



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski seminar I.

NEDVOJBENA IDENTIFIKACIJA PROTEINA SPEKTROMETRIJOM MASA

Lucija Dončević

A. Butorac, M. Solak Mekić, A. Hozić, J. Diminić, D. Gamberger, M. Nišavić,
M. Cindrić, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **30** (2016) 1687-1694

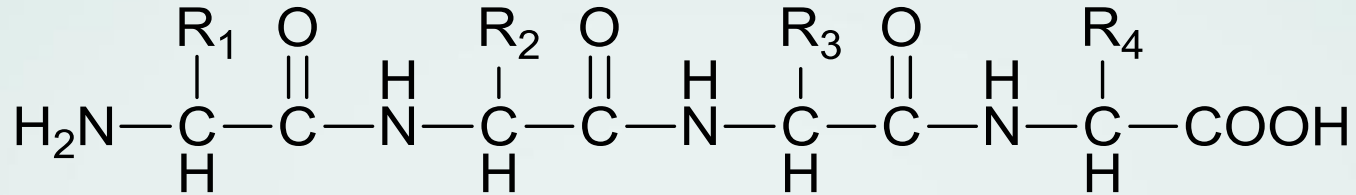


01

PROTEOMIKA

Proteom, sekvenciranje proteina,
identifikacija

UVOD



PROTEOM- skup proteina kodiranih genomom nekog organizma



PROTEINI- strukturno građeni od aminokiselina povezanih peptidnom vezom



AMINOKISELINE- poredane jedinstvenim slijedom u proteinu pojedinog organizma



SEKVENCIRANJE- poznavanje jedinstvenog slijeda aminokiselina



IDENTIFIKACIJA ORGANIZMA



PRIPREMA UZORKA

01

EKSTRAKCIJA

Razaranje stanica, tkiva ili organa kako bi se ekstrahirali proteini

02

DIGESTIJA

Odgradnja proteina proteinazama na peptide

03

DERIVATIZACIJA

Specifično obilježavanje N- ili C-kraja peptida

04

ANALIZA

Spektrometrija masa

05

INTERPRETACIJA REZULTATA

Asignacija pikova, kreiranje proteinske sekvence te identifikacija



ODGRADNJA PROTEINA

Tehnika odozgor nagore,
specifične proteinaze, tripsin



02

Specifične proteinaze

Najčešće korištene proteinaze za odgradnju proteina

Proteinaza	Mjesto cijepanja peptidne okosnice
Kimotripsin	FX, YX, WX, LX, MX, IX, SX, TX, VX, HX, GX, AX
Tripsin	KX, RX EX i DX u fosfatnim puferima
Glu-C	EX u NH_4HCO_3 puferu
Lys-C	KX, NX
Arg-C	RX, KX
Asp-N	XD, XC, XE
V8	EX

Peptidi sadrže bazične aminokiseline arginina ili lizina na C-kraju

Nastaju peptidi optimalne dužine (oko 30 aminokiselina) za analizu spektrometrijom masa

SPEKTROMETRIJA

MASA

Princip analize, ESI, MALDI, m/z

An abstract graphic design featuring organic, rounded shapes in shades of olive green, orange, and teal. A central teal circle with a black border contains the white number '03'. Other shapes include a white teardrop with a green circle, a large orange teardrop with a teal circle, and a smaller orange teardrop with a white circle. The background is a light blue gradient with scattered small dots in white, black, and teal.

03

01

IONIZATOR

Ionizacija molekula u plinovitom stanju

- Pozitivni $[M+H]^+$ ioni
- Negativni $[M-H]^-$ ioni

02

ANALIZATOR

Odjeljivanje iona na temelju omjera mase i naboja (m/z)

Moguća fragmentacija

03

DETEKTOR

Pretvorba električnog signala u spektar masa

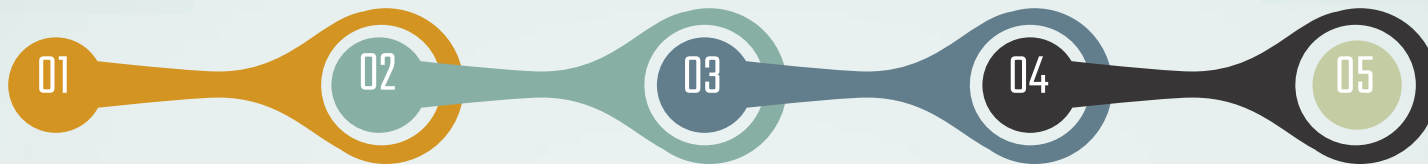
Pikovi predstavljaju m/z vrijednost detektiranog iona

1. ANALIZATOR

Odjeljivanje pepida
odabrane vrijednosti
 m/z - ION PREKURSOR

2. ANALIZATOR

Odjeljivanje nastalih
fragmenta samo
jednog pepida



IONIZATOR

Ionizacija pepida

FRAGMENTACIJA PEPTIDA

Cijepanje pepida
odabrane vrijednosti
 m/z

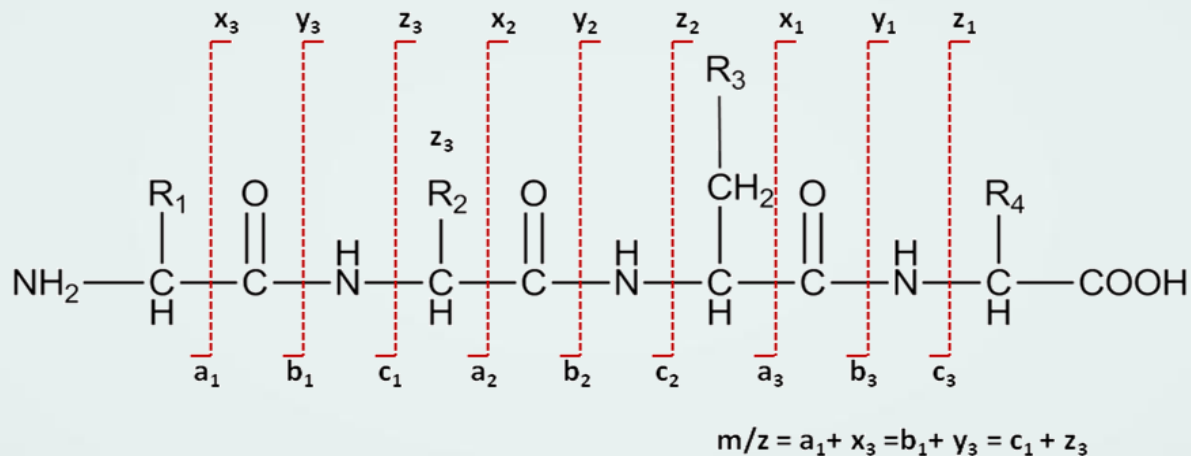
DETEKCIJA

KOLIZIJOM INDUCIRANA DISOCIJACIJA (CID) – ioni prekursori stupaju međusobno u interakciju ili u interakciju s inernim plinom (Ar, N₂, zrak, itd.)



Rezultat je fragmentacija iona prekursora, tj. pepida na specifičnim mjestima peptidne veze

Nomenklatura fragmentacije peptida



Ioni nastali fragmentacijom peptidnog iona prekursora označavaju se: a_n , b_n i c_n odnosno z_n , x_n i y_n ovisno o tome jesu li nastali cijepanjem C- odnosno N-kraja peptida



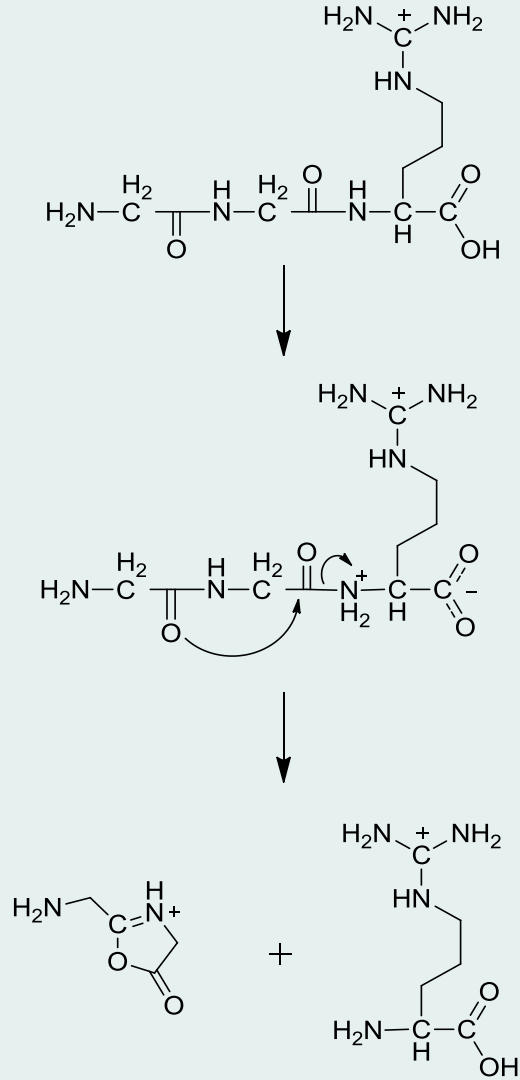
04

MODEL POKRETNOG IONA

- Energetski ili kinetički favorizirana mjesta za protonaciju u molekuli peptida - bazični bočni ogranci lizina ili arginina na C-kraju

- Povećanjem interne energije nastaju reaktivni međuprodukti - protonirani peptidni izomeri s protonom na dušikovom atomu peptidne veze

- Proton prisutan na dušiku reaktivnog međuprodukta migrira na kinetički favorizirano mjesto - dolazi do disocijacije peptidne veze i nastanka iona b- i y-serije



Identifikacija proteina

Identifikaciju proteina moguće je provesti na dva načina:

Pretraga proteomskih baza podataka

- Metoda otiska prsta mase peptida
- Eksperimentalno dobivene mase spektra uspoređuju se s masama peptida koji su teorijskim putem (*in silico*) nastali cijepanjem analiziranog proteina
- Pretraga cjelokupne baze podataka nije moguća
- Identifikacija moguća samo ukoliko nam je prethodno poznata taksonomska vrsta bića analiziranog proteina

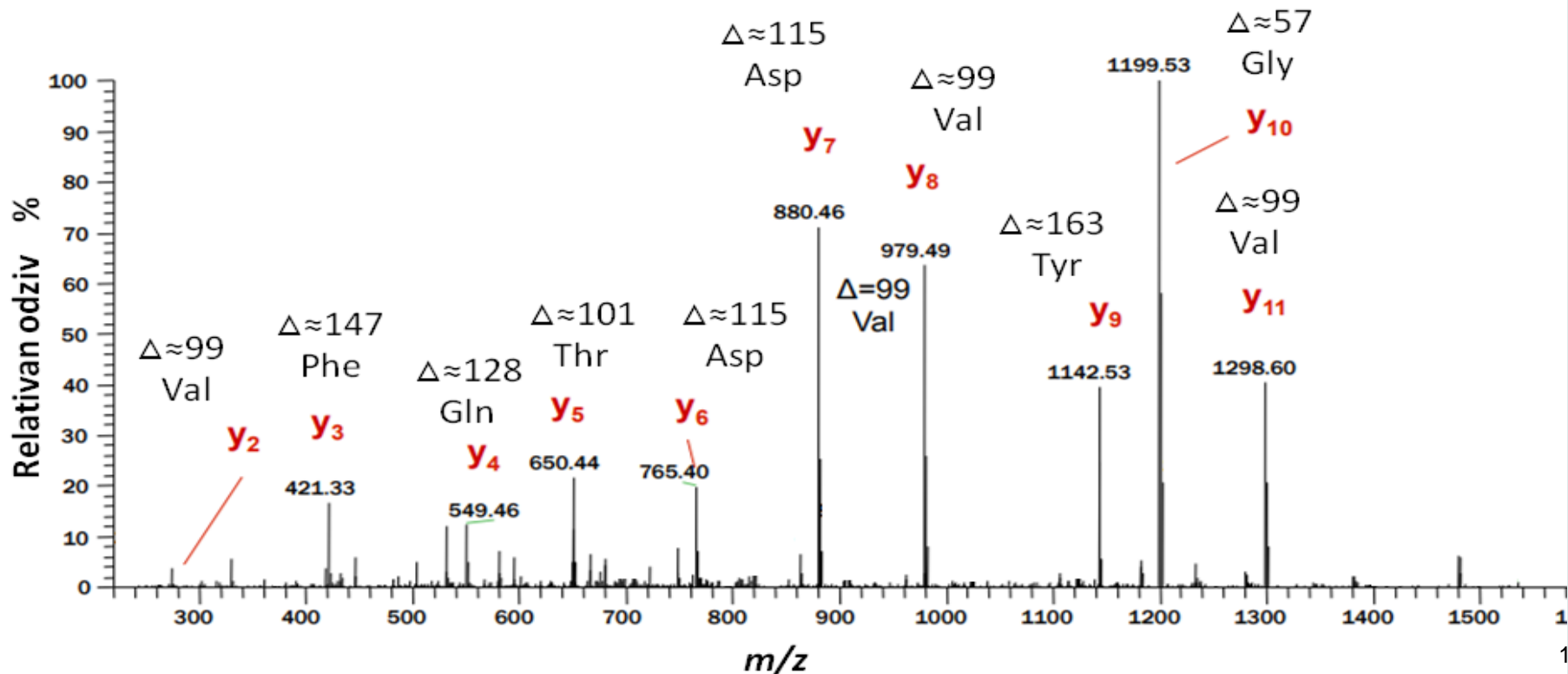
Sekvenciranjem proteina *de novo*

- Moguće identificirati i one proteine koji se ne nalaze u proteomskim bazama podataka
- Iz dobivenog MS spektra kreira se slijed aminokiselina, tj. slovni niz analiziranog peptida
- Identifikacija proteina provodi se iščitavanjem reverzne translacije
- Moguće pretražiti spektre u cjelokupnim bazama
- Moguće odrediti taksonomsku vrstu bića

11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 **y ioni**

F-I-I-V-G-Y-V-D-D-T-Q-F-V-R

2 3 4 6 7 8 9 10 11 12 13

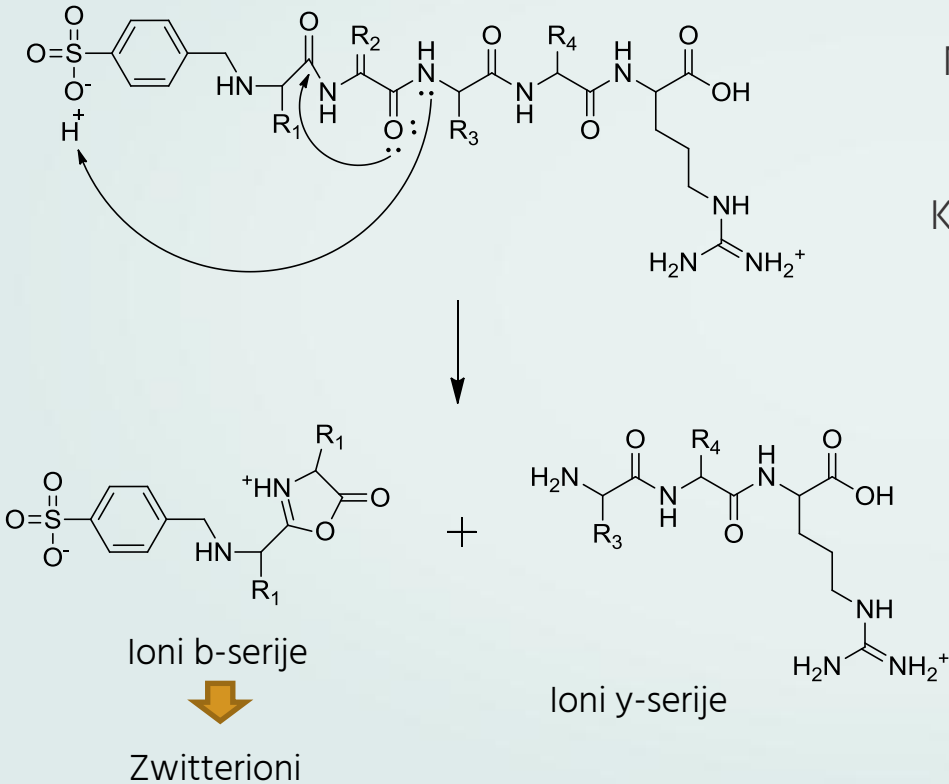




05

KEMIJSKO AKTIVIRANA FRAGMENTACIJA (CAF)

Sulfonacija N-kraja peptida



Nastaje Zwitterion $^{-}O_3-R-A_1-A_2-A_3-A_4-A_5-X^+$ koji u plinovitom stanju nosi pozitivan i negativan naboj

Kiseli se N-kraj peptida deprotonira, a bazične skupine lizin i arginin na C-kraju protoniraju

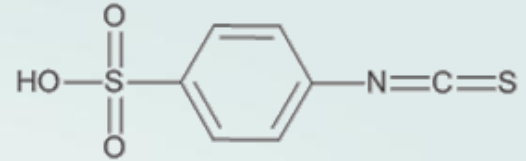
Amidne skupine postaju favorizirano mjesto protonacije

Disocijacija peptidne veze i nastaju ioni b- i y-serije

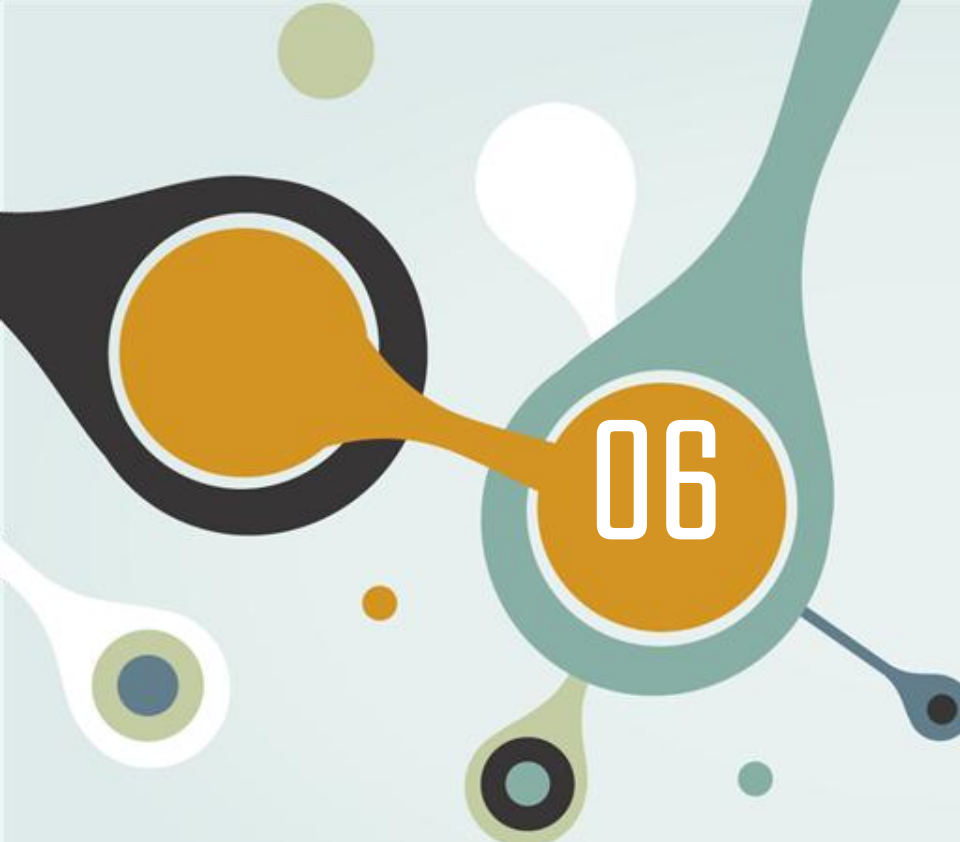
Zwitterioni nisu detektabilni – negativan se naboj neutralizira pozitivnim nabojem

SPITC reagens

4-sulfofenil-izotiocijanat



- Ograničenja sulfonacije N-kraja peptida = nespecifično vezanje CAF reagensa na bočne ogranke aminokiselina
- Izotiocijanatna skupina SPITC-a može se neželjeno vezati na prolin (pK_a 10,6), lizin (pK_a 110,5) i tirozin (pK_a 10,0) u peptidu dok je pK_a N-kraja peptida otprilike 8
- **Gvanidacija** – korak prije derivatizacije – često rezultira razrjeđenju uzorka peptida
- Rješenje! **Promjena pH otopine uzorka**
- Smanjenjem pH reakcijske otopine, izotiocijanatna skupina ima dovoljan afinitet vezanja na amino skupinu N-kraj peptida, ali nedovoljan za stupanje u reakciju s ostalim bazičnijim skupina



METODA NEDVOJBENE IDENTIFIKACIJE

Derivatizacija disulfoksi reagensom

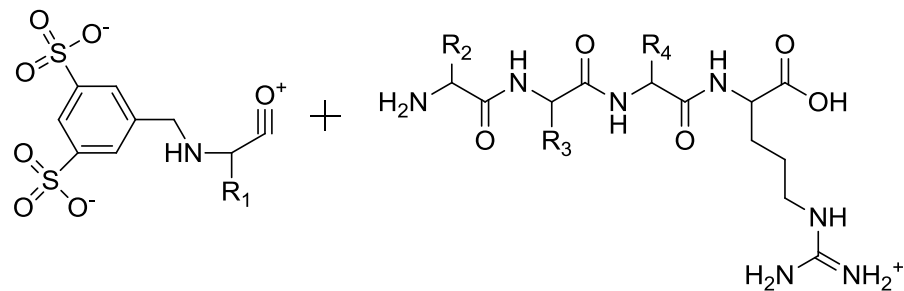
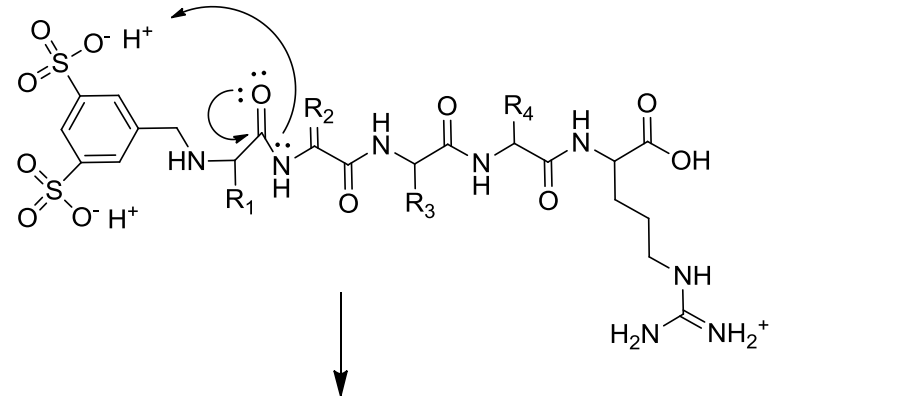
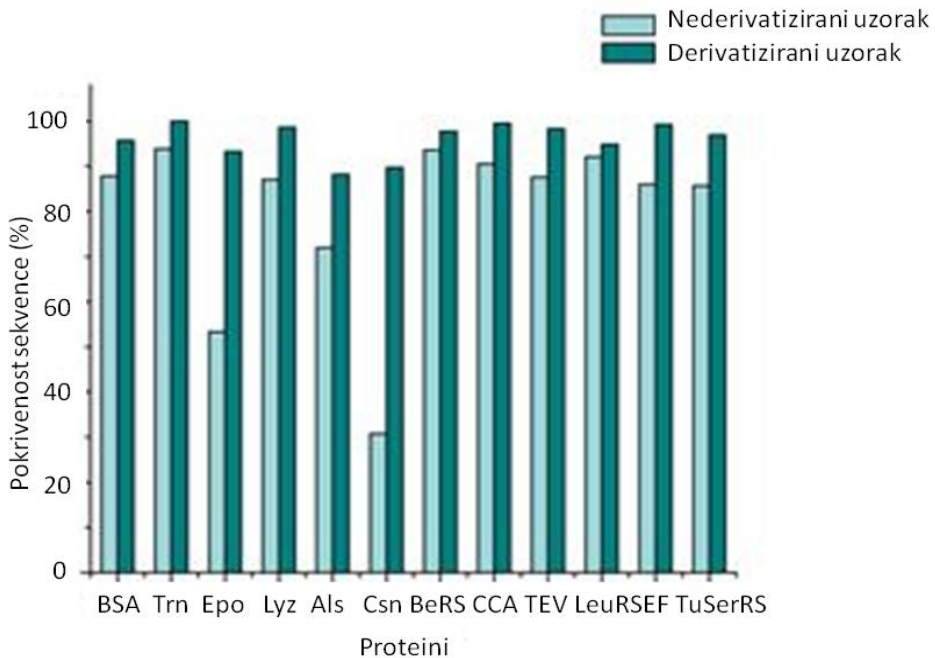
Disulfonski CAF reagens

Disulfonski CAF reagens obilježava N-kraj peptida i ima dvojaku ulogu:

1. omogućuje bolju ionizaciju i usmjerava fragmentacijski put iona,
 2. daje predominantnu seriju samo jednog tipa iona u pozitivnom načinu rada spektrometra masa i drugog tipa iona u negativnom načinu rada.
- Dodatkom još jedne sulfonske skupine nastaje b-ion negativnog naboja koji je moguće snimiti **negativnim načinom** rada MS-a

Analizom y- i b-iona istog uzorka, doprinosi većoj pokrivenosti peptidne sekvence proteina

Veća pokrivenost sekvence ujedno rezultira nedvojbenoj identifikaciji analiziranog proteina



Veća pokrivenost proteinske sekvence obilježenog uzorka za 59%

ZAKLJUČAK

1

CAF reagensi usmjeravaju mehanizam fragmentacije peptida

2

Nastaju ioni samo jedne serije (**y- i b-serije**) čime se lakše određuje aminokiselinski slijed analiziranih peptida

Jednostavni spektri omogućuju **nepogrješivu identifikaciju** čak i evolucijski srodnih bića

3

Omogućena identifikacija proteina pretragom preko **cijele baze do taksonomske vrste** analiziranog bića

4

HVALA!

lucija.doncevic@gmail.com

