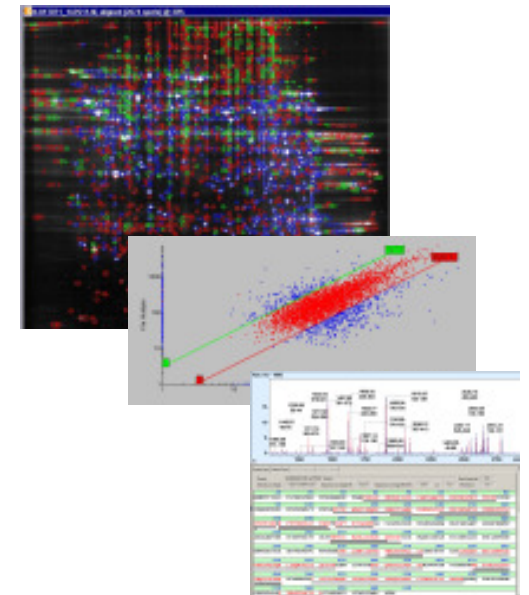


Innovative Technologien für die Wirkungsbezogene Analytik I:

Proteomics

Axel Oberemm

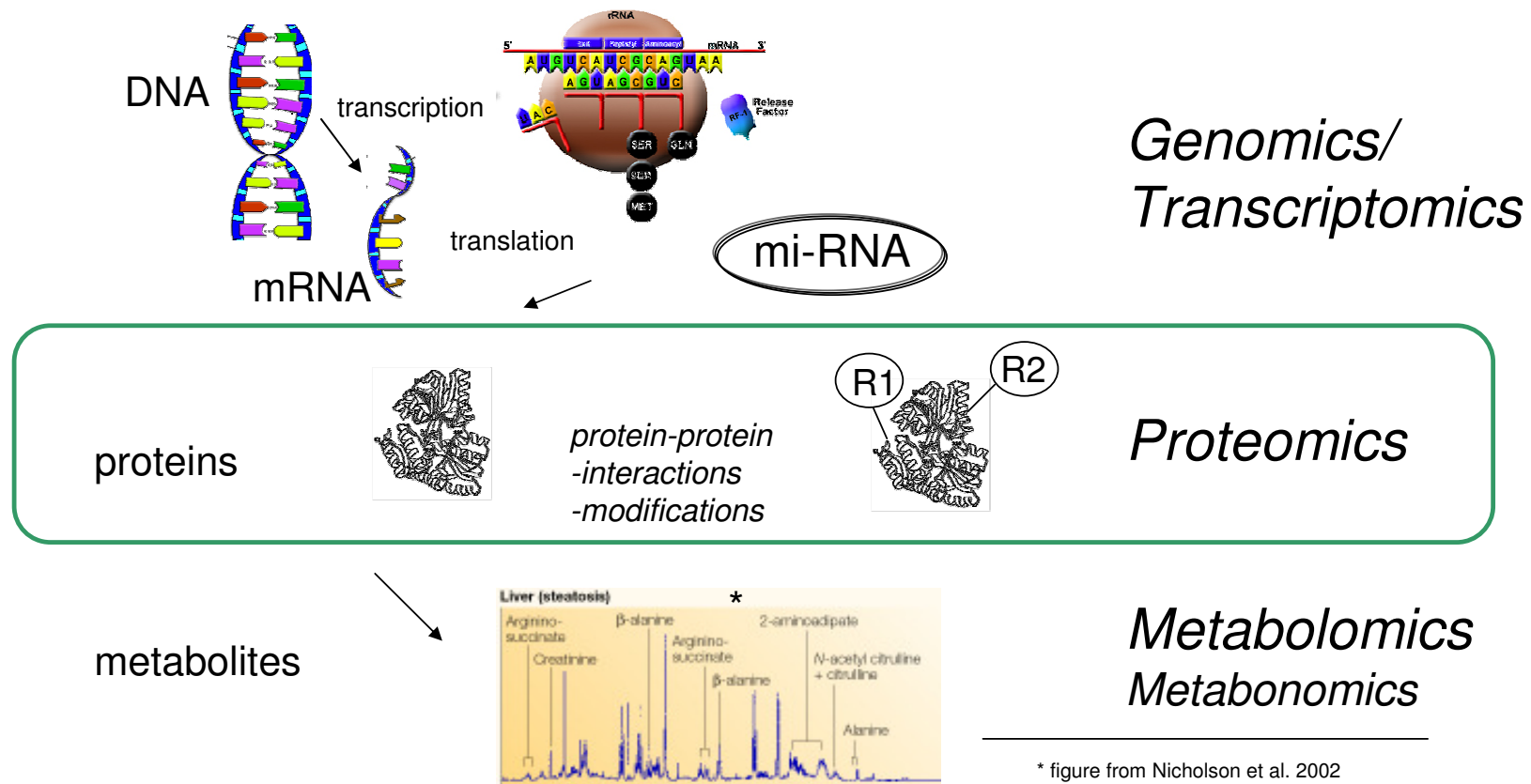
Abteilung Lebensmittelsicherheit



Proteomics (Proteomik)

- Charakterisierung der Form, Funktion und Interaktion der Proteine eines Organismus
- globale Analyse der Expression von Proteinen in Organismen (Zellen, Geweben)
- zentrale Bedeutung der Proteine für die Steuerung von zellulären Prozessen:
 → exogene Einflüsse bewirken komplexe, spezifische Änderungen der Proteinexpression

OMICS Methoden

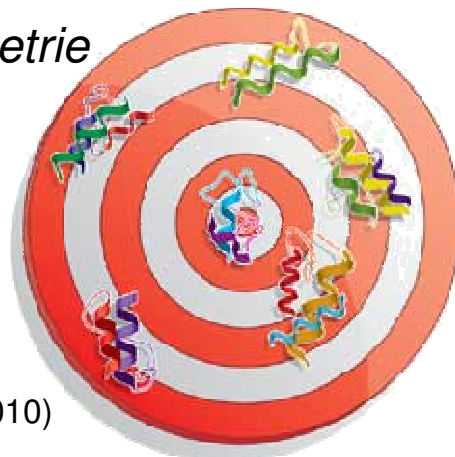


Proteomics- Strategien

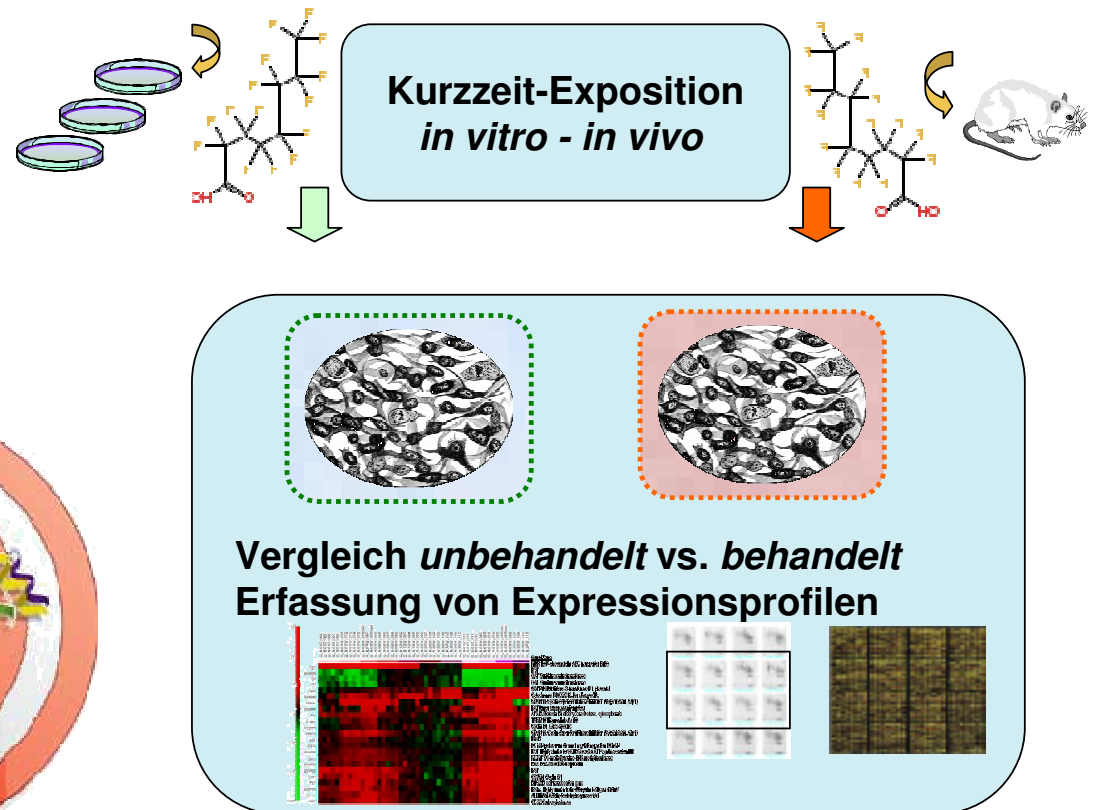
- klassischer Ansatz: globaler Vergleich von Zuständen (Situation A vs. B vs. C ...)
- nicht Hypothesen-basiert, keine Vorinformation nötig (“Discovery Proteomics”)
- 2-DE basierte Proteomics (“Top-Down”), “Shotgun” – Proteomics (“Bottom-up”)
- Analysen können Ergebnisse und Erkenntnisse liefern, die mit anderen Methoden gezielt weiter untersucht werden können

- “Targeted” Proteomics: sensitive Erfassung, Charakterisierung und Quantifizierung einzelner ausgewählter Proteine

- *Hypothesen-basiert*
- *Massenspektrometrie*
- *SRM, MRM*



Nature Methods 7, 34 (2010)



Globale Analyse der Proteinexpression

- Erfassung und Quantifizierung möglichst vieler Proteine in einer biologischen Probe
- Hauptziele: Kategorisierung und Zuordnung von Expressionsprofilen
+ Aufklärung von Wirkungsmechanismen, Etablierung von Biomarkern

Herausforderungen

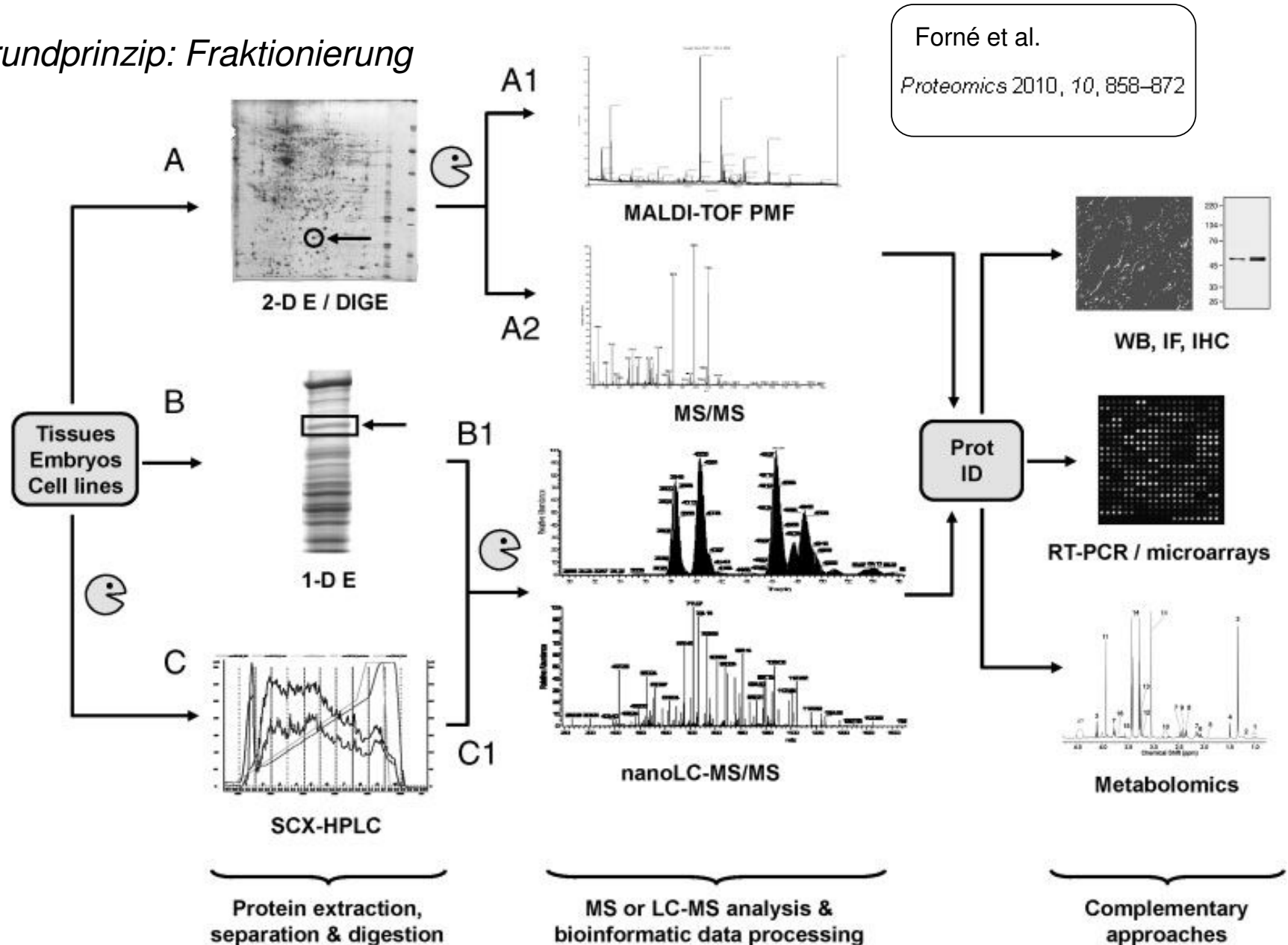
- Unterschiedliche chemisch-physikalische Eigenschaften der Proteine:
Molekulargewicht, wasserlöslich – fettlöslich, Polarität
→ Extraktion/ Solubilisierung Trennung + Quantifizierung
- Komplexizität:
Diversität > 20 Tsd. Gene → Splicing, Modifikationen, Degradierung
> 30 Tsd. Proteinspezies/ Zelle
+ Abundanzen (dynamischer Bereich $< 10^2 - \gg 10^6$)
→ abundante Proteine maskieren gering exprimierte Proteine
→ zeitliche Dynamik

Durchführung

- Grundprinzip: Solubilisierung der Proteine + Fraktionierung der komplexen Proteinextrakte
- tryptischer Verdau zu einem Peptidgemisch
- Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie und Datenbanksuche

Methodenübersicht

Grundprinzip: Fraktionierung



2-DE (2D Elektrophorese)-basierte Proteomics („top-down“)

■ Trennung komplexer Proteinlysate über

- isoelektrischen Punkt (pH-Gradient, isoelektrische Fokussierung/ IEF) und
- Molekülgröße (SDS-PAGE) O'Farrell und Klose, **NEPHGE** (1975)

■ (1) **NEPHGE-Technik (Nonequilibrium pH Gel Electrophoresis)**

- IEF mittels pH-Gradienten im Röhrchengel (Träger-Ampholyte, Acrylamid)
- IEF nicht bis zum Steady State (Kathodendrift)
- hochauflösend, gute Trennung im hochmolekularen und basischen Bereich
- manuell sehr anspruchsvoll, hohe Anforderungen für reproduzierbare Ergebnisse
- max 8 Gele/ Kammer

■ (2) **IPG-Technik (Görg 1982)**

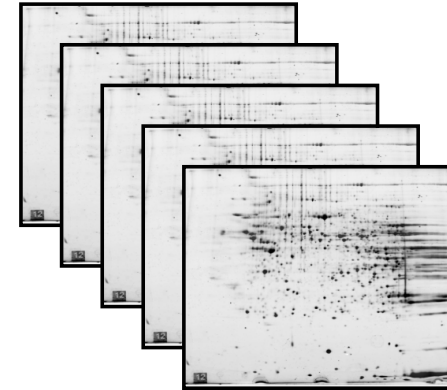
- IEF mittels Gelstreifen auf Kunststoffolie (fixierter pH Gradient, Immobiline)
- IPG-Gelstreifen kommerziell erhältlich (max 24cm), mehrere Monate lagerungsfähig
- SDS-PAGE wie bei NEPHGE
- 12 Gele/ Kammer
- problematisch: Trennung im basischen Bereich („streaking“)

■ (3) **DIGE (Difference in gel electrophoresis)**

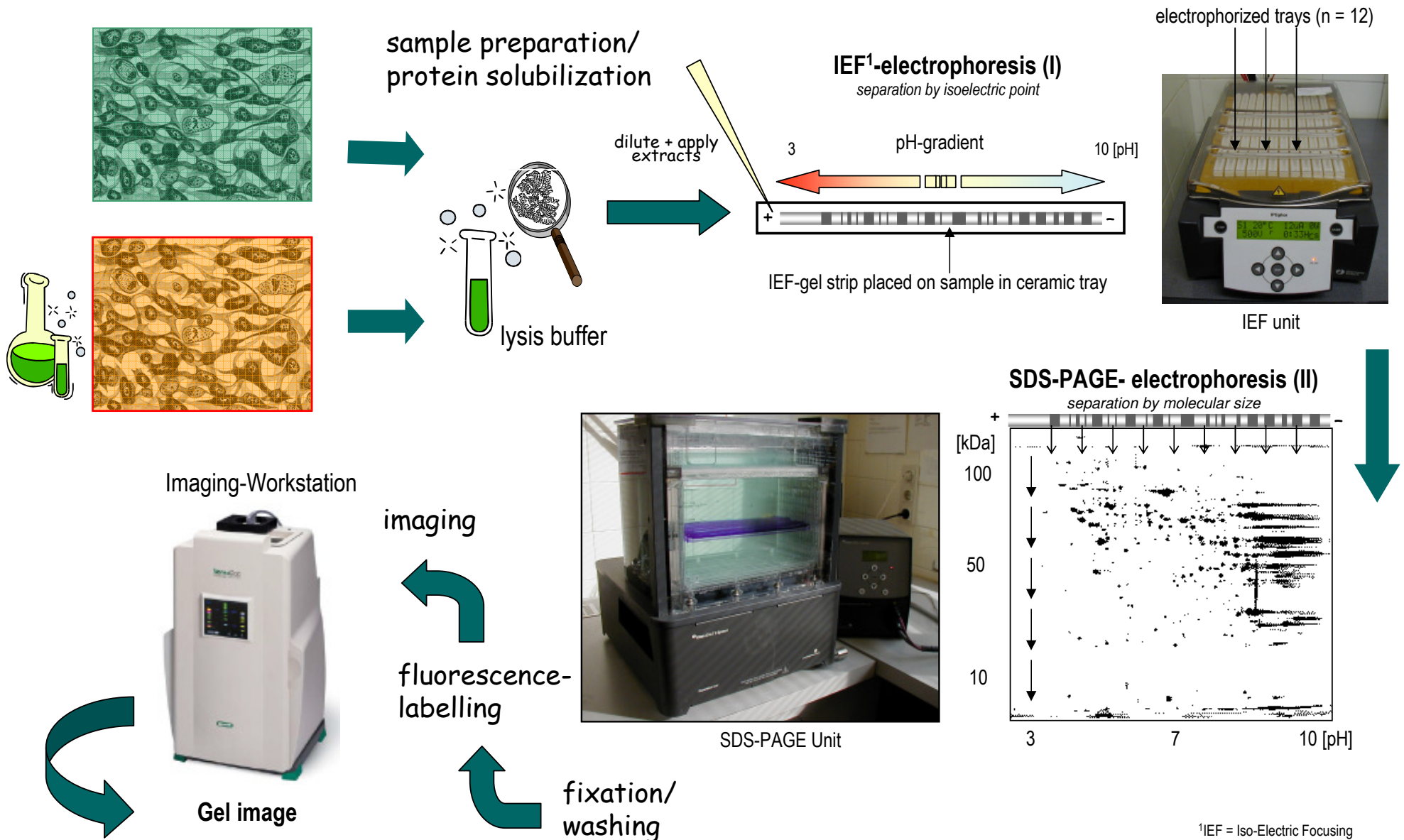
- 2 Proben + interner Standard in einem Gel
- Fluoreszenzmarker Cy3, Cy5, Cy2, *Multiplexing*

2D Elektrophorese (2-DE)

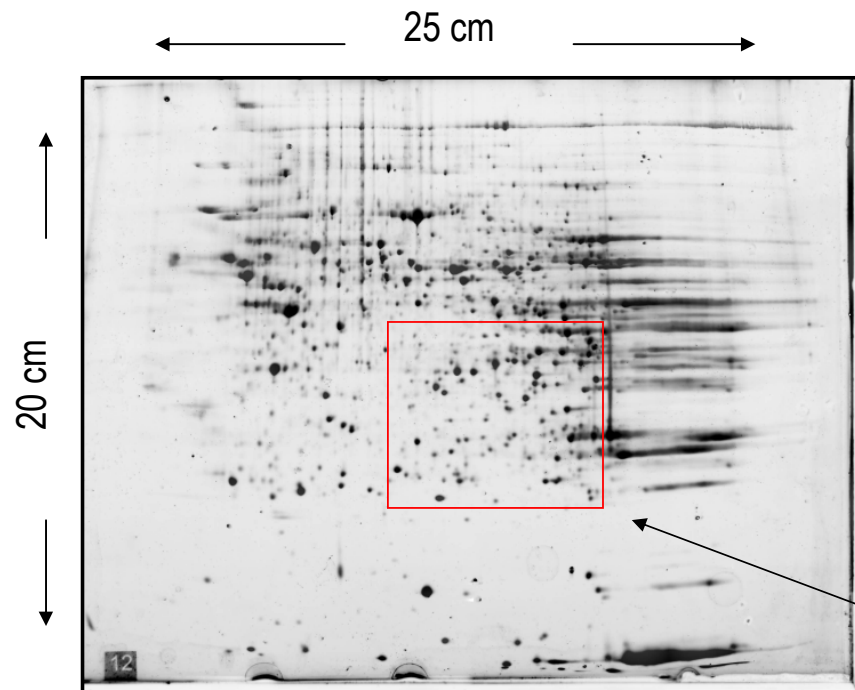
- immer noch führende Technik
- aus komplexen Proteingemischen (Lebergewebe) lassen sich mehrere Tausend Spots trennen
- gut zur Erfassung differentiell exprimierter Proteine geeignet (Quantifizierbarkeit)
- Limitationen:
 - sehr kleine + große sowie stark saure/ basische Proteine sind unterrepräsentiert
 - Berücksichtigung von Membranproteinen nur schwer möglich (Löslichkeit + Basizität)
 - Proben müssen einen Proteingehalt im Bereich $> 10 \mu\text{g}$ aufweisen



2-DE Proteomics Workflow (BfR)

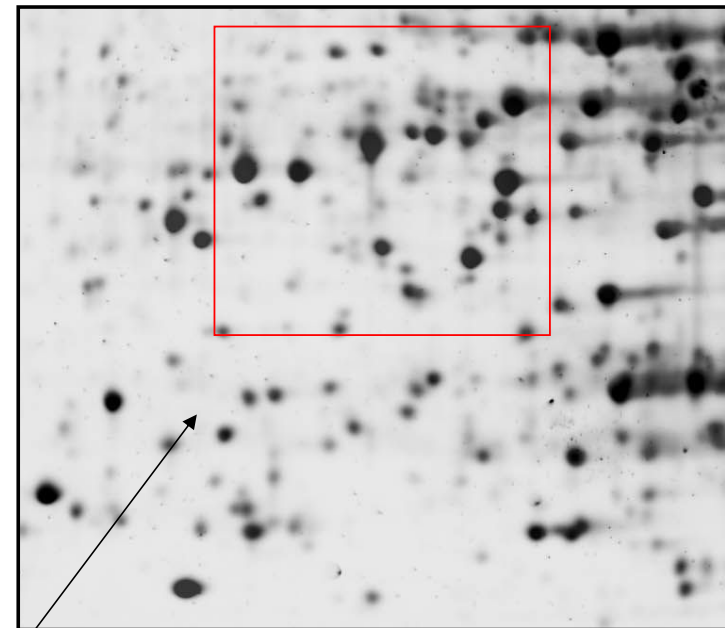


¹IEF = Iso-Electric Focusing

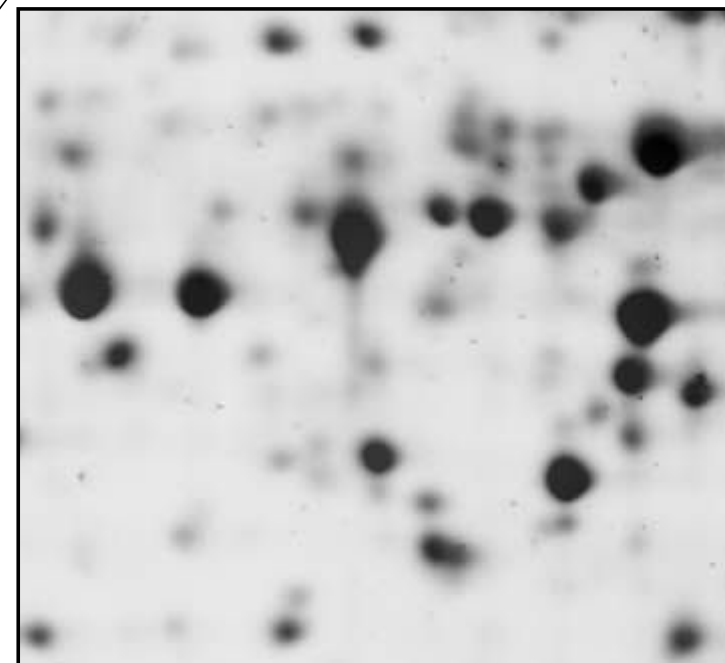


2-D gel image
100 μ m, 16 bit (10 MB)
(BfR, rat liver crude extract)
staining: Ruthenium II Tris
app. 5.000 spots resolvable

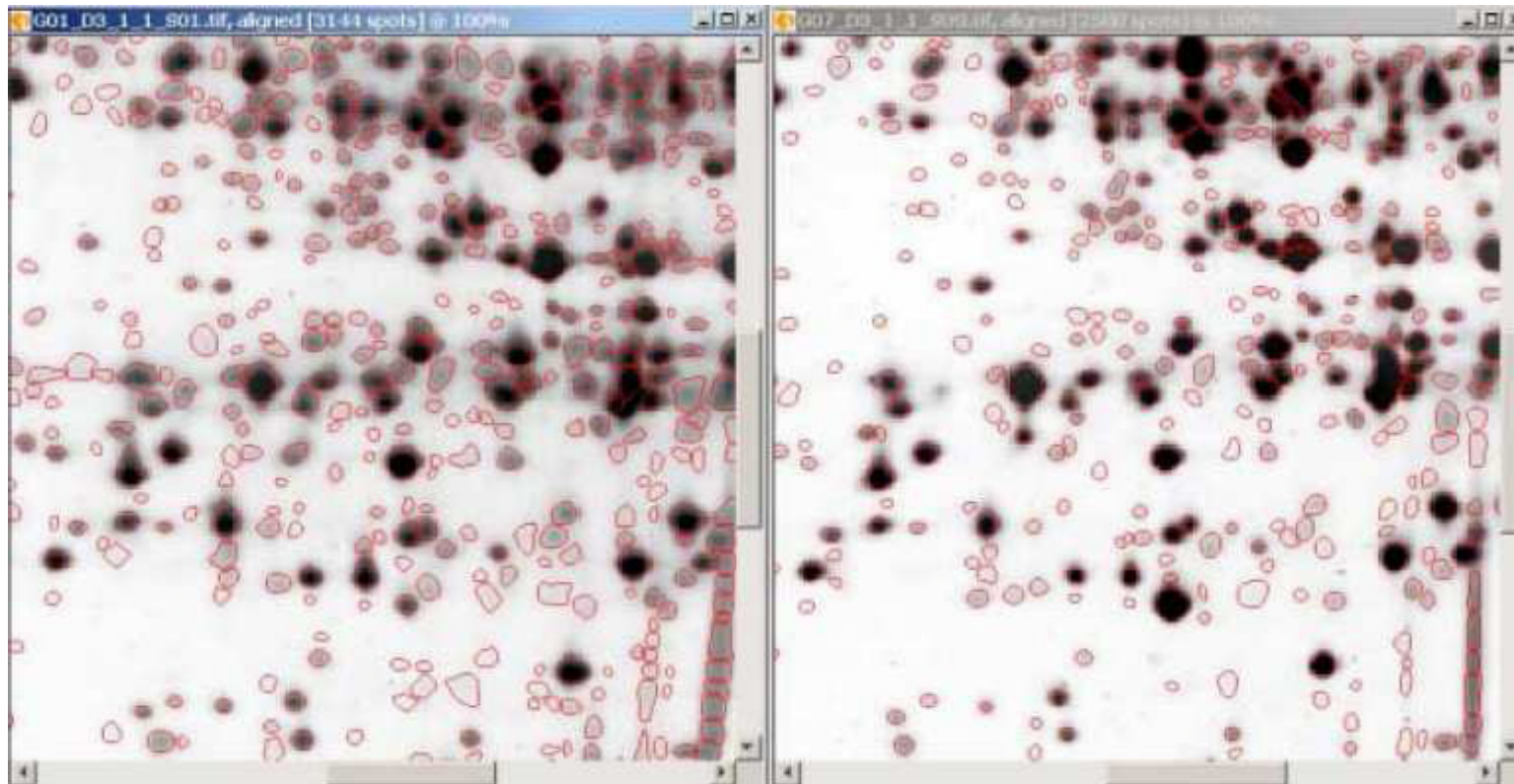
zoom I



zoom II



Gelbildanalyse



Spot Detection + Warping

Spot Matching

Normalization

Identification of interesting spots



Commercial Software

Delta-2D

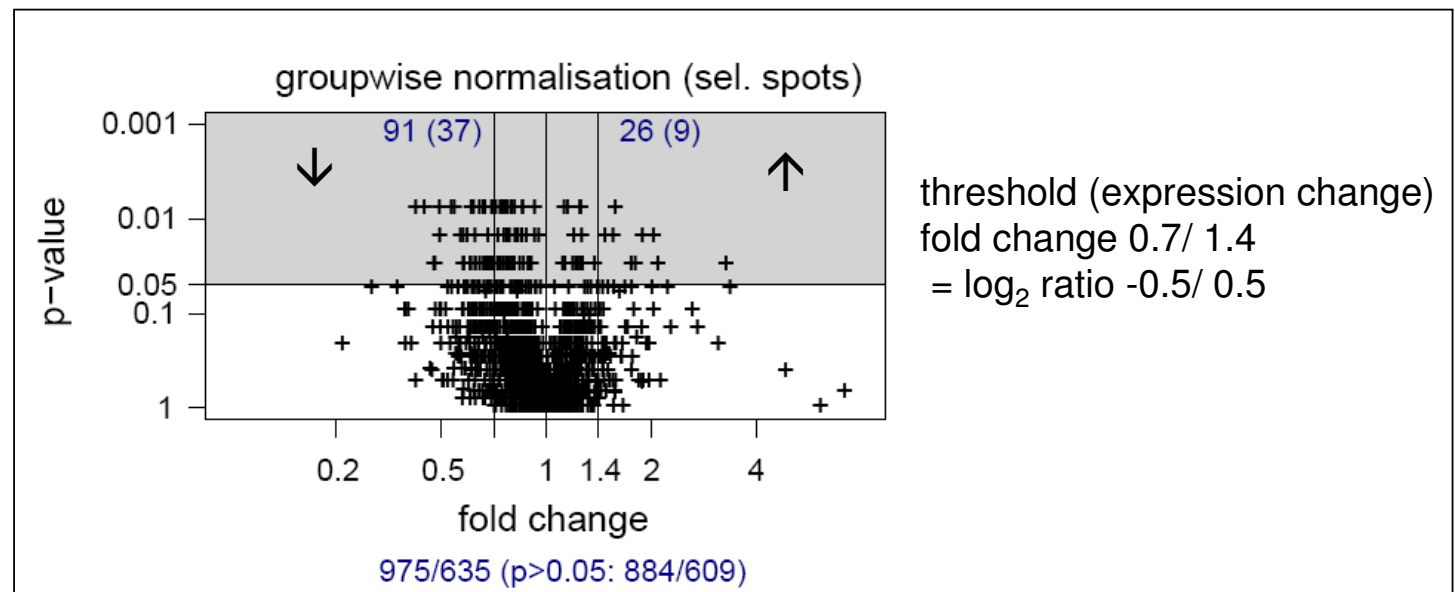
ProteinMine

Biostatistics

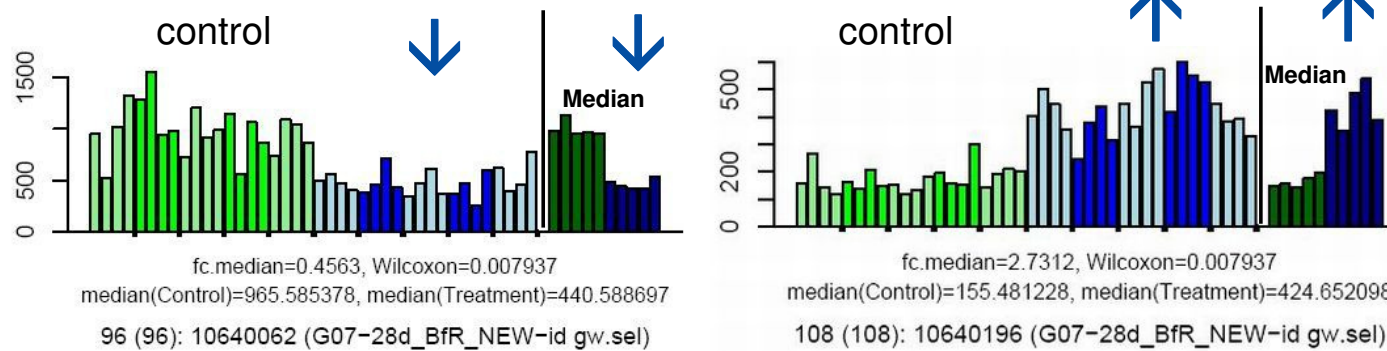


- equalize intensity medians of gels
- absence-presence search + statistical testing

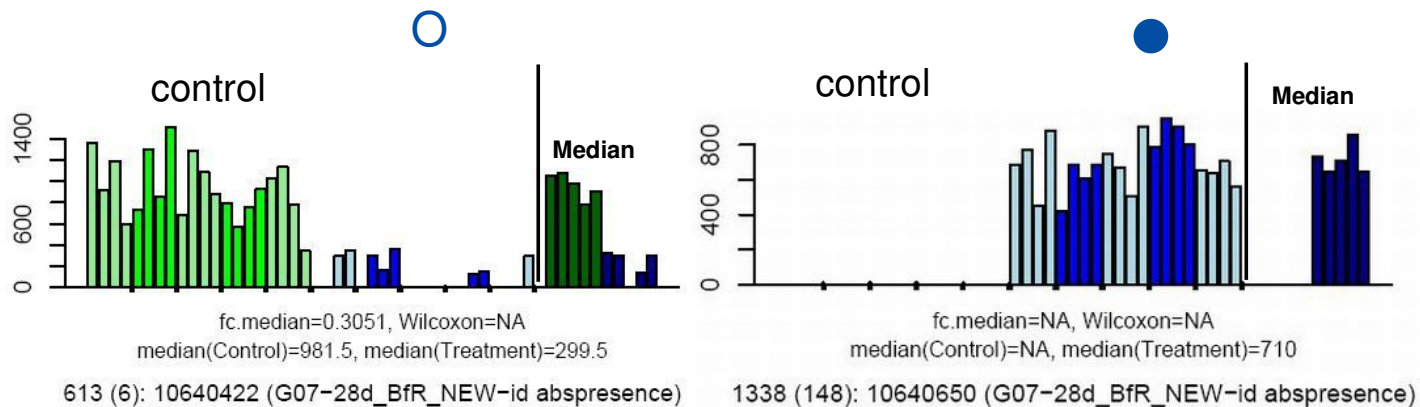
Datenanalyse/ Biostatistik



A)



B)



KDa

100

Spotmapping

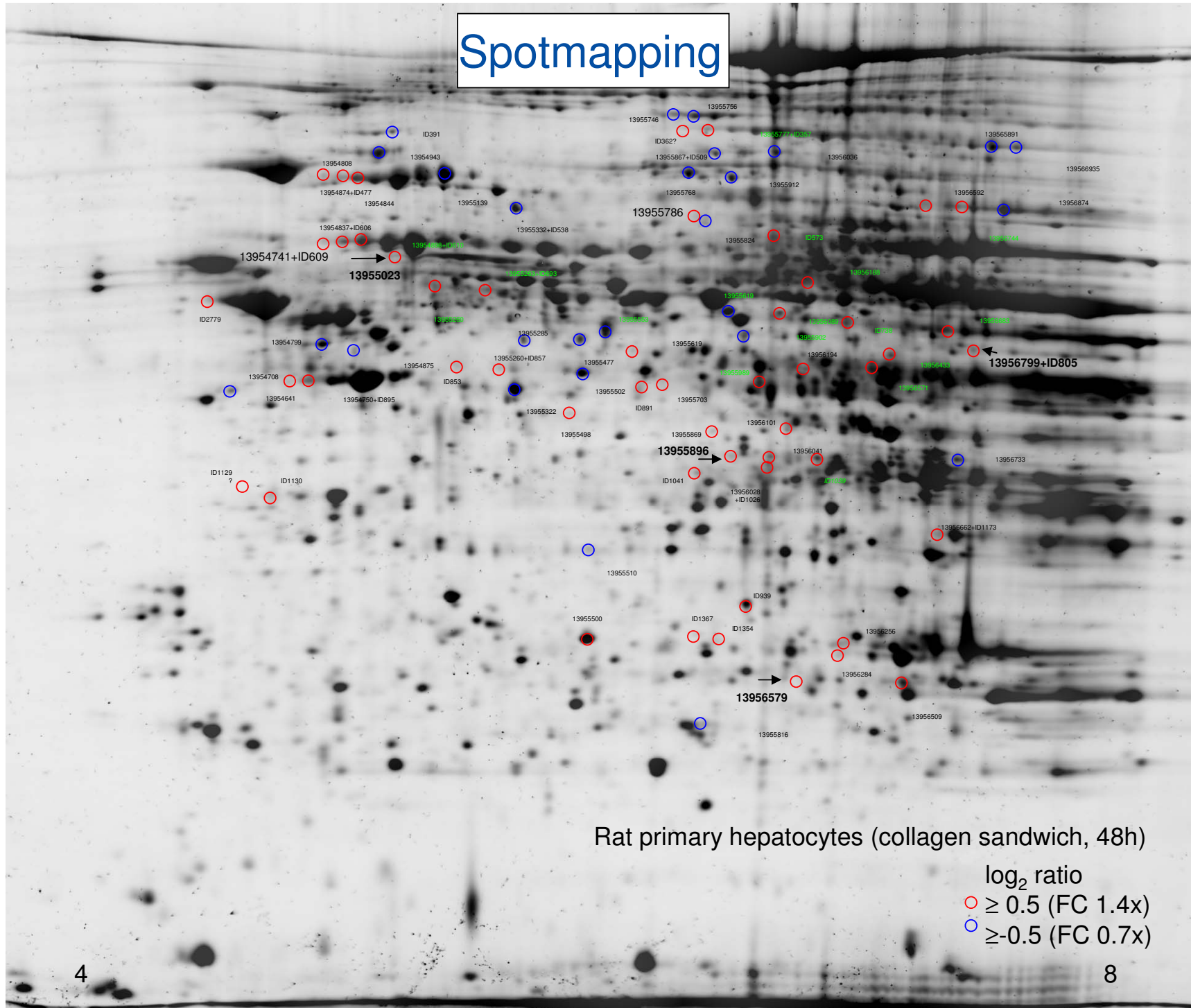
50

10

4

8

pH

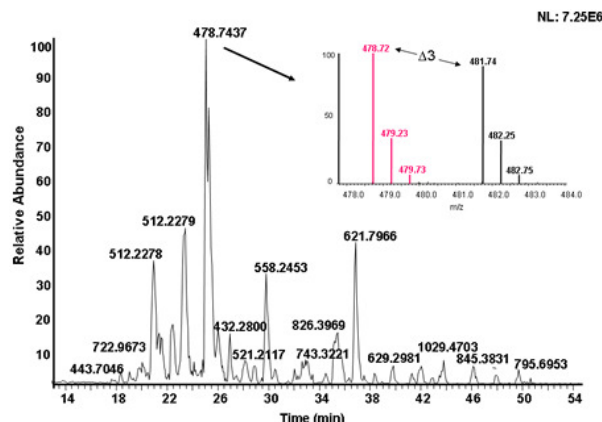


Rat primary hepatocytes (collagen sandwich, 48h)

log₂ ratio
○ ≥ 0.5 (FC 1.4x)
○ ≥ -0.5 (FC 0.7x)

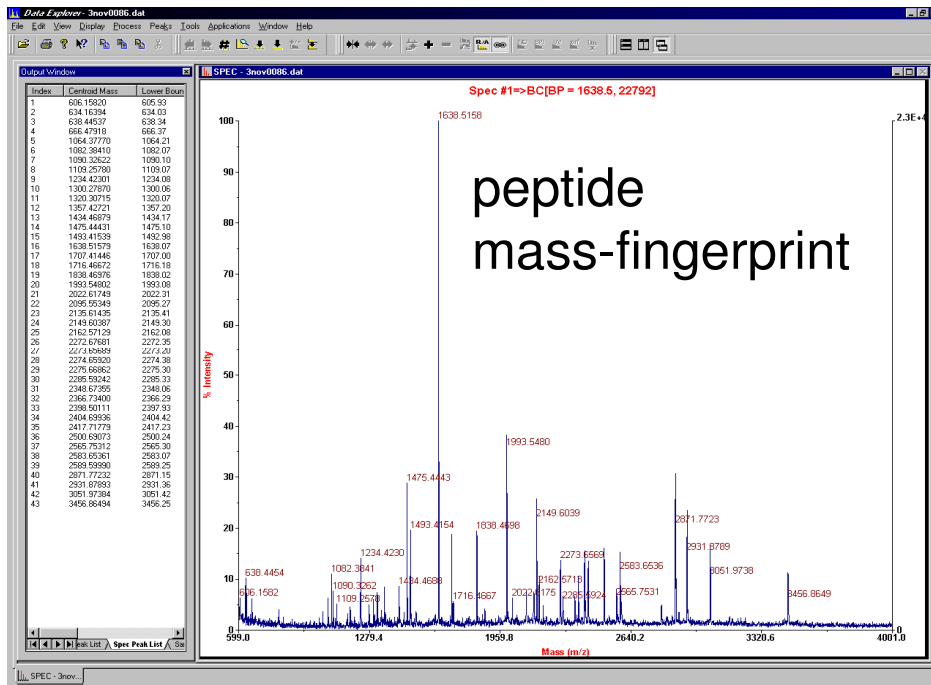
Proteinidentifizierung - Massenspektrometrie

- Spotentnahme aus 2-DE Gel (“Picking”) manuell oder mittels Roboter
- Proteingelspots werden mit Trypsin verdaut
- aufspotten der Probe (Peptidgemisch) auf MALDI-Target Platte
- Messung mit MALDI-TOF MS/MS
 - Peptide-Mass-Fingerprint (PMF)
 - Ionenfragmentierung, Massenselektion (MS/MS)
- alternativ: Messung mit ESI-QTOF MS/MS
(falls keine Identifizierung mittels MALDI)



PMF + MS/MS Spektren

Proteinidentifizierung – PMF + MS/MS (MALDI-TOF)



Database-search

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

Your name: kalenberg | Email: kalenberg@mp-berlin.de

Search title: Oberemm 10/T62

Database: NCBInr

Taxonomy: Rodentia (Rodents)

Enzyme: Trypsin | Allow up to: 1 missed cleavages

Fixed modifications: AB_olc_ICAT00 (C), AB_olc_ICAT08 (C), Acetyl (C), Acetyl (N-term), Amide (C-term)

Variable modifications: N-Acetyl (Protein), N-Formyl (Protein), NIPCAM (C), O18 (C-term), Oxidation (M)

Protein mass: kDa | Peptide tol.: 0.1 Da

Mass values: MH⁺ M_r | Monoisotopic Average

Data file: [] | Durchsuchen...

Query: 610.55402, 634.27465, 638.57689, 713.40225, 810.51298, 1033.57223

Overview: | Report top: 10 hits

Start Search ... | Reset Form

MS/MS / Fragmentionenanalyse:
 → Zuordnung zu einem spezifischen Peptid möglich

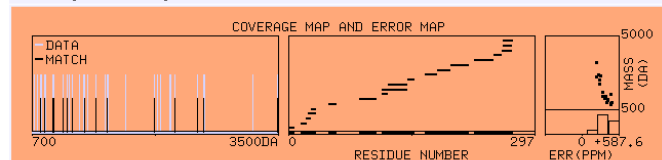
ProFound - Search Result Details

Copyright © 1997-2002 ProteoMetrics LLC

Details for rank 1 candidate in search 20040514111419-05F8-127000000001

- gi|6325126|ref|NP_015194.1 Homology to rat ribosomal protein L5; required for assembly of stable 60S ribosomal subunits; Rpl5p [Saccharomyces cerevisiae]
- gi|1071983|pir| S42144 ribosomal protein L5.e, cytosolic - yeast (Saccharomyces cerevisiae)
- gi|172424|gb|AAA34979.1 ribosomal protein L1
- gi|1244783|gb|AAB68228.1 Lp114p

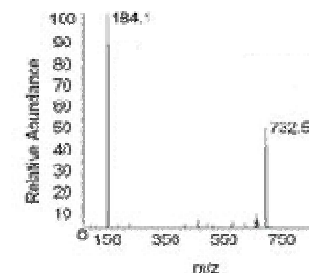
Sample ID : C:\Documents and Settings\demo\Desktop\Spectra Yeast\subset\09_MS [Pass:0]
 Measured peptides : 38
 Matched peptides : 17
 Min. sequence coverage: 63%



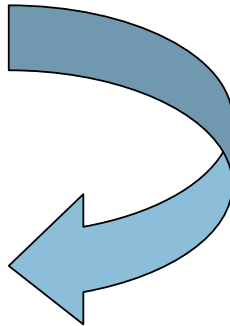
Note: click on the symbol to change column format.

Mass (M)	Mono	Avg/Computed Mass	Error (ppm)	Residues	Missed	Peptide sequence	
Start	To	Cut					
800.848	M	800.473	469	22	27	3	RPRRCK
844.758	M	844.371	458	28	33	0	TDYYOR
937.844	M	937.475	393	113	120	0	LGLDETYR
937.844	M	937.469	400	1	8	1	MAFQDKAK
950.974	M	950.508	490	16	22	1	FQTPFRK

MASCOT search results



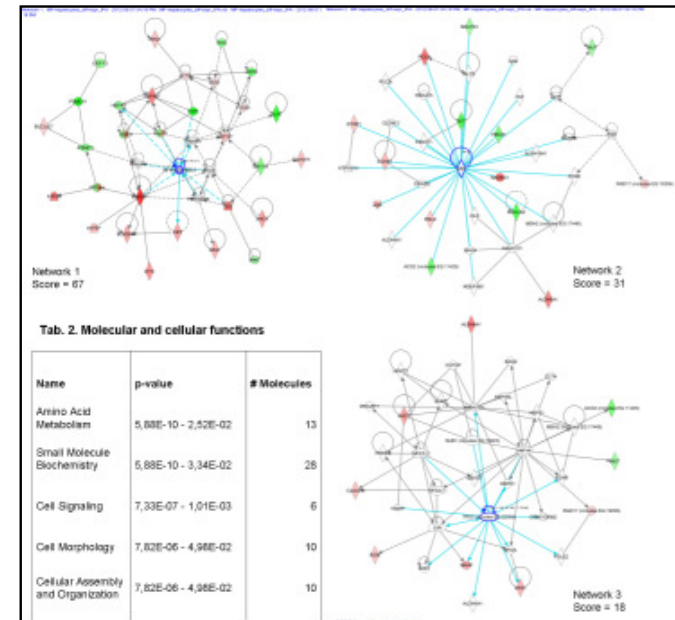
■ Proteinlisten



Log2 Ratio	Uniprot-ID	Notes	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)	Log2 Ratio	Uniprot-ID	Notes	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
3,950	P63038	D	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	Cytoplasm	enzyme	0,984	Q58F93		Ka3	kyunurine aminotransferase III	unknown	enzyme
2,895	Q1HCL7		NADK1	NAD kinase domain containing 1	Cytoplasm	other	0,930	Q68FU3	D	ETFB	electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	Cytoplasm	transporter
2,853	P07734		ALB	albumin	Extracellular	transporter	0,926	Q9P2R7	D	SUCLA2	succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit	Cytoplasm	enzyme
2,653	Q91Z93		PCCA	propionyl CoA carboxylase, alpha polypeptide	Cytoplasm	enzyme	0,895	Q6XW6		RAD17	cell cycle checkpoint protein RAD17	Nucleus	other
2,632	P06576		ATP5B	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex	Cytoplasm	transporter	0,846	Q5BJY9	D	KRT18	keratin 18	Cytoplasm	other
2,445	P63018	D	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	Cytoplasm	enzyme	0,633	P63038	D	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	Cytoplasm	enzyme
2,442	P00367		GLUD1	glutamate dehydrogenase 1	Cytoplasm	enzyme	0,478	P60711		ACTB	actin, beta	Cytoplasm	other
2,350	Q63342		DMGDH	dimethylglycine dehydrogenase	Cytoplasm	enzyme	-1,915	Q2K142		PSMD11	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit	Cytoplasm	other
2,341	Q02253		ALDH6A1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	Cytoplasm	enzyme	-1,870	P28480		TCP1	t-complex 1	Cytoplasm	other
2,123	P63018	D	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	Cytoplasm	enzyme	-1,751	P08461		DLAT	dihydropyrimidine S-acetyltransferase	Cytoplasm	enzyme
1,889	P11725		OTC	ornithine carbamoyltransferase	Cytoplasm	enzyme	-1,516	P50137	D	TKT	transketolase	Cytoplasm	enzyme
1,861	P63038	D	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	Cytoplasm	enzyme	-1,491	Q6Z218		SUCLG2	succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit	Cytoplasm	enzyme
1,792	P10760		AHCY	adenosylhomocysteinase	Cytoplasm	enzyme	-1,290	Q10758		KRT8	keratin 8	Cytoplasm	other
1,711	P11960	D	BCKDHA	branched chain keto acid dehydrogenase E1	Cytoplasm	enzyme	-1,179	Q6ER34		ACD2	aconitase 2, mitochondrial	Cytoplasm	enzyme
1,711	P53395		DBT	dihydropyrimidine branched chain transacylase E2	Cytoplasm	enzyme	-1,169	Q5XK20	D	TRAP1	TNF receptor-associated protein 1	Cytoplasm	enzyme
1,612	Q64640		ADK	adenosine kinase	Nucleus	kinase	-1,126	Q5XIE6		HIBCH	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase	Cytoplasm	enzyme
1,612	Q80XB4		NRAP	netubin-related anchoring protein	Cytoplasm	other	-1,079	P13444		MAT1A	methionine adenosyltransferase 1, alpha	Cytoplasm	enzyme
1,402	P14568		ASS1	argininosuccinate synthase 1	Cytoplasm	enzyme	-1,077	P11960	D	BCKDHA	branched chain keto acid dehydrogenase E1 alpha polypeptide	Cytoplasm	enzyme
1,379	Q68FU3	D	ETFB	electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	Cytoplasm	transporter	-1,051	P62193		PSMC1	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit	Nucleus	peptidase
1,351	P14604		ECH51	enoyl CoA hydratase, short chain, 1, mitochondrial	Cytoplasm	enzyme	-1,033	Q5XK20	D	TRAP1	TNF receptor-associated protein 1	Cytoplasm	enzyme
1,263	Q6BJY9	D	KRT18	keratin 18	Cytoplasm	other	-0,981	Q32LP2		RDX	radixin	Cytoplasm	other
1,227	Q6BJY9	D	KRT18	keratin 18	Cytoplasm	other	-0,958	Q5BJY9	D	KRT18	keratin 18	Cytoplasm	other
1,202	P20817		Cyp4a14	cytochrome P450, family 4, subfamily a polypeptide 14	Cytoplasm	enzyme	-0,946	Q68FR6		EEF1G	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	Cytoplasm	translation regulator
1,181	P07624		ARG1	arginase, liver	Cytoplasm	enzyme	-0,930	P38647		HSPA9	heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)	Cytoplasm	other
1,079	P29401	D	TKT	transketolase	Cytoplasm	enzyme	-0,815	P16332		MUT	methylmalonyl CoA mutase	Cytoplasm	enzyme
1,070	Q03336		RGN	regucaloin (senescence marker protein-30)	Nucleus	enzyme	-0,783	Q6HF1		NDUFS1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1	Cytoplasm	enzyme
1,049	B0ENL4		ETHE1	ethylmalonic encephalopathy 1	Cytoplasm	enzyme	-0,710	Q5XK20	D	TRAP1	TNF receptor-associated protein 1	Cytoplasm	enzyme
1,001	P63018	D	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	Cytoplasm	enzyme	-0,690	Q6CAQ8		IMMT	inner membrane protein, mitochondrial	Cytoplasm	other
1,000	Q66G31		PBLD	phenazine biosynthesis-like protein domain containing protein	unknown	enzyme	-0,597	Q6Z219	D	SUCLA2	succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit	Cytoplasm	enzyme

■ Netzwerk-/ Pathwayanalyse

- ✓ Analyse der funktionalen Kategorien + Zusammenhänge/ Mechanismen
- ✓ Proteininteraktionen, cell signalling
- ✓ Biomarker
- Hypothesenbildung
- Verifizierung mittels traditioneller molekularbiologischer Techniken



Shotgun-Proteomics (LC-MS/MS)

- generell: komplementärer Einsatz zur 2-DE
- Vorteile: bessere Erfassung kleiner und großer Proteine + saurer + basischer Proteine + gering abundanter Proteine (z. B. Transkriptionsfaktoren)
- Herausforderungen: Reproduzierbarkeit, Quantifizierung, Messzeiten, Datenmengen
- je nach Komplexizität der Probe: Vorfraktionierung erforderlich
- ✓ 1-D Elektrophorese
 - alternativ:**
 - ✓ gelfrei: Säulen-Fraktionierung, auch mehrdimensional
- tryptischer Verdau der Proteine → Peptidgemisch
- HPLC, micro/ nano
- Analyse mittels ESI-MS/MS (Q-TOF, Orbitrap)
- Quantifizierung komplexer Gemische: Isotopemmarkierung

Übersicht - Massenspektrometer

<http://archive.genomeconference.org/File/publicity/Health-Service-in-BGI/Proteomics-platform-by-high-throughput-MS.pdf>

— Mass spectrometry instrument

MS	QTRAP 5500	LTQ-Orbitrap velos	maXis	ultrafleXtreme
Producer	AB SCIEX	Thermo Scientific	Bruker	Bruker
Source-Analyzer	ESI-Triplequadrupole-LIT	ESI-LTQ-Orbitrap	ESI-Q-TOF-MS	MALDI-TOF-TOF
Resolution	>12,000	>100,000	>60,000	≥40,000
Accuracy	≤700 ppm	<1 ppm	<5 ppm	≤3 ppm
Application	<ul style="list-style-type: none"> • MRM • Modification (target protein) 	<ul style="list-style-type: none"> • Profiling • Label-free • iTRAQ • Modification 	<ul style="list-style-type: none"> • Medium complex sample ID 	<ul style="list-style-type: none"> • QC • Peptide and protein molecular weight determination • Low complex sample ID



QTRAP 5500, AB SCIEX



LTQ-Orbitrap velos, Thermo Scientific



maXis Q-TOF, Bruker



ultrafleXtreme, Bruker

Shotgun Strategien

■ 1) *Shotgun (A)*

- ✓ Fraktionierung eines Proteinlysates mittels 1-DE
- *Proteinverlust durch Transfer von IEF- auf PA-Gel wird vermieden*
- ✓ Gel zerschneiden oder Banden ausschneiden, tryptischer Verdau
- ✓ Trennung des Peptidgemisches mittels nano-LC
- ✓ Analyse mittels ESI-MS/MS

■ 2) *Shotgun (B)*

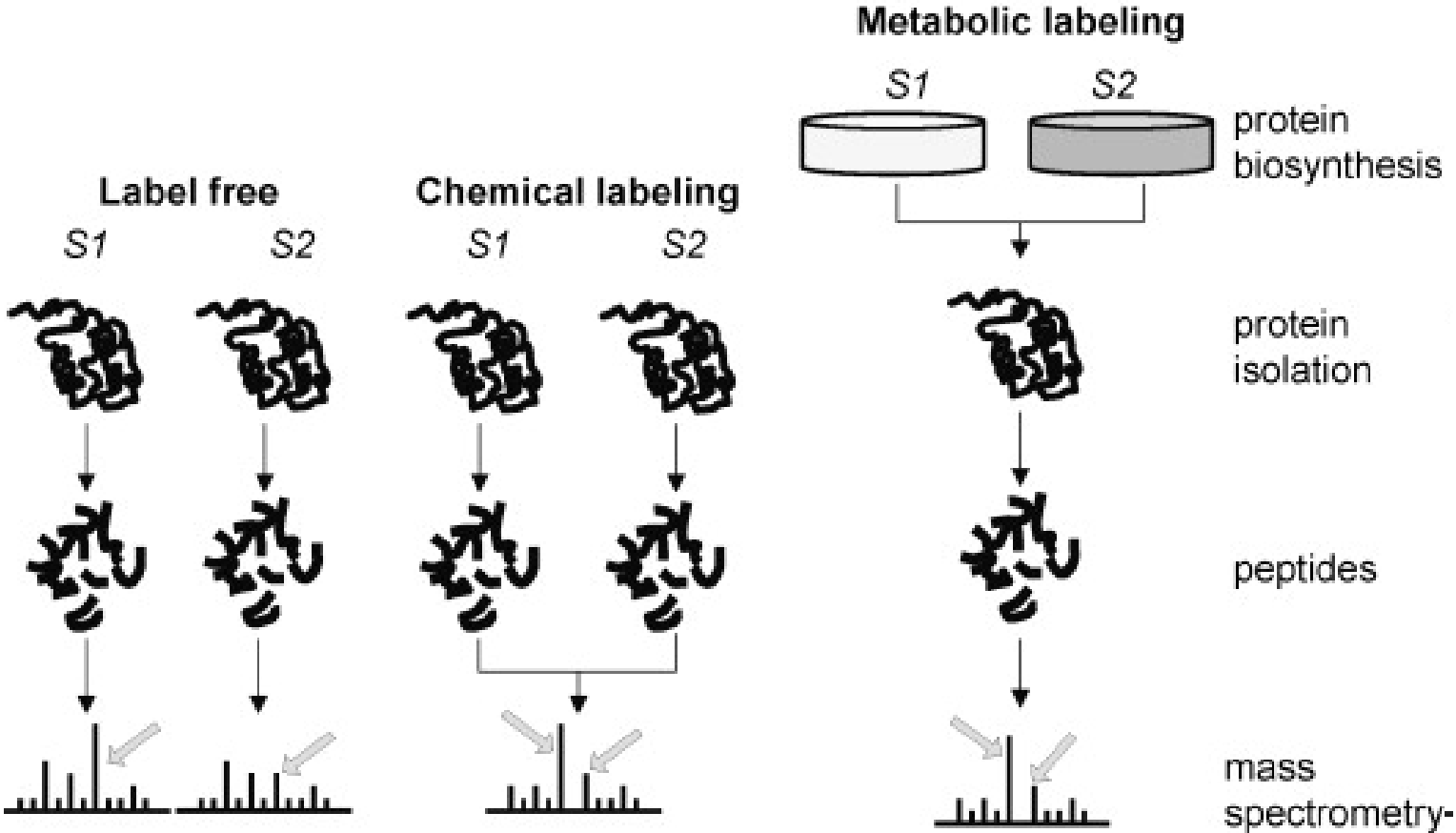
- ✓ (Vorfraktionierung eines Proteinlysates mittels Säulenchromatografie)
- ✓ tryptischer Verdau
- ✓ Trennung des Peptidgemisches mittels nano-LC
- ✓ Analyse mittels ESI-MS/MS

■ 3) *MudPIT* (Multidimensionale Protein Identifikationstechnologie)*:

- ✓ Proteinverdau, Trennung des Peptidgemisches über 2D-Säule mit „reversed phase“ Material + Kationenaustauscher (SCX)
 - Elution der Peptide in 10-15 Salzstufen
- ✓ Analyse mittels ESI-MS/MS: 30-50 Tsd.! Tandem-Massenspektren für ein komplexes Proteingemisch (Zelllysate)
- ✓ „top-down“

*<http://www.ruhr-uni-bochum.de/bioms/forsch.html>

Differentielle Expressionsanalyse mittels MDLC*/MS



- Spectral counting:
number of fragmented spectra
- peptide chromatographic
peak intensity (AUC)

- (1) labeling of proteins:
 - ICAT
 - ICPL
- (2) labeling of peptides
 - iTRAQ:
(erhöhter Probendurchsatz)

- SILAC
labeling of amino acids
(¹³C, ¹⁵N)

*multi-dimensional liquid chromatography
Abb. entnommen aus Zhang et al. (2010)

Phosphoproteomics

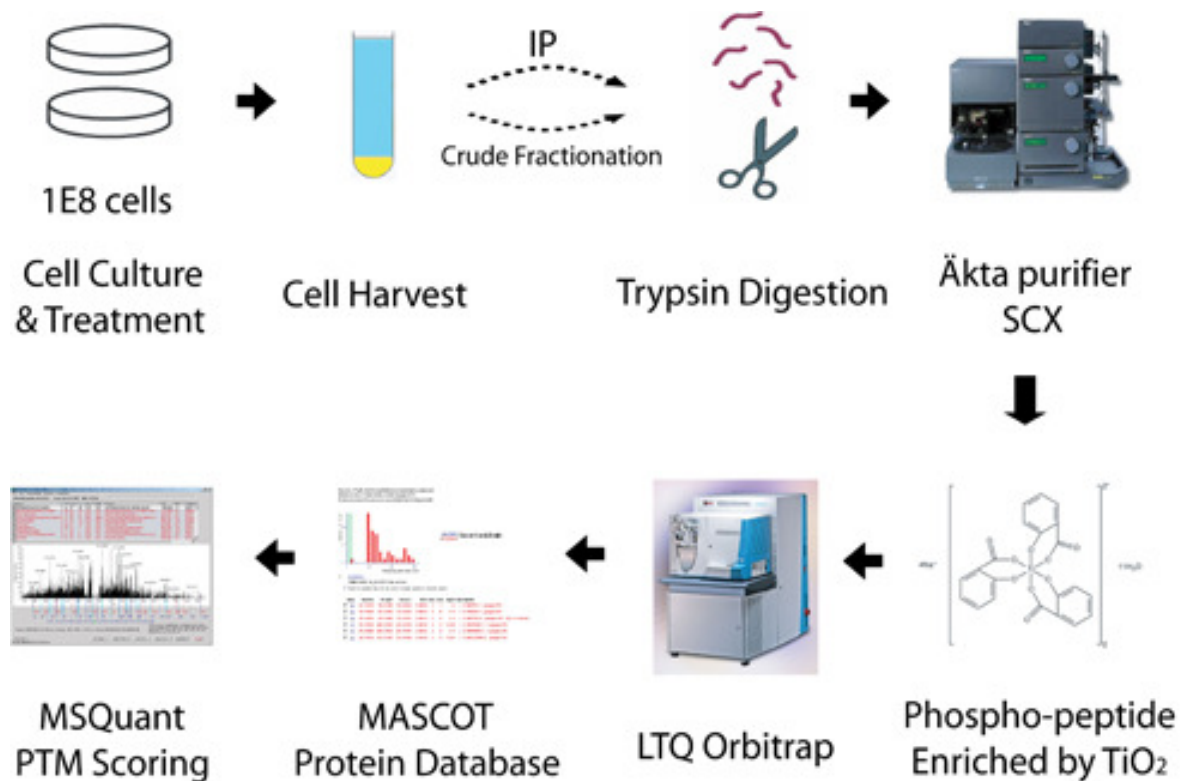
- posttranslationale Phosphorylierung von zellulären Proteinen
- Im Vergleich zu globalen Ansätzen, Beschränkung auf spezifischen Teil des Proteoms
- ✓ betrifft rund 1/3 der zellulären Proteine
- ✓ Änderung des Phosphorylierungsstatus wirkt sich auf die Aktivität aus
- ✓ assoziierte Pathways lassen sich gezielt erfassen- weniger ist oft mehr!
- ✓ Enzymaktivität, Konformation, Protein-Protein Interaktionen, intrazellulärer Transport
 - bedeutend für viele intrazelluläre Signalübertragungen
 - MAPK Pathway, Aktivierung von Onkogenen
 - Entstehung von Krebs

- Glycosylierung

- Ubiquitinierung

Phosphoproteomics

- 2-DE: Proteinextraktion und nachfolgend Markierung der phosphorylierten Proteinspots
 - ✓ ^{32}P Markierung
 - ✓ Pro-Q Diamond gel stain
 - ✓ Lanthan
- gelfrei: Anreicherung über phosphospezifische Antikörper, TiO_2



© 2012, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried

Targeted Proteomics

- Erfassung, Charakterisierung und Quantifizierung ausgewählter Proteine
- auch gering abundante Proteine analysierbar (app. 50 copies/cell)
- geringe quantitative Veränderungen nachweisbar
- wenig Ausgangsmaterial benötigt
- LC-MS/MS (Triple Quad MS): Selected (Multiple Reaction Monitoring (SRM/ MRM)
- Methodenentwicklung für ein Protein vergleichsweise aufwändig
 - ✓ gute Reproduzierbarkeit
- Prinzip: mehrere Massenanalytoren- mehrdimensionale Fragmentationanalyse
 - ✓ Rückschlüsse auf die Struktur möglich
 - ✓ Quantifizierung: interne Standards; Vergleich von 1-2 Fragmentationenspektren
- Anwendungen:
 - ✓ differentielle Expressionsanalyse auch größerer Sets von Proteinen
 - ✓ Allergennachweis
 - ✓ Biomarkervalidierung

Proteomics-Anwendungen im Lebensmittelbereich: „Food Proteomics“

- Erregernachweis (mikrobiologische Kontaminationen von LM)
 - ✓ MALDI/TOF MS, spezifischer MS-„Fingerprint“, sub-Spezies, Endotoxine
- Analyse herstellungsbedingter Modifikationen (Hochdruckbehandlung, GVO)
 - ✓ MALDI/TOF MS, spezifischer MS-„Fingerprint“
- Allergennachweis („Allergenomics“)
 - ✓ IgE-Antigen-Screening von LM:
 - 2-DE, immunoblotting mit IgE-AK aus Patientenseren
 - MS-Identifizierung markierter Spots
 - ✓ MALDI-TOF MS
 - ✓ SRM (MRM) als Alternative zu qRT-PCR und antikörperbasierten Methoden
 - Sensitivität im Bereich von 1 ppm
 - ✓ Identifizierung immunodominanter Epitope in LM
- lebensmittelassoziierte Substanzen: Screening molekulartoxikologischer Effekte
 - Erfassung potentiell toxischer Wirkungsmechanismen
 - ✓ Kontaminanten (Heattox-Produkte, Nanopartikel , PSM etc.)
 - ✓ Pflanzeninhaltsstoffe
 - ✓ Nahrungsergänzungsmittel

DANKE FÜR IHRE AUFMERKSAMKEIT

Axel Oberemm

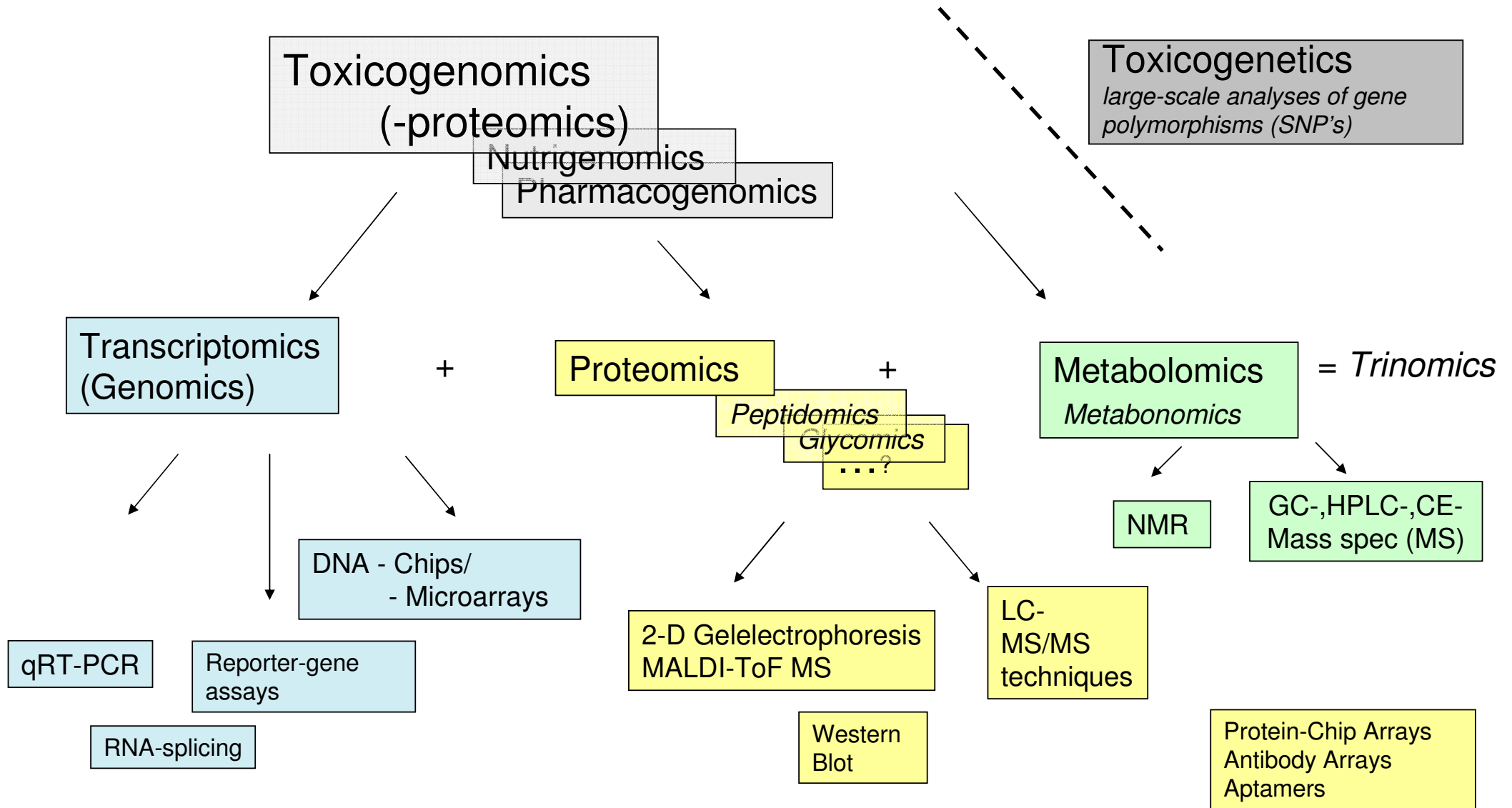
Bundesinstitut für Risikobewertung

Thielallee 88-92 • D-14195 Berlin

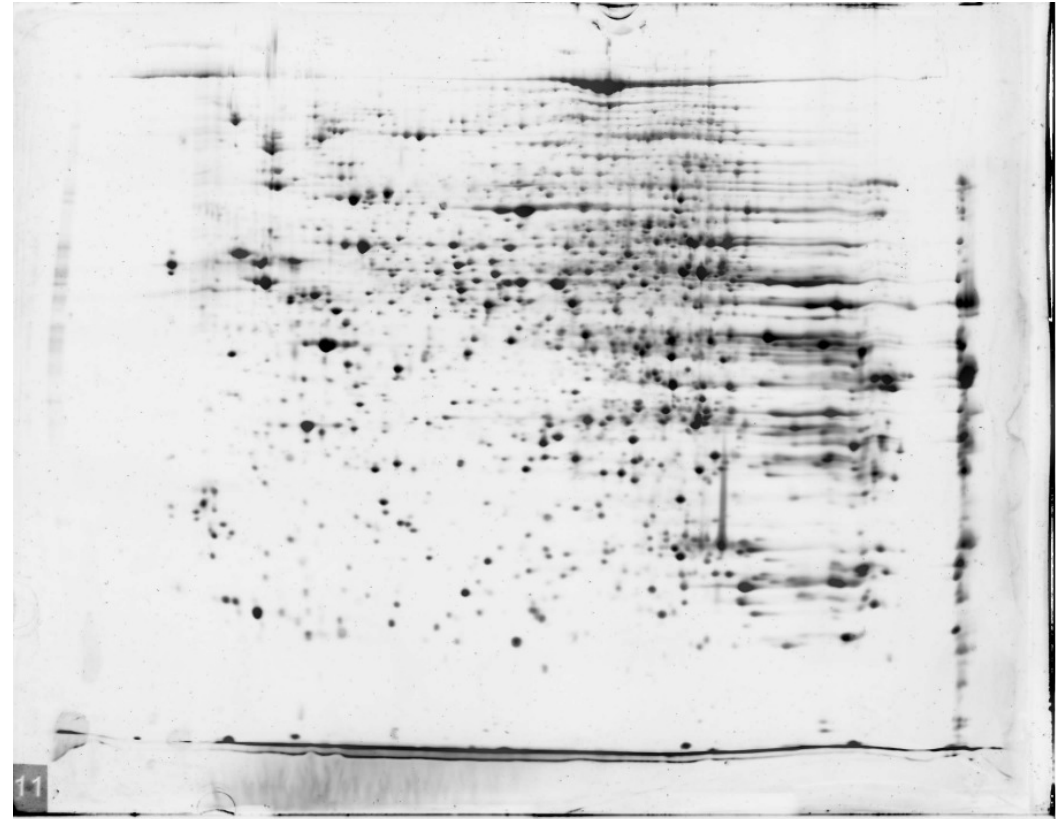
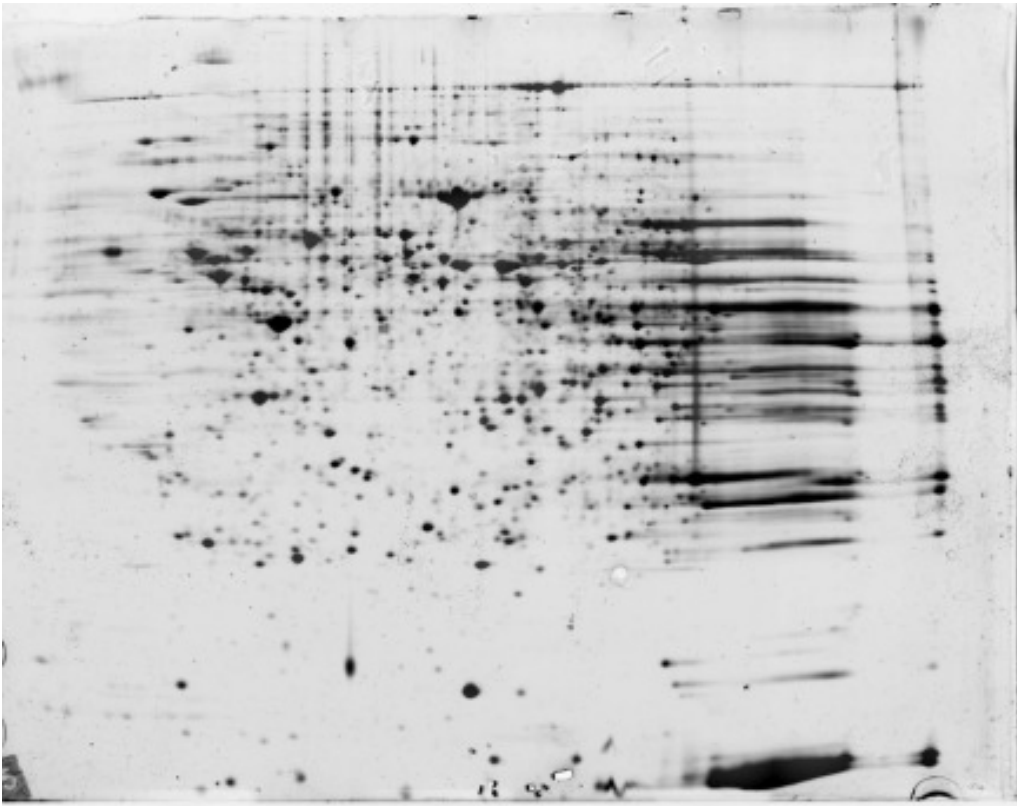
Tel. 0 30 - 184 12 - 0 • Fax 0 30 - 184 12 - 47 41

bfr@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de

Toxicogenomics (TXG)

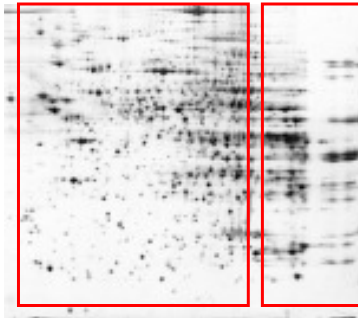


Methodenoptimierung (BfR, K. Paal 2006)

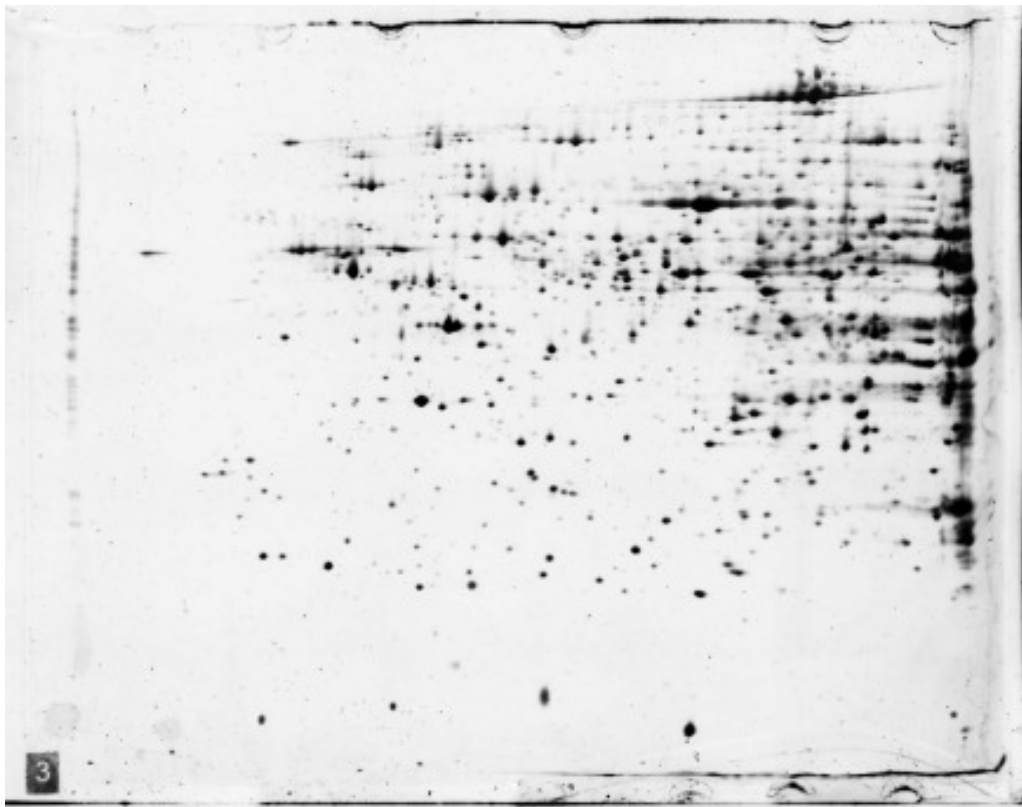


- ✓ horizontale und vertikale Streifen sind eliminiert
- ✓ Auflösung im basischen Bereich verbessert
- ✓ hochmolekulare Proteine in Gel gewandert
- ✓ Hintergrund klarer, runde, kleine Spots
- ✓ um 50% reduzierter Proteinauftrag

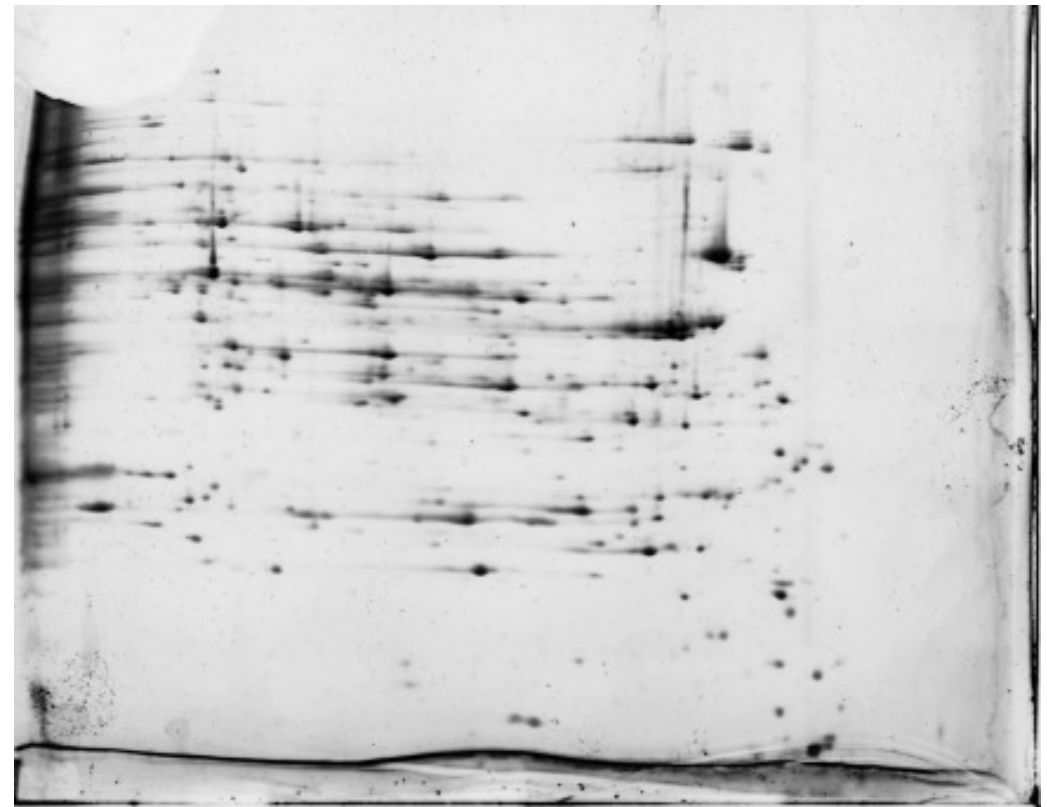
2DE-Methodenoptimierung - Weitere pH Bereiche



pH 4-7



pH 7-11



DIGE - experimental workflow *

2D sample preparation

2D Clean-Up Kit
2D Quant Kit

DIGE Cy-dye labelling

2D gel co-separation

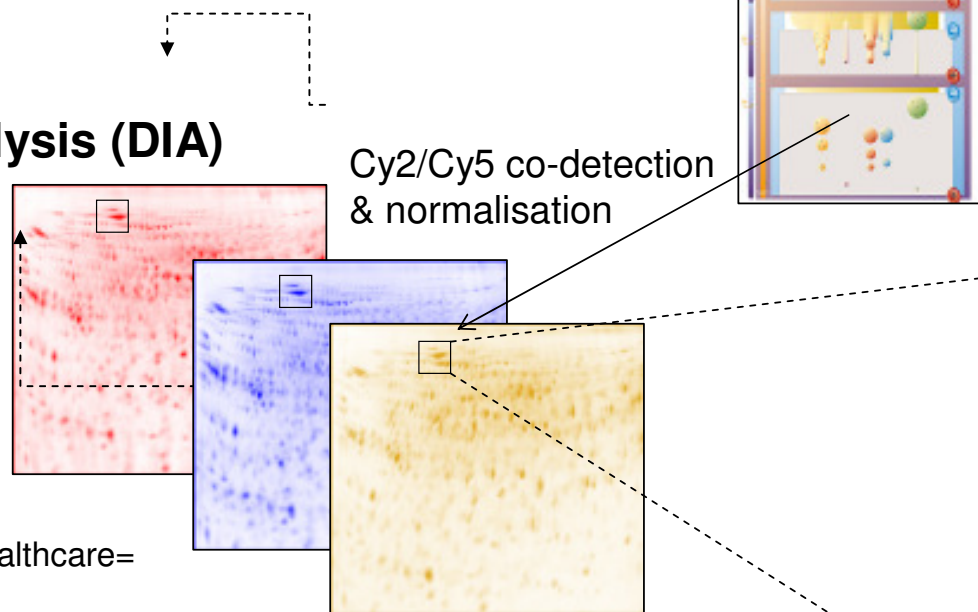
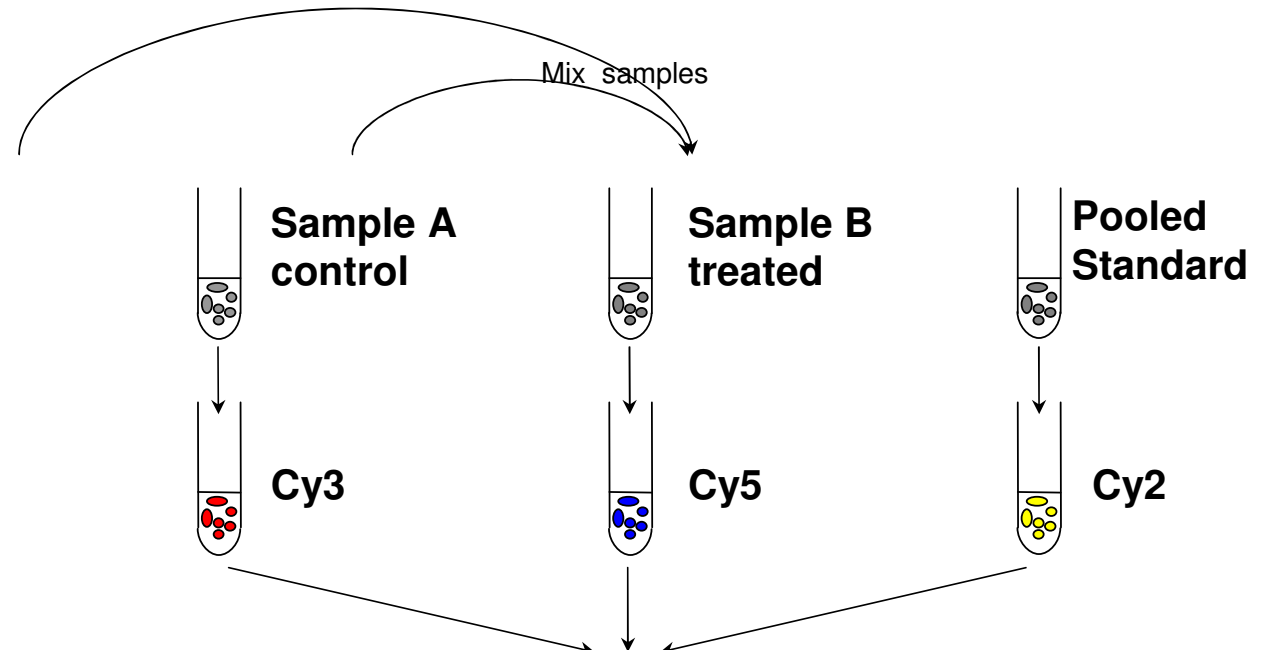
IPGphor, Ettan DALTsix/twelve

Image acquisition

Typhoon 9400

Differential In-gel Analysis (DIA)

DeCyder Software



Präsentation B. Scheibe
Amersham Biosciences (GE Healthcare=

Proteinidentifizierung: MALDI-TOF

- Proteinspots werden mit Trypsin verdaut

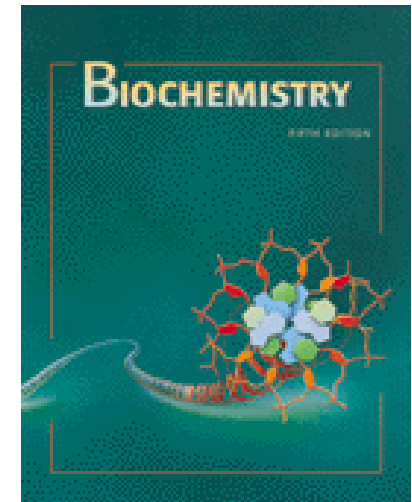
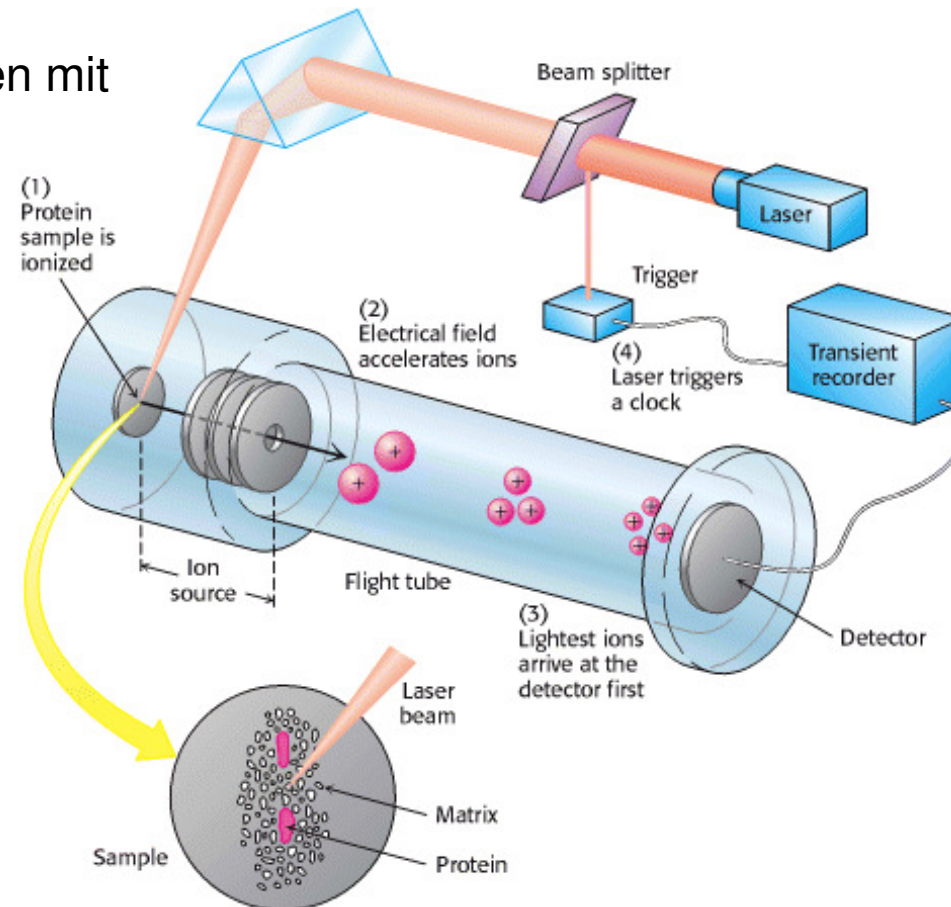


Figure 4.16. MALDI-TOF Mass Spectrometry. (1) The protein sample, embedded in an appropriate matrix, is ionized by the application of a laser beam. (2) An electrical field accelerates the ions formed through the flight tube toward the detector. (3) The lightest ions arrive first. (4) The ionizing laser pulse also triggers a clock that measures the time of flight (TOF) for the ions. [After J. T. Watson, Introduction to Mass Spectrometry, 3d ed. (Lippincott-Raven, 1997), p. 279.]

© 2002 by W. H. Freeman and Company.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=stryer.figgrp.481>

Simplifying Targeted Protein Quantification with Mass Spec: The SRM Atlas and Multiplexed MRM Protein Assays

12/ 2010



Mass spectrometry (MS), especially selected reaction monitoring/multiple reaction monitoring (SRM/MRM), has become routine for proteomics, metabolomics, and biomarker validation. SRM and MRM assays conducted on triple quadrupole instruments can be coupled to liquid chromatography (LC) for analysis of complex proteome digests.

For successful execution of SRM/MRM experiments several factors require consideration. These include ready access to appropriate parameters such as peptide choice and transition choice, reproducible and specific sample preparation setup, and optimal use of the mass spectrometer to achieve the highest sensitivity possible.

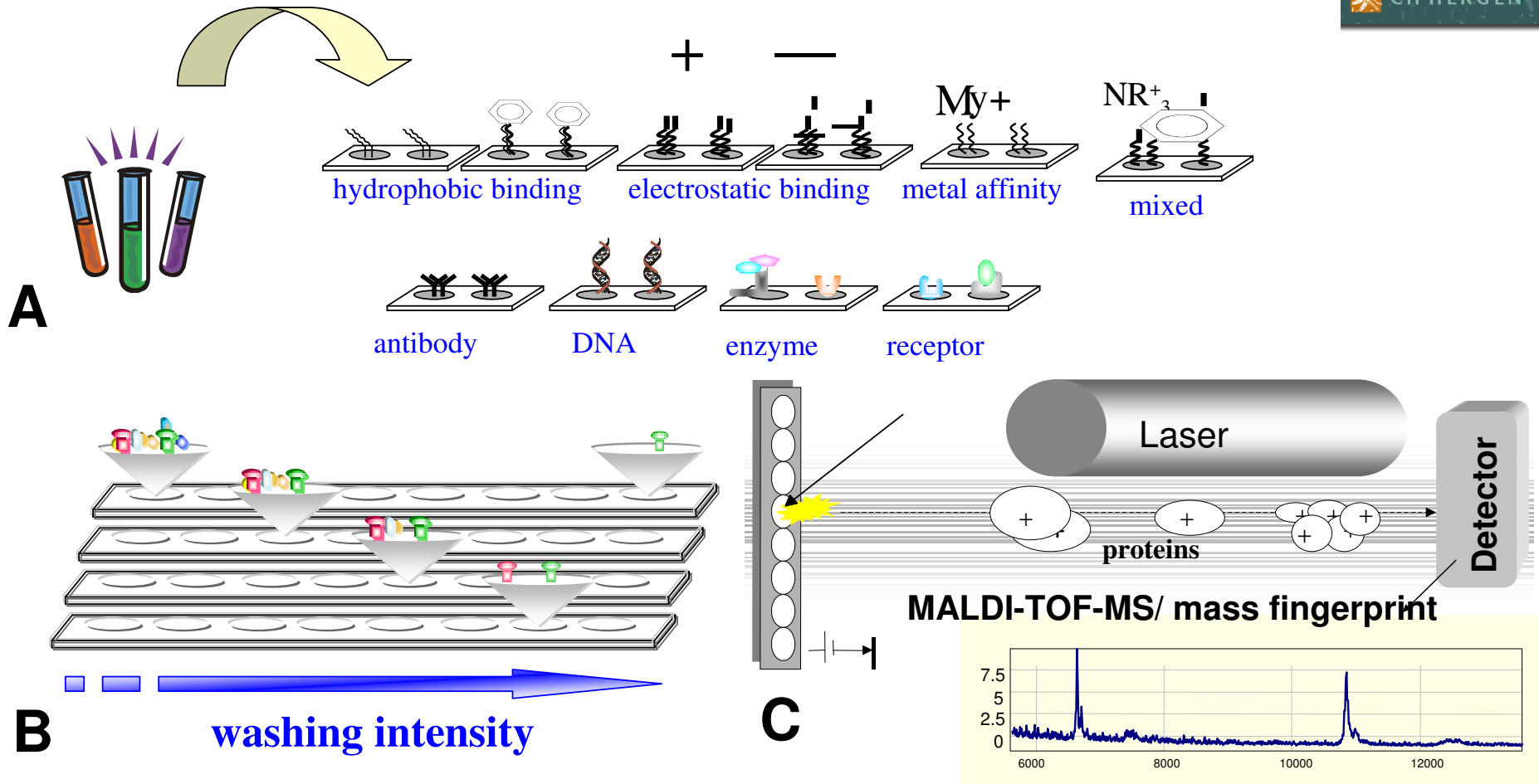
SRM Atlas, an informatics resource, facilitates setup of SRM/MRM quantification assays of targeted proteins by providing access to these parameters. Created by ordering more than 150,000 synthetic peptides based on 20,300 proteins, the resource generated high-resolution accurate mass spectra on Q-TOF LC/MS systems to create MS/MS profiles for peptide library searching and fragmentation data for the SRM Atlas.

During this webinar you will learn about combining automated robotic sample preparation, SISCAPA sample preparation, and MRM assay setup with transitions from the SRM Atlas as well as increasing sensitivity gains from iFunnel-enabled triple quad LC/MS systems to develop practical assays for differential proteomic analysis, biomarker validation, or biological pathway analysis.

<http://www.genengnews.com/webinars/simplifying-targeted-protein-quantification-with-mass-spec-the-srm-atlas-and-multiplexed-mrm-pr/130/>

SELDI™-Proteinchip-Array

Surface-enhanced laser desorption/ionization



slide supported by F. DeJesus, Merck KGaA

MRM (SRM)

Jungblut

Proteinspezies lassen sich mit der SRM(*selected reaction monitoring*)-Methode dann quantifizieren, wenn von der Proteinspezies mindestens ein Peptid bekannt ist, das in seiner Struktur einzigartig ist[5]. Die SRM-Analyse beinhaltet im ersten Schritt nach der Ionisierung der Analyten die Selektion eines definierten Ions im ersten Massenanalysator. Nach Fragmentierung des Ions im zweiten Massenanalysator wird aus den Fragmenten ein definiertes Ion selektiert und anschließend detektiert. Aufgrund der doppelten Selektion liefert die SRM-Methode eine hohe Zuverlässigkeit und Nachweisempfindlichkeit. In Kombination mit internen Standards, idealerweise strukturidentische Moleküle mit stabilen Isotopen markiert, kann mit der SRM-Methode absolut quantifiziert werden. Der lineare dynamische Bereich umfasst drei bis fünf Größenordnungen[6]. Selbst niedrig abundante Plasma-Proteine lassen sich mit der SRM-Methode quantifizieren[7]. Die SRM-Methode lässt sich vorteilhaft nutzen, um quantitative Veränderungen von 100 Proteinspezies und mehr im Zeitverlauf von Inkubationsexperimenten parallel zu verfolgen.

Wikipedia

Der dritte Quadrupol gibt die Möglichkeit zu „scannen“, also alle Produktionen des im ersten Quadrupol isolierten Ions (engl. *parent ion*) zu ermitteln, oder selektiv nur ein bekanntes Fragmentation zu beobachten. Durch das Erfassen aller Fragmentationen können Rückschlüsse auf die Struktur gezogen werden. Durch Beobachtung von nur ein oder zwei Fragmentationen kann sehr empfindlich und selektiv quantifiziert werden. Diese Technik wird auch als Multiple Reaction Monitoring (MRM) bezeichnet.

Figure 1. Main proteomic workflows used in fish proteome studies published in the period 2000–2009. Proteins from a given tissue, cell line or even the whole organism (embryo) were separated and digested (A and B) or digested and separated (C). Analysis of digested proteins was performed either by PMF (A1) and/or MS/MS (A2) for 2-DE separated proteins, or by LC-MS/MS for 1-DE separated proteins (B1) as well as for SCX fractionated peptides (C1). MS data from all sources was then processed by searching engines to identify proteins of interest.

The results were finally confirmed by using other complementary techniques to achieve a wider picture of the biological question addressed.

Projekte im BfR, Abt. Lebensmittelsicherheit