

Fehérje O-glikoziláció tömegspektrometriás vizsgálata

Darula Zsuzsanna

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Proteomikai Laboratórium

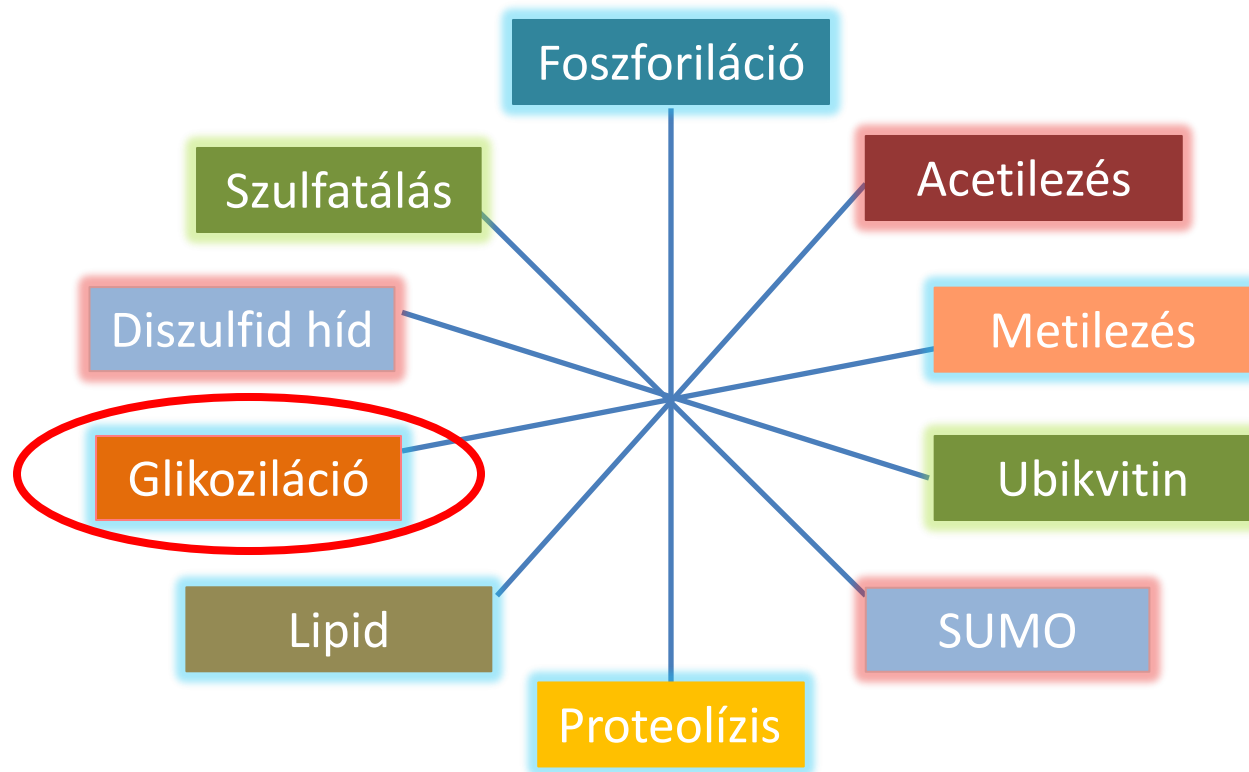
Fehérjeanalitika

60-as évektől: Edman szekvenálás

90-es évektől: Tömegspektrometria (ESI, MALDI)
(*de novo* és DNS adatbázisok alapján)

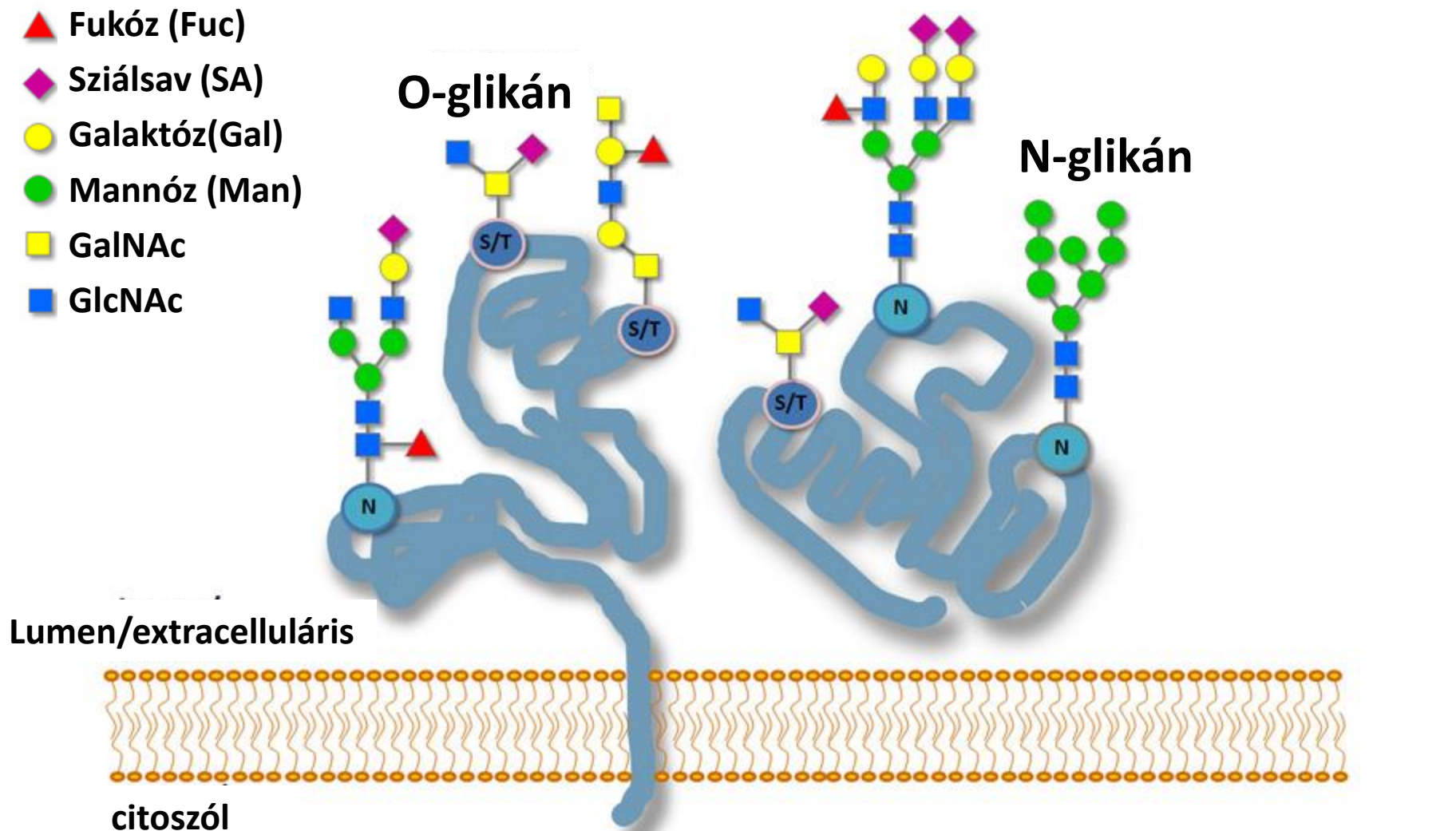
Poszt-transzlációs módosítások
vizsgálata!

Poszt-transzlációs módosítások



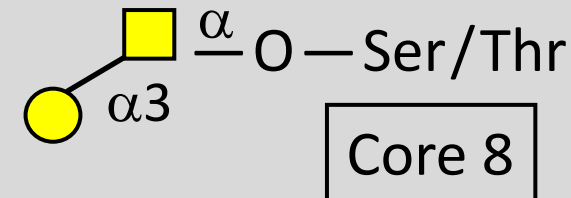
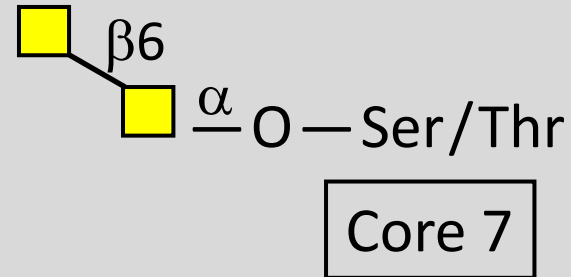
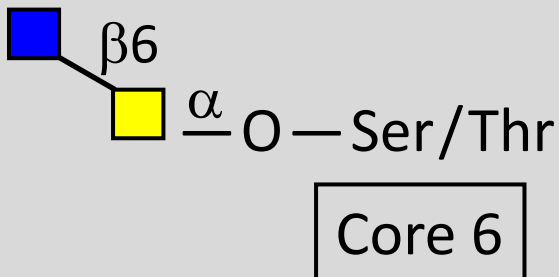
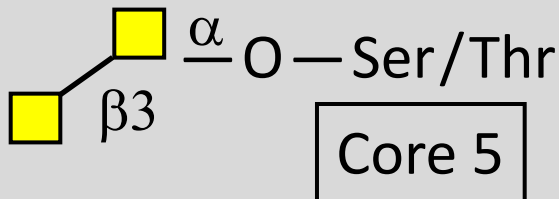
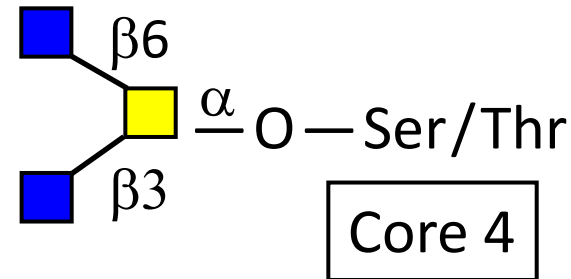
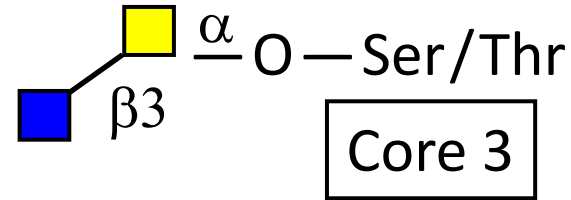
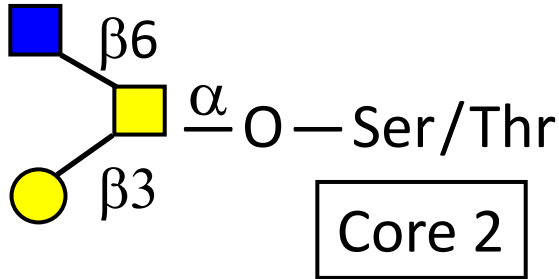
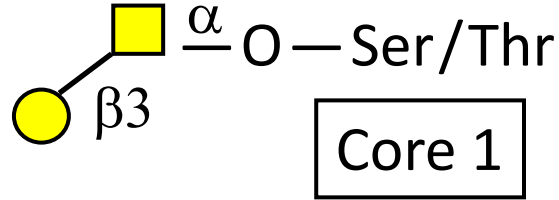
→ Szerkezet, stabilitás, lokalizáció, aktivitás

Extracelluláris glikoziláció



C-glikoziláció: Trp + Mannóz (1994)
O-glikoziláció: Tyr-on is!!! (2011)
S-glikoziláció: Cys + GlcNAc (2016)

Mucin-típusú (GalNAc α) O-glikán magszerkezetek



GalNAc



Gal



GlcNAc

Biológiai funkció

Általános

- Fehérje szerkezet, oldhatóság, stabilitás
- Sejt-sejt kommunikáció
- Sejtadhézió

Fehérje / helyspecifikus

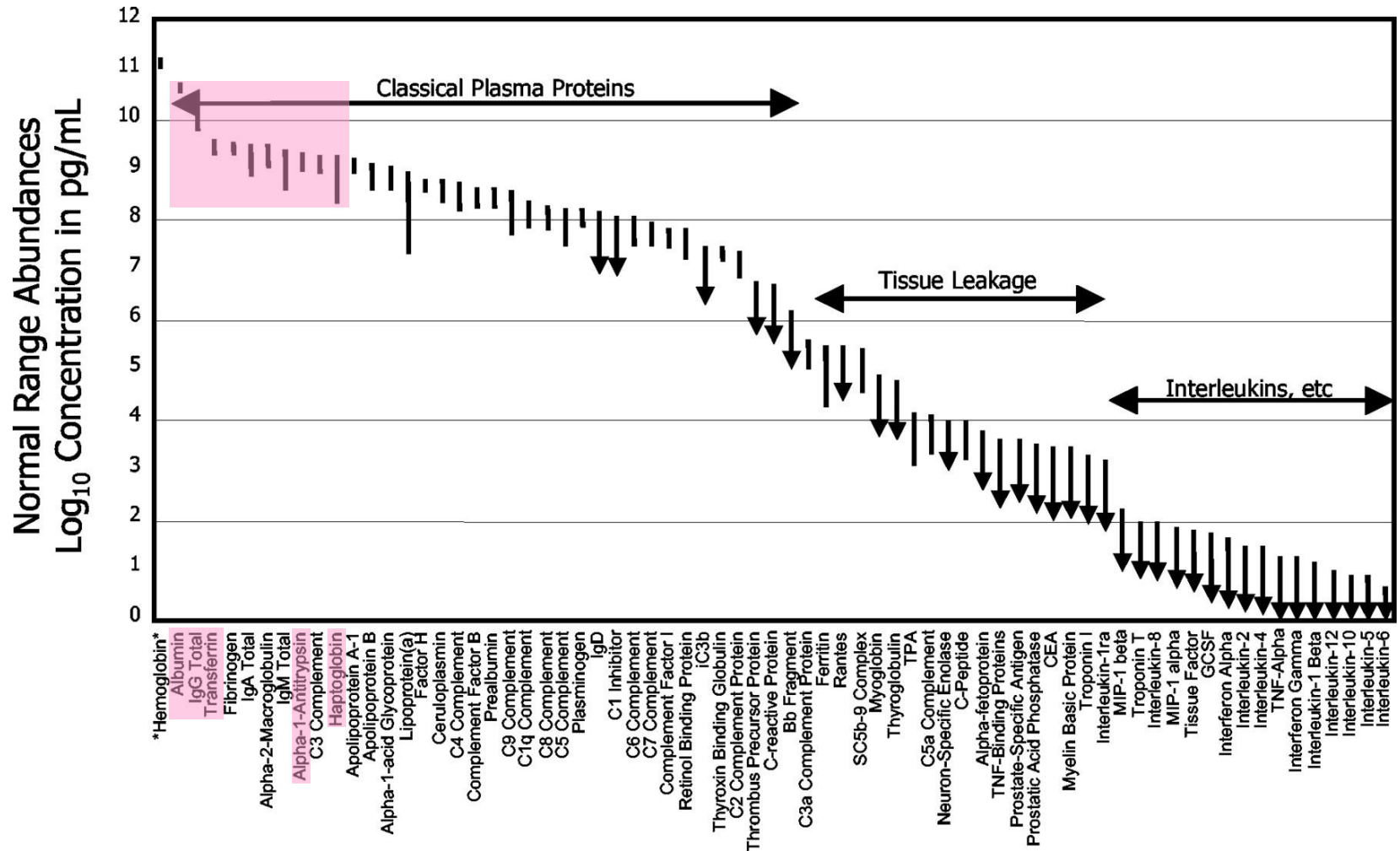
- IgA nefropátia
- familial tumoral calcinosis (FGF23 hormon)
- Proprotein konvertáz

Rák, autoimmun betegségek – glikozilációs mintázat megváltozik

Felhasználható a betegség kimutatására?

Komplex minták (vérszérum):

Dúsítás + LC-MS analízis



További nehézségek

Dúsítás: kis glikán: módosítatlan peptidekhez hasonló fiziko-kémiai tulajdonságok

MS/MS: ütközéses aktiválás: cukor “lerepül”

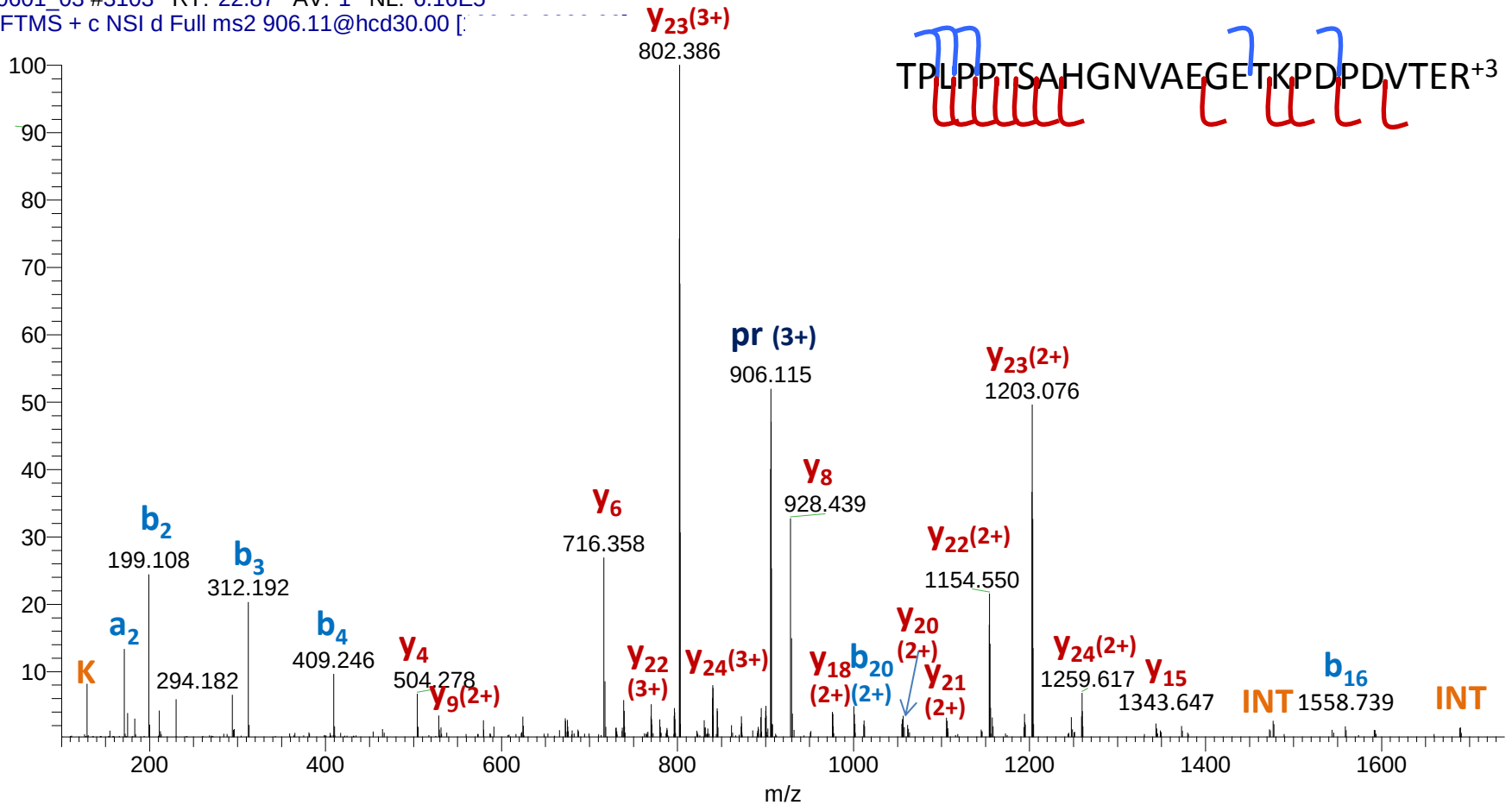
ECD/ETD: glikán részről limitált információ
hatékonyság

Automatizált adatkiértékelés – megbízhatóság?

MS/MS (ütközéses aktiválás, CID|HCD)

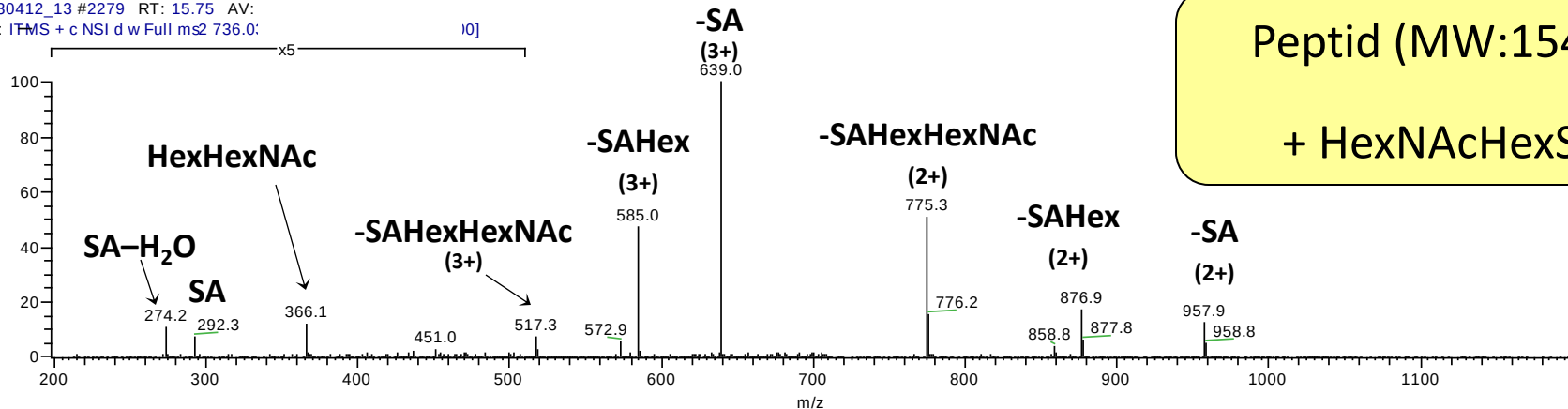
- módosítatlan** peptid

160601_03 #3103 RT: 22.87 AV: 1 NL: 6.16E5
T: FTMS + c NSI d Full ms2 906.11@hcd30.00 [



- Glikopeptid** : peptid szekvencia?
glikán (szerkezet)?
módosítás helye?

130412_13 #2279 RT: 15.75 AV:
T: FTMS + c NSI d w Full ms2 736.0:

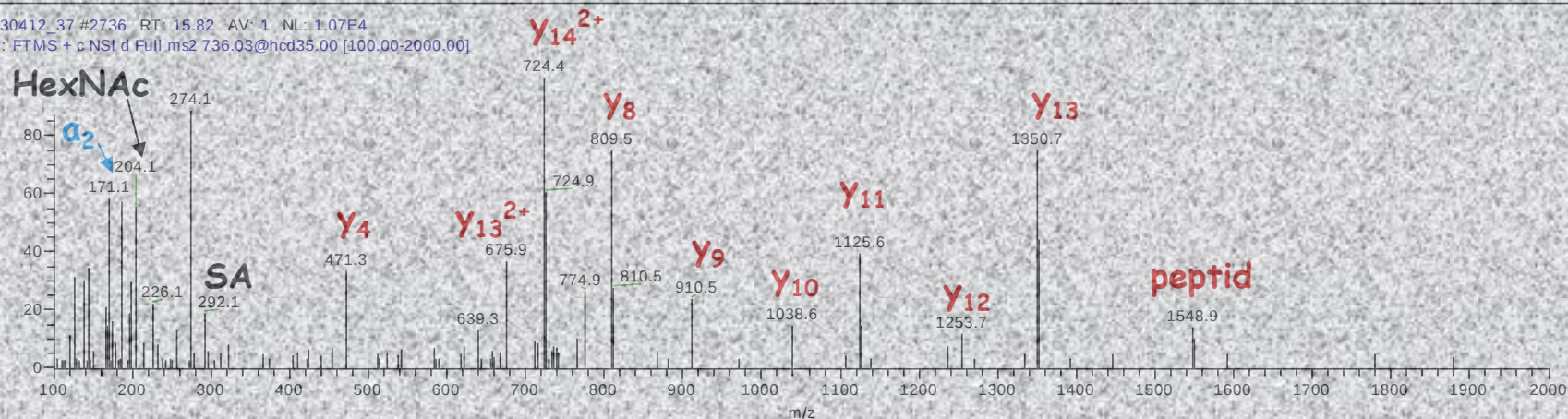


Peptid (MW:1549)

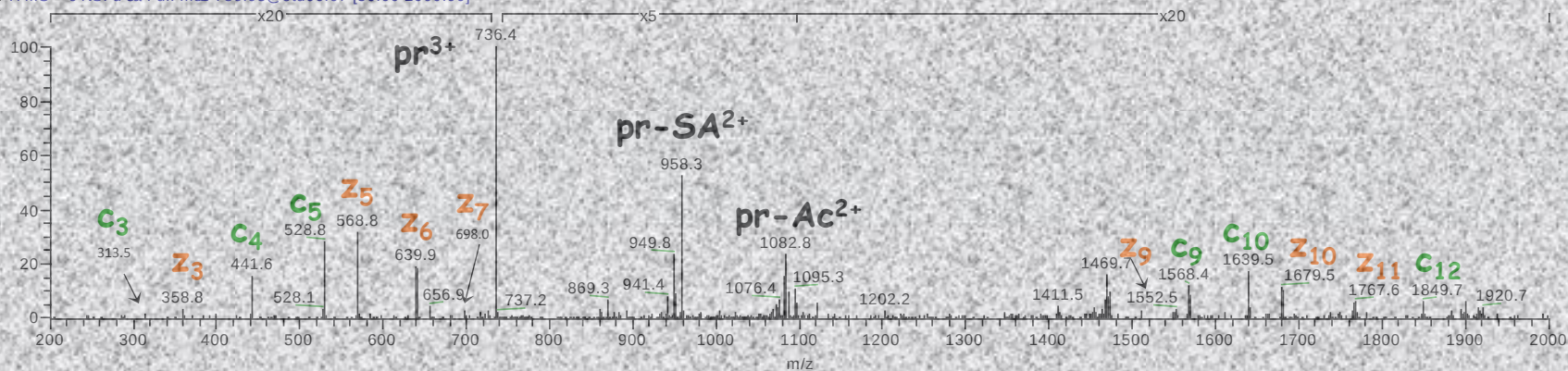
+ HexNAcHexSA

CID

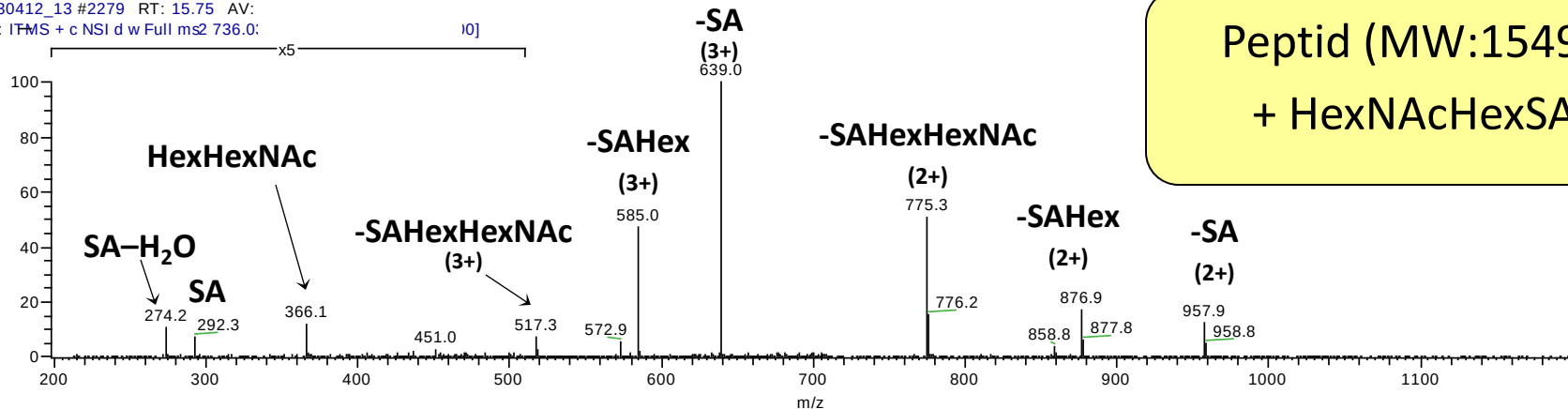
130412_37 #2736 RT: 15.82 AV: 1 NL: 1.07E4
T: FTMS + c NSI d Full ms2 736.03@hcd35.00 [100.00-2000.00]



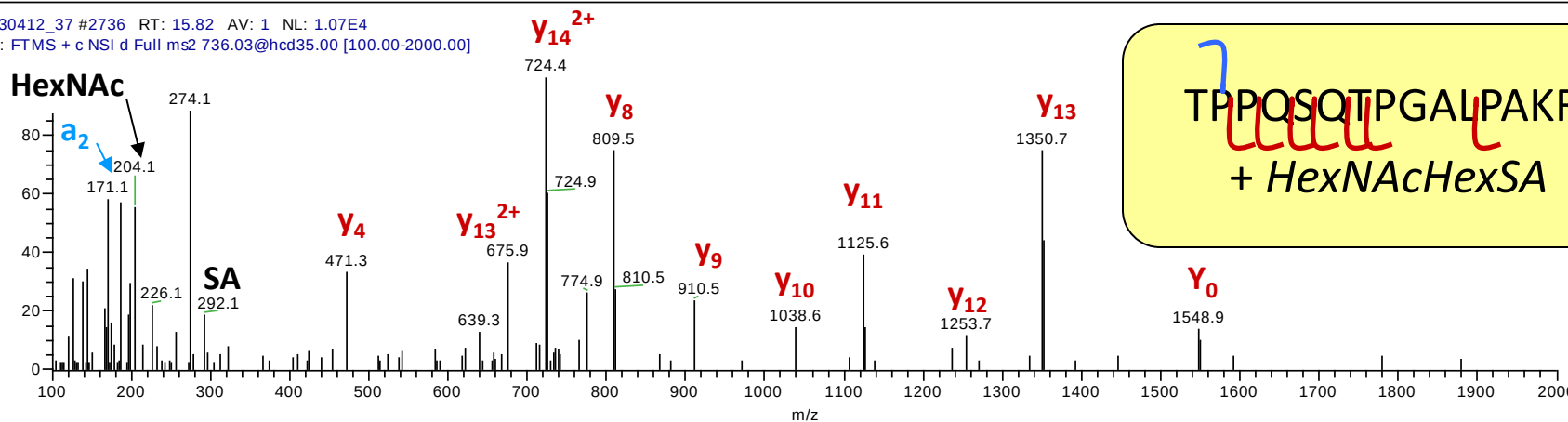
130412_37 #2737 RT: 15.82 AV: 1 NL: 1.16E5
T: ITMS + c NSI d sa Full ms2 736.03@etd66.67 [50.00-2000.00]



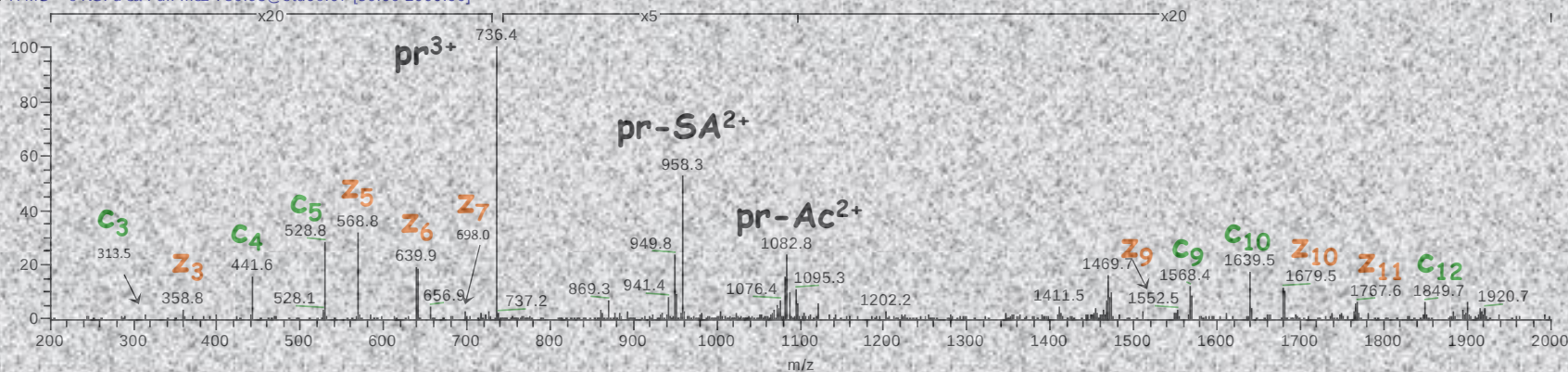
130412_13 #2279 RT: 15.75 AV:
T: FTMS + c NSI d w Full ms2 736.0:



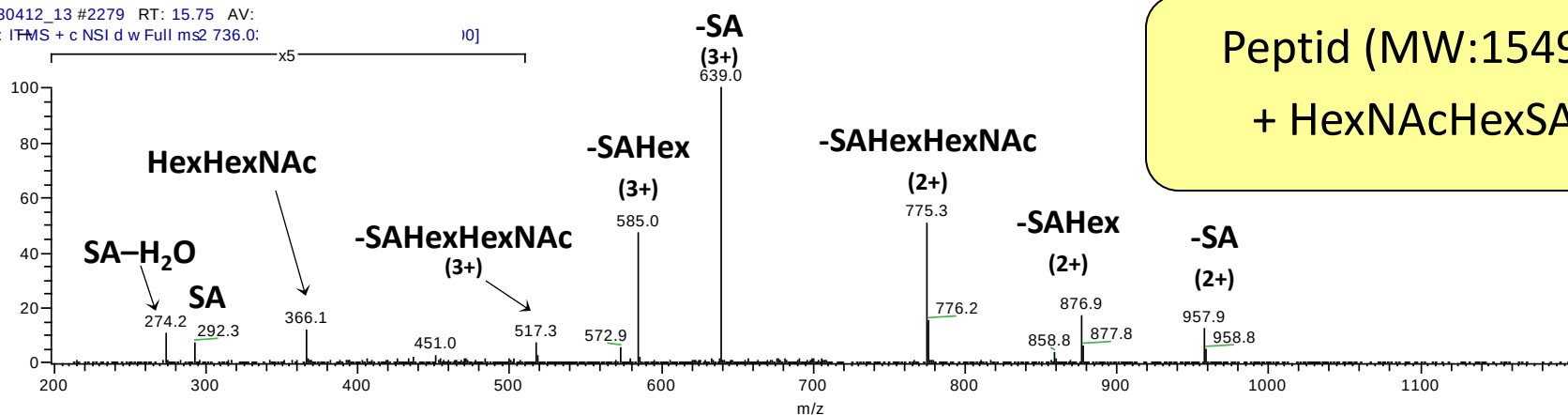
130412_37 #2736 RT: 15.82 AV: 1 NL: 1.07E4
T: FTMS + c NSI d w Full ms2 736.03@hcd35.00 [100.00-2000.00]



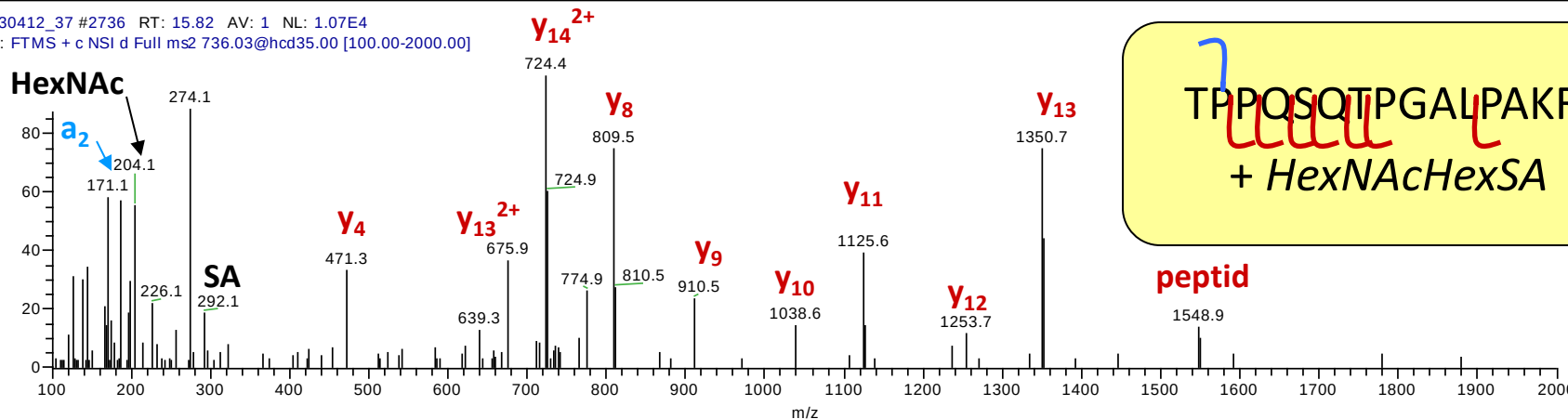
130412_37 #2737 RT: 15.82 AV: 1 NL: 1.16E5
T: ITMS + c NSI d sa Full ms2 736.03@etd66.67 [50.00-2000.00]



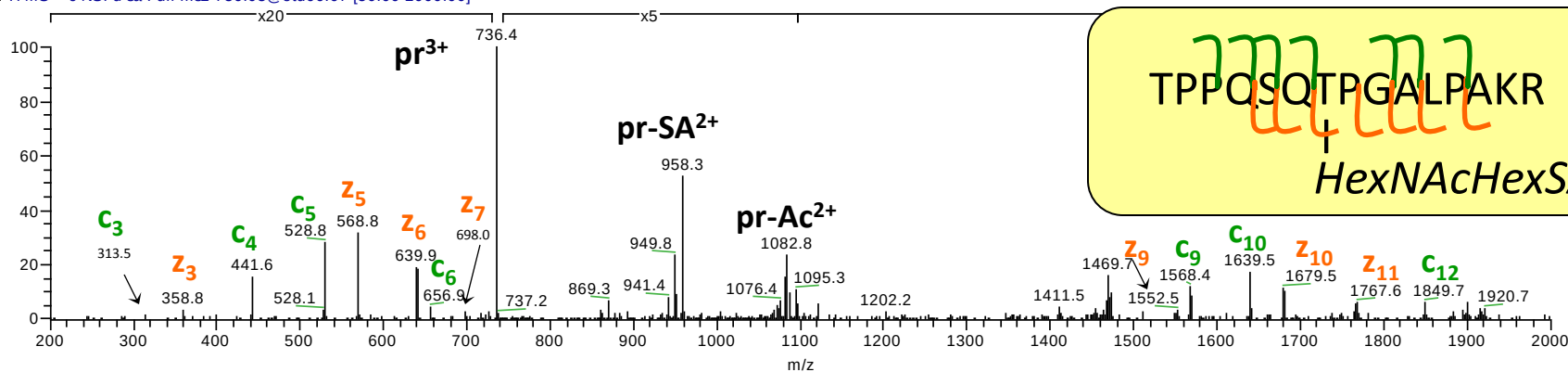
130412_13 #2279 RT: 15.75 AV:
T: ITMS + c NSI d w Full ms2 736.0:



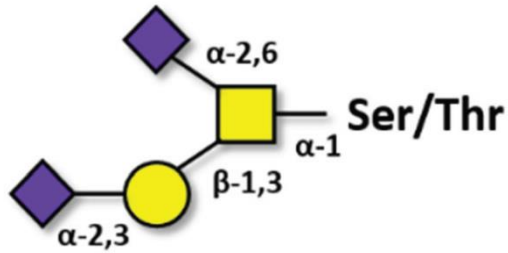
130412_37 #2736 RT: 15.82 AV: 1 NL: 1.07E4
T: FTMS + c NSI d Full ms2 736.03@hcd35.00 [100.00-2000.00]



130412_37 #2737 RT: 15.82 AV: 1 NL: 1.16E5
T: ITMS + c NSI d sa Full ms2 736.03@etd66.67 [50.00-2000.00]



Szérumfehérjék O-glikozilációs vizsgálata



Dúsítás: lektin affinitás kromatográfia

- Jacalin (Gal β 1,3GalNAc α)
 - + ERLIC (hidrofilicitás, savasság)
 - + mLEX
 - + Jacalin

- Búzacsíra agglutinin (WGA)
 - + Jacalin

RPLC-MS: HCD és ETD

adatok

Kiértékelés: adatbázis

Biztos jó, amit az adatbázis kereső mond?

Humán szérum triptikus emésztmény

Kétkörös lektin affinitás dúsítás (WGA)

Váratlan glikán szerkezetek?

HexNAcHexFuc ???

	m/z	z	Peptide	RT(min)	Score	Expect
Peptid 1	890.4311	3	TFVLS(511.19)ALQPSPTHSSSNTQR	15.617	34.4	0.0085
Peptid 2	938.7789	3	TFVLSALQPS(656.23)PTHSSSNTQR	39.583	41.7	8.90E-05
Peptid 3	973.1314	3	TFVLSALQPS(759.29)PTHSSSNTQR	35.433	29.9	0.0023

✓ HexNAcHexSA

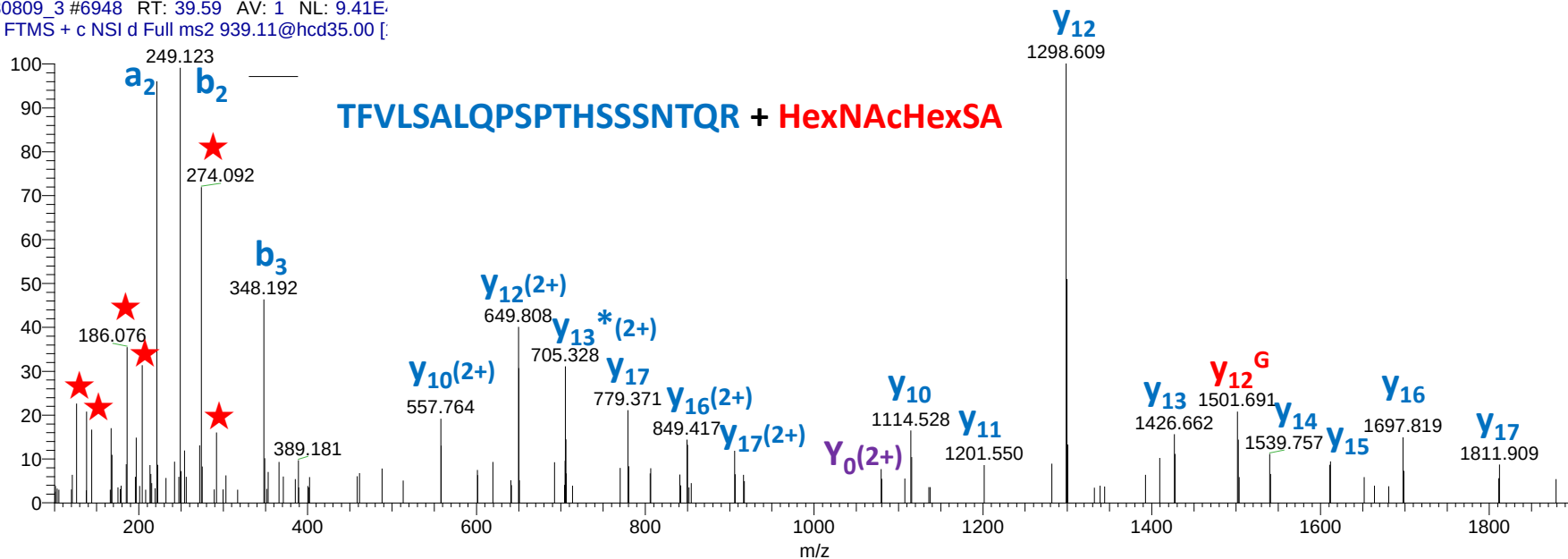
???

E:\OT_Elite\130809_3
1208 exp 5/20 ul

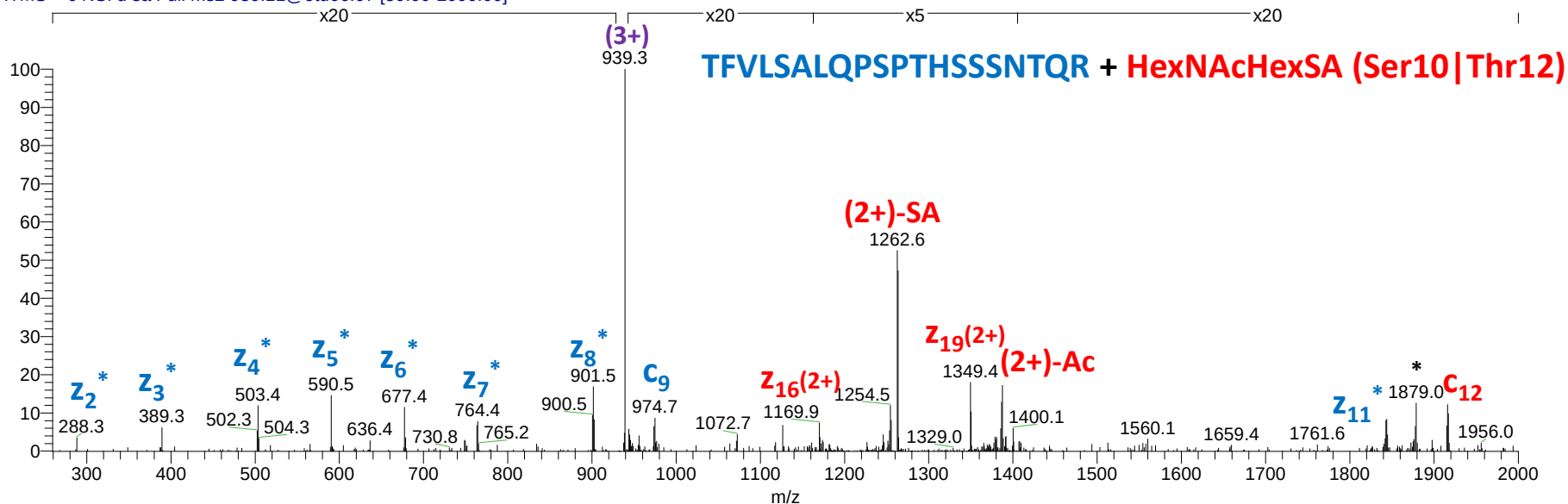
8/9/2013 10:28:37 AM

WGA double digest pooled

130809_3 #6948 RT: 39.59 AV: 1 NL: 9.41E-
T: FTMS + c NSI d Full ms2 939.11@hcd35.00 [



130809_3 #6949 RT: 39.60 AV: 1 NL: 8.87E5
T: ITMS + c NSI d sa Full ms2 939.11@etd66.67 [50.00-2000.00]



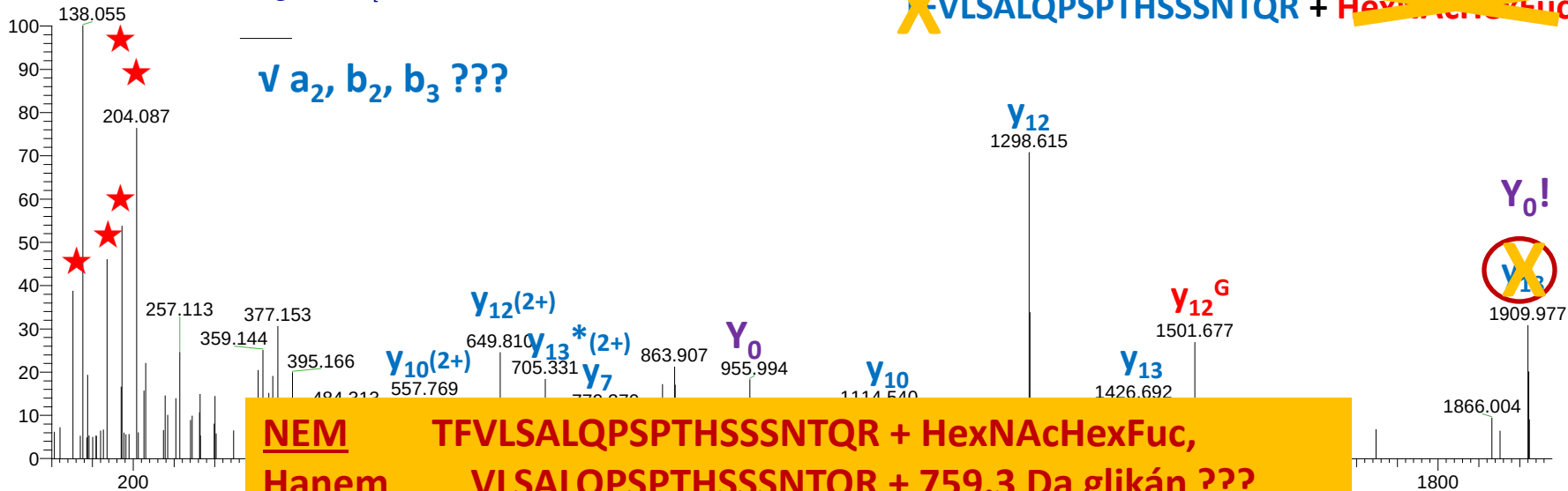
E:\OT_Elite\130809_3
1208 exp 5/20 ul

8/9/2013 10:28:37 AM

WGA double digest pooled

130809_3 #2371 RT: 15.62 AV: 1 NL: 1.91E:
T: FTMS + c NSI d Full ms2 890.76@hcd35.00 [

~~TFVLSALQPSPTHSSSNTQR~~ + ~~HexNAcHexFuc~~?



130809_3 #2371
T: ITMS + c NSI

	m/z	z	Peptide	RT(min)	Score	Expect
Peptid 1	890.4311	3	TFVLS(511.19)ALQPSPTHSSSNTQR	15.617	34.4	0.0085
Peptid 2	938.7789	3	TFVLSALQPS(656.23)PTHSSSNTQR	39.583	41.7	8.90E-05
Peptid 3	973.1314	3	TFVLSALQPS(759.29)PTHSSSNTQR	35.433	29.9	0.0023

E:\OT_Elite\130809_3

1208 exp 5/20 ul

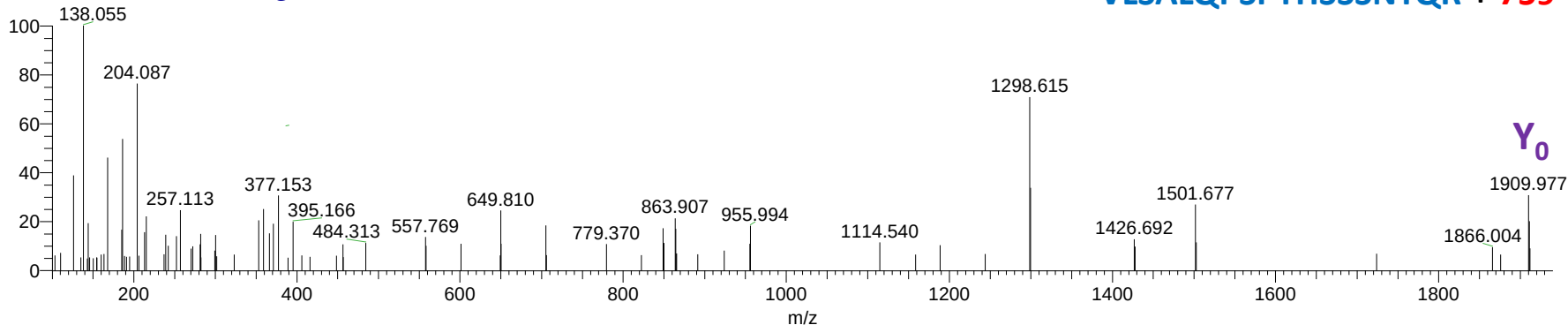
8/9/2013 10:28:37 AM

WGA double digest pooled

130809_3 #2371 RT: 15.62 AV: 1

T: FTMS + c NSI d Full ms2 890.76@

VLSALQSPPTHSSNTQR + 759



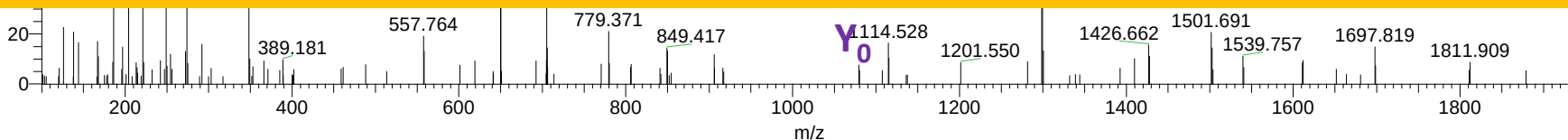
130809_3 #6948 RT: 39.59 AV: 1 NL: 9.41E4

T: FTMS + c NSI d Full ms2 939.11@hcd35.00 [100.00-2000.00]

TFVLSALQSPPTHSSNTQR + 656



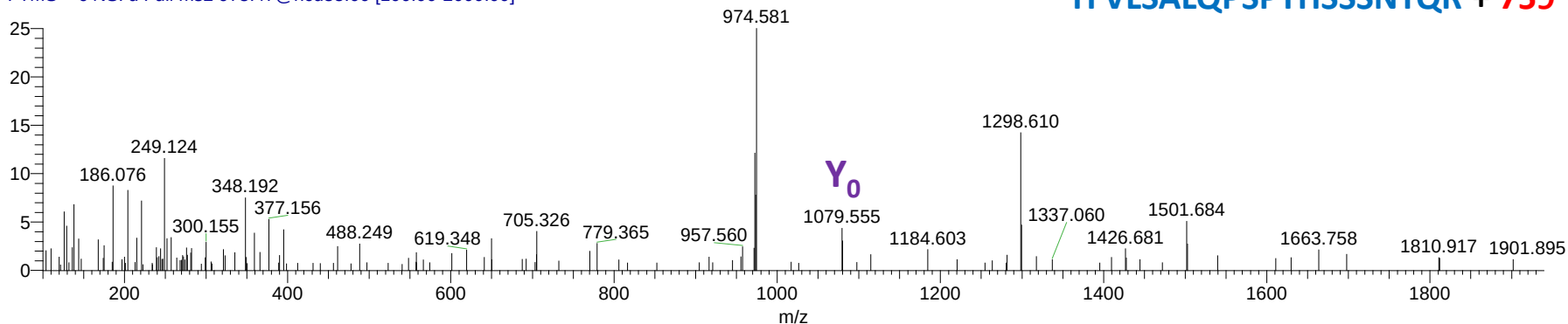
**A HCD spektrumok meglehetősen hasonlítanak –
valószínűleg nem a peptid, hanem a GLIKÁN HORDOZZA A MÓDOSÍTÁST**



130809_3 #6204 RT: 36.07 AV: 1 NL: 1.85E4

T: FTMS + c NSI d Full ms2 973.47@hcd35.00 [100.00-2000.00]

TFVLSALQSPPTHSSNTQR + 759



E:\OT_Elite\130809_3

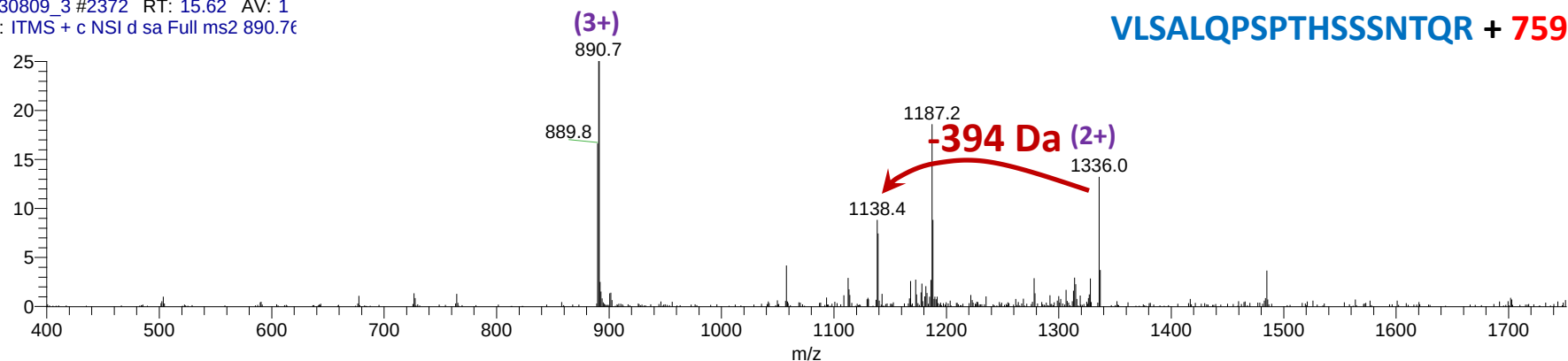
1208 exp 5/20 ul

130809_3 #2372 RT: 15.62 AV: 1

T: ITMS + c NSI d sa Full ms2 890.76

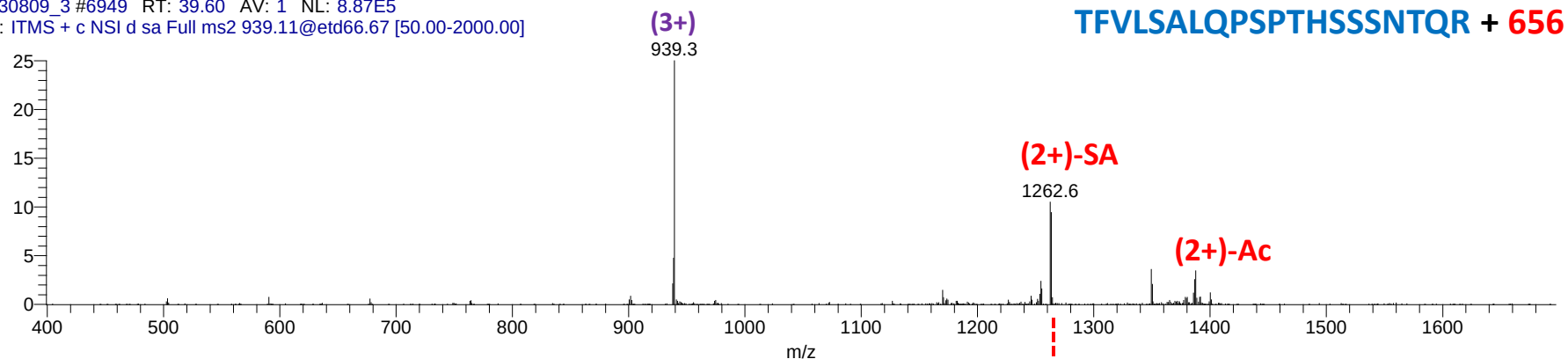
8/9/2013 10:28:37 AM

WGA double digest pooled



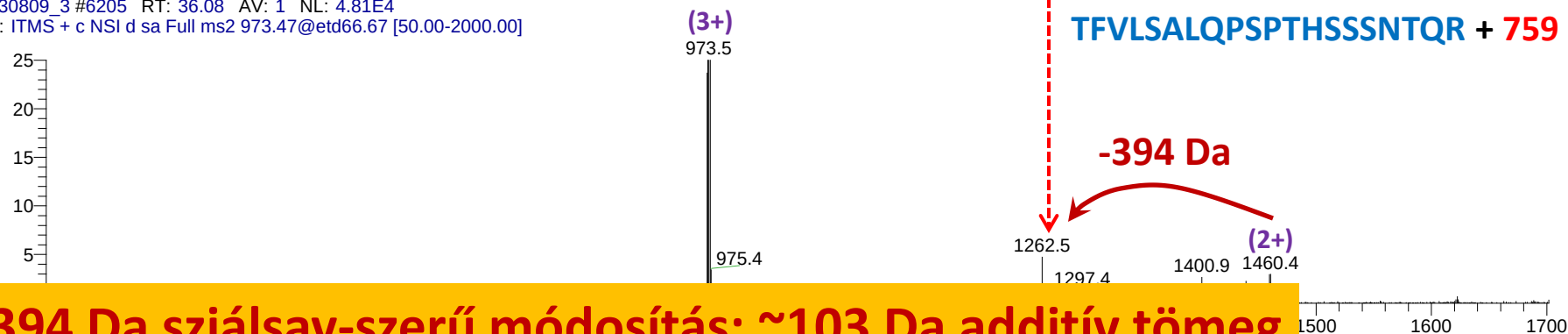
130809_3 #6949 RT: 39.60 AV: 1 NL: 8.87E5

T: ITMS + c NSI d sa Full ms2 939.11@etd66.67 [50.00-2000.00]



130809_3 #6205 RT: 36.08 AV: 1 NL: 4.81E4

T: ITMS + c NSI d sa Full ms2 973.47@etd66.67 [50.00-2000.00]



~394 Da szialsav-szerű módosítás: ~103 Da additív tömeg

E:\OT_Elite\130809_3

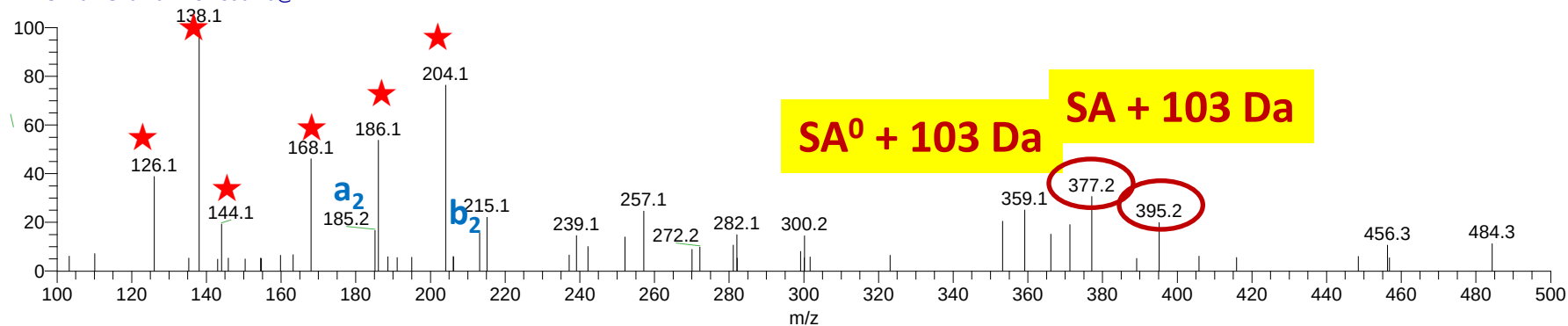
1208 exp 5/20 ul

8/9/2013 10:28:37 AM

WGA double digest pooled

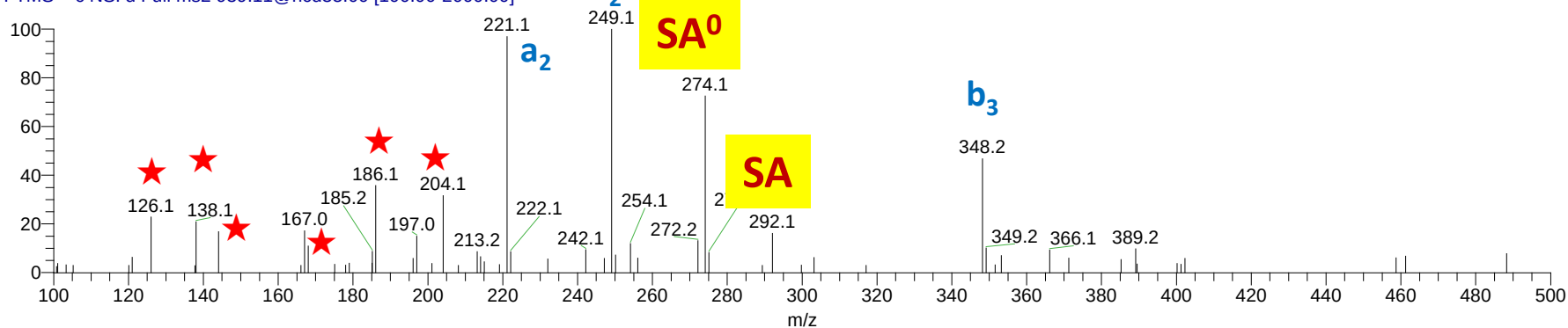
130809_3 #2371 RT: 15.62 AV: 1

T: FTMS + c NSI d Full ms2 890.76@



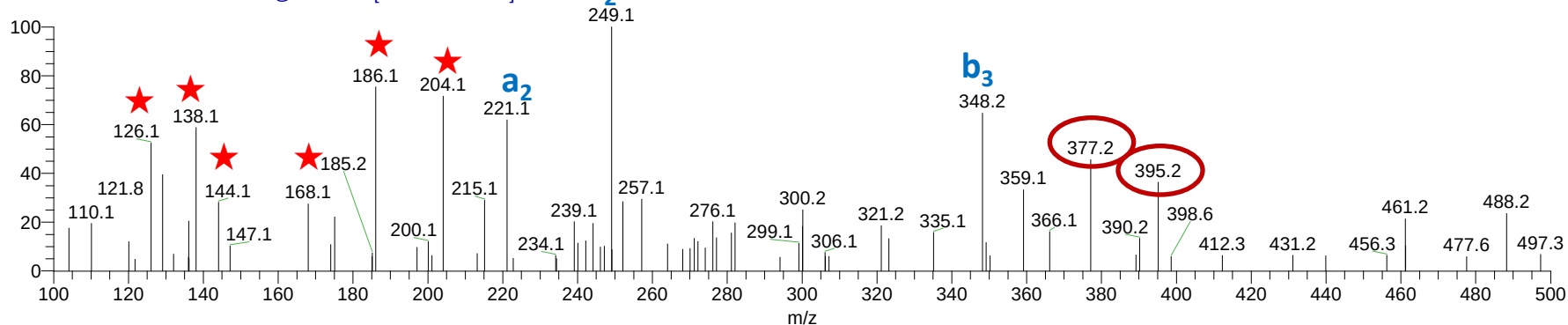
130809_3 #6948 RT: 39.59 AV: 1 NL: 9.32E4

T: FTMS + c NSI d Full ms2 939.11@hcd35.00 [100.00-2000.00]



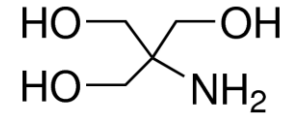
130809_3 #6204 RT: 36.07 AV: 1 NL: 2.14E3

T: FTMS + c NSI d Full ms2 973.47@hcd35.00 [100.00-2000.00]

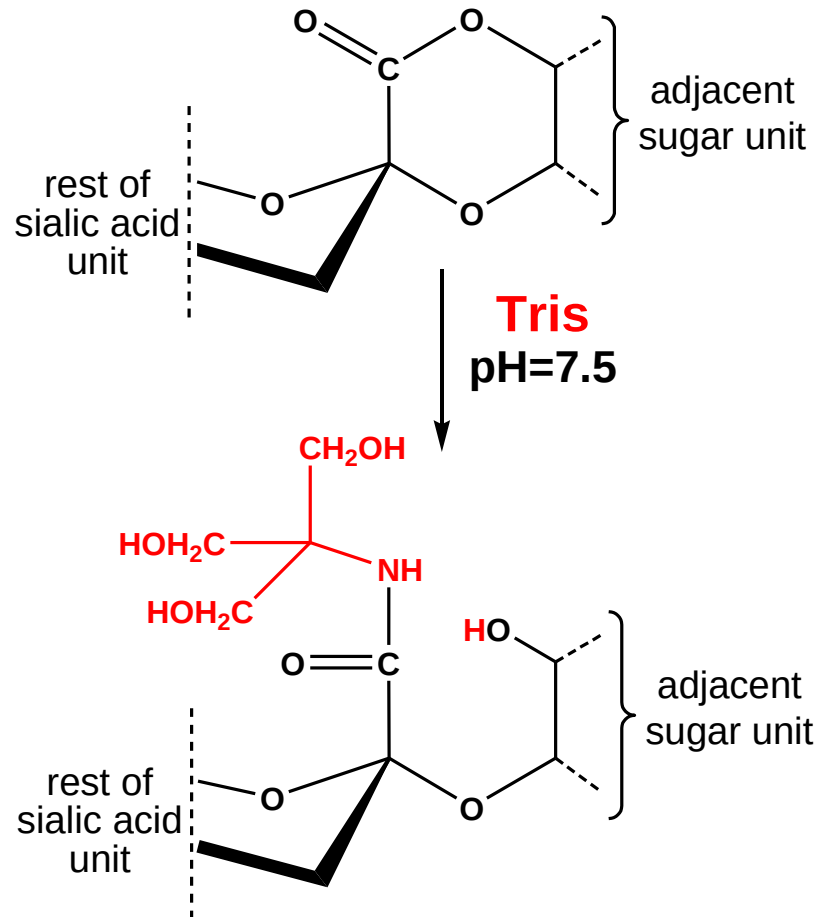


Milyen reagenseket használtunk a mintaelőkészítés során?

Affinitás kromatográfia Tris pufferben



MW: 121.1 Da



Tanulságok

- PTM analízis - adatkiértékelő szoftverek további fejlesztésre szorulnak
- Az eredmények manuális validálása egyelőre megkerülhetetlen

Köszönetnyilvánítás

Dr. Tóth Géza, Dr. Dirk Tourwe

MTA SzBK Proteomikai Laboratórium

Dr. Medzihradszky Katalin

Hunyadi-Gulyás Éva, Klement Éva



Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért

Soros Alapítvány

Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj

MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj

OTKA