



## MS e Biomolecole

Teoria e applicazioni

---

---

---

---

---

---

---

---



### APPLICAZIONI ESI E MALDI PER LO STUDIO DI PEPTIDI E PROTEINE

- Determinazione del peso molecolare
- Individuazione di isoforme
- Mappatura peptidica e conferma della struttura primaria.
- Determinazione della struttura primaria mediante spettrometria di massa tandem.
- Studio della conformazione proteica.
- Studio delle interazioni covalenti e non covalenti.

---

---

---

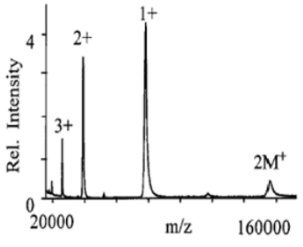
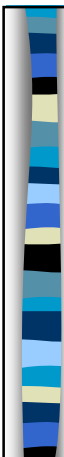
---

---

---

---

---



Spettro ESI-MS della transferrina, una proteina ad alto peso molecolare (circa 80000Da).

---

---

---

---

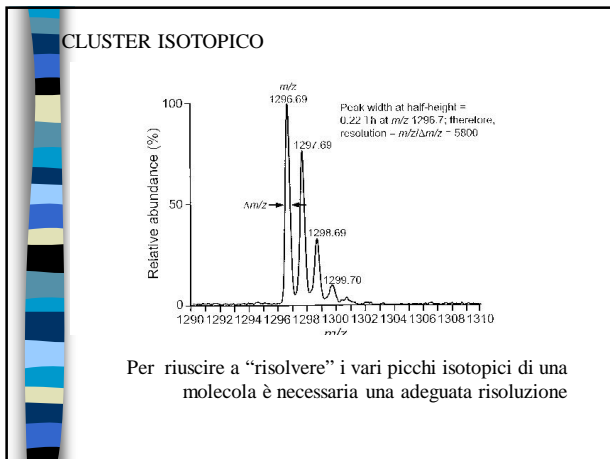
---

---

---

---

# FOLDING PROTEICO




---

---

---

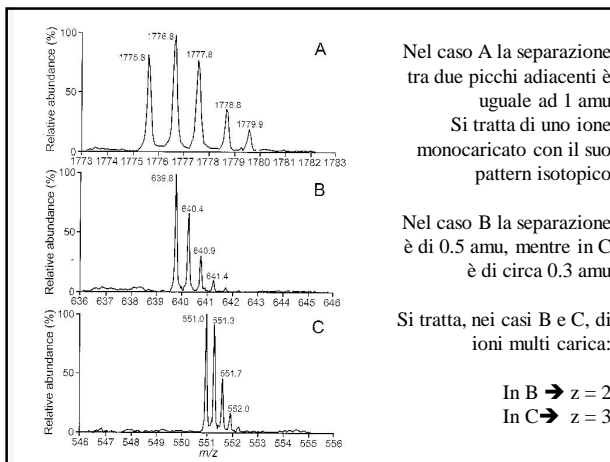
---

---

---

---

---




---

---

---

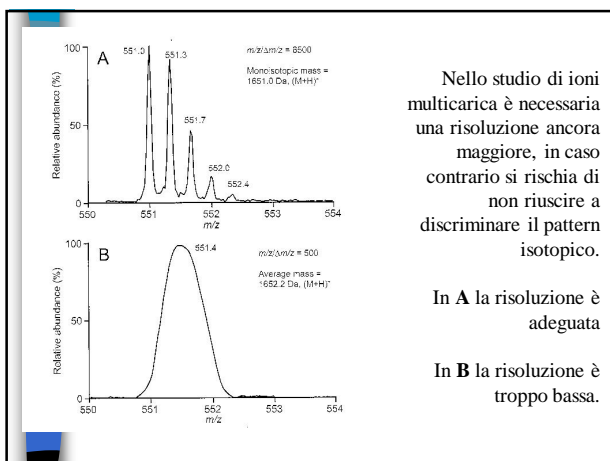
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

## Rivelazione e determinazione del peso molecolare di peptidi e proteine mediante tecnica ESI.

La ionizzazione electrospray di una macromolecola produce uno spettro di massa contenente una serie di ioni multi-caricati con una caratteristica distribuzione a campana

- Gli ioni carichi positivamente si formano a seguito della protonazione degli amminoacidi basici (arginina, lisina, istidina, residuo N-terminale)
- Gli ioni carichi negativamente a seguito della deprotonazione degli amminoacidi acidi (aspartato, glutammato, tirosina, cisteina, residuo C-terminale).

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Il peso molecolare di una proteina può essere determinato direttamente dal suo spettro di massa assumendo che due picchi adiacenti differiscano per una sola carica acquisita, corrispondente all'attacco del protone:

se  $M$  = peso molecolare della proteina  
 $m_1$  e  $m_2$  masse degli ioni multicaricati  
 $n_1$  e  $n_2$  numero di cariche acquisite

$$\begin{cases} m_1 = \frac{M + n_1}{n_1} \\ m_2 = \frac{M + n_2}{n_2} \\ m_1 = n_2 + 1 \end{cases}$$

con  $m_2 > m_1$   
 $n_1 > n_2$

risolvendo il sistema di tre equazioni in tre incognite s

$$M = \frac{(m_1 - 1)(m_2 - 1)}{(m_2 - m_1)}$$

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Esempio di determinazione del peso molecolare di un peptide dallo spettro di massa ESI.

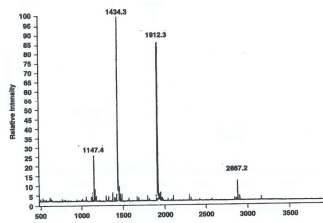


Figura 1: spettro ESI dell'insulina bovina

---

---

---

---

---

---

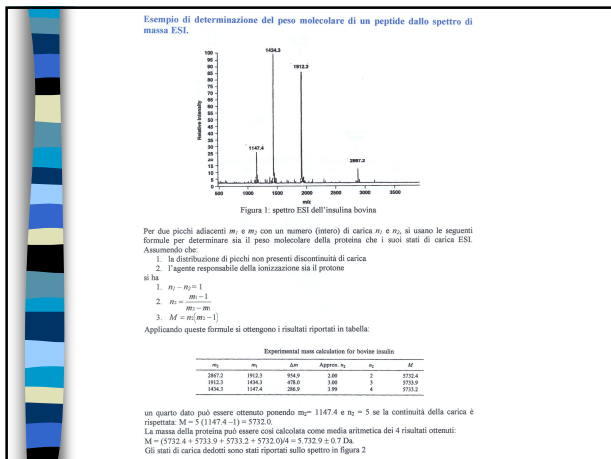
---

---

---

---

# FOLDING PROTEICO




---

---

---

---

---

---

---

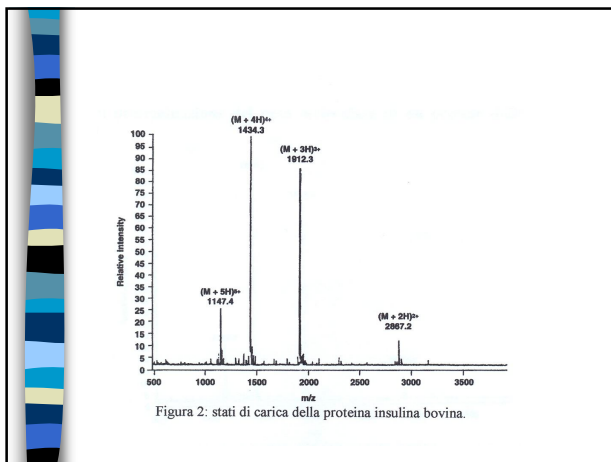
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**AMINOACIDI: LE UNITÀ COSTITUTIVE DELLE PROTEINE.**

Gli  $\alpha$ -aminoacidi che costituiscono le proteine sono 20 ed hanno tutti una configurazione L al  $C_\alpha$ .

$$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ | \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{H} \\ | \\ \text{L} \\ | \\ \text{R} \end{array}$$

Gli aminoacidi possono essere classificati in quattro classi sulla base della polarità del gruppo R:

1. R non polari o idrofobici
2. R polari neutri (privi di carica)
3. R con carica positiva (a  $\text{pH}=6-7$ )
4. R con carica negativa (a  $\text{pH}=6-7$ ).

Il legame peptidico possiede un alto grado di stabilizzazione di risonanza perciò il gruppo  $-\text{NH}-$  non ha tendenza a protonarsi o ionizzarsi tra  $\text{pH} 0$  e  $14$ .

$$\begin{array}{c} \delta^- \\ \text{O} \\ || \\ \text{C} \\ \delta^+ \\ \text{N} \\ | \\ \text{H} \end{array} \quad \begin{array}{c} \text{C} \\ \alpha \\ \delta^+ \\ \text{C} \\ \alpha \end{array}$$


---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

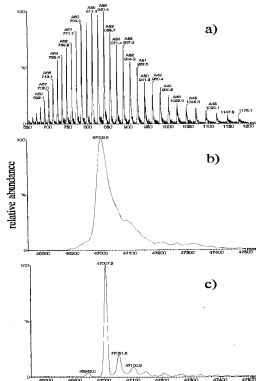
---

---

## Rivelazione e determinazione del peso molecolare di peptidi e proteine mediante tecnica ESI.

La ionizzazione electrospray di una macromolecola produce uno spettro di massa contenente una serie di ioni multicaricati con una caratteristica distribuzione a campana (= spettro ESI proteina rho con MW 47005).

- Gli ioni carichi positivamente si formano a seguito della protonazione degli aminoacidi basici (arginina, lisina, istidina, residuo N-terminale)
- Gli ioni carichi negativamente a seguito della deprotonazione degli aminoacidi acidi (aspartato, glutammato, tirosina, cisteina, residuo C-terminale).



---

---

---

---

---

---

---

---

Algoritmi sviluppati per la determinazione automatizzata del peso molecolare di una proteina e per ottenere una rappresentazione grafica semplificata dello spettro:

- **"averaging algorithm"**, si calcola per ciascun picco *i-esimo* il peso molecolare  $M_i$ ; la migliore stima di  $M$  è calcolata come media degli  $M_i$  relativi ai picchi selezionati.
- **"deconvolution algorithm"**, trasforma matematicamente uno spettro di diversi picchi in uno "deconvolto" in cui il picco più alto (massimo della funzione di trasformazione utilizzata) corrisponde al picco della proteina monocaricata; l'intensità di questo picco sarà data dalla somma delle intensità dei picchi multicaricati misurate nello spettro reale
- **"maximum entropy deconvolution"** ha un approccio analogo al "deconvolution algorithm", ma in questo caso la funzione utilizzata è una funzione di distribuzione di probabilità. Lo spettro "deconvolto", che appare altamente risolto, si ottiene in seguito al processamento ripetuto di spettri di prova comparati ai dati sperimentali fino alla determinazione del peso molecolare  $M$

---

---

---

---

---

---

---

---

## STUDIO DEL FOLDING PROTEICO MEDIANTE ESI-MS.

Il **foldig proteico** è un processo tramite il quale l'informazione lineare, contenuta nella sequenza amminoacidica di una catena polipeptidica, si traduce in una definita struttura tridimensionale biologicamente attiva.

La **ESI-MS**, attraverso

- l'analisi delle distribuzioni dello stato di carica
- l'applicazione delle tecniche di scambio H/D, è emersa come nuova tecnica per ottenere informazioni circa la struttura tridimensionale delle proteine ed i meccanismi di folding.

---

---

---

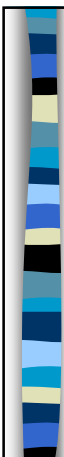
---

---

---

---

---



**Distribuzioni dello stato di carica nella ESI.**  
Gli stati conformazionali delle proteine in soluzione hanno una profonda influenza sulla distribuzione degli stati di carica (CSD) osservati in ESI-MS:

- **proteine nello stato nativo** hanno un limitato CSD con una carica netta bassa
- **proteine denaturate** producono un'ampia serie di picchi caricati centrati a cariche molto più alte.

---

---

---

---

---

---

---

---



---

---

---

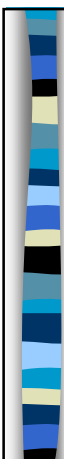
---



---



---

---

---



**Folded Protein**  
ESI-MS →  → 

**Unfolded Protein**  
ESI-MS →  → 

---

---

---


---

---

---

---

---



La differenza nella distribuzione degli stati di carica osservata per i due conformeri è credata essere correlata all'**accessibilità dei gruppi ionizzabili** durante il processo electrospray:

- **nello stato nativo** alcuni dei gruppi basici sono coinvolti in interazioni che non li rendono disponibili per la protonazione, mentre i pKa delle catene laterali dei gruppi acidi sono più bassi perché coinvolti in interazioni elettrostatiche specifiche;
- • **in uno stato denaturato** i siti basici e acidi sono più accessibili al solvente ed i pKa più vicini ai loro valori intrinseci, risultando molto più disponibili nell'accumulare carica di quando sono in uno stato nativo più compatto.

---

---

---


---

---

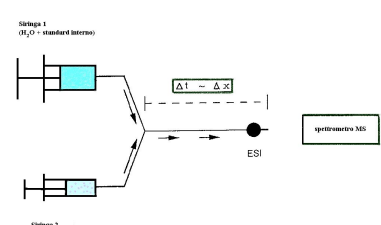
---

---

---



Un nuovo approccio per studiare il folding proteico, usando la ESI-MS in combinazione con una tecnica di miscelamento a flusso continuo, è stato chiamato "**time-resolved ESI**":



Apparato sperimentale per gli esperimenti time-resolved ESI. Le frecce indicano la direzione del flusso delle soluzioni provenienti dalle due siringhe. La siringa 1 (volume 1 mL) si muove ad un flusso di 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ , la siringa 2 (volume 0.1 mL) ad un flusso di 0.1  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

---

---

---

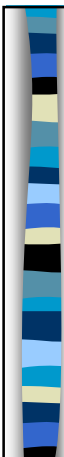
---

---

---


---

---



Nello studio della rinaturazione del *citocromo c* non è stato individuato nessun intermedio conformazionale tra lo stato nativo ed il denaturato.

Al contrario, *la mioglobina* ha rivelato la presenza di una specie intermedia durante la sua denaturazione indotta dall'acido:



Dispositivo di Microsoft PowerPoint

---

---

---

---

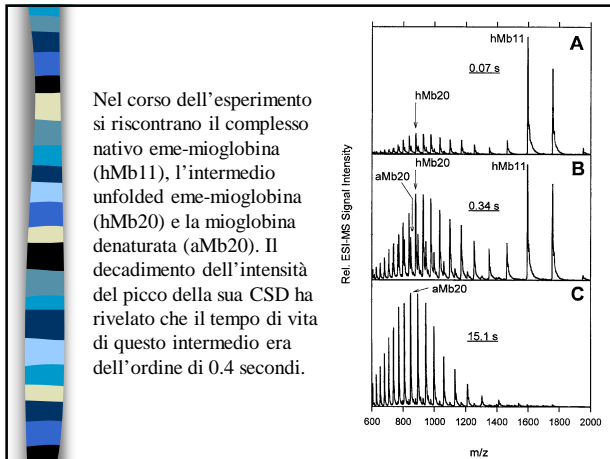
---

---

---

---

# FOLDING PROTEICO



Nel corso dell'esperimento si riscontrano il complesso nativo eme-mioglobina (hMb11), l'intermedio unfolded eme-mioglobina (hMb20) e la mioglobina denaturata (aMb20). Il decadimento dell'intensità del picco della sua CSD ha rivelato che il tempo di vita di questo intermedio era dell'ordine di 0.4 secondi.

---

---

---

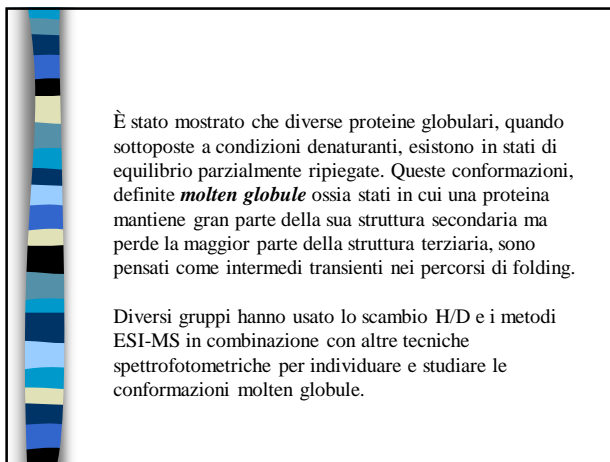
---

---

---

---

---



È stato mostrato che diverse proteine globulari, quando sottoposte a condizioni denaturanti, esistono in stati di equilibrio parzialmente ripiegate. Queste conformazioni, definite *molten globule* ossia stati in cui una proteina mantiene gran parte della sua struttura secondaria ma perde la maggior parte della struttura terziaria, sono pensati come intermedi transienti nei percorsi di folding.

Diversi gruppi hanno usato lo scambio H/D e i metodi ESI-MS in combinazione con altre tecniche spettrofotometriche per individuare e studiare le conformazioni molten globule.

---

---

---

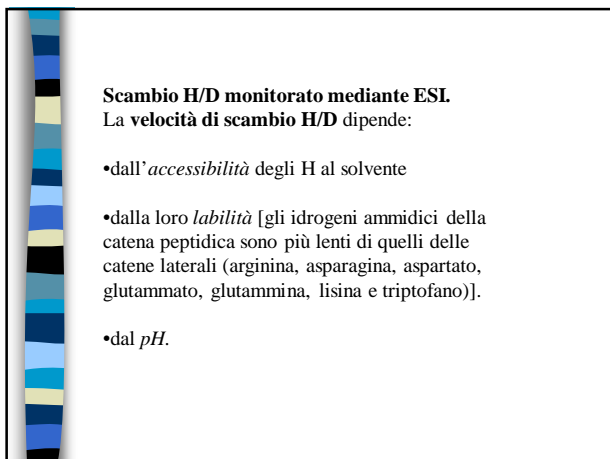
---

---

---

---

---



## Scambio H/D monitorato mediante ESI.

La velocità di scambio H/D dipende:

- dall'accessibilità degli H al solvente
- dalla loro labilità [gli idrogeni ammidici della catena peptidica sono più lenti di quelli delle catene laterali (arginina, asparagina, aspartato, glutammato, glutammina, lisina e triptofano)].
- dal pH.

---

---

---

---

---

---

---

---



# FOLDING PROTEICO

Nei **piccoli peptidi**, dissolti in  $D_2O$  ( $pH < 5$ ) a temperatura ambiente, tutti gli idrogeni labili sono facilmente accessibili al solvente e lo scambio può essere completato entro alcuni minuti.

Nel caso delle **proteine** l'accessibilità al solvente, e quindi la velocità di scambio, dipende anche dalla conformazione, per cui:

- nello stato denaturato**, le velocità di scambio sono simili a quelle nei peptidi semplici
- nello stato nativo**, poiché molti H sono inglobati nel cuore idrofobico della proteina o coinvolti in legami idrogeno o elettrostatici, le velocità di scambio H/D possono differire tra i vari H di molti ordini di grandezza (fino ad 8) e lo scambio completo essere molto lento.

---

---

---

---

---

---

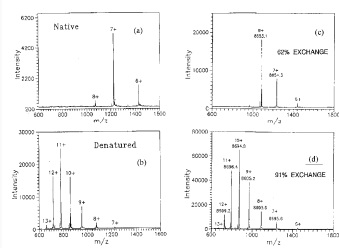
---

---

Tali differenze di comportamento nello scambio H/D tra proteine native e denaturate è stato precedentemente usato per identificare intermedi nel folding proteico mediante NMR.

La ESI-MS consente di monitorare lo scambio H/D, seguendo l'incremento di massa di una proteina.

Nel caso dell'ubiquitina, si hanno un totale di 144 idrogeni labili, di cui 72 sulle catene laterali e 72 sulla catena polipeptidica.



**Spettro (a):** ubiquitina nativa in una soluzione acquosa di acido acetico allo 0.1% ( $pH = 3.2$ ); **spettro (b):** ubiquitina denaturata in una soluzione  $H_2O: CH_3OH$  1:1 (v/v) a  $pH = 2.3$  per aggiunta di  $HCl$ ; **spettro (c):** proteina nativa deuterata in  $D_2O$  allo 0.1% in  $CH_3COOD$  (dopo 20 minuti); **spettro (d):** proteina denaturata deuterata in  $CH_3OD$ :1%  $CH_3COOD$  in  $D_2O$  1:1 (v/v) (dopo 23 minuti).

---

---

---

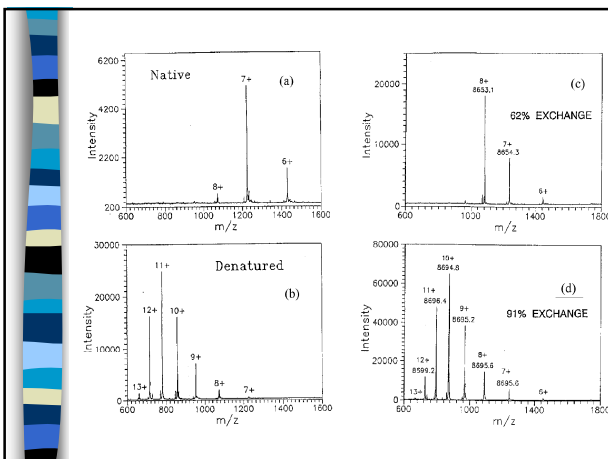
---

---

---

---

---




---

---

---

---


---

---

---

---

# FOLDING PROTEICO



L'incremento di massa misurato dagli spettri (c) e (d) sul peso molecolare dell'ubiquitina nativa e denaturata (spettri a e b) fornisce una misura degli idrogeni scambiati:

il peso molecolare misurato (e mediato) dagli ioni 7+ e 8+ degli spettri (a) e (c) risulta pari a 8565.0 Da, per la proteina nativa tal quale, e 8653.7 Da, per la proteina nativa deuterata; l'aumento di peso dovuto allo scambio H/D è di 88.7 u (cioè 88.7 idrogeni scambiati) corrispondente solo al  $88.7/144 \times 100 = 62\%$  del totale degli idrogeni labili dell'ubiquitina. Lo stesso ragionamento, applicato alla proteina denaturata, ci dice che la percentuale di idrogeni scambiati arriva al 91% dopo 23 minuti di esposizione a condizioni di pH estremo; dopo 1 h la percentuale raggiunge il 96% per non subire ulteriori modifiche per esposizioni più estese nel tempo.

---

---

---


---

---

---

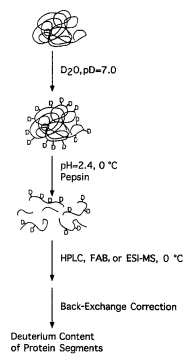
---

---



Metodi per identificare i siti di scambio H/D in una proteina allo stato nativo (o di un intermedio):

- frammentazione CAD e comparazione degli spettri MS/MS della proteina deuterata e non;
- rapida digestione della proteina deuterata, seguita dalla mappatura peptidica mediante HPLC-MS/MS:



Deuterium Content of Protein Segments

---

---

---

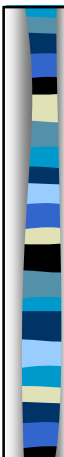
---

---

---

---

---



Questo approccio è utile per ottenere dati a bassa risoluzione sulla dinamica proteica, in specie nel caso di proteine ad alto peso molecolare che non sono adatte all'analisi NMR. Comunque, per piccole proteine (<25000 Da) l'NMR risulta una tecnica superiore, in grado di fornire informazioni dettagliate sulla struttura e sulla stabilità.

---

---

---


---

---

---

---

---



**Complessi proteici non covalenti.**  
La ESI-MS è una tecnica analitica in grado di ionizzare e rivelare complessi proteici covalenti e non intatti che la proteina può formare con vari ligandi (altre proteine, DNA, peptidi, carboidrati ecc.).  
**ESI-MS “nativa”.**  
Nella ESI-MS “nativa”, i complessi proteici non covalenti inizialmente formati in soluzione sono rivelati in fase gassosa. L’electrospray e le condizioni in soluzione sono tali che il complesso proteico è efficacemente trasferito dalla soluzione alla fase gassosa per la successiva analisi di massa.

---

---

---


---

---

---

---

---



Lo studio di molti *complessi proteici oligomerici* mediante ESI-MS nativa ha portato a risultati concordanti con quelli ottenuti mediante le tecniche tradizionali. In taluni casi tuttavia, la ESI può fornire dei dati definitivi che non sono ottenibili con le altre tecniche analitiche; per esempio, gli studi condotti allo scopo di determinare la struttura oligomerica di un piccolo enzima batterico, la tautomerasi (4OT), ha portato a risultati contrastanti, ottenuti mediante tecniche analitiche diverse:

- mediante elettroforesi su gel in condizioni native la proteina era riscontrata come ottamero;
- mediante cromatografia ad esclusione molecolare e tecniche di ultracentrifugazione u pentamero;
- usando la ESI-TOF il complesso enzimatico intatto del 4OT è stato trovato avere una massa consistente con un esamero, in accordo con i dati stechiometrici offerti dalla cristallografia a raggi X e dall’NMR.

---

---

---

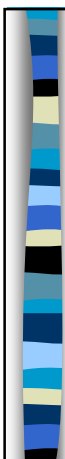
---

---

---

---

---



Nell’ambito dello studio dei *complessi DNA-proteina* la ESI “nativa” è una tecnica in grado di determinare delle precise stechiometrie di legame e caratterizzare affinità relative di una proteina per una particolare sequenza di DNA.  
La tecnica ESI nativa trova applicazione anche nello studio dei complessi *proteina-ligando* in termini di rapporti stechiometrici e di affinità di legame. Queste forze relative possono essere ottenute determinando la quantità di energia necessaria per rompere le interazioni non covalenti. La dissociazione di questi complessi viene indotta in uno spettrometro di massa aumentando l’energia di collisione. Recentemente questo approccio è stato usato per studiare la stabilità di legame di diversi complessi eme-proteina, quali eme-mioglobina e eme-citocromo b5 come modelli.

---

---

---

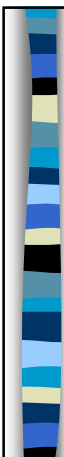
---

---

---

---

---



L'energia di attivazione in soluzione per la dissociazione eme-mioglobina è minore di quella richiesta dal citocromo b5, mentre nell'esperimento electrospray il voltaggio necessario alla dissociazione del complesso eme-mioglobina era maggiore di quello del citocromo b5. Gli autori attribuiscono questa discrepanza al ben documentato fenomeno che ioni più grandi (mioglobina MW=17500 Da; citocromo b5 MW=10000 Da) richiedono più grandi energie interne per la loro dissociazione. Sebbene non ci sia una correlazione assoluta tra la forza di un dato complesso proteico ed il voltaggio richiesto per la dissociazione, questi esperimenti hanno suggerito che si possono stabilire delle correlazioni relative entro uno specifico sistema proteico. Quindi, la ESI-MS nativa gioca un ruolo importante non solo per identificare complessi ligando-proteina, ma anche per assegnare una stabilità relativa ai complessi ligando-proteine mutanti.

---

---

---

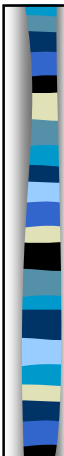
---

---

---

---

---



Mentre la ESI-MS è particolarmente adatta allo studio delle interazioni non covalenti nella chimica sopramolecolare, la forte acidità utilizzata per la preparazione dei campioni nel MALDI tende a denaturare i campioni biologici e spesso preclude la caratterizzazione di specifici assemblaggi non covalenti. Recentemente, comunque, sono state individuate matrici MALDI e messe a punto tecniche di preparazione di campioni in condizioni non denaturanti allo scopo di studiare anche con questa tecnica complessi proteici non covalenti.

---

---

---

---

---

---

---

---