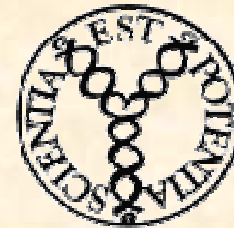




**Oddělení funkční genomiky a proteomiky**

Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta MU



# Hmotnostní spektrometrie v proteomice

**Zbyněk Zdráhal**

*Centrální laboratoř OFGP PřF MU*

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



# **Základní pojmy**

## **Proteomika**

Vědní disciplína zabývající se studiem proteomu, resp. proteinů, jejich funkce, struktury a jejich vzájemných interakcí v celkovém kontextu

## **Proteom**

Soubor proteinů v buňce (její části nebo celém organismu) včetně jejich posttranslačních modifikací; zjednodušeně proteinový ekvivalent genomu

## **Posttranslační modifikace**

Chemická modifikace proteinu v poslední fázi biosyntézy proteinů (po translaci), velmi často rozhodující o funkci a aktivitě proteinu

## **Hmotnostní spektrometrie (MS)**

Nejrozšířenější analytická technika pro identifikaci proteinů a studium jejich posttranslačních modifikací  
(MS, z anglického mass spectrometry)

# Genom *versus* Proteom

**Studium proteomu je mnohem komplikovanější:**

- **proteinů je podstatně víc než genů**

*lidský genom obsahuje ~25 000 genů, ale lidský proteom může obsahovat ~ 1 000 000 proteinů*

*([http://www.expasy.org/sprot/hpi/hpi\\_desc.html](http://www.expasy.org/sprot/hpi/hpi_desc.html))*

- **u proteinů řádově vyšší variabilita primární struktury**

*u genomu 4 základní stavební jednotky, u proteinů 20 zákl. stavebních jednotek (plus posttranslační modifikace)*

- **široký rozsah koncentrací proteinů (~ 10 řádů)**

*nutnost účinné separace majoritních proteinů od minoritních, chybí obdoba PCR reakce používané pro amplifikaci DNA*

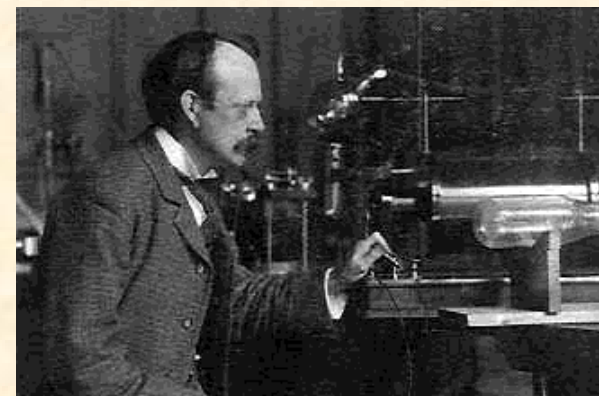
# Možnosti hmotnostní spektrometrie

**MS analyzuje proteiny zejména na úrovni primární struktury (pořadí aminokyselin)**

V současné době se stále více využívá i k analýze proteinových komplexů, studiu prostorové struktury proteinů (komplementárně k NMR) nebo k sledování distribuce proteinů v tkáních (MS imaging)

*Základní úkoly MS v analýze proteinů:*

- **Určení hmotnosti intaktních proteinů**
- **Identifikace proteinů**
- **Určení druhu a místa posttranslační modifikace**
- **Kvantifikace proteinů**



*Otec hmotnostní spektrometrie J.J. Thomson,  
Nobelova cena za fyziku, 1906*

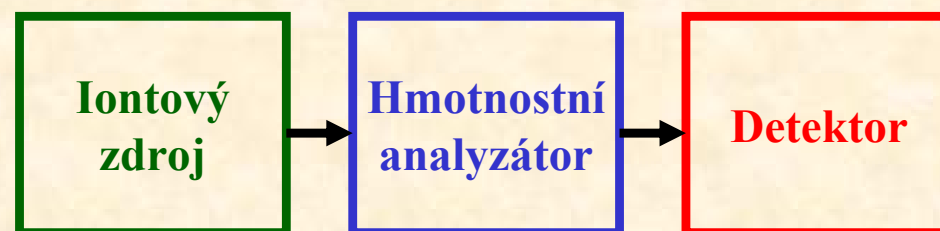
# Hmotnostní spektrometrie (MS)

*Princip metody:*

- měření měrného náboje ( $m/z$ ) iontů analyzované látky
- $m$  - hmotnost iontu  
 $z$  - náboj

*Základní operace:*

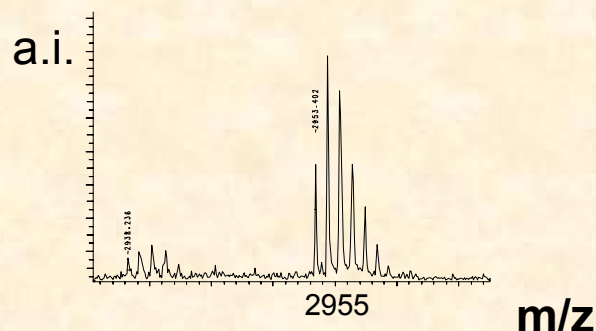
- ionizace molekul analyzované látky
- separace iontů podle jejich měrného náboje  $m/z$
- detekce iontů



*Výsledek:*

- hmotnostní spektrum - závislost intenzity iontů na jejich  $m/z$   
takto **určení hmotnosti iontů**,  
v případě molekulárního iontu

**hmotnost celé molekuly**



*Pozn. Kromě vybraných typů ionizace, všechny kroky MS analýzy probíhají ve vakuu, aby bylo zamezeno nechtěným srážkám analyzovaných iontů po cestě ze zdroje do detektoru (střední volná dráha molekul)*

## Průlom v MS proteinů

Nové „šetrné“ ionizační techniky (polovina 80. let 20. století)

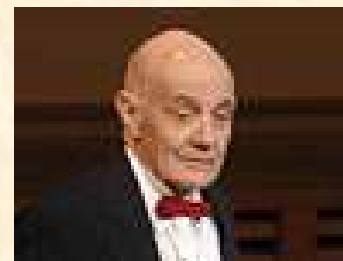
základní předpoklad pro široké využití MS pro analýzu biomolekul  
(*Nobelova cena 2002*)



**Koichi Tanaka**  
Shimadzu Corp., Kyoto, Japan

### MALDI

**ionizace laserovou desorpcí za účasti matrice**  
(nejčastěji ve spojení s průletovým analyzátozem, TOF)



**John B. Fenn**  
Virginia Commonwealth University,  
Richmond, USA

### ESI

**ionizace elektrosprejem**  
(nejčastěji ve spojení s iontovou pastí, IT)

# MALDI ionizace

## *Příprava vzorku:*

- ▶ vzorek proteinu je smíchán s nadbytkem matrice
- ▶ směs je nanesena na vzorkovací destičku a nechá se zaschnout
- ▶ vzniknou směsné krystaly matrice se vzorkem

**matrice** je nízkomolekulární látka schopná absorpce laserového záření

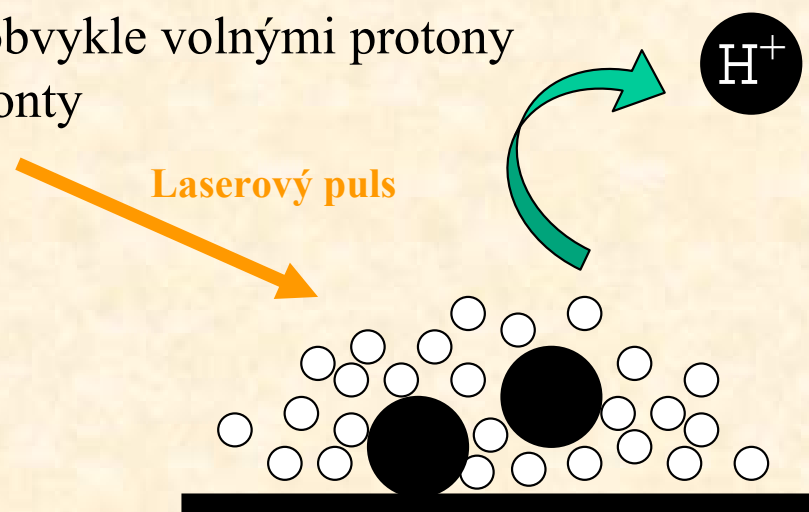
*např. kyselina dihydroxybenzoová (pro UV laser)*

## *Ionizace vzorku:*

- ✚ krátkým pulzem laserového záření jsou molekuly vzorku a matrice vytrženy z povrchu, díky nadbytku matrice je zamezeno nechtěné fragmentaci vzorku
- ✚ vzorek je pak následně ionizován, obvykle volnými protony
- ✚ přednostně vznikají jednoduše nabití ionty

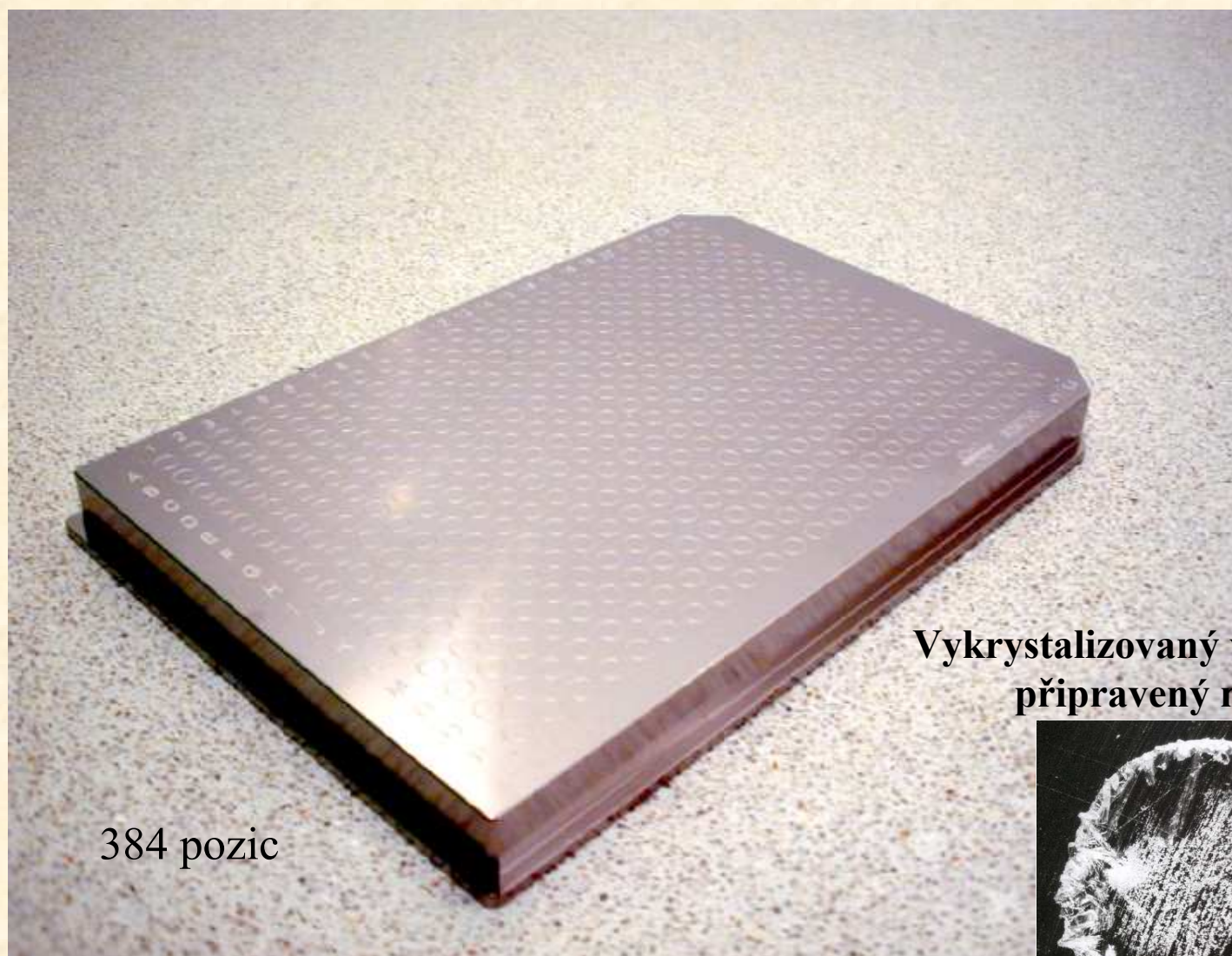
## *Výsledek:*

- Šetrná ionizace bez fragmentace
- Jednoduchá spektra
- Uchování vzorku na vzorkovací desce





## Vzorkovací destička pro MALDI-MS



384 pozic

Vykrytalizovaný vzorek s matricí  
připravený na analýzu



Destička pro přístroj Reflex IV (Bruker)



# Průletový analyzátor (Time-of-Flight, TOF)

Separuje ionty dle doby letu analyzátořem, čas je pak přepočten na hmotnost

$$E = \frac{1}{2} m v^2$$

$$V = s/t$$

*E* – energie iontu

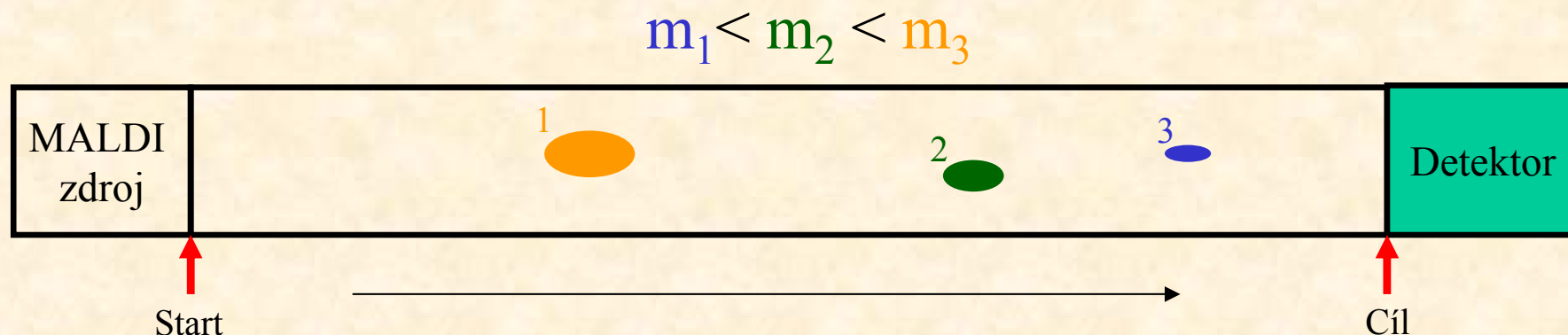
*m* – hmotnost iontu

*v* – rychlost iontu

*s* – dráha letu

*t* – doba letu iontu

Ionům je po ionizaci udělena stejná kinetická energie; současně vstupují do trubice analyzátořu a měří se jejich čas dopadu na detektor

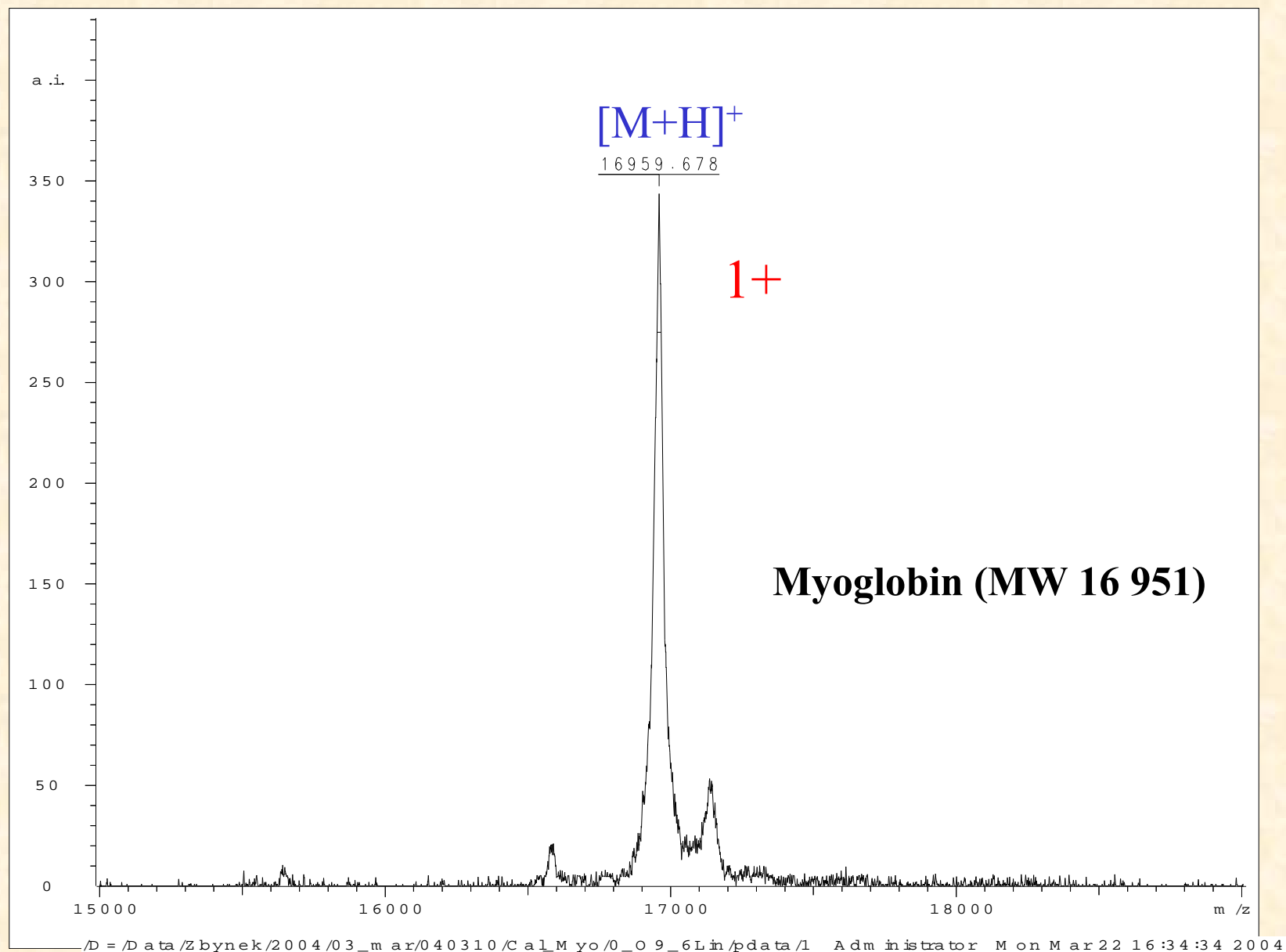


# MALDI -TOF MS



MALDI-TOF hmotnostní spektrometr Reflex IV od firmy Bruker umístěný v CL OFGP PřF MU

# MALDI-TOF spektrum proteinu



# ESI ionizace

## *Příprava vzorku:*

- ▶ vzorek proteinu je v roztoku
- ▶ roztok je pak dávkován přes vstupní kapiláru do iontového zdroje

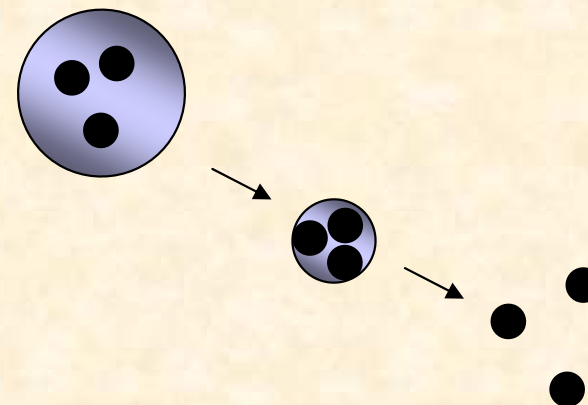
## *Ionizace vzorku:*

- ✚ roztok vzorku je vstupní kapilárou zmlžován v komoře iontového zdroje **za atmosferického tlaku**
- ✚ ionizace probíhá ve spreji působením vloženého elektrického napětí
- ✚ vznikají nabité kapičky kapaliny, které během odpařování přechází na vícenásobně nabité ionty
- ✚ ionty jsou pak vtaženy do vakuové části spektrometru přechodovou kapilárou a dále analyzovány

## *Výsledek:*

- Šetrná ionizace bez fragmentace
- vícenásobně nabité ionty
- Snadné spojení se separačními technikami (LC, CE)

LC - kapalinová chromatografie; CE - kapilární elektroforéza



# Iontová past

## *MS scan*

### **Měření hmotností resp. $m/z$ analyzovaných iontů**

- zachycení iontů
- postupné vypuzování iontů z pasti podle  $m/z$
- detekce iontů

Ionty vzniklé v elektrospreji jsou transportovány do komory iontové pasti a odtud jsou pak postupně změnou vložených elektrických polí vypuzovány do detektoru

## *MS/MS scan*

### **Analýza fragmentů vybraných iontů**

- zachycení iontů
- vypuzení všech iontů z pasti mimo iontů s požadovaným  $m/z$
- excitace a fragmentace vybraných iontů
- detekce fragmentů (dceřinných iontů)

Výhodou iontové pasti je možnost fragmentace vybraných iontů a takto získání strukturní informace o fragmentované látce.

Ionty jsou zachyceny v iontové pasti stejně jako při MS modu, následuje izolace iontů o vybraném  $m/z$  (ostatní ionty jsou z prostoru iontové pasti vypuzeny), pak jsou vybrané ionty fragmentovány kolizně indukovanou disociací (srážky s He), vzniklé fragmenty jsou pak postupně vypuzeny do detektoru dle svého  $m/z$ .



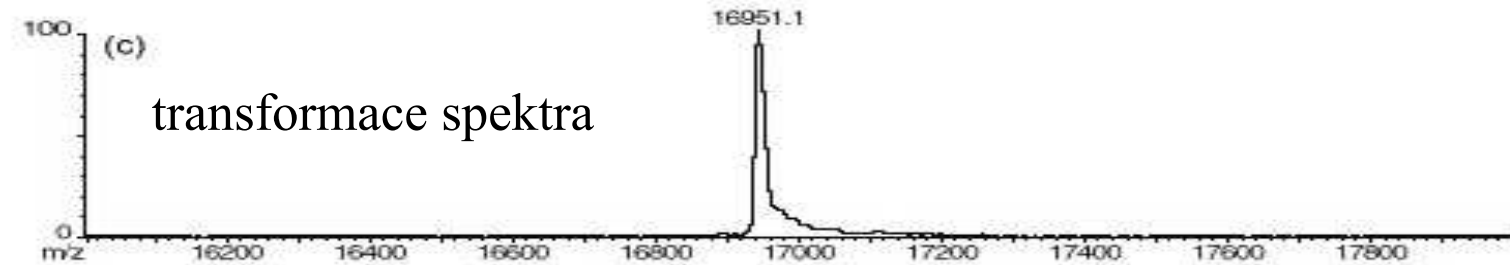
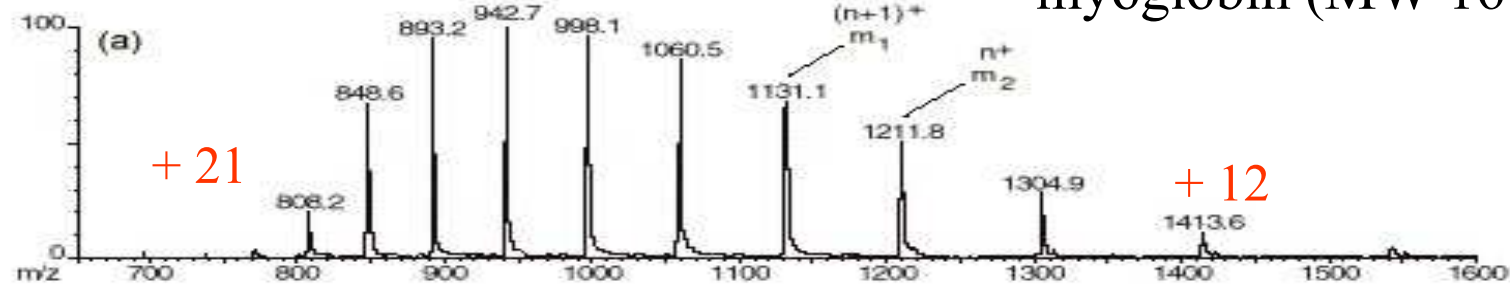
# ESI -IT MS



ESI-IT hmotnostní spektrometr Esquire 2000 od firmy Bruker umístěný v CL OFGP PřF MU  
Místo dávkovače vzorku lze připojit kapalinový chromatograf

# ESI – MS spektrum proteinu

myoglobin (MW 16 951)



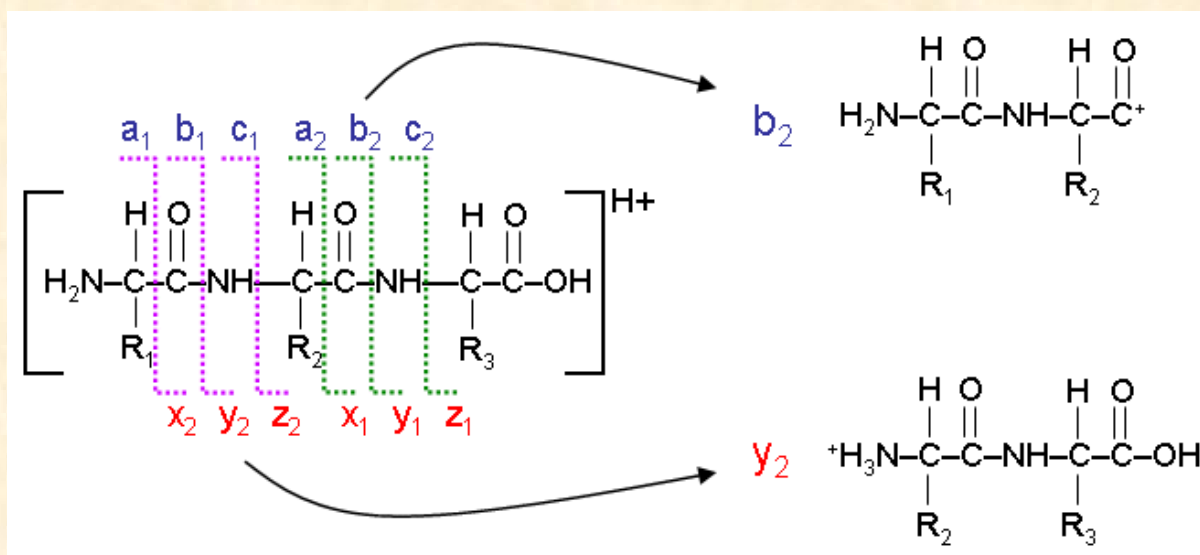
(b)

Mass to Charge Ratio (m/z)	No. of charges (n)	Molecular Mass (RMM)
1542.04	11	16951.40
1413.59	12	16950.95
1304.93	13	16950.94
1211.80	14	16951.11
1131.12	15	16951.62
1060.46	16	16951.26
998.11	17	16950.67
942.75	18	16951.30
893.15	19	16950.71
848.57	20	16951.25
808.21	21	16951.14
771.49	22	16950.72
	Mean	16951.09
	S.D.	±0.30

Porovnej s MS spektrem při použití MALDI ionizace

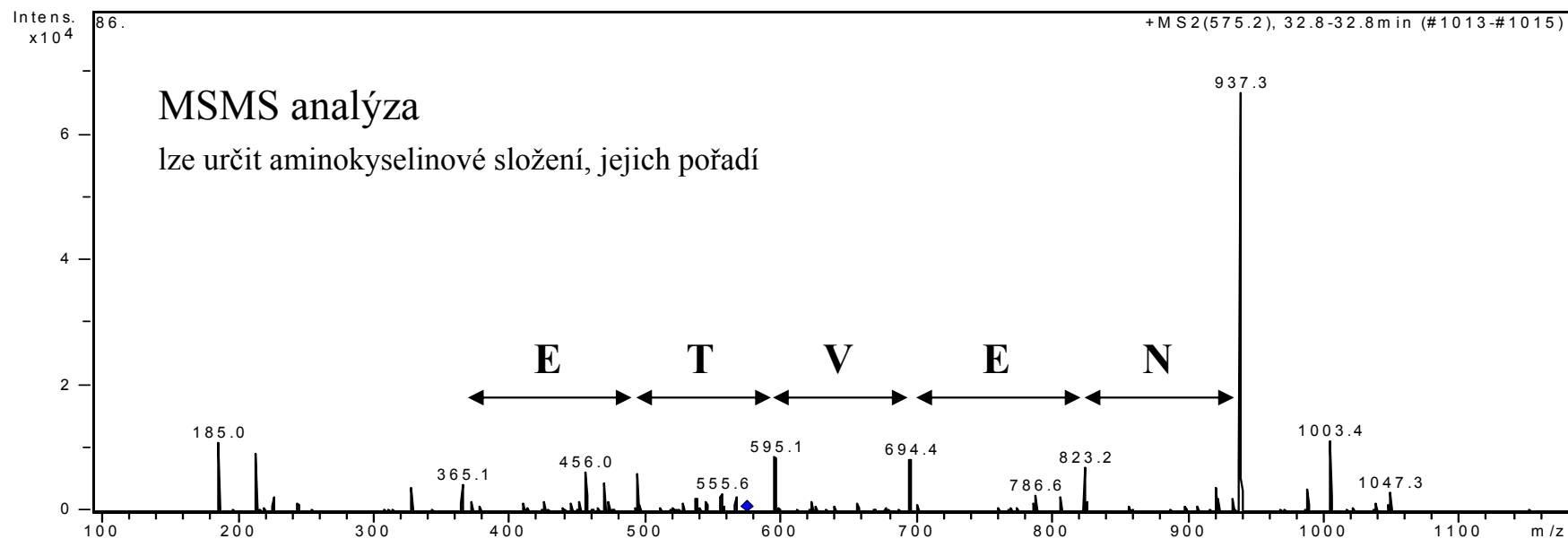
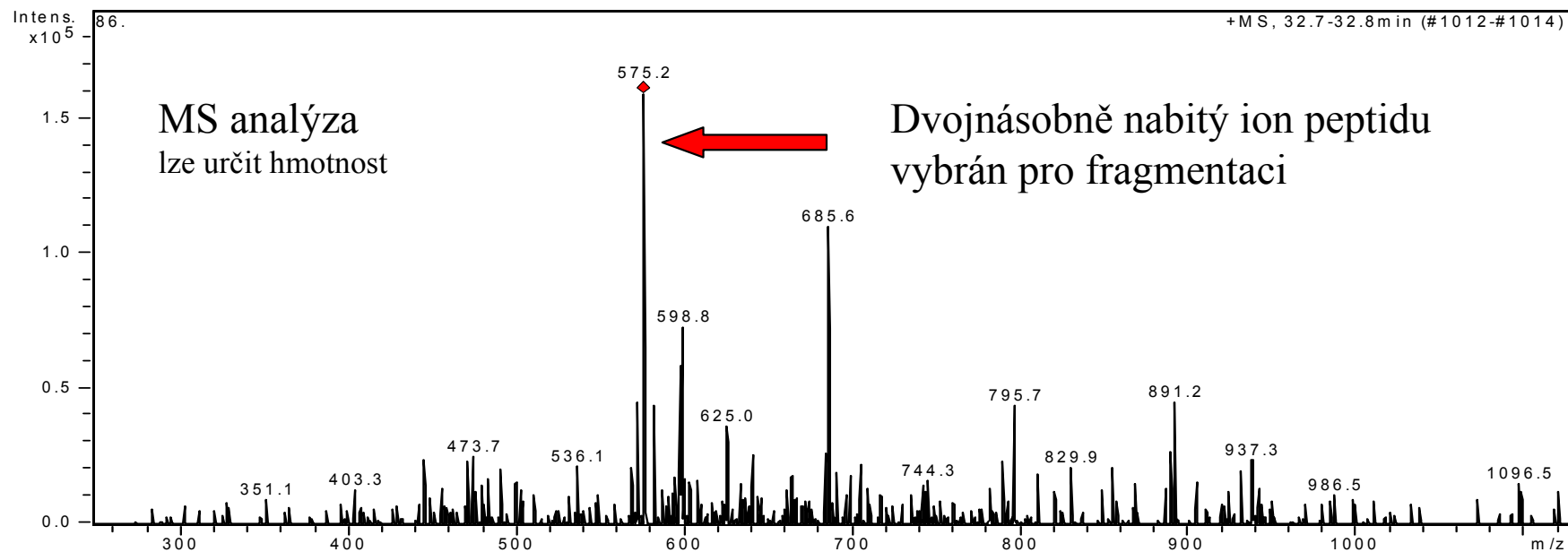
## MSMS peptidů

- ❖ peptidy jako polymerní látky jsou spojeny peptidovou vazbou
- ❖ při fragmentaci je peptid štěpen přednostně na peptidové vazbě a to tak, že v ideálním případě dojde k rozštěpení všech peptidových vazeb, takže vznikne soubor fragmentů s jednou, dvěma, třemi ... aminokyselinami, z rozdílů v  $m/z$  (resp. hmotnosti) „sousedních fragmentů“ lze odvodit druh aminokyseliny
- ❖ vznikají predikovatelné serie iontů ( $b - y$ ,  $a - x$ ,  $c - z$ ), které lze snadno ze známé sekvence peptidu odvodit



Schema fragmentace tripeptidu

## ESI-MS a MSMS peptidu (MW 1148.5)

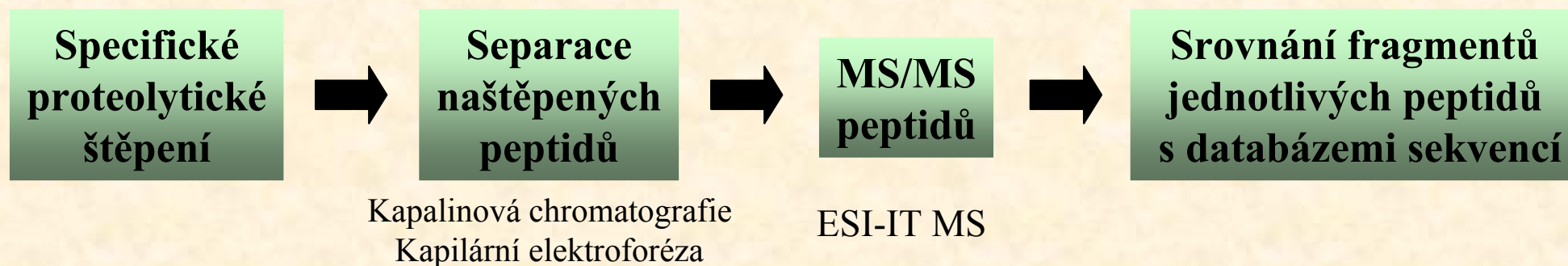
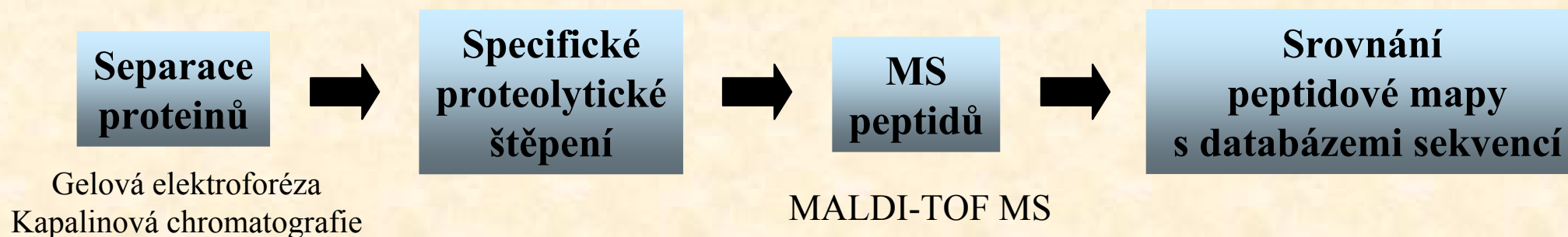






# Identifikace proteinů pomocí MS

Standardní postupy:

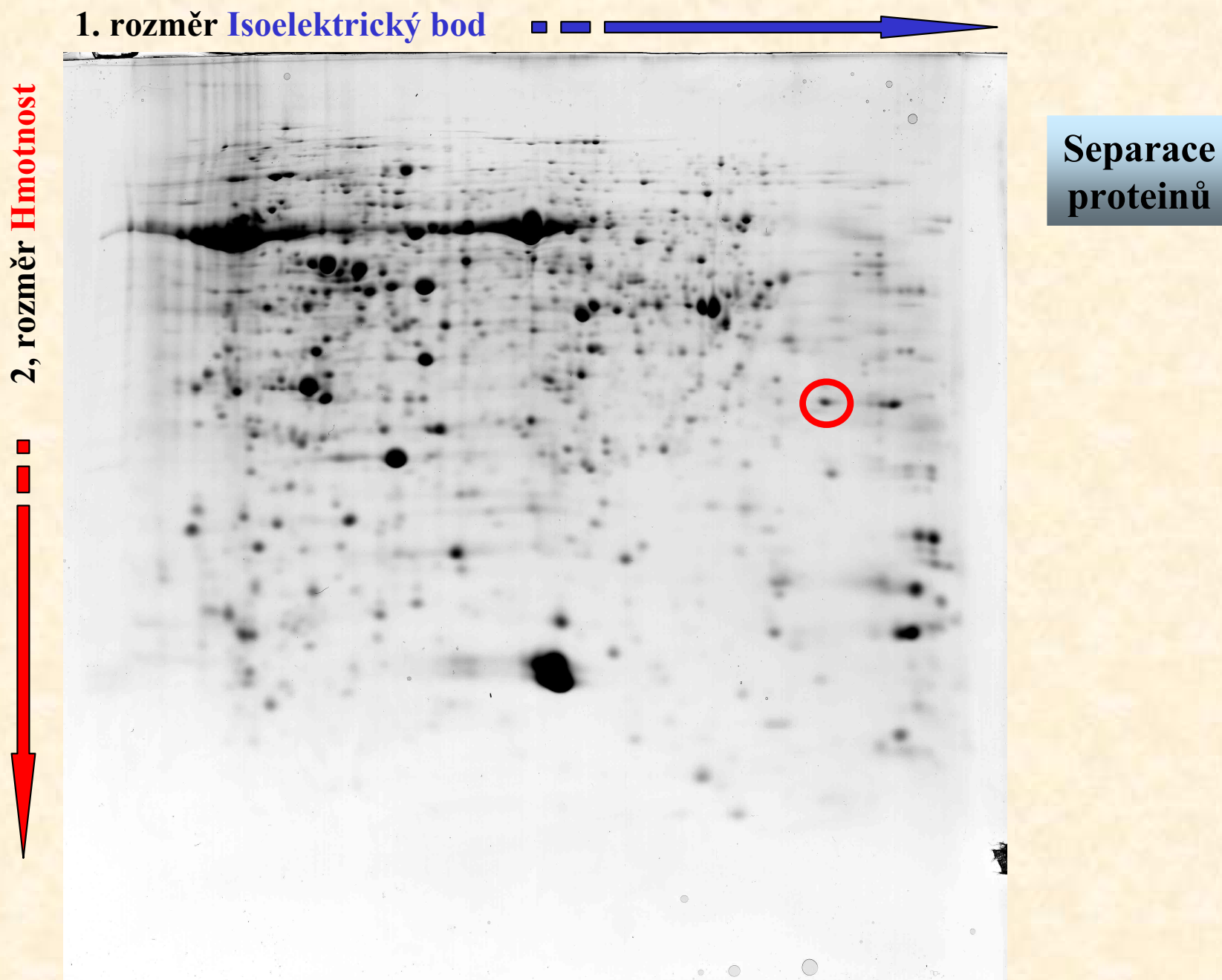


# **Příklad identifikace proteinu pomocí peptidového mapování**

(peptide mass fingerprinting, peptide mapping)

**Modrá varianta**

# Separace proteinové směsi pomocí dvojrozměrné gelové elektroforézy



# Proteolytické štěpení (digesce)

enzymatické štěpení proteinu na soubor peptidů specifickou proteázou

## Trypsin

štěpí vždy za **lysinem (K)** a **argininem (R)**, pokud není následující aminokyselina prolin

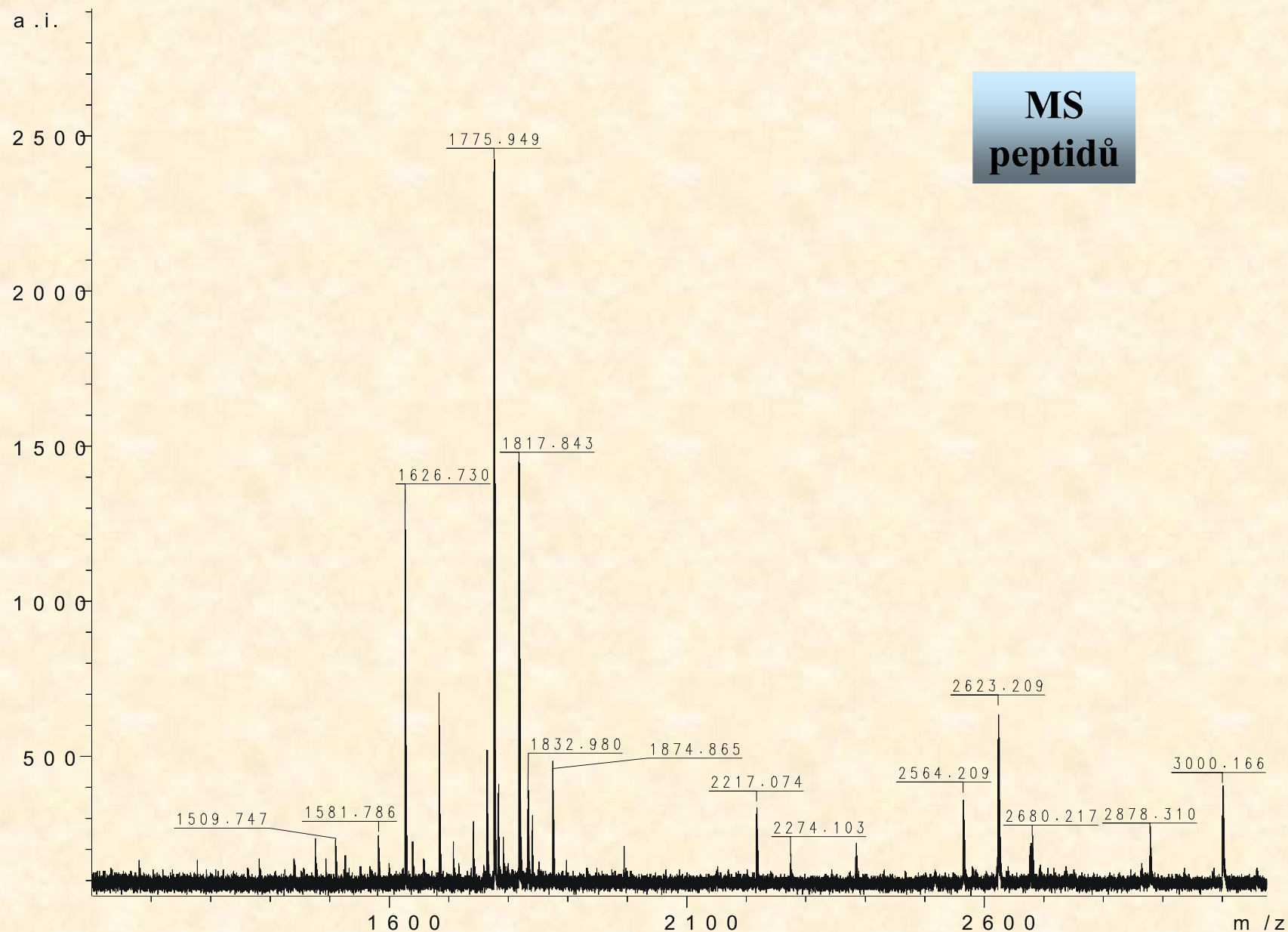
QNGVQMLSPSEIPQ**R**DWFPSDFTFGAATSAYQIEGAWNEDG**K**GESNWDHFCHNHPE**R**ILD  
GSNSDIGANSYHMY**K**TDV**R**LL**K**EMGMDAY**R**FSISWP**R**ILP**K**GT**K**EGGINPDGI**K**YY**R**NLI  
NLLLENGIEP

QNGVQMLSPSEIPQ <b>R</b>	1–15	1683.848 Da
DWFPSDFTFGAATSAYQIEGAWNEDG <b>K</b>	16–42	3010.317 Da
GESNWDHFCHNHPE <b>R</b>	43–57	1864.757 Da
ILDGSNSDIGANSYHMY <b>K</b>	58–75	1984.907 Da
TDV <b>R</b>	76–79	490.262 Da
...		

Specifické  
proteolytické  
štěpení

Soubor hmotností takto vzniklých peptidů (peptidová mapa) je charakteristický pro daný protein podobně jako otisk palce pro člověka

# MALDI - TOF MS peptidů po digesti proteinu



MS spektrum obsahuje hmotnosti peptidů vzniklých digestí vybraného proteinu



# Identifikace proteinu – peptidové mapování databázové prohledávání

Naměřená peptidová mapa (soubor hmotností peptidů vzniklých digescí analyzovaného proteinu) je prohledávána proti databázi proteinových sekvencí.

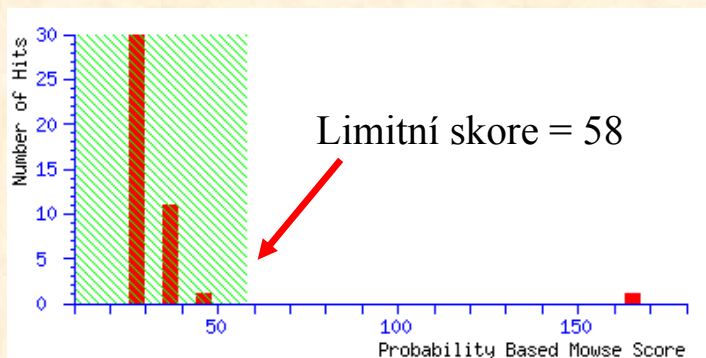
Prohledávací program si vytváří teoretickou peptidovou mapu od každé proteinové sekvence v databázi (to je umožněno použitím specifické proteázy se známými štěpnými místy) a postupně je srovnává s experimentálně naměřenou peptidovou mapou našeho analyzovaného proteinu.

Výsledkem prohledávání je žebříček proteinů s nejpodobnějšími peptidovými mapami. Míra shodnosti je vyjádřena tvz. skore, všechny proteiny s hodnotou skore vyšší než limitní jsou programem považovány za identifikované.

**Srovnání  
peptidové mapy  
s databázemi sekvencí**

# Výsledek databázového prohledávání peptidové mapování

## Mascot Search Results



Database : MSDB 20021127 (1019653 sequences)

Timestamp : 26 Jan 2003 at 10:36:50 GMT

Top Score : 165 for **S18600**, glutamate-ammonia ligase ...

1. **S18600** Mass: 47780 Total score: **165** Peptides matched: 12  
glutamate-ammonia ligase (EC 6.3.1.2) precursor, chloroplast (clone lambdaAtgsl1) - Arabidopsis thaliana
2. **S32228** Mass: 47714 Total score: **76** Peptides matched: 7  
glutamate-ammonia ligase (EC 6.3.1.2) precursor - rape - Brassica napus

Sequence Coverage: 44%

Srovnání  
peptidové mapy  
s databázemi sekvencí

```
1  MAQILAASPT CQMRVPKHSS VIASSSKLWS SVVLKQKKQS NNKVRGFRVL
51  ALQSDNSTVN RVETLLNLDT KPYSDRIIAE YIWIGGSGID LRSKSRTIEK
101 PVEDPSELPK WNYDGSSTGQ APGEDSEVIL YPQAIFRDPF RGGNNILVIC
151 DTWTPAGEPI PTNKRAKAAE IFSNKKVSGE VPWFGIEQEY TLLQQNVKWP
201 LGWPVGAFPG PQGPYYCGVG ADKIWGRDIS DAHYKACLYA GINISGTNGE
251 VMPGQWEFQV GPSVGIDAGD HVWCARYLLE RITEQAGVVL TLDPKPIEGD
301 WNGAGCHTNY STKSMREEGG FEVIKKAILN LSLRHKEHIS AYGEGNERRL
351 TGKHETASID QFSWGVANRG CSIRVGRDTE AKGKGYLEDR RPASNMDPYI
401 VTSLLAETTL LWEPTLEAEA LAAQKLSLNV
```

[www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)

Červeně jsou vyznačeny úseky sekvence odpovídající přiřazeným peptidům z naměřené peptidové mapy

# **Příklad identifikace proteinu pomocí LC-MSMS**

**Zelená varianta**

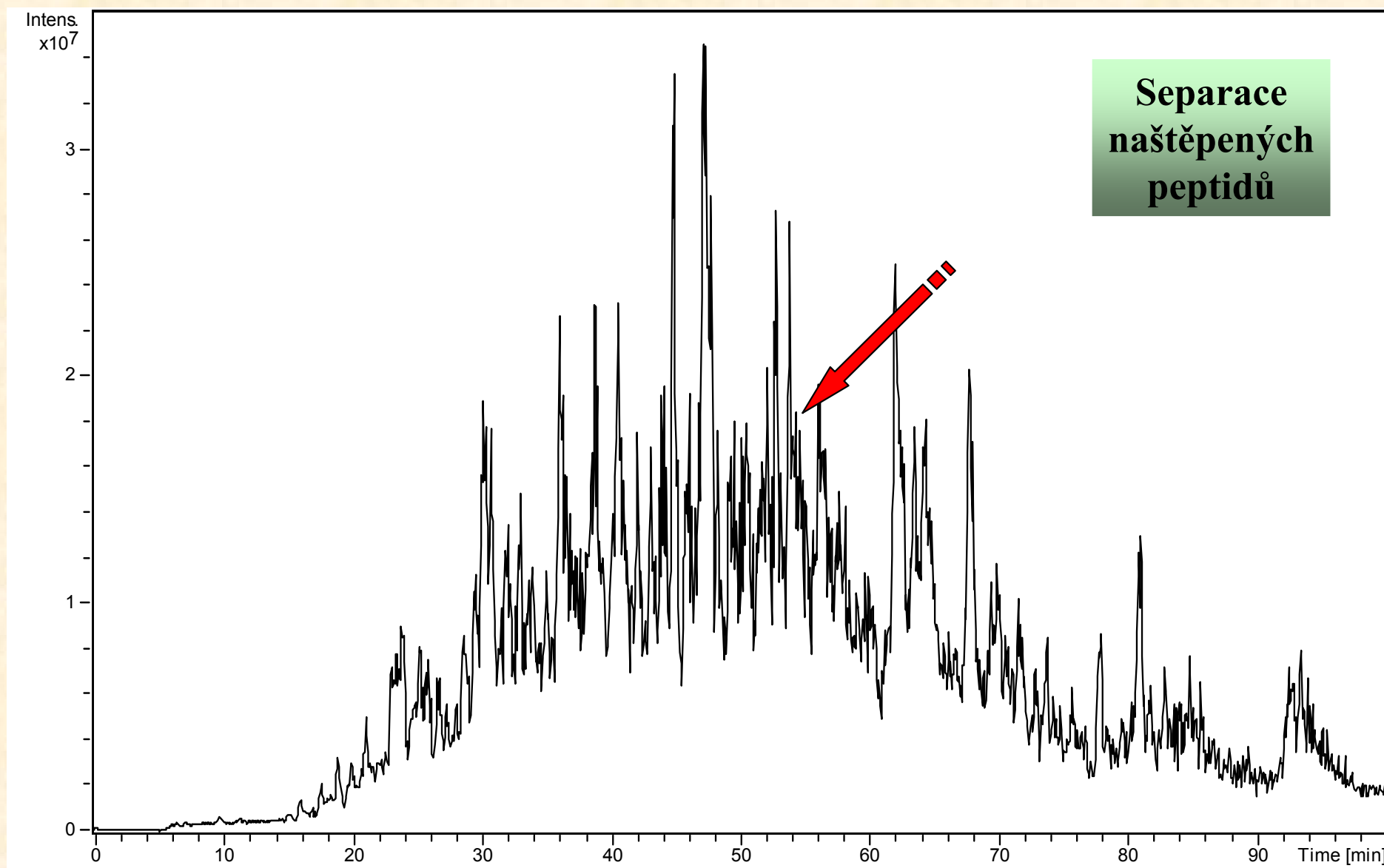
# Proteolytické štěpení (digesce)

**Specifické  
proteolytické  
štěpení**

**Na rozdíl od „modré varianty“ identifikace proteinů je enzymaticky štěpena celá směs proteinů najednou, opět za použití specifické proteázy (obvykle trypsin).**

**Takto vzniklá směs peptidů je pak separována a podrobena MSMS analýze.**

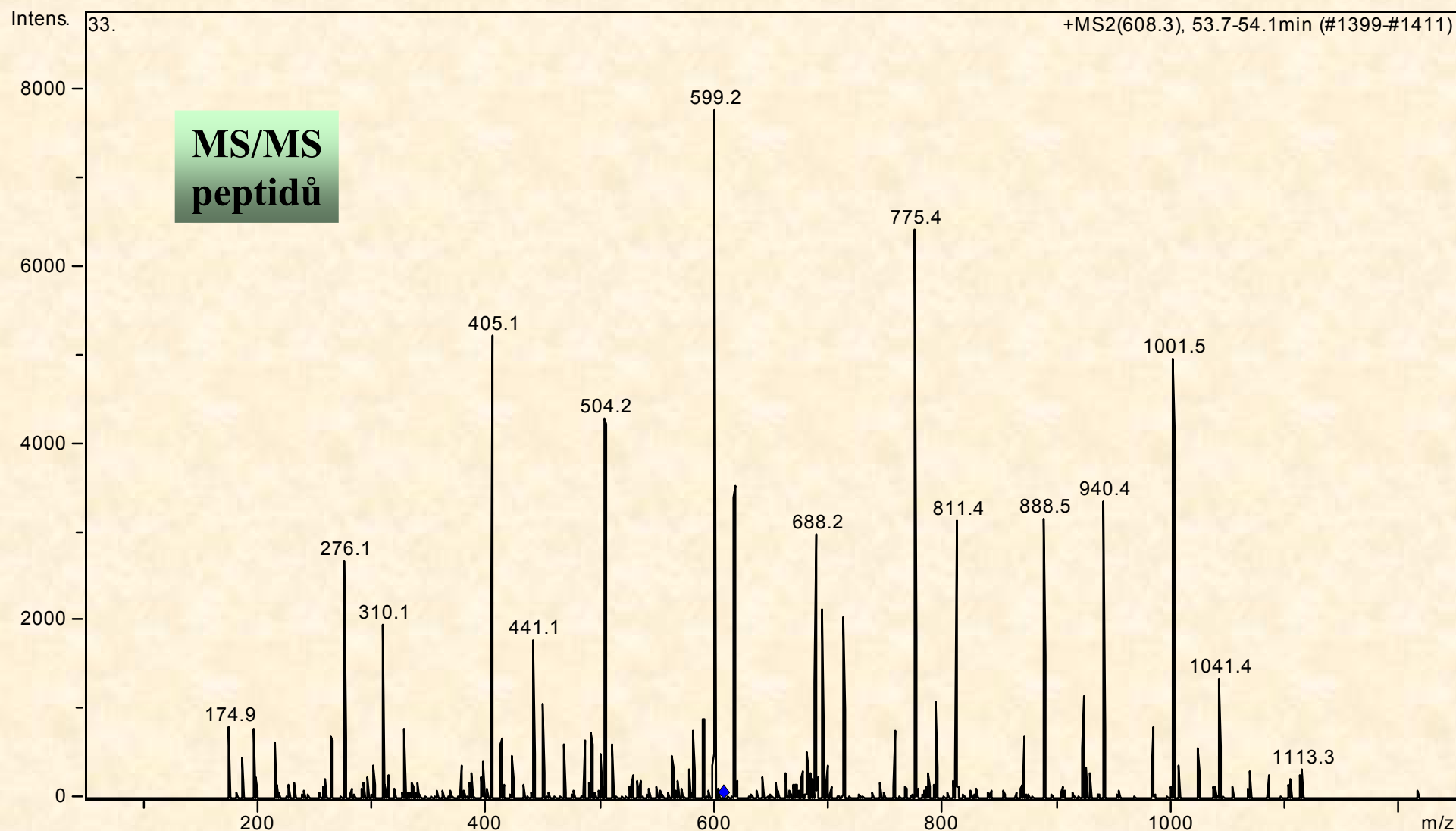
## Separace peptidů tryptického digestu směsi proteinů



Digest vzorku lidské plazmy separovaný kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií (LC-MSMS)



## MSMS spektrum tryptického peptidu (m/z 608.3, 2+)



MSMS spektrum obsahuje fragmenty peptidu vzniklé kolizní disociací v iontové pasti. Fragmenty nesou specifickou informaci o sekvenci peptidu.

# **Identifikace proteinu – MSMS databázové prohledávání**

Naměřené fragmentační mapy (soubory hmotností fragmentů vzniklých při kolizní disociaci jednotlivých peptidů) jsou prohledávány proti databázi proteinových sekvencí.

Prohledávací program si vytváří teoretickou peptidovou mapu proteinové sekvence v databázi, po té si od každého peptidu příslušné peptidové mapy připraví teoretickou fragmentační mapu a postupně je srovnává s experimentálně naměřenými fragmentačními mapami analyzovaných peptidů. Takto to provede pro každou proteinovou sekvenci v databázi.

Pro každý přiřazený peptid (MSMS spektrum) je spočítáno individuální skóre, hodnota skóre vyšší než limitní určuje signifikantní shodu mezi teoretickou a naměřenou fragmentační mapou.

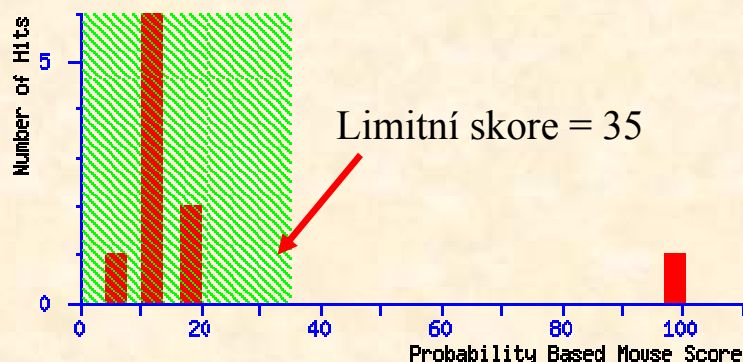
Míra shodnosti proteinu je vyjádřena celkovým skóre, které je součtem individuálních skóre peptidů přiřazených danému proteinu.

**Srovnání fragmentů  
jednotlivých peptidů  
s databázemi sekvencí**

# Výsledek databázového prohledávání MSMS

## Mascot Search Results

Database : SwissProt 51.2 (243975 sequences; 89639744 residues)  
Taxonomy : Homo sapiens (human) (15175 sequences)  
Timestamp : 16 Dec 2006 at 16:05:59 GMT  
Significant hits: **AACT\_HUMAN** Alpha-1-antichymotrypsin precursor (ACT) –  
Homo sapiens



Srovnání fragmentů  
jednotlivých peptidů  
s databázemi sekvencí

### Peptide Summary Report

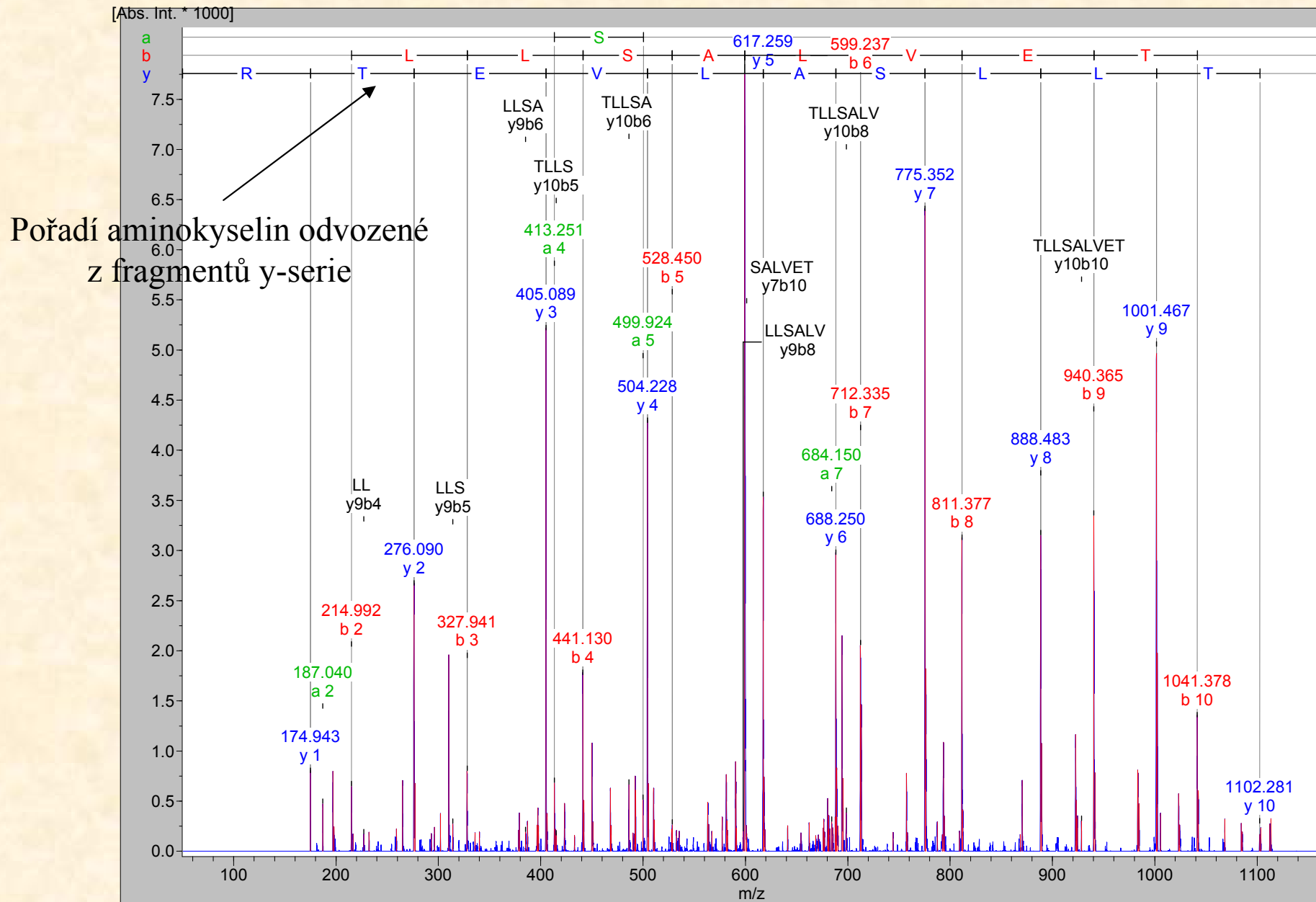
1. **AACT\_HUMAN** Mass: 47621 Score: **99** Queries matched: 1  
Alpha-1-antichymotrypsin precursor (ACT) Homo sapiens (Human)

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
1	608.3000	1214.5854	1214.7234	-0.1380	0	99	2.2e-08	1	K. <b>ITLLSALVETR</b> .T

Individuální skore peptidu

Díky variabilitě primární struktury proteinů lze určit jejich identitu na základě fragmentace (MSMS spektra) jediného peptidu.

# Vyhodnocené MSMS spektrum



Z rozdílů  $m/z$  (resp. hmotnosti) mezi sousedními ionty příslušné serie (**b**, **y**) lze zjistit identitu jednotlivých aminokyselin i jejich pořadí.

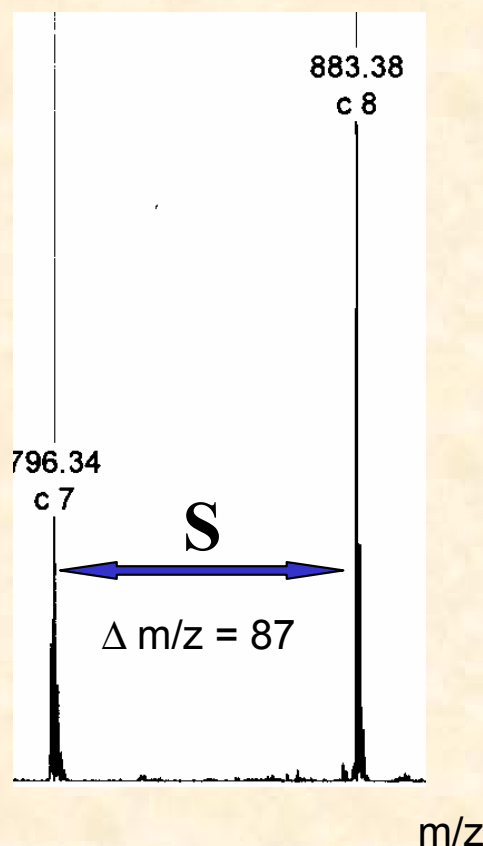
# Charakterizace proteinů pomocí MSMS

## *shrnutí*

Identifikace proteinů pomocí MSMS technik je daleko spolehlivější než metoda peptidového mapování (pomocí fragmentace můžeme ověřit přímo aminokyselinové složení peptidu včetně pořadí jednotlivých aminokyselin)

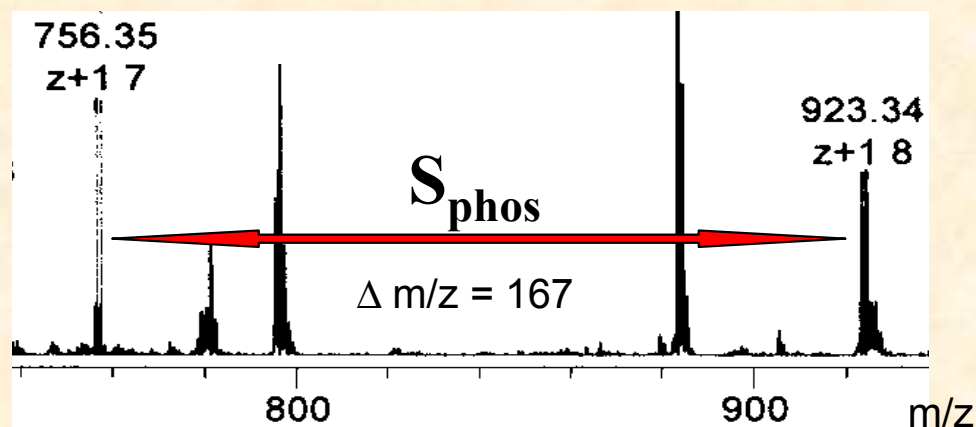
Pomocí MSMS technik lze určit i sekvence peptidů, resp. proteinů, které ještě nejsou v databázích (*de novo* sequencing)

MSMS techniky jsou účinným nástrojem pro vyhledávání posttranslačních modifikací, určování jejich druhu a místa modifikace, opět na základě rozdílů hmotností (resp.  $m/z$ ) charakteristických pro příslušné modifikace.



S – serin

S<sub>phos</sub> – fosforylovaný serin



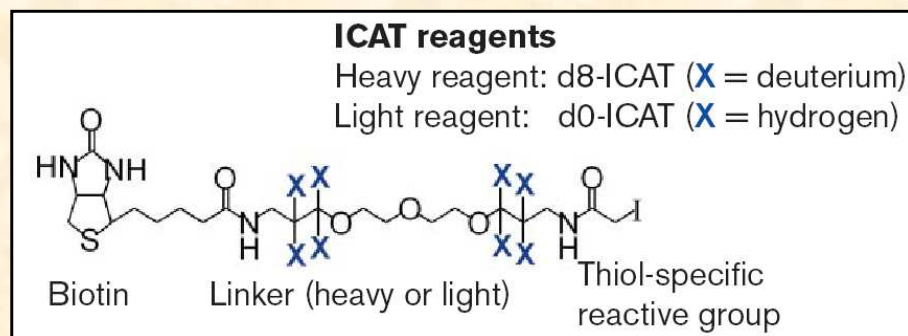
# Kvantifikace proteinů pomocí MS

Nejpoužívanější jsou metody relativní kvantifikace založené na srovnání dvou i více vzorků označených značkami o různé hmotnosti.

Výsledkem je pak poměr v jakém se příslušný protein vyskytuje v jednotlivých vzorcích. Takto lze určit zda je protein ve vzorku ve vyšší či nižší koncentraci oproti vzorku kontrolnímu, což je důležitá informace např. při studiu odezvy organismu na změněné podmínky, při studiu buněčných procesů či při diagnóze chorob.

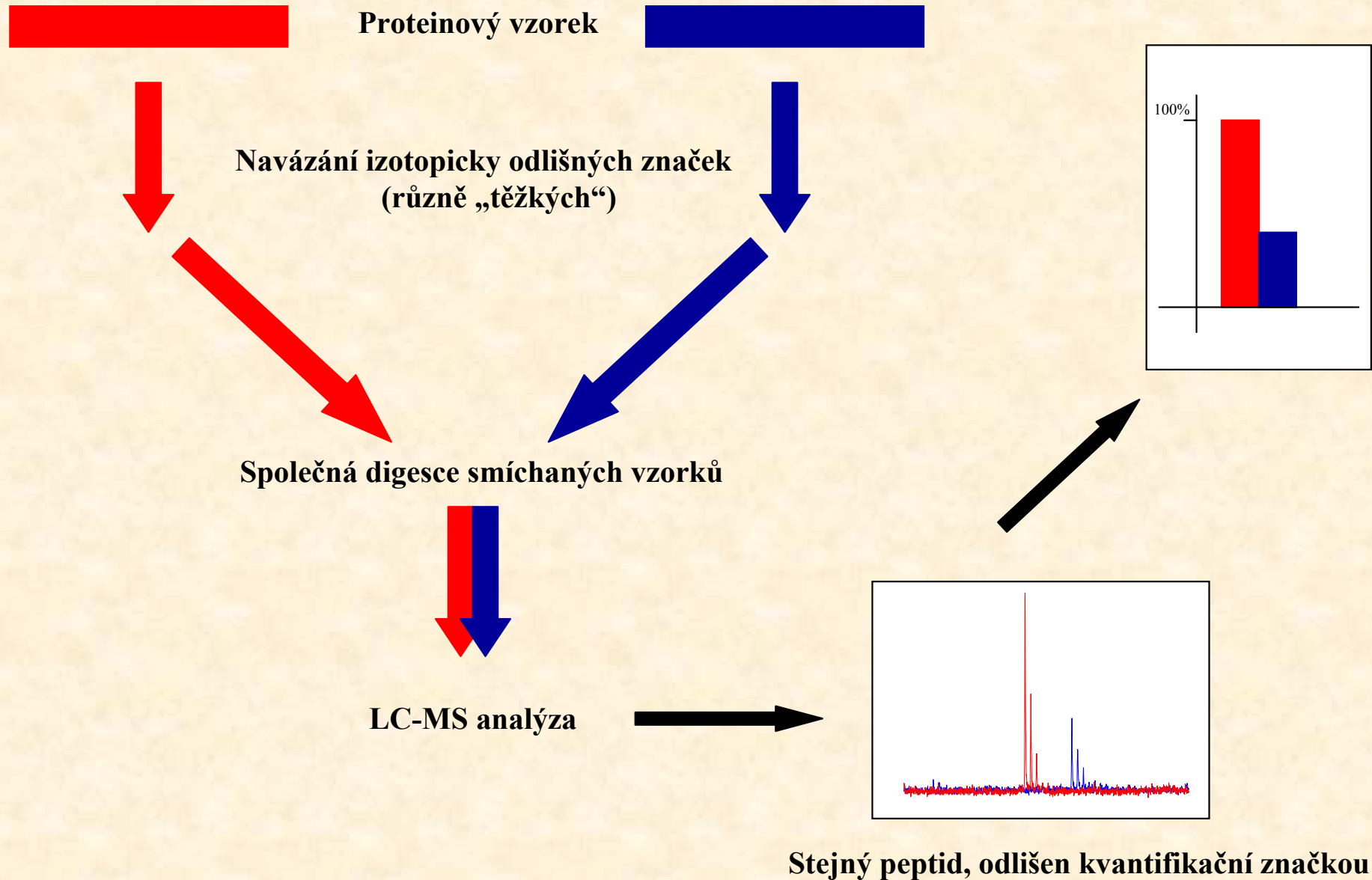
Značky jsou většinou izotopicky značené sloučeniny, které jsou navázány na analyzované proteiny, resp. digestované peptidy nebo jsou do proteinů zabudovány během buněčného růstu.

## Příklad kvantifikační značky







# Schéma kvantifikačního experimentu



## Závěr

-  Hmotnostní spektrometrie je nejrozšířenější metoda charakterizace proteinů zejména na úrovni jejich primární struktury.
-  Hmotnostní spektrometrie je významným pomocníkem, při studiu buněčných procesů, odezvy organismů na dané podmínky při odhalování mechanismu chorob, lze ji využít pro včasnou diagnostiku chorob ...