Занятие №13. Обработка протеомных данных (масс-спектрометрия)

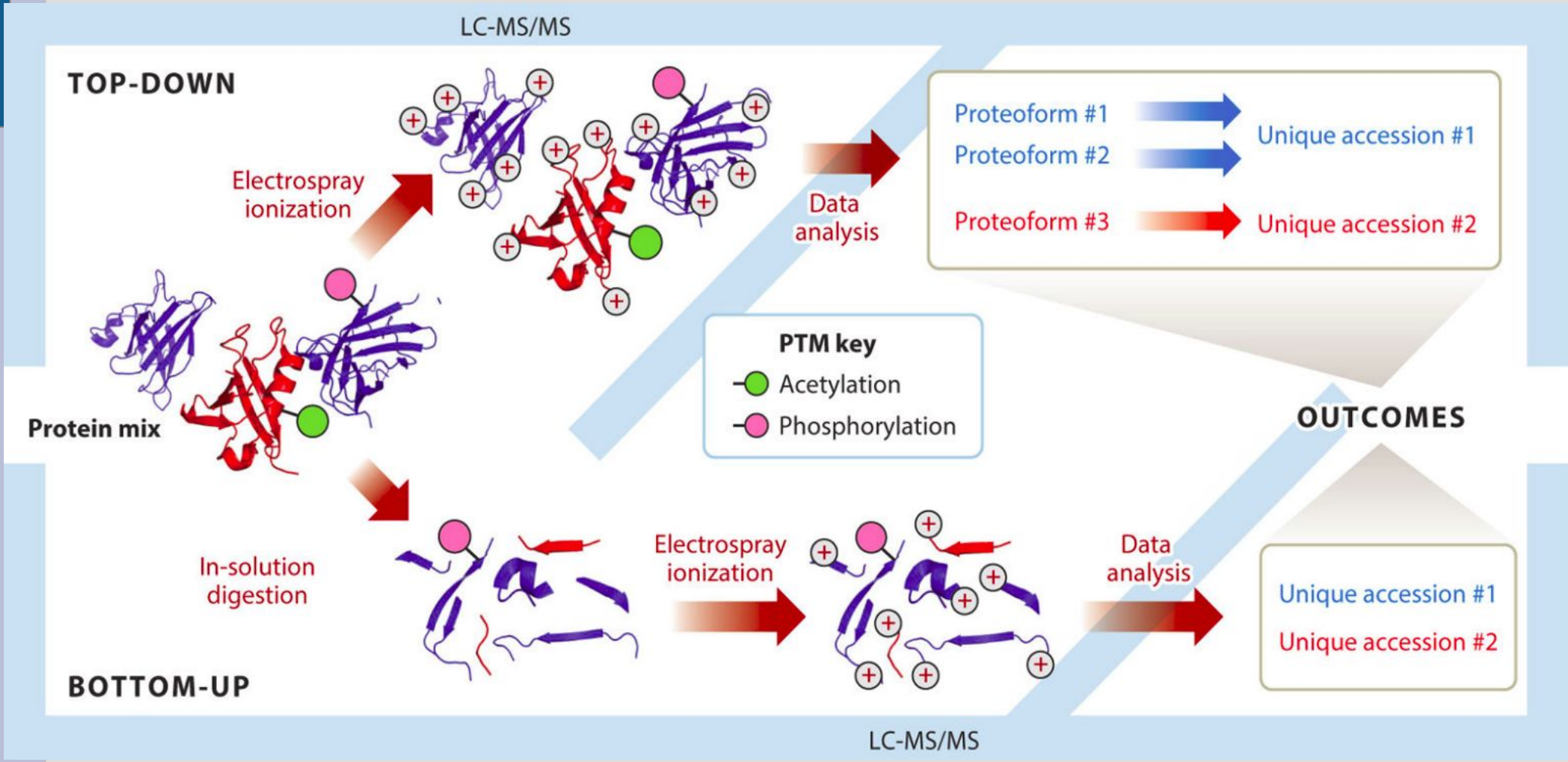
Подходы к анализу в протеомной масс-спектрометрии

- I. “Восходящий” анализ – Bottom-up
- гидролиз белка/белков, масс-спектрометрия малых пептидных фрагментов

- II. “Нисходящий” анализ – Top-down
- анализ без гидролиза (интактные протеины)

- III. Middle-down
- гидролизат состоит из более крупных пептидов

Два главных подхода к протеомному анализу



Top-down: изучение интактных белков

- 1). Позволяет изучать индивидуальные протеины.
- 2). Является низкопроизводительным подходом.

- Исключение: изучение белкового спектра для идентификации бактериальных культур. Данная методика предусматривает высокопроизводительное сравнительное исследование целых протеомов (однако, имеет ограниченную информативность о природе белков).

Bottom-up

- Данный подход преобладает в протеомных исследованиях.
- Существует в двух вариантах:
- 1. Выделение одного/нескольких белков (PAGE), их гидролиз –> масс-спектрометрия.
- 2. Гидролиз сложной смеси белков –> хроматомасс-спектрометрия.

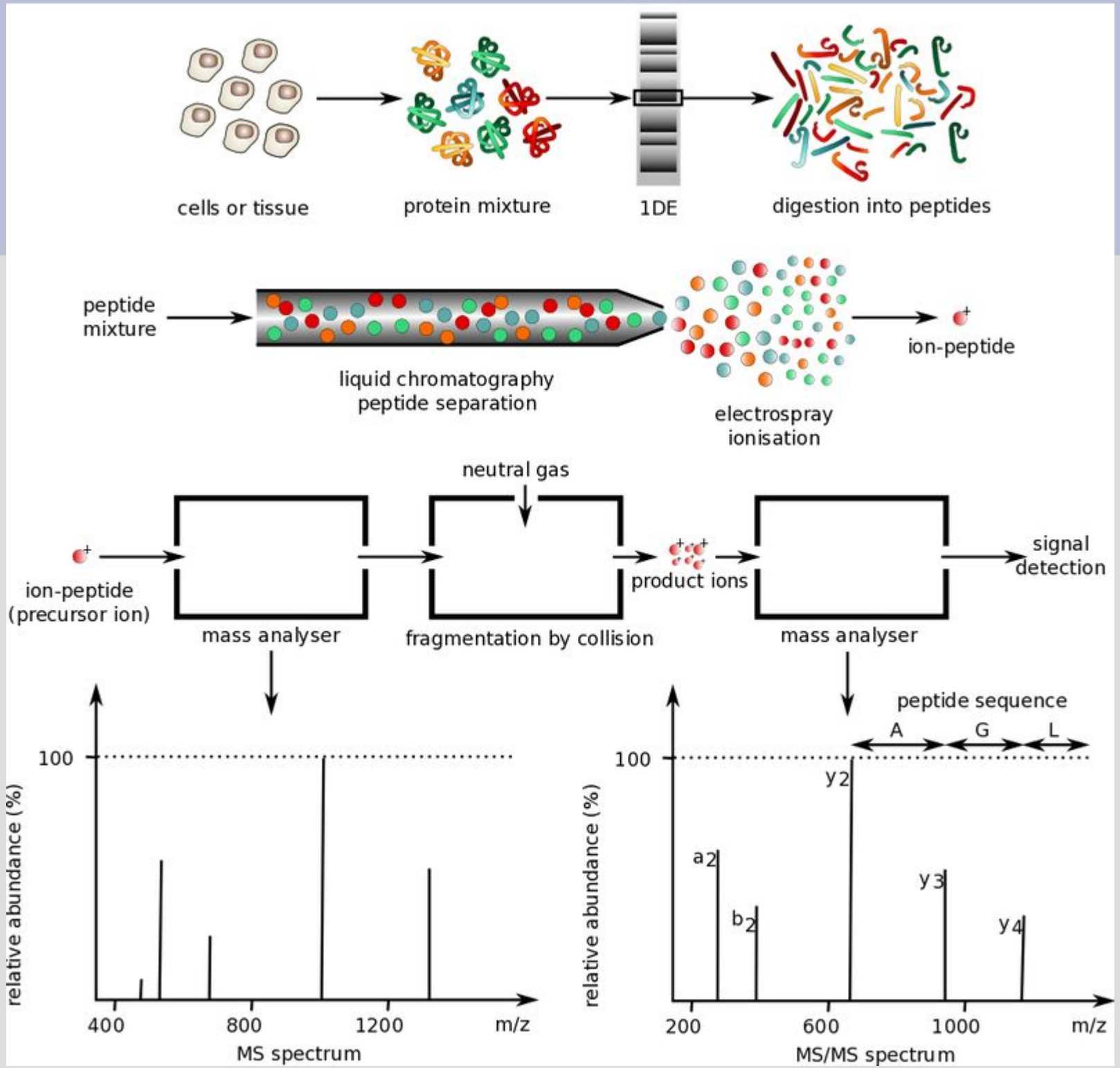
- Второй вариант известен также как протеомное исследование по методу дробовика – shotgun proteomics.

Типы протеомного исследования

- 1. Определение наличия в образце белков с известной последовательностью (“ресеквенирование” белков).
- 2. Определение последовательности белков de novo.

Определение белков de novo

- Применяется на основе bottom-up подхода (анализ пептидных спектров). В данном случае требуется (особенно для сложных смесей белков) использование тандемного хроматомасс-спектрометра (LC-MS/MS). MS/MS обеспечивает большую разрешающую способность за счёт образования большего числа ионов.


cells or tissue
protein mixture
1DE
digestion into peptides
peptide mixture
liquid chromatography peptide separation
electrospray ionisation
ion-peptide
neutral gas
ion-peptide (precursor ion)
mass analyser
fragmentation by collision
product ions
mass analyser
signal detection
relative abundance (%)
100
400
800
1200
m/z
MS spectrum
peptide sequence
A
G
L
y2
a2
b2
y3
y4
200
600
1000
MS/MS spectrum

Основа анализа масс-спектров – определение типов образующихся ионов

- В подавляющем большинстве методов МС в результате ионизации образуются положительно заряженные ионы (протонирование, $[M+H]^+$). При этом из одной изначальной молекулы (или иона в случае второго этапа MS/MS) может образовываться несколько типов ионов:
- 1). Протонированная исходная молекула – простое присоединение иона H+.
- 2). Множество ионизированных кусочков исходной молекулы – в результате миграции иона H+ по молекуле и его “оседания” около какой-либо связи происходит разрыв по этой связи.

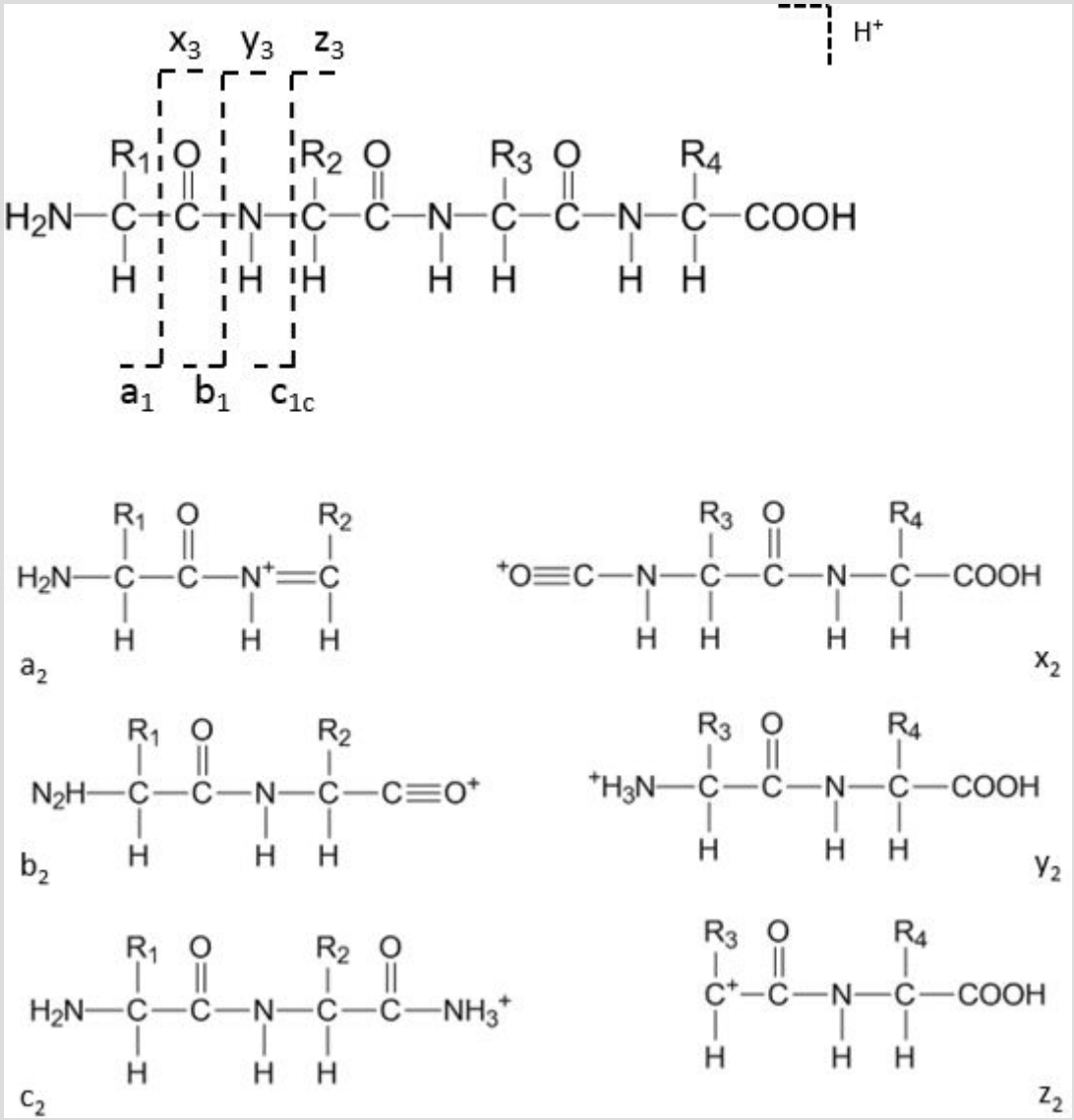
Главные типы ионов, образующихся в протеомной МС

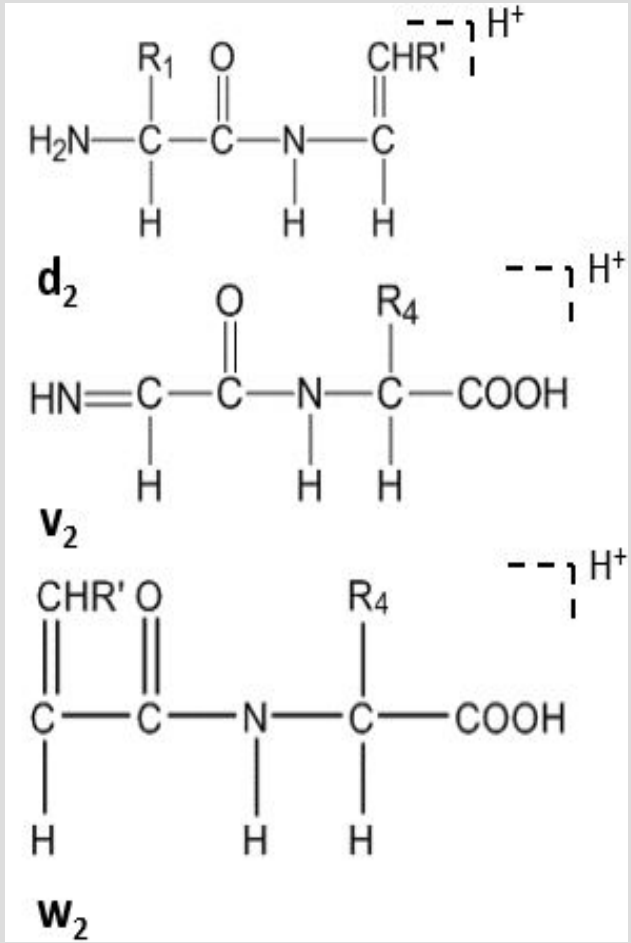
- Существует три вида связей в пептидах, по которым происходит ионная фрагментация:
- а). Алкил-карбонильная: HC(R) – CO (ионы типа a или x)
- б). Пептидная: C(O) – NH (ионы типа b или y)
- в). Амино-алкильная: HN – CHR (ионы типа c или z)
- 6 типов ионов возникают из-за того, что заряженным может быть фрагмент как слева от связи (ближе к N-концу; типы a, b, c), так и справа (ближе к C-концу; типы x, y, z). В качестве нижнего индекса к типу иона приписывают количество аминокислотных остатков, его образующих (напр., y_2, b_1).
- Наиболее распространёнными являются ионы типов b и y (комплементарные ионы). Часто встречаются a-ионы, образующиеся из b-ионов в результате потери карбонильной группы (CO).

Дополнительные пептидные ионы

- При более жёсткой ионизации наряду с главными ионами происходит образование саттелитных ионов (d-, v-, и w-типы).
- В этих ионах по сравнению с главными ионами происходит дополнительное присоединение H+ к аминокислотному радикалу.

Главные и саттелитные пептидные ионы





Связь между массой главного иона и массами аминокислотных остатков иона

- Масса образующихся главных ионов определяется суммой масс аминокислот, входящих в их состав с учётом особенностей образования (с N- или C-конца; первичный или вторичный ион):

- $m(b)=\sum m(aa) + 1$; 1 – масса протона
- $m(y)=\sum m(aa) + 19$; 19 – масса протона+молекула воды
- $m(a)=m(b) - 28$; 28 – масса карбонила (CO)

Массы аминокислотных остатков, главных и соответствующих главных (a_1-ионы; immonium ion) и сателлитных ионов (related ions)

Name	3-letter code	1-letter code	Residue Mass	Immonium ion	Related ions	Composition
Alanine	Ala	A	71.03711	44		C_3H_5NO
Arginine	Arg	R	156.10111	129	59,70,73,87,100,112	$C_6H_{12}N_4O$
Asparagine	Asn	N	114.04293	87	70	$C_4H_6N_2O_2$
Aspartic Acid	Asp	D	115.02694	88	70	$C_4H_5NO_3$
Cysteine	Cys	C	103.00919	76		C_3H_5NOS
Glutamic Acid	Glu	E	129.04259	102		$C_5H_7NO_3$
Glutamine	Gln	Q	128.05858	101	56,84,129	$C_5H_8N_2O_2$
Glycine	Gly	G	57.02146	30		C_2H_3NO
Histidine	His	H	137.05891	110	82,121,123,138,166	$C_6H_7N_3O$
Isoleucine	Ile	I	113.08406	86	44,72	$C_6H_{11}NO$
Leucine	Leu	L	113.08406	86	44,72	$C_6H_{11}NO$
Lysine	Lys	K	128.09496	101	70,84,112,129	$C_6H_{12}N_2O$
Methionine	Met	M	131.04049	104	61	C_5H_9NOS
Phenyalanine	Phe	F	147.06841	120	91	C_9H_9NO
Proline	Pro	P	97.05276	70		C_5H_7NO
Serine	Ser	S	87.03203	60		$C_3H_5NO_2$
Threonine	Thr	T	101.04768	74		$C_4H_7NO_2$
Tryptophan	Trp	W	186.07931	159	11,117,130,132,170,100	$C_{11}H_{10}N_2O$
Tyrosine	Tyr	Y	163.06333	136	91,107	$C_9H_9NO_2$
Valine	Val	V	99.06841	72	44,55,69	C_5H_9NO

Массы b2-ионов

	G	A	S	P	V	T	C	I/L	N	D	K/Q	E	M	H	F	R	Y	W
G	115																	
A	129	143																
S	145	159	175															
P	155	169	185	195														
V	157	171	187	197	199													
T	159	173	189	199	201	203												
C	161	175	191	201	203	205	207											
I/L	171	185	201	211	213	215	217	227										
N	172	186	202	212	214	216	218	228	229									
D	173	187	203	213	215	217	219	229	230	231								
K/Q	186	200	216	226	228	230	232	242	243	244	257							
E	187	201	217	227	229	231	233	243	244	245	258	259						
M	189	203	219	229	231	233	235	245	246	247	260	261	263					
H	195	209	225	235	237	239	241	251	252	253	266	267	269	275				
F^b	205	219	235	245	247	249	251	261	262	263	276	277	279	285	295			
R	214	228	244	254	256	258	260	270	271	272	285	286	288	294	304	313		
Y	221	235	251	261	263	265	267	277	278	279	292	293	295	301	311	320	327	
W	244	258	274	284	286	288	290	300	301	302	315	316	318	324	334	343	350	373

GG=N=114; GA=K/Q=128; GV=R=156; GE=AD=SV=W=186.

“Правила” ионизации пептидов

- 1). Подавляющее большинство ионов приходится на b-, y- и a-ионы. a-Ионы образуются из b-ионов в результате отщепления CO.
- 2). Аминокислоты, содержащие гидроксильную группу в радикале (Ser, Thr, Asp, Glu), при ионизации теряют её в виде воды (-18).
- 3). Аминокислоты, содержащие аминогруппу в радикале (Lys, Arg, Asn, Gln), при ионизации теряют её в виде аммиака (-17).
- 4). Наличие на C-конце осно́вной аминокислоты (Arg, His, Lys) приводит к образованию вместо иона b_n иона (b_{n-1}+18).
- 5). Комплементарные ионы (b_n и y_{N-n}), образующиеся из одного пептида, в сумме дают одно и то же значение массы пептида из N аминокислот (точнее, массу пептида + 2 из-за двух ионов водорода).

Количественный протеомный анализ

- Позволяет оценивать относительные количества одинаковых белков их разных источников в результате анализа смешанного образца.
- Выделяют несколько методов:
- I. С введением метки – исследуемые белки метят молекулами, содержащими разное количество стабильных изотопов 13C и 15N.
- 1). Метаболическая метка
- 2). Химическая метка
- II. Без введения метки – анализ хроматограмм или пиков специфических пептидных ионов, отвечающих отдельным протеинам.

Виды количественного протеомного МС-анализа

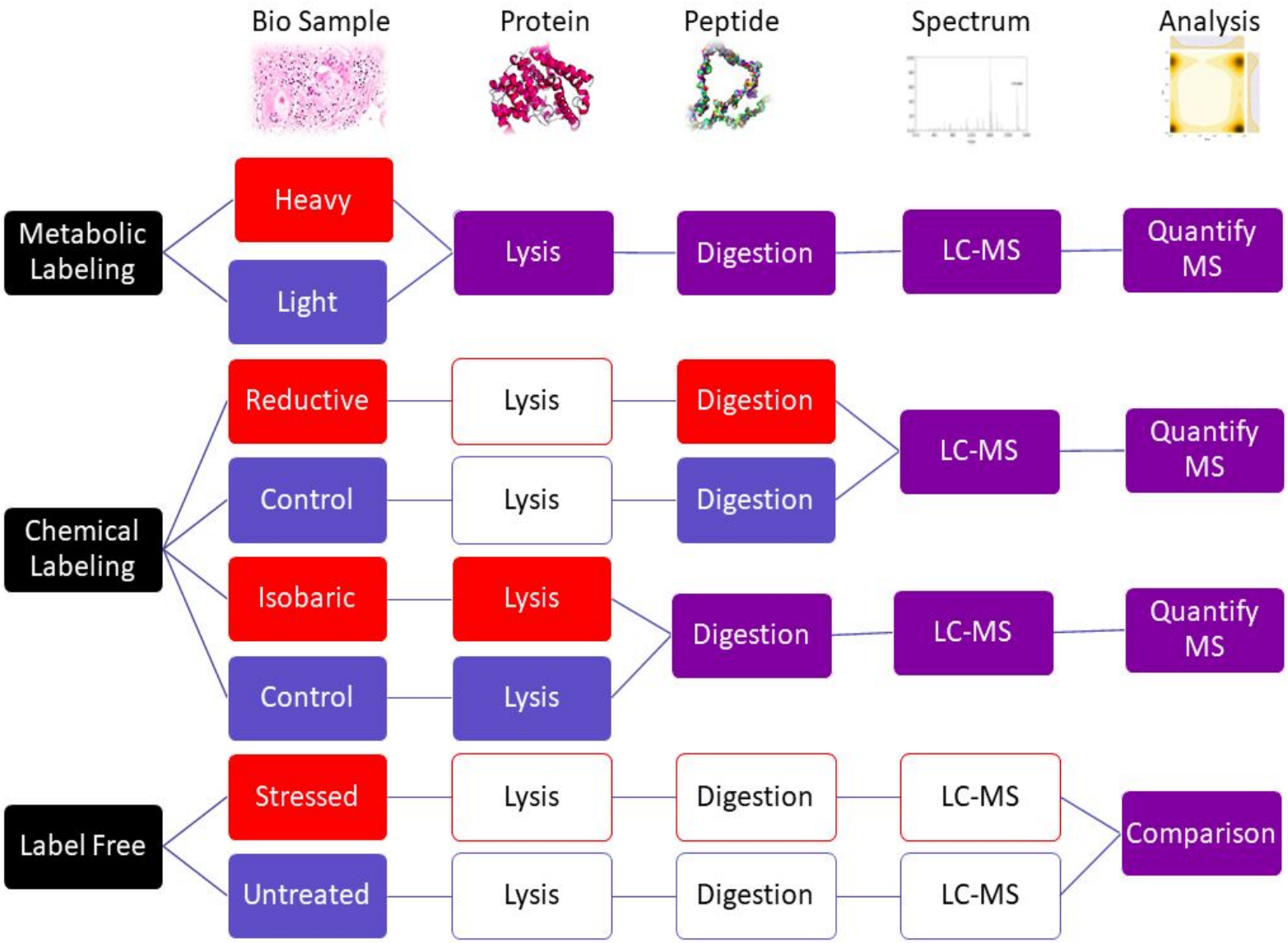
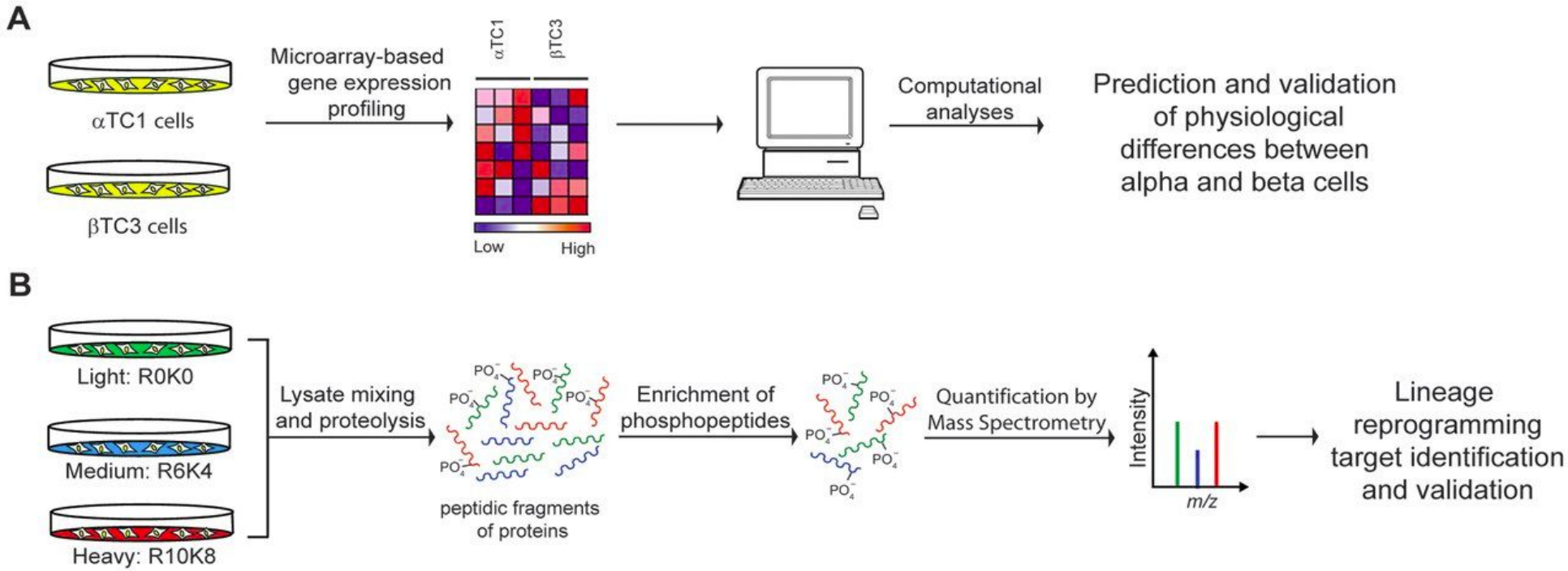


Схема метаболического мечения белков – культивирование клеток на средах с разным содержанием “лёгких” и “тяжёлых” аминокислот – метод SILAC



C

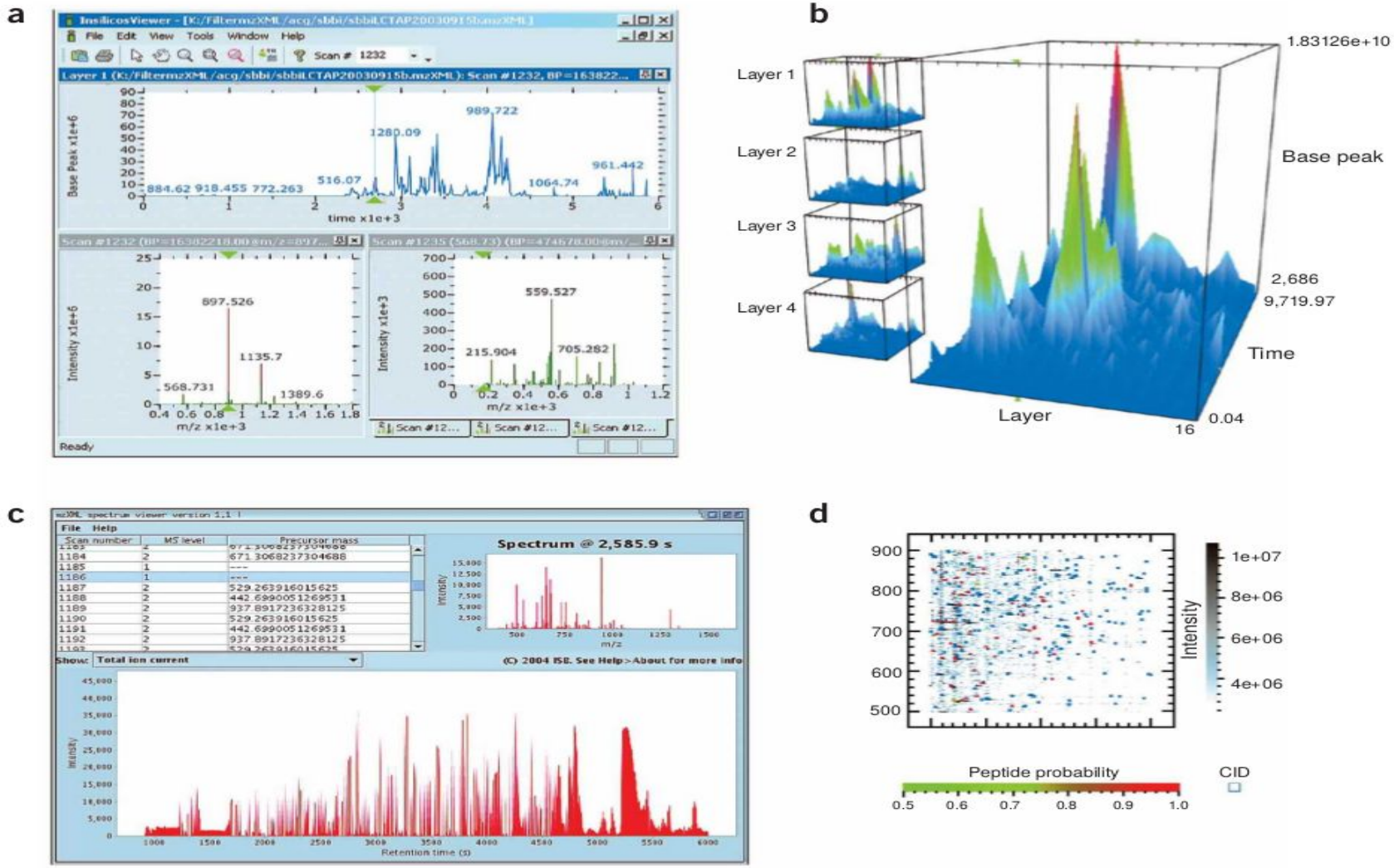
Experiment	Light	Medium	Heavy
1a	βTC3 cells	[αTC1+ βTC3] cells	αTC1 cells
1b	[αTC1+ βTC3] cells	αTC1 cells	βTC3 cells
2a*	No treatment	DMSO, 1h	BRD7389, 1h
2b*	No treatment	DMSO, 120h	BRD7389, 120h
2c*	No treatment	DMSO, 120h	GW8510, 120h

* all alpha cells

Форматы представления МС-данных

- 1. “Родные” форматы приборов
- TDF (Bruker), t2d (ABI), lcd (Shimadzu), tdc (Physical Electronics) и мн. др.
- 2. Универсальные форматы
- mzXML, mzXL

Примеры представления данных из mzXML файлов в разных программах (a,b – InsilicosViewer; c – mzXML Spectrum Viewer; d - Pep3D)



- a,c – масс-спектры и хроматограммы; b – масс-спектры четырёх экспериментов; d – оценка результатов исследования после поиска в пептидной базе данных

Анализ результатов МС-эксперимента

- 1. Поиск по базам данных масс-спектров пептидных фрагментов записей, отвечающих (с учётом посттрансляционных модификаций) с полученными данными (напр., SEQUEST).
- 2. Расчёт вероятности правильного определения пептидов (напр., PeptideProphet).
- 3. Поиск по базам данных масс-спектров триптических гидролизатов белков соответствий с выявленными пептидами и оценка вероятности правильного определения белков (напр., ProteinProphet).
- 4. [Для количественных исследований] Определение количественного отношения белков из разных источников (напр., XPRESS).
- 5. Интерпретация качественных и количественных данных с помощью метаболических сетей (Cytoscape).

Пример результатов анализа масс-спектра с помощью инструмента MS-Fit онлайн-ресурса ProteinProspector

UCSF University of California, San Francisco | About UCSF | Search UCSF | UCSF Medical Center

Home | MS-Fit | MS-Tag | MS-Seq | MS-Pattern | MS-Bridge | MS-Digest | MS-Product | MS-Comp | DB-Stat | MS-Isotope | MS-Homology | MS-Viewer

MS-Fit Search Results

[–] **Parameters**

Database searched: **SwissProt.2017.11.01**
Digest Used: **Trypsin**
Max. # Missed Cleavages: **1**
Constant Modification: **Carbamidomethyl (C)**
Minimum Matches: **4**
Sort Type: **Score Sort**
Considered modifications: | **Peptide N-terminal Gln to pyroGlu** | **Oxidation of M** | **Protein N-terminus Acetylated** |
Min Parent Ion Matches: **1**
MOWSE On: **1**
MOWSE P Factor: **0.4**
Report Homologous Proteins: **Interesting**

[+] **Pre Search Results (SwissProt.2017.11.01)**

Fraction-Spot-Run ID: **1-1-1**
MS-Fit search selects **2350** entries (results displayed for top **5** matches).

[–] **Results Summary**

Protein Hit Number	MOWSE Score	# pep # mat % mat 52 pks	% Cov	% TIC	Mean Err ppm	Data Tol ppm	# Hom Prot	MS-Digest Index #	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Species	Protein Name
1	6.97e+11	27/26/50	24.4	50.0	-0.168	13.2	No	510649	124105/5.3	P30822	YEAST	Exportin-1
2	9679	6/6/12	11.6	11.5	-2.19	31.6	1	456342	76189/5.1	P37465	BACSU	Methionine--tRNA ligase
4	2022	6/6/12	6.7	11.5	-3.90	24.3	No	448675	93395/5.5	B0SZN4	CAUSK	Alanine--tRNA ligase
5	1957	6/6/12	9.9	11.5	2.15	28.2	No	457858	68567/5.1	Q1J9R3	STRPB	Proline--tRNA ligase

| | | |

FASTA – универсальный формат представления первичной структуры белков и нуклеиновых кислот

- >BBB04705.1 M1 protein [Influenza A virus (A/WSN/1933(H1N1))]
- MSLLTEVETYVLSIVPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEVLMEWL

KTRPILSPLTKGILGFVFTLTVPSERGLQRRRFVQNALNGNGDPNN

MDKAVKLYRKLKREITFHGAKEIALSYSAGALASCMGLIYNRMGAV

TTEVAFGLVCATCEQIADSQHRSHRQMVTTTNPLIRHENRMVLAS

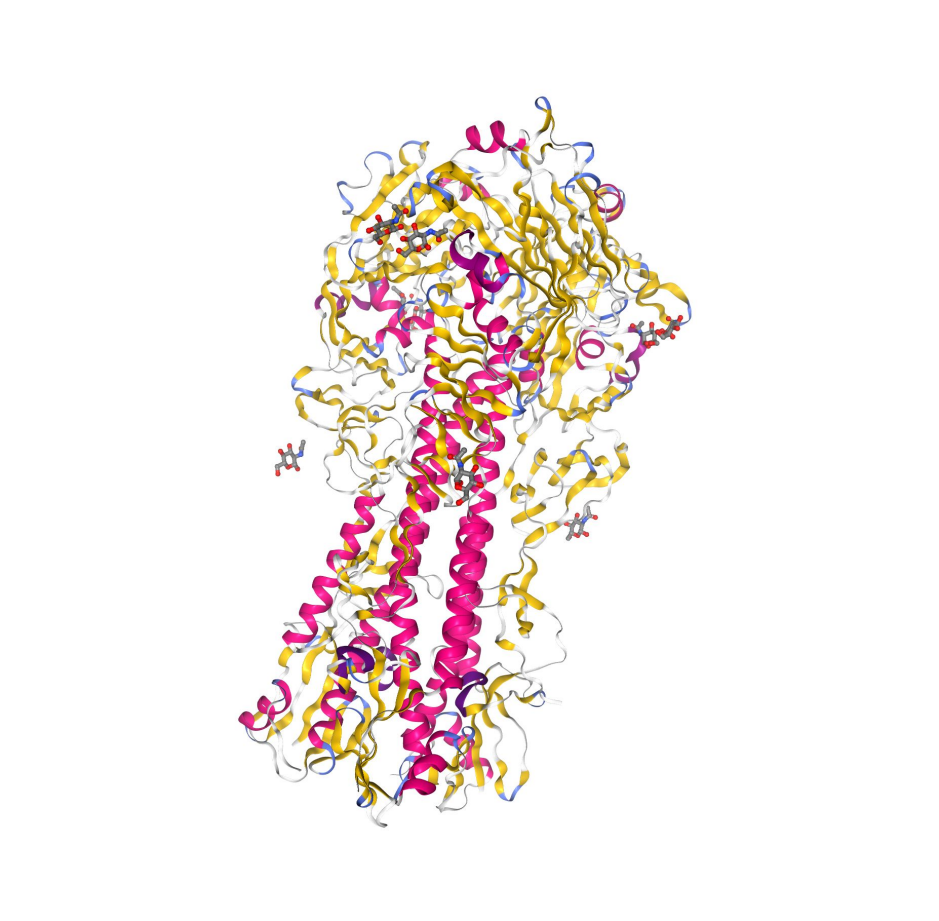
TTAKAMEQMAGSSEQAAEAMDIASQARQMVQAMRTVGTHPSSS

AGLKDDLLENLQAYQKRMGVQMQRFK

Обозначение аминокислот в формате FASTA

Код	Значение	Код	Значение

Трёхмерная структура гемагглютинина H1, полученная с помощью средств базы данных PDB (разным цветом обозначены разные участки вторичной структуры)



Протеомные базы данных и интернет-ресурсы

- **Molbiol** – https://www.molbiol.ru
- операции с нуклеотидными и аминокислотными последовательностями и др.
- **NCBI** – https://www.ncbi.nih.nlm.gov/Protein
- белковые последовательности, их сравнение, статьи и пр.
- **Protein Data Bank (PDB)** – https://www.rcsb.org
- структура белковых молекул
- **ExPASy** – https://www.expasy.org/proteomics
- портал биоинформатических ресурсов
- **ProteinProspector** – https://www.prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm
- инструменты для анализа масс-спектров макромолекул