

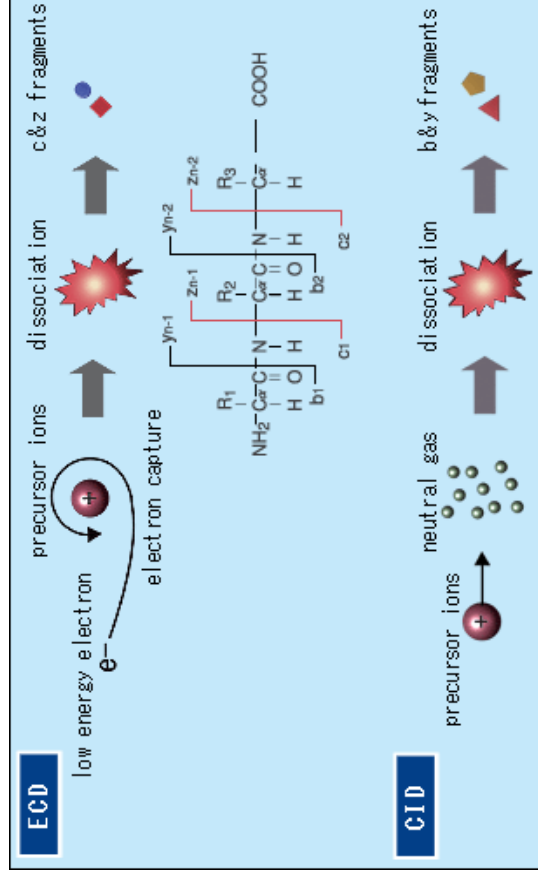
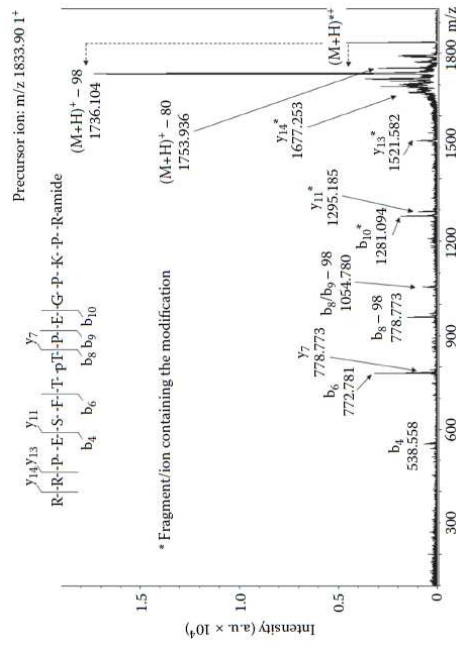
Žalec, 10. 11. 2012

MAPIRANJE POST-TRANSLACIJSKIH MODIFIKACIJ PROTEINOV Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Eva Knapič in Alja Zottel

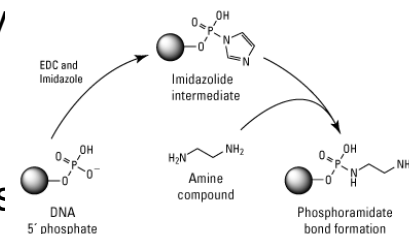
DETEKCIJA FOSFORILACIJE Z MS

- MS ali MS/MS
- povečanje mas za 80 DA
- MS in MS/MS oblikovane za različne reaktivnosti
- Fosfotirozin 216 Da
- Problem: fosfotreonin in fosfotirozin → MS/MS/MS
- MS/MS se običajno izvaja s CAD (collisionally activated dissociation)
 - ∅ Ioni pridobijo pozitiven naboj z adicijo protonov
 - ∅ Z nukleofilnimi reakcijami
 - ∅ Mesta cepitve se odvisna od distribucije protonov po ogrodju in stranskih skupinah
- ECD (electron capture dissociation) in ETD (electron transfer dissociation)
 - ∅ Lahko detektirata PTM, ki so nestabilne pri MS/MS



OBOGATITEV FOSFORILIRANIH PROTEINOV IN PEPTIDOV

- Ovira pri analizi je nizka senzitivnost
- Kovalentna spojitev: beta eliminacija fosforne kisline, nastane dvojna vez, kjer lahko poteče Michaelova adicija.
 - ◆ PROBLEM: adicija lahko poteče na obeh ogljikih ob dvojni vez in lahko dobimo heterogen produkt. Lahko poteče eliminacija ostalih PTM.
 - ◆ Problem so stranske reakcije.
Spojitev z EDC- nastane direktna vez s fosfatom
- Afinitetno čiščenje
 - ◆ immobilizirana kovinska afinitetna kromatografija (IMAC)- fosfopeptidov
 - ◆ adsorpcija kovinskih ione (Fe^{3+} , Ga^{3+})
 - ◆ selektivno imuno čiščenje
 - ◆ problem: izguba fosfopeptidov zaradi



IDENTIFIKACIJA MEST FOSFORILACIJE

- Problem:

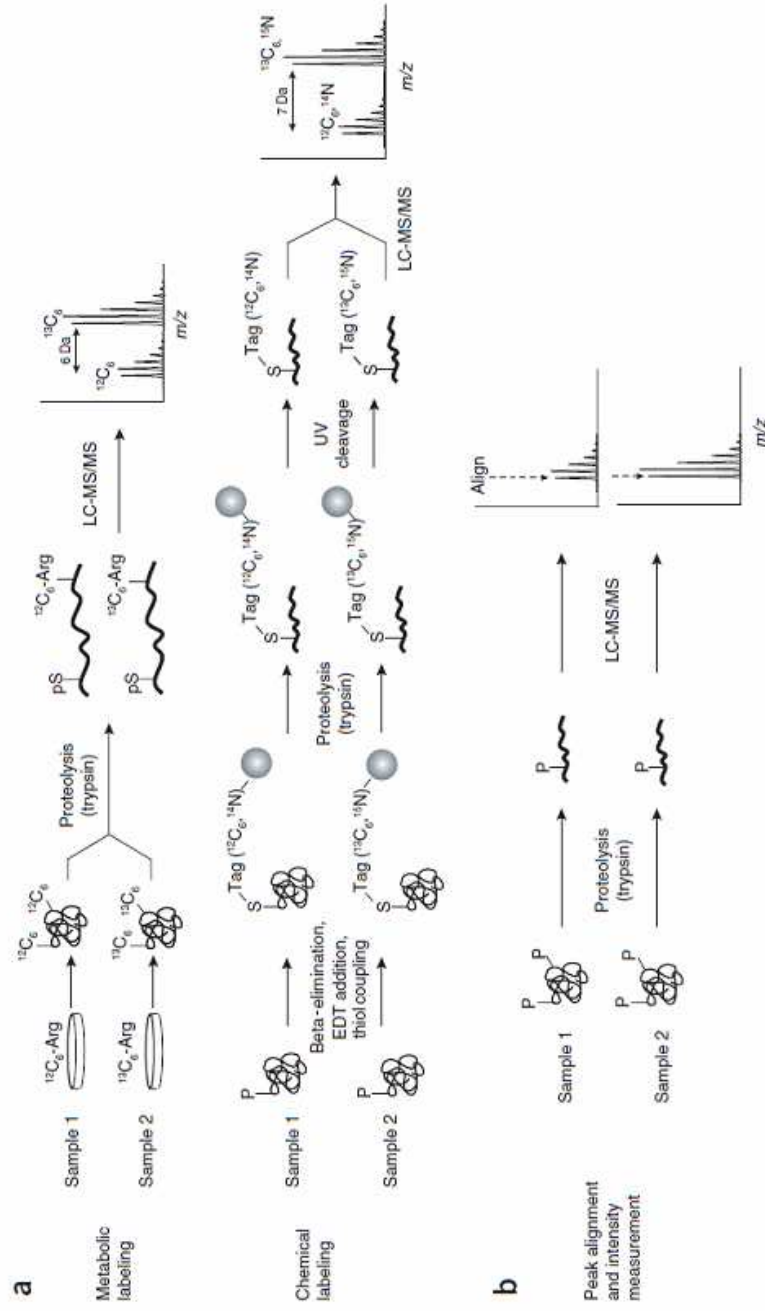
1) iskalni program upošteva vse fosfatne modifikacije. S tem se poveča iskalni prostor za 15X in poveča se verjetnost napak

2) Lociranje fosfatnih sekvenc je težko, ker je 25% mest fosforilacije dvomljivih

- Eden izmed prvih algoritmov: SALSA
- Novejši programi temeljijo na verjetnosti

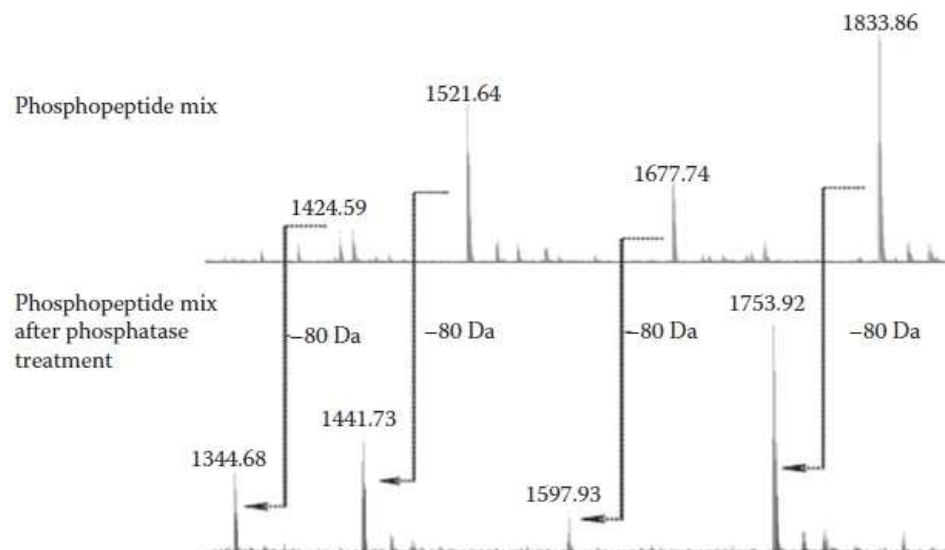
KVANTIFIKACIJA FOSFOPEPTIDA

- Določevanje preko stabilnih izotopov
 - ◆ SILAC-AK so označene s C13 ali N15
 - ◆ Novejša metoda: kombinacija obeh
 - ◆ Spojitev stabilne izotopske oznake na peptid preko fosfat spec. reakcije
- Metoda brez označb



STOIHOMETRIJA

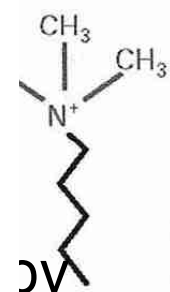
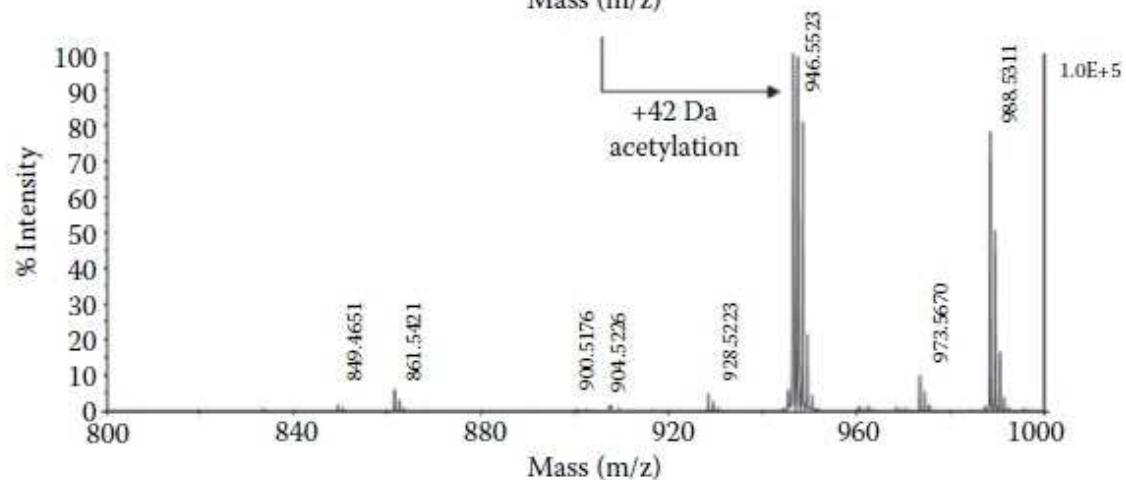
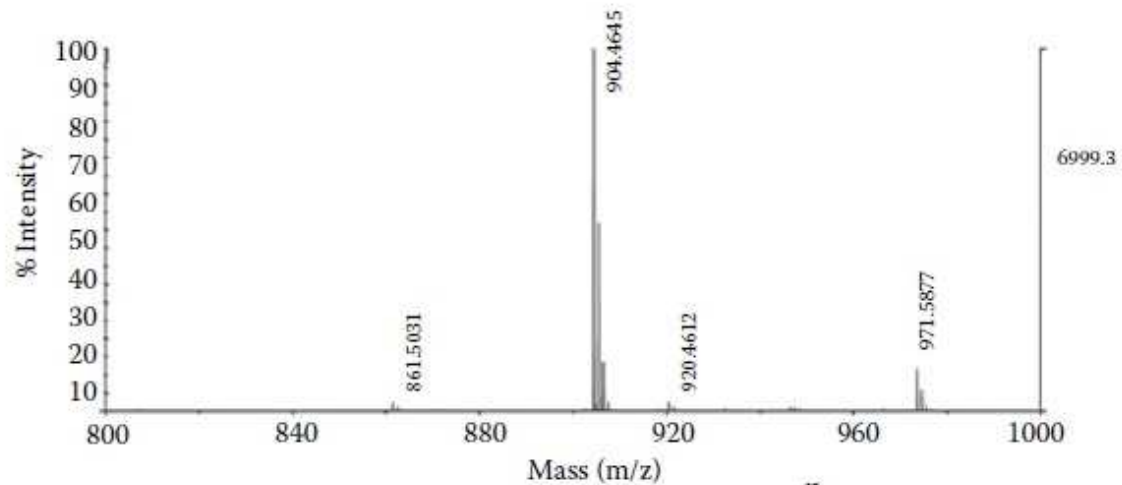
- Uporablja se metoda brez oznak, kjer se meri razmerje med vrhovi ionov fosforiliranih in nefosforiliranih oblik
- Primerna je tudi metoda z izotopi: vzorec razdelimo na pol, pri enem defosforiliramo, metiesterificiramo z izotopsko metilno skupino, obe polovici zmešamo in analiziramo z LC-MS/MS



BAZE PODATKOV

- Podatke bi morali obravnavati z določeno stopnjo previdnost
- Metoda določevanje PTM in programi iskanja so površno zastavljeni oz. izvedeni
- Natančna določitev mest je pogojena s tem, kakšna je občutljivost MS tehnike

ACETILACIJA



ε-Methyl-Lys

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56012/#ch6_r19

<http://www.benbest.com/health/cancer.html>

UBIKVITIN in UBIKVITINU PODOBNI PROTEINI

- Peptidna povezava med karboksi skupino na C-koncu ubikvitina in ϵ -amino skupino lizinskega ostanka na tarčnem proteinu.

• Tripsinska proteoliza

- GG dipeptidna o

• Problemi:

- nedokončano reza
- zadušeno delovar
- NEDD8 in ISG15
- Nekateri UBL – ve

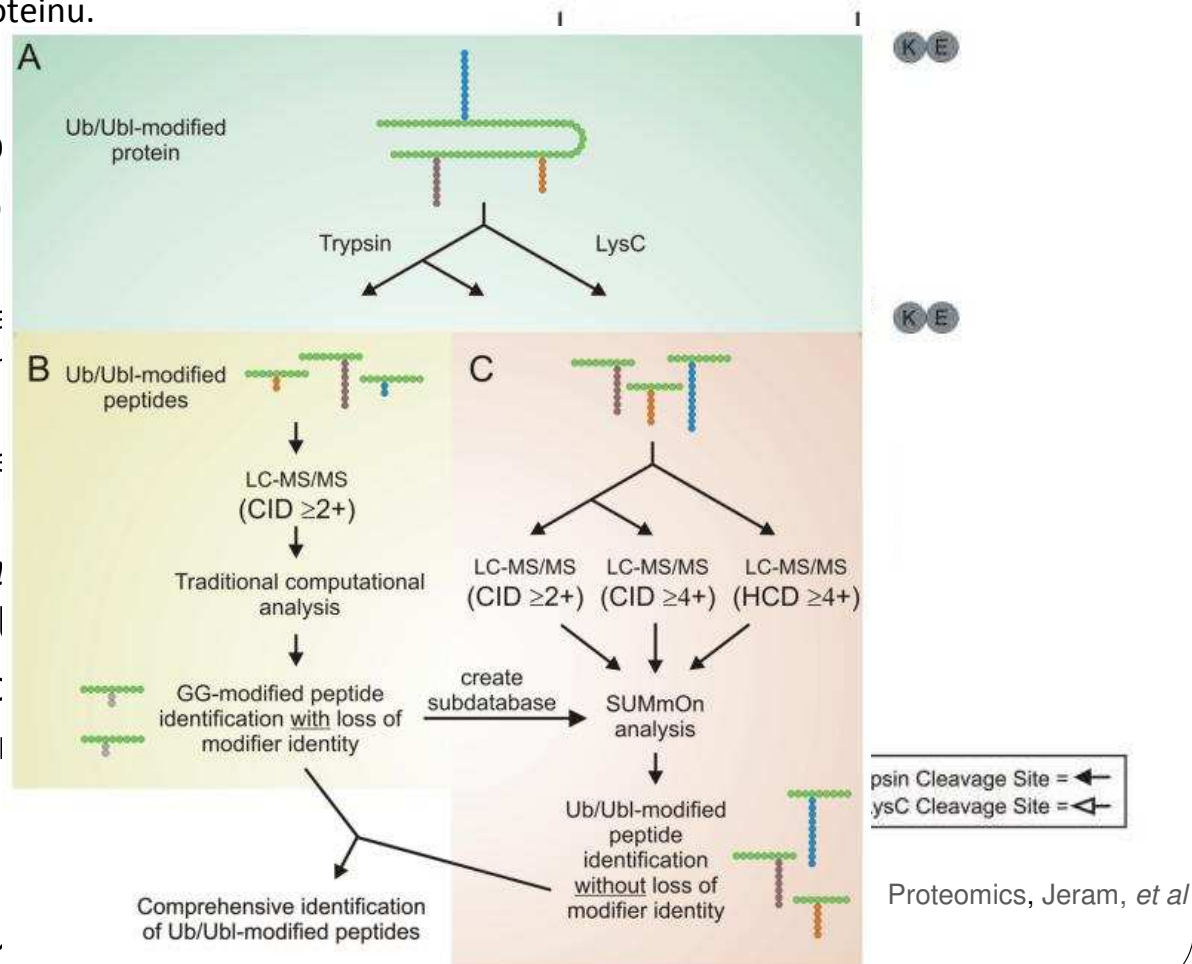
• Izboljšana tehnika prepoznavanje S

- Lysyl endopeptic

• Daljši iz bolj info

- Ubikvitin – 13AK
- NEDD8 – 16AK
- ISG15 – 14AK

• Obdelava podat



CISTEIN – oksidacija in nitrozilacija

- OKSIDACIJA

- Masni premiki:

- R-SOH: +16 Da
 - R-SO₂H :+32 Da
 - R-SO₃H: +48 Da

- NITROZILACIJA

- Modifikacija z NO
 - “biotin-switch”

- masni premik Cys-S-biotin je 428 Da

