

—— Tudományos Diákköri Dolgozat ——

TARSOLY GERGELY

**Az Aprotinin meglepetései:
avagy
gyártásközi szennyezők
tömegspektrometriai
szerkezetvizsgálata**

Témavezető: Kóti János,
Richter Gedeon Nyrt. Szerkezetkutatási Osztály



—— Eötvös Loránd Tudományegyetem ——
—— Természettudományi Kar ——
— Budapest, 2010 —

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki lehetővé tette, illetve segítette a munkámat. dr. Pellioniszné dr. Paróczai Margit Emberierőforrás igazgató Asszonynak, Mohr Ferenc tanüzemvezetőnek, aki lehetővé tette, hogy nyári gyakorlatom és TDK munkámat a Richter Gedeon Nyrt.-nél végezhessem.

Dr. Szántay Csaba osztályvezetőnek, aki engedélyezte részvételemet a Szerkezetkutatói osztály munkájában. Kóti János témavezetőmnek, aki a műszerek működésébe, kezelésébe és felhasználási lehetőségeibe egyaránt betekintést nyújtott, koordinálta és segítette mind a kísérleti munkát, mind az eredmények interpretációját, illetve eme dolgozat megírását. Dr. Szájli Emíliának a polipeptidok fragmentációs spektrumainak kiértékelésében nyújtott segítségét, tanácsaiért, dr. Dékány Miklósnak és dr. Háda Viktornak a tömegspektrometriával kapcsolatban adott hasznos tanácsaikért és a dolgozat átnézéséért.

Továbbá köszönettel tartozom dr. Bódi Józsefnek, a Szintetikus fejlesztő laboratórium osztályvezetőjének, aki figyelmembe ajánlotta a CDAP-t, mint lehetséges reagenst.

Tartalomjegyzék

Bevezető	1
Aprotinin.....	1
Tömegspektrometria	2
Célkitűzés	5
Aprotinin mérése és eredményei	5
Felhasznált műszerek.....	6
1. MS mérés kémiai módosítás nélkül	6
2. MS/MS mérés kémiai módosítás nélkül.....	8
3. MS/MS mérés redukált mintán	10
4. Módszerfejlesztés enzimatis emésztéssel.....	14
5. Polipeptidlánc kémiai hasítása	19
Összefoglalás.....	24
További tervek, feladatok.....	25
Hivatkozások.....	26

Bevezető

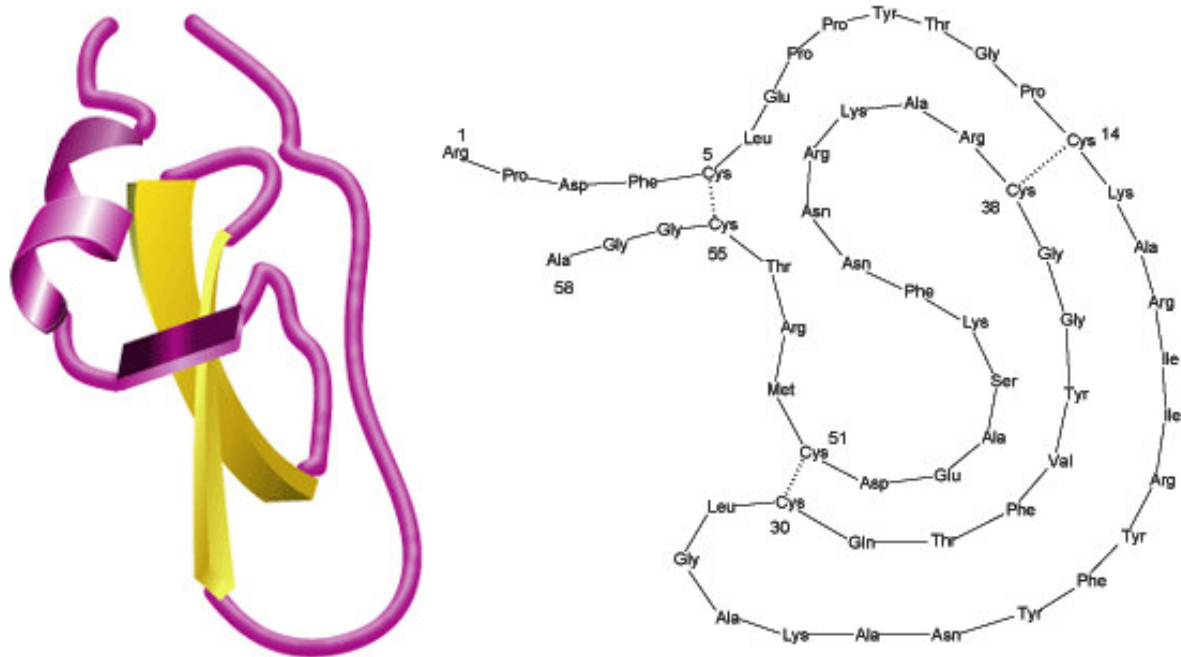
A Richter Gedeon Nyrt. Magyarország egyetlen szakmai befektető nélkül működő gyógyszercege, a magyar irányítású vállalatok közül a legtöbbet költi a kutatás-fejlesztésre. Főbb termékei közé tartoznak a generikus gyógyszerkészítmények, illetve néhány originális készítmény.

A vállalat az ország legjobban felszerelt szerkezetkutatási laboratóriumával rendelkezik. A Szerkezetkutatási osztály (SzKO) feladata a különböző területekről beérkező minták (elsősorban kis szerves molekulák) szerkezetigazolása, illetve ismeretlen vegyületek (melléktermékek, szennyezők, metabolitok) azonosítása. Az osztály nagyműszer parkja igen jól felszerelt, a Tömegspektrometriai (MS) laborjukban négy különböző analizátorral rendelkező tömegspektrométer, Mágneses magrezonancia spektroszkópiai (NMR) laborjukban négy különböző térerősségű mágnessel felszerelt NMR készülék, az Infravörös spektroszkópiai laborban pedig egy FT-IR spektrométer üzemel.

A közelmúltban az SzKO egyik feladata az aprotinin, egy polipeptid jellegű enziminhibitor gyártása közben felmerülő szennyezők azonosítása volt.

Aprotinin

Az aprotinin 58 aminosavból álló peptid, szekvenciája a következő: RPDFCLEPPY_TGPKARIIR_YFYNAKAGLC_QTFVYGGCRA_KRNNFKSAED_CMRTCGGA, három diszulfid híd van az 5-55, 14-38, és 30-51-es ciszteinek között. A diszulfidhidaknak köszönhetően tömör struktúrájú, stabil harmadlagos szerkezettel rendelkezik (1.ábra). IR-raman spektroszkópiás kutatások alapján az aprotinint kristályos halmazállapotban leginkább β -redők, és némi α -hélix jellemez, míg oldatban egyértelműen helikális szerkezeti elemek dominálnak ^[1]. A szerkezet mélyebb elemzését aprotinin-analógokon is elvégezték ^[2].



1. ábra: az aprotinin térszerkezete és szekvenciája a diszulfidhidakkal

Az aprotinin a szarvasmarhából kinyerhető BPTI (basic pancreatic trypsin inhibitor), mely egy szerin proteáz inhibitor: a tripszint és az ahhoz hasonló működésű proteolitikus enzimeket (kimotripszin, plazmin, kallikrein) blokkolja. A kallikreinre gyakorolt hatásának köszönhető, hogy a véralvadás mechanizmusát megakadályozza, erősen lelassítja a fibrinolízist. Ennek megfelelően legelterjedtebb használata vértranszfúzióval járó műtétek esetén a vérzés csökkentése ^[3].

Az aprotininnek megfigyeltek antibakteriális hatását is, mely független az enziminhibíciós képességektől, hanem más oldalláncok felelősek érte, melyek aprotinin fragmensek vizsgálatával beazonosíthatóak ^[4].

Tömegspektrometria

A tömegspektrometria lényege, hogy a minta komponenseit ionizáljuk és tömeg/töltés alapján az ionokat elválasztjuk. Az ionok fajlagos tömeg szerinti szétválogatása többféle analizátorral lehetséges. A tömegspektrométerek leegyszerűsítve az ionforrásból, ionoptikából, analizátorból, detektorból és vákuumrendszerből állnak, számítógép vezéreltek.

MS-sel szilárd, folyadék és gáz halmazállapotú minta is elemezhető megfelelő ionizációs technikával.

Szilárd mintákat direkt adagolással általában Elektron ionizációval (EI) vizsgálunk.

Folyadékminta elemzésére atmoszferikus nyomású ionizáció (API – atmospheric pressure ionization) alkalmazásával van lehetőség. Ennek négy fajtája van: az ESI

(electrospray ionization), az APCI (atmospheric pressure chemical ionization), az APPI (atmospheric pressure photoionization) és az SSI (sonic spray ionization) ^{[5][6]}.

Az ESI alkalmas minden olyan anyag mérésére, mely az oldatfázisban ion formában van jelen, vagy ionos formába hozható, akár addukt képzéssel. Mivel többszörösen töltött ionok is képződnek, 2000 daltonnál nagyobb molekulatömeg esetén is használható. Ennél a technikánál a mintát folyadékáramban juttatjuk be. Ez lehet HPLC-ről jövő oldat vagy folyadék pumpáról (áramlási sebesség 1-300 $\mu\text{L}/\text{perc}$). A folyadékot nitrogén gáz (1-4 atm) segítségével porlasztjuk. A minta a kapillárisba kerül, amelyre 1-6 kV-os feszültséget kapcsolunk. Az elektrosztatikus térben a folyadékcseppek töltött állapotba kerülnek, majd a fűtött (180-300 $^{\circ}\text{C}$) kapillárisba jutnak. Itt zsugorodnak, ezáltal nő a felületi töltéssűrűség. Elérve azt a pontot, amikor az elektromos taszító erő nagyobb lesz, mint a felületi feszültségből adódó összetartó erő bekövetkezik a Coulomb robbanás, tovább aprózódik a csepp, egészen addig, míg végül a minta ionjai jelennek meg.

Gáz minták elemzésére gázkromatográfval kapcsolt MS-t használunk általában elektron ionizációs (EI) vagy kémiai ionizációs (CI) technikával. EI esetén 70 V feszültséggel gyorsított nagyenergiás (értelemszerűen 70 eV energiájú) elektronokkal ionizálunk, ez a molekula fragmentálódását idézi elő (gyökionok keletkeznek), így fragmensekben gazdag tömegspektrumot kapunk, mely segítségével azonosítható a molekula, azonban a molekulaion nem mindig jelenik meg. CI módszer esetén először egy segédgázt ionizálunk, és ezzel ionizáljuk az analizálandó molekulákat, melyek így kevésbé fragmentálódnak, általában protontranszferrel $(\text{M}+\text{H})^+$ kvázi-molekulaionokat kapunk.

A tömegspektrométerek analizátorának legfontosabb típusai például: kettős fókuszálású, szektor típusú, kvadrupól, ionsapda, lineáris ionsapda, ionciklotron-rezonancia (ICR), repülési idő (TOF), Orbitrap. A kettős fókuszálású, a TOF és az Orbitrap analizátor képes nagy felbontásra és ezáltal pontos tömeg meghatározására. Az ICR analizátor ultranagy felbontású, így nagy molekulatömegeknél is meghatározható vele a pontos tömeg.

A detektor a legtöbb esetben egy elektronsokszorozó. ICR esetén azonban nincs szükség rá, hiszen az analizátor már magában szolgáltatja a jelet, mely Fourier-transzformációjával megkapjuk a tömegspektrumot.

Proteinek és polipeptidek mérésére a tömegspektrometriás módszerek közül az ESI ionforrás használata a legelterjedtebb, a módszer kifejlesztéséért John B. Fenn és Koichi Tanaka Nobel-díjat kapott ^[7]. Ebben az esetben a polipeptid lánc pozitív többszörös töltésű ionjait képezzük, és ezeket az $(\text{M}+n\text{H})^{n+}$ ionokat detektáljuk. A többszörösen töltött ionok

lehetővé teszik, hogy hagyományos analizátorokkal lehessen elemezni több ezer egységnyi tömegű molekulákat is. A töltésszámot az izotópcsúcsok távolságából lehet kiszámolni. Hosszú polipeptid láncok esetén a molekula C-atomszáma elég magas ahhoz, hogy egymás mellett megfelelő mennyiségű csúcs legyen jelen. A peptid láncok minőségi elemzéséhez azonban nem elegendő a molekulaion mérése, hanem szükség van a molekula fragmentálására is.

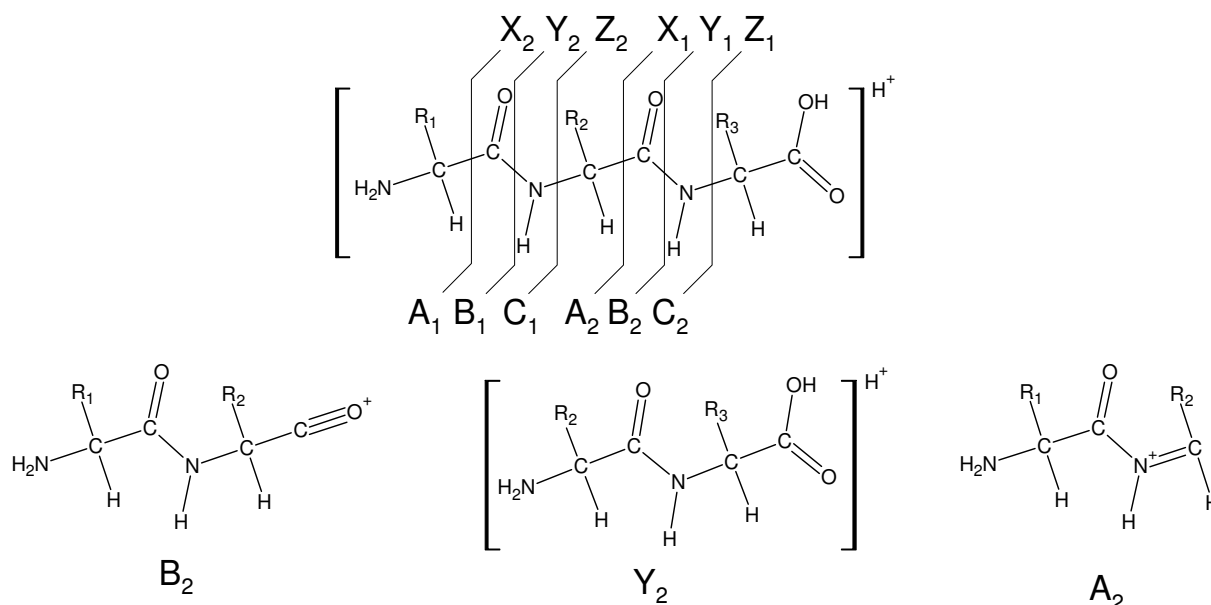
A fragmentálást tandem tömegspektrometria esetén lehet megvalósítani, ahol először kiválasztva egy adott m/z -jú ionokat az analizátorból az ütközési cellába vezetjük, ahol a fragmentáció megtörténik, és onnan a fragmensionokat egy újabb analizátorba vezetjük. Ez kvadrupól analizátor esetén két kvadrupól közé helyezett ütközési cellával valósítható meg, míg ioncsapdánál elég egyetlen analizátor: a kiválasztott ionokon kívül minden iont kivezetünk a csapdából, végül az ioncsapdán kívül fragmentálunk, és a fragmensionokat visszavezetjük az ioncsapdába. Ennek az elrendezésnek az előnye, hogy MS^n mérésre is alkalmas.

A legfontosabb fragmentációs módszerek a CID (collision induced dissociation), az IRMPD (infrared multiphoton dissociation), az ECD (electron capture dissociation) és az ETD (electron transfer dissociation). CID esetén semleges gázatomok, míg az IRMPD esetén infravörös lézer fotonjai hatására hasad fragmensekre az ion. ECD esetén nagyfeszültséggel gyorsított elektronokkal ütköznek az ionok, ez okozza a disszociációt, míg ETD esetén gyök anionokat használunk.

A polipeptidek a peptid lánc mentén három különböző helyen hasadhatnak. Az α -C atom és a CO csoport között, ekkor **A** és **X** ionok keletkeznek, ha a savamid kötés mentén hasad, akkor **B** és **Y**, ha pedig az NH és az α -C atom közt, akkor **C** és **Z** ionok keletkeznek (2. ábra). CID alkalmazása esetén **B**, **Y** és **A** típusú ionok keletkeznek és a leggyengébb kötés mentén hasít először. Az IRMPD főleg **B** és **Y**, kisebb mennyiségben **A** ionok keletkezését okozza és ez esetben is a leggyengébb kötés hasad először. Megfelelő optika alkalmazásával közel 100% disszociációs hatékonyság is elérhető MS-MS mérésekhez ^{[8] [9]}. Az ECD során főleg **C** és **Z** típusú ionok keletkeznek (kis mennyiségben **A** és **Y** típusú is), és bármely kötés hasadhat, kivéve a prolin nitrogénjénél. A fragmentációs mechanizmusok nem ismertek pontosan, azonban a spektrum jó pontossággal számolható, mely a polipeptidek spektrumának kiértékelését nagyban megkönnyíti ^[10].

Bizonyos esetekben egyfajta ütközési mód használata nem elegendő, ezért MS^n mérések során hasznos lehet többféle módszert alkalmazni, hogy minden aminosav egyesével

nagy hatékonysággal lehasadjon és mérhető legyen. Ez ismeretlen polipeptidek szekvenciájának meghatározásakor lehet fontos ^{[11][12]}.



2. ábra: a polipeptidek különböző fragmensei

Célkitűzés

Célunk az volt, hogy az aprotinin gyártása közben megjelenő szennyezők azonosítására megbízható, robusztus tömegspektrometriás módszert dolgozzunk ki. Emellett feladatunk volt még az azonosított szennyezők spektroszkópiai karakterizációja.

Aprotinin mérése és eredményei

Az aprotininnek három ismert szennyezője van, a fehérjelánc C-terminálisánál levő két aminosav hidrolízisével keletkező dez-Ala-aprotinin és dez-Ala-dez-Gly-aprotinin, illetve az N-pyroglutamin származék.

TFL II (Technológiai fejlesztő laboratórium II) kollégáink preparatív HPLC-n legyűjtötték az ismeretlen szennyező komponenst (szilárd minta), amit analitikai HPLC-vel vizsgálva kiderült, hogy három vegyületet tartalmaz (ezeket is legyűjtötték, 1, 2, 3 számú minta). A szilárd minta nagyobb mennyiségben, míg a három folyadékminta kis mennyiségben állt a rendelkezésünkre.

Az üzemen dolgozó vegyészek az eljárás ismerete alapján azt gyanították, hogy vagy további aminosav leszakadásáról, vagy pedig a fehérjében megtalálható metionin egyszeres vagy kétszeres oxidációjáról lehet szó (más, oxidációra hajlamos aminosav nem található az aprotininben). A célunk az volt, hogy megállapítsuk, mely szennyezőkről lehet szó.

Felhasznált műszerek

A mérésekhez két tömegspektrométert használtunk: egy lineáris ioncsapdát (Thermo Electron Corporation, LTQ XL™), illetve egy lineáris ioncsapda – ionciklotron rezonancia hibrid tandem tömegspektrométert (Thermo Electron Corporation, LTQ FT Ultra™). Mindkét műszer API interfésszel van felszerelve, melyben a cserélhető fej lehetővé teszi ESI és APCI üzemmódban történő működést.

A folyadékkromatográfiai módszer fejlesztéséhez egy Thermo Surveyor™ kvaterner pumpás, kis nyomású gradiens képzésre alkalmas HPLC-t használtunk.

Centrifugáláshoz egy Eppendorf™ Centrifuge 5804 készüléket használtuk, Millipore™ Amikon Ultra-15, Ultracel 3K szűrőkkel, mely a 3000 Da molekulatömeg alatti molekulákat eresztí át.

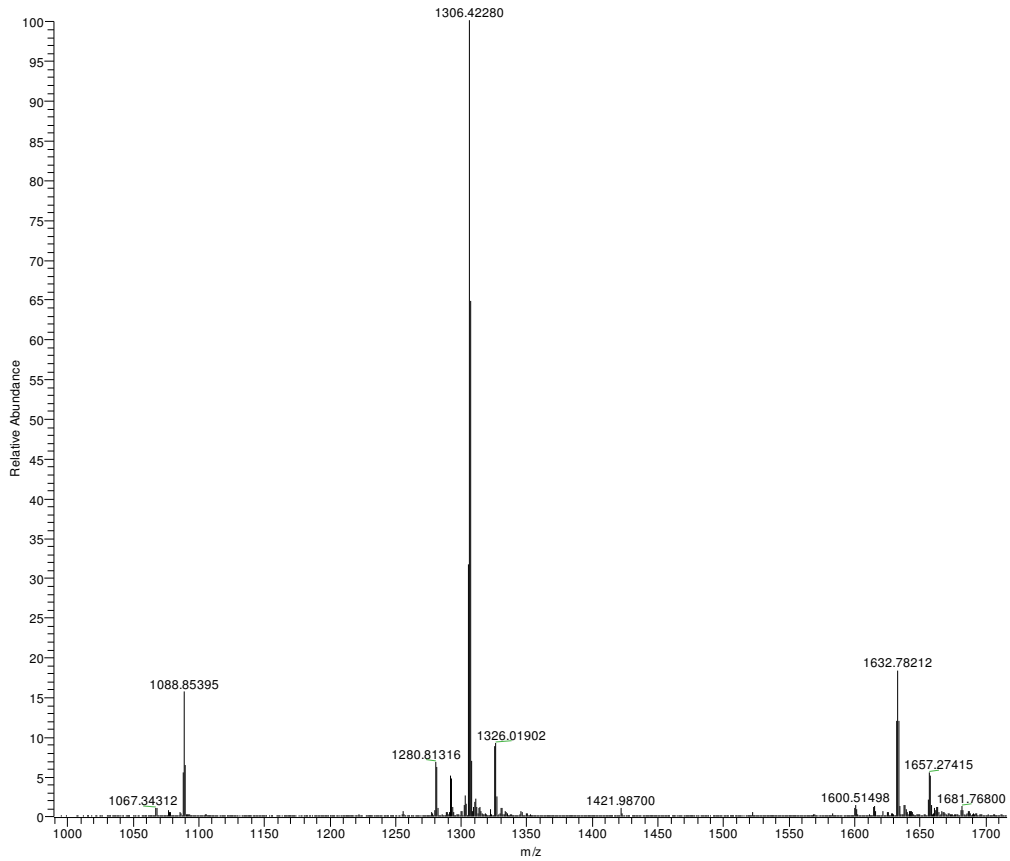
A reakciók többségét rázóinkubátorban végeztük. Két készülék állt a rendelkezésünkre. Egy PHMT Grant-bio, PSC-18 termosztálható feltéttel, illetve egy BIOSAN Thermo Shaker TS-100C, SC-10C termosztálható feltéttel. Mindkét feltét 20 db 0,5 mL térfogatú, és 12 db 1,5 mL térfogatú Eppendorf™-cső egyidejű rázatására alkalmas.

1. MS mérés kémiai módosítás nélkül

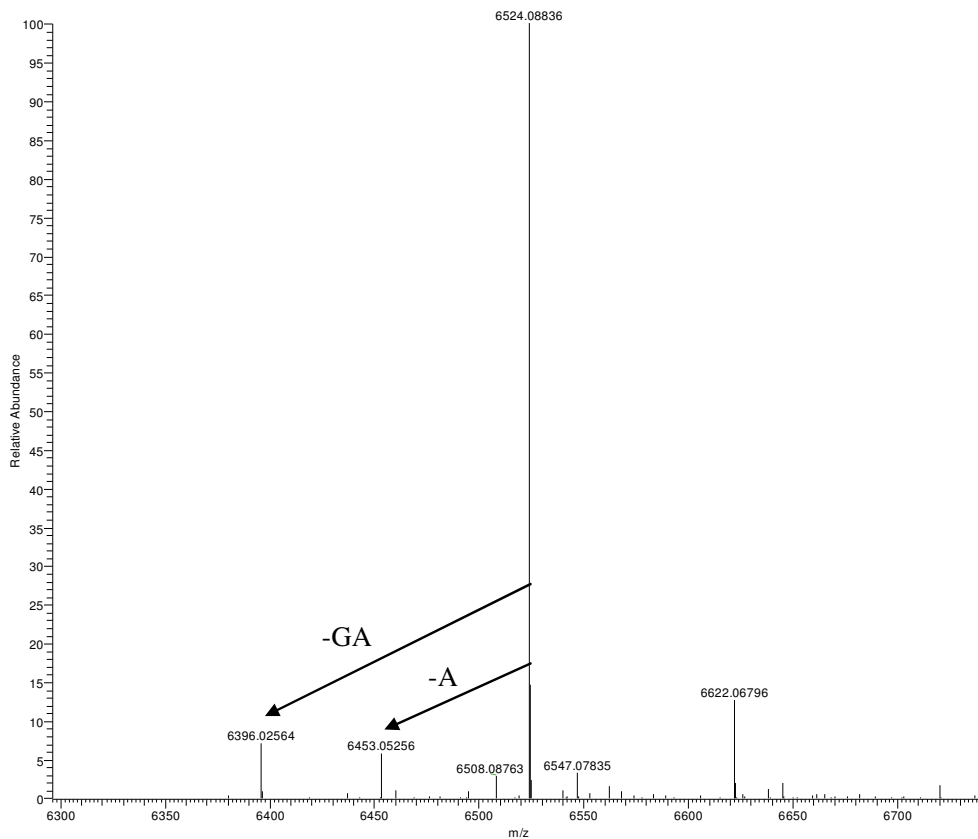
A pontos tömeg meghatározásával ellenőrizhető a hipotézis, ezért első kísérletnek azt választottuk, hogy mindennemű módosítás nélkül meghatározzuk a polipeptid pontos tömegét, és egybevetjük a felmerülő lehetőségekkel.

A szilárd minta kis részletét feloldottuk metanol-víz-ecetsav (MeOH:H₂O = 1:1 + 1 V/V% cc. AcOH) oldószer elegyben és Millipore szűrőn centrifugáltuk, mely 3000 Da molekulatömegnél vág, ezáltal a kb. 6000 Da tömegű aprotinin tisztítására és sómentesítésére alkalmas. Direkt adagolással mértük ESI-ben az ultranagy felbontású ICR tömegspektrométeren (3. ábra, 4. ábra).

Tudományos Diákköri Dolgozat



3. ábra: szilárd minta ESI tömegspektruma



4. ábra: szilárd minta (M+H)⁺-ra dekonvolált ESI tömegspektruma monoizotópos tömegre számolva

A pontos tömegeket dekonvolúcióval megállapítva arra jutottunk, hogy a három ismeretlen szennyező az aprotinin, a dez-Ala-aprotinin és a dez-Ala-dez-Gly-aprotinin egyszeresen oxidált változata (1. táblázat). A folyadékminták egyesével történő vizsgálata kimutatta, hogy az egyes mintákban e három komponens valamelyike dúsul, de mindhárom anyag megtalálható bennük.

1. táblázat: aprotinin-oxid és származékainak mért és számolt tömege

(M+H) ⁺	Mintaszám	monoizotópos tömeg / Da számolt	Da mért	eltérés / ppm
Aprotinin-oxid	3	6524,04357	6524,08836	6,87
dez-Ala-	2	6453,00646	6453,05256	7,14
dez-Ala-dez-Gly-	1	6395,98499	6396,02564	6,35

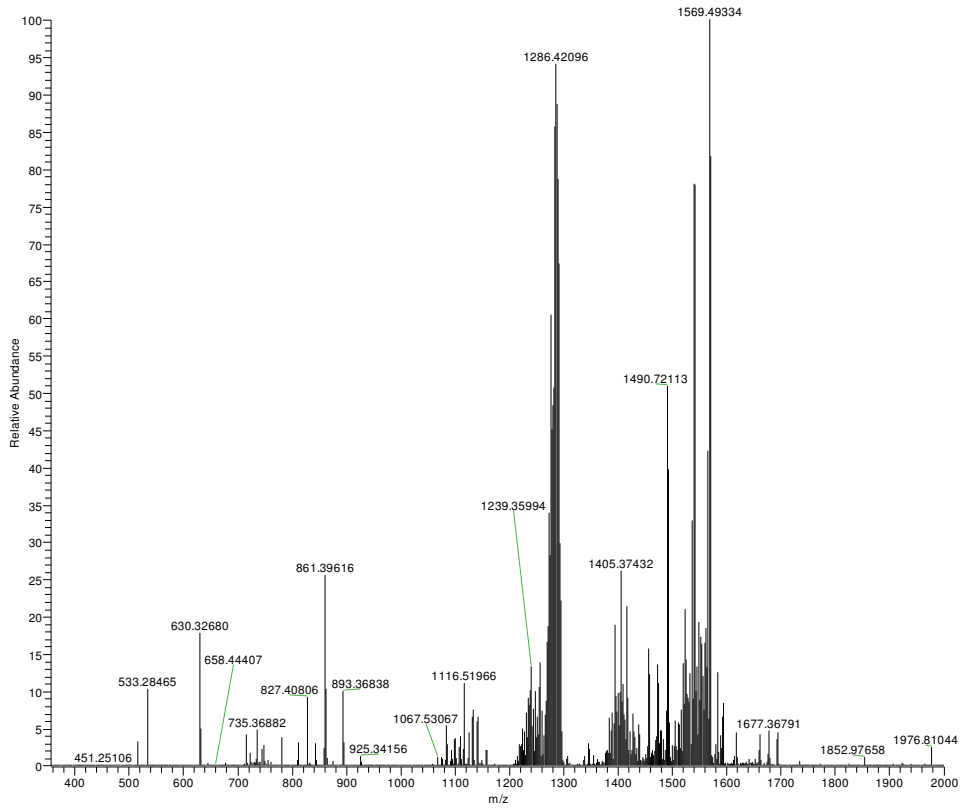
Ezzel tulajdonképpen a feladatot megoldottuk, az FT-ICR-MS ultranagy felbontásának köszönhetően egy egyszerű direkt-ESI-ICR-MS mérés elegendő volt mindhárom komponens meghatározásához.

Azonban úgy döntöttük, további vizsgálatokat végzünk annak érdekében, hogy eredményünk ne csak pontos molekulatömeg meghatározáson alapuljon, hanem bővebb szerkezeti információt adhassunk a szennyezőkről.

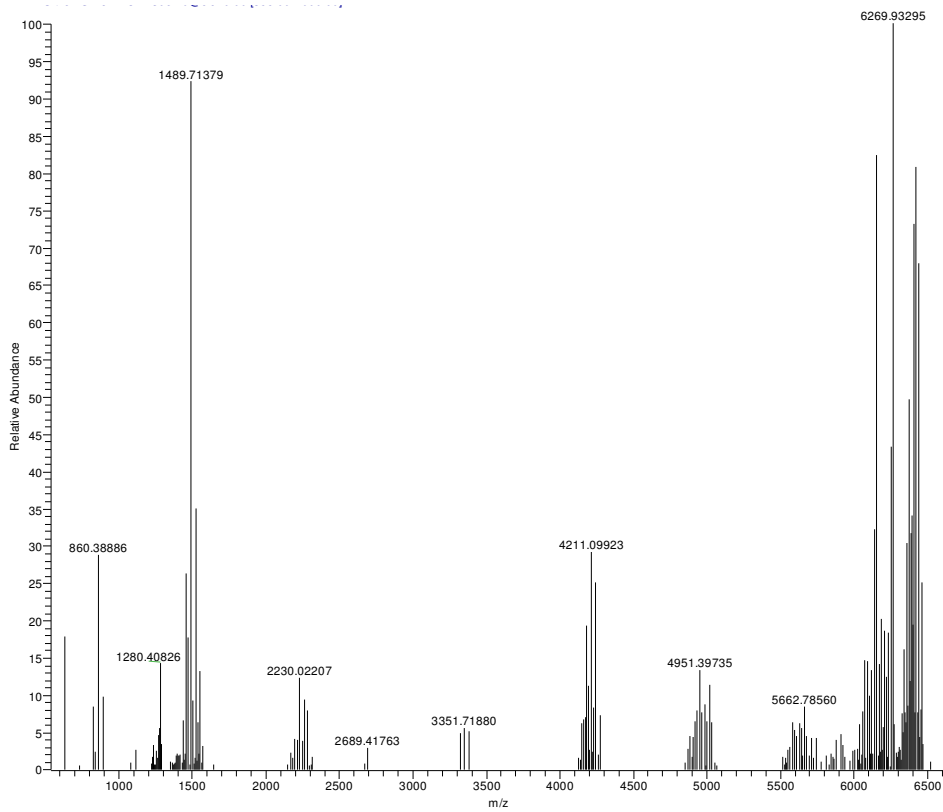
2. MS/MS mérés kémiai módosítás nélkül

A direkt ESI mérés során fragmentáltuk a szilárd minta legintenzívebb ioncsúcsát ($m/z = 1306,4$, aprotinin-oxid $z = +5$), bízva abban hogy megfelelő szerkezeti információt kapunk a peptidről. A korábbi tapasztalatok ugyanis azt mutatták, hogy 6000 Da körüli molekulatömeg esetén csupán fragmentációval megfelelő részletességgel felderíthető az aminosavszekvencia. A készülékben rendelkezésre álló fragmentációs módszerek (CID, IRMPD, ECD) egyikével sem sikerült megfelelő fragmentációt elérni. A spektrumokat dekonvolváltuk, de a kiértékelésük nem járt sikerrel, a csúcsokat nem tudtuk asszignálni. Az így kapott tömegspektrumok legfeljebb ujjlenyomat szintű azonosításhoz volna megfelelő (5. ábra, 6. ábra).

Tudományos Diákköri Dolgozat



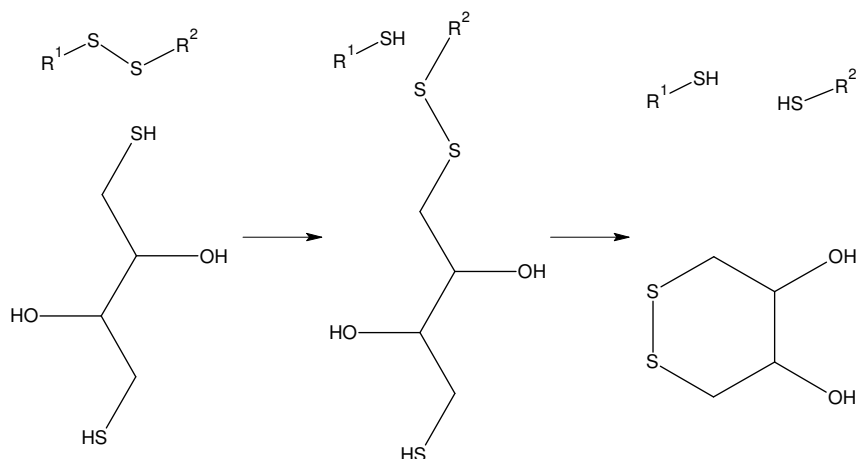
5. ábra: $m/z=1306,4$ ionsúcs CID-MS/MS tömegspektruma



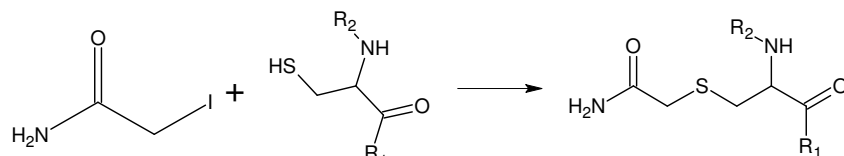
6. ábra: $m/z=1306,4$ ionsúcs CID-MS/MS dekonvolált tömegspektruma

3. MS/MS mérés redukált mintán

A további méréshez kémiai módon módosítottuk a mintát: fel kell bontani a kénhidakat, és a keletkező SH csoportok diszulfidhíddá való visszaalakulását karbamidometil védőcsoport alkalmazásával kell megakadályozni. Ehhez egy in-house protokollt választottunk ki, melyben a polipeptidet guanidin-hidrokloridban denaturáljuk. A redukálószer a ditiotreitól (DTT, 7. ábra), melyet sikerrel alkalmaztak már nagyobb aminosavszámú fehérjék MS-MS vizsgálata esetén is ^[13] ^[14]. A karbamidometilálást jódcetamiddal (IAA, 8. ábra) végeztük. Ezt a vegyületet az irodalom szerint nem csak védőcsoportként ^[15] ^[16], hanem diszulfidkötésben részt nem vevő ciszteinek feltérképezésére is sikerrel alkalmazták ^[17]. A polipeptidet ammónium-bikarbonáttal (ABC) mosva centrifugáljuk.



7. ábra: diszulfidhíd redukciója ditiotreitollal



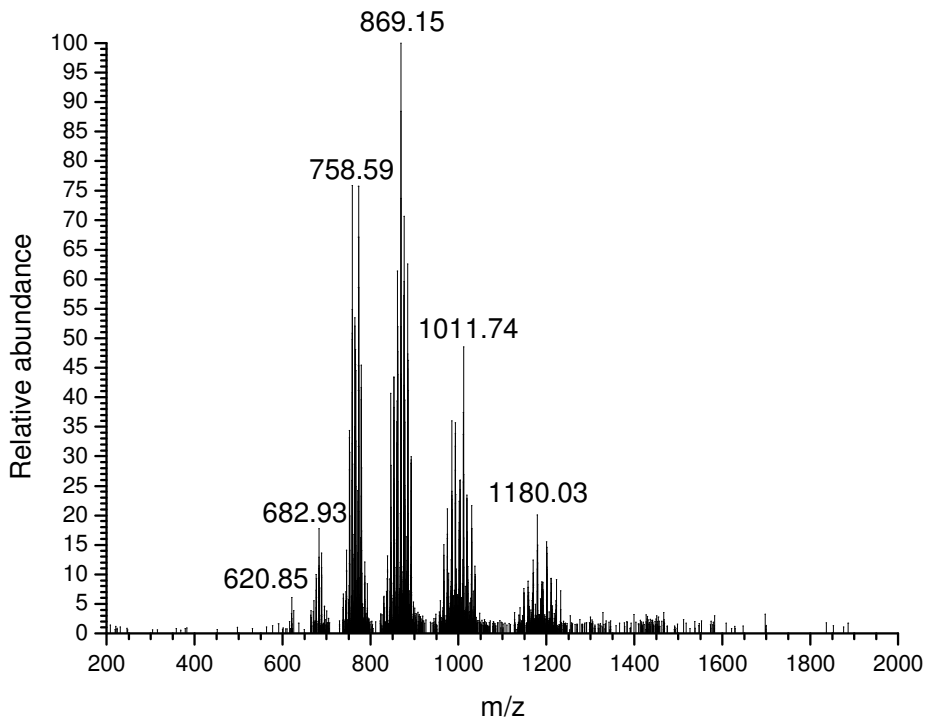
8. ábra: cisztein reakciója jódcetamiddal

Ehhez a kísérlethez az egyik oldatmintát választottuk, melyben a dez-Ala-aprotinin-oxid dúsul, hogy ellenőrizzük, azzal jobban lehet-e dolgozni, van-e értelme a továbbiakban az analitikai HPLC-n legyűjteni a frakciókat.

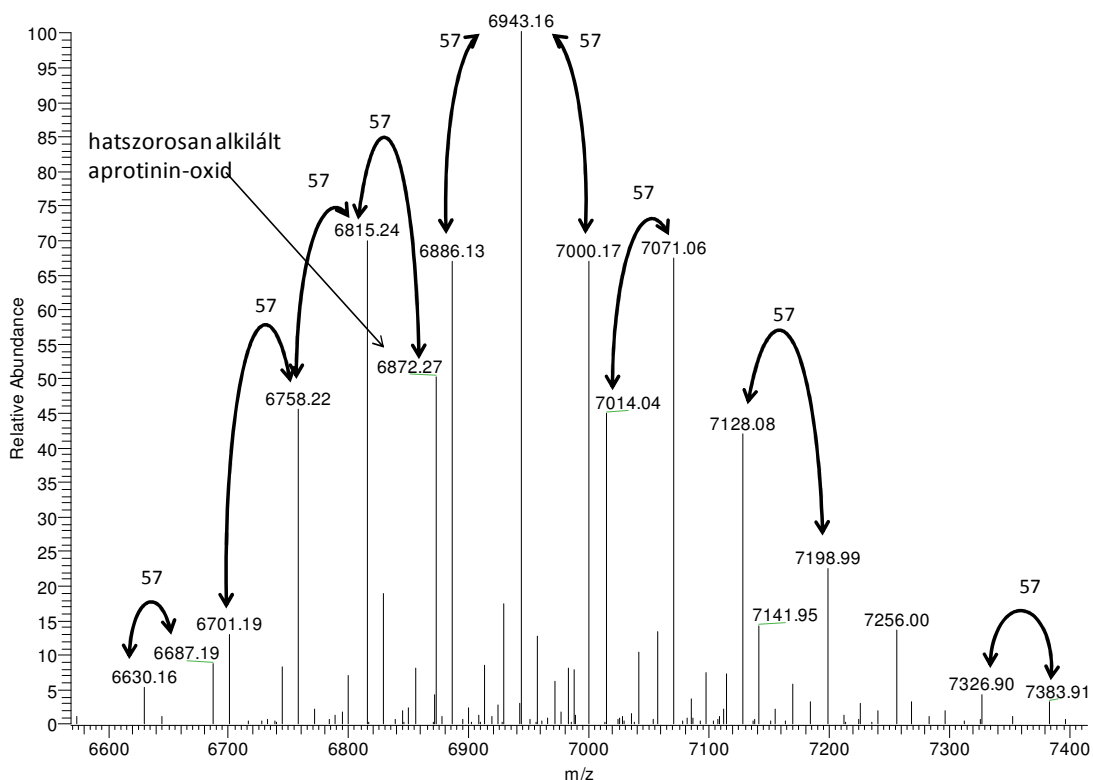
A legyűjtött, kettes számú folyadékmintából 100 μL -t bemértünk, és 400 μL , 8 M-os guanidin-hidrokloridot adtunk a fehérje denaturálásához és a harmadlagos szerkezet megbomlásához. A diszulfidhidak felbontásához 45 μL , 1 M DTT-t adtunk, ezt rázó inkubátorban 56 $^{\circ}\text{C}$ -on, 250 rpm-en rázattuk két órán keresztül. Ezután 90 μL , 1 M-os IAA-t adtunk a rendszerhez, szobahőmérsékleten, sötétben 4 órát állni hagytuk.

Az így kezelt aprotinin-oxidhoz 500 μL 25 mM-os ABC-t adtunk és 12 percig 10 000 rpm-en centrifugáltuk. Ezt a mosást négyszer elvégeztük. A visszamaradt, kb. 100 μL

karbamidometilált polipeptidből 20 μL -t kivettünk a pontos tömeg meghatározásához. A mintát metanol-víz-ecetsav eleggyel ötszörösre hígítottuk, és ESI ionforrásban, ionciklotron-rezonanciás detektálással mértük, a mérésekből dekonvolúcióval állapítottuk meg a molekulatömeget.



9. ábra: a részlegesen karbamidometilezett aprotinin-oxid tömegspektruma

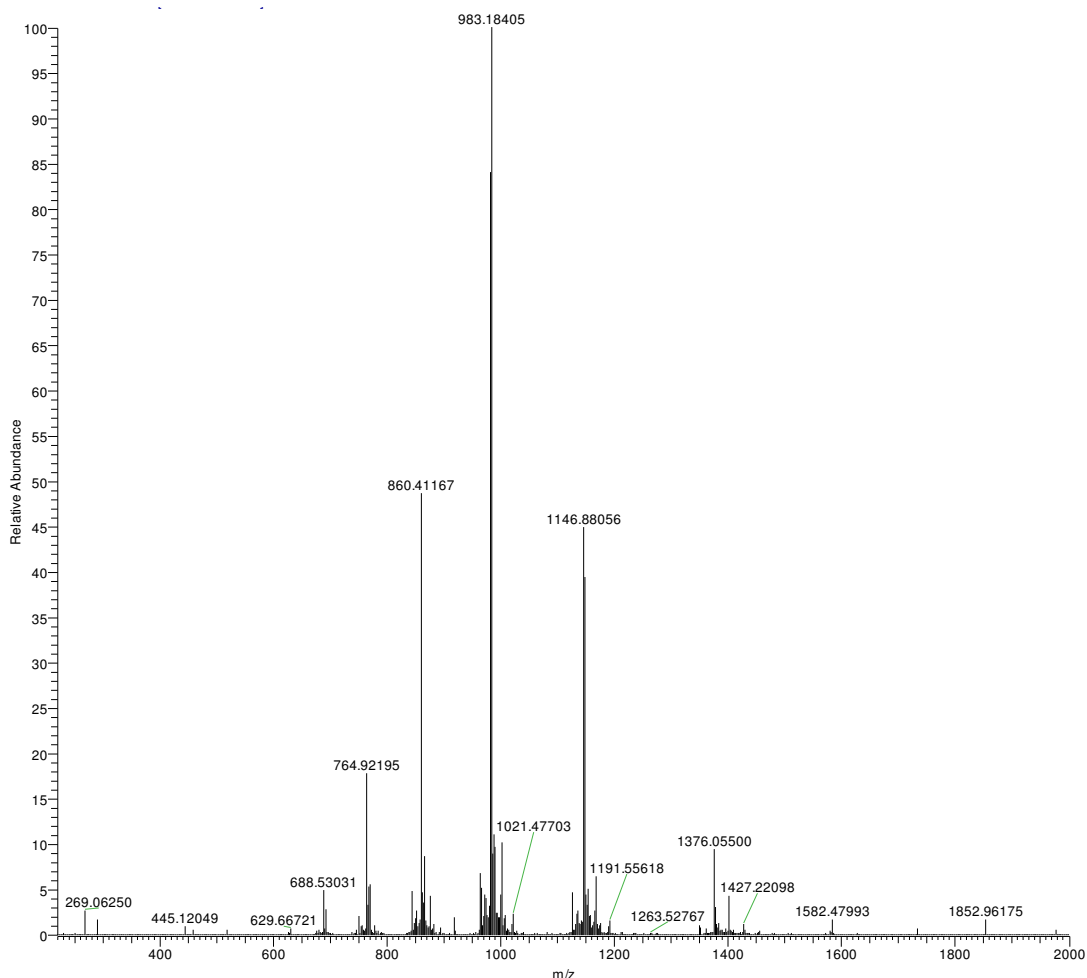


10. ábra: a részlegesen karbamidometilezett aprotinin-oxid $(\text{M}+\text{H})^+$ -ra dekonvolált tömegspektruma monoizotópos tömegre számolva

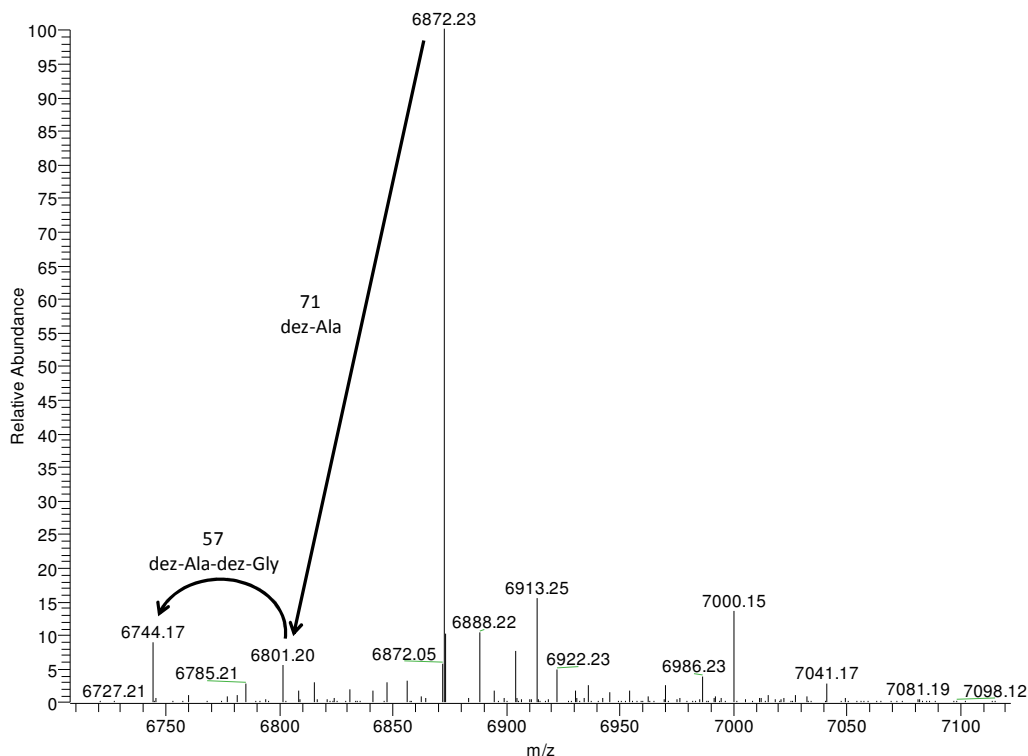
Az általunk pásztázott tömegtartományban (200-2000 egység) a többszörösen ionizált csúcsok jelentek meg (9. ábra). Az ionciklotron-rezonancia analízátor fel tudta bontani olyan pontossággal a spektrumot, hogy az izotópcszúcsok távolságából a töltés megadható volt. A spektrum dekonvolúciójával megállapítottuk az $(M+H)^+$ kvázi-molekulaion tömegét. Azonban azt kaptuk, hogy a karbamidometilezés nem zajlik le tökéletesen 4 óra alatt, ugyanis a spektrumban megjelent több csúcs, melyek közt a jellegzetes 57,0215 Da különbség jelentkezett, az anyag nem volt egységes (10. ábra).

Mivel a mérés alapján a reakció nem játszódott le teljesen, az in-house protokollt módosítva kellett alkalmazni. A következő kísérletet hosszabb idő alatt, azonos körülmények közt hajtottuk végre: a karbamidometilezést IAA-dal 16 órán keresztül végeztük. Az így kapott mintát metanol-víz-ecetsav eleggyel ötszörösre hígítva, ESI-ICR-MS-ben vizsgáltuk.

Ez a reakció a mérésünk szerint sikeresen zárult (11. ábra, 12. ábra). Ebből megállapítottuk, hogy a mintában a karbamidometilezett aprotinin-oxid mellett a dez-Ala- és a dez-Ala-dez-Gly-aprotinin-oxid is megjelent (2. táblázat).



11. ábra: teljesen metilezett aprotinin-oxid és szennyezőinek tömegspektruma



12. ábra: teljesen karbamidometilezett aprotinin-oxid és egyéb szennyezőinek (M+H)⁺-ra dekonvolált tömegspektruma monoizotópos tömegre számolva

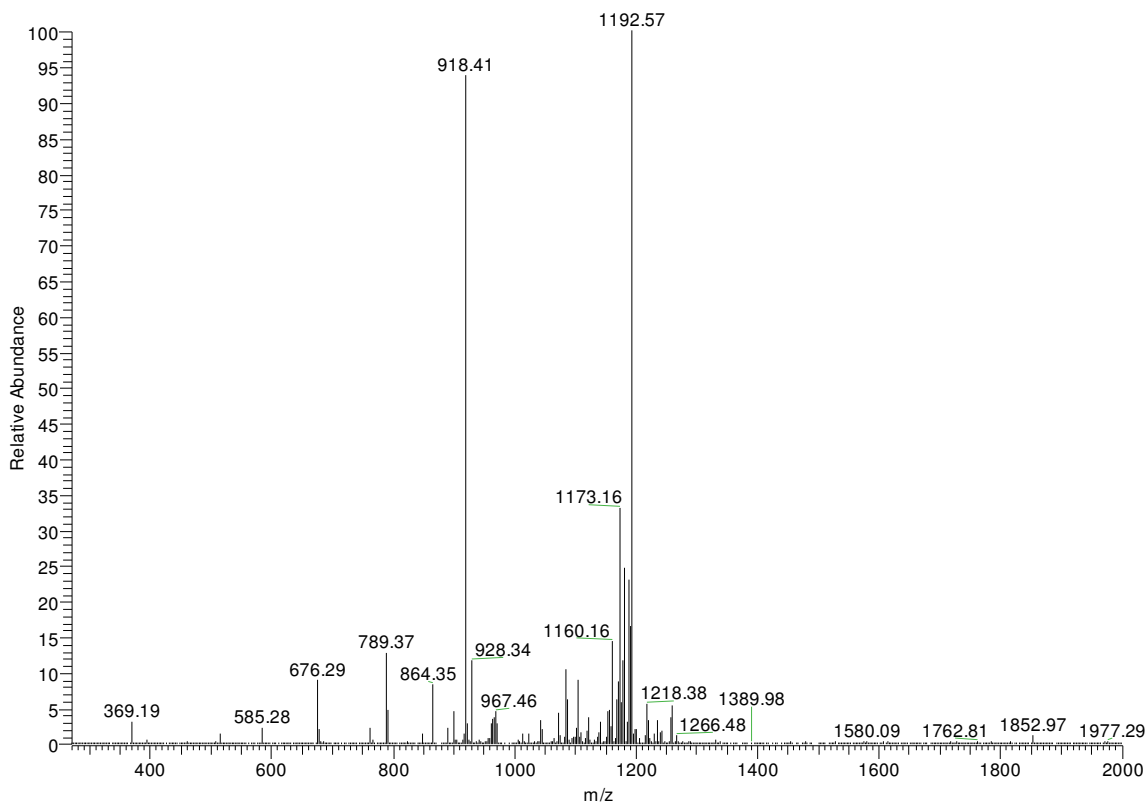
2. táblázat: karbamidometilezett aprotinin-oxid mért és számított tömegei

(M+H) ⁺	monoizotópos tömeg / Da		eltérés / ppm
	számolt	mért	
Aprotinin-oxid karbamidometilált	6872,21931	6872,23472	2,24
dez-Ala-	6800,17491	6801,20035	2,67
dez-Ala-dez-Gly-	6743,15345	6744,17162	1,62

Látszik, hogy a mintában a dez-Ala-aptopinin-oxid dúsulása ellenére az aprotinin-oxid a főkomponens, tehát a további mérésekhez a nagyobb mennyiségben rendelkezésre álló szilárd minta is tökéletesen megfelel.

Eztán CID-ben, IRMPD-ben és ECD-ben is fragmentáltuk a megjelenő, legnagyobb intenzitású molekulaiont, és felvettük az MS-MS spektrumot.

A mérések során nem sikerült olyan mértékben fragmentálni a polipeptidet (13. ábra), hogy abból a szekvencia megfelelő részét bizonyítani tudjuk. MSⁿ méréshez túlságosan kicsi volt a jelintenzitás, lévén a többszörös töltöttség miatt a polipeptid ionjai több, különálló csúcsban oszlanak meg.



13. ábra: a teljesen karbamidometilált aprotinin-oxid MS-MS tömegspektruma a 983,20 m/z hétszeres töltöttségű ion CID fragmentációjával.

4. Módszerfejlesztés enzimatikus emésztéssel

Az MS-MS mérésnél valamelyest részletesebb információhoz juthatunk a módosított polipeptid enzimatikus emésztésével. Megfelelő, specifikus emésztést alkalmazva számításokkal (*in silico* emésztés) jól megjósolható, kis méretű oligopeptid keletkezik. Ezek akár direkt injektálással fragmentálva, akár HPLC-ESI-MSⁿ módszerrel beazonosíthatóak, és a szekvencia igazolására alkalmasak [18]. Az *in silico* emésztést a University of California, San Francisco honlapján található Protein Prospector program MS-Digest funkciójával végeztük, míg az MS-MS mérésekhez az egyes oligopeptid fragmentációját az MS-Product funkcióval számoltuk [19]. Ez a szoftver ugyanis az irodalom alapján megbízhatóan használható segédeszköz polipeptid tömegspektrometriás elemzéséhez [20] [21] [22].

Választásunk a tripszinre esett, mivel az irodalom szerint ez egy széleskörűen használható, specifikus enzim, mely csak azt a peptidkötést hidrolizálja el, ahol arginin vagy lizin adja a karbonilcsoportot. Egyetlen hátránya a tripszinnek, hogy szerin proteáz enzim, tehát az aprotinin gátolja a működését. Azonban reményeink szerint a módosítások denaturálták az aprotinint olyan mértékben, hogy funkcióját teljesen elvesztette, de a kísérlet sikeressége érdekében a szokásosnál magasabb enzim:polipeptid arányt alkalmaztunk.

Ilyenkor viszont az irodalom szerint nagyon megnő az enzim autolízis termékeinek mennyisége [23].

3. táblázat: a várt oligopeptidek tömege (a ciszteineken karbamidometiláltsággal számolva)

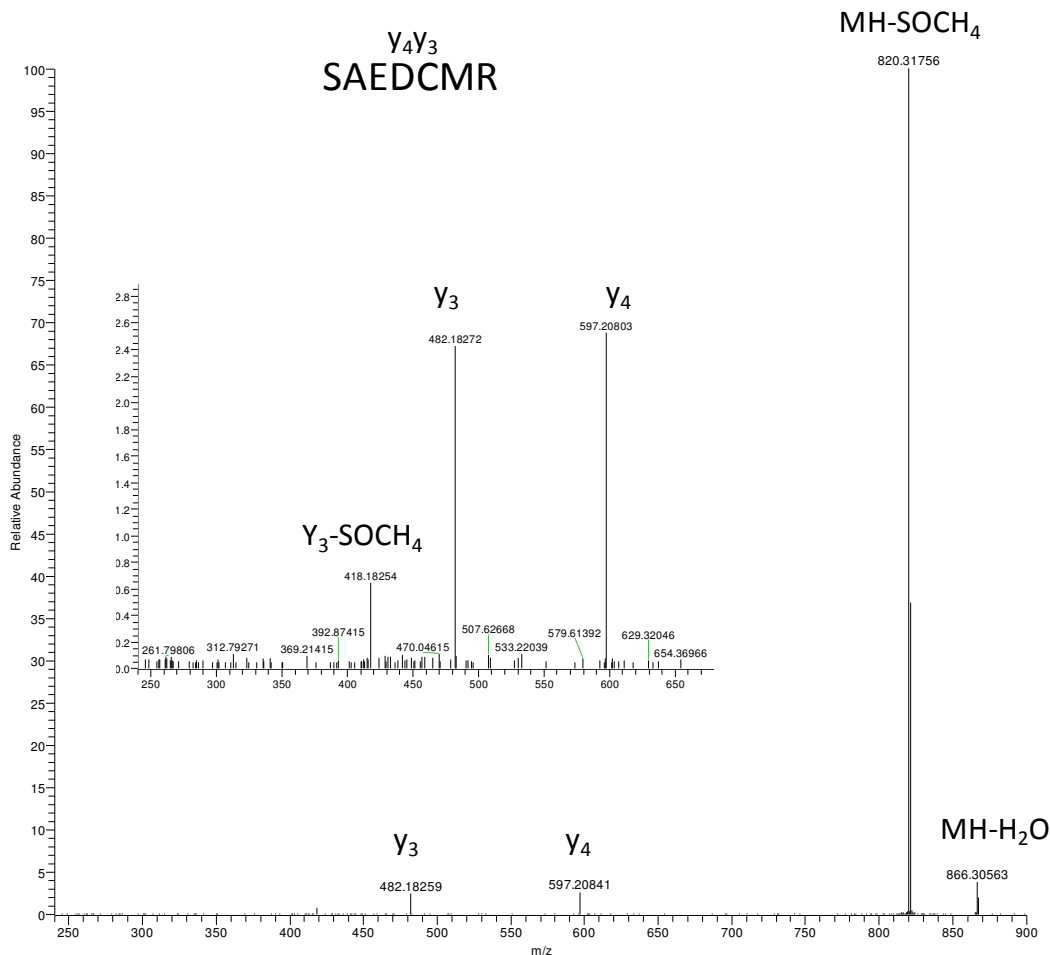
szekvencia	monoizotópos tömeg / Da
AK	218,15
AR	246,16
IIR	401,29
TCG (dez-Ala-dez-Gly-)	340,12
TCGG (dez-Ala-)	397,14
TCGGA	465,18
NNFK	522,27
YFYNAK	805,39
SAEDCMR (nem oxidált)	868,33
SAEDCMR (oxidált)	884,32
AGLCQTFVYGGCR	1488,67
RPDFCLEPPYTGPCK	1836,84

0,5 mg szilárd mintát oldottunk fel 100 μ L, 25 mM-os ammónium-bikarbonát (ABC) oldatban, majd ehhez 400 μ L, 8 M-os guanidin-hidrokloridot adtunk. A diszulfidhidak felbontásához 45 μ L, 1 M DTT-t adtunk, ezt rázó inkubátorban 56 °C-on, 250 rpm-en rázattuk két órán keresztül. Ezután 90 μ L, 1 M-os IAA-t adtunk a rendszerhez, majd szobahőmérsékleten, sötétben 16 órát állni hagytuk.

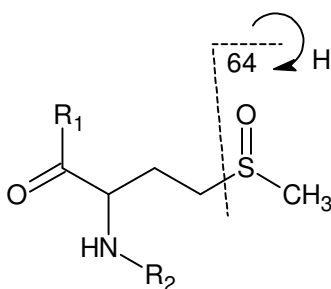
Az így kezelt aprotinin-oxidhoz 500 μ L 25 mM-os ABC-t adtunk és 12 percig 10 000 rpm-en centrifugáltuk. Ezt a mosást négyszer elvégeztük. A visszamaradt, kb. 100 μ L karbamidometilált polipeptidből 20 μ L-t kivettünk a pontos tömeg meghatározásához. A maradék polipeptidhez 25 μ L tripszint (1 μ g/ μ L, ez kb. 1:20 tripszin:polipeptid aránynak felel meg) adtunk, és 22 órán keresztül 37 °C-on emésztettük.

Direkt ESI-MSⁿ méréssel megpróbáltuk megkeresni az emésztett minta azon oligopeptidjeit, melyek tartalmazzák az oxidált metionint. Ehhez az *in silico* emésztésből kapott tömegeket használtuk fel. Az egyik alkotóhoz tartozó egyszeres töltésű csúcs megfelelő intenzitással látható volt a spektrumban, ennek szekvenciája a számítások szerint SAEDCMR. A fragmentálás során két *Y* iont tudtunk beazonosítani, illetve a molekulaion és az *Y*₃ ion 64 egységnyi tömegvesztéssel keletkező csúcsát találtuk meg (14. ábra, 15. ábra). Az *Y* ionok túlsúlyát azzal magyarázhatjuk, hogy a metionin és az arginin bázikus oldallánccal rendelkező aminosavak, melyek előszeretettel protonálódnak, így a komplementer *B* fragmensek protonálódása minimális.

A módszerrel tehát sikerült a legfontosabb oligopeptid fragmentálása, és az oxidáltság helyének bizonyítása, azonban a sok oligopeptid direkt ESI mérése rengeteg tömegspektrometriás csúcsot mutat, ezek egyesével történő fragmentálása rendkívül idő és mintaigényes, tehát a szennyező karakterizálására túl költséges módszer.



14. ábra: az oxidált metionint (és karbamidometilált ciszteint) tartalmazó oligopeptid (884,3 Da) CID-del készült fragmenseinek tömegspektruma

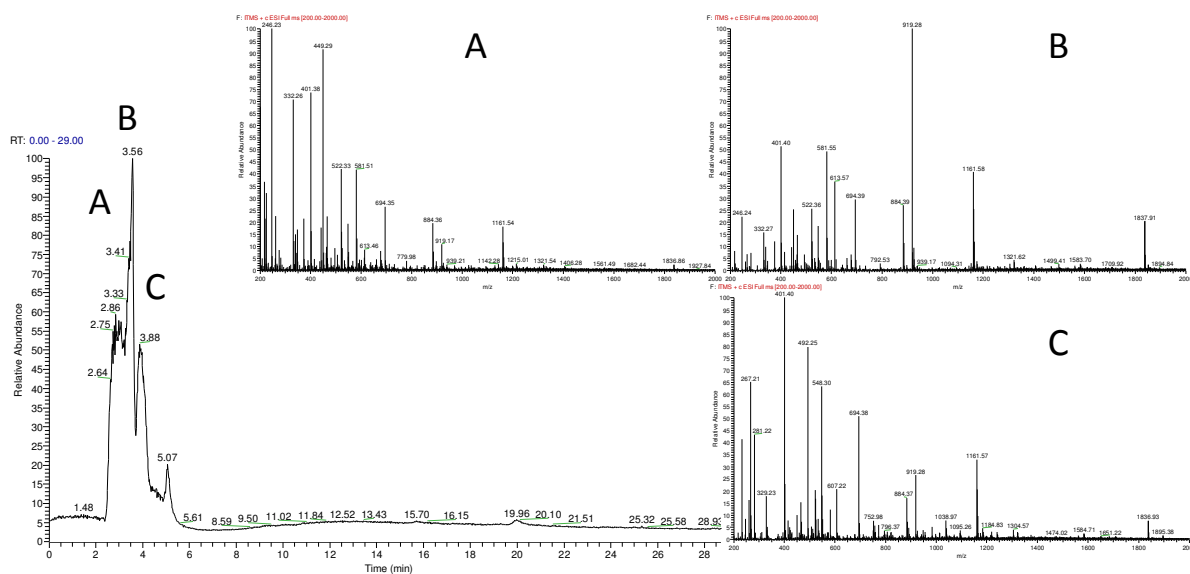


15. ábra: 64 tömegegységnyi veszteség az oxidált metioninból

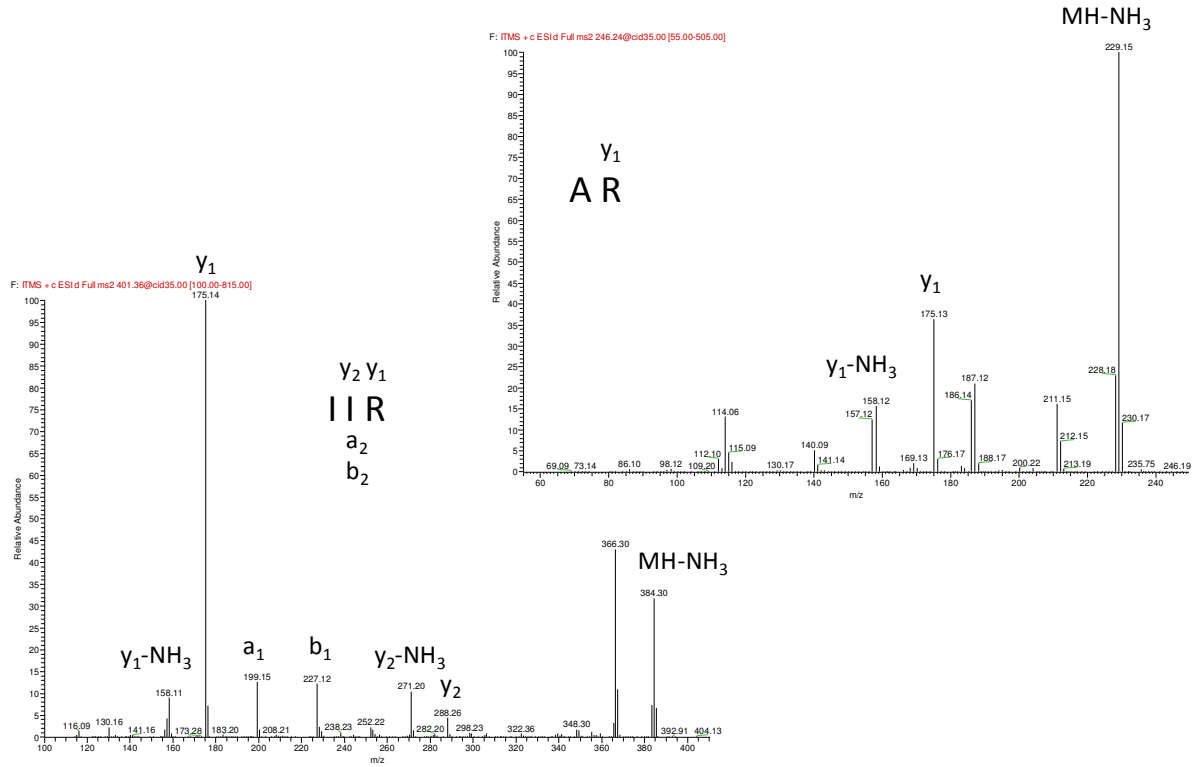
Ezek után arra a megfontolásra jutottunk, hogy az emésztett minta oligopeptidjeit kromatográfiásan szétválasztva kisebb mintamennyiségből részletesebb információhoz juthatunk, amennyiben a retenciós idők közt megfelelő különbség adódik, és így a polipeptid szekvenciájáról pontosabb információt kaphatunk.

Az emésztett minta HPLC-ESI-MS-MS vizsgálatát három különböző oszlopon (két különböző felületi borítottságú és pórusméretű C-18 illetve egy C-4 oszlop) és két különböző elúciós programmal végeztük (víz-acetonitril elegyben gradiens elúció: 5% ACN kiindulási koncentráció, 95% ACN célkoncentráció; tiszta vizes izokratikus elúció). A mérést vezérlő számítógépet úgy programoztuk, hogy a „full scan” mellett legintenzívebb ion fragmentációját mindig vegye fel úgy, hogy a „vak” mintában is megjelenő csúcsokat ne vegye figyelembe.

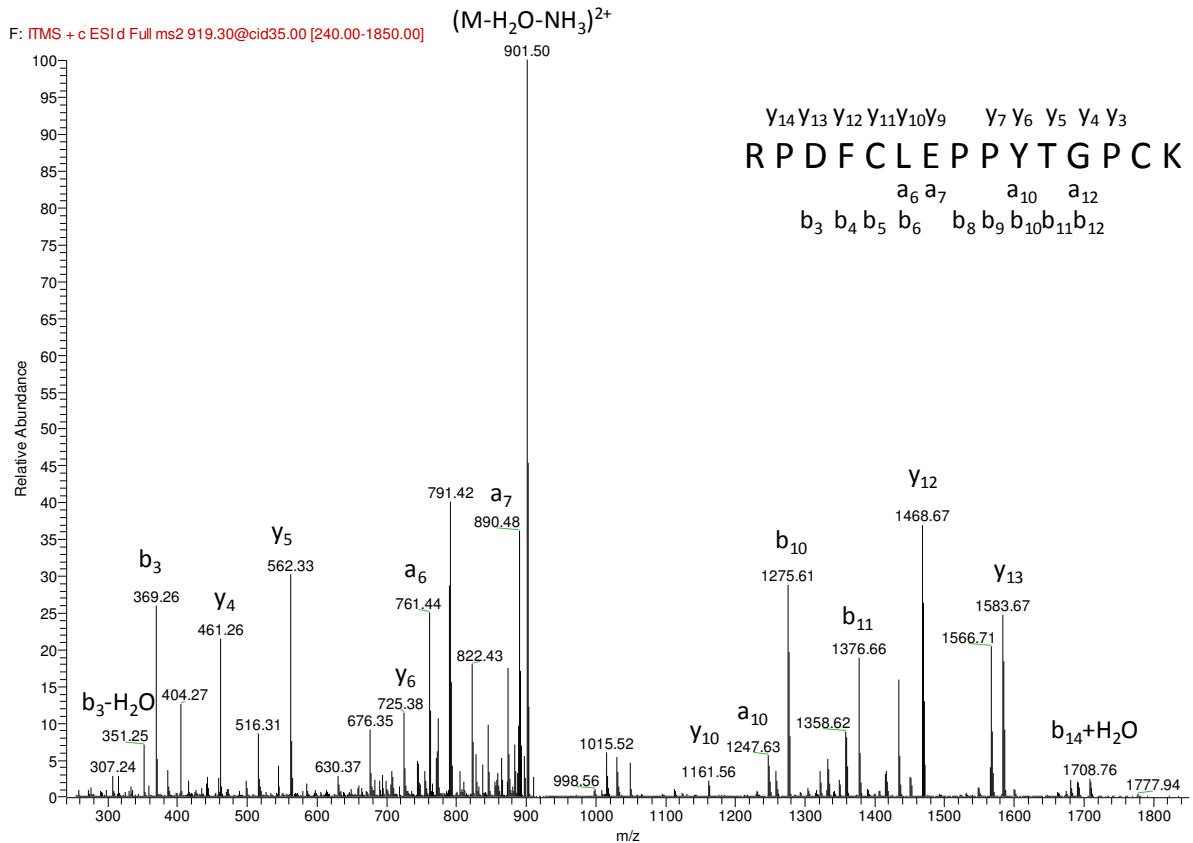
A kapott HPLC-MS-MS kromatogramokat megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy egyik esetben sem váltak szét megfelelően az oligopeptidok, többségében az oldószerfronttal eluálódtak (16. ábra). Emellett a felvett MS-MS spektrumokból csupán néhány az, ami az *in silico* emésztés alapján beazonosítható, és a fragmensei is megfelelőek voltak. Ezek viszont nem a peptidlánc oxidált részéből keletkeztek, így ez a módszer nem csak a teljes szekvencia igazolására alkalmatlan, de még az oxidáltság ellenőrzésére sem használható esetünkben (17. ábra, 18. ábra).



16. ábra: a HPLC-MS módszer TIC kromatogramja, és a három csúcs tömegspektruma (A: 2,66-3,20 perc, B: 3,37-3,63 perc, C: 3,78-4,11 perc).



17. ábra: a HPLC-MS-MS módszerből kapott néhány MS-MS spektrum, és a fragmensek azonosítása



18. ábra: a HPLC-MS-MS módszerből kapott egyik spektrum, a nagyobb méretű fragmensekkel. A szekvencia felett és alatt jelölt fragmensek a kisebb csúcsok között megtalálhatóak. A ciszteinek karbamidometilálva vannak

5. Polipeptidlánc kémiai hasítása

Mivel a lánc megfelelő számú ciszteint tartalmaz, alkalmazhatunk egy olyan módszert, amelyben 1-ciano-4-(dimetilamino)-piridínium (CDAP, 20. ábra) segítségével a cisztein SH csoportját nitrilezzük. A reakció az irodalom alapján rendkívül szelektív, savas körülmények közt (pH 3) gyorsan és kvantitatívan lejátsszódik. Az így módosított polipeptidben lúgos közegben (pH 8-12) gyűrűzáródás történik úgy, hogy a cisztein nitrogénje felől a peptidkötés megszakad, és egy öttagú gyűrű képződik ^{[24] [25] [26]}. Ez megfelelő körülmények közt a hat ciszteint tartalmazó aprotininszármazékokat hét kisebb darabra bontja, melyek molekulatömege a 300 és 2000 Da közötti tartományba esik, eddigi tapasztalataink szerint tehát jól fragmentálhatóak.

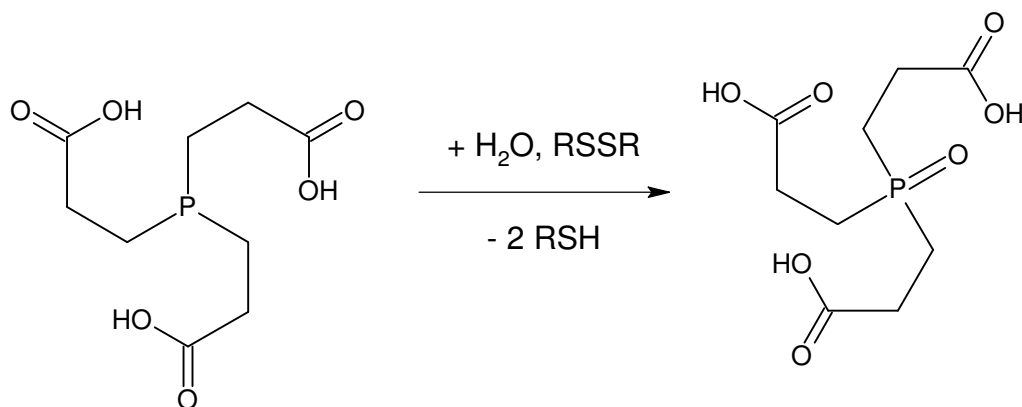
Az oligopeptidek várt tömegének számításakor figyelembe kell venni, hogy az ammóniás közegben valószínűleg a C-terminálison amidálva is megjelennek a spektrumban. Az irodalom azonban felhívja a figyelmet arra, hogy a gyűrűzárással versengő β -elimináció magas pH-n bizonyos polipeptidek esetén sok melléktermékhez vezet, viszont kevésbé lúgos pH esetén a reakció órákat vehet igénybe.

4. táblázat: az ammóniás hidrolízis termékeinek várható tömege. A ciszteinek gyűrűzárt formában szerepelnek

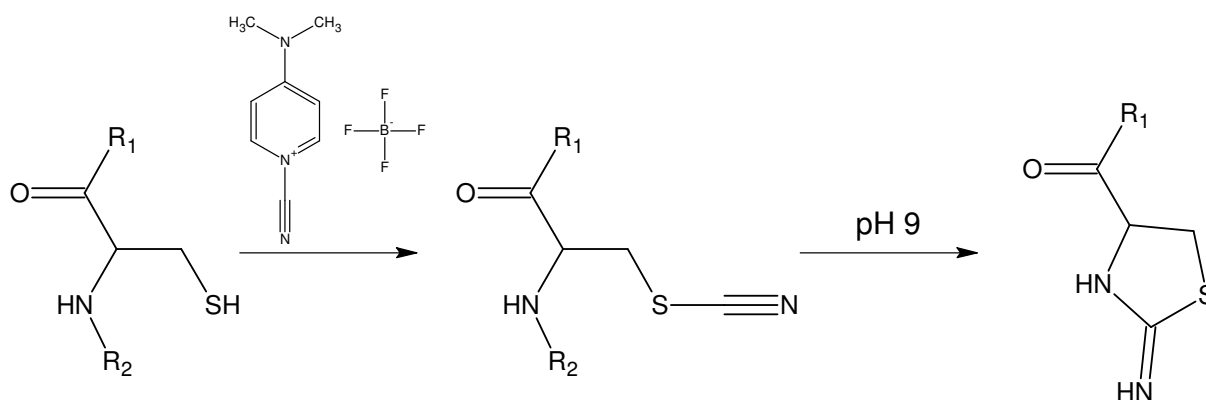
szekvencia	monoizotópos tömeg / Da
CG (dez-Ala-dez-Gly-)	203,23
CGG (dez-Ala-)	260,07
CGGA	331,11
RPDF	533,28
CMRT (nem oxidált)	434,23
CMRT (oxidált)	550,22
CQTFVYGG	898,38
CLEPPYTGP	1000,45
CRAKRNNFKSAED	1562,75
CKARIIRYFYNAKAGL	1911,05

Ezt a módszert korlátozza azonban, hogy milyen redukálószeret alkalmazhatunk, ugyanis a feleslegben maradt DTT SH csoportjai versengenek a ciszteinnel, tehát a CDAP alkalmazása előtt az oldatot valamilyen módszerrel DTT-mentesíteni kell. Az irodalom szerint azonban a Trisz-(2-karboxietil)-foszfin (TCEP, 19. ábra) is tökéletesen alkalmazható, ez a preferált redukálószer CDAP-s reakciók esetén ^{[27] [28]}.

Mi azonban megvizsgáltuk a DTT alkalmazásának lehetőségét is, hiszen az SzKO-n jól optimált protokoll létezik a használatára.



19. ábra: a TCEP mint redukálószer

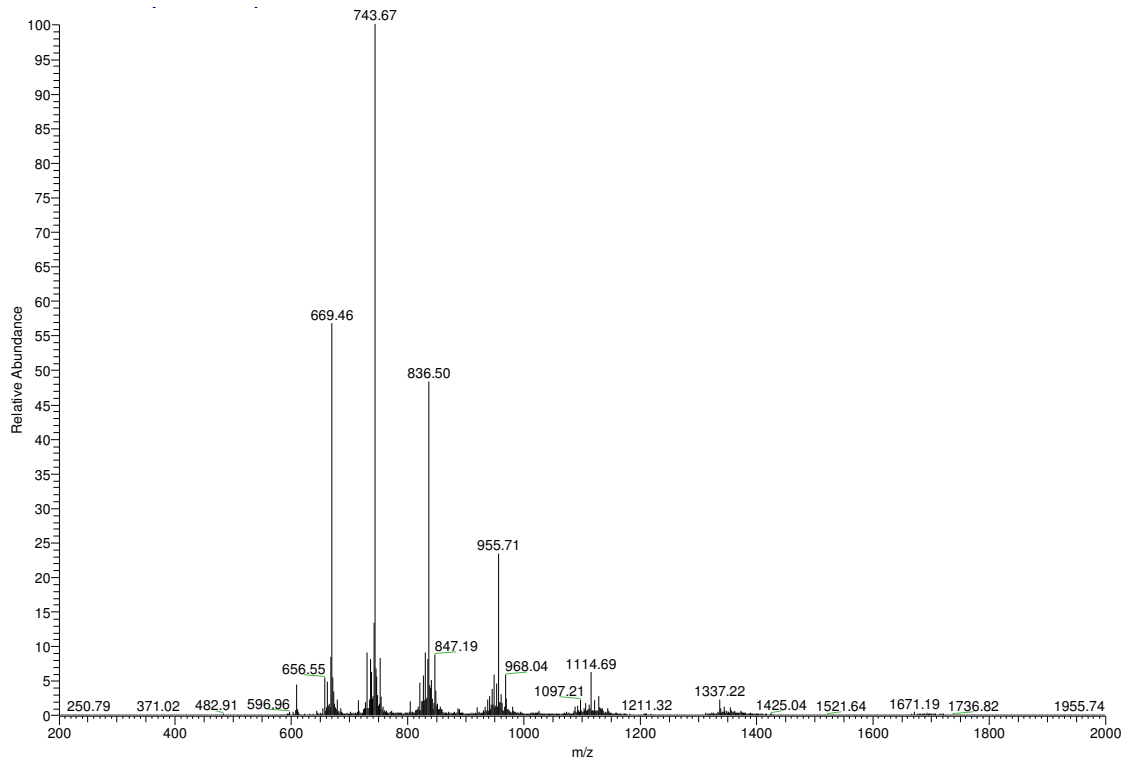


20. ábra: a CDAP mint nitrilezőszer

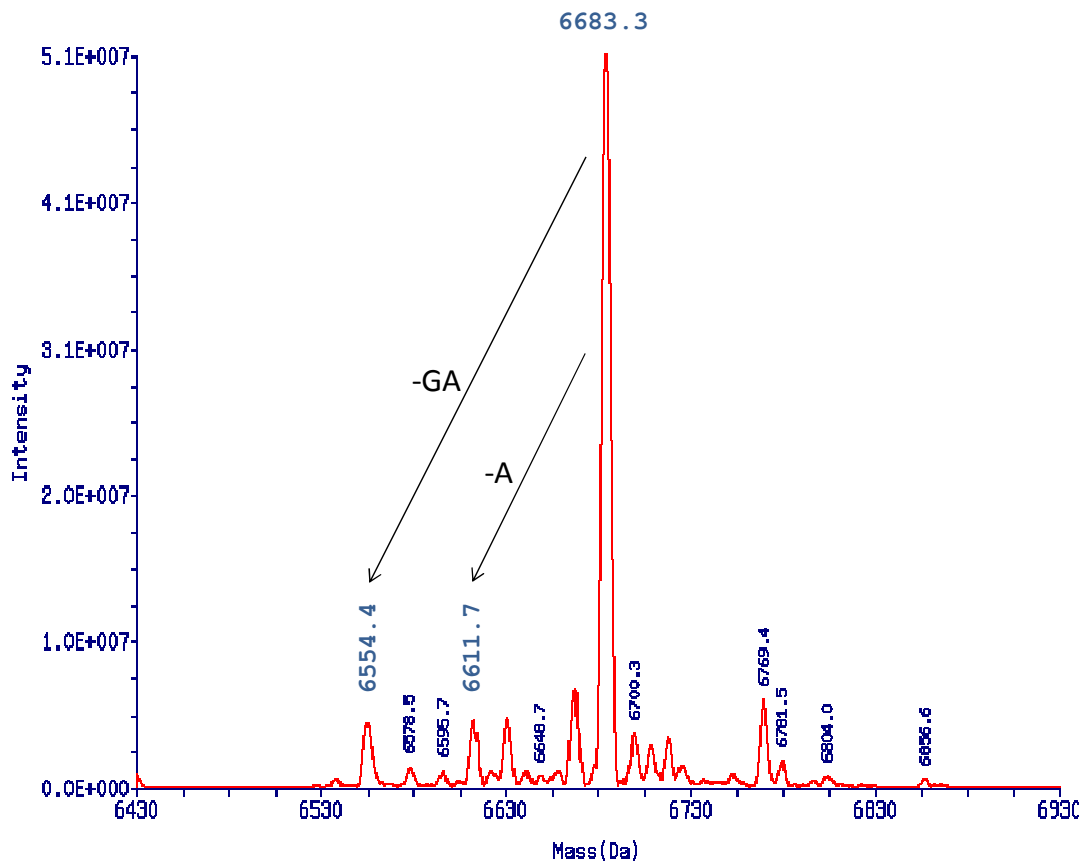
Négy párhuzamos reakciót végeztünk, mellyel a célunk az volt, hogy a reakció sebességét, illetve a lehetséges lassú mellékreakciókat is felderítsük.

A kísérlethez négy oldatot készítettünk. 0,50 mg szilárd mintát mértünk be, melyet 100 μ L 0,25 mM ABC-ben feloldottuk, és 0,5 mL 6 M guanidin hidrokloridot adtunk hozzá. A diszulfidhidak felbontásához 45 μ L, 1 M DTT-t adtunk, ezt rázó inkubátorban 56 °C-on, 250 rpm-en ráztuk két órán keresztül. A mintákat háromszor mostuk 1 mL MQ vízzel, 12 percig 10 000 rpm-en centrifugálva. A kb. 200 μ L oldatot 800 μ L, 0,1 %-os FA oldattal hígítottuk. Mind a négy mintához 2,2 mg CDAP-t adtunk, majd szobahőmérsékleten, 250 rpm-en, sötétben ráztuk. A mintákat különböző időtartamokig (5, 22, 40 és 81 perc) tartottuk a rázó inkubátorban, majd kb. 1000 μ L-re kiegészítve háromszor mostuk 1000 μ L MQ vízzel, 12 percig, 10 000 rpm-en centrifugálva. A kb. 100 μ L mintát MQ vízzel 200 μ L-re egészítettük ki, majd direkt-ESI-MS méréshez 20 μ L mintát kivéve metanol-víz-ecetsav elegyben 120 μ L-re hígítottuk.

Az átlagmolekulatömegre dekonvolvált tömegspektrum báziscsúcsa megegyezik a nitrilezett aprotinin-oxid számított átlagtömegével (21. ábra, 22. ábra, 5. táblázat).



21. ábra: a nitrilezett aprotinin-oxid ESI tömegspektruma



22. ábra: nitrilezett aprotinin-oxid M-re dekonvolált tömegspektruma átlag molekulatömegre számolva

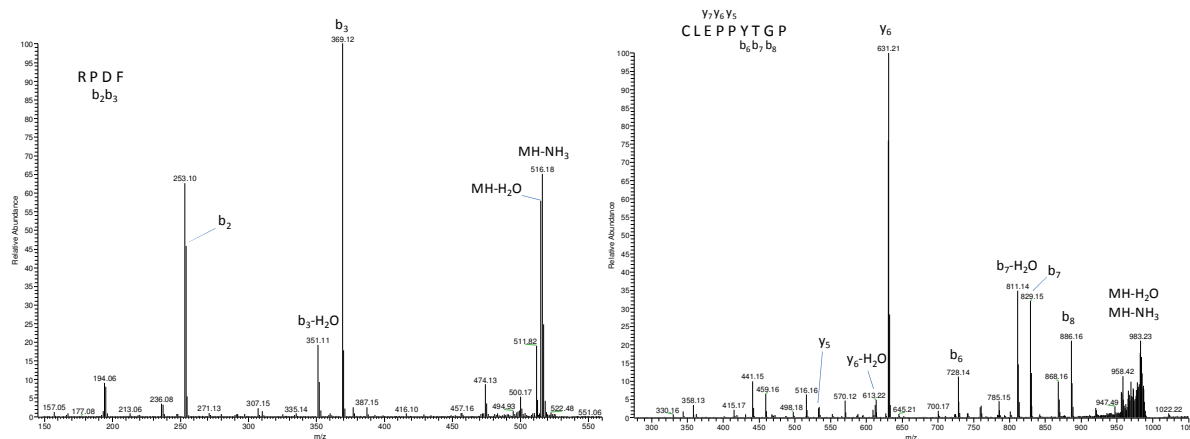
5. táblázat: nitrilezett aprotinin-oxid mért és számított tömegei

M	átlag molekulatömeg / Da	
	számolt	mért
Aprotinin-oxid nitrilált	6683,56568	6683,3
dez-Ala-	6612,48762	6611,7
dez-Ala-dez-Gly-	6555,43618	6554,4

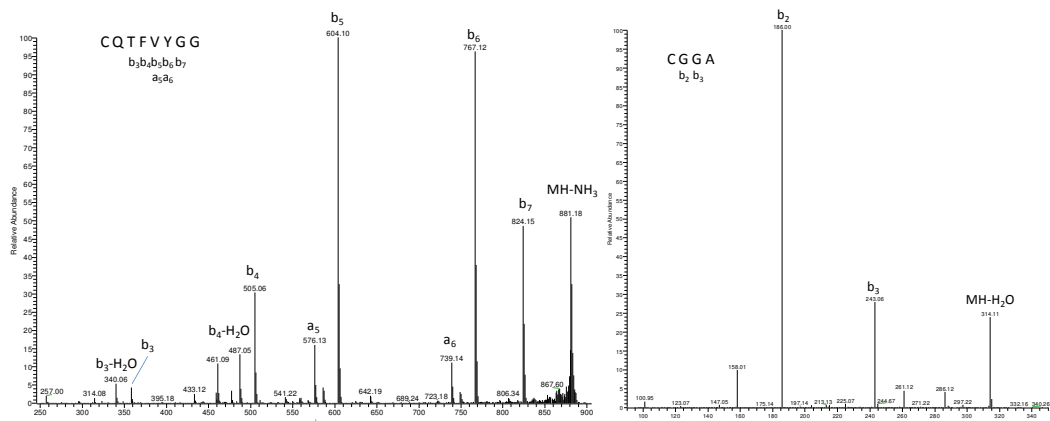
A mintákat egy napra hűtőbe tettük, majd másnap ellenőrizve a tömegspektrumot, megállapítottuk, hogy változás nem történt, a polipeptid hűtőben tárolható.

A hasításához a kb. 200 μL mintához 200 μL 5 % NH_3 -t adtunk. A reakciót szobahőmérsékleten, 250 rpm-en rázatva végeztük. 70 perc reakcióidő után 20 μL mintát kivettünk, és 120 μL -re hígítottuk víz-metanol-ecetsav eleggyel.

Direkt-ESI-MS méréssel megállapítottuk, hogy a reakció részlegesen zajlott le. Több oligopeptid tömegét sikerült beazonosítani és fragmentálni (23. ábra, 24. ábra). Az oligopeptidok megjelentek a C-terminálison amidált és karbonsav formában is (tömegkülönbség 1 Da), azért hogy az intenzitások megfelelőek legyenek akkora tömegablakot választottunk amelyben a savamid és a karbonsav forma egyaránt fragmentálódik az ütközési cellában (4 Da).

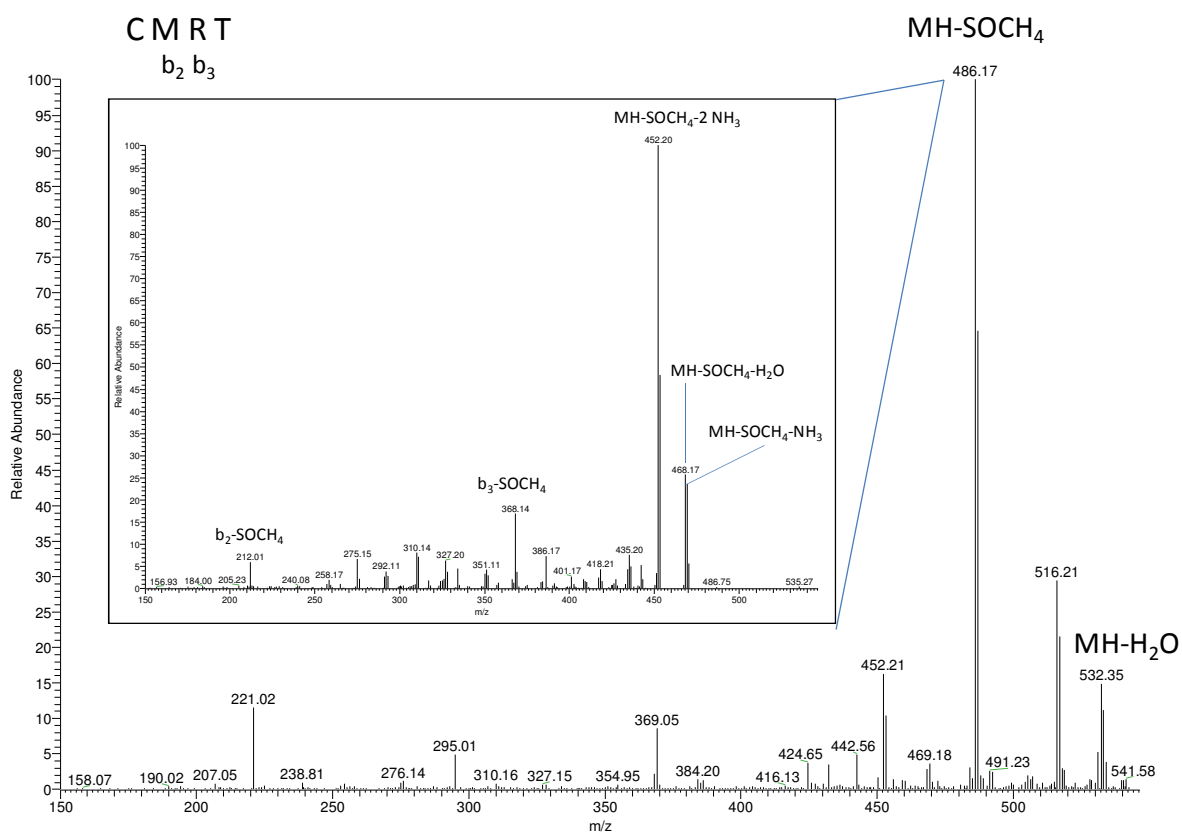


23. ábra: beazonosított oligopeptid MS-MS spektruma



24. ábra: beazonosított oligopeptid MS-MS spektruma

A számunkra fontos, a metionin-oxidot tartalmazó oligopeptidet is sikerült megtalálni, bár viszonylag kis intenzitással jelent meg, azonban a fragmentáció során a jellemző 64 Da veszteséget detektáltuk (15. ábra), és az MH-SOCH₄ ioncsúcsot (486.2 Da) tovább fragmentálva az MS³ spektrumban már megjelennek a *B* ionok 64 vesztesett csúcsai is (25. ábra).



25. ábra: az oxidált metionint tartalmazó minta MS-MS és MS³ spektruma, benne a jellegzetes SOCH₄ vesztesékekkel

Ezzel a módszerrel tehát sikeresen azonosítottuk az aprotinin szekvenciájának nagy részét, köztük az N és C terminálisokat, illetve a számunkra fontos oxidált részt (26. ábra).

RPDF
CLEPPY_TGP
CKARIIR_YFYNAKAGL
C_QTFVYGG
CRA_KRNNFKSAED_
CMRT
CGGA

26. ábra: a kémiai hasítás során beazonosított oligopeptidek, és azok helye az aprotinin-oxid szekvenciájában

Összefoglalás

Az aprotinin oxidált gyártási szennyezői preparatív HPLC-n jól elválaszthatóak a főterméktől, és ezek további elválasztása bár lehetséges, de nem szükséges, mivel tömegspektrometrián a három komponens egy mintából is jól elkülöníthető, és ultranagy felbontás esetén az egyes csúcsok további elemzés nélkül is, kémiai ismeret birtokában beazonosíthatóak. A szennyezők módosítás nélküli fragmentálása a tömegspektrométerben alkalmas arra, hogy ujjlenyomatszerűen azonosítsa az egyes vegyületeket, így gyártás során rutin mérésekre alkalmas a módszer.

A diszulfidhidak felbontásával alapvetően frágensekben dúsabb MSⁿ spektrumot kapunk, de ez is csak ujjlenyomatszerű azonosítást tesz lehetővé, tehát önmagában nem jelent előnyt. Specifikus emésztéssel kisebb oligopeptidekre bontható, melyek már kiértékelhető MS-MS spektrumokat adnak. Mind az emésztés, mind a fragmentálás jól jósolható szoftveresen, viszont a teljes szekvencia meghatározására túlságosan idő és mintaigényes.

A CDAP-vel történő hasítás olyan polipeptidek analizéséhez javasolható, melyek megfelelő számú ciszteint tartalmaznak, és a hasítás során akkora méretű oligopeptidek keletkeznek, melyek MS-MS fragmentációja kényelmesen megvalósítható, tehát nem keletkeznek többszörösen töltött ionok. A módszer hátránya csupán a drága reagens, illetve a β -eliminációs reakció miatt a melléktermékek képződése sem zárható ki.

A kémiai hasítás mellett szól továbbá, hogy a polipeptidek többségén végrehajtható, a reakció független a polipeptid biokémiai hatásaitól, pusztán kémiai karaktere játszik szerepet, és ez alapján ez a módszer megfelelő elválasztástechnikával kombinálva a polipeptid jellegű gyógyszerhatóanyagok szennyezésprofilának felvételében versenyképes megoldás lehet az órákat igénybe vevő enzimátikus emésztéssel szemben.

Aprotinin és szennyezőinek meghatározásakor pedig egyértelműen előnyös e módszer használata, hiszen a ciszteinek elhelyezkedése a polipeptidláncon belül olyan, hogy méretben

és számban sokkal ideálisabb oligopeptidek keletkeznek, mint az enzimatis emésztés során, és HPLC módszer kidolgozása nélkül is alkalmazható.

További tervek, feladatok

A módszer bár sikeres volt, érdemes volna még a hiányzó, hosszú peptidláncok felderítésére módszert fejleszteni, a folyamatot tovább optimalni a maximális hatékonyság és minimális időigény elérése érdekében, illetve a reprodukálhatóság megállapítása további kísérletek végzésével.

Hivatkozások

1. *Raman spectroscopic studies of some biochemically relevant molecules.* **S. E. May Colaianni, J. Aubard, S. Høime Hansen, O. Faurskov Nielsen.** 1995, *Vibrational Spectroscopy*, Vol. 9, pp. 111-120.
2. *¹³C NMR, X-ray, and Differential Scanning Calorimetry Investigations of Truncated BPTI (Aprotinin) Analogues.* **P. E. Hansen, W. Zhang, C. Lauritzen, S. Bjørn, L. C. Petersen, K. Norris, O.H. Olsen, and C. Betzel.** 1998, *Biochemistry*, Vol. 37, pp. 3645-3653.
3. *A possible association between aprotinin and improved survival after radical surgery for mesothelioma.* **P. H. Norman, P. F. Thall, R. V. Purugganan, B. J. C. J. Riedel, D. R. Thakar, D. C. Rice, L. Huynh, W. Qiao, S. Wen, W. R. Smythe.** 2009, *Cancer*, Vol. 115, pp. 833-841.
4. *Identification and Isolation of the Bactericidal Domains in the Proteinase.* **A. Pellegrini, U. Thomas, N. Bramaz, S. Klauser, P. Hunziker, R. von Fellenberg.** 1996, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 222, pp. 559–565.
5. *Multi-atmospheric pressure ionisation interface for liquid chromatography–mass spectrometry.* **M. Sakairi, Y. Kato.** 1998, *Journal of Chromatography A*, Vol. 794, pp. 391–406.
6. *Comparison of SSI with APCI as an interface of HPLC-mass spectrometry for analysis of a drug and its metabolites.* **T. Arinobu, H. Hattori, H. Seno.** 2001, *J Am Soc Mass Spectrom*, Vol. 13, pp. 204–208.
7. *Mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) applied to biological macromolecules.* **K. Markides, A. Gräslund,.** 2002, *Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002*, pp. 1-13.
8. *Infrared Multiphoton Dissociation of Peptide Cations in a Dual Pressure Linear Ion Trap Mass Spectrometer.* **M. W. Gardner, S. I. Smith, A. R. Ledvina, J. A. Madsen, J. J. Coon, J. C. Schwartz, G. C. Stafford Jr., J. S. Brodbelt.** 2009, *Anal. Chem.*, Vol. 81, pp. 8109–8118.
9. *Improving IRMPD in a Quadrupole Ion Trap.* **G. A. Newsome, G. L. Glish.** 2009, *J Am Soc Mass Spectrom*, Vol. 20, pp. 1127–1131.

10. *Prediction of Electron-Transfer/Capture Dissociation Spectra of Peptides.* **Zhang, Z.** 2010, *Anal. Chem.*, Vol. 82, pp. 1990–2005.
11. *On Performing Simultaneous Electron Transfer Dissociation and Collision-Induced Dissociation on Multiply Protonated Peptides in a Linear Ion Trap.* **J. L. Campbell, J. W. Hager, J. C. Y. Le Blanc.** 2009, *J Am Soc Mass Spectrom*, Vol. 20, pp. 1672–1683.
12. *Electron Capture/Transfer versus Collisionally Activated/Induced Dissociations: Solo or Duet?* **R. A. Zubarev, Alexander R. Zubarev, and Mikhail M. Savitski.** 2008, *J Am Soc Mass Spectrom*, Vol. 19, pp. 753–761.
13. *Mass spectrometric characterization of transferrins and their fragments derived by reduction of disulfide bonds.* **M. Thevis, R. R. O. Loo. J. A. Loo.** 2003, *J Am Soc Mass Spectrom*, Vol. 14, pp. 635–647.
14. *Extensive Investigations on Oxidized Amino Acid Residues in H₂O₂-Treated Cu,Zn-SOD Protein with LC-ESI-Q-TOF-MS, MS-MS for the Determination of the Copper-Binding Site.* **T. Kurahashi, A. Miyazaki, S. Suwan, M. Isobe.** 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 123, pp. 9268-9278.
15. *Modification of Cysteine Residues by Alkylation. A Tool in Peptide Mapping and Protein Identification.* **S. Sechi, B. T. Chait.** 1998, *Anal. Chem.*, Vol. 70, pp. 5150-5158.
16. *De Novo Sequencing and Disulfide Mapping of a Bromotryptophan-Containing Conotoxin by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry.* **S. S. Nair, C. L. Nilsson, M. R. Emmett, T. M. Schaub, K. H. Gowd, S. S. Thakur, K. S. Krishnan, P. Balaram, A G. Marshall.** 2006, *Anal. Chem.*, Vol. 78, pp. 8082-8088.
17. *Probing the Active Site of Human IMP Dehydrogenase Using Halogenated Purine Riboside 5'-Monophosphates and Covalent Modification Reagents.* **L. C. Antonino, K. Straub, J. C. Wu.** 1994, *Biochemistry*, Vol. 33, pp. 1760-1765.
18. *Tryptic Fragments of Phaseolin from Protein Isolates of Phaseolus Beans.* **F. K. Yeboaha, I. Alli, B. K. Simpson, Y. Konishi, B. F. Gibbs.** 1999, *Food Chemistry*, Vol. 67, pp. 105-112.
19. ProteinProspector. *University of California, San Francisco.* [Online] <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>.

20. *Mass Spectrometric Determination of ILPR G-Quadruplex Binding Sites in Insulin and IGF-2*. **J. Xiao, L. B. McGown**. 2009, *J Am Soc Mass Spectrom*, Vol. 20, pp. 1974–1982.
21. *Proteomic Profiling of Hepatic Endoplasmic Reticulum-associated Proteins in an Animal Model of Insulin Resistance and Metabolic Dyslipidemia*. **J. F. Morand, J. Macri, K. Adeli**. 2005, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, pp. 17626–17633.
22. *Warm Ischemia-induced Alterations in Oxidative and Inflammatory Proteins in Hepatic Kupffer Cells in Rats*. **J. Hirsch, K. C. Hansen, S. Choi, J. Noh, R. Hirose, J. P. Roberts, M. A. Matthay, A. L. Burlingame, J. J. Maher, C. U. Niemann**. 2006, *Molecular and Cellular Proteomics*, Vol. 5, pp. 979-986.
23. *Evaluation of the possible proteomic application of trypsin from *Streptomyces griseus**. **T. Stosova, M. Sebel, P. Rehulka, O. Sedo, J. Havlis, Z. Zdrahal**. 2008, *Analytical Biochemistry*, Vol. 376, pp. 94–102.
24. *A Novel Methodology for Assignment of Disulfide Bond Pairings in Proteins*. **J. T. Watson, J. Wu**. 1997, *Protein Science*, Vol. 6, pp. 391-198.
25. *Determination of the Disulfide Structure of Sillucin, a Highly Knotted, Cysteine-Rich Peptide, by Cyanylation - Cleavage Mass Mapping*. **J. Qi, J. Wu, G. A. Somkuti, J. T. Watson**. 2001, *Biochemistry*, Vol. 40, pp. 4531-4538.
26. *Capture and identification of folding intermediates of cystinyl proteins by cyanylation and mass spectrometry*. **J. T. Watson, Y. Yang, J. Wu**. 2001, *J. Mol. Graphics Modell.*, Vol. 19, pp. 119-128.
27. *Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine*. **J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran and G. M. Whitesides**. 1991, *J. Org. Chem.*, Vol. 56, pp. 2648-2650.
28. *A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiotreitol for Use in Protein Biochemistry*. **E. B. Getz, M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke and P. R. Selvin**. 1999, *Analytical Biochemistry*, Vol. 273, pp. 73-80.