



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUNA

**Masa-espektrometriaren bidezko
giza-malkotako peptidoen analisia
eta peptido antimikrobien
identifikazioa**

*Mikel Azkargorta, Javier Soria,
Claudia Ojeda, Fanny Guzmán,
Arantxa Acera, Ibon Iloro,
Iraide Escobes, Tatiana Suárez
eta Felix Elortza*

784-789 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.109>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Masa-espektrometriaren bidezko giza-malkotako peptidoen analisisa eta peptido antimikrobiarren identifikazioa

Mikel Azkargorta¹, Javier Soria², Claudia Ojeda⁴, Fanny Guzmán³, Arantxa Acera², Ibon Iloro¹, Iraide Escobes¹, Tatiana Suárez², Felix Elortza¹

¹Proteomikako Plataforma, CIC bioGUNE, CIBERehd, ProteoRed-ISCI, Bizkaia Zientzia eta Teknologia Parkea, Derio, Bizkaia;

²Biofalmik Applied Research, Bizkaia Zientzia eta Teknologia Parkea, Derio, Bizkaia;

³Núcleo Biotecnológico de Curauma (NBC), Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile;

⁴Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

mazkargorta@cicbiogune.es edo felortza@cicbiogune.es

Laburpena

Malkoak begia lubrifikatu eta babesten duten jariakinak dira. Bertan hainbat molekula desberdin daude, eta hauen artean peptido naturalak aurkitzen dira. Peptido hauek malkoaren babes-mekanismoen parte dira, izan ere aktibitate antimikrobiarra izan baitezakete. Malkoen peptido naturalen edukia sakonean karakterizatu gabe dirau gaur egun. Masa-espektrometria erabiliz, lan honetan malkotan inoiz identifikatu den peptido naturalen zerrenda handiena aurkezten da: 25 proteina desberdinetatik eratorritako 234 peptido. Identifikatutako bi peptidoren aktibitate antimikrobiarra frogatu da, erabilitako prozedura peptido antimikrobiarrak aurkitzeko eta karakterizatzeko baliogarria dela frogatuz.

Abstract

The tear film, an aqueous secretion protecting the eye, contains antimicrobial peptides involved in the protection against exogenous pathogens. In contrast to tryptic peptide studies, mass spectrometry analysis of endogenous peptides is difficult because of their heterogeneity. Therefore, we combined three mass spectrometry methods, leading to the generation of the biggest dataset of endogenous tear peptides to date. The antimicrobial activity prediction analysis performed in silico revealed different putative antimicrobial peptides among them. Two of the extracellular glycoprotein lacritin peptides were de novo synthesized, and their antimicrobial activity was confirmed in vitro. Our findings provide a useful approach for the discovery of peptides with antimicrobial activity.

Hitz gakoak: malkoak, peptidoak, peptidoma, peptido antimikrobiarrak, masa-espektrometria.

1. Sarrera eta motibazioa

Giza malkoak jariakin konplexua dira, non lipidoak, proteinak, peptidoak eta molekula organiko txikiak dauden (Donald *et al.* 2002). Malkoek, begiko kornea eta konjuntiba estaliz, ondoko funtzioak betetzen dituzte: lubrifikazioa, begi azaleko epitelioko zelulen elikadura, eta kanpoko patogenoekiko babesa. Patogenoekiko babes hau, hein batean, bertan dauden peptido antimikrobiarrek (PAM) betetzen dute, bakterioen hazkuntza gelditzeko zein hauek hiltzeko gai baitira (Fleiszig *et al.* 2002). PAMak modu konstitutiboan sortzen dituzte zelulek, baina baldintza berezietan hauen sorrera indusatu egin daiteke, zauriak egitean edo mikrobioen presentzian, adibidez (Zasloff 2007). Bakterioek orokorrean ez dute peptido hauen aurkako erresistentzia-mekanismo

eraginkorrik garatu, eta horregatik PAMak antibiotikoen garapenerako eredu baliotsutzat hartzen dira (Peschel eta Sahl 2006). Hortaz, peptido hauen identifikazio eta karakterizazioa interes handikoa da (McDermott 2013).

Gaur egun proteinak identifikatzeko teknikarik erabiliena masa-espektrometria (MS) da. Horretarako, proteinak proteasa batekin tratatzen dira (tripsina orokorrean), eta prozesamendu horren ondorioz sortutako proteina-zatikiak (peptidoak) masa-espektrometroan aztertzen dira. Masa-espektrometroak peptido hauen tamaina neurtzen du, eta peptidoak fragmentatu ostean hauen sekuentziaren inguruko informazioa ematen du. Lortutako informazioa proteina identifikatzeko erabili daiteke: programa informatiko espezifikoak erabiliz datu-baseetan bilaketak egin daitezke, eta esperimentera lortutako informazioak datu-basean dagoen informazioarekin bat eginez gero, proteina identifikatutzat jo daiteke. MS eta kromatografia likidoa (LC) konbinatuz gero (LC-MS), peptido eta proteina ugari identifikatu daitezke esperimentera bakarrean (Cotrell 2011).

Halere, peptido naturalek zenbait berezitasun dituzte, eta orokorrean proteinen azterketarako erabiltzen diren hurbilketek ez dute balio izaten hauen azterketarako. Alde batetik, lagin prestaketari begira, ez dira tripsinarekin tratatzen, zuzenean aztertzen bait dira. Bestalde, beraien izaera heterogeneoa dela eta (Sasaki *et al* 2013), peptido naturalen MS-bitarteko azterketa zaila da. Horregatik, lan honetan peptido naturalen azterketarako metodo espezifikoak jarraitu ziren, eta laginaren edukinean ahal bezain beste sakontzeko asmoz peptidoak masa-espektrometroan fragmentatzeko hiru metodo osagarri erabili ziren. Metodo hauek CID (Collision Induced Dissociation), ETD (Electron Transfer Dissociation) eta HCD (Higher Collision Dissociation) izan ziren (Shen *et al.* 2011).

Horrela, 25 proteinatik eratorritako 234 peptido desberdin identifikatu ziren, gaur egun ezagutzen den giza-malko basaleko peptidoen katalogo handiena lortuz. Peptido hauek karakterizatu eta beraien artean aktibitate antimikrobiarra izan zezaketen zenbait peptido identifikatu ziren. Hauetariko bi sintetizatu eta beraien aktibitate antimikrobiarra testatzeko zenbait frogak egin ziren, aktibitate hau konfirmatu zelarik.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Giza-malkotako peptido naturalen azterketa sakona oraindik egin gabe dago. Malkotako proteinak ikertzeko egin diren hurbilketa gehienetan proteomika klasikoa erabili izan da, non proteinak tripsinarekin tratatzen diren analisi aurretik, sortutako peptidoak masa-espektrometriaren bitartez identifikatuz. Honela, de Souza eta lankideek 491 proteina identifikatu zituzten 2006an (de Souza 2006), eta sei urte beranduago Zhou eta lankideek 1500 proteina inguru (Zhou *et al.* 2012). Halere, lagin-prestaketa eta prozesamendua direla eta, peptido naturalen azterketa ikerketa horietatik kanpo gelditzen da; peptido naturalen azterketak metodo espezifikoak beharrezkoak ditu. Zentzu honetan, Hayakawa eta taldekideek giza-malko erreflexuan (negarra indusituz) lortutako peptido naturalen lehen analisia burutu zuten duela gutxi (Hayakawa *et al.* 2013). Horretarako, kromatografia likidoa egin eta gero MALDI-TOF/TOF teknika erabili zuten. Analisi horretan 30 peptido desberdin identifikatu zituzten, giza malkotako peptido naturalen lehen katalogoa sortuz. Halere, peptido kopurua murrizta izateaz gain, malko erreflexua erabili izanak garrantzia kentzen dio ikerketari.

Hau guztia dela eta, gure ikerketaren helburuak honakoak izan ziren:

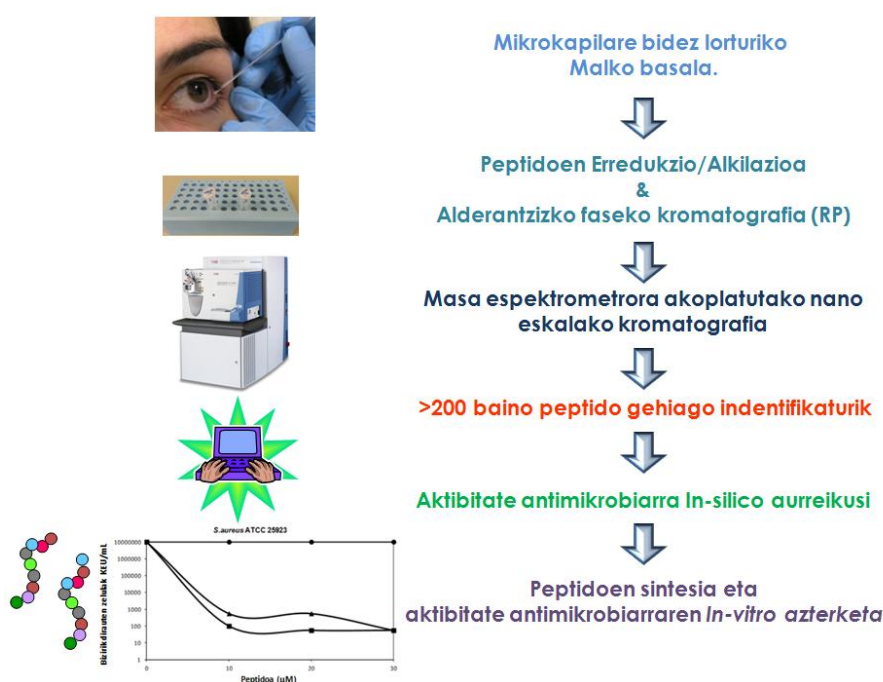
- Giza-malko basaletako peptido naturalen azterketa sakona egin.
- Peptido hauen artean aktibitate antimikrobiarra izan dezaketen peptidoak antzeman.
- Aukeratutako peptido hauen aktibitate antimikrobiarra frogatu.

3. Emaizak

Malko basalen laginak egun ezberdinetan zehar eta bost pertsona osasuntsuen bi begietatik kapilar bat erabiliz lortu ziren. Proteinen disulfuro zubiak hausteko erredukzio

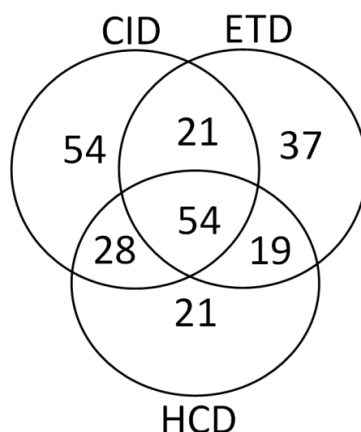
eta alkilazio prozedura burutu zen ditiotreitola (DTT) eta iodoazetamida (IAA) erabiliz. Ondoren, laginaren gatzak garbitzeko eta bertako peptidoak kontzentratzeko, fase errebertsuko alderantziko faseko (RP) mikrozutabeak erabili ziren. Peptido naturalak aztertzeko, laginak nano eskalako kromatografia likidozko ekipoa (Waters) ziztatu ziren, eta kromatografian banandutako peptidoak zuzenean LTQ Orbitrap XL-ETD (Thermo-Fisher) masa espektrometroan aztertu ziren. Laginak CID, ETD eta HCD fragmentazioetan oinarritutako metodoak erabiliz aztertu ziren. Horretaz gain, %5 DMSO kromatografia-gehiagarria erabiliz ere aztertu ziren laginak.

Guztira, 25 proteinatik eratorritako 234 peptido identifikatu ziren. Laginaren izaerarekin bat eginez, peptido asko jariatutako proteinetatik zein mintz-proteinetatik eratorriak zirela ikusi zen. Proteinak kontutan hartuz gero, babes-mekanismoekin erlazionatutako proteinen presentzia nabaria aurkitu zen (aktibitate antimikrobiarra, bakterioen aurkako erantzuna e.a.).



1 Irudia. Malkoen peptidomika: erabilitako hurbilketaren eskema orokorra.

Peptidoen identifikaziorako erabilitako hiru teknikek informazio osagarria eman zuten. Hiru teknikek identifikatutako peptido komunak 54 ziren bitartean, teknika bakoitzak espezifikoki identifikatutakoak guztira 112 izan ziren: 54 CIDrekin, 37 ETDrekin eta 21 HCDrekin. Beraz, teknika bakoitzak informazio osagarria eman zuen, laginaren karakterizazio sakonagoa ahalbidetuz.



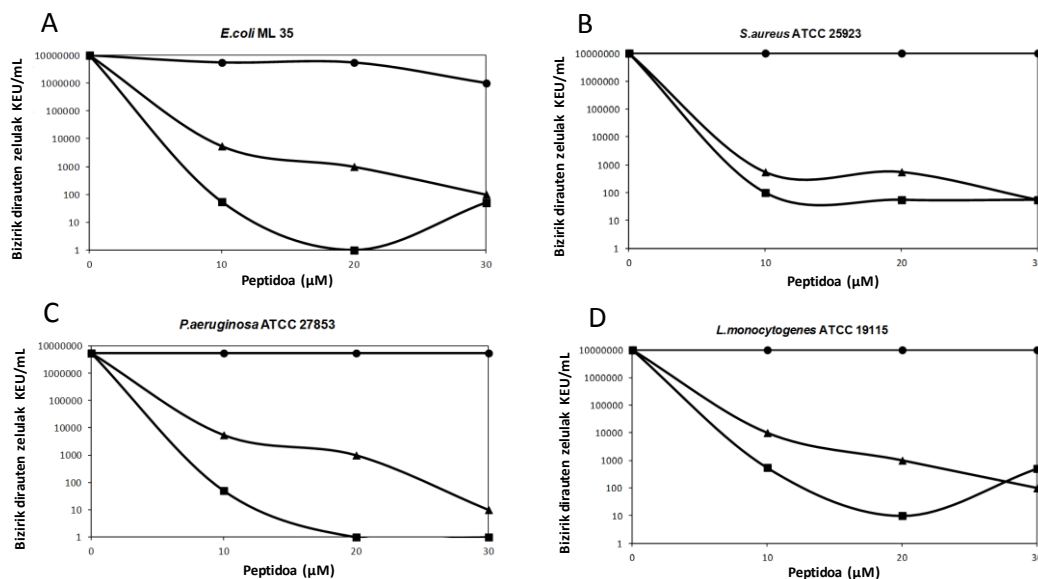
2 Irudia. CID, ETD eta HCD teknikak erabilia masa-espektrometria bitartez identifikatutako peptidoen banaketa.

Identifikatutako peptidoen artean aktibitate antimikrobiarra izan zezaketen peptidoak aurreikusteko tresna bioinformatiko bereziak erabili ziren. Tresna bioinformatiko hauek, CAMP delako datu basean dauden algoritmo berezietan oinarrituta daude (Thomas *et al.* 2010). Horrela, zenbait peptidok oso aktibitate antimikrobiar handia izan zezaketenaren baloreak jaso zuten. Balio handiena extracellular glycoprotein lacritin (LACRT_HUMAN) izeneko proteinatik eratorritako bi peptidok erakutsi zuten: KLLKKFSLLKPWA eta LLKKFSLLKPWA, 0.997 eta 0.992 probabilitatezko baloreekin, hurrenez hurren (ikus 1 taula).

1 Taula. Tresna bioinformatikoen bidez identifikatutako peptidoen artean aktibitate antimikrobiarra izateko probabilitate altuena zuten peptidoak. UNIPROT sarrera: Uniprot datu-basean proteina horrek duen sarrera. SEKUENTZIA: Identifikatutako peptidoaren aminoazido-sekuentzia. Prob.: Peptido horrek aktibitate antimikrobiarra izateko probabilitatea.

UNIPROT Sarrera	SEKUENTZIA	Prob
LACRT_HUMAN	LLKKFSLLKPWA	0.992
LACRT_HUMAN	KLLKKFSLLKPWA	0.977
LYSC_HUMAN	AVACAKRVVRDPQGIRAWVAWRNRCQNRDVRQYVQGCGV	0.965
LYSC_HUMAN	ACAKRVVRDPQGIRAWVAWRNRCQNRDVRQYVQGCGV	0.96
LACRT_HUMAN	GGKQFIENGSEFAQKLLKKFSLLKPWA	0.944
LYSC_HUMAN	AKRVVRDPQGIRAWVAWRNRCQNRDVRQYVQGCGV	0.939
LACRT_HUMAN	GSEFAQKLLKKFSLLKPWA	0.938
LACRT_HUMAN	LKKFSLLKPWA	0.936
LYSC_HUMAN	CAKRVVRDPQGIRAWVAWRNRCQNRDVRQYVQGCGV	0.933
LACRT_HUMAN	AQKLLKKFSLLKPWA	0.928
LACRT_HUMAN	GVPGGKQFIENGSEFAQKLLKKFSLLKPWA	0.901
LACRT_HUMAN	QALAKAGKGMHGGVPGGKQFIENGSEFAQKLLKKFSLLKPWA	0.897
LYSC_HUMAN	QDNIADAVACAKRVVRDPQGIRAWVAWRNRCQNRDVRQYVQGCGV	0.897
LACRT_HUMAN	QKLLKKFSLLKPWA	0.885
LACRT_HUMAN	AGKGMHGGVPGGKQFIENGSEFAQKLLKKFSLLKPWA	0.877
PROL4_HUMAN	GPQQRPPKPGGHHRHPPPPFQNRQRRPPRRGHR	0.839
PROL4_HUMAN	GPQQRPPKPGGHHRHPPPPFQNRQRRPPRRGH	0.837
PROL4_HUMAN	DGPQQRPPKPGGHHRHPPPPFQNRQRRPPRRGH	0.837
LYSC_HUMAN	HLSCSALLQDNIADAVACAKRVVRDPQGIRAWVAWRNRCQNRDVRQYVQGCGV	0.826
DCD_HUMAN	LEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDA	0.823

Aktibitate antimikrobiarra izateko probabilitate handieneko bi peptidoak *de novo* sintetizatu ziren, oinarri solidoko peptido anitzen sistema erabilia. Ondoren, peptido hauen aktibitate antimikrobiarra neurtu egin zen begitako patogenoak diren lau bakterio mota erabiliz: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) eta *Escherichia coli* (ATCC 25922) gram-negatiboak, eta *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) eta *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) gram-positiboak. Horretarako, zelula hauek koloniak eratzeko ahalmena (hazteko ahalmena, alegia) neurtu egin zen peptido horien presentzian. Kontrol bezala identifikatutako peptidoen artean zegoen WLQEGGQECECKDWFLRAPR (0.253 probabilitatea) peptidoa erabili zen. 3 irudian ikus daitekeen bezala, aukeratutako bi peptidoek oso aktibitate antimikrobiar handia zuten gram-positibo zein negatiboak diren bakterioen aurka.



3 Irudia. Laborategian sintetizatutako peptidoek begiko patogeno diren lau bakterio mota ezberdinen aurkako aktibitate antimikrobiarra. (●)Peptido kontrola, WLQEGGQECECKDWFLRAPR, aurreikusitako aktibitate antimikrobiarrik ez duena; (■)LLKKFSSLKPWA (▲)KLLKKFSSLKPWA.

4. Ondorioak

Orohar, jarraitutako lan-fluxua gure helburuak lortzeko baliogarria izan dela ondoriozta daiteke. Batetik, giza-malko basaletan dauden 234 peptido identifikatu ziren, gaurdaino ezagutzen zen katalogoa modu nabarian handituz. Bestetik, tresna bioinformatikoen bidez, peptidoek izan zezaketen aktibitate antimikrobiarra aurreikusi zen. Ondoren, hauetariko bi peptidoren aktibitatea esperimentalki frogatu zen, estrategiaren baliogarritasuna frogatuz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Esan bezala, aktibitate antimikrobiarra duten peptidoak antibiotikoen garapenerako garrantzi handiko ereduak izan daitezke eta, hortaz, lan honetan aurkeztutako lan-fluxuak eta emaitzek zentzu honetan lagundu dezakete, peptido interesgarrien identifikazioa ahalbidetzen baitute. Erabilitako prozedura beste edozein jariakin edo lagin biologikorekin jarraitu daiteke, eta bestelako funtzioak izan ditzaketen peptidoak identifikatzeko eta karakterizatzeko baliogarria gerta daiteke, zaurien sendaketan zein estimulo kimotaktikoen garapenean parte hartzen duten peptidoak kasu.

6. Erreferentziak

- (1) Donald RK, Jennifer C, Michael D, Jean-Pierre G, George S, Alan T. The Tear Film; Butterworth-Heinemann: Oxford, 2002. p. 51–81.
- (2) Fleiszig, S. M., McNamara, N. A., and Evans, D. J. (2002) The tear film and defense against infection. *Advances in experimental medicine and biology* 506, 523-530
- (3) Zasloff, M. (2007) Antimicrobial peptides, innate immunity, and the normally sterile urinary tract. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18, 2810-2816
- (4) Peschel, A., and Sahl, H. G. (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature reviews. Microbiology* 4, 529-536
- (5) McDermott, A. M. (2013) Antimicrobial compounds in tears. *Experimental eye research* 117, 53-61
- (6) Cottrell JS. Protein identification using MS/MS data. *J Proteomics*. 2011 Sep 6;74(10):1842-51
- (7) Sasaki, K., Osaki, T., and Minamino, N. (2013) Large-scale identification of endogenous secretory peptides using electron transfer dissociation mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12, 700-709
- (8) Shen, Y., Tolic, N., Xie, F., Zhao, R., Purvine, S. O., Schepmoes, A. A., Moore, R. J., Anderson, G. A., and Smith, R. D. (2011) Effectiveness of CID, HCD, and ETD with FT MS/MS for degradomic-peptidomic analysis: comparison of peptide identification methods. *Journal of proteome research* 10, 3929-3943
- (9) de Souza, G. A., Godoy, L. M., and Mann, M. (2006) Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome biology* 7, R72.
- (10) Zhou, L., Zhao, S. Z., Koh, S. K., Chen, L., Vaz, C., Tanavde, V., Li, X. R., and Beuerman, R. W. (2012) In-depth analysis of the human tear proteome. *Journal of proteomics* 75, 3877-3885
- (11) Hayakawa, E., Landuyt, B., Baggerman, G., Cuyvers, R., Lavigne, R., Luyten, W., and Schoofs, L. (2013) Peptidomic analysis of human reflex tear fluid. *Peptides* 42, 63-69
- (12) Thomas, S., Karnik, S., Barai, R. S., Jayaraman, V. K., and Idicula-Thomas, S. (2010) CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic acids research* 38, D774-780.

7. Eskerrak eta oharrak

- Lan hau burutzeko ondoko erakundeek laguntza jaso dugu: Eusko Jaurlaritza, Bizkaiko Foru Aldundia, ProteoRed-ISCIH eta CIBERehd.