

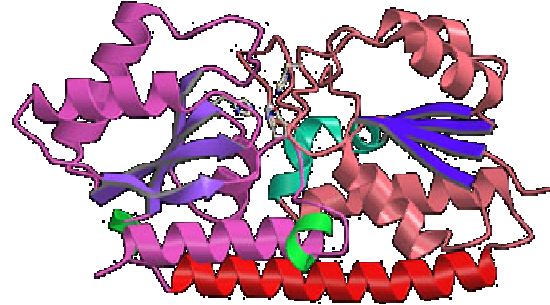


PROTEİN TANIMLANMASINDA MALDI-TOF KÜTLE SPEKTROMETRE YÖNTEMİ

Canan ÇOBANOĞLU

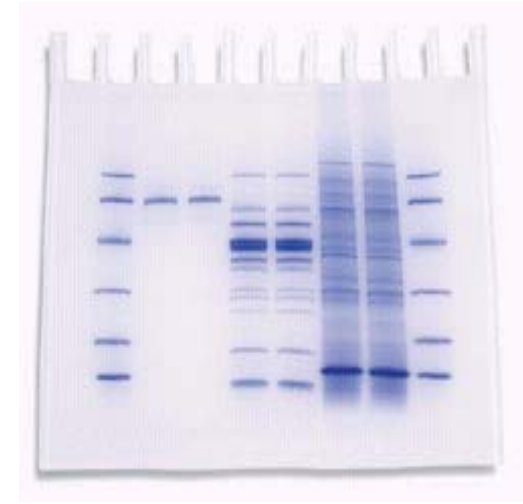
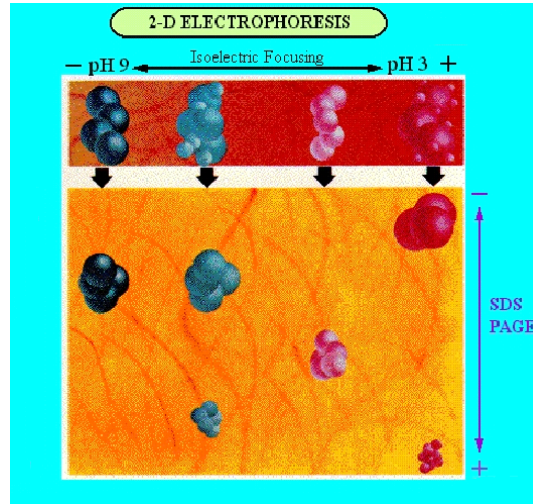
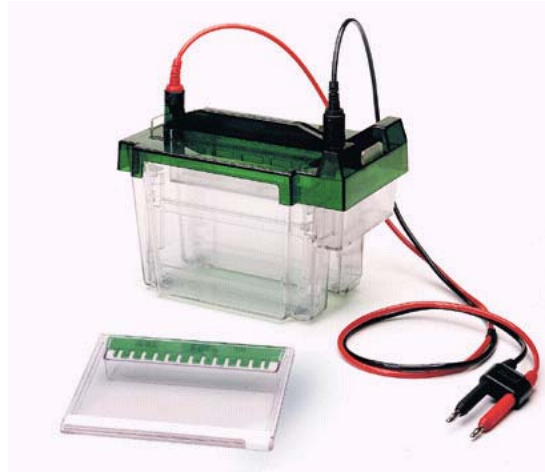
Protein Tanımlanmasındaki Yaklaşımlar

Bu protein nedir?



- Moleküler ağırlık
- İzoelektrik noktası
- Aminoasit kompozisyonu
- Diğer fiziksel/kimyasal özellikler
- Kısmi ya da tam aminoasit sekansı
 - Edman (N-terminal sekansı) - N-term. bloklanmamışsa
 - C-terminal sekansı – genellikle uygulanmaz
 - Kütle spektrometresi-ölçülen bilgi

Jel Elektrofrezisi Protein Tanımlanmasında Ne Kadar Yeterlidir?



- 1D ve 2D jel elektrofrezinden elde edilen bilgi, proteinleri tanımlamada yeterli değildir
- Proteinlerin moleküler ağırlıkları ve izoelektrik noktaları hakkında fikir sahibi olmamızı sağlar
- Posttranslasyon modifikasyonlar ve kesikler proteinlerin moleküler ağırlıklarını ve izoelektrik noktalarını etkileyebilir



Blot Digestion of Proteins

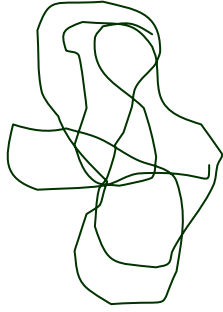
- Protein tanımlanmasında blot kullanımı 1990'ların ortalarında tercih edilen bir teknikti
- Jel üzerinde dikey doğrultuda elektrik alanı oluşturulur
- Proteinler jel içinde anoda doğru göç eder
- nitroselüloz gibi bir bağlanma membranına aktarılır
- Coomassie ya da gümüş boyama yapılır
- Başlangıçta edman degradasyonu ile birlikte proteinlerin tanımlanmasında kullanıldı
- MS analizi için gerekli protein prosesinin seçimini sağlayan bir metod oldu



- Metod blotta bulunan proteinin enzimatik parçalanmasına izin verecek şekilde modifiye edildi
- Blottaki noktalar kesip alınır ve Polyvinglpyrrolidone-40 (PVP-40) adlı bir ajanla muamele edilir
- PVP-40 membranı kaplar ve enzimin blotlanmış proteine ulaşmasına imkan sağlar

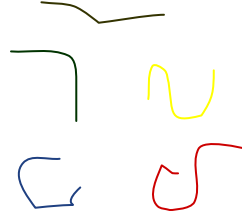


Protein Örneği



→
enzim

Peptidler



→

**MS
Analizi**

Enzim mekanizması iki reaksiyonun kombinasyonu ile etkin olur:

- Katı faz reaksiyonu:
Enzim tutunmuş proteini parçalar
- Solusyon reaksiyonu:
Fragmentlerin ileri düzey parçalanmasıdır. Blotlanmış proteinden peptid solusyonu oluşur. Bu peptid solusyonu MS analizi için kullanılır



Blot Tekniğinde Sınırlayıcı Faktörler

1-Blot kullanımı sıkıcı, yorucu ve çok zaman isteyen bir tekniktir

- 2D jel oluşturulacak
- Nitroseluloza elektrotransfer yapılacaktır
- Boyama yapılacaktır
- Boyalı noktalar kesilip çıkarılacaktır
- Noktalar PVP-40 ile muamele edilecektir
- Blotlanmış proteinler tripsin ile muamele edilecektir

2-Jelden blota aktarılan proteinlerde nicel uyumsuzluk görülmüştür

- Bazı proteinlerin aktarılma oranı yüksek iken bazıları neredeyse hiç aktarılamamıştır

3-Membran bloklanmasından sonra yetersiz yıkama nedeniyle PVP-40'ın taşınmaması

Proteinlerin Jelde Parçalanması

- 1990'ların başlarında geliştirildi
- Jel fikse edilir, proteinler boyanır, fark edilen noktalar jelden kesilerek alınır, uygun şekilde yıkanır ve jel parçalarına enzim solusyonu eklenir
- Enzimle jeli buluşturmak için jel parçaları iyice küçültülür
- peptidleri elde etmek için bir kaç basamağa daha ihtiyaç vardır



protein digestion robot

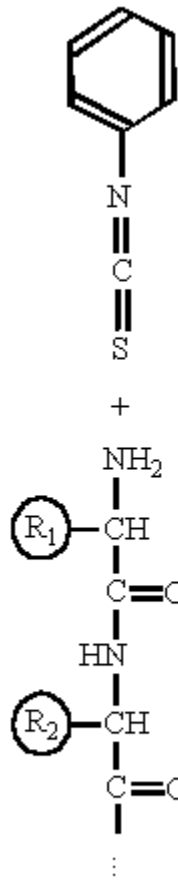
Edman Degradasyonu

- 1967 yılında Edman ve Begg adlı araştırmacılar tarafından “Protein Sequenator” adında bir teknik ortaya atıldı
- Proteinlerin N-terminal ucunu kullanarak aminoasitleri tek tek elde etmeye olanak saęlıyordu
- Daha sonra tekrarlayan kimyasal degradasyon döngüsüyle 20 a.a sekansı yapmak mümkün oldu



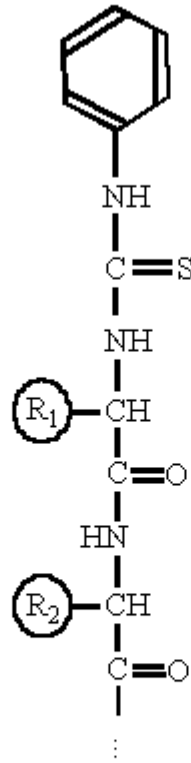
Edman Degradasyonu

Phenylisothiocyanate



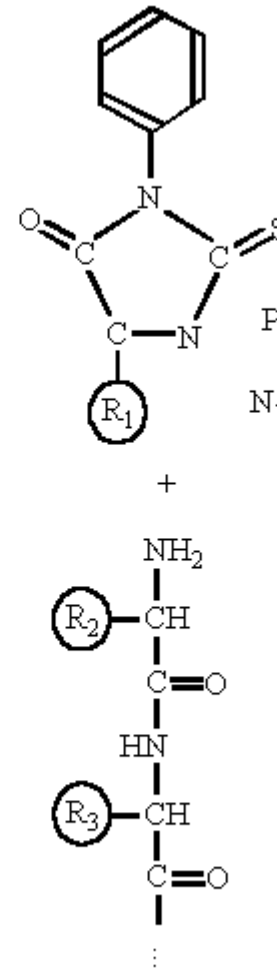
Polypeptide

base



Phenylthiocarbamoyl-polypeptide

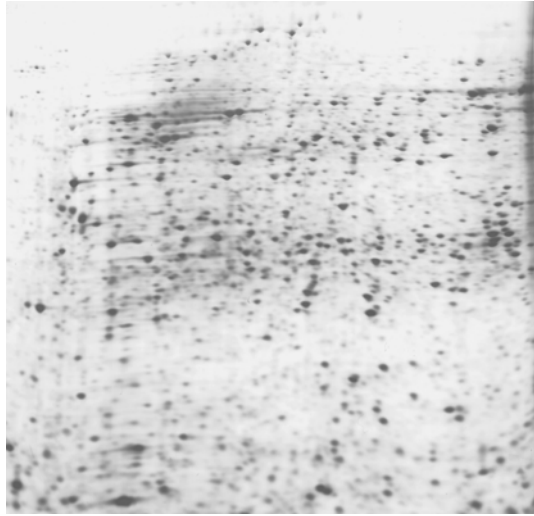
acid



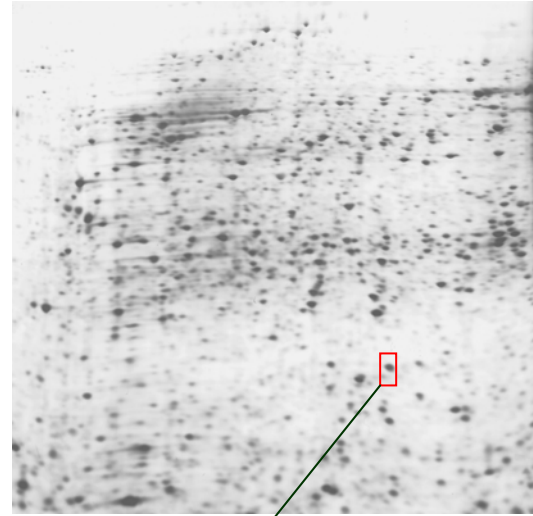
Phenylthiohydantoin
derivative of the
N-terminal amino acid

Polypeptide (N-1)

Edman Degradasyonuyla Mikrosekans Analizi



Electroblotting on a
inert membrane (PVDF
polyvinylidene
difluoride)



Nokta kesilir



Otomatik Edman degradasyonu



Kütle Spektrometresiyle Protein Tanımlanması

- Başlarda sıkıcı, yavaş ve çok fazla örneğe ihtiyaç duyan bir yöntemdi
- Yıllar sonra teknolojik gelişmeler ve genomik veritabanlarındaki değişiklikler bu tekniğin kullanım fikrinin gelişmesine yol açtı
- Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI)
- Time-of-flight (TOF)
- Elektrosprey iyonizasyonu (ESI) bu alanda devrim yarattı



2002 Kimya Nobel Ödülü

“Biyolojik makromoleküllerin yapısal analizi ve tanımlanması yöntemlerinin geliştirilmesi”

“Biyolojik makromoleküllerin soft desorpsiyon iyonizasyon metoduyla kütle spektrometrik analizi”

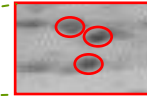
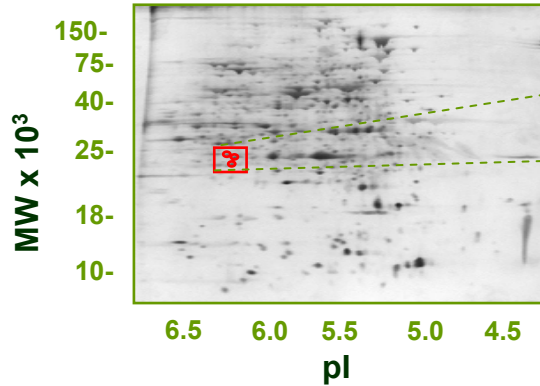


John Fenn

Koichi Tanaka

Kütle Spektrometresiyle Protein Tanımlanması

2-D Gel Electrophoresis



Kesip çıkarılan protein noktaları

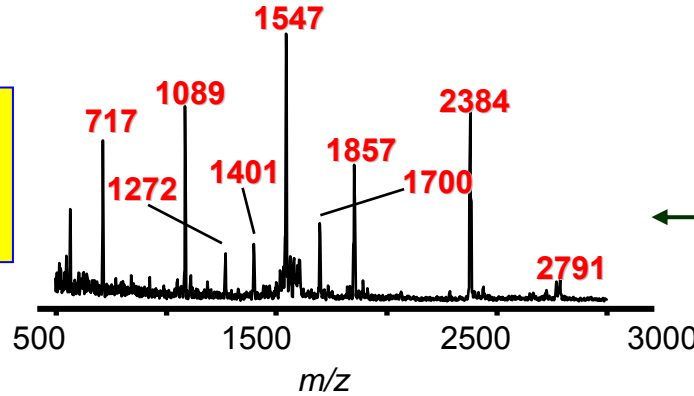


Jelde trypsinle müdahale

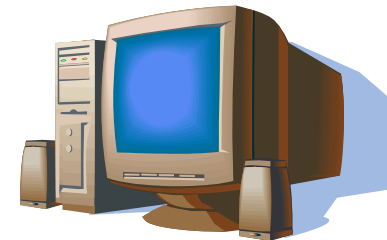


Yeniden tryptic peptidler elde edilir

MALDI-TOF veya LC-ESI-MS.
Peptid kütle fingerprint
MS/MS ile ek sekans bilgileri
elde edilebilir.



Proteomik veya genomik veritabanları kullanılarak protein tanımlanması





Kütle Spektrometresi

- Proteinlerin tanımlanmasında oldukça etkili bir yöntemdir
- Bu yöntem bize neler hakkında bilgi verir?
 - Protein dizileri
 - Posttranslasyonal modifikasyonları
 - Fosforilasyon
 - N- veya C- terminal modifikasyonları
 - Glikolizasyon
 - Proteinler arası ilişkileri



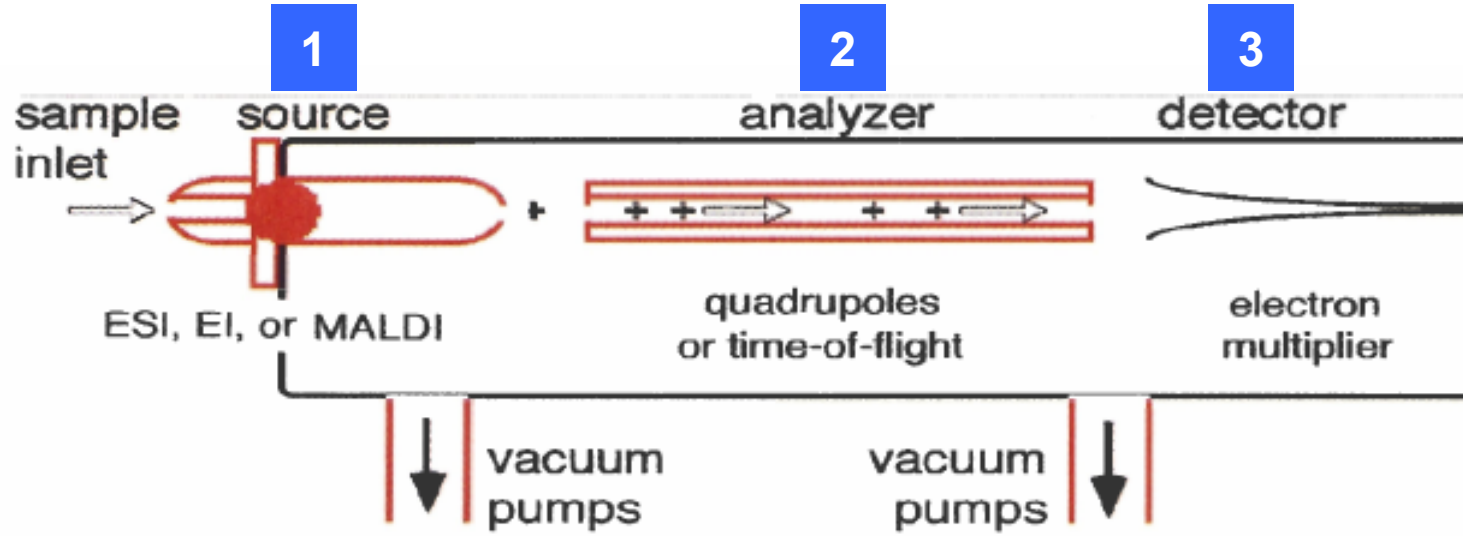
Kütle Spektrometrisi

- Moleküler ağırlığın iyon yüküne oranını ölçer (m/z)

Esas temeli;

- Peptidleri buharlaştırmak
 - Elektro-sprey
 - Lazer uygulaması
- İyonların miktarını belirlemek
 - İyon kapanı (Ion trap)
 - TOF

Kütle Spektrometresinin Ana Kısımları

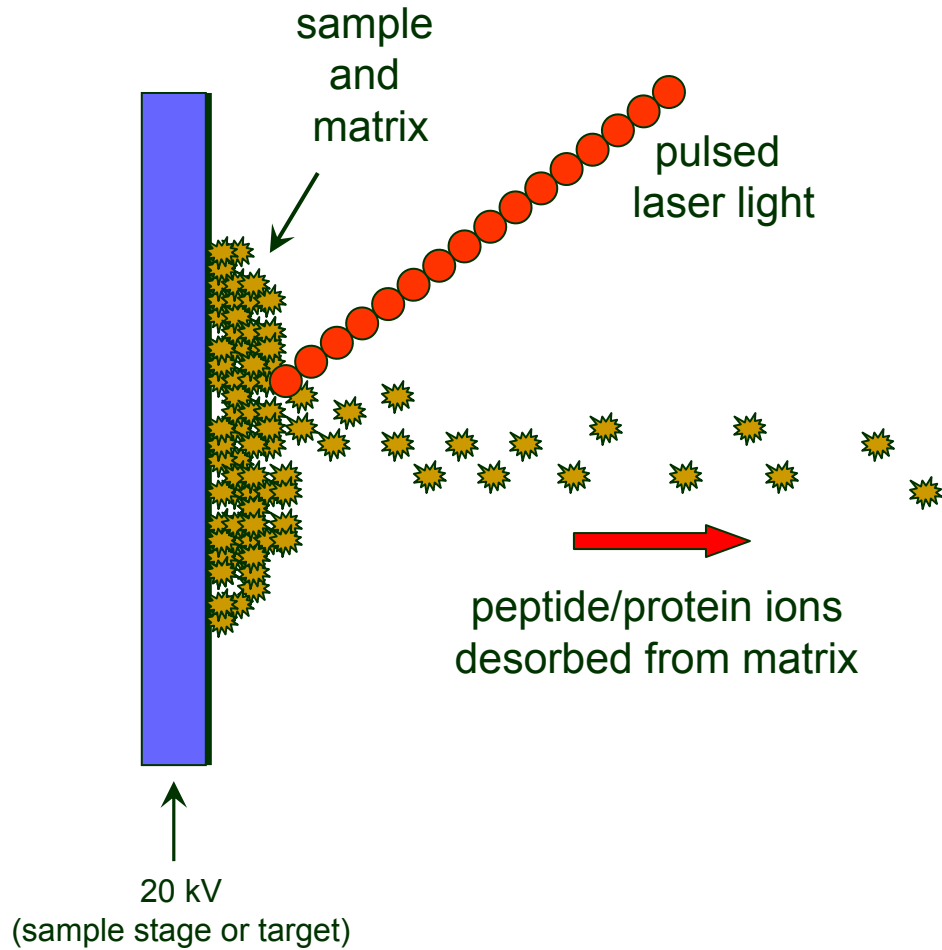


(1) İyon kaynağı: moleküler iyonların üretildiği ve kütle kararlılık birimine iletildiği ünedir (MALDI, ESI)

(2) Kütle kararlılık birimi (the mass analyzer): iyonlar m/z oranlarına göre ayrılır (TOF)

(3) İyon detektörü: Sinyaller belirlenir, ileri aşamalar için veriyi bilgisayara aktarır.

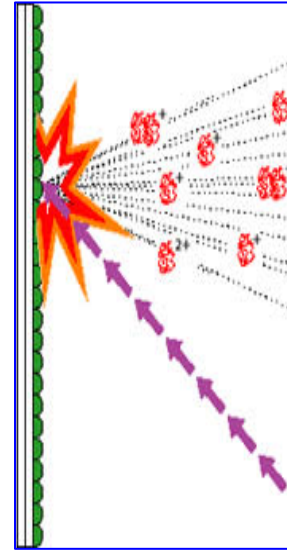
MALDI



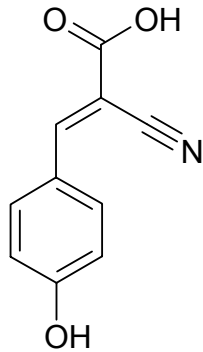
- Tanaka (Japonya) ve Hillenkamp/Karas (Almanya) tarafından geliştirildi
- Peptid analiti MALDI plağında uygun matriks içinde ko-kristalizasyona uğrar
- Plaka bir nitrojen (N_2) lazer tarafından 337 nm U.V. ışına maruz bırakılır
 - Matriks lazer enerjisini absorbe eder
 - Enerji yüzeyden analite transfer olur
 - Analit proton transferiyle iyonize hale geçer
 - İyonlar kütle analiz birimine aktarılır (TOF)

MALDI

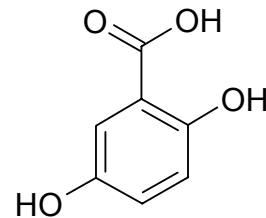
- Enerji pompalamanın en iyi yolu lazer ışınlaması yapmaktır.
- Bu nedenle lazer dalgaboyunu güçlü şekilde absorblayacak bir madde matriks olarak seçilir
- En uygun matriks maddesi aromatik moleküllerdir



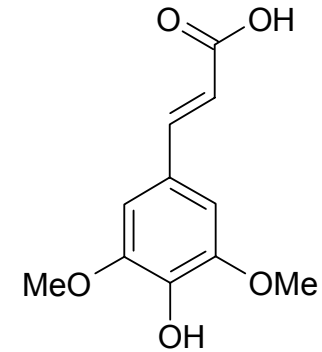
MALDI matriksleri



4-hydroxy- α -
cyanocinnamic
acid (“alpha-
cyano” or 4-
HCCA)
peptides

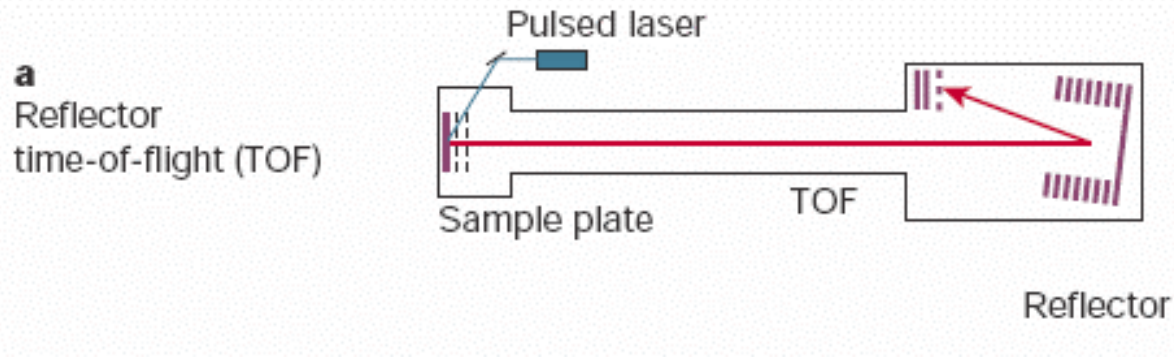


2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)
peptides and proteins



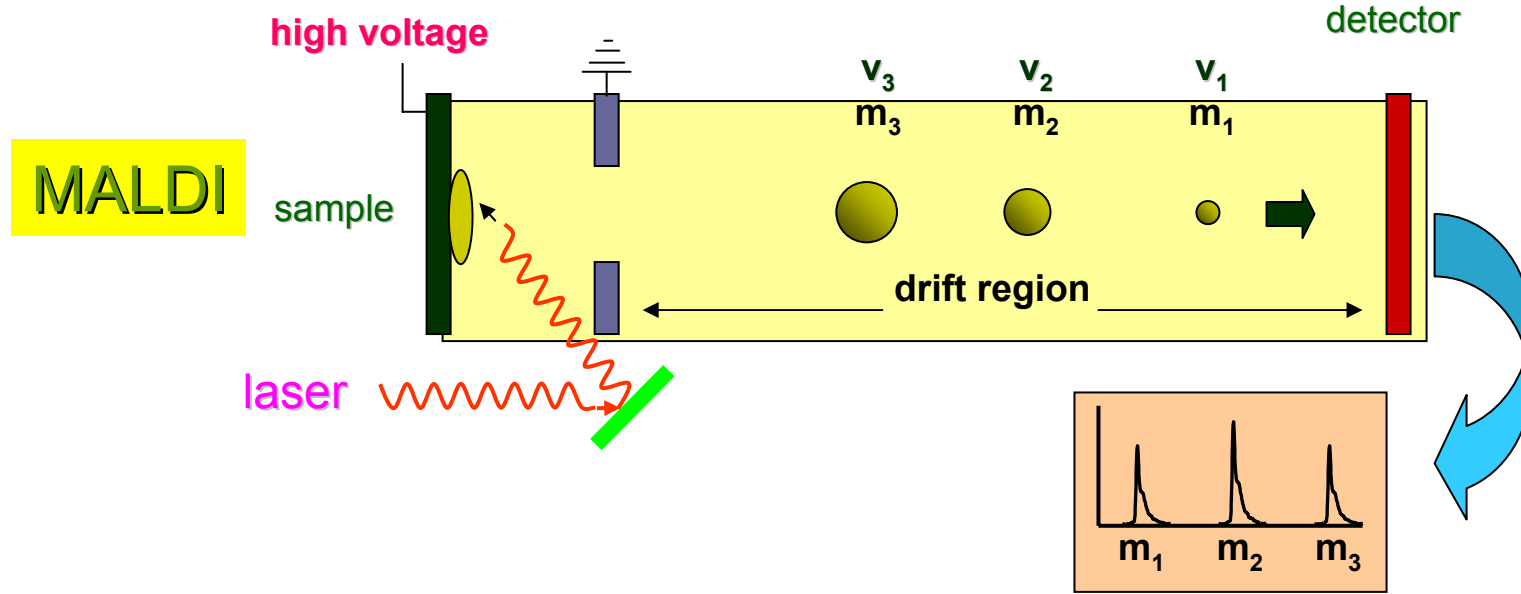
3,5-dimethoxy-4-
hydroxycinnamic
acid (sinapinic acid)
proteins

Time-of-flight (TOF)



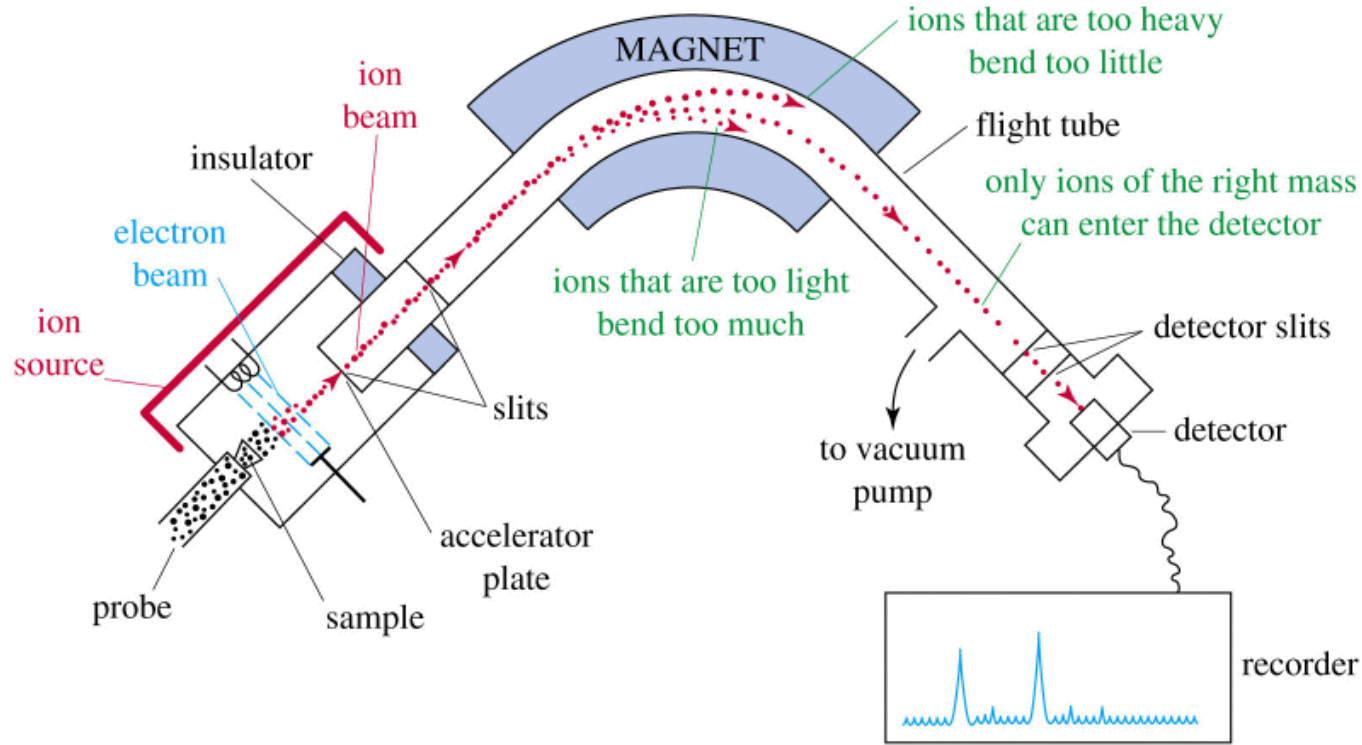
- TOF'da Reflektron Bir grup halkasal lensten oluşur ve bunlar bir yığın halinde bulunurlar. Sürekli artan bir yüksek potansiyel halkalara uygulanır
- Reflektron biriminde iyonlar yüksek kinetik enerjiyle ivmelendirilir.
- İyonlar flight tüpü boyunca hız farklılıklarına göre ayrılır.
- Detektöre çarpan iyonlar kuvvetlendirilerek sayılır

Time-of-Flight (TOF) Analyzer



- Hareket anında her peptid bir paket iyonla temsil edilir. Bu iyonlar dar bir aralıktaki kinetik enerjiye yani hıza sahip olarak hareket ederler.
- Hızlı hareket eden iyonlar reflektora ilk ulaşanlardır. Sahip oldukları yüksek kinetik enerjiden dolayı reflektorda daha fazla ilerlerler. Kinetik enerjileri sıfır oluncaya kadar bu hareket devam eder.
- Bu arada diğer iyonlar da reflektora giriş yaparlar. Bu iyonlar yönleri değiştirilmeden önce reflektora içinde daha az mesafe katederler (kinetik enerjileri daha az daha çabuk sıfır noktasına ulaşırlar). Bunun sonucunda yavaş hareket eden iyonlar iyon paketinin önündeyken hızlı hareket edenler arkasında kalır

MALDI-TOF Kütle Spektrometresi



- Moleküller aynı yüke sahip olduklarında kütleleriyle orantılı bir hıza sahip olacaklardır
- Genel olarak MALDI'de peptidler +1 yüklüdür
- Peptidler kütlelerine göre flight tüpün içinden geçerler ve farklı zaman aralıklarında detektöre çarparlar
- Kütle spektrometresi verileri kolayca m/z oranına dönüştürür.

MALDI-TOF Kütle Spektrometresi

- Jel elektroforezinden izole edilen proteinler enzimlerle parçalanır, tuzlarından arındırılır
- Kristalizasyon için doymuş matriks solusyonu içeren MALDI plağına aktarılır
- Lazer ışını uygulanır
- Hızlı enerji transferiyle plaka yüzeyinden iyon fırlatılır ve peptidleri gaz fazına dönüştürür
- MALDI plağına +20 ile +30 kV'larda yüksek voltaj uygulanır



- Pozitif yüklü peptidler flight tüpünün ağzına doğru hızlanır
- Peptidler ağız kısmına $(z/m)^{1/2}$ orantılı bir hızla ulaşırlar
- Peptidler ağız kısmını geçtikleri anda hepsi aynı kinetik enerjiye sahiptir ancak farklı kütlelerden dolayı aynı hıza sahip değildir
- Küçük kütleli iyonlar önce detektöre çarpar ve sinyal kaydedilir
- Veriler bilgisayar ortamında değerlendirilir



MALDI İçin Örnek Hazırlanmasında Farklı Yaklaşımlar

- Cleanup Prior to Spotting
- Spotting
- Cleanup Post Spotting
- On plate concentration



Cleanup Prior to Spotting

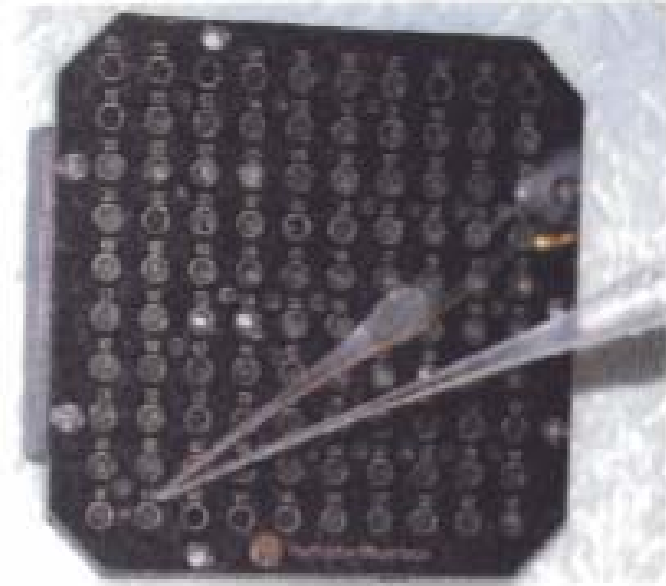
- Bu yaklaşım örneklerin tuzlardan ve polimerlerden ayrılmasında yararlı olmuştur.
- Ziptips adlı pipet uçlarına ya da kolonlara tampon bir polimerik destek içinde reverse faz materyali gömülür.
- Reverse faz materyal taneleri polimer içine iyice yayılır
- Analit sıvısı buradan kolaylıkla akar
- Orta ve yüksek seviyedeki peptid karışımlarının temizlenmesinde yararlı Ancak düşük miktardaki peptid karışımlarını analiz etmek bu yöntemle oldukça zordur.

Spotting

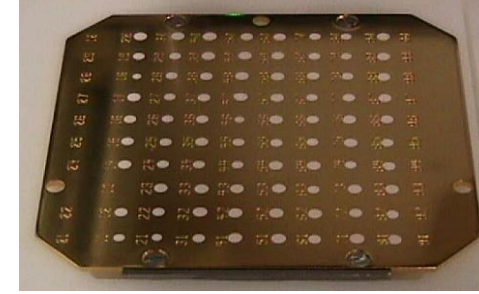
- Küçük miktarlardaki peptidlerin analizi için
- “Dried Droplet” metodu
- Bu yöntemde peptid karışımının suyu çekildi ve α -cyano-4-hydroxycinnamic asit ile doyurulmuş asitli su içinde asılı bırakılır
- Bu organik karışımdan 1 mikrolitre MALDI plağının içine konular ve kurumaya bırakılır
- Bu yöntem örnek hazırlanması için hızlı bir yoldur ancak en duyarlı yol değildir
- “Two-layer” metodu
- İlk önce α -cyano-4-hydroxycinnamic asit solüsyonu MALDI plağının üzerine konular ve bir mikrokristal tabakası oluşturması için kurumaya bırakılır
- Daha sonra matriks ve analit solüsyonu ilk tabakanın üzerine konular ve kurumaya bırakılır
- Bu yöntem oldukça sıkıcı olmasına rağmen analizde daha temiz bir spektra verir. Ayrıca bu metod otomatikleştirilebilir

Cleanup Post Spotting

- Bu yöntem bir spotting yönteminin hemen ardından uygulanır.
- Bir su damlası MALDI plağının üzerindeki her bir spota eklenir ve su damlası uçurular ve spotlar kurumaya bırakılır. Bu basamak tuzlar ve kurutulmuş kristaldeki hidrofilik moleküllerin eldesini sağlar



On plate concentration



- Analit konsantrasyon artışı gözlemlenen sinyali artırabilir
- Örnek miktarı kısıtlı olduğunda yoğunluğu artırmanın tek yolu spotun büyüklüğünü azaltmaktır
- MALDI plakları küçük ve hidrofilik spotting bölümleriyle hazırlanır fakat plağın diğer kısmı hidrofobiktir
- Bir damla peptid solusyonu spot üzerine konulduğunda hidrofobik çevre ve yüzey gerilimi damlanın yüzeyle temasını kısıtlayacak bir şekil almasına zorlar
- Damla kururken küçük hidrofilik paze üzerinde yoğunlaşır.
- Sonuç; MALDI plağı üzerinde küçük bir alanda yüksek bir konsantrasyondur



Post-Source Decay

- Fazla enerji peptidlerde(iyonlarda) kırıklara yol açar. Bu iyonlar düşük kinetik enerjilerinden dolayı genellikle MALDI-TOF analizlerinde görülmez
- Ancak refletron üzerindeki ayarlar değiştirilerek düşük enerjili peptid kırıkları tespit edilebilir
- PSD, refletron üzerindeki farklı ayarlı özel kütle dağılımı için spektra alınmasıyla gerçekleştirilir. Daha sonra bütün spektra birleştirilir.
- PSD, peptidlerin kırık patternlerinin eldesinde hızlı bir yol gibi görünse de ciddi olarak duyarlılıktan uzaktır. Ayrıca kırık patternleri ayırt etmek sıklıkla zordur. Bu nedenle tercih edilen bir yöntem değildir



Veritabanları

- PepSea ve MS-Fit
(<http://prospector.ucsf.edu>)
- MOWSE ve Mascot
(<http://www.matrixscience.com/>)
- Profound (<http://prowl.rockefeller.edu/>)



Kütle Spektrometrik Verilerle Proteinlerin Tanımlanmasında Kullanılabilecek Web Adresleri

Program	Web Address
BLAST	http://www.ebi.ac.uk/blastall/
Mascot	http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/home.html
MassSearch	http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/ServerBooklet/MassSearchEx.html
MOWSE	http://srs.hgmp.mrc.ac.uk/cgi-bin/mowse
PeptideSearch	http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptidesearchpage.html
Protein Prospector	http://prospector.ucsf.edu/
Prowl	http://prowl.rockefeller.edu/
SEQUEST	http://fields.scripps.edu/sequest/

Mascot (Matrix Science) for peptide mass fingerprints

The screenshot shows the Mascot web interface in a Microsoft Internet Explorer browser window. The page title is "Mascot: Peptide Mass Fingerprint". The interface includes a navigation menu on the left with links like HOME, MASCOT HELP, WHAT'S NEW, PRODUCTS SUPPORT, SITE SEARCH, LINKS, EMPLOYMENT, and CONTACT US. The main form contains several input fields and dropdown menus for search parameters: "Your name" (Joe), "Email" (jloo@chem.ucla.edu), "Search title" (Chem 266 example), "Database" (NCBInr), "Taxonomy" (All entries), "Enzyme" (Trypsin), "Allow up to" (1 missed cleavages), "Fixed modifications" (AB_old_ICATd0 (C), AB_old_ICATd8 (C), Acetyl (K), Acetyl (N-term), Amide (C-term)), "Variable modifications" (O18 (C-term), Oxidation (M), Oxidation (HW), PEO-Biotin (C), Phospho (ST)), "Protein mass" (kDa), "Peptide tol. ±" (0.2 Da), "Mass values" (MH⁺ selected, M_r unselected), "Monoisotopic" (selected), "Average" (unselected), "Data file" (Browse...), "Query" (1116.67, 1247.70, 1287.73, 1375.76, 1424.85, 1505.77), "Overview" (checkbox unselected), "Report top" (20 hits), "Start Search ..." button, and "Reset Form" button. A dropdown menu for "Taxonomy" is open, showing a list of taxonomic categories including Drosophila (fruit flies), Chordata (vertebrates and relatives), bony vertebrates, lobe-finned fish and tetrapod clade, Mammalia (mammals), Primates, Homo sapiens (human), Other primates, Rodentia (Rodents), Mus, and Mus musculus (house mouse). A yellow box with the text "enter peak list" has a green arrow pointing to the "Query" input field. Another green arrow points to the "Taxonomy" dropdown menu. The footer contains copyright information: "Copyright © 2000 Matrix Science Ltd. All Rights Reserved. Last Updated 04/30/2003 18:07:22".

Mascot: Peptide Mass Fingerprint

Search Parameters:

- Your name: Joe
- Email: jloo@chem.ucla.edu
- Search title: Chem 266 example
- Database: NCBInr
- Taxonomy: All entries
- Enzyme: Trypsin
- Allow up to: 1 missed cleavages
- Fixed modifications: AB_old_ICATd0 (C), AB_old_ICATd8 (C), Acetyl (K), Acetyl (N-term), Amide (C-term)
- Variable modifications: O18 (C-term), Oxidation (M), Oxidation (HW), PEO-Biotin (C), Phospho (ST)
- Protein mass: kDa
- Peptide tol. ±: 0.2 Da
- Mass values: MH⁺ M_r
- Monoisotopic: Average
- Data file: Browse...
- Query: 1116.67, 1247.70, 1287.73, 1375.76, 1424.85, 1505.77
- Overview:
- Report top: 20 hits
- Start Search ...
- Reset Form

Taxonomy List:

- All entries
- Drosophila (fruit flies)
- Chordata (vertebrates and relatives)
- bony vertebrates
- lobe-finned fish and tetrapod clade
- Mammalia (mammals)
- Primates
- Homo sapiens (human)
- Other primates
- Rodentia (Rodents)
- Mus.
- Mus musculus (house mouse)

enter peak list

Copyright © 2000 Matrix Science Ltd. All Rights Reserved. Last Updated 04/30/2003 18:07:22

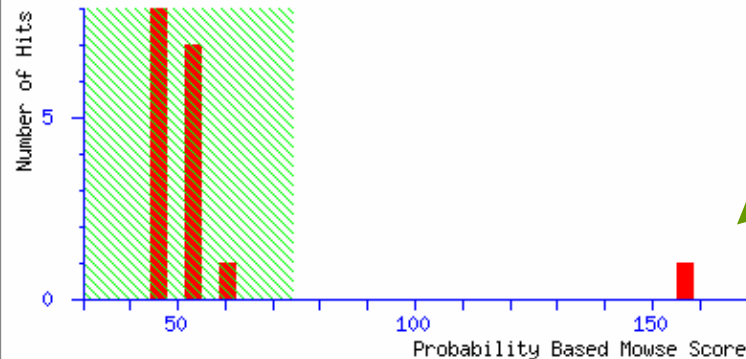
Mascot (Matrix Science) for peptide mass fingerprints

{MATRIX} Mascot Search Results *{SCIENCE}*

User : Joe
Email : jloo@chem.ucla.edu
Search title : Chem 266 example
Database : NCBI nr 20030426 (1418929 sequences; 456730478 residues)
Timestamp : 1 May 2003 at 01:09:31 GMT
Top Score : 157 for **gi|15801397**, cell division inhibitor, a membrane ATPase, activates minC [Escherichia coli O1

Probability Based Mowse Score

Score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 74 are significant ($p=0.05$).



possible identification

Concise Protein Summary Report

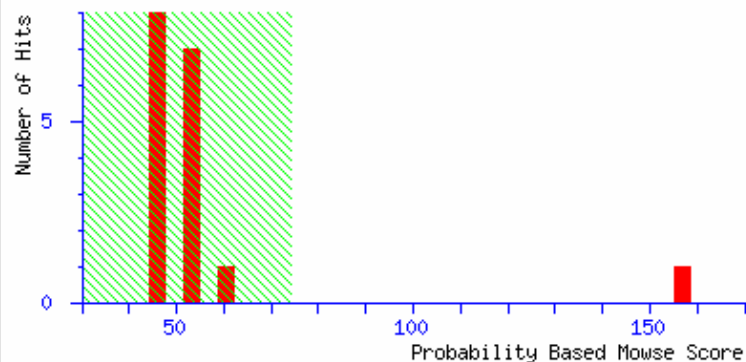
[Switch to full Protein Summary Report](#)

To create a bookmark for this report, right click this link: [Concise Summary Report \(Chem 266 example\)](#)

Re-Search All

Search Unmatched

Mascot (Matrix Science) for peptide mass fingerprints



Concise Protein Summary Report

[Switch to full Protein Summary Report](#)

get more info on probable proteins

To create a bookmark for this report, right click this link: [Concise Summary Report \(Chem 266 example\)](#)

Re-Search All

Search Unmatched

- | | | | |
|---|-------------|-------------------------|----------------------|
| gi 15801397 | Mass: 29596 | Total score: 157 | Peptides matched: 10 |
| cell division inhibitor, a membrane ATPase, activates minC [Escherichia coli O157:H7 EDL933] | | | |
| gi 16765156 | Mass: 29482 | Total score: 114 | Peptides matched: 8 |
| cell division inhibitor, a membrane ATPase, activates MinC, directs division apparatus to middle of cell by oscillating | | | |
| gi 16760705 | Mass: 29508 | Total score: 95 | Peptides matched: 7 |
| septum site determining protein [Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi] | | | |
| gi 2982289 | Mass: 14233 | Total score: 59 | Peptides matched: 4 |
| 60S ribosomal protein L17 [Picea mariana] | | | |
| gi 28262885 | Mass: 73276 | Total score: 56 | Peptides matched: 6 |
| excinuclease ABC subunit C [Rickettsia sibirica] | | | |
| gi 15892787 | Mass: 73307 | Total score: 56 | Peptides matched: 6 |
| excinuclease ABC subunit C [Rickettsia conorii] | | | |
| gi 443085 | Mass: 18625 | Total score: 54 | Peptides matched: 4 |
| Lysozyme (E.C.3.2.1.17) Mutant With Gln 105 Replaced By Glu (Q105e) | | | |
| gi 230094 | Mass: 18625 | Total score: 54 | Peptides matched: 4 |
| Lysozyme (E.C.3.2.1.17) (Mutant With Asn 116 Replaced By Asp) (N116D) | | | |

list of all possible matches