup>, který aktualizuje a vydává názvoslovný výbor při IUBMB, klasifikovány jako součást třídy 3-hydrolasy (celkem je šest enzymových tříd). Peptidasy tvoří podtřídu 3.4-hydrolasy působící na peptidové vazby. V rámci této podtřídy pak rozlišujeme celou řadu podpodtříd (tabulka I). Katalog enzymů v hypertextové formě s odkazy na další specializované webové stránky a databáze je k dispozici na internetu, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Katalog je vydáván knižně<sup>17</sup> a aktualizován dodatky<sup>18</sup>. Při srovnání způsobu klasifikace ostatních enzymů na jedné straně a peptidas na straně druhé nalezneme jednu významnou odlišnost<sup>8</sup>. Rozdílné proteiny jsou klasifikovány jako jeden a týž enzym, katalyzují-li stejnou reakci. Na základě popisu této reakce pak můžeme enzym snadno pojmenovat. Pokud jediný enzymový protein katalyzuje několik reakcí, může mít přiřazeno i více EC čísel. Pro peptidasy byl zvolen odlišný přístup, neboť v základním principu je reakce, kterou katalyzují, všeobecně shodná. Specifita se samozřejmě liší, ale i když je známa, je prakticky nemožné z ní vyvodit jednoduché pojmenování. Závisí totiž nejen na charakteru aminokyselinových zbytků

okolo štěpného místa, ale i na konformaci polypeptidového řetězce substrátu<sup>8</sup>. Využívá se proto klasifikace podle typu katalytického místa na základě experimentů s inhibitory<sup>8</sup>. Nadto jsou odlišeny i peptidasy z různých zdrojů, které jinak vykazují obdobnou nebo identickou specifitu: např. elastasa z pankreatu (EC 3.4.21.36) a elastasa z leukocytů (EC 3.4.21.37).

#### 4. Stručný přehled vlastností vybraných enzymů

V proteomice nacházejí uplatnění zejména endopeptidasy používané k přípravě peptidových směsí a následné MS analýze peptidů (tabulka II)<sup>1,12</sup>. Svůj význam však mají i karboxypeptidasy a aminopeptidasy, které se využívají pro tzv. žebříčkové sekvencování (ladder sequencing) a při analýze posttranslačních modifikací proteinů<sup>19–22</sup>. Po endopeptidasovém štěpení proteinového vzorku následuje postupné štěpení exopeptidasou z C- nebo N-konce. Jsou generovány série peptidů (ladders), ve kterých se každá komponenta liší od té následující o jeden aminokyselinový zbytek. Tyto peptidy jsou analyzovány metodou MS a na základě hmotnostních rozdílů mezi po sobě následujícími proteolytickými fragmenty je pak určena aminokyselinová sekvence. Celý proces vede k identifikaci místa modifikace.

Trypsin (EC 3.4.21.4) je serinová endopeptidasa trávicího traktu obratlovců s mírně alkalickým optimálním

Tabulka II  
Proteolytické enzymy běžně používané v proteomice<sup>1,12,17,18</sup>

Enzym	Místo štěpení	Výjimka	Rozsah pH
Trypsin	C-konec R-X, K-X	X = P	7,0–9,0
Chymotrypsin	C-konec F-, Y-, W-, L-, I-, V- a M-X	X = P	7,5–8,5
Endoproteinasa Glu-C (V8-DE)	C-konec E-X, D-X	X = P	4,0–8,0
Endoproteinasa Lys-C	C-konec K-X	(X = P)	8,5–8,8
Endoproteinasa Arg-C	C-konec R-X	(X = P)	7,5–8,5
Endoproteinasa Asp-N	N-konec X-D, X-E		6,0–8,5
Elastasa	C-konec A, V, L, I, G, S		8,5
Pepsin	F, M, L, W (zvl. F-L, F-F, F-Y)		2–4
Pronase	směs endo- a exoproteinas, štěpí téměř všechny peptidové vazby		7,0–8,0 <sup>a</sup>
Subtilisin	široká specifita, pref. C-konec nenabitě aminokyseliny		7,0–11,0
Thermolysin	široká specifita (W, Y, F, I, L, V, A, M), převážně N-konec X-F, X-L		6,0–10,0

<sup>a</sup> V závislosti na povaze směsi

pH a striktní specifitou pro zbytky lysinu a argininu. Trypsin je z pankreatu vylučován do dvanáctníku ve formě inaktivního prekurzoru trypsinogenu<sup>23</sup>. Hovězí trypsinogen má relativní molekulovou hmotnost 24 000 a pI 9,4. Aktivuje se odštěpením N-koncového hexapeptidu působením enterokinasy a kaskádovitě pak autolýzou<sup>12</sup>. Vzniká  $\beta$ -trypsin s jedním polypeptidovým řetězcem (223 aminokyselin;  $M_r = 23\,300$ ; pI 10,5)<sup>12,24</sup>, který podléhá další autolýze za vzniku víceřetězcových produktů (řetězce spojeny disulfidovými vazbami) –  $\alpha$ -trypsinu (2 řetězce) a pseudotrypsinu (3 řetězce). Pseudotrypsin se svou specifitou štěpení blíží chymotrypsinu<sup>25</sup>. Trypsin obsahuje 101 aminokyselin ve stejných polohách jako v sekvenci chymotrypsinu (41 %)<sup>12,23</sup>.

Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) ve skutečnosti představuje skupinu strukturně a katalyticky příbuzných serinových endopeptidas (optimum pH  $\sim 7,0$ – $9,0$ )<sup>12</sup>. Extrakt z hovězího pankreatu obsahuje dvě formy zymogenu: chymotrypsinogen A (245 aminokyselin;  $M_r = 25\,700$ ; pI 9,1) a chymotrypsinogen B (248 aminokyselin;  $M_r = 25\,800$ ; pI 5,2)<sup>12</sup>. Aktivace zymogenů se účastní trypsin, zčásti je autokatalytická. V závislosti na podmínkách mohou z chymotrypsinogenu A vznikat  $\pi$ -,  $\alpha$ -,  $\delta$ -,  $\beta$ - nebo  $\gamma$ -chymotrypsin<sup>12</sup>. Specifita štěpení je na rozdíl od trypsinu nízká<sup>26</sup>, preferuje aromatické aminokyseliny (tabulka II).

Elastasa (EC 3.4.21.36) je serinová endopeptidasa (240 aminokyselin;  $M_r = 25\,700$ ). Inaktivní prekurzor proelastasa se tvoří v pankreatu a je aktivován trypsinem. Vykazuje homologii s trypsinem i chymotrypsinem, zejména pokud jde o důležité katalytické aminokyseliny. Specifita štěpení zahrnuje nepolární nearomatické zbytky (tabulka II), optimum pH je 8,0–8,5 (cit.<sup>12</sup>).

Pepsin je kyselá aspartátová endopeptidasa

(maximální aktivita při pH 1,0–2,0), která je hlavním enzymem žaludeční šťávy obratlovců<sup>12</sup>. Majoritní složkou je pepsin A (EC 3.4.23.1) s relativní molekulovou hmotností 34 500 (327 aminokyselin). V žaludeční sliznici se tvoří jako inaktivní pepsinogen ( $M_r = 42\,500$ ). Aktivace zymogenu je autokatalytická v přítomnosti HCl (cit.<sup>12</sup>). Minoritní pepsiny jsou klasifikovány jako pepsin B (gelatinasa, EC 3.4.23.2) a pepsin C (gastriksin, EC 3.4.23.3), tvoří se z vlastních zymogenů. Specifita štěpení (tabulka II) zahrnuje hydrofobní zbytky, zvláště aromatické<sup>12</sup>.

Subtilisiny (EC 3.4.21.62) představují širokou skupinu extracelulárních serinových endopeptidas (optimum pH  $\sim 10,0$ ) s vysokou termostabilitou, které jsou produkovány bakteriemi rodu *Bacillus*<sup>27</sup>. Nejznámější jsou subtilisin typ Carlsberg a subtilisin BPN' (shodný s preparátem Novo, též Nagarse) z *B. subtilis* respektive *B. amyloquefaciens*. Jsou to strukturně velmi podobné enzymy tvořené jediným polypeptidovým řetězcem, který čítá 274 (Carlsberg) nebo 275 aminokyselinových zbytků (BPN'). Relativní molekulová hmotnost činí zhruba 27 500, specifita štěpení je nízká. Existuje jistá preference pro velký nenabitý zbytek u štěpené peptidové vazby substrátu<sup>27</sup>.

Thermolysin (EC 3.4.24.27) je termostabilní neutrální metaloendopeptidasa z *Bacillus thermoproteolyticus* (316 aminokyselin;  $M_r = 37\,500$ ). Molekula obsahuje ion  $Zn^{2+}$  a 3 ionty  $Ca^{2+}$ , vápník přispívá k termostabilitě<sup>28</sup>. Zhruba 50 % aktivity přetrvává hodinovou inkubací při 80 °C (cit.<sup>12</sup>). Jeho specifita není vyhraněná (tabulka II), podobně jako u subtilisinu lze rozoznat jistou preferenci<sup>28</sup>.

*Streptomyces griseus* slouží k produkci komerčního produktu s obchodní značkou Pronase<sup>12</sup>. Jde o filtrát z kultury zmíněné streptomycety, který obsahuje směs proteolytických enzymů (např. SG-trypsin, proteasu A

a B)<sup>29</sup>. Významnou složkou je i serinová endopeptidasa, která preferenčně štěpí u karboxylu kyseliny glutamové. Označuje se jako proteasa E (188 aminokyselin;  $M_r = 20\ 000$ )<sup>29</sup>.

Serinová endopeptidasa Glu-C (též Protease V8, EC 3.4.21.19) je produktem bakterie *Staphylococcus aureus* V8. Štěpí peptidové vazby na C-konci kyseliny glutamové případně kyseliny asparagové (u Asp ve srovnání s Glu až 3000× pomaleji, optimum pH ~ 8,0)<sup>30</sup>. Sekvence má 268 aminokyselin ( $M_r = 30\ 000$ ), tvoří se z prekursoru (336 aminokyselin;  $M_r = 36\ 300$ )<sup>31</sup>. Endopeptidasa Lys-C (EC 3.4.21.50) z *Lysobacter enzymogenes* rovněž obsahuje katalytický serin (269 aminokyselin;  $M_r = 28\ 000$ ). V rozmezí pH 7,0–9,0 štěpí peptidové vazby na C-konci lysinu<sup>32,33</sup>. Thiolová endopeptidasa Arg-C z *Clostridium histolyticum* (clostripain, EC 3.4.22.8) je heterodimer (526 aminokyselin;  $M_r = 59\ 600$ )<sup>34</sup>. Serinová endopeptidasa Arg-C (EC 3.4.21.-) z *Lysobacter enzymogenes* je monomer ( $M_r = 26\ 000$ )<sup>35</sup>. Oba enzymy štěpí specificky u argininového karboxylu (optimum pH ~ 7,5). Enzym Asp-N (EC 3.4.24.33) z *Pseudomonas fragi* je metaloendopeptidasa ( $M_r = 27\ 000$ )<sup>36</sup>, která štěpí peptidové vazby na N-konci kyseliny asparagové nebo cysteové v rozmezí pH 6,0–8,0 (cit.<sup>37</sup>).

Nejznámější metalokarboxypeptidasy jsou karboxypeptidasy A a B, které se liší štěpením aminokyselin z C-konce substrátů<sup>12</sup>. Karboxypeptidasa A (EC 3.4.17.1) preferenčně štěpí aminokyseliny s aromatickým nebo rozvětveným postranním řetězcem. Naproti tomu karboxypeptidasa B (protaminasa, EC 3.4.17.2) preferenčně odštěpuje lysin a arginin<sup>12</sup>. Karboxypeptidasa Y (též karboxypeptidasa C, EC 3.4.16.5) je serinová exopeptidasa. Enzym z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ( $M_r = 60\ 000$ ) má optimum pH při 4,5–6,0 (cit.<sup>38</sup>). Má širokou specifitu a uvolňuje z C-konce proteinů a peptidů aminokyselinové zbytky včetně prolinu, u glycinu a kyseliny asparagové je uvolňování významně zpomalené<sup>17</sup>.

## 5. Trypsin a jeho výjimečné postavení v proteomice

Rychlý vývoj genomiky přinesl generování objemných databází, které zahrnují nejen fragmenty DNA, ale i celé genomy. Úspěch strategie identifikace proteinů v proteomice spoléhá na výskyt hledané proteinové sekvence v takové databázi<sup>1,3</sup>. U organismů s dosud neznámým genomem je pomůckou *de novo* sekvencování peptidů a předpoklad homologie (vyhledávání typu MS Blast (cit.<sup>39</sup>) nebo MultiTag (cit.<sup>40</sup>)). Pro štěpení proteinů v roztoku se využívají endopeptidasy uvedené v tabulce II, případně některé další enzymy (proteinas K, cit.<sup>41</sup>). Pokud provádíme štěpení v polyakrylamidovém gelu, jedním z limitujících faktorů difuze peptidasy k substrátu je velikost její molekuly. Pro 12% polyakrylamidový gel, který je standardně používán k přípravě proteinového vzorku pro MS analýzu<sup>42</sup>, byla odvozena zdánlivá velikost pórů 20 až

30 Å (cit.<sup>43</sup>). Molekula  $\beta$ -trypsinu má včetně solvatačního obalu rozměry menší (17 Å)<sup>44</sup>. Pro větší molekuly peptidas je difuzi bráněno ze sterických důvodů, případně je zcela znemožněna. K dalším výhodám použití trypsinu v proteomice patří jeho striktní substrátová specifita daná konfigurací aktivního místa (obr. 1), která poskytuje přiměřené množství definovaných peptidových fragmentů o příznivé ionizovatelnosti a velikosti pro MS analýzu<sup>1</sup>. Ostatně, výhodné je i optimum pH trypsinu, které umožňuje práci s levným těkavým pufrem na bázi hydrogenuhličitanu amonného (pH 7,8)<sup>4</sup>.

Používání trypsinu je rozšířeno o protokoly s ostatními peptidasami. Většinou nejde o rutinní peptidové mapování, ale o analýzu specifických vlastností proteinů. Chymotrypsin někdy nahrazuje či doplňuje trypsin pro působení v roztoku i gelu<sup>45,46</sup>. Vzhledem k velikosti molekuly je pro štěpení proteinů v gelu vhodná i elastasa, např. při lokalizaci fosforylačních míst<sup>47</sup>. Při studiu glykosylace se uplatnily peptidasy Glu-C a Asp-N (cit.<sup>48</sup>). Použití Glu-C, Lys-C, případně thermolysinu se osvědčilo při analýze peptidů s disulfidovými vazbami<sup>49</sup>. Peptidasy Asp-N, Arg-C, Glu-C a Lys C jsou díky striktní specifitě výhodné pro peptidové mapování. S ohledem na velikost molekuly mohou být použity i v gelu<sup>33,50,51</sup>. Aplikace Pronasy je vázána na analýzu proteinových modifikací – posttranslačních<sup>52</sup> či vyvolaných působením chemických látek<sup>53</sup>. Enzym totiž poskytuje pouze krátké peptidy (2–8 aminokyselin)<sup>52</sup> a pro peptidové mapování je tak nevhodný. Pepsin nebo i jiné peptidasy s kyselým optimem pH se využívají zejména při MS detekci strukturálních změn v proteinech na základě izotopové výměny vodík/deuterium<sup>54,55</sup>. Kyselá prostředí je důležité z toho důvodu, aby k proteolýze docházelo za podmínek, kdy je izotopová výměna pomalá. Pepsin byl použit i pro štěpení v gelu při analýze O-glykosylace proteinu<sup>56</sup>.

Jinými limitujícími faktory použití peptidas v proteomové analýze jsou doba nutná k dostatečné proteolýze vzorku a rezistence některých proteinů vůči štěpení (např. kompaktních globulinů). Použití trypsinu obvykle vyžaduje dobu inkubace 4–24 h, pro některé proteiny je ale i tak neúčinný<sup>57</sup>. Průběh štěpení je primárně závislý na mobilitě struktury substrátu, kterou je možné ovlivňovat přítomností denaturačních činidel nebo teplotou<sup>58,59</sup>. Za zvýšené teploty lze využít termofilních peptidas: thermolysin poskytuje významné množství analyzovatelných peptidových fragmentů již během krátké inkubace při 65 °C (15 min). Specifita štěpení thermolysinu je při této teplotě mnohem vyšší než za běžných teplot<sup>57</sup>. Pro proteiny náchylné k proteolýze (např. myoglobin) je efekt thermolysinu za zvýšené teploty extrémně rychlý a peptidové fragmenty je tak možné získat přímo na destičce MALDI<sup>57</sup>.

## 6. Měření proteolytické aktivity

Měřítkem aktivity endopeptidas je množství štěpných peptidů uvolněných za určitý časový interval. Absolutní kvantifikace štěpných peptidů např. hmotnostní spektro-

metrií je však obtížná a časově náročná<sup>60</sup>. Pro štěpení v gelu je stanovení dále zatíženo výraznou statistickou chybou související se sterickým stíněním štěpných míst<sup>60</sup>. Nejstarší metody měření aktivity jsou založeny na spektrofotometrickém stanovení peptidů v reakční směsi po vysrážení a odstranění nezreagovaného proteinového substrátu. Ansonova metoda využívá hemoglobinu jako substrátu a štěpné peptidy (obsahující Tyr) se stanovují fenolovým činidlem<sup>61</sup>. Kunitzova metoda je založena na štěpení kaseinu, absorpce uvolněných peptidů (s obsahem Tyr a Trp) se měří při 280 nm (cit.<sup>62</sup>). S rozvojem chemie peptidů se začaly více uplatňovat syntetické substráty. Jejich štěpení endo- či exopeptidasou má nejčastěji za následek uvolnění chromoforu (existují však i rozmanité fluorogenní substráty), který se měří spektrofotometricky při odpovídající vlnové délce. Pro trypsin jsou k dispozici ethylester *N*<sup>α</sup>-benzoyl-L-argininu (BAEE) nebo *N*<sup>α</sup>-benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid (BAPNA)<sup>63</sup>. V prvním případě se sleduje nárůst absorpce při 253 nm, ve druhém případě při 405 nm. Jako substrát pro chymotrypsin se používá ethylester *N*-benzoyl-L-tyrosinu (BTEE); měří se při 256 nm (cit.<sup>64</sup>). Vhodným substrátem pro pepsin je oktapeptid Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe(NO<sub>2</sub>)-Ala-Leu (monitorování při 300 nm)<sup>65</sup>. Aktivitu peptidas specifických pro kyselinu glutamovou (např. SGPE ze *Streptomyces griseus*) lze určit s použitím substrátu Z-Glu-NH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NO<sub>2</sub> (410 nm)<sup>29</sup>. Aktivitu nespecifického subtilisinu lze rutinně stanovit s použitím řady substrátů, zmínit lze např. *N*-sukcinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-4-nitroanilid<sup>27</sup>. Substrátem pro karboxypeptidasu A je např. Bz-Gly-L-α-hydroxy-β-fenyl-laktát (monitorování při 254 nm)<sup>66</sup>.

## 7. Počítačová predikce štěpných peptidů

Zásadní význam pro identifikaci proteinů metodou MS má predikce (předpověď), jaké peptidy vzniknou proteolytickým štěpením proteinů. Metodologie identifikace proteinů je založena buď na principu tzv. map molekulových hmotností peptidů (peptide mass mapping či peptide mass fingerprinting) nebo na principu identifikace úplné či částečné sekvence (sequence tag)<sup>67–69</sup>. Oba tyto přístupy jsou závislé na srovnání experimentálně získaných dat s předpověděnými. V prvním případě jde o srovnání experimentálně získaného souboru molekulových hmotností peptidů nebo souboru molekulových hmotností iontů fragmentů vzniklých z prekurzorového iontu s příslušnými předpověděnými soubory. V druhém případě se pak srovnává experimentálně zjištěná úplná nebo částečně interpretovaná aminokyselinová sekvence s jejich předpověďmi. Soubory dat se vždy předpovídají s ohledem na experimentální podmínky. Základem takové předpovědi jsou sekvence v kompozitních neredundantních databázích<sup>70</sup> (např. OWL, NRDB, viz níže). Následně, při procesu zvaném štěpení *in silico*, se na takto získané sekvence aplikuje algoritmus, který nahrazuje štěpení enzymem. Tento proces generuje soubor peptidových sekvencí a jejich molekulových hmotností, a to buď ve formě jejich hmotností mo-

noizotopických nebo monoizotopických s adicí protonu (zohledňuje produkty vzniklé ionizací). Soubor by měl obsahovat i takové sekvence, které obsahují nedokonale štěpené úseky (miscleavage sites), vzniklé blokováním daného štěpného místa pro peptidasu sterickým uspořádáním. Jejich počet nastavuje uživatel; běžně se užívá generování peptidů obsahujících jeden až dva nedokonale štěpené úseky, pro volbu více než dvou musejí být zásadní důvody. To proto, že soubor proteolytických štěpů musí být pro následné srovnání s experimentálními daty co nejstručnější, jinak je ohroženo správné statistické vyhodnocení shody<sup>71</sup>. Dalšími položkami v souboru jsou peptidové sekvence obsahující modifikované aminokyseliny. Může jít o modifikace přirozené – např. fosforylace, záměrné – např. alkylace cysteinu, nebo o modifikace vzniklé v průběhu přípravy vzorku – např. oxidace methioninu nebo tryptofanu. Opět platí, že vnesením příliš mnoha modifikačních parametrů (> 2) se vzniklý soubor nadbytečně komplikuje. Co proces generování štěpných peptidů nemůže zohledňovat, to jsou posttranslační úpravy jako například alternativní sestřih.

Existuje mnoho volně i komerčně dostupných programů, které umožňují identifikaci proteinů na základě předpovězených proteolytických štěpů a statistické vyhodnocení shody. Odlišnosti jsou převážně v metodách vyhodnocení: <http://umber.sbs.man.ac.uk/dbbrowser/OWL/>, <http://www.ebi.ac.uk/~holm/nrdb90/>, <http://prospector.ucsf.edu/>, <http://www.matrixscience.com/>, <http://www.expasy.org/tools/>, <http://prowl.rockefeller.edu/>, <http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptidesearchpage.html>, [http://vigen.biochem.vt.edu/protein\\_prospector/ucsfhtml4.0/instruct/fitman.htm#scoring](http://vigen.biochem.vt.edu/protein_prospector/ucsfhtml4.0/instruct/fitman.htm#scoring).

## 8. Varianty procesu proteolýzy používané v proteomice

Původně se trypsin v proteomové analýze používal pro rozložení vzorku na štěpné produkty, které usnadňovaly či vůbec umožňovaly analýzu<sup>72</sup>. S nástupem peptidového mapování a proteomiky s použitím MS se ukázalo, že štěpení proteinů trypsinem (zkráceně trypsinace) musí splňovat určité podmínky dané povahou metodiky analýzy. Jde především o maximální výtěžek a úplnost štěpení (co největší počet peptidů vzniklých trypsinací daného proteinu a přitom experimentálně zjistitelných z jejich předpověděného počtu pozitivně ovlivňuje statistické skóre při vyhodnocení identifikace), minimalizace autolýzy trypsinu a opakovatelnost map molekulových hmotností peptidových štěpů<sup>60</sup>. Proces proteolytického štěpení v roztoku obsahuje z toho důvodu určitý poměr enzym/substrát (např. 1:50 až 1:5)<sup>60</sup>. Provádí se i redukce disulfidových vazeb dithiothreitem a alkylace reaktivních cysteinů jodacetamidem, avšak jen je-li to nutné<sup>73</sup>. Štěpení trypsinem běžně probíhá 12 h při 37 °C, použitím methylovaného trypsinu při 58 °C lze dobu štěpení zkrátit na 30 min (cit.<sup>4,60</sup>).

Podstatně větší význam pro proteomiku má analýza proteinů separovaných v polyakrylamidových gelech<sup>74</sup>. Proteolýza v gelu je sice komplikována přítomností polyakrylamidové matrice, do které musí trypsin proniknout, na druhou stranu je usnadněna manipulace se vzorkem, např. při odstraňování produktů alkylace cysteinu. Po vyvolání barvením pomocí modří Coomassie<sup>74</sup> nebo stříbrem<sup>42</sup> jsou proteinové pásy vyříznuty s minimem neobarvených okrajů. Tyto části jsou potom dále nařezány na kostičky o velikosti cca 1 mm<sup>3</sup>. Kvůli manipulaci se nedoporučují menší fragmenty (ucpávání špičky mikropipety). Následuje odbarvení, dehydratace acetonitrem a vysušení. Gel je pak rehydratován roztokem trypsinu (1,5 μM) v 50 mM uhličitane amonném při 4 °C, přičemž délka rehydratace určuje výtěžek enzymového štěpení<sup>4</sup>. Štěpení se provádí 12 h při 37 °C (je-li použit methylovaný trypsin, štěpí se 30 min při 58 °C)<sup>4,60</sup>. Postup lze rozšířit o redukci a alkylaci, jak již bylo uvedeno výše.

Proteolytické štěpení vzorku na membránách po přenosu z gelu metodou Western blotting se s nástupem proteomiky využívající MS začalo provádět dříve než přímá trypsinace proteinů v gelech<sup>75</sup>. V běžném postupu OMD (on-membrane digestion) se pracuje s poly(vinylidendifluoridovou) tedy PVDF membránou, která je po přenosu obarvena roztokem amidočerní<sup>76</sup>. Vyříznuté kousky membrány se odbarví zředěným methanolem a vysuší. Potom se přidá roztok trypsinu v uhličitane amonném s 30% obsahem acetonitrilu a pokračuje se inkubací 12 h při laboratorní teplotě. Následuje odebrání horní vrstvy a extrakce peptidů. Spojený materiál se vysuší ve vakuovém koncentrátoru a suspenduje ve vhodném rozpouštědle pro následnou MS analýzu<sup>76</sup>. Inovací klasického postupu je tzv. proces jednostupňového štěpení a přenosu (OSDT, one-step digestion-transfer)<sup>76</sup>. OSDT se provádí při laboratorní teplotě ve speciálním zařízení po dobu 12–18 h. Používá se komerčně dostupná membrána Immobilon-AV (IAV), což je PVDF membrána s aktivovanými karboxy skupinami pro vazbu proteinů nebo peptidů. Přenosový/štěpící sendvič se skládá z dvojité vrstvy membrány IAV imobilizovaným trypsinem vložené mezi polyakrylamidový gel a PVDF membránu (sběrná plocha pro uvolněné peptidy)<sup>76</sup>.

Princip štěpení vzorku trypsinem imobilizovaným na membráně je zdokonalen při on-line proteolýze v mikrokolonách/reaktorech, a to v souvislosti s nahrazováním klasické 2D elektroforézy vícerozměrnou chromatografií (MDC, multidimensional chromatography)<sup>77</sup>. Štěpení se provádí ve vodných roztocích<sup>78</sup> nebo ve směsi s mísitelnou organickou fází<sup>79</sup>. Získané peptidy se buď přímo analyzují metodou MS nebo dále separují. Pro přímé spojení štěpení s nanoESI-MS analýzou bylo též popsáno nano-zařízení s trypsinem ukotveným na membráně<sup>80</sup>. Zajímavou možností je rychlé štěpení trypsinem ukotveným na destičce MALDI (on-probe digestion). Jeho nevýhodou je nutnost vysoké koncentrace trypsinu a tím i zvýšená kontaminace autolytickými produkty<sup>81</sup>. Srovnání

účinnosti štěpení trypsinem v roztoku a imobilizovaným trypsinem je shrnuto v cit.<sup>82</sup>.

## 9. Modifikace proteolytických enzymů (modulace funkčnosti a termostability)

Modulační modifikace se týkají především dostupného trypsinu (i když třeba i chymotrypsinu), jehož zásadní použití v proteomice je omezeno dvěma komplikacemi. Enzym má poměrně malou termostabilitu – k jeho výrazné inaktivaci dochází již při 37 °C (30% pokles aktivity po půlhodinové inkubaci)<sup>4</sup>. V podmínkách optimální funkčnosti trypsinu (mírně alkalické pH) a v nepřítomnosti stabilizujících iontů Ca<sup>2+</sup> probíhá navíc rychlá autolýza<sup>83</sup>. Autolytické peptidy představují rušivé pozadí při MS analýze směsi štěpných peptidů (digestu). Vzhledem ke specifitě štěpení (tabulka II) je možné autolýzu eliminovat kovalentní modifikací zbytků lysinu a argininu v molekule trypsinu<sup>83,84</sup>. Nejjednodušším postupem je alkylace nebo acylace lysinu<sup>83–86</sup>. Připravené deriváty, např. methylovaný<sup>83</sup>, resp. acetylovaný<sup>85</sup> nebo sukcinylovaný<sup>86</sup> trypsin, vykazují podstatně vyšší rezistenci vůči autolýze než samotný trypsin. Acetamidinací lze docílit zachování kladného náboje původního zbytku<sup>84</sup>. Reakcí trypsinu s 1-guanyl-3,5-dimethylpyrazolem vzniká stabilní guanylovaný trypsin<sup>86</sup>. Argininové zbytky v proteinech se kvůli své značné bazicitě alkylují nebo acylují obtížně. Pro trypsin byla popsána jejich modifikace reakcí s biacetylem<sup>84</sup>.

Již methylovaný trypsin je ve srovnání s nemodifikovaným enzymem odolnější vůči vyšším teplotám<sup>4</sup>. Enzym byl též stabilizován nitrací povrchových tyrosinových zbytků a jejich následnou redukci na aminotyrosin<sup>87</sup>. K obdobné stabilizaci vedla acylace α-chymotrypsinu reakcí s anhydridy aromatických karboxylových kyselin<sup>87</sup>. Výrazné rezistence vůči tepelné inaktivaci lze dosáhnout vytvářením konjugátů s oligo- a polymery. Za zmínku stojí modifikace lineárními oligosacharidy<sup>88</sup> či cyklodextriny<sup>89</sup>. Cyklodextrinové konjugáty trypsinu byly připraveny enzymovou metodou s transglutaminasou<sup>89</sup>. V případě polymerů je ovšem výsledkem rozměrná molekula, která sice může katalyticky působit v roztoku, ale je nepoužitelná pro štěpení v gelu. V literatuře lze najít zmínky o konjugátech trypsinu např. s poly(*N*-isopropylakrylamidem)<sup>90</sup>, methoxypolyethylenglykolem<sup>91</sup>, polymery sacharosy<sup>63</sup> a karboxymethylcelulosou<sup>92</sup>. Naše skupina se zabývá konjugáty hovězího trypsinu s oligosacharidy a jejich testováním pro štěpení v gelu při peptidovém mapování (MALDI-MS)<sup>93</sup>. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím rafinosy, maltotriosy a stachyosy (pro reakci aktivovány oxidací jodistanem). Příslušné modifikované trypsinu vykazují vysokou termostabilitu (50% inaktivace nastává až při teplotách nad 60 °C, inkubace 30 min), produkce autolytických peptidů je ve srovnání se samotným hovězím trypsinem výrazně omezena<sup>93</sup>.

## 10. Závěr – perspektivy proteolýzy v moderní proteomice

Moderní techniky ESI-MS (ve spojení s kvadrupólovou iontovou pastí nebo analyzátozem FT-ICR – Fourier transform ion cyclotron resonance) a MALDI-MS (TOF/TOF, time-of-flight) umožňují pracovat s intaktními proteiny, provádět jejich fragmentaci a měření MS/MS (cit.<sup>94</sup>). Tento postup se označuje jako top-down analýza (fungující shora dolů, tj. od intaktního proteinu k fragmentům). Aktuální alternativu představuje metoda bottom-up (zdola nahoru), která se též označuje jako shotgun (= angl. poloautomatická brokovnice střelící v krátkých intervalech)<sup>94</sup>. „Shotgun“ proteomika je založena na počátečním štěpení složitěho proteinového vzorku buď působením peptidas nebo chemickou metodou. Výsledkem je směs peptidů, která je analyzovatelná metodou LC-ESI-MS/MS nebo MALDI-MS s následnou identifikací bioinformatickými metodami. Použití MALDI-MS je však omezené kvůli složitosti digestů proteomů např. celých virů nebo bakterií. Výhodnější metodou LC-ESI-MS/MS lze během jednoho dne rutinně analyzovat 500–1000 proteinů z buněčného lyzátu, a to na jediném přístroji. Parametry dostupných technik „shotgun“ proteomiky jako jsou úhrnná rychlost, citlivost a dynamický rozsah, nemohou být v současné době s použitím ostatních metod překonány<sup>94</sup>.

Jak již bylo zmíněno v úvodní části, fragmentace membránových a jiných ve vodě nerozpustných proteinů je často prováděna chemickými metodami, tedy v prostředí organických rozpouštědel nebo jejich směsí s vodou (methanol, acetonitril, kyselina mravenčí). Podle potřeby se navíc ještě přidávají detergenty<sup>95</sup>. Samotné chemické štěpení však často neposkytuje peptidy vhodné pro přímou MS analýzu. Tento stupeň je proto nutné kombinovat se štěpením enzymovým<sup>96</sup>. Zde bohužel narážíme na nutnost úpravy vzorku pro dosažení optimálních podmínek proteolýzy, což způsobuje nežádoucí prodlevy, zvláště ve vysoce výkonné a „shotgun“ proteomice. Řada laboratoří se proto zaměřila na vývoj a hledání postupů umožňujících aplikaci peptidas v prostředích s obsahem organického rozpouštědla<sup>97</sup>. Vzhledem k principu štěpné reakce je nutná alespoň minimální přítomnost vody v reakční směsi (proteolýza je totiž hydrolyza). V současné době lze nalézt např. práce využívající trypsinaci ve směsi 60 % methanolu a 40 % vodného roztoku  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 7,9 (cit.<sup>98</sup>). Dalším přístupem může být fragmentace nerozpustných proteinů robustní, ale nespecifickou proteinasou K<sup>99</sup>. Nabízí se rovněž chemická modifikace specifických peptidas, zejména trypsinu, pro zvýšení stability v nevodných prostředích jako je 50% acetonitril (Šebela a spol., nepublikované výsledky).

### LITERATURA

1. Westermeier R., Naven T.: *Proteomics in Practice. A Laboratory Manual To Proteome Analysis*. Wiley-VCH, Weinheim 2002.
2. Lamond A., Mann M.: *Trends Cell Biol.* 7, 139 (1997).
3. Pandey A., Mann M.: *Nature* 405, 837 (2000).
4. Havliš J., Thomas H., Šebela M., Shevchenko A.: *Anal. Chem.* 75, 1300 (2003).
5. Washburn M. P., Wolters D., Yates J. R. 3rd: *Nat. Biotechnol.* 19, 242 (2001).
6. Greenberg Z., Bisello A., Mierke D. F., Rosenblatt M., Chorev M.: *Biochemistry* 39, 8142 (2000).
7. Li A., Sowder R. C., Henderson L. E., Moore S. P., Garfinkel D. J., Fisher R. J.: *Anal. Chem.* 73, 5395 (2001).
8. Barrett A. J., v knize: *Proteolytic Enzymes. A Practical Approach* (Beynon R., Bond J. S., ed.), str. 1. Oxford University Press, Oxford 2001.
9. Grassmann W., Dyckerhoff H.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 179, 41 (1928).
10. Bergmann M., Ross W. F.: *J. Biol. Chem.* 114, 717 (1936).
11. Bergmann M.: *Adv. Enzymol.* 2, 49 (1942).
12. Scott T., Eagleson M.: *Concise Encyclopedia of Biochemistry*. Walter de Gruyter, Berlin-New York 1988.
13. Hartley B. S.: *Annu. Rev. Biochem.* 29, 45 (1960).
14. Seemüller E., Lupas A., Stock D., Löwe J., Huber R., Baumeister W.: *Science* 268, 579 (1995).
15. Rawlings N. D., Barrett A. J.: *Biochem. J.* 290, 205 (1993).
16. Rawlings N. D., Barrett A. J.: *Nucleic Acids Res.* 27, 325 (1999).
17. Kolektiv: *Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992*. Academic Press, San Diego 1992.
18. *Eur. J. Biochem.* 223, 1 (1993); *Eur. J. Biochem.* 232, 1 (1995); *Eur. J. Biochem.* 237, 1 (1996); *Eur. J. Biochem.* 250, 1 (1997); *Eur. J. Biochem.* 264, 610 (1999).
19. Bonetto V., Bergman A. C., Jornvall H., Sillard R.: *Anal. Chem.* 69, 1315 (1997).
20. Patterson D. H., Tarr G. E., Regnier F. E., Martin S. A.: *Anal. Chem.* 67, 3971 (1995).
21. Mano N., Iijima S., Kasuga K., Goto J.: *Anal. Sci.* 19, 1469 (2003).
22. Wang R., Chait B. T.: *Methods Mol. Biol.* 64, 175 (1997).
23. Walsh K., Neurath H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 52, 884 (1964).
24. Cunningham L.: *J. Biol. Chem.* 211, 13 (1954).
25. Keil-Dlouhá V., Zylber N., Imhoff J., Tong N., Keil B.: *FEBS Lett.* 16, 291 (1971).
26. Berezin I., Martinek K.: *FEBS Lett.* 8, 261 (1970).
27. Svendsen I.: *Carlsberg Res. Commun.* 41, 237 (1976).
28. Titani K., Hermodson M. A., Ericsson L. H., Walsh K. A., Neurath H.: *Biochemistry* 11, 2427 (1972).
29. Svendsen I., Jensen M. R., Breddam K.: *FEBS Lett.* 292, 165 (1991).
30. Sørensen S. B., Sørensen T. L., Breddam K.: *FEBS Lett.* 294, 195 (1991).
31. Drapeau G. R.: *Can. J. Biochem.* 56, 534 (1978).
32. Jekel P. A., Weijer W. J., Beintema J. J.: *Anal. Biochem.* 134, 347 (1983).



33. Jenö P., Mini T., Moes S., Hintermann E., Horst M.: *Anal. Biochem.* *224*, 75 (1995).
34. Dargatz H., Diefenthal T., Witte V., Reipen G., von Wettstein D.: *Mol. Gen. Genet.* *240*, 140 (1993).
35. Wright D. S., Graham L. D., Jennings P. A.: *Biochim. Biophys. Acta* *1443*, 369 (1998).
36. Noreau J., Drapeau G. R.: *J. Bacteriol.* *140*, 911 (1979).
37. Drapeau G. R.: *J. Biol. Chem.* *255*, 839 (1980).
38. Nakagawa Y., Ghotb-Sharif J., Douglas K. T.: *Biochim. Biophys. Acta* *706*, 141 (1982).
39. Shevchenko A., Sunyaev S., Loboda A., Shevchenko A., Bork P., Ens W., Standing K. G.: *Anal. Chem.* *73*, 1917 (2001).
40. Sunyaev S., Liska A. J., Golod A., Shevchenko A., Shevchenko A.: *Anal. Chem.* *75*, 1307 (2003).
41. Han J., Pope M., Borchers C., Graves L. M.: *Anal. Biochem.* *310*, 215 (2002).
42. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.: *Anal. Chem.* *68*, 850 (1996).
43. Sarbolouki M. N., Mahnam K., Rafiee-Pour H. A.: *Electrophoresis* *25*, 2907 (2004).
44. Nakasako M.: *J. Mol. Biol.* *289*, 547 (1999).
45. Marshall J., Jankowski A., Furesz S., Kireeva I., Barker L., Dombrowsky M., Zhu W., Jacks K., Ingratta L., Bruin J., Kristensen E., Zhang R., Stanton E., Takahashi M., Jackowski G.: *J. Proteome Res.* *3*, 364 (2004).
46. Christoffers K. H., Li H., Keenan S. M., Howells R. D.: *Mol. Brain Res.* *118*, 119 (2003).
47. Schlosser A., Bodem J., Bossemeyer D., Grummt I., Lehmann W. D.: *Proteomics* *2*, 911 (2002).
48. Zhang X., Medzihradzky K. F., Cunningham J., Lee P. D., Rognerud C. L., Ou C. N., Harmatz P., Witkowska H. E.: *J. Chromatogr., B* *759*, 1 (2001).
49. Merewether L. A., Le J., Jones M. D., Lee R., Shimamoto G., Lu H. S.: *Arch. Biochem. Biophys.* *375*, 101 (2000).
50. Vieths S., Frank E., Scheurer S., Meyer H. E., Hrazdina G., Hausteiner D.: *Scand. J. Immunol.* *47*, 263 (1998).
51. Vouquier S., Mary J., Friguet B.: *Biochem. J.* *373*, 531 (2003).
52. Wuhler M., Koeleman C. A., Hokke C. H., Deelder A. M.: *Anal. Chem.* *77*, 886 (2005).
53. Noort D., Fidder A., Hulst A. G., Woolfitt A. R., Ash D., Barr J. R.: *J. Anal. Toxicol.* *28*, 333 (2004).
54. Cravello L., Lascoux D., Forest E.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *17*, 2387 (2003).
55. Wang L., Pan H., Smith D. L.: *Mol. Cell. Proteomics* *1*, 132 (2002).
56. Holland J. W., Deeth H. C., Alewood P. F.: *Proteomics* *5*, 990 (2005).
57. Bark S. J., Muster N., Yates J. R. 3rd, Siuzdak G.: *J. Am. Chem. Soc.* *123*, 1774 (2001).
58. Hubbard S. J., Eisenmenger F., Thornton J. M.: *Protein Sci.* *3*, 757 (1994).
59. Park Z. Y., Russell D. H.: *Anal. Chem.* *72*, 2667 (2000).
60. Havliš J., Shevchenko A.: *Anal. Chem.* *76*, 3029 (2004).
61. Anson M. L.: *J. Gen. Physiol.* *22*, 79 (1938).
62. Kunitz M.: *J. Gen. Physiol.* *30*, 291 (1947).
63. Venkatesh R., Sundaram P. V.: *Protein Eng.* *11*, 691 (1998).
64. Al-Ajlan A., Bailey G. S.: *Arch. Biochem. Biophys.* *348*, 363 (1997).
65. Cottrell T. J., Harris L. J., Tanaka T., Yada R. Y.: *J. Biol. Chem.* *270*, 19974 (1995).
66. Peterson L. M., Sokolovsky M., Vallee B. L.: *Biochemistry* *15*, 2501 (1976).
67. Pappin D. J. C., Hojrup P., Bleasby A. J.: *Curr. Biol.* *3*, 327 (1993).
68. Perkins D. N., Pappin D. J. C., Creasy D. M., Cottrell J. S.: *Electrophoresis* *20*, 3551 (1999).
69. Zhang W. Z., Chait B. T.: *Anal. Chem.* *72*, 2482 (2000).
70. Holm L., Sander C.: *Bioinformatics* *14*, 423 (1998).
71. Wise M. J., Littlejohn T. G., Humphery-Smith I.: *Electrophoresis* *18*, 1399 (1997).
72. Puigdomenech P., Palau J., Crane-Robinson C.: *Eur. J. Biochem.* *104*, 263 (1980).
73. Borchers C., Peter J. F., Hall M. C., Kunkel T. A., Tomer K. B.: *Anal. Chem.* *72*, 1163 (2000).
74. Wilm M., Shevchenko A., Houthaev T., Breit S., Schweigerer L., Fotsis T., Mann M.: *Nature* *379*, 466 (1996).
75. Aebersold R. H., Leavitt J., Saavedra R. A., Hood L. E., Kent S. B. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *84*, 6970 (1987).
76. Bienvenut W. V., Sanchez J. C., Karmime A., Rouge V., Rose K., Binz P. A., Hochstrasser D.: *Anal. Chem.* *71*, 4800 (1999).
77. Massolini G., Calleri E.: *J. Sep. Sci.* *28*, 7 (2005).
78. Hsieh Y. L. F., Wang H. Q., Elicone C., Mark J., Martin S. A., Regnier F.: *Anal. Chem.* *68*, 455 (1996).
79. Slysz G. W., Schriemer D. C.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *17*, 1044 (2003).
80. Cooper J. W., Chen J. Z., Li Y., Lee C. S.: *Anal. Chem.* *75*, 1067 (2003).
81. Harris W. A., Reilly J. P.: *Anal. Chem.* *74*, 4410 (2002).
82. Mirgorodskaya O. A., Kazanina G. A., Mirgorodskaya E. P., Shevchenko A. A., Maltsev K. V., Miroshnikov A. I., Roipstorff P.: *Bioorg. Khim.* *23*, 91 (1997).
83. Rice R. H., Means G. E., Brown W. D.: *Biochim. Biophys. Acta* *492*, 316 (1977).
84. Nureddin A., Inagami T.: *Biochem. J.* *147*, 71 (1975).
85. Fraenkel-Conrat H., Bean R. S., Lineweaver H.: *J. Biol. Chem.* *177*, 385 (1949).
86. Elsner C., Grahn S., Bauer S., Ullmann D., Kurth T., Jakubke H.-D.: *J. Mol. Catal., B* *8*, 193 (2000).
87. Mozhaev V. V., Šikšnis V. A., Melik-Nubarov N. S., Galkantaite N. Z., Denis G. J., Butkus E. P., Zaslavsky B. Y., Mestechkina N. M., Martinek K.: *Eur. J. Biochem.* *173*, 147 (1987).

88. Vaňková H., Pospíšilová M., Tichá M., Turková J.: *Biotechnol. Tech.* 8, 375 (1994).
89. Villalonga R., Fernández M., Fragoso A., Cao R., Mariniello L., Porta R.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38, 53 (2003).
90. Matsukata M., Aoki T., Sanui K., Ogata N., Kikuchi A., Sakurai Y., Okano T.: *Bioconjugate Chem.* 7, 96 (2001).
91. Zhang Z., He Z., Guan G.: *Biotechnol. Tech.* 13, 781 (1999).
92. Villalonga R., Villalonga M. L., Gómez L.: *J. Mol. Catal., B* 10, 483 (2000).
93. Šebela M., Havliš J., Drhlíková T., Thomas H., Schmalz N., Shevchenko A.: *Acta Univ. Palacki. Olomouc. Fac. Rerum Nat. - Chemica* 43S, 18 (2004).
94. VerBerkmoes N. C., Hervey W. J., Shah M., Land M., Hauser L., Larimer F. W., Van Berkel G. J., Goeringer D. E.: *Anal. Chem.* 77, 923 (2005).
95. van Montfort B. A., Canas B., Duurkens R., Godovac-Zimmermann J., Robillard G. T.: *J. Mass Spectrom.* 37, 322 (2002).
96. van Montfort B. A., Doeven M. K., Canas B., Veenhoff L. M., Poolman B., Robillard G. T.: *Biochim. Biophys. Acta* 1555, 111 (2002).
97. Wu C. C., Yates J. R. 3rd: *Nat. Biotechnol.* 21, 262 (2003).
98. Blonder J., Hale M. L., Lucas D. A., Schaefer C. F., Yu L. R., Conrads T. P., Issaq H. J., Stiles B. G., Venstra T. D.: *Electrophoresis* 25, 1307 (2004).
99. Wu C. C., MacCoss M. J., Howell K. E., Yates J. R. 3rd: *Nat. Biotechnol.* 21, 532 (2003).

**T. Štosová<sup>a</sup>, J. Havliš<sup>b</sup>, R. Lenobel<sup>c</sup> and M. Šebela<sup>a</sup>**  
<sup>a</sup>*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic,* <sup>b</sup>*Department of Analytical Chemistry, Masaryk University, Brno, Czech Republic,* <sup>c</sup>*Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University and Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Olomouc, Czech Republic):* **Proteolytic Enzymes: Significance for Proteomics**

Proteolytic enzymes (peptidases) are important tools for proteomic research. This article reviews their application to digestion of proteins, which commonly precedes the mass spectrometry analysis of proteins. In the opening part, mechanism of proteolysis is described together with a detailed introduction to classification and nomenclature of enzymes. The following part brings an overview of proteolytic enzymes that are currently used in expression and functional proteomics including their properties and specificity. The review continues with reports on assays of proteolytic activity and computer prediction of peptide cleavage. The methodology of in-solution and in-gel digestion of samples and the use of peptidases for cleavage of proteins on membrane surfaces is also mentioned. Furthermore, chemical modifications of peptidases for improving their stability to autolysis and thermal inactivation are documented. Peptidase treatment of hydrophobic proteins in solutions containing organic solvents are also mentioned. Finally, new perspectives of proteolysis in shotgun proteomics are outlined.