



Oddělení funkční genomiky a proteomiky

Přírodovědecká fakulta MU



CEITEC



# Charakterizace proteinů hmotnostní spektrometrií

Bi7050

Část III

Zbyněk Zdráhal

*Centrální laboratoř-Proteomika, CEITEC-MU  
Oddělení funkční genomiky a proteomiky, ÚEB PŘF*

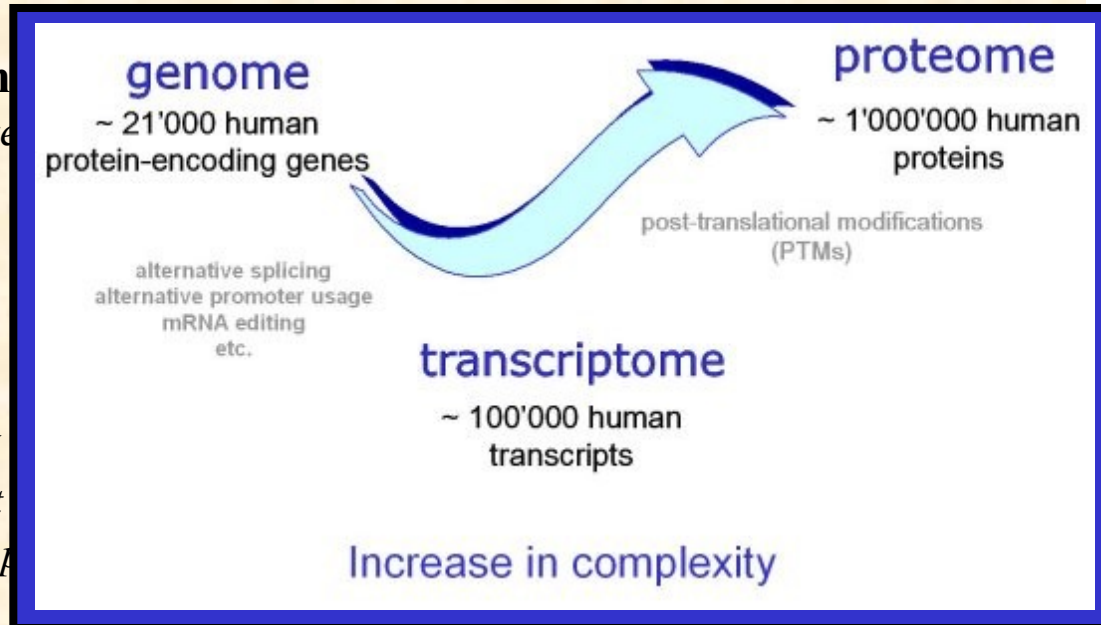
*[zdrahal@sci.muni.cz](mailto:zdrahal@sci.muni.cz)*

[www.sci.muni.cz/FGP](http://www.sci.muni.cz/FGP)





# Analýza proteomu



- **protein**  
*lidský ge*

- **široký**  
*nutnost*  
*reakce p*

- **široké spektrum fyzikálně-chemických vlastností**

- **analýza komplexů**

*pro úplné pochopení buněčných procesů mnohdy nestačí prostá identifikace jednotlivých proteinů, cca 80% je funkčních jako součást komplexů*

*n*  
[/hpi/hpi\\_desc.html](#)

*m okamžiku*

*oba PCR*

## Pečlivá příprava vzorku – základní kámen úspěchu

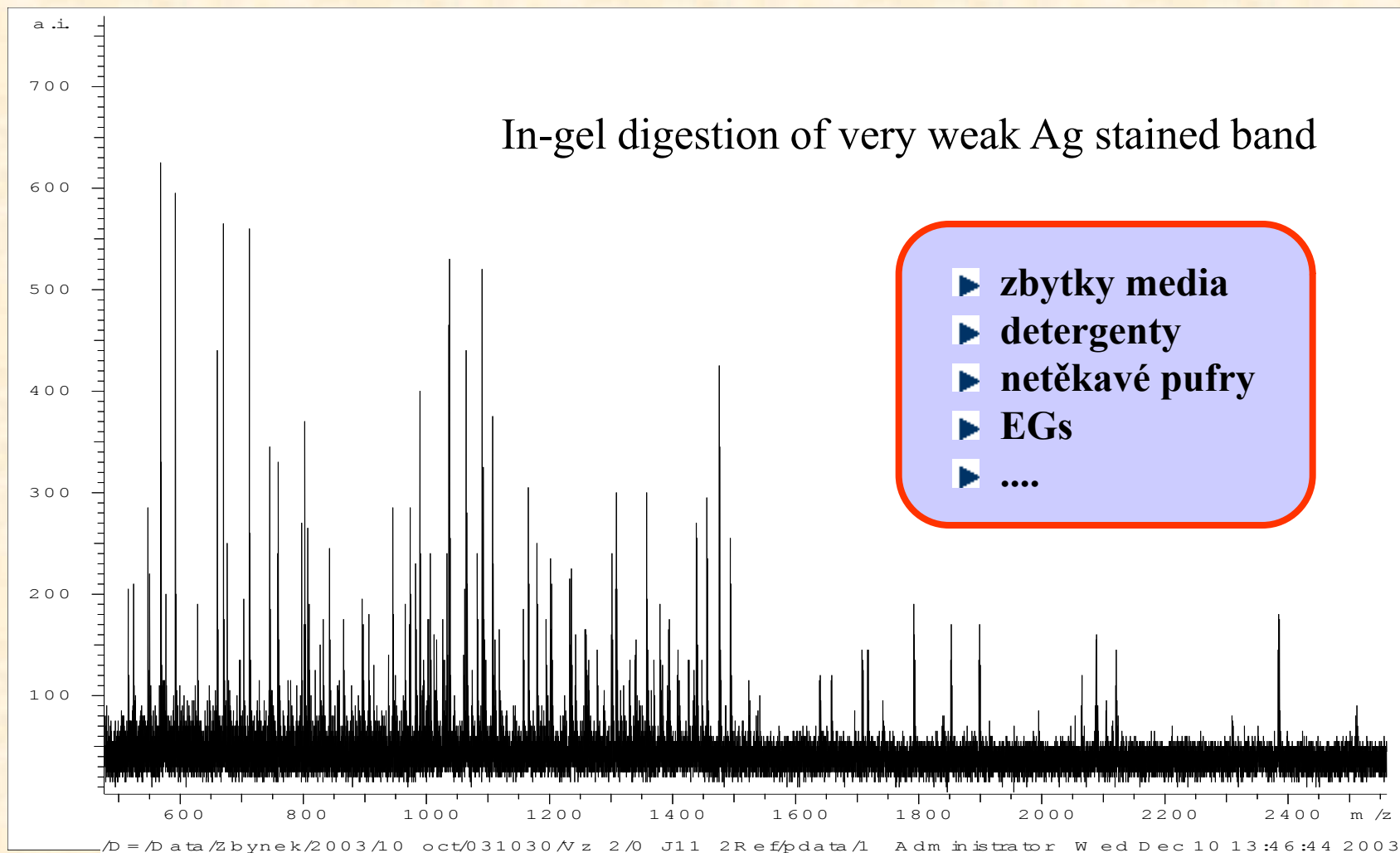


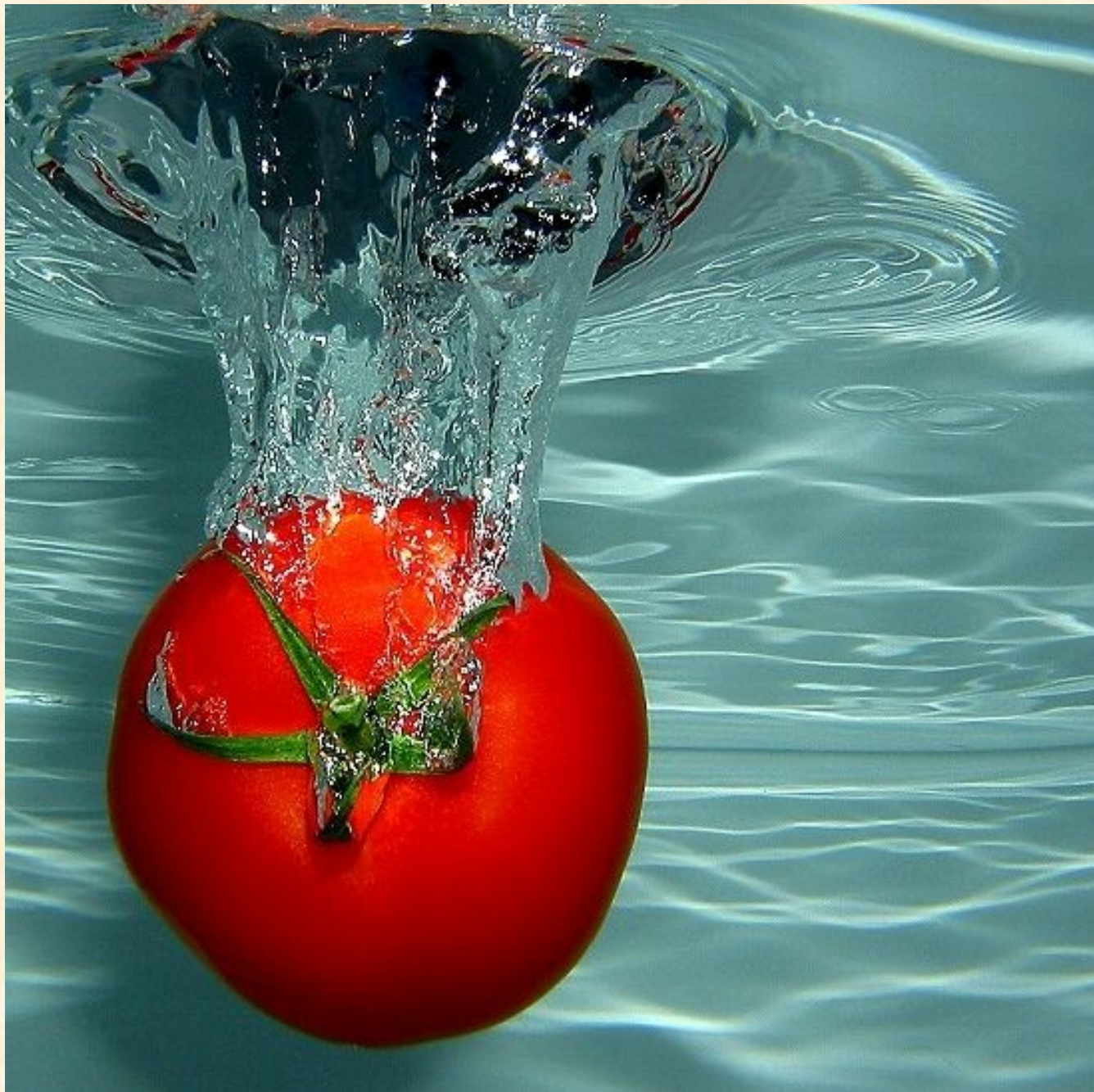
**zachování původního proteinového složení**  
**zachování modifikací (např. inhibitory fosfatáz)**

...

# Keratiny !!!

from skin, hair, nails, wollen clothes .... EVERYWHERE





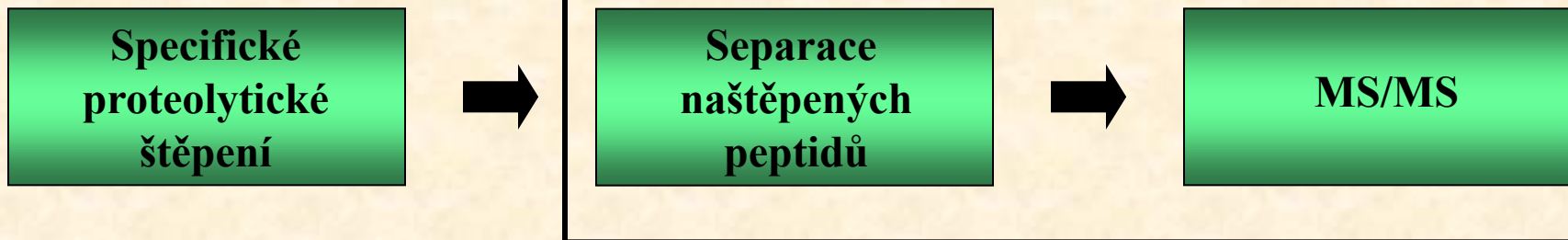
## Standardní 1-D postupy

### JEDNODUCHÉ SMĚSI

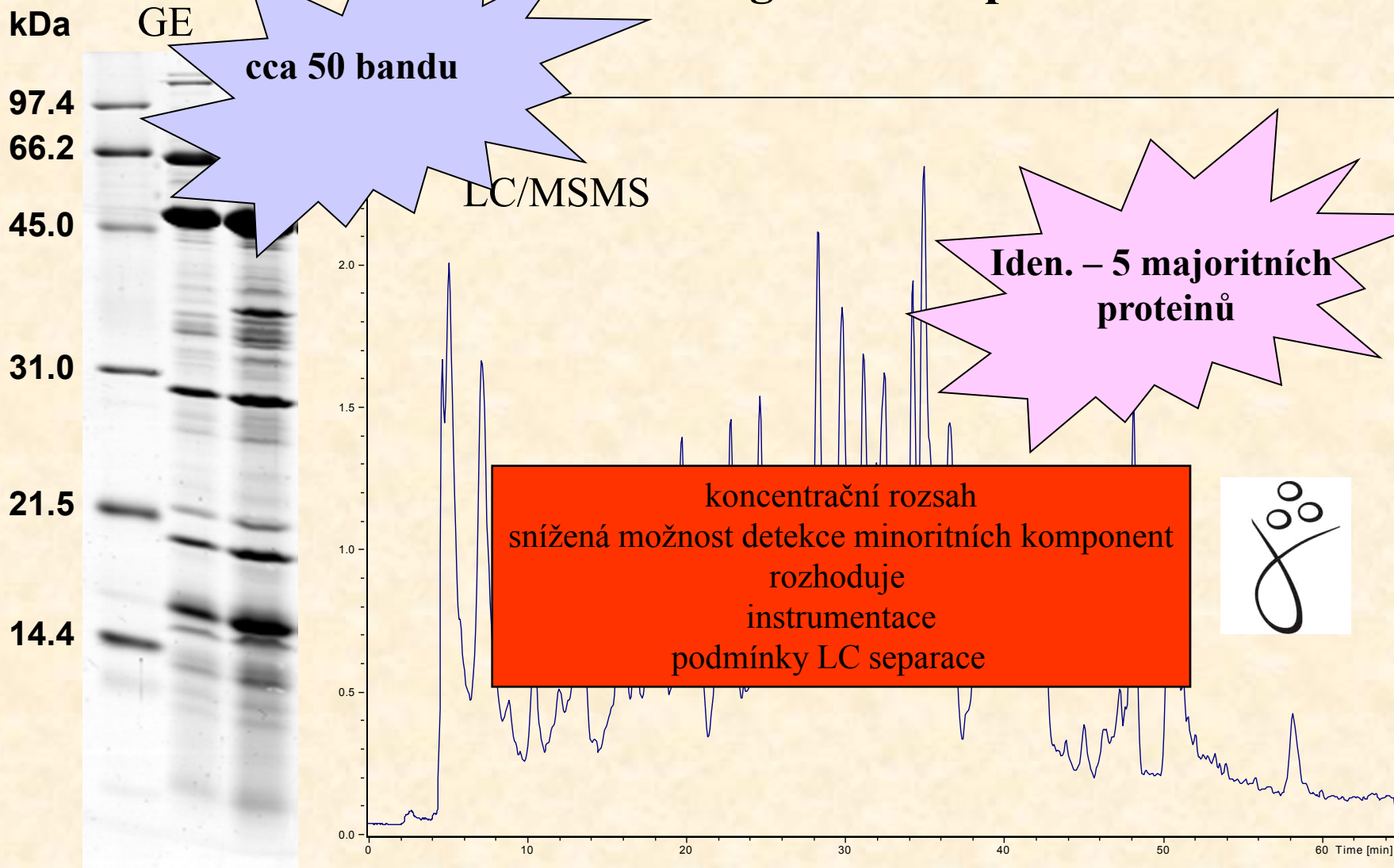
#### 1-D GE



#### 1-D LC-MS/MS shotgun proteomics



# Proteinový extrakt fága – 1-D separace









### Klasické 2-D postupy

2-D GE

Separace proteinů



Specifické proteolytické štěpení



MALDI-MS  
MALDI-MS/MS

LC-MS/MS

Specifické proteolytické štěpení



Separace naštěpených peptidů



MS/MS

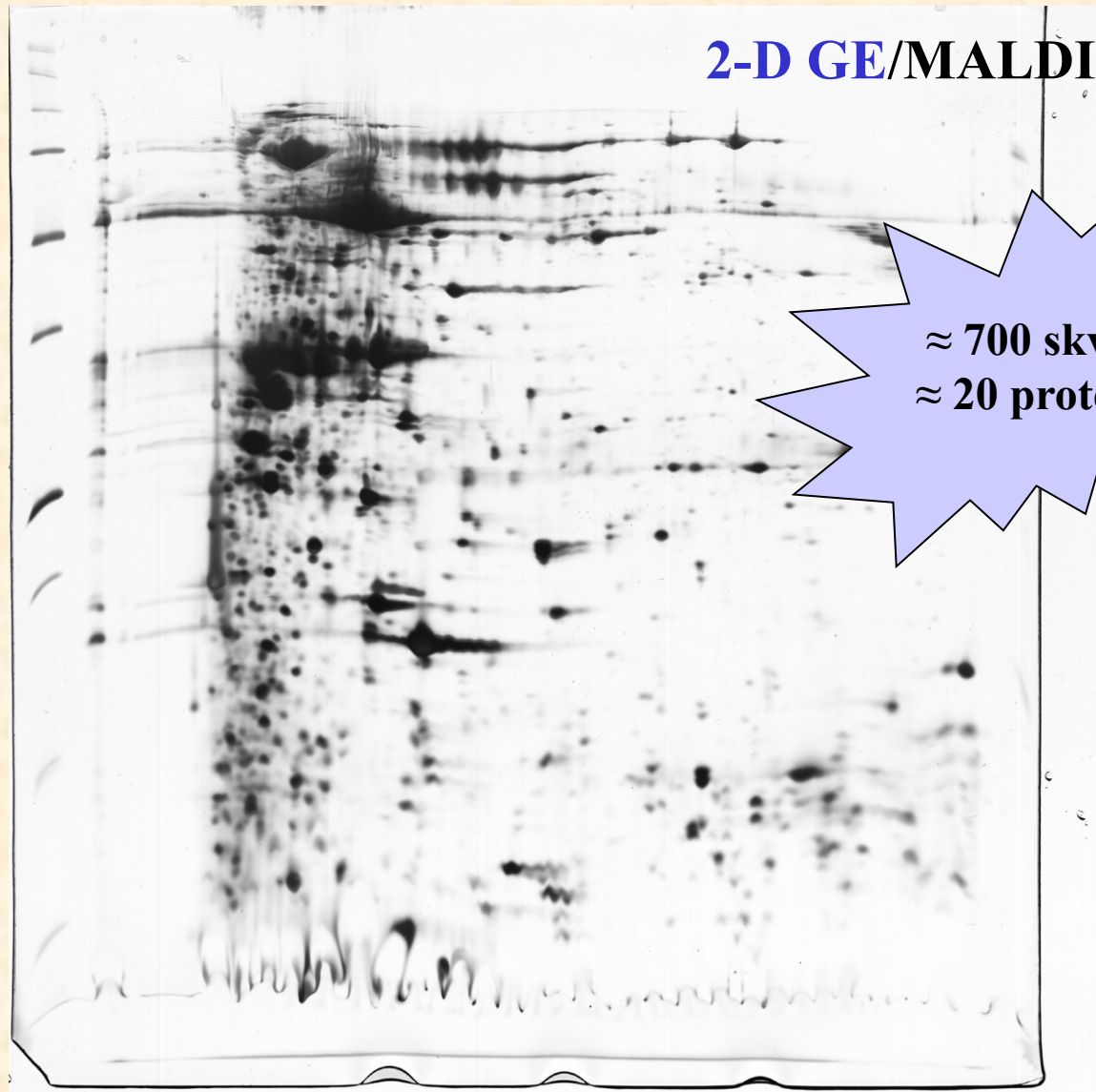
2-D LC-MS/MS

on-line/off-line

LC-MALDI

# Proteinový extrakt fága – 2-D separace

Bi7050



≈ 700 skvrn  
≈ 20 proteinů



2-D LC  
peptides

Protein mix



digesce

On-line ("MudPIT")

1D - SCX

frakcionace  
step by step

2D - RP

MS/MS



Off-line

1D - SCX

LC

UV

Peptide fraction



MS/MS

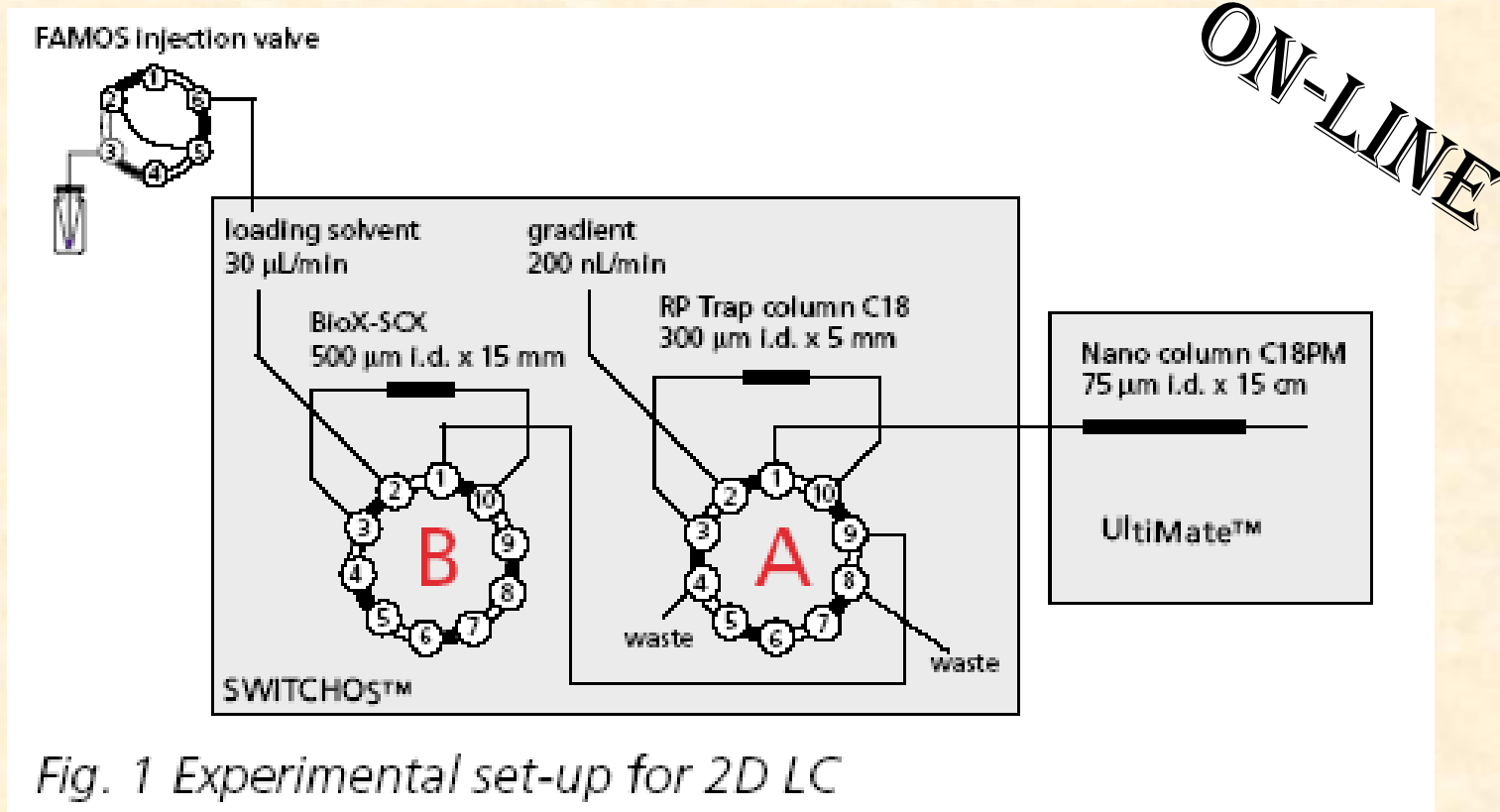
2D - RP

Peptide fraction

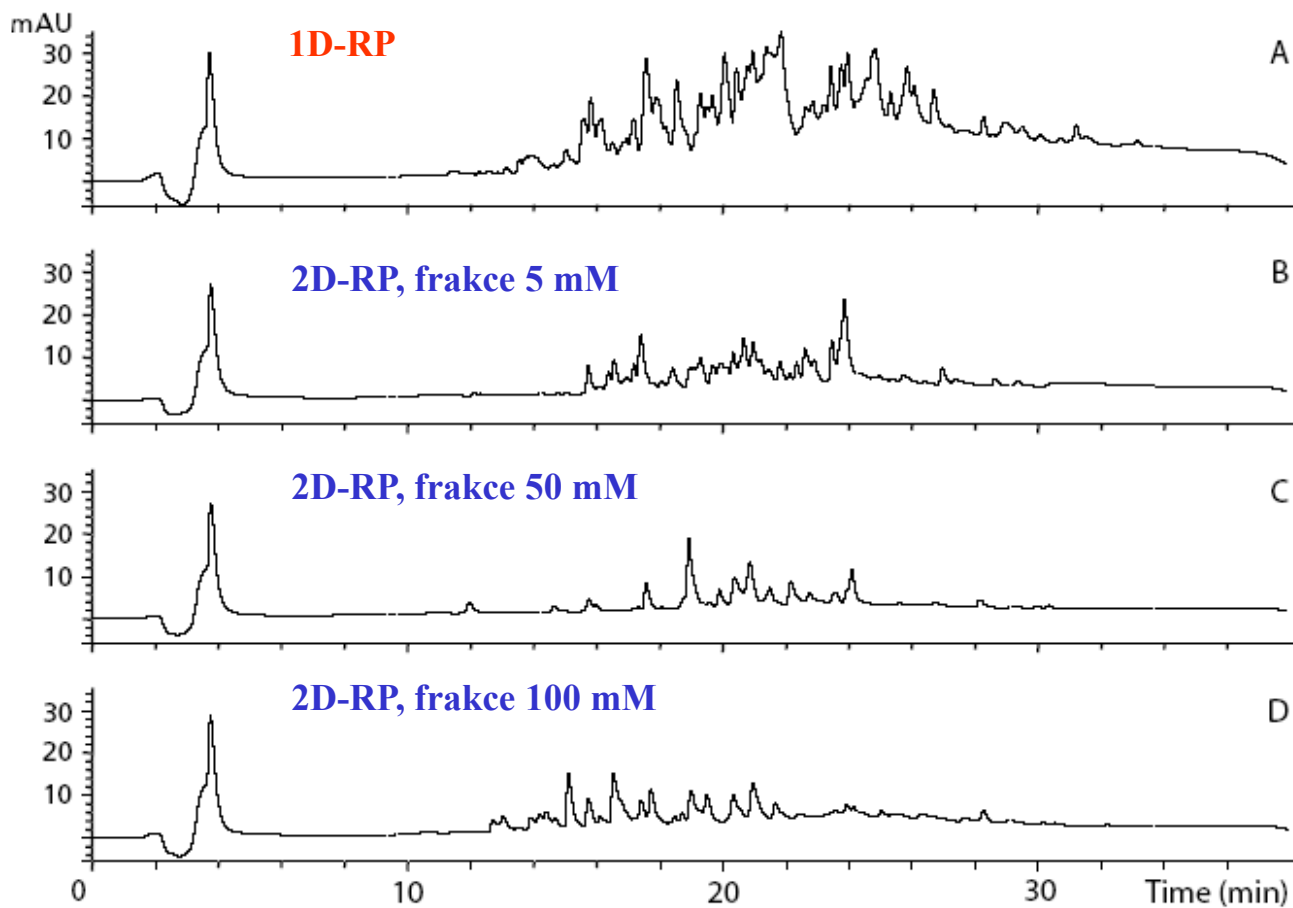


MudPIT (multidimensional protein identification technology)

## 2-D LC peptides



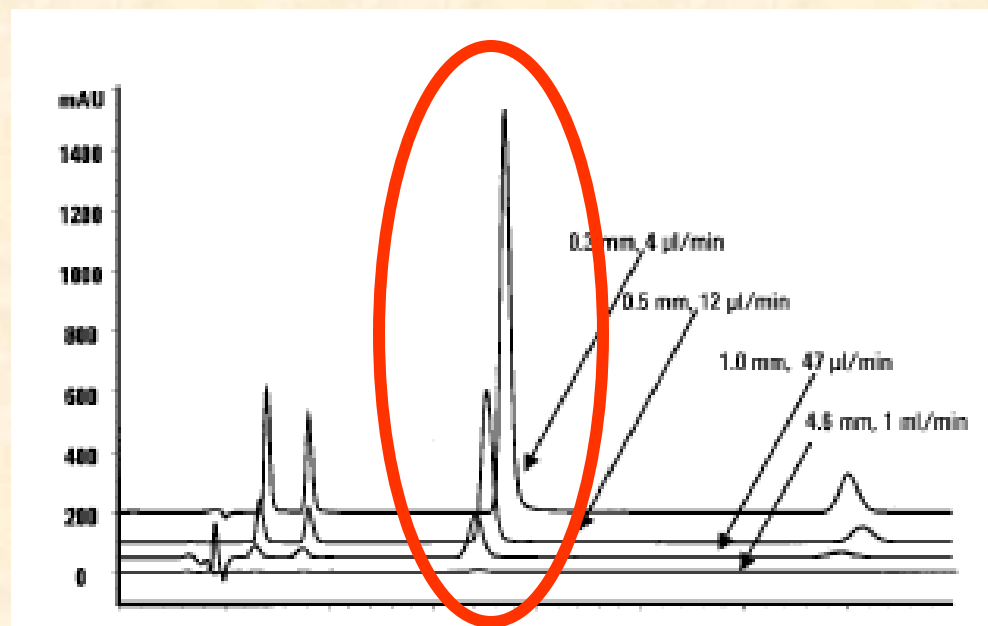
## 2-D LC (peptides)



ON-LINE

Fig. 2 Chromatograms of the digest mixture. Upper trace is the result of a separation without SCX. The next chromatograms are the result of the 5, 50 and 100 mM fractions. (Not all fractions are shown)

## Průměr HPLC kolony vs citlivost



**Figure 5** Mass sensitivity benefit. Injection of the same sample amount on HPLC columns with decreasing internal diameter. Stationary phase: ZORBAX® SB-C18; length: 150 mm; solvent: water/acetonitrile, 40/60; flow rate: see diagram; sample: isocratic checkout sample; injection volume: 0.1 µL; third peak: biphenyl, 200 ng; temperature: 25 °C; detection wavelength: 230 nm.

*„Sensitivity increases with a decrease in column diameter because the **same sample mass (amount)** is eluted in a smaller volume. Therefore the concentration of the eluting peak is higher and the detection signal is stronger.“*

**2-D LC**  
peptides

**sorbenty**

**1-D:**    **ionex**  
IMAC (fosfoproteiny)  
affinity (lectin – glyko)

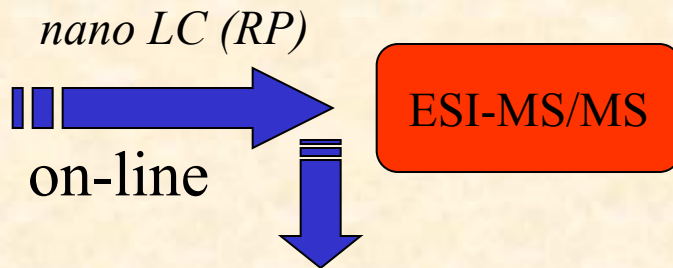
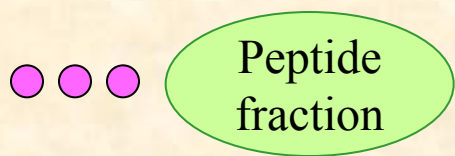
**2-D:**    **reverzní fáze**

**On-line vs Off-line**

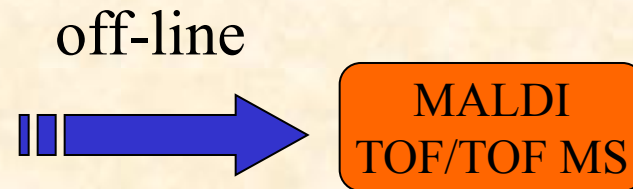
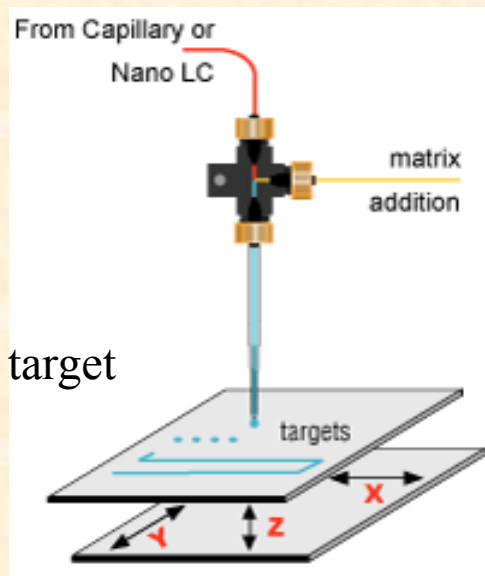
automatizace

flexibilita  
optimalizace  
kontinuální odběr frakcí

# LC -MALDI (peptides)



Depozice na MALDI target



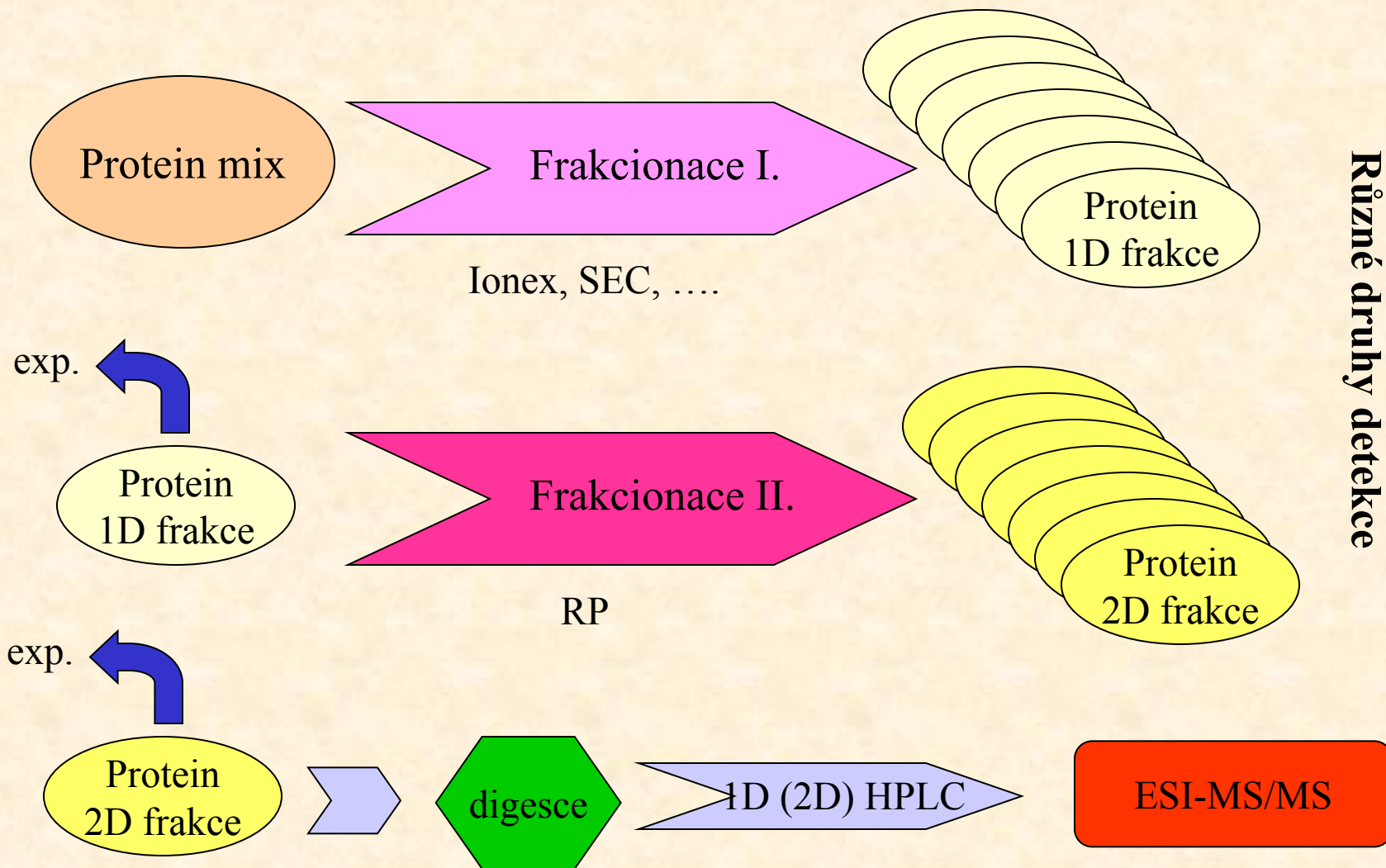
Archivace





# LC separace komplexních proteinových směsí

Bi7050



# LC separace komplexních proteinových směsí

Bi7050

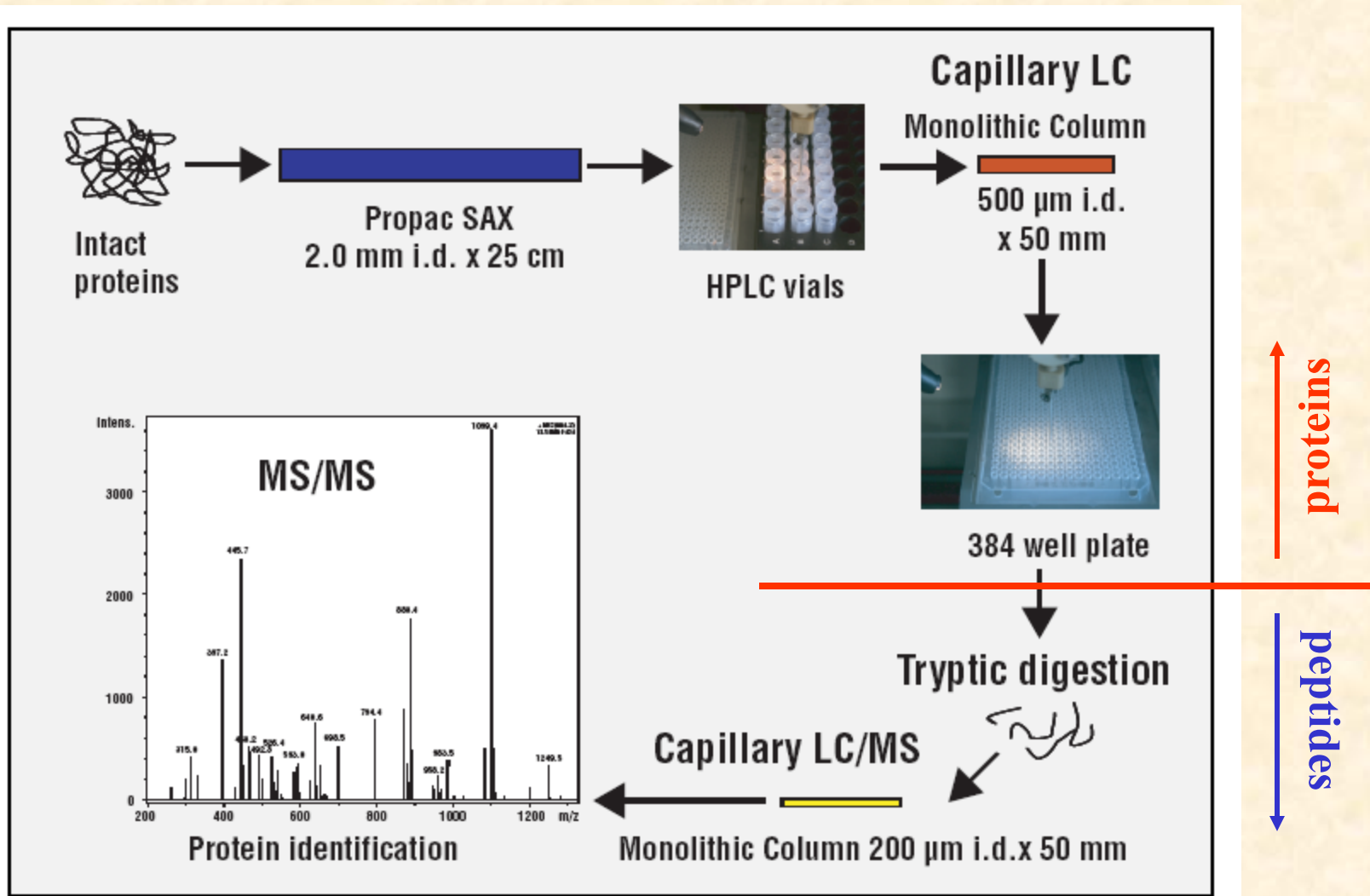
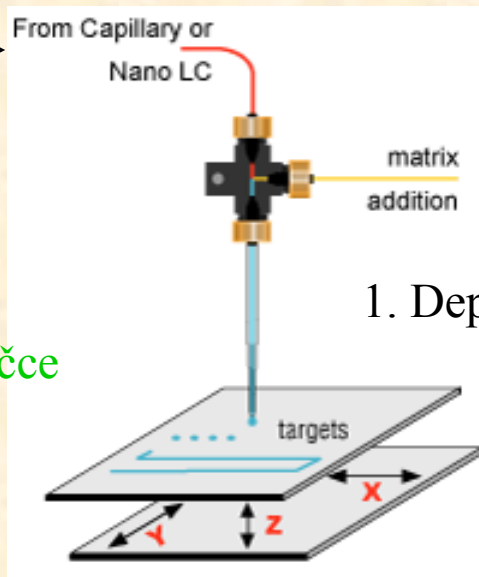


Figure 1: Multidimensional LC work flow.

# LC –MALDI (proteins)

Protein mix

(2-D) LC  
CE



1. Depozice na MALDI target

2. Digesce na destičce

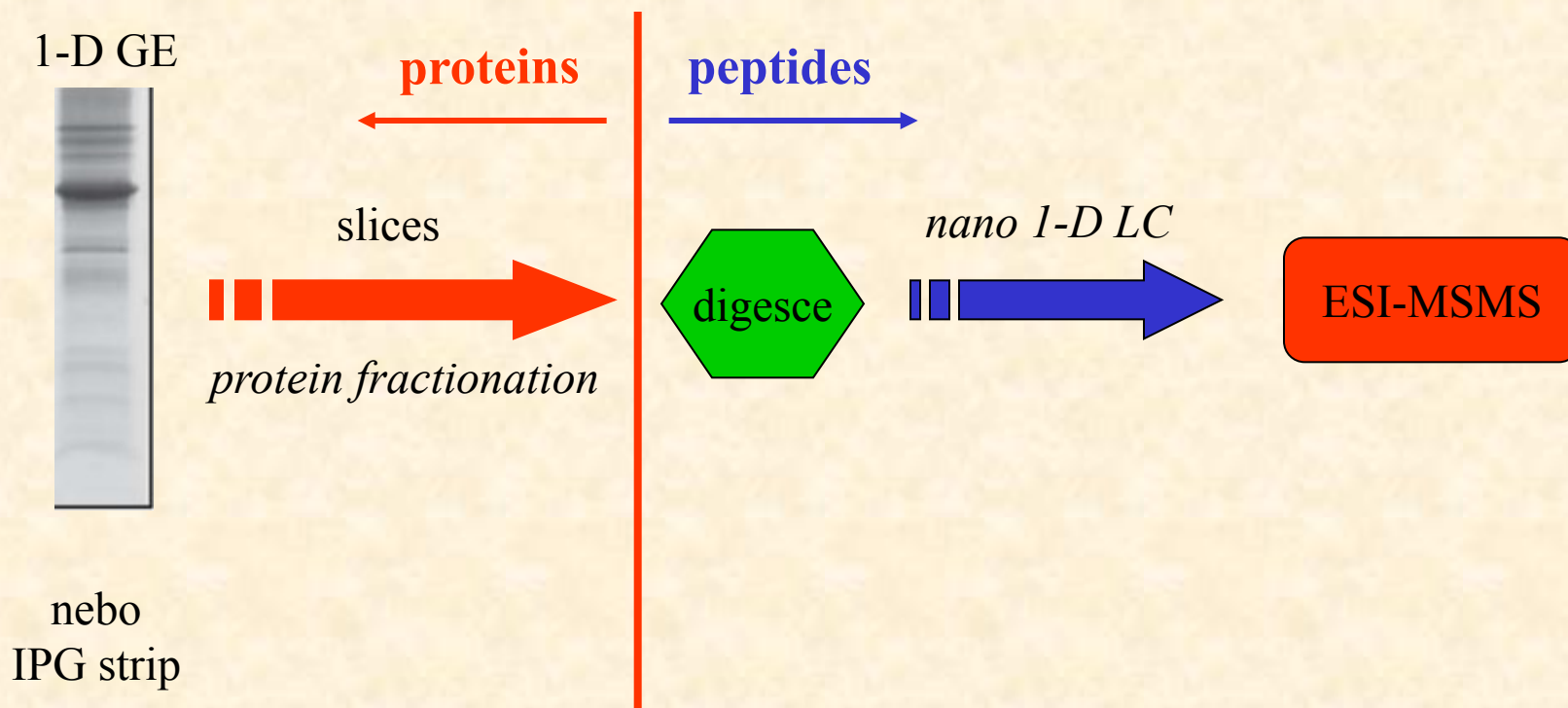
off-line

MALDI TOF/TOF

MALDI TOF/TOF

# Kombinace GE a HPLC separace

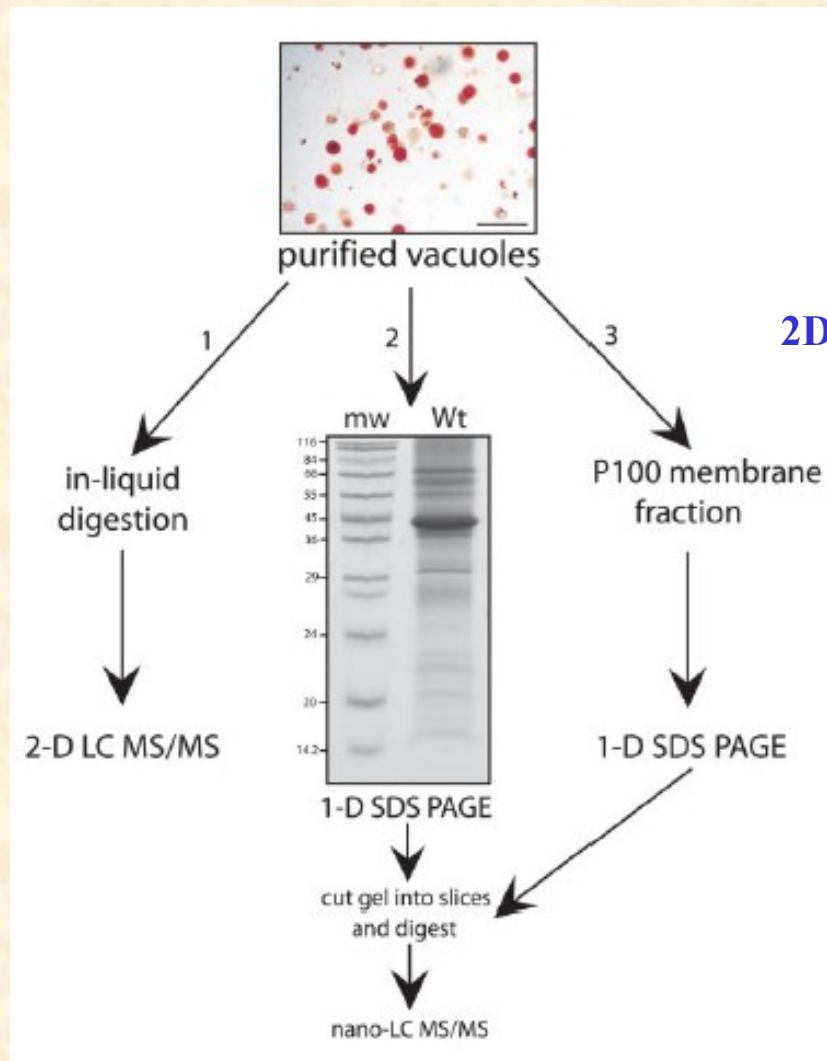
Bi7050



často používané pro analýzu proteinových komplexů

2D-On-line

2D-Off-line (3D ?)



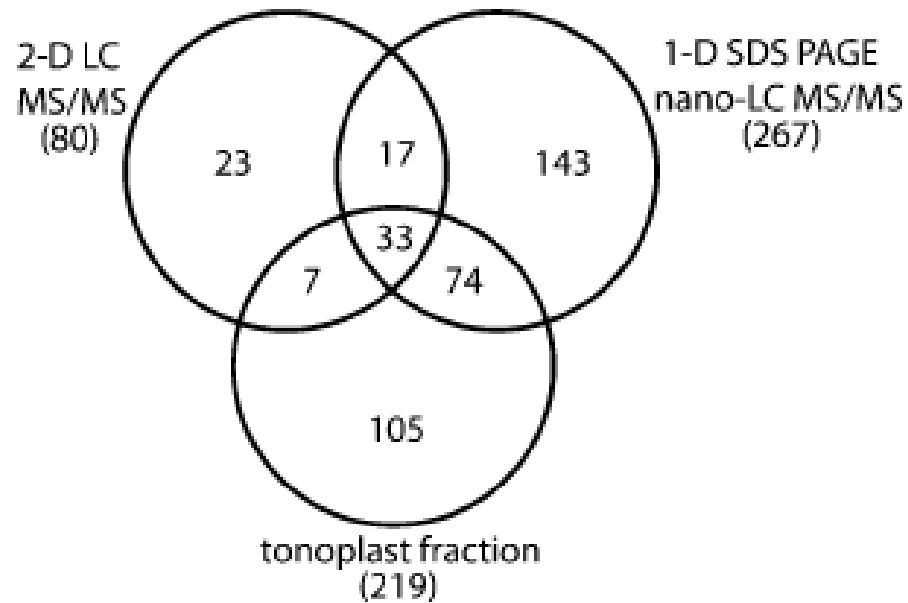


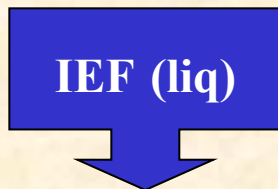
Figure 2. Distribution of Identified Proteins by Different Methods.

Overlap of the different protein sets is shown. Numbers in parentheses indicate the total number of proteins found by a particular method.

## Celková analýza proteomu (screening)

Depletovaná plazma  
(3500 – 9000 proteinů ??)

**0. rozměr**



**1. rozměr**

**20 frakcí**



**2. rozměr**

**1600 frakcí**

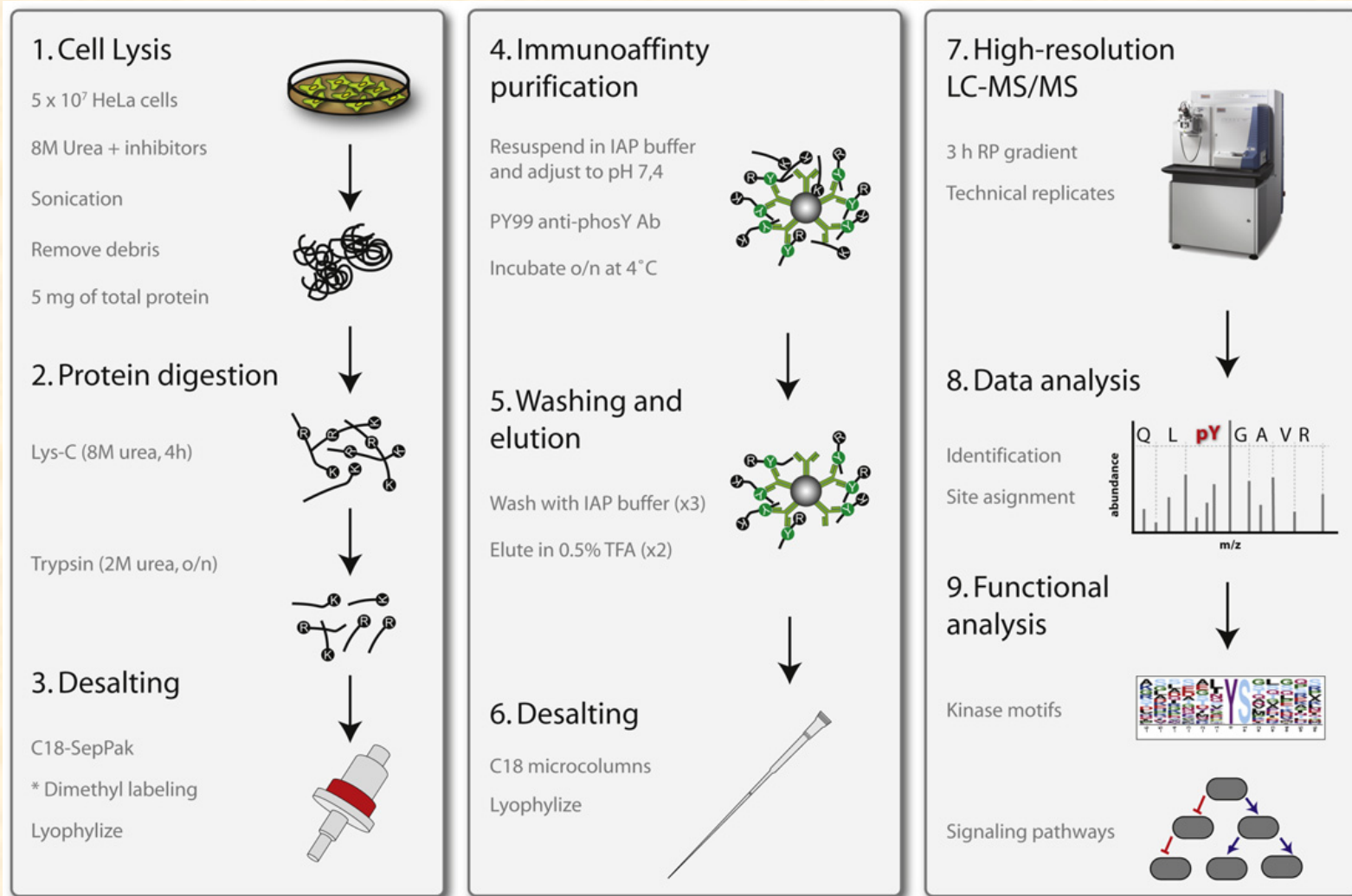


**3/4. rozměr**

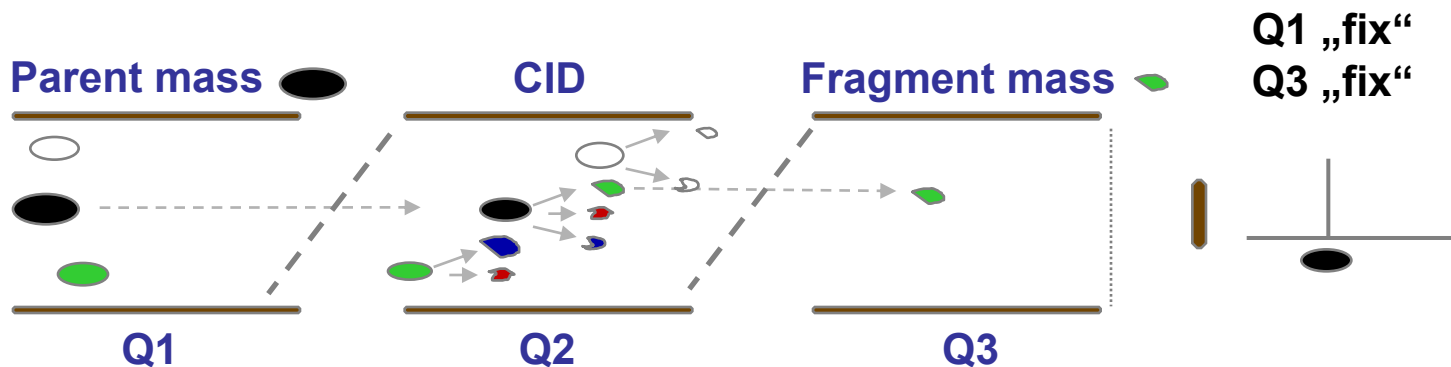
**∞ frakcí**



# Cílená analýza imunoafinitní frakcionace (Y(phos))



## Cílená analýza jednotlivých proteinů



- ✿ kvadrupol **Q1** i **Q3** jsou nastaveny na vybrané hodnoty  $m/z$  (prekurzoru a vybraného fragmentu), zaznamenány jsou jen prekurzory, z kterých při fragmentaci v kolizní cele **Q2** vzniká určený fragment
- ✿ během analýzy lze sledovat více reakcí (MRM)

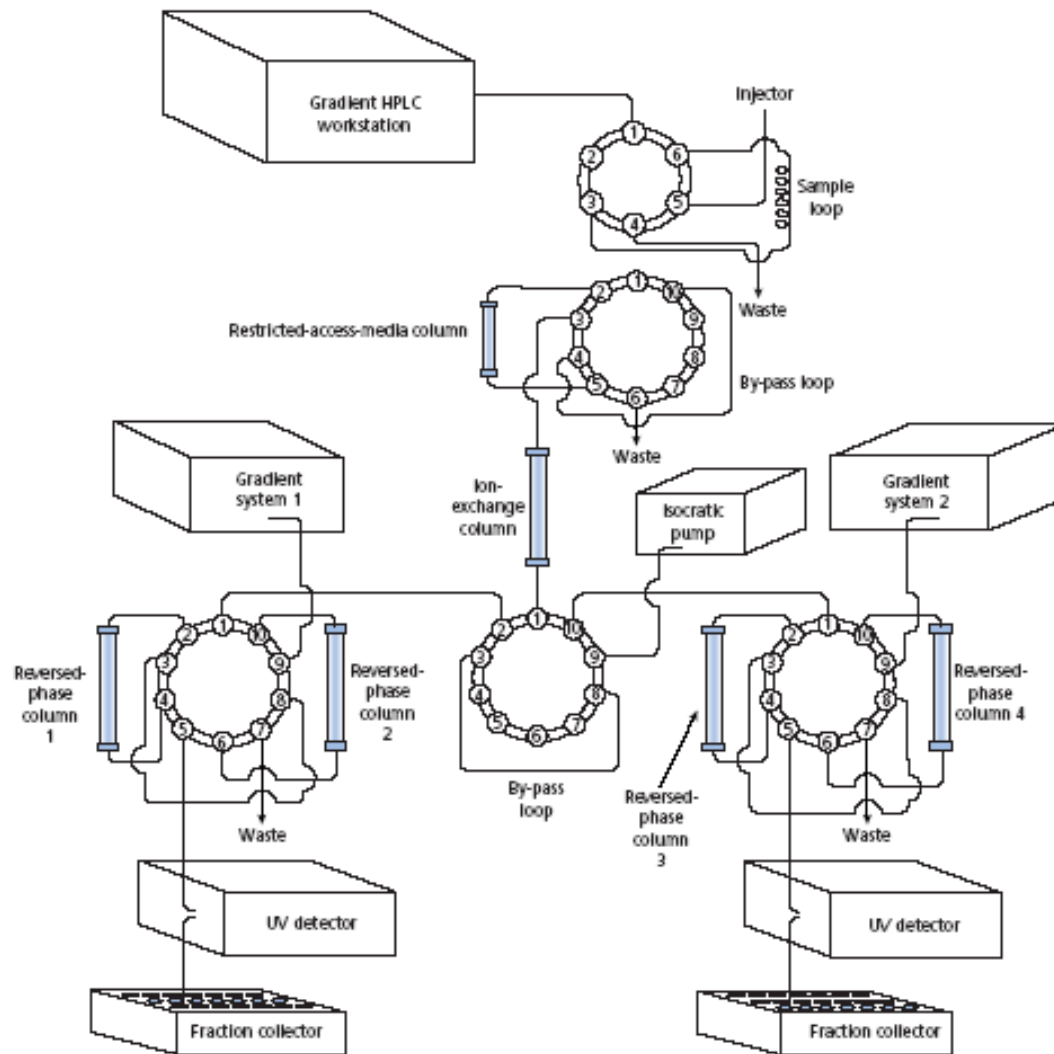


© 2000 [Signature]

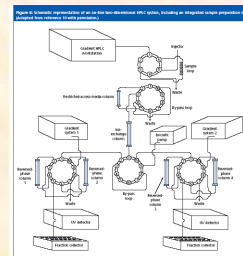
# High throughput

Bi7050

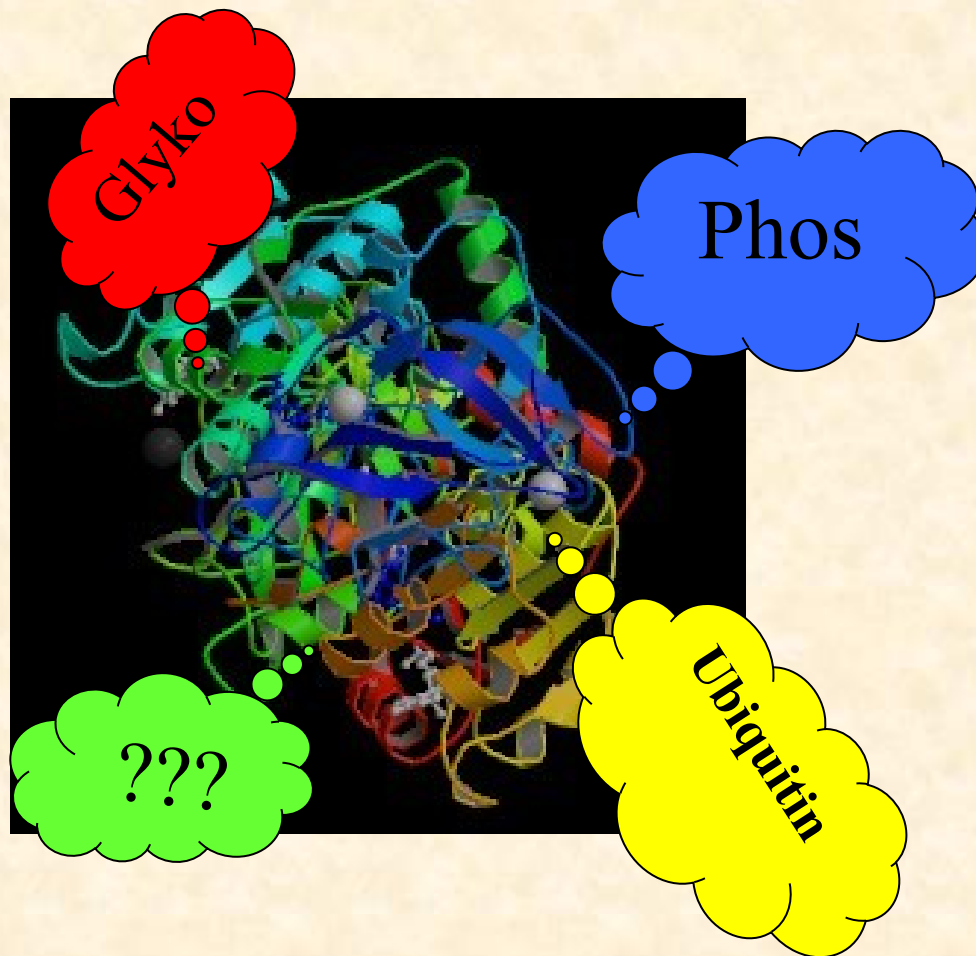
Figure 6: Schematic representation of an on-line two-dimensional HPLC system, including an integrated sample preparation step. (Adapted from reference 10 with permission.)



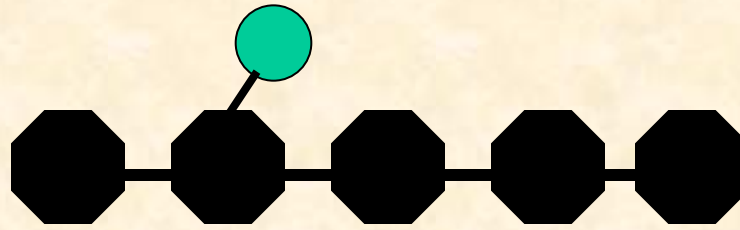
## + Miniaturizace - chip technologie



# MS CHARAKTERIZACE MODIFIKACÍ



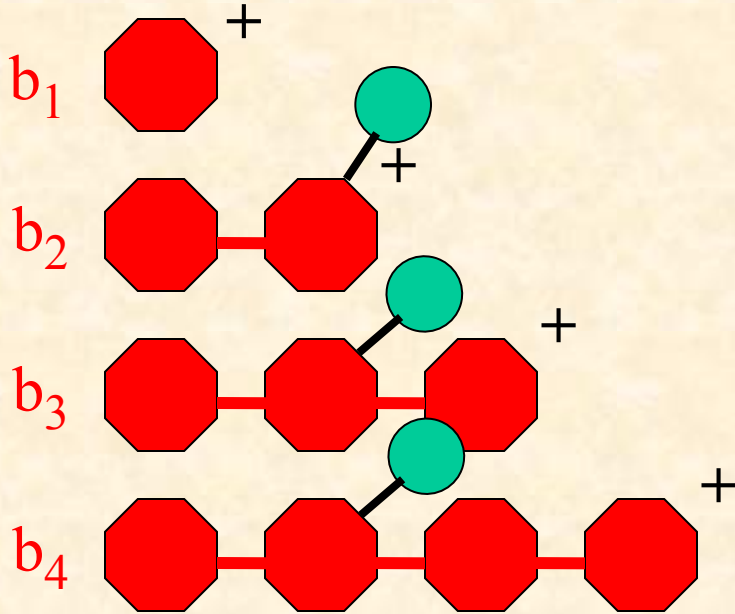
N-terminus



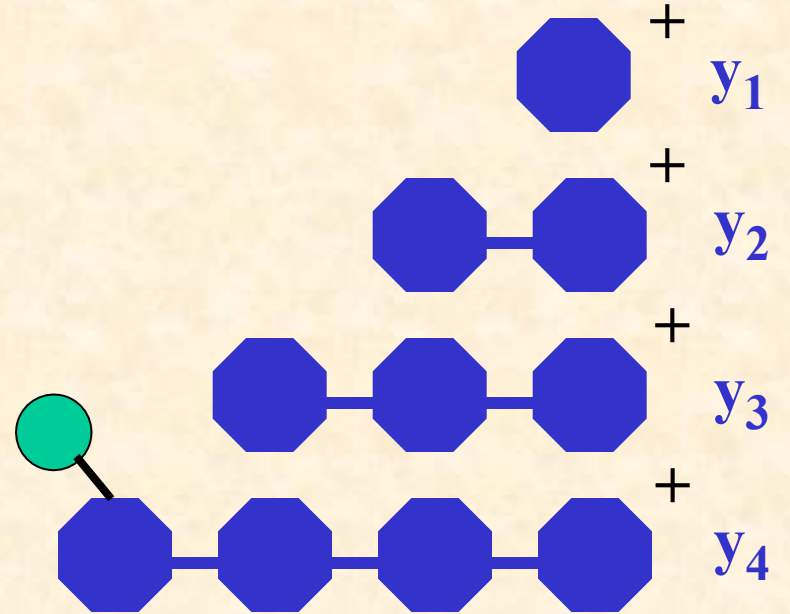
C-terminus



**b- ion serie**



**y- ion serie**

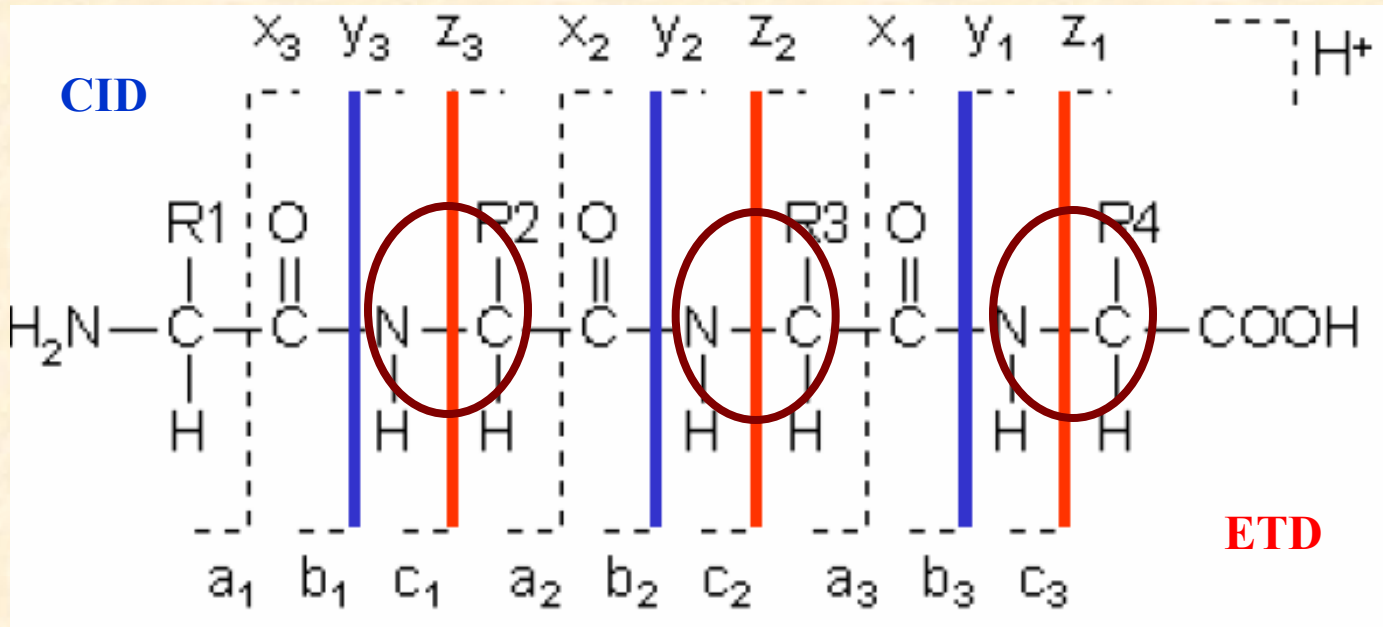


# Fragmentace peptidů – CID vs ETD

*b, y*

*c, z*

C-terminus (*z-serie*)



N-terminus (*c-serie*)



## Proč analýza modifikací proteinů?



### Možnosti MS při analýze modifikací

- Druh
- Místo
- Úroveň



*Druhy modifikací:*

➤ **mutace** (záměna AMK)

➤ **chemické**

➤ **posttranslační**

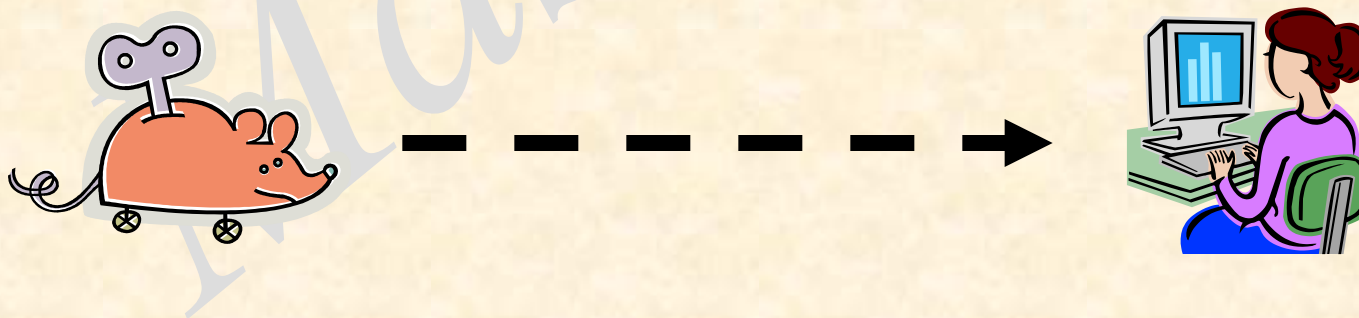
Užitečný přehled modifikací:

**DeltaMass** <http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home>

**ExpASy** - <http://www.expasy.ch/>

## „Chemické“ modifikace:

- ❑ **záměrné modifikace** (*karbamidometylace Cys, N-terminal acetylace, PSD derivatizace, kvantifikační značky aj.*)
- ❑ **nechtěné modifikace** (*oxidace Met, deamidace N → D při purifikaci, adukty farmak*)



## Common Posttranslational Modifications

**Bi7050**

<b>Amines (K/N-terminus)</b>	Methylation	+14.0269	Formylation	+28.0104
	Acetylation	+42.0373	Lipoic acid	+188.3147
	Farnesylation	+204.3556	Myristoylation	+210.3598
	Biotinylation	+226.2994	Palmitoylation	+238.4136
	Stearoylation	+266.4674	Geranylgeranylation	+272.4741
<b>Acids &amp; amides (E/D/Q/N)</b>	Pyroglutamic acid (Q)	-17.0306	Deamidation (Q/N)	+0.9847
	Carboxylation (E/D)	+44.0098		
<b>Hydroxyl groups (S/T/Y)</b>	<b>Phosphorylation</b>	+79.9799	Sulphation	+80.0642
<b>Carbohydrates (S/T/N)</b>	Pentoses	+132.1161	Deoxyhexoses	+146.1430
	Hexosamines	+161.1577	Hexoses	+162.1424
	N-acetylhexosamines	+203.1950	Sialic acid	+291.2579

*Další detaily:* <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/protein-modifications.html>

# **MS CHARAKTERIZACE MUTACÍ**

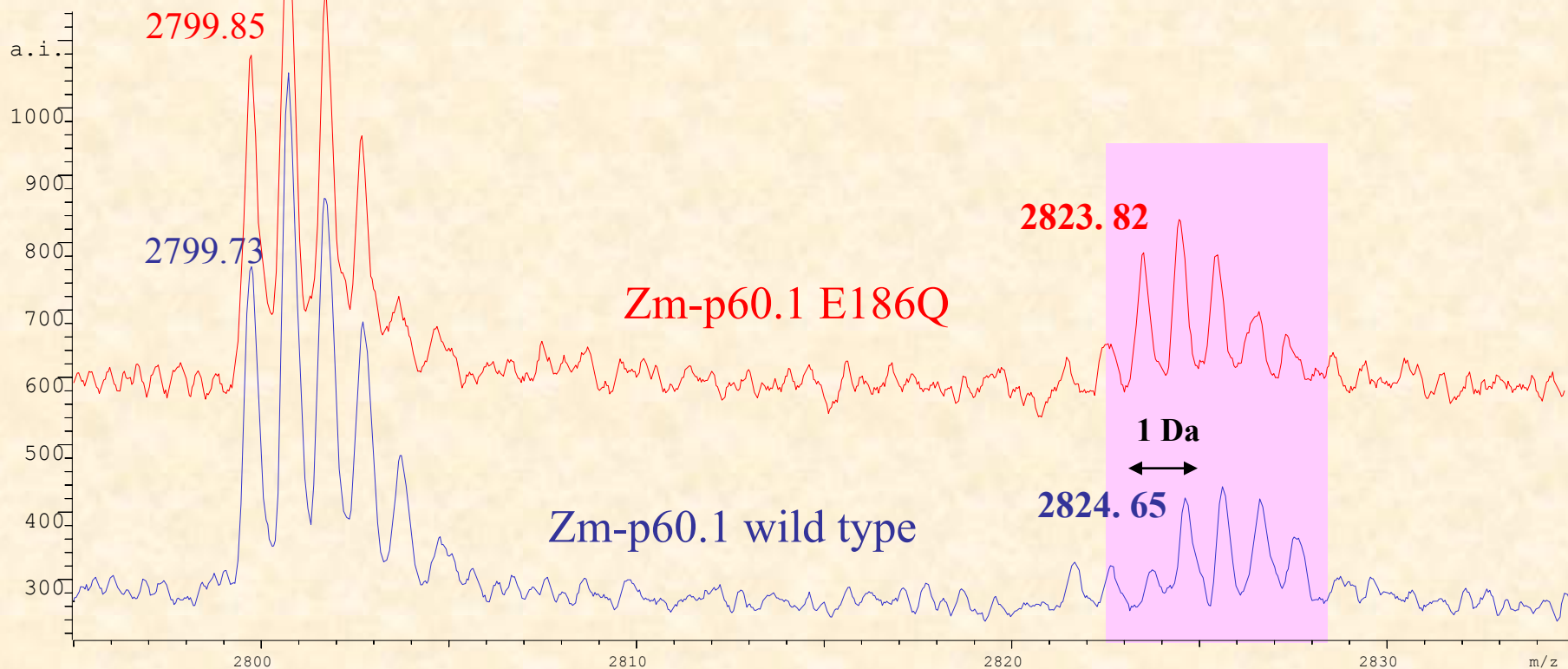
# Potvrzení výměny AMK na peptidové úrovni

Protein: Zm-p60 (pozice 186)

wild type 179 - 203 **NWLTFNEPQTFTSFSYGTGVFAPGR** 2824  
**E186Q** **Q** **2823**

peptide mass difference: - 1 Da

In-gel digesce  
MALDI-TOF MS



## Identifikace výměny AMK na aminokyselinové úrovni

Protein ve dvou variantách v jednom spotu na 2-D gelu

*Vstupní informace:*

Změna hmotnosti tryptického peptidu: **-14 Da**

...

DEEELQKENVKNTASLTGKITLSVTQSKPETGEVIGVFESIQPSDTDLGAKVPKDVKIQG

...

MALDI-MS potvrzení změny hmotnosti daného peptidu (2 proteázy)  
MALDI-PSD nejednoznačné výsledky

LC-MSMS nalezena mutace D/E v pozici 210

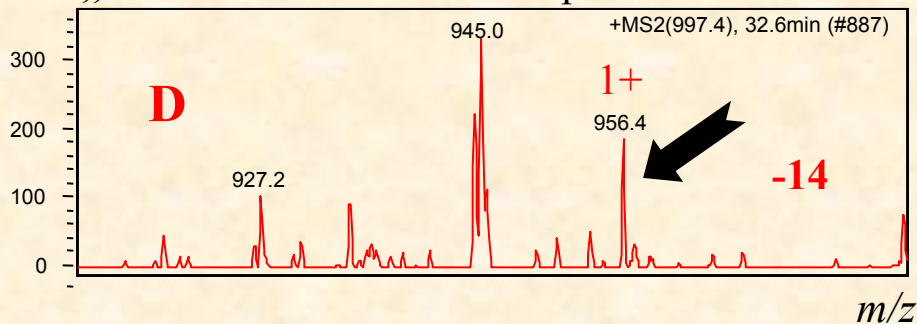
...

DEEELQKENVKNTASLTGKITLSVTQSKP**E**TGEVIGVFESIQPSDTDLGAKVPKDVKIQG

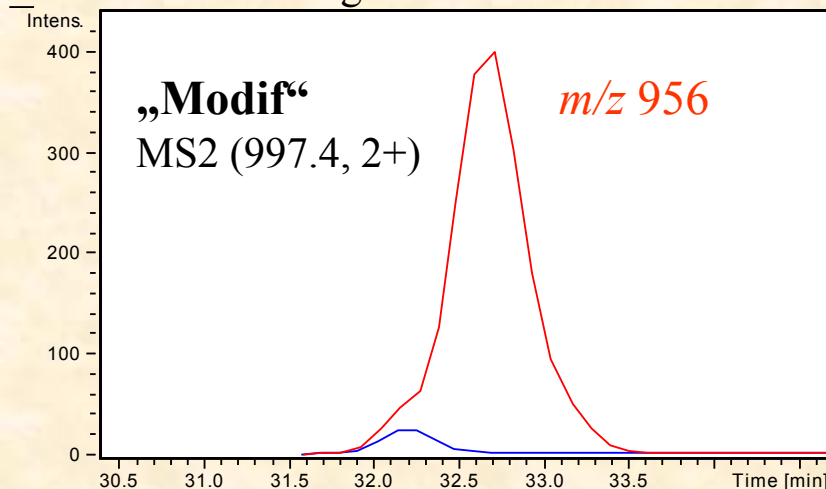
...

MSMS peptidu LSVTQSKPXTGEVIGVFES, MW 2006.0 (1992.0)

„Modif“ - detail MS/MS spektra

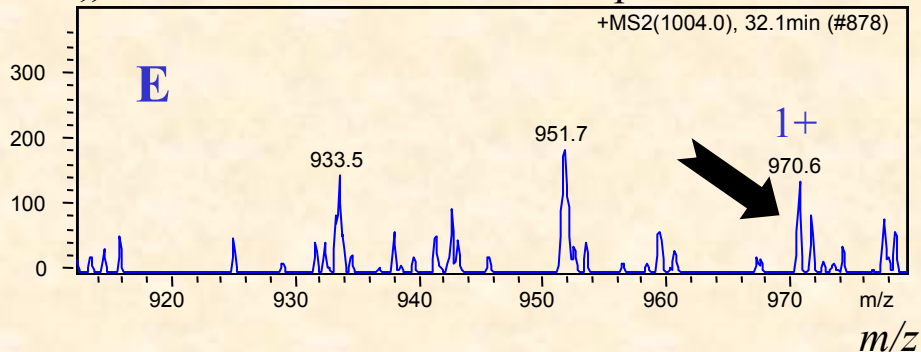


EIC chromatogram

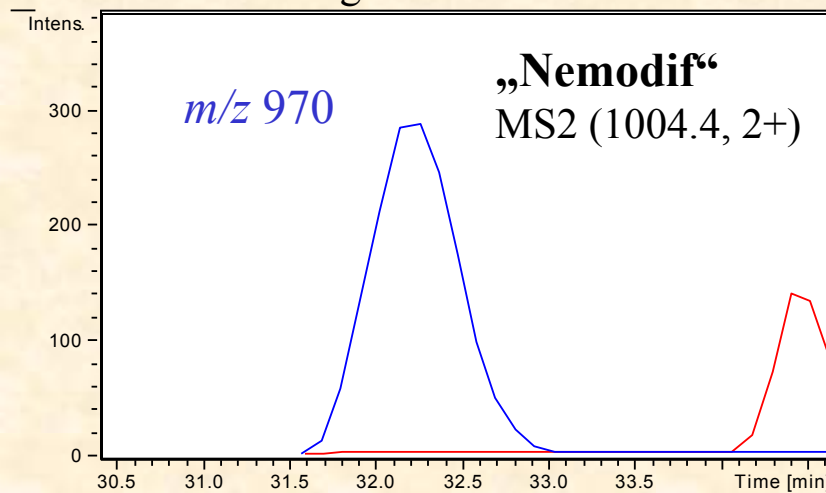


Ion b<sub>9</sub> LSVTQSKPXTGEVIGVFES D / E

„Nemodif“ – detail MS/MS spektra



EIC chromatogram



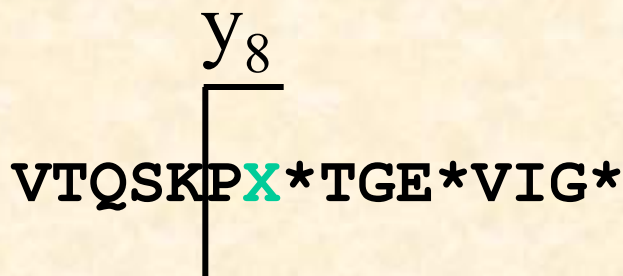
Rt (min)



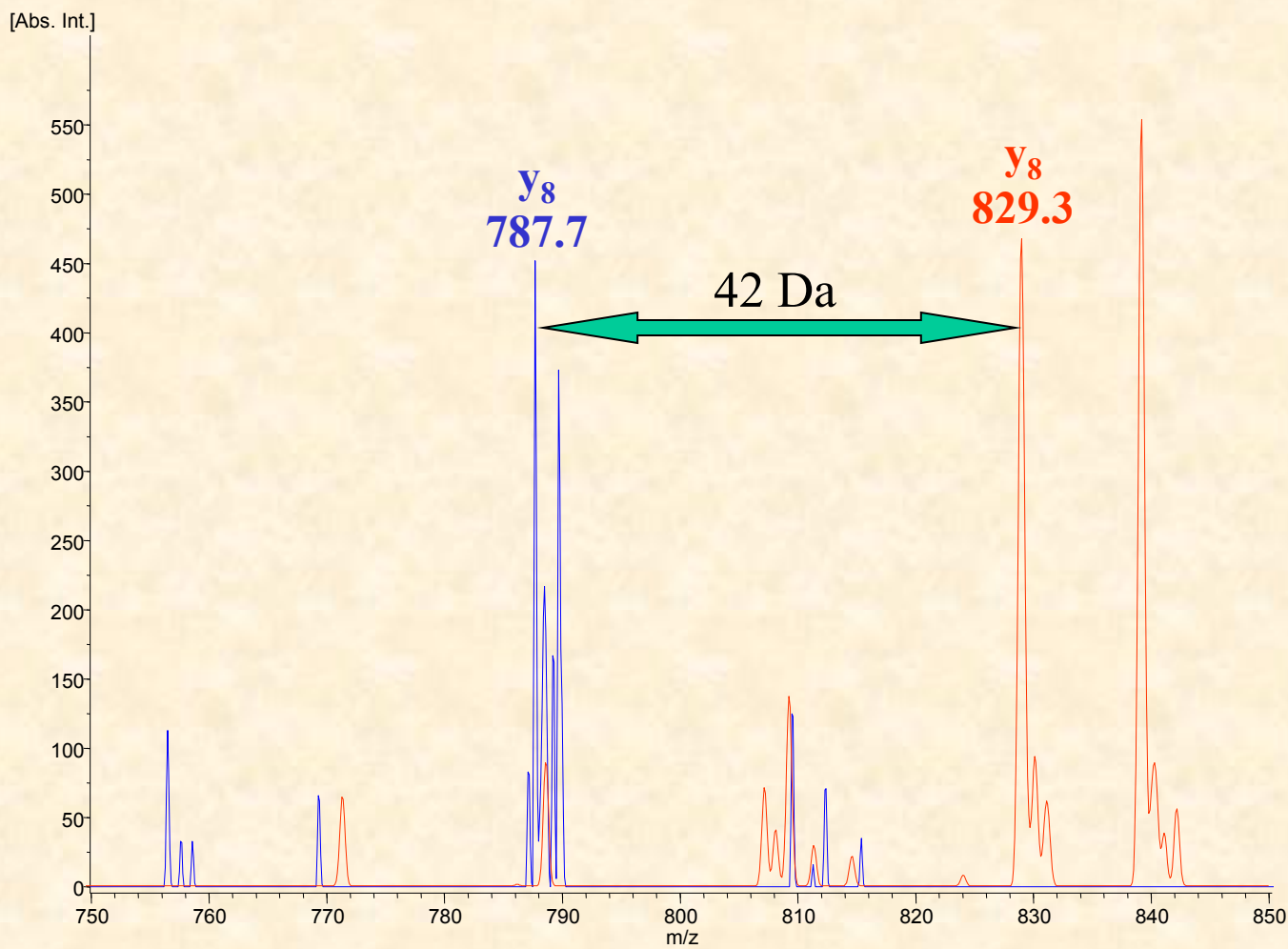
LC-MSMS

**methylace**, potvrzení D v pozici 210*po derivatizaci výměna H za CH<sub>3</sub> na karboxy skupině*tj.  $\Delta = 14$  Da/skupinu


pouze  
D, E a C-terminal

 $\Delta = 42$  Day<sub>8</sub> nederiv *m/z* 787.2 pro Dy<sub>8</sub> methyl *m/z* 829.3 pro D

## MSMS peptidu VTQSKPXTGEVIG před a po methylaci



**MS CHARAKTERIZACE MODIFIKACÍ  
„CHEMICKÉ“**

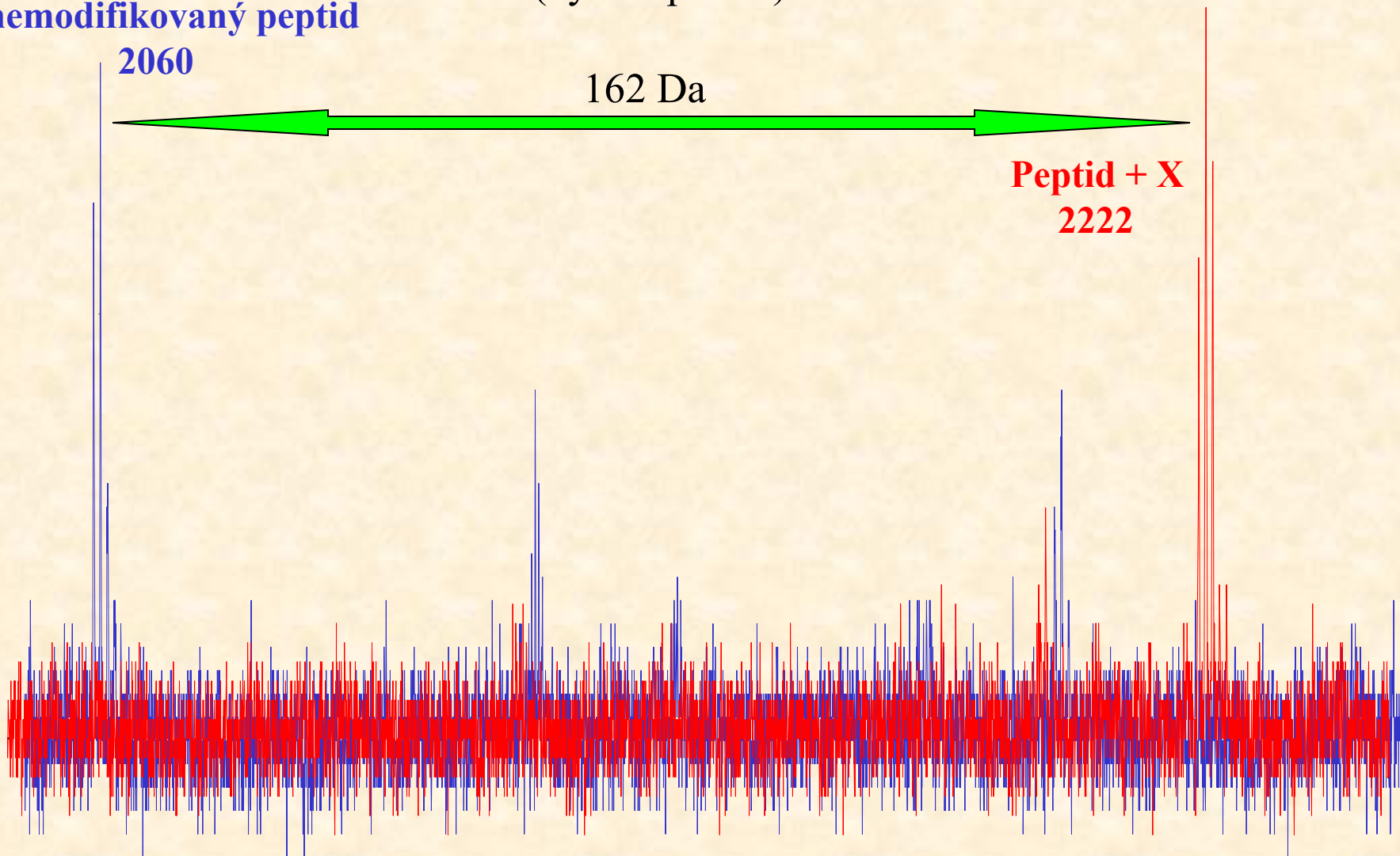
# MALDI-MS spektrum digestů před a po modifikaci (výřez spektra)

nemodifikovaný peptid

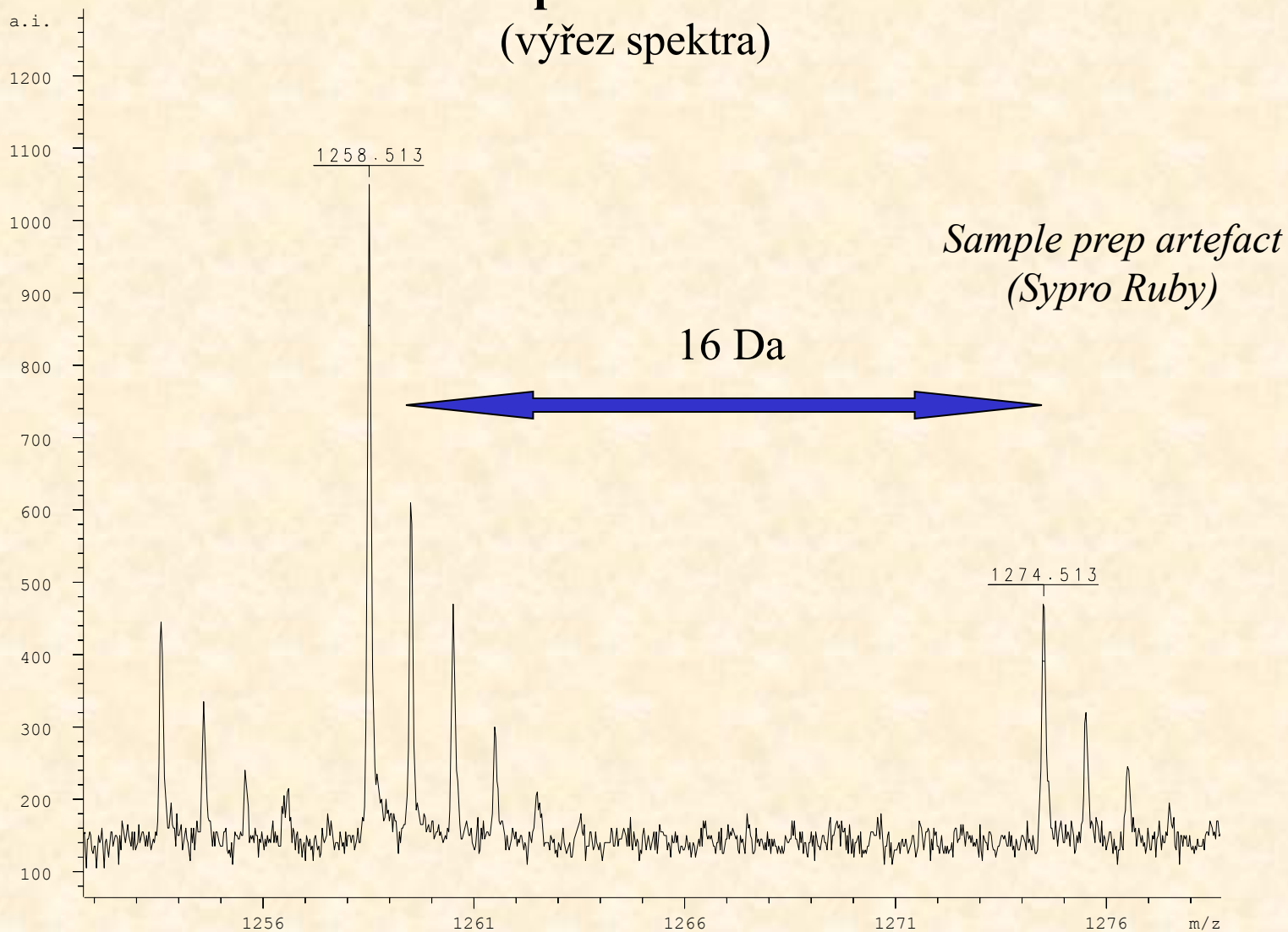
2060

162 Da

Peptid + X  
2222



# MALDI-MS spektrum – Oxidace Met (výřez spektra)




## Výsledek identifikace proteinu (Mascot)

1. gi|15803837 **Mass: 13532** **Score: 487** **Queries matched: 5**  
**50S ribosomal protein L14** [Escherichia coli O157:H7]

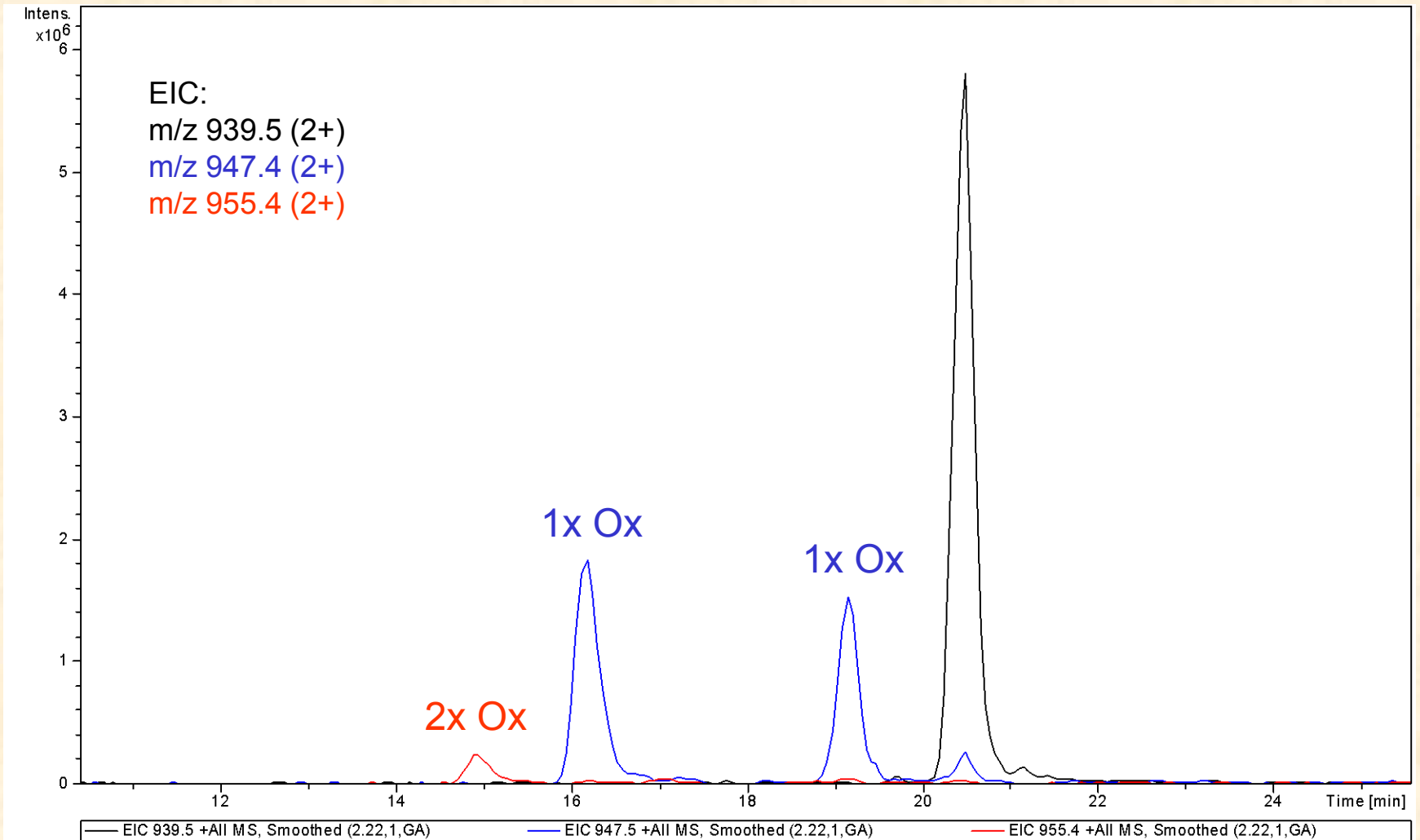
<i>Observed</i>	<i>Mr(expt)</i>	<i>Mr(calc)</i>	<i>Delta</i>	<i>Miss</i>	<i>Score</i>	<i>Peptide</i>
.....						
939.45	1876.89	1876.88	0.02	0	(125)	MIQEQTMLNVADNSGAR
947.44	1892.87	1892.87	-0.01	0	159	MIQEQT <u>ML</u> NVADNSGAR + Oxidation (M)
947.45	1892.88	1892.87	0.01	0	(147)	<u>MI</u> QEQTMLNVADNSGAR + Oxidation (M)
955.45	1908.89	1908.87	0.03	0	(118)	<u>MI</u> QEQT <u>ML</u> NVADNSGAR + 2 Oxidation (M)

.....

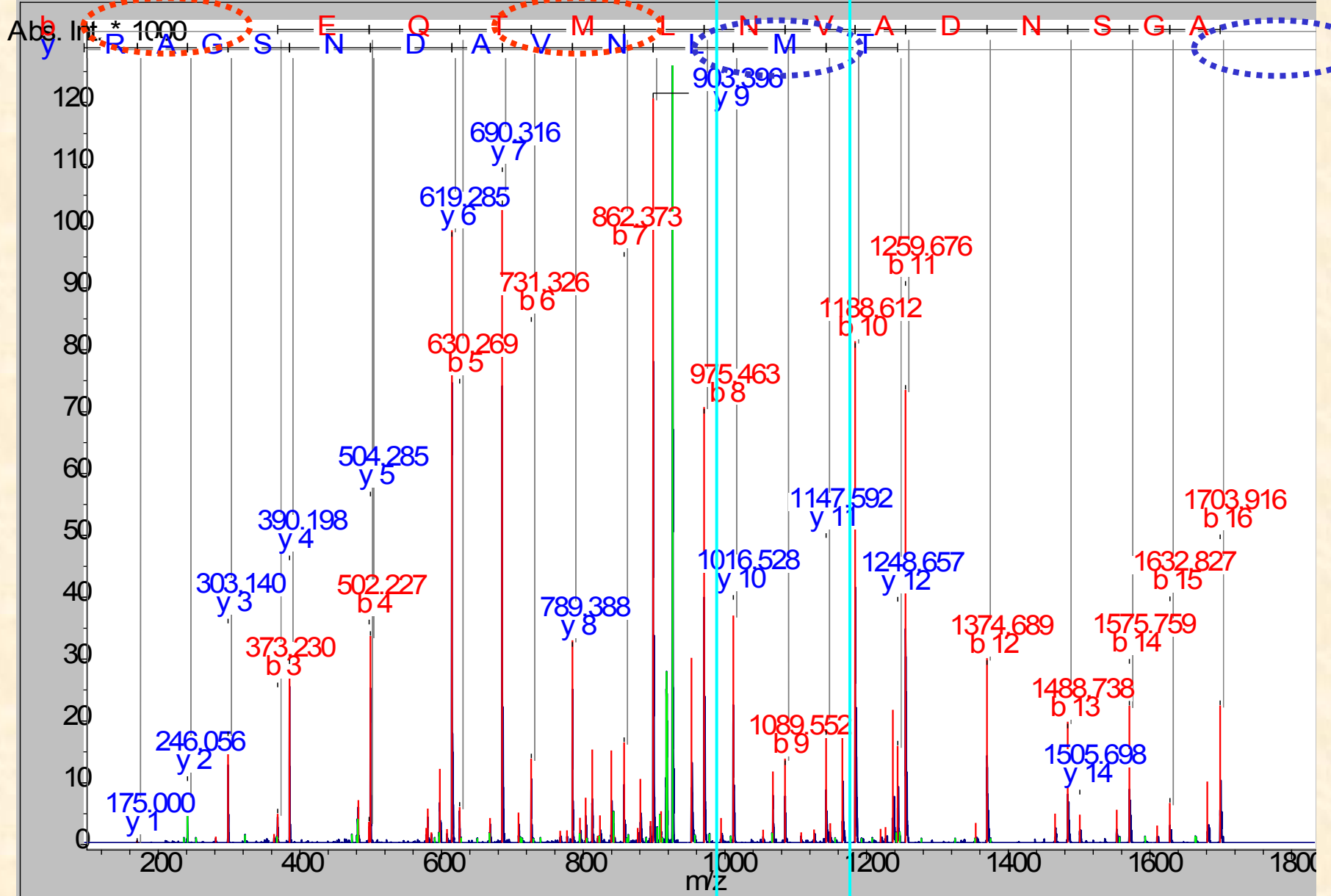


$\Delta m/z$  8 (16) ..... 16 (32)

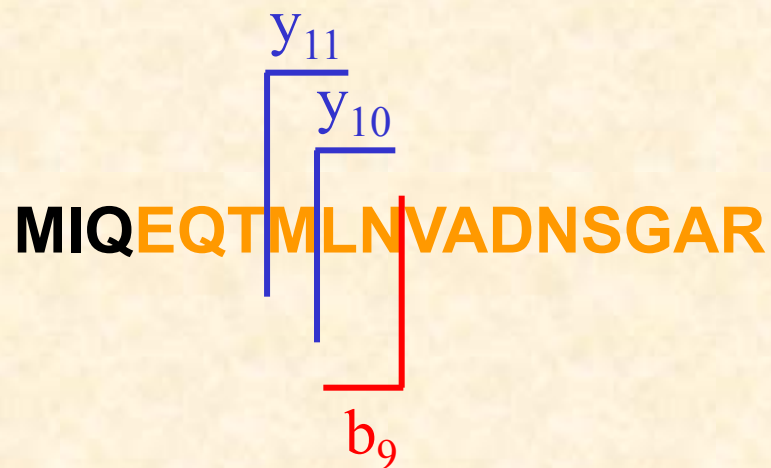
Jen část týkající se modifikovaného peptidu  
(Petra P. Vz. 3, 080821)



MS/MS spektrum nemodifikovaného peptidu - **MIQEQTMLNVADNSGAR**







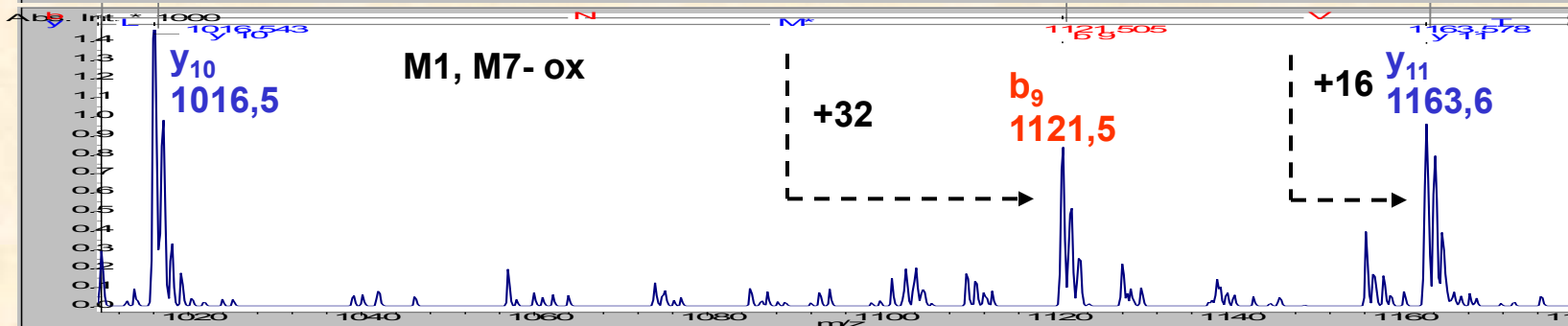
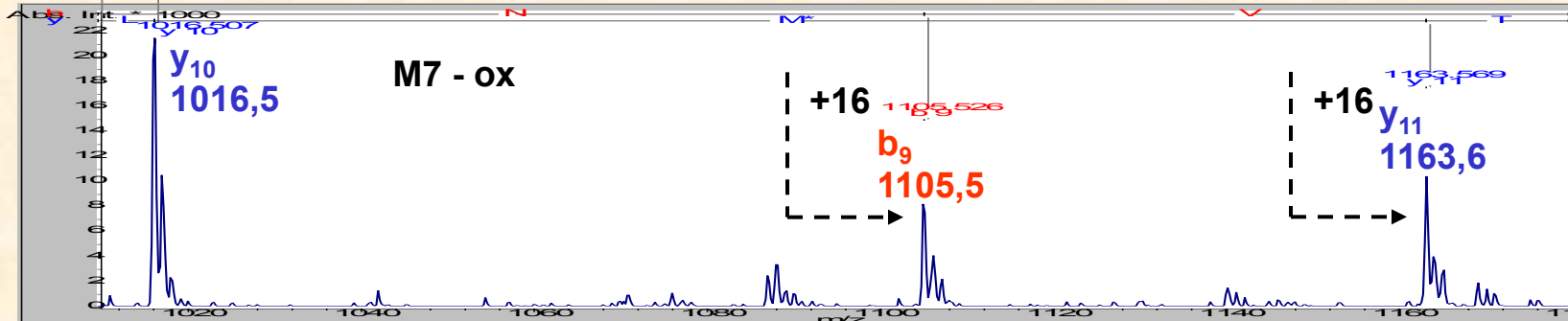
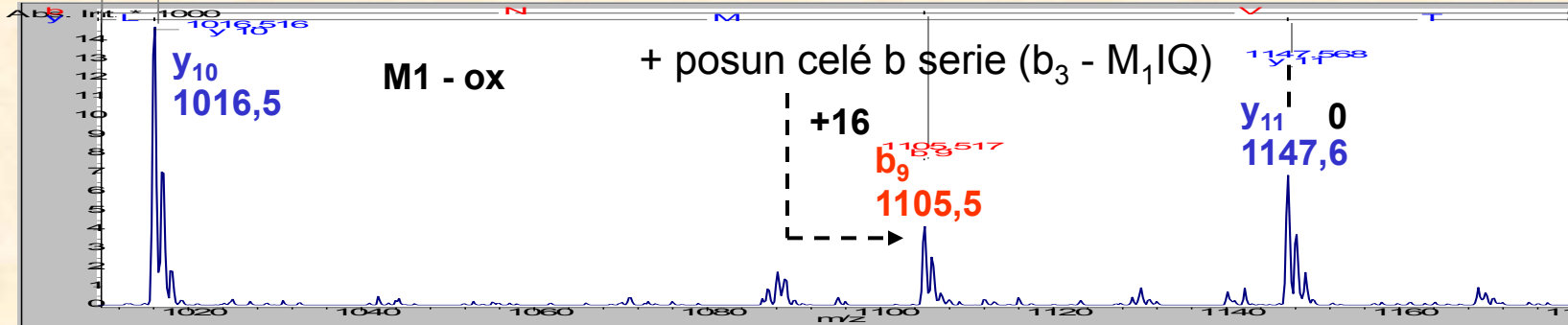
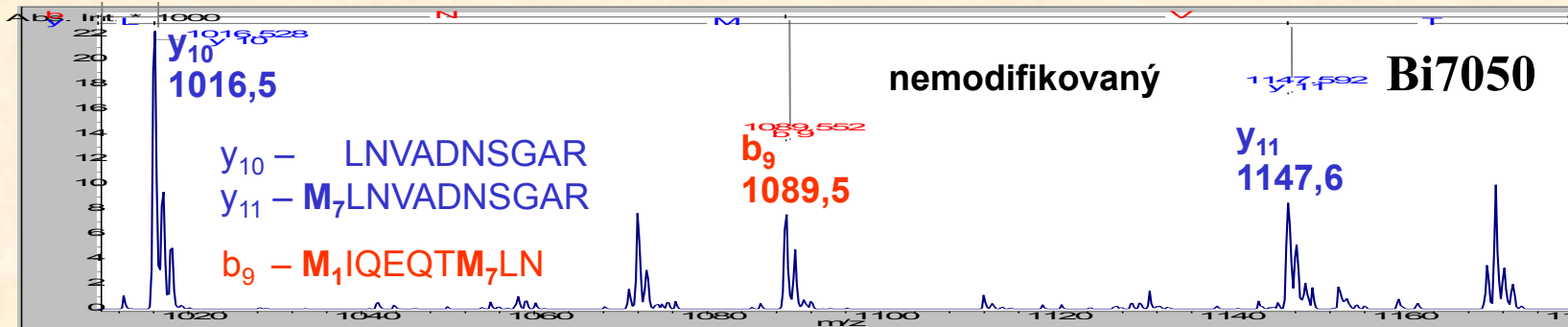
$b_9$  – M<sub>1</sub>IQEQTM<sub>7</sub>LN

$y_{10}$  – LN<sub>7</sub>VADNSGAR

$y_{11}$  – M<sub>7</sub>LN<sub>7</sub>VADNSGAR

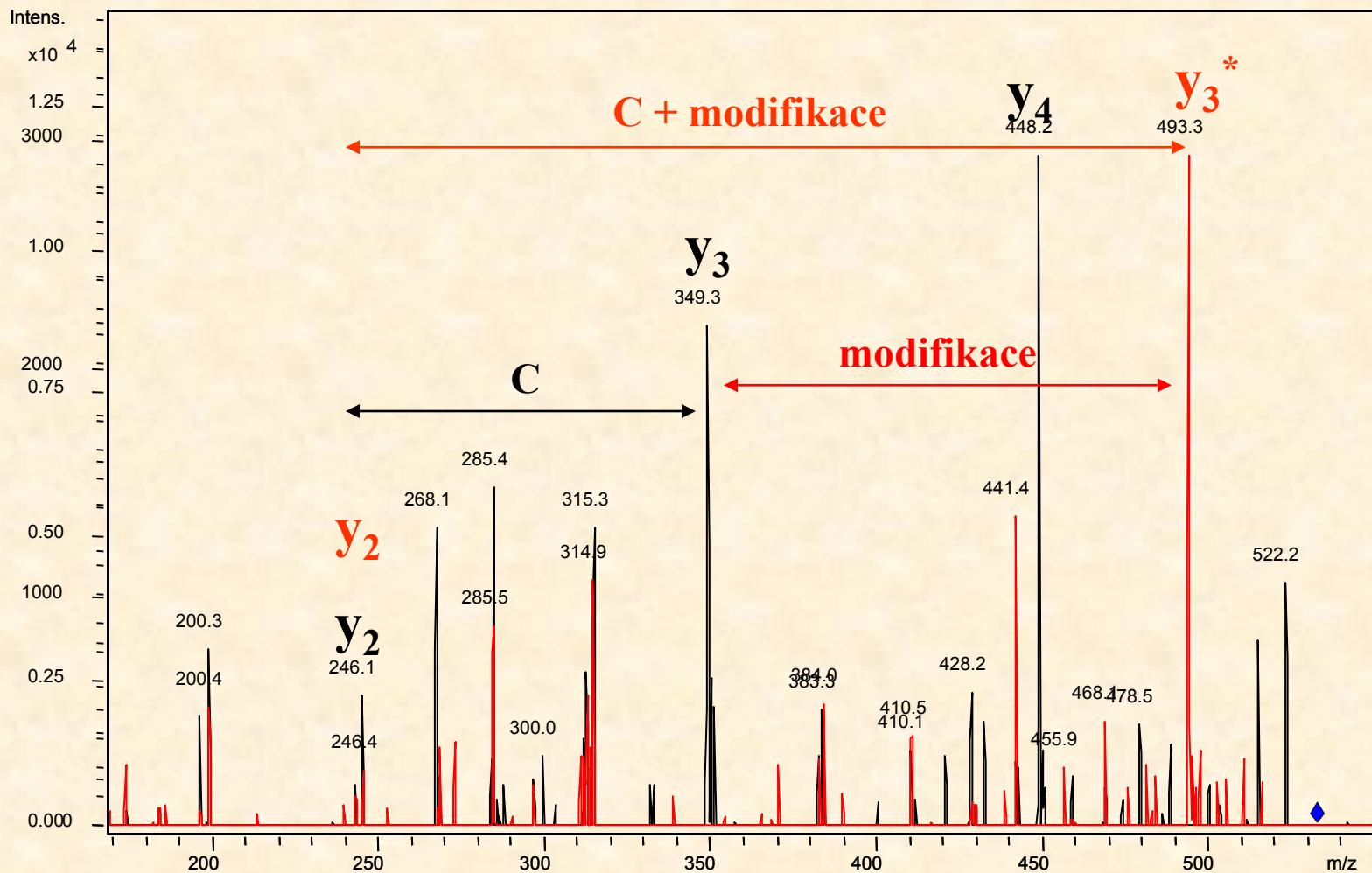
*Posuny v m/z vybraných fragmentů pro jednotlivé případy M<sub>(ox)</sub>*

	bez	1 Ox	1 Ox	2 Ox
		M <sub>1</sub>	M <sub>7</sub>	oba
$y_{10}$	0	0	0	0
$y_{11}$	0	0	16	16
$b_9$	0	16	16	32



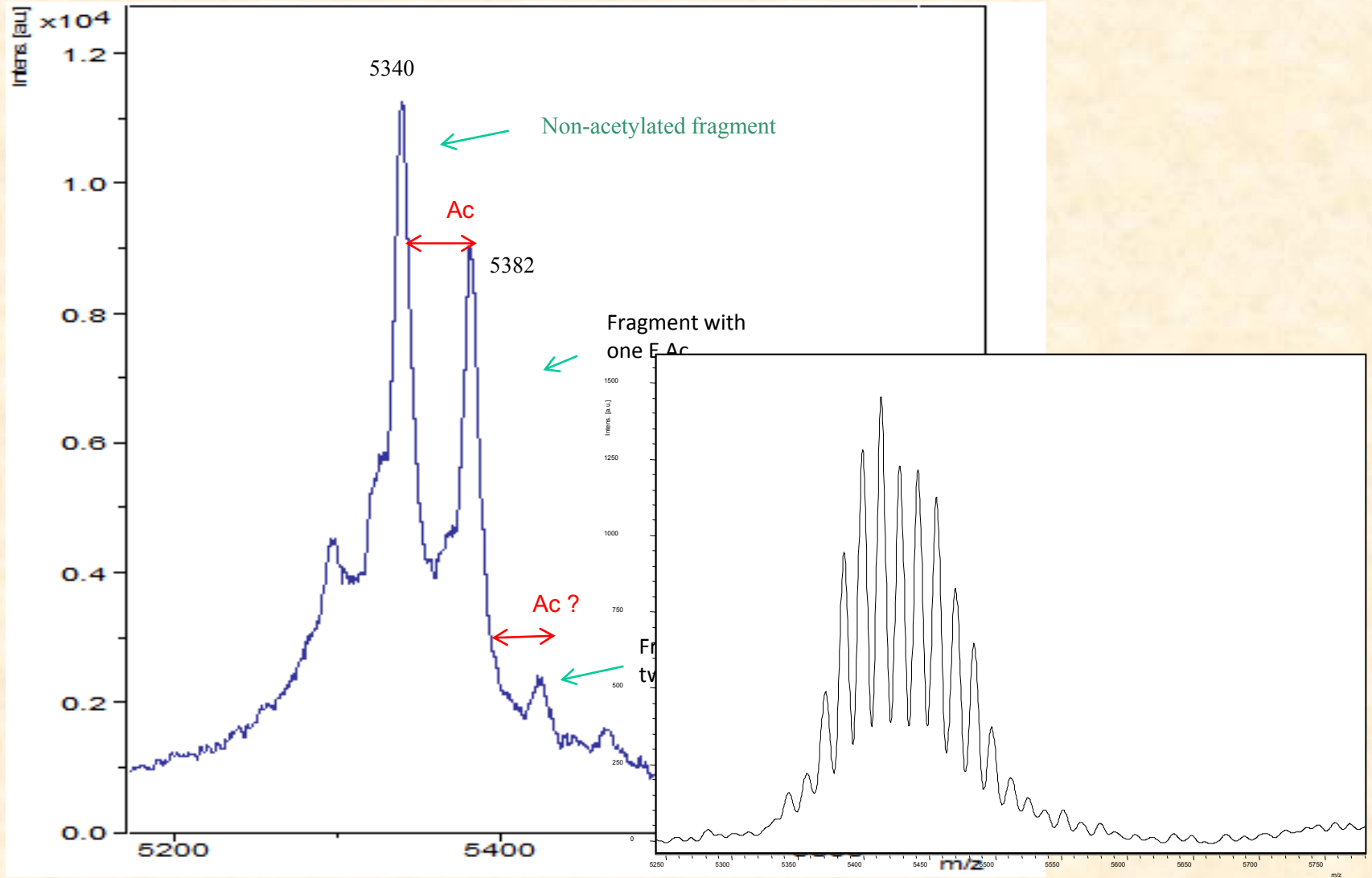
# LC-MSMS spectrum (výřez spektra)

Potrzení modifikace na Cys ...VC\*AR

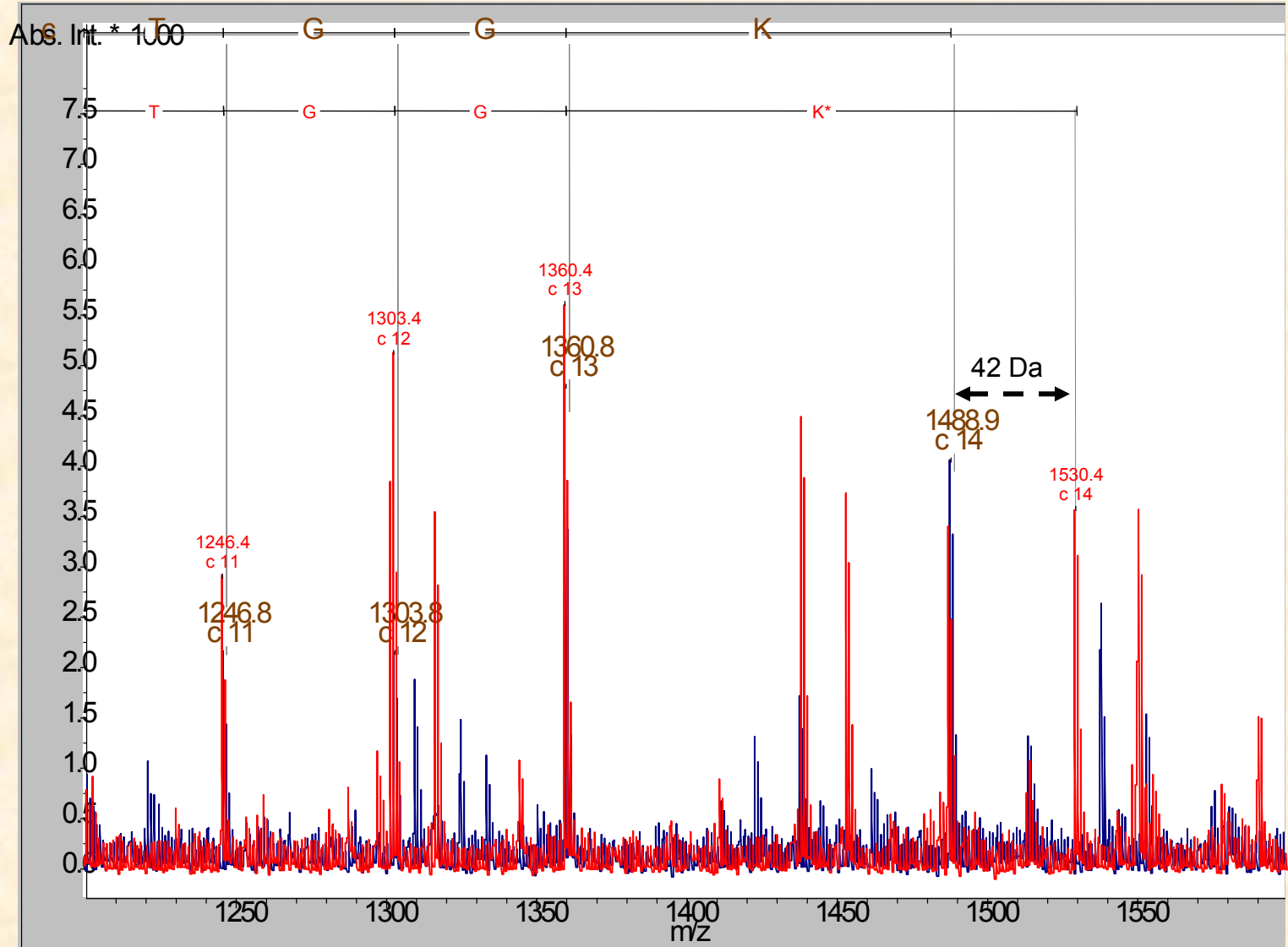


# Histon H3, lokalizace acetylace (*in-vitro*) MALDI-MS digestu (detail spektra)

Bi7050



# Histon H3, lokalizace acetylace K(14) MALDI-MS (detail spektra)







Konec III. části