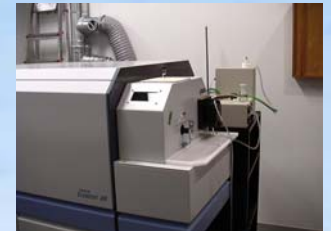
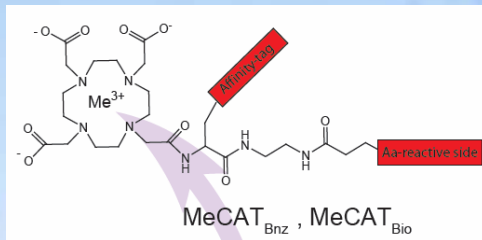


Proteome Factory

Quantifizierung von Proteinen mittels MeCAT-Lanthanid-Markierung



Christian Scheler

Karola Lehman, Boris Neumann,
Stefanie Wienkoop, Robert Ahrends

Andreas Kühn, Stefan Pieper,
Michael Linscheid

Proteome Factory AG Berlin

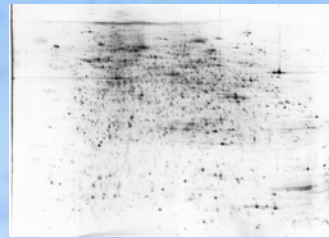
Humboldt-Universität zu Berlin
Institut für Chemie

Hauptansätze der quantitativen Proteomanalyse

auf **Proteinebene**

1) ggf. Proteinmarkierung
MeCAT, ICPL, ITRAQ, Fluoreszenz

2) Proteintrennung
2DE, LC, CE, Free-flow



40x30 cm 2DE

3) Quantifizierung*
Spotintensität, UV, ICP-MS (MeCAT)

4) Proteinspaltung
Enzymatische/chemische Spaltung

5) Protein-ID*
MALDI-, ESI-MSMS

*bei ICPL, ITRAQ: Quantifizierung in 4)

auf **Peptidebene**

1) Proteinspaltung
Enzymatische/chemische Spaltung,
ggf. mit Isotopen-Markierung zuvor,
danach oder in-vivo

2) Peptidtrennung
LC, MD-LC

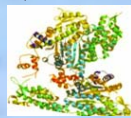
3) Peptid-Quantifizierung und
Protein-ID
LC-MALDI-MSMS, LC-ESI-MSMS

Proteomanalyse auf der Proteinebene. Warum?

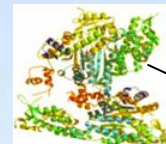
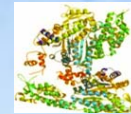
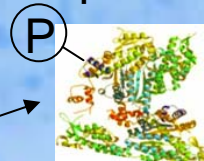
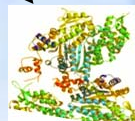
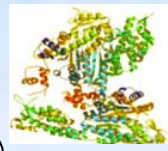
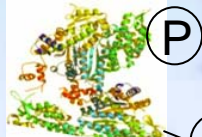
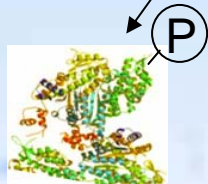
Single gene



Transcriptomics Multiple splice variantes



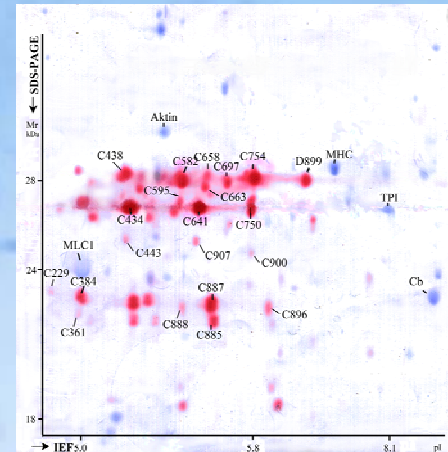
Translated proteins



glyco residue

Only on protein level post-translational modifications (PTMs) can be matched to protein species !!

LC-MS based proteomics of peptides does not allow matching of PTMs to protein species!



Protein species – Protein can be post-translational modified
>50% of eukaryontic proteins are post-translational modified

Herausforderungen der Proteomanalyse

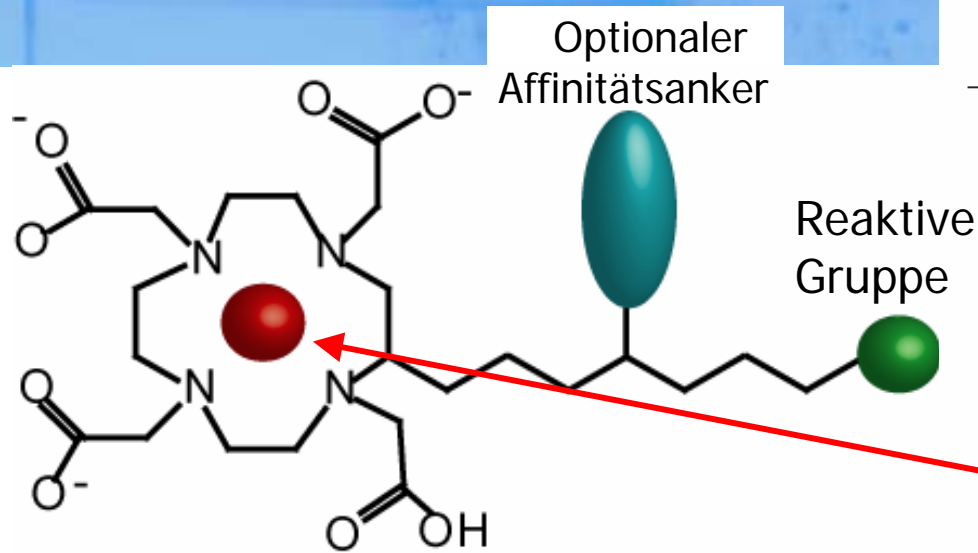
- 1) Datenmenge und Zeitaufwand bei Quantifizierung** und Identifizierung
Müssen alle Proteine identifiziert werden?
- 2) Erfassung von tausenden bis zehntausenden Proteinspecies** (Proteine mit ihren PTMs und Isoformen)
=> hochauflösende Trennverfahren
- 3) Dynamischer Konzentrationsbereich** von Proteinen: wenige bis zu vielen Millionen Kopien pro Zelle
=> analytische Detektionsverfahren mit einem ähnlichen linearen dynamischen Messbereich ($>10^6$)
- 4) Die Proteinmenge** in einer einzelnen Zell beträgt ca. 100 pg (ca. 2 fmol)
=> hochsensitive Nachweisverfahren
- 5) Quantifizierung:** Absolute oder relative Quantifizierung?

Voraussetzungen für Multiplex-Markierungen



- A) Quantitative Markierung
- B) Ko-Migration/-Elution in Trennverfahren
 - Elektrophorese
 - LC
- C) Kompatibilität mit Detektionsverfahren
 - Quantifikation (ICP-MS, MALDI-, ESI-MS)
 - Identifikation (MALDI-, ESI-MSMS)

MeCAT - Metal coded tagging



elements	⁸⁹ Y	¹³⁹ La	¹⁴⁰ Ce #	¹⁴¹ Pr	¹⁵⁹ Tb	¹⁶⁵ Ho	¹⁶⁹ Tm	¹⁷⁵ Lu
⁸⁹ Y	0	50	51	52	70	76	80	86
¹³⁹ La			1	2	20	26	30	36
¹⁴⁰ Ce				1	19	25	29	35
¹⁴¹ Pr					18	24	28	34
¹⁵⁹ Tb						6	10	16
¹⁶⁵ Ho							4	10
¹⁷⁵ Lu								6

Massendifferenz

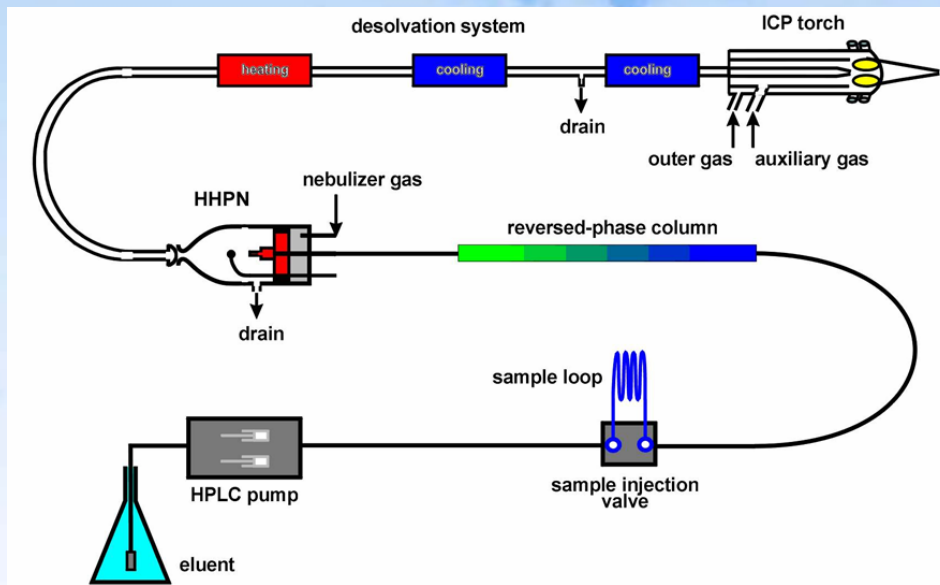
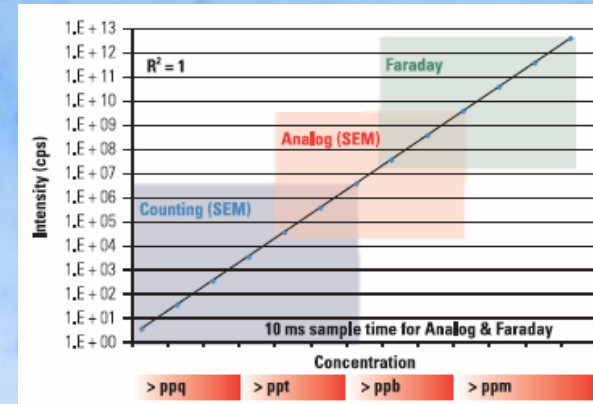
Natural abundance ¹⁴⁰Ce (88 %) and ¹⁴²Ce (11 %).

- Differentielle Markierung mit verschiedenen Lanthaniden
- Optionale Affinitätsanreicherung markierter Proteine/Peptide
- Protein / Peptid-Trennung (z.B. 2DE-Gel, LC)
- Quantifizierung: **1) absolute Quantifizierung der Metalle mit ICP-MS**
2) relative Quantifizierung mit MALDI-, ESI-MS -> Massendifferenz (in Analogie zu ICAT)
- Protein-Identifizierung: MSMS von Peptiden nach Proteinspaltung

Der MeCAT-„Lanthanid-Detektor“: ICP-MS

Bisher unerreichte Vorteile für die Bioanalytik

- Robuste, sehr empfindliche Analysenmethode für Elementanalytik, u.a. Spurenanalyse von Schwermetallen
- **Linearer dynamischer Meßbereich: 8 (bis max. 12) Größenordnungen**
- **Keine Matrix-Suppressionseffekte**
- **Sensitivität:** amol/g bis µmol/g Bereich
- **Externe Kalibration mit Metallstandards**
- Sehr gute S/N-Verhältnisse



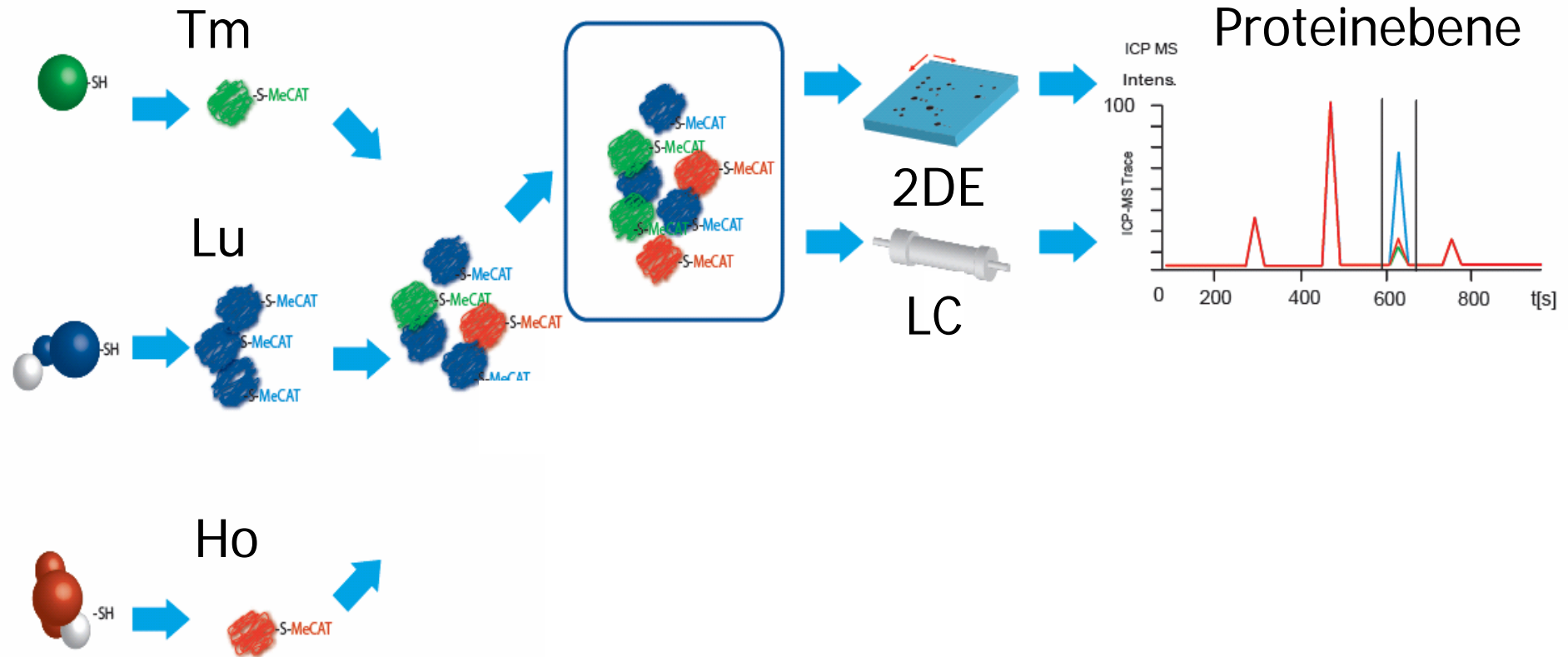
The solution (solvent/sample) gets nebulized and the aerosol is dried



Probe wird auf 8000-10000°C
in ionisiertem Argon erhitzt

MeCAT-Workflow auf Proteinebene

Markierungs-Metalle



Preparation

- Tissue isolation
- Denaturation
- Reduction

Labeling

Pooling

Proteolyse free

Proteolysis

- Enzymatic
- Chemically

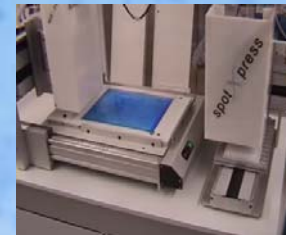
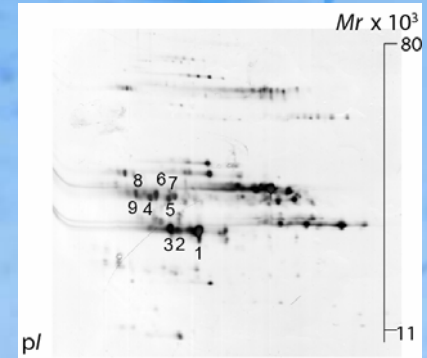
Separation

- 2-D-Page
- Affinity chromatography
- SEC
- C4-, C8-RP
- SCX, AX

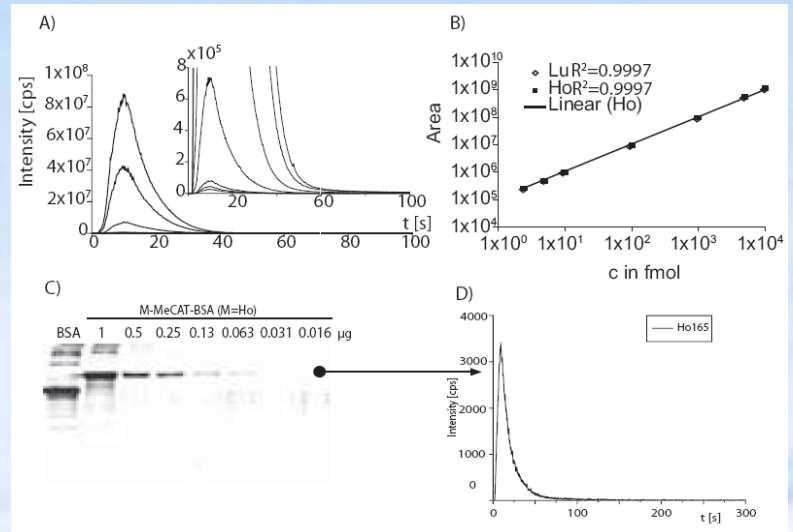
Quantification & Identification

Workflow - Absolute Quantifizierung intakter Proteine aus Elektrophorese-Gelen

1. Quantitative MeCAT-Markierung der Proteine
2. Elektrophorese mit auflösbaren Gelen (*Spage*-Gele)
3. Spot-Stanzen mit *spot Xpress* und auflösen der Proteinspots
4. Absolute Quantifikation mit ICP-MS (dynamischer Bereich $>10^8$)



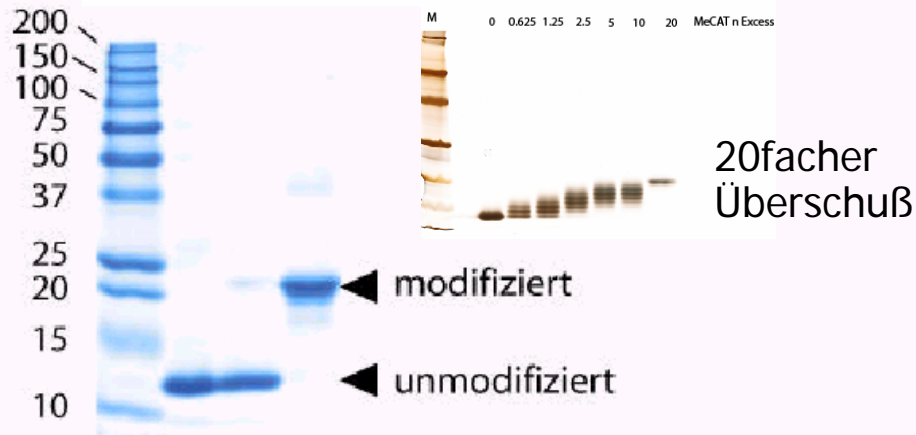
Z.B. Detektion von
 - 670 amol α -Lactalbumin und
 110 amol BSA (ca. 7,5 pg)



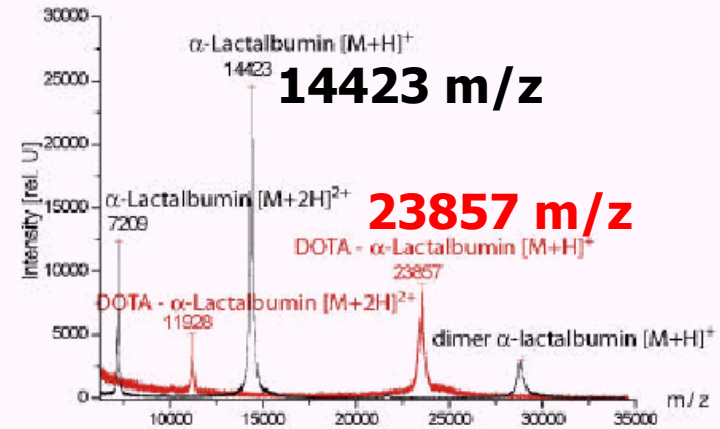
5. Identifikation regulierter Proteine mit nanoLC-ESI-MSMS nach tryp. Spaltung

Quantitative MeCAT Protein-Metallmarkierung

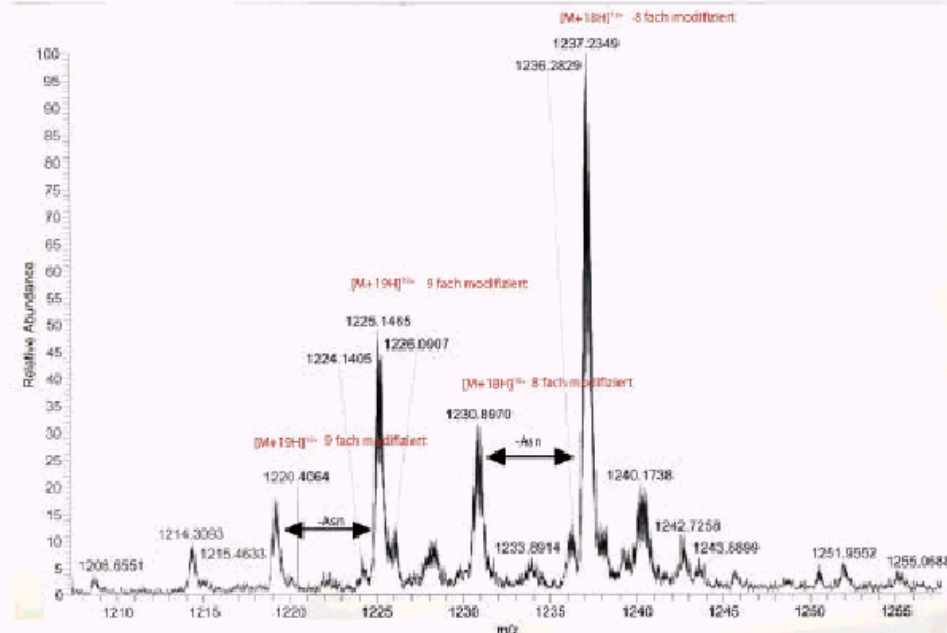
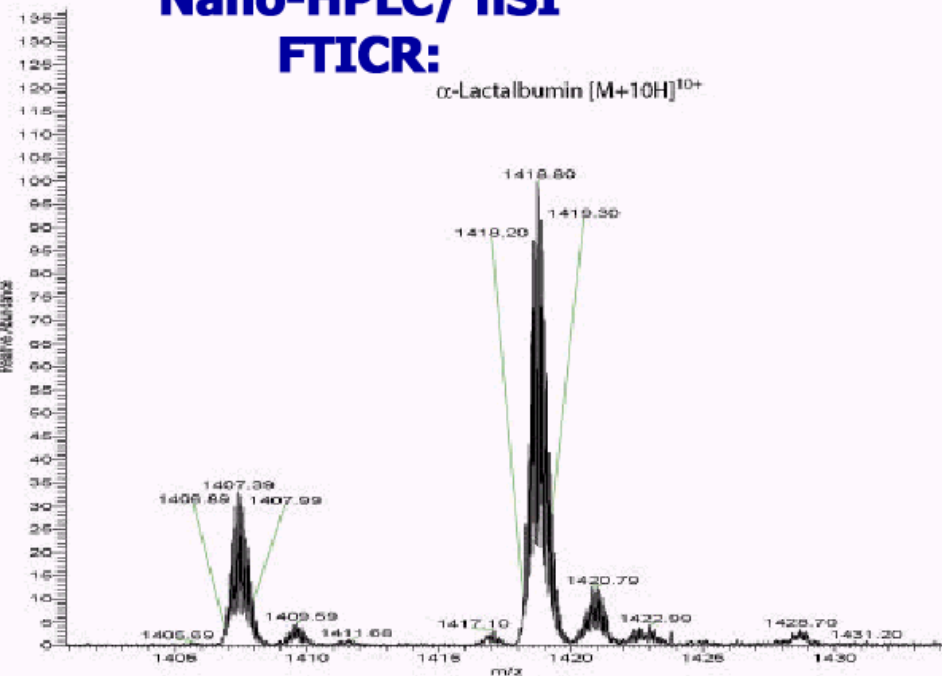
SDS-PAGE:



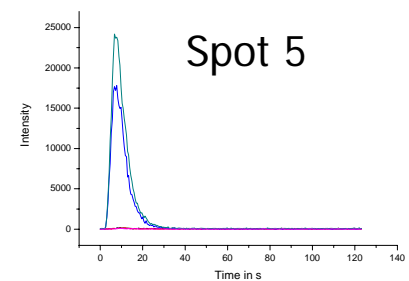
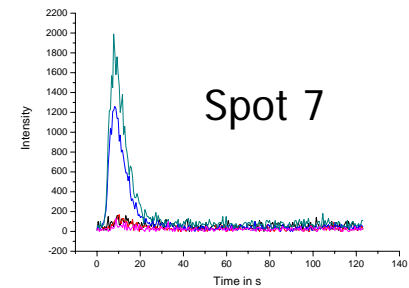
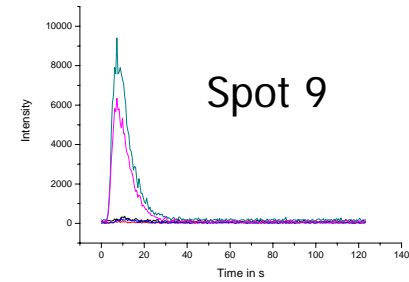
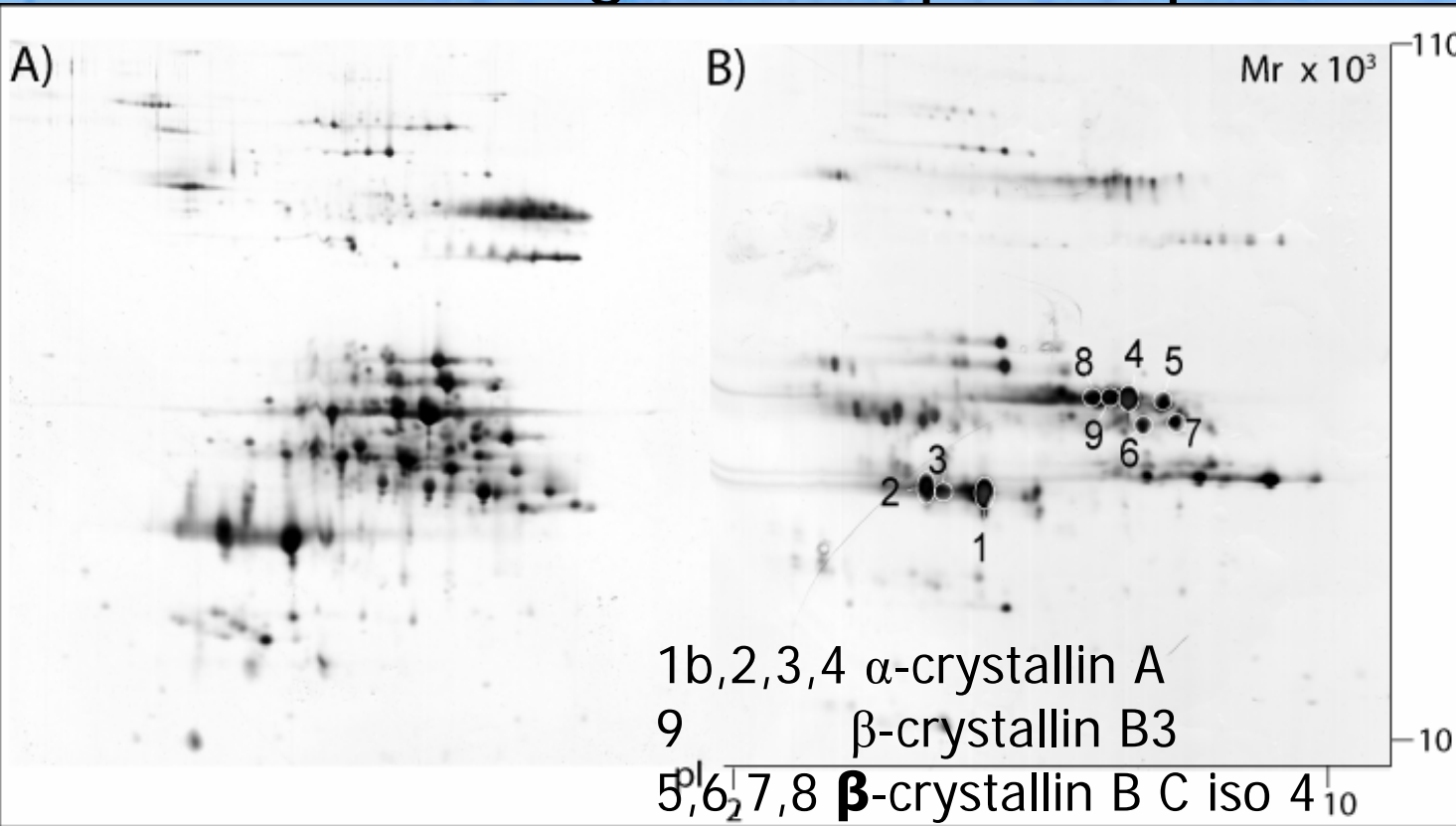
MALDI:



Nano-HPLC/ nSI FTICR:

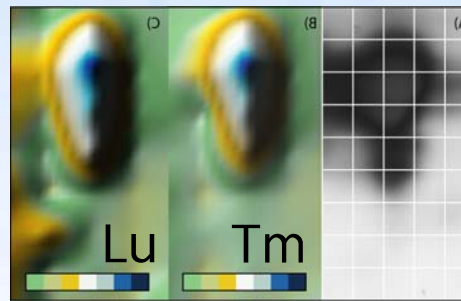


2 D Geltrennung von zwei MeCAT markierten Augenlinsenproteinproben



Silbergefärbte 2DE Gele: A) ohne, B) mit MeCAT-Markierung

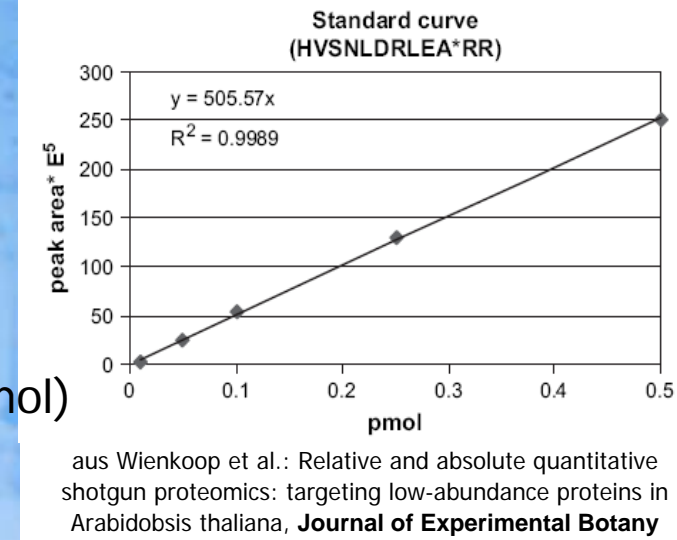
Konzentrationsverteilung
 eines Proteinspots
 Probe 1: Lutetium
 Probe 2: Terbium



6 pmol
 22 fmol

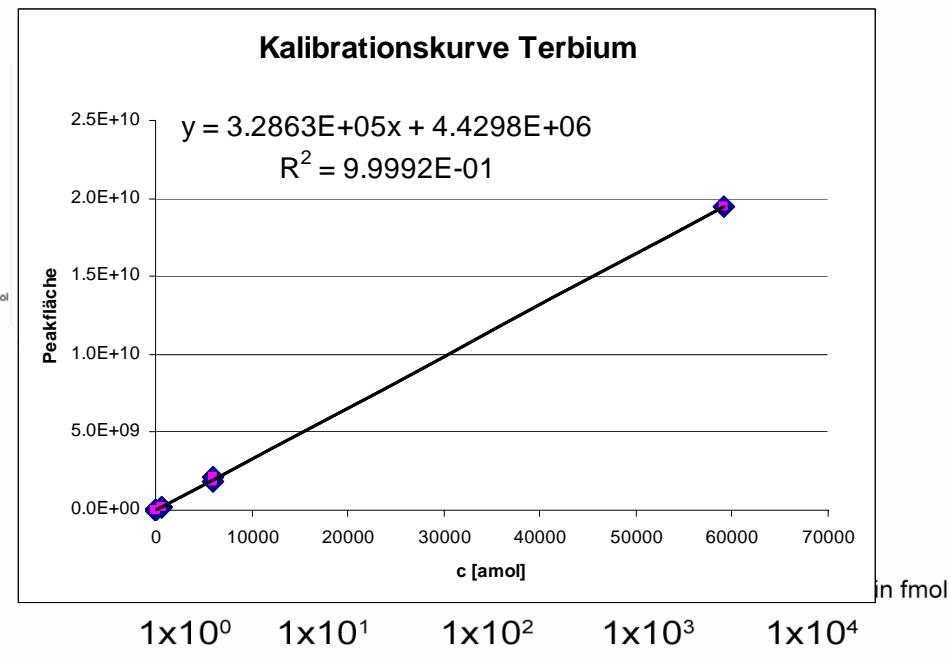
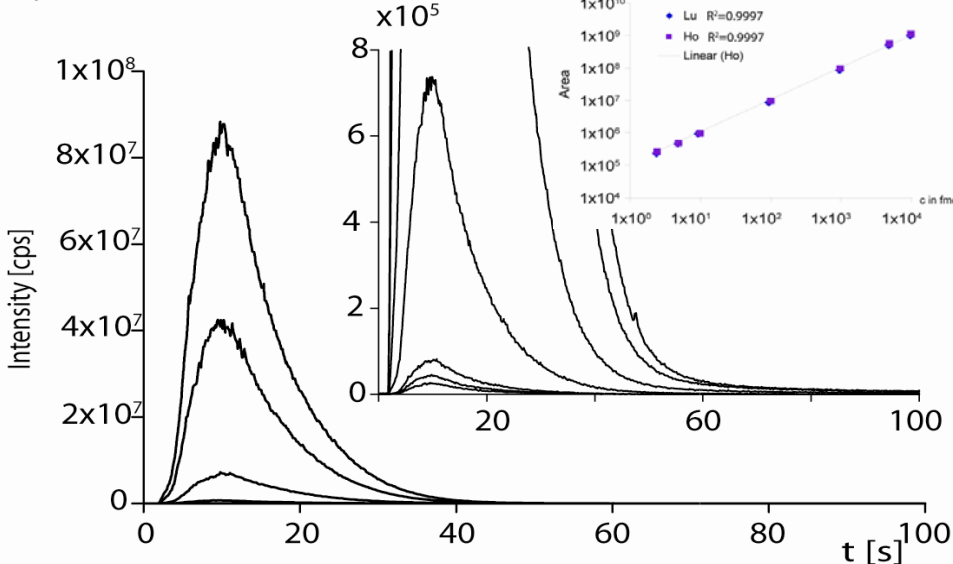
Linearer Meßbereich ICP-MS vs. ESI-MS

- Triple Quadropol ESI-MS:
 - Linearität bis ca. 3 Größenordnungen für einzelne Peptide (hier **Kalibrationskurve: 5-500 fmol**)
 - Kalibration mit Peptid-spezifischen Heavy-Peptides
- **ICP-MS:** (hier Kalibrationskure: 570 amol bis 57 pmol)
 - Linearität über 8 Größenordnungen
 - **Externe/Interne Kalibration mit Metallstandards** z.B. Terbiumchloridlösungen (Protein/Peptid-unabhängig)



External calibration and dynamic range

A) FIA/ICP MS



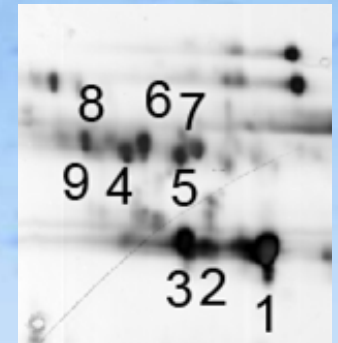
Absolute Quantifizierung

$$m(\text{Protein}) [\text{g}] = \frac{m(\text{Metall}) [\text{g}] * M(\text{Proteine}) [\text{g/mol}]}{x(\text{Metall}) [-] * M(\text{Metall}) [\text{g/mol}]} * F$$

m: mit ICP-MS gemessene Metallmenge [g]

F: Verdünnungsfaktor der Probe vor ICP-MS Messung

x: Anzahl der MeCAT-Metall-Markierungen des Proteins

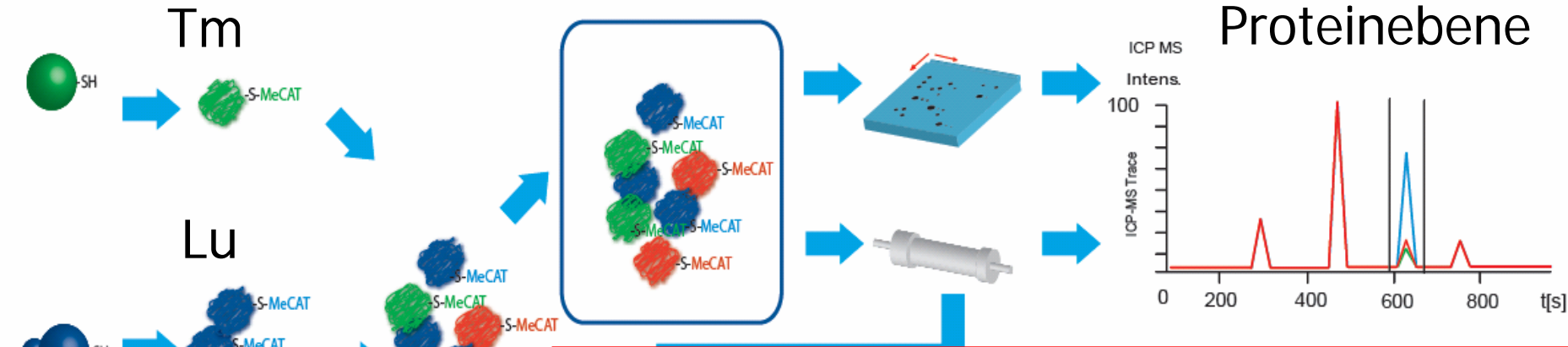


Spot	Protein	Database	gi No.	Mascot score	Coverage [%]	n Tm [mol]	n Lu [mol]	m [g] Protein Tm	m [g] Protein Lu
1	Alpha crystallin A chain	Ss EST	13658496	469	42	3.9E-11	4.9E-11	7.6E-07	9.7E-07
2	Alpha crystallin A chain	Ss EST	13658496	443	41	1.4E-11	1.8E-11	2.8E-07	3.5E-07
3	Alpha crystallin A chain	Ss EST	13658496	462	57	3.3E-12	3.3E-12	6.4E-08	6.5E-08
4	Chain C, Beta B2 Crystallin	NCBIInr*	809228	517	50	6.0E-12	6.5E-12	1.2E-07	1.3E-07
5	Chain C, Beta B2 Crystallin	NCBIInr*	809228	517	50	3.8E-12	3.2E-12	4.4E-08	3.7E-08
6	Crystallin, beta B3	Ss EST	46176196	543	41	4.3E-12	4.2E-12	5.0E-08	4.8E-08
7	Crystallin, beta B3	Ss EST	46176196	603	43	1.5E-11	1.7E-11	9.5E-08	1.1E-07
8	Crystallin, beta B3	NCBIInr*	73994848	534	29	1.7E-11	2.2E-11	1.8E-07	2.4E-07
9	Crystallin, beta B3	Ss EST	46176196	763	34	1.8E-11	2.1E-11	2.0E-07	2.3E-07

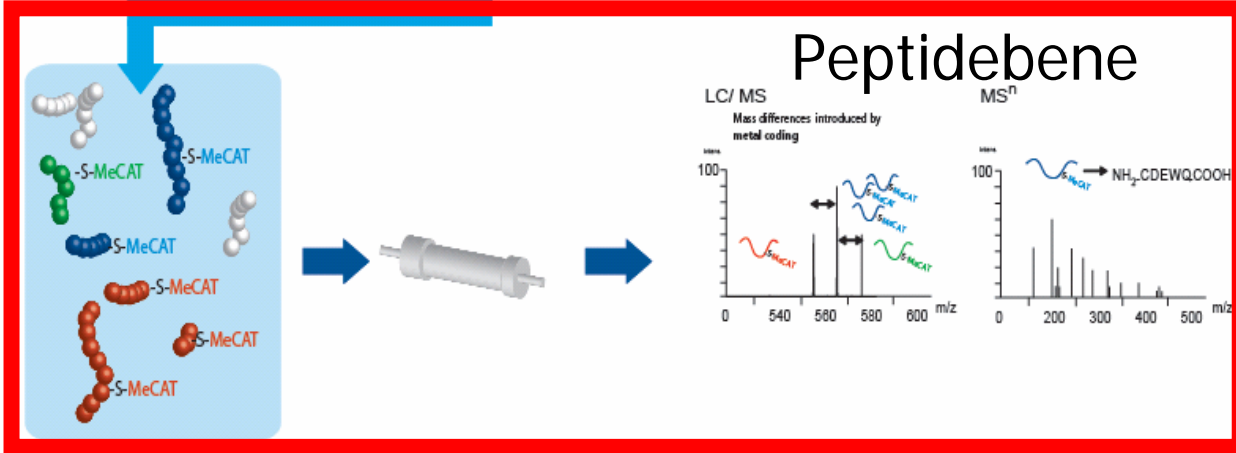
MeCAT-Workflow auf Peptidebene



Markierungs-Metalle



Proteinebene



Peptidebene

- Preparation**
- Tissue isolation
 - Denaturation
 - Reduction

Labeling

Pooling

- Proteolyse free**
- Proteolysis**
- Enzymatic
 - Chemically

Separation

- 2-D-Page
- Affinity chromatography
- SEC
- C4-, C8-RP
- SCX, AX

Quantification & Identification

Voraussetzungen für Multiplex-Markierungen

A) Quantitative Markierung

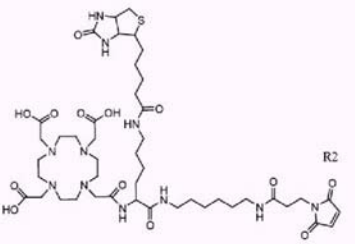
B) Ko-Migration/-Elution in Trennverfahren

- Elektrophorese
- LC

C) Kompatibilität mit Detektionsverfahren

- Quantifikation (ICP-MS, MALDI-, ESI-MS)
- Identifikation (MALDI-, ESI-MSMS)

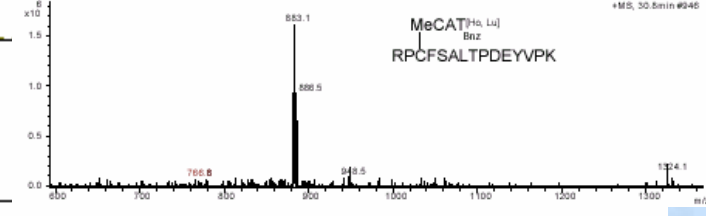
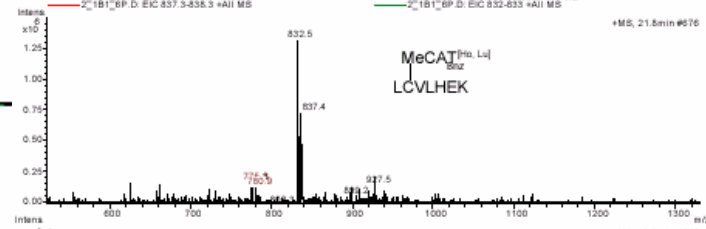
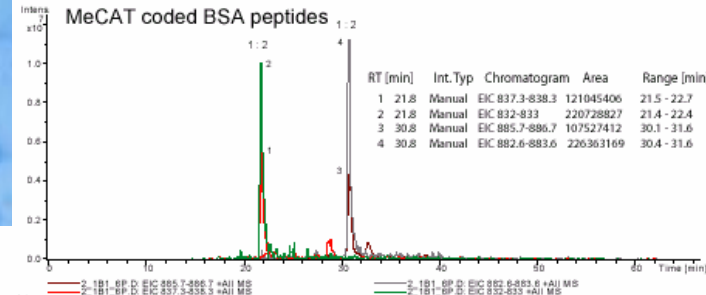
Ko-Elution MeCAT-markierter Peptide



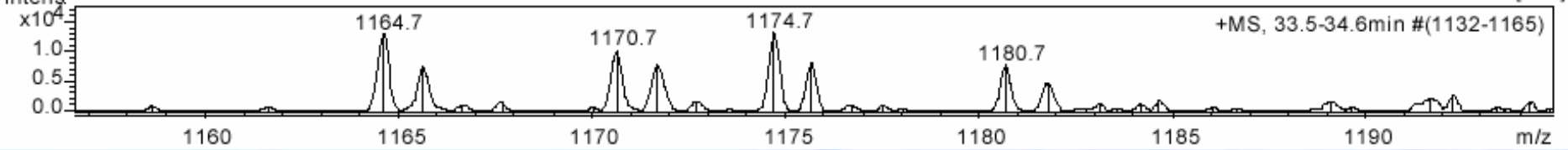
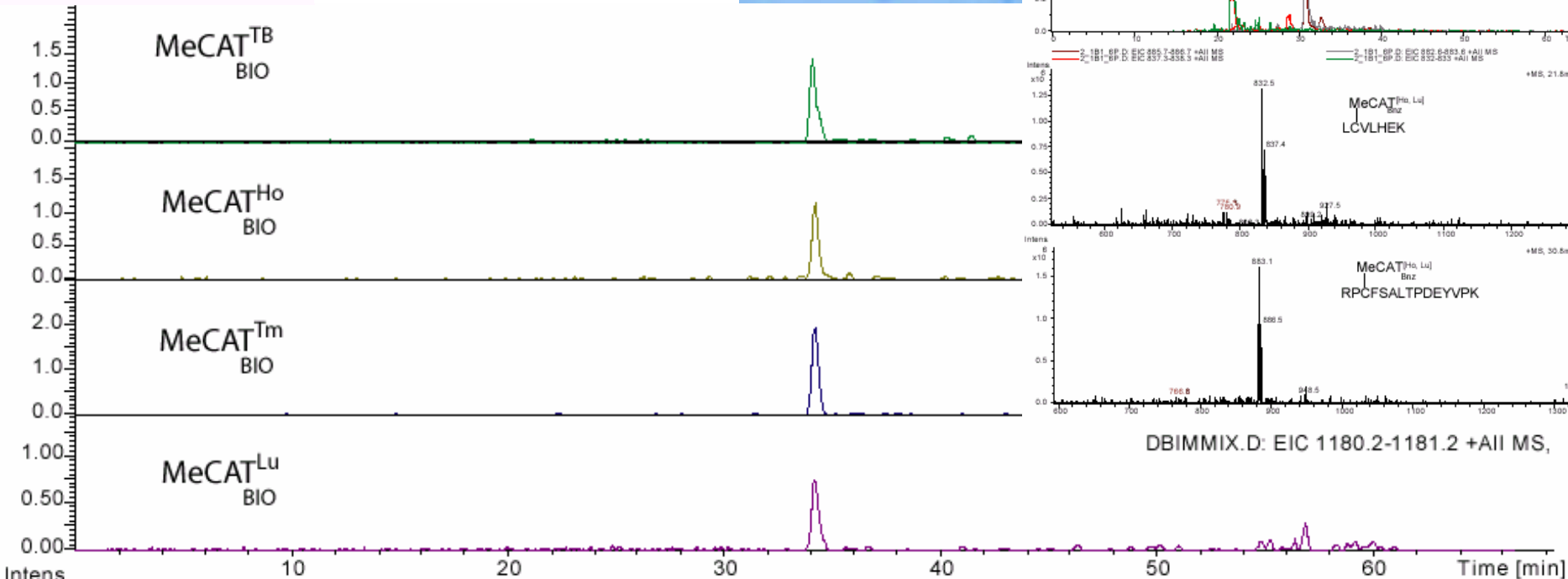
MeCAT-Peptide mit
Tb, Ho, Tm, Lu

NanoHPLC/ Nano ESI MS

MeCAT coded BSA peptides

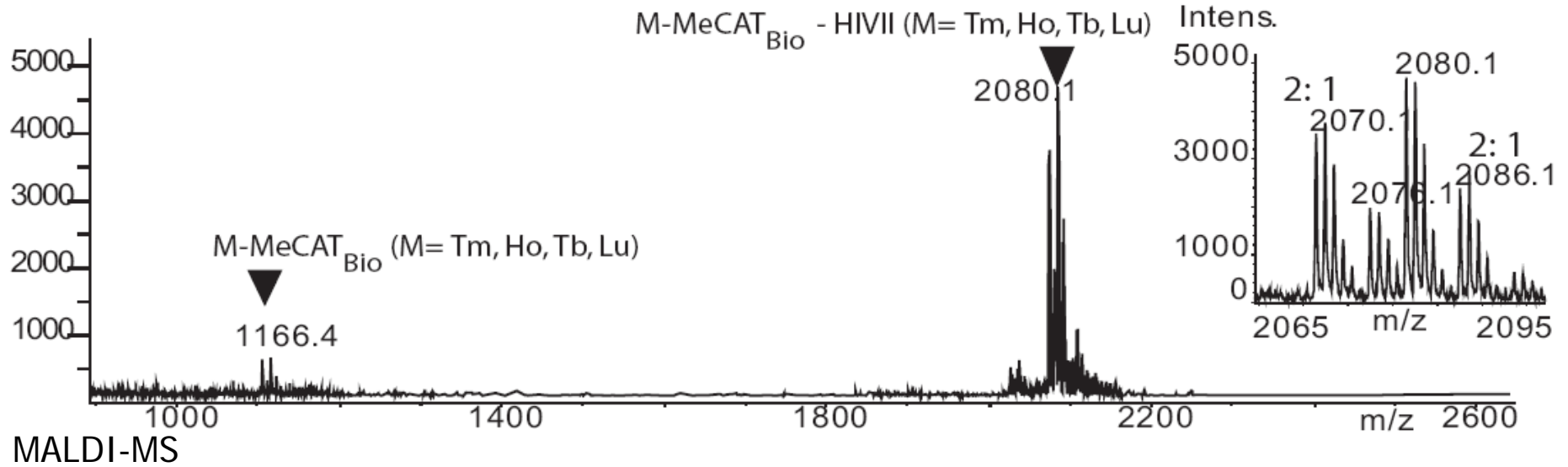


DBIMMIX.D: EIC 1180.2-1181.2 +All MS,



+MS, 33.5-34.6min #(1132-1165)

Relative Quantifizierung Ho und Lu MeCAT-markierter Peptide



Massendifferenzen (Da) zw.

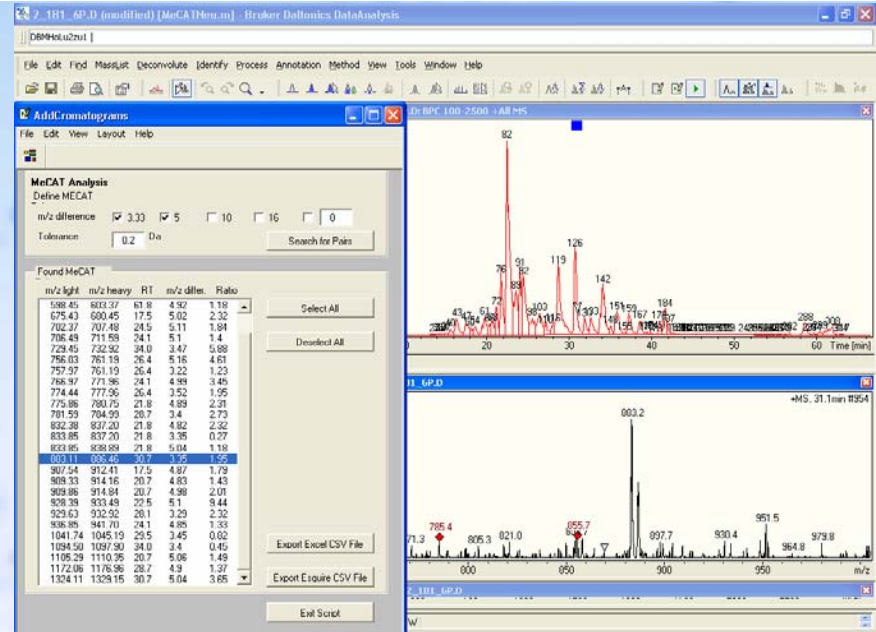
¹⁵⁹Tb (Terbium) 6

¹⁶⁵Ho (Holmium) 4

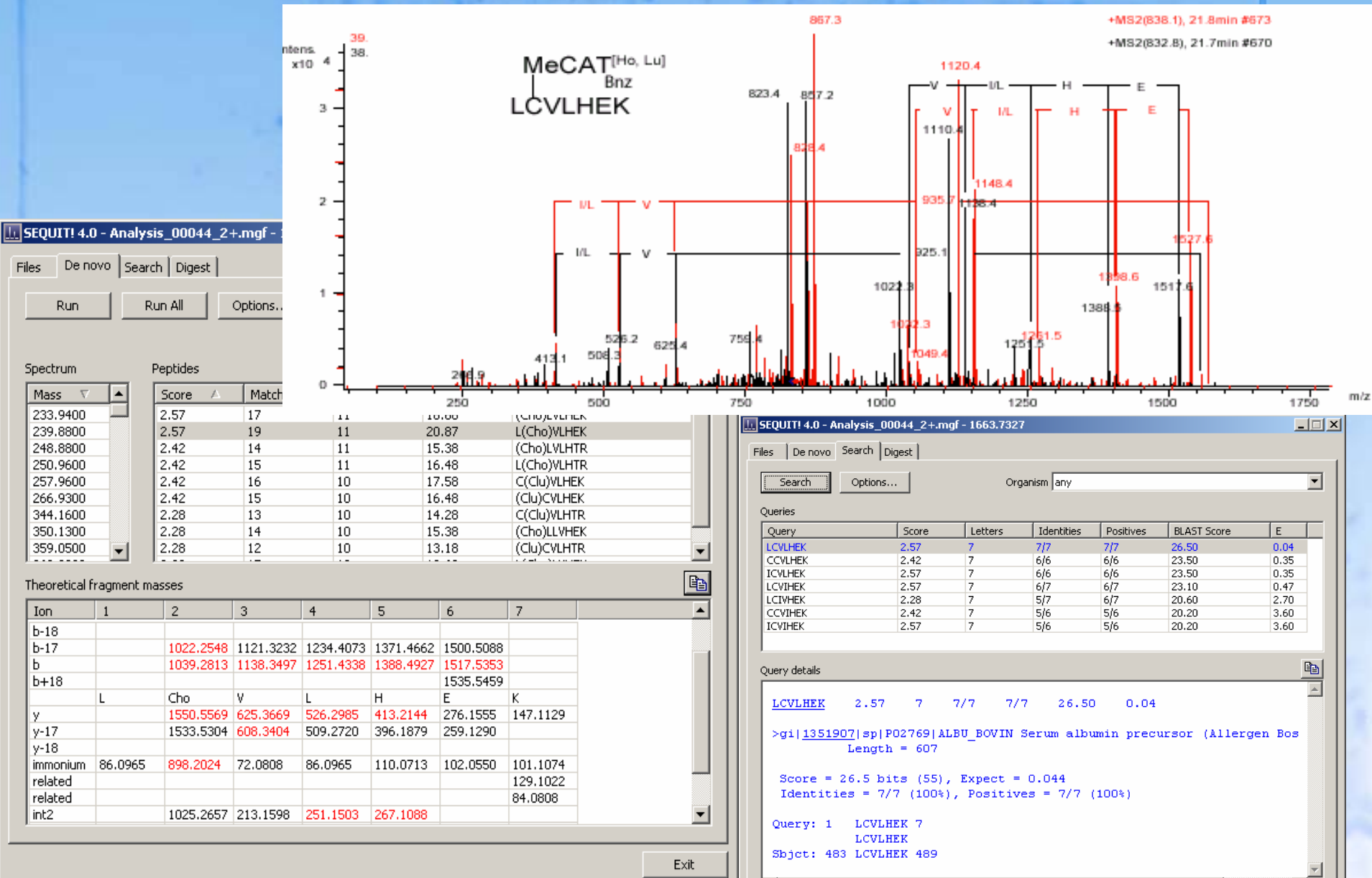
¹⁶⁹Tm (Thulium) 6

¹⁷⁵Lu (Lutetium) 6

nanoLC-ESI-MSMS



MSMS-Identifikation von MeCAT-markierten Peptiden mit Sequit! (*de novo* Sequenzierung)



Voraussetzungen für die Multiplex-Markierungen

MeCAT

- + A) Quantitative Markierung
- + B) Ko-Migration/-Elution in Trennverfahren
 - Elektrophorese
 - LC
- + C) Kompatibilität mit Detektionsverfahren
 - Quantifikation (ICP-MS, MALDI-, ESI-MS)
 - Identifikation (MALDI-, ESI-MSMS)

Vergleich von Isotopen- und Metallmarkierung

Verfahren mit stabiler Isotopenmarkierung	MeCAT-Markierung
Komplexe und aufwendige Datenauswertung zur Quantifizierung	Sehr einfache Datenauswertung durch Quantifizierung weniger Metall-Ionenspuren mit ICP-MS
Keine Quantifizierung auf Proteinebene	Absolute Quantifizierung auf Proteinebene durch ICP MS mit sehr gutem Signal-Rauschverhältnis
Relative Quantifizierung von Peptiden mit MALDI- und ESI-MS	Relative Quantifizierung von Peptiden mit MALDI-, ESI-MS und ICP MS (sehr gutes Signal-Rauschverhältnis)
Multiplexing, je Reagenz zwei bis vier Proben	Multiplexing , Quantifizierung von 4 und mehr Proben möglich
Sensitivität im fmol Bereich	Sensitivität im attomol -Bereich (ICP MS) ↳ Detektion von Proteinen geringer Abundanz (fmol Bereich bei ESI-MS)
Dyn. Messbereich: $\leq 10^3$	Hoher dynamischer Messbereich: $>10^8$ (mit ICP-MS)

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

The logo for Proteome Factory features the words "Proteome" and "Factory" in a sans-serif font, separated by a stylized graphic. The graphic consists of a central circle with a horizontal line passing through it, and several vertical lines of varying heights extending upwards from the top of the circle.

Proteome Factory

Proteomics Services, Technologies and Products

Kooperationspartner

M. Linscheid, R. Ahrends, S. Pieper, A. Kühn
Institut für Chemie, Humboldt Universität zu Berlin

P. Jungblut, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin

W. Weckwerth, Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam