

NOTA BREVE

DETECCIÓN DE FORMACIÓN DE IMIDAS EN PÉPTIDOS SINTÉTICOS
POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

*Julio C. Calvo, Fanny Guzmán, Martha P. Alba, Elizabeth Torres, Magnolia Vanegas,
Mary Trujillo, Manuel E. Patarroyo**

Recibido Junio 21/99 – Aprobado Diciembre 10/99

Keywords: Imide formation, aspartimide, glutamimide, mass spectrometry, matrix-assisted laser desorption, MALDI-TOF.

RESUMEN

La formación de aspartimida en la síntesis de péptidos en fase sólida es quizás uno de los ejemplos característicos de reacciones no deseadas dependientes de la secuencia. La ciclización y subsecuente formación de imidas a partir de ácido aspártico y de de ácido glutámico fue observada en el estudio de un conjunto de péptidos análogos de glicina por espectrometría de masas con ionización por desorción de láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). En nuestro estudio, se observó que la secuencia Glu-Gly tiene una probabilidad similar de formar imidas a la observada para la secuencia Asp-Gly.

ABSTRACT

Formation of aspartimide in solid phase peptide synthesis is perhaps one of the most characteristic examples of sequence dependent undesirable processes. Cycli-

zation and subsequent formation of imides from aspartic acid and glutamic acid were observed in the study of a set of glycine-analogue peptides by matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. In our study we observed that the sequence Glu-Gly has a similar probability for imide formation as observed in the sequence Asp-Gly.

INTRODUCCIÓN

La espectrometría de masas es una técnica complementaria que ayuda en la identificación y caracterización de una gran variedad de compuestos. Desde su descripción por Karas et al. (1) y Tanaka et al. (2), la espectrometría de masas con ionización por desorción de láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) ha encontrado muchas aplicaciones en el campo de péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. En el método de ionización MALDI se deposita una gran cantidad de energía resonante dentro de la matriz, la cual se desorbe de la superficie del disco portamuestra y se fragmenta, mientras el analito es arrastrado

* Instituto de Inmunología, Hospital San Juan de Dios, Universidad Nacional de Colombia, Av. 1 No. 10-01, Santafé de Bogotá, Colombia.

dentro de la matriz desorbida y ionizado a través de una transferencia protónica de la matriz, por mecanismos aún desconocidos (3). La razón masa a carga (m/z) de la partícula ionizada es medida en el analizador de tiempo de vuelo (TOF) en función de su velocidad, después de ser acelerada por un campo eléctrico.

Un problema en la síntesis de péptidos que contienen ácido aspártico es la formación de aspartimida bajo condiciones ácidas ó básicas (4-5). La subsiguiente apertura del anillo α -amino-succinimida de cinco átomos por soluciones básicas acuosas da como resultado un isómero erróneo que contiene un enlace β -amido

duos 341-360), VANAKTVNFDDLDGLYT-DAEE y de sus análogos de glicina. Los péptidos análogos fueron diseñados reemplazando cada vez un aminoácido de la secuencia original por glicina. En este análisis se tomó como referencia $[M+H-18]^+$, para indicar una deshidratación posiblemente debida a la formación de anillos tipo imida.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparación de las muestras de péptido. Los péptidos fueron sintetizados por la metodología de síntesis en fase sólida propuesta por Merrifield (7), por estrategia de síntesis t-Boc, aplicando la tecno-

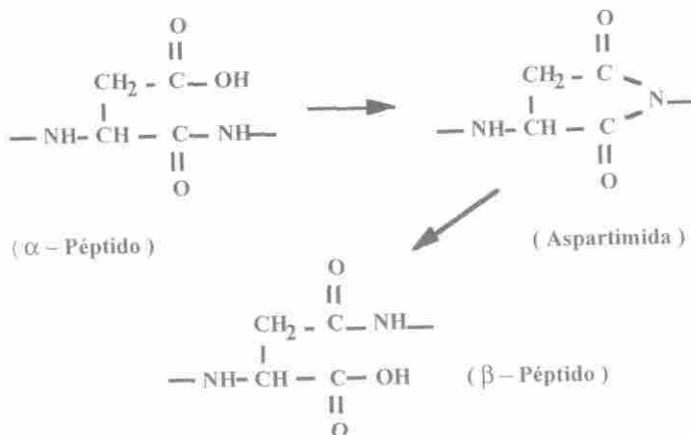


Figura 1. Formación de aspartimida y rearrreglo de péptidos α -, β -aspartilo.

(figura 1). Esta reacción secundaria es crítica especialmente en secuencias tales como Asp-Gly, Asp-Ser, Asp-His, cuando están protegidas con grupos bencilo, los cuales permiten la producción extensiva de imidas (4-6). En este trabajo, se hace un análisis en los productos crudos por la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF del péptido I686 de la proteína PV200 de *Plasmodium vivax* (resi-

logía de síntesis múltiple de péptidos de Houghten (8), sobre una resina amida MBHA (Orpegen-Pharma, Heidelberg, Alemania). La desprotección de las cadenas laterales y la liberación del péptido de la resina se llevó a cabo usando el procedimiento de baja y alta concentración de fluoruro de hidrógeno (9). De cada uno de los péptidos crudos se preparó una solución (0.2 mg/mL TA, ≈ 100 pmol / μL

TA; TA = 0.1% TFA en agua/acetonitrilo 2:1). Aparte se preparó una solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CCA) en TA, el cual actuó como matriz para el análisis de masas. De cada solución de péptido se tomaron 2 μ L y se diluyeron con 18 μ L de la solución de matriz para obtener una concentración de 10 pmol / μ L. De estas últimas mezclas se aplicó 1 μ L (10 pmol) por pozo en un disco portamuestra y se dejó secar al aire.

Espectrometría de masas MALDI-TOF. Los espectros de masas fueron tomados en el modo reflector en un espectrómetro de masas Protein-TOF (Bruker, Billerica, MA, USA). Este instrumento usa un láser de nitrógeno a una longitud de onda de 337 nm con pulsos de una duración de 3 ns. El voltaje de aceleración usado fué de -17.5 kV y el voltaje del reflector de +20 kV. Todos los espectros fueron obtenidos adicionando los datos de 10 - 20 pulsos de láser para obtener condiciones comparables. La potencia del laser fue la mínima posible, utilizando atenuaciones entre 30 y 60 en la escala instrumental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros de masas de los péptidos analizados muestran una especie $[M+H]^+$ predominante que corresponde a la masa molecular M del péptido y otros picos que corresponden a las especies $[M+H-18]^+$ y $[M+H-36]^+$, que indican la pérdida de 1 y 2 moléculas de agua respectivamente, debido a deshidrataciones de los aminoácidos (figura 2). El péptido original 1686 presenta la secuencia DG (Asp-Gly), la cual es crítica en la formación de la imida del ácido aspártico. El espectro del péptido

1686 (figura 2-a) muestra un pico de gran intensidad cuya masa (calculada / encontrada) corresponde a la de la especie intacta $[M+H]^+$ (2185.5 Da / 2186.0 Da \pm 1.4 u) y un segundo pico de intensidad fuerte en $[M+H-18]^+$ (2168.3 Da \pm 1.4 u). El espectro del péptido análogo 11 (figura 2-b), que contiene la secuencia DGDG (Asp-Gly-Asp-Gly) presenta tres picos: dos de muy fuerte intensidad en $[M+H]^+$ (2127.0 Da \pm 1.4 u) y en $[M+H-18]^+$ (2109.1 Da \pm 1.4 u), y un tercer pico de pequeña intensidad en $[M+H-36]^+$ (2091.6 Da \pm 1.4 u). El espectro del péptido análogo 12 (figura 2-c), en el cual se ha reemplazado en su secuencia el DG por GG (Gly-Gly), presenta solo el pico correspondiente a $[M+H]^+$ (2125.5 Da \pm 1.4 u). El espectro del péptido análogo 19 (figura 2-d), que contiene en su secuencia DG (Asp-Gly) y EG (Glu-Gly), presenta un comportamiento similar al del péptido análogo 11 con picos en $[M+H]^+$ (2112.7 Da \pm 1.4 u), $[M+H-18]^+$ (2094.8 Da \pm 1.4 u) y $[M+H-36]^+$ (2077.1 Da \pm 1.4 u). En la tabla 1 se presenta un resumen de la secuencia de espectros de masas de los péptidos de la serie observada por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Analizando los datos de la tabla 1, se puede observar la aparición de una especie de masa $[M+H-18]^+$, la cual se incrementa en intensidad en los análogos 11 (-DGDG-), 17 (-DG---DG-) y 19 (-DG---EG), y no existe en el análogo 12 (-GG-). La aparición del pico en $[M+H-18]^+$ debe corresponder a la formación de las imidas de los ácidos aspártico y glutámico cuando están seguidos de una glicina en su secuencia. El pico en $[M+H-36]^+$ nos indica la presencia de una pequeña población de moléculas que

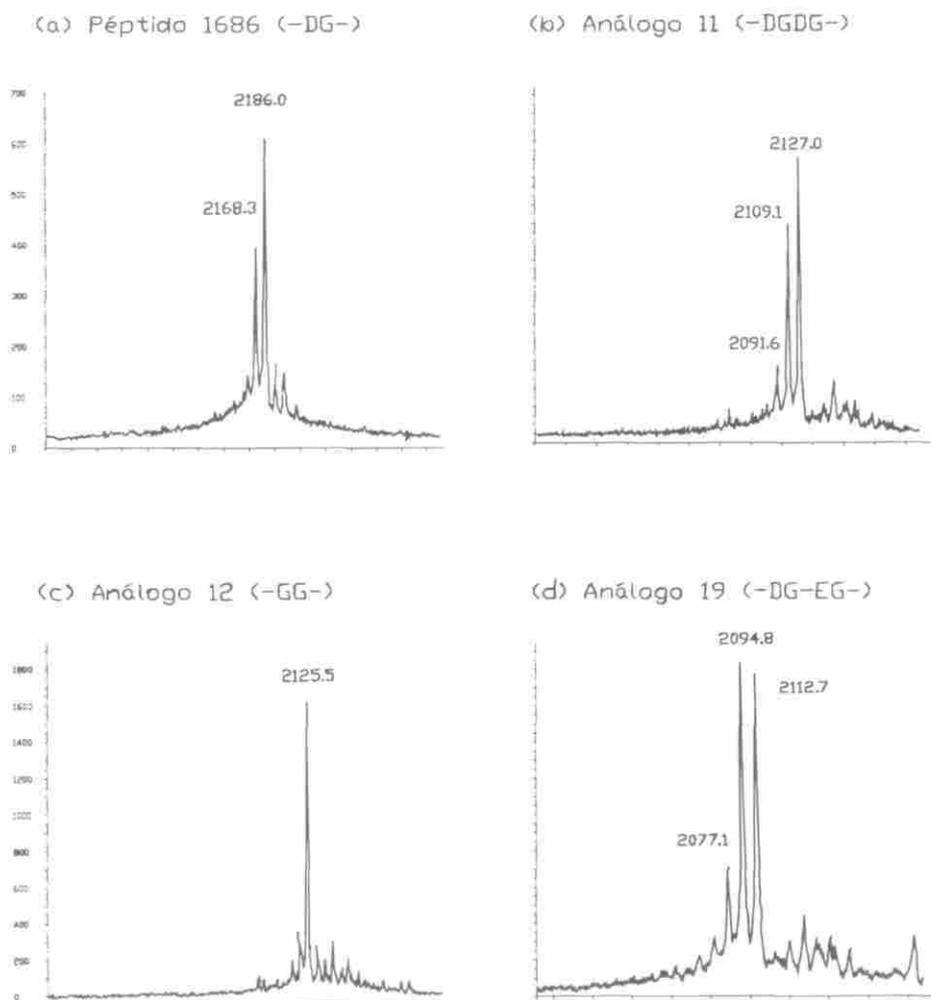


Figura 2. Espectros de masas MALDI-TOF de los péptidos: 1686 (fig. 2-a), análogo 11 (fig. 2-b), análogo 12 (fig. 2-c) y análogo 19 (fig. 2-d).

contienen simultáneamente dos grupos imida, como es el caso del análogo 11 (-DGDG-), del análogo 17 (-DG---DG-) y del análogo 19 (-DG---EG).

En la estrategia t-Boc de síntesis de péptidos en fase sólida se ha encontrado

que la formación de la aspartimida no es solo dependiente de la naturaleza del grupo protector, sino que se produce también por acción del ácido (HF), usado en el desanclaje, sobre la cadena ya desprotegida. Esto ha llevado a implementar cambios en la metodología de desanclaje del

Tabla 1. Secuencia de los espectros de masas del péptido 1686 y de sus análogos de glicina. Señal muy fuerte + + + +; señal fuerte + + +; señal mediana + +; señal débil +.

Péptido	Secuencia	[M+H] ⁺	[M+H-18] ⁺	[M+H-36] ⁺
1686	VANAKTVNFDLDGLYDAEE	++++	+++	
Análogo 1	GANAKTVNFDLDGLYDAEE	++++	+++	
2	VGNAKTVNFDLDGLYDAEE	++++	+++	
3	VAGAKTVNFDLDGLYDAEE	++++	+++	
4	VANGKTVNFDLDGLYDAEE	++++	+++	
5	VANAGTVNFDLDGLYDAEE	++++	+++	
6	VANAKGVNFDLDGLYDAEE	++++	+++	
7	VANAKTGNFDLDGLYDAEE	++++	+++	
8	VANAKTVGFDDGLYDAEE	++++	+++	
9	VANAKTVNGDLDGLYDAEE	++++	+++	
10	VANAKTVNFGLDGLYDAEE	++++	+++	
11	VANAKTVNFDGDGLYDAEE	++++	+++	+
12	VANAKTVNFDLGGYDAEE	++++	+++	
13	VANAKTVNFDLDGGYDAEE	++++	+++	
14	VANAKTVNFDLDGLGDAEE	++++	+++	
15	VANAKTVNFDLDGLYGDAEE	++++	+++	
16	VANAKTVNFDLDGLYGAEE	++++	+++	
17	VANAKTVNFDLDGLYDGEE	++++	+++	+
18	VANAKTVNFDLDGLYDAGE	++++	+++	
19	VANAKTVNFDLDGLYDAEG	++++	++++	++

péptido para disminuir esta reacción secundaria.

En conclusión, si en una molécula existen dos puntos críticos para la formación de imidas, aumenta la probabilidad de formación de la imida, independientemente de que se trate de un Asp o de un Glu. La población de moléculas que contienen la imida se aumenta y esto se refleja en el aumento de la intensidad absoluta del pico $[M+H-18]^+$. Sin embargo, debe existir alguna probabilidad de que esta reacción se presente simultáneamente en los dos puntos críticos en la misma molécula, tal como se observa en los espectros de masas encontrados (pico de baja intensidad en $[M+H-36]^+$). Como consecuencia de lo observado, la secuencia EG

(Glu-Gly) también debe considerarse como un punto crítico para la formación de imidas y debe tenerse en cuenta su existencia para introducir los cambios necesarios en el desanclaje del péptido por la metodología de baja y alta concentración de HF.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresamos nuestra gratitud al Ministerio de Salud, República de Colombia, por la financiación de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Karas, M.; Hillenkamp, F. (1988), Laser desorption ionization of pro-

- teins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301.
2. Tanaka, T.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. (1988), Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2**, 151-153.
 3. Land, C.M.; Kinsel, G.R. (1999), Investigation of the mechanism of intracuster proton transfer from sinapinic acid to biomolecular analytes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, 1060-1067.
 4. Tam, J.P.; Riemen, M.W.; Merrifield, R.B. (1988), Mechanisms of aspartimide formation: the effects of protecting groups, acid, base, temperature and time. *Peptide Res.* **1**, 6-18.
 5. Nicolas, E.; Pedroso, E.; Giralt, E. (1989), Formation of aspartimide peptides in Asp-Gly sequences. *Tetrahedron Lett.* **30**, 497-500.
 6. Baba, T.; Sugiyama, H.; Seto, S. (1973), Rearrangement of α - to β -aspartyl peptide with anhydrous fluoride. *Chem. Pharm. Bull.* **21**, 207-209.
 7. Merrifield, R.B. (1963), Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154.
 8. Houghten, R.A. (1985), General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5131.
 9. Tam, J.P.; Heath, W.F.; Merrifield, R.B. (1983), SN^1 and SN^2 mechanism for the deprotection of synthetic peptides by hydrogen fluoride. Studies to minimize the tyrosine alkylation side reaction. *Int. J. Peptide Protein Res.* **21**, 57-65.