

Országos Tudományos Diákköri Dolgozat

LEMLE ÁKOS

**Tömegspektrometria alapú
peptidtérképezés optimalálása
újszerű emésztőenzimmel**

Témavezetők:

Dr. Steckel Arnold, tudományos segédmunkatárs

Dr. Schlosser Gitta, egyetemi adjunktus

MTA-ELTE Lendület

Ionmobilitás-tömegspektrometria Kutatócsoport



Eötvös Loránd Tudományegyetem,

Természettudományi Kar

Budapest

2022

Dolgozat lezárása: 2023. január 9.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetet szeretnék mondani Dr. Schlosser Gittának, az MTA-ELTE Lendület Ionmobilitás-tömegspektrometria Kutatócsoport vezetőjének, amiért bemutatta nekem a csoportot, és megszerettette velem a nagyműszeres mérések módszerének fejlesztését, illetve megtanította nekem a tömegspektrometria és az elválasztástechnika alapjait, valamint lehetővé tette a kutatómunkámat a csoportban. Mindig számíthattam rá, ha kérdés merült fel bennem valamivel kapcsolatban.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani Dr. Steckel Arnoldnak, amiért idejét nem sajnálva türelmesen segített a kísérletek megtervezésében, kivitelezésében, kiértékelésében. Bármikor számíthattam rá, ha elakadtam. Továbbá, amiért segített elsajátítani a tudományos kommunikáció alapjait, és megtanított irodalmazni.

Hálával tartozom Dr. Gellén Gabriellának, amiért segített nekem megtervezni és kivitelezni az enzimatikus emésztéseket.

Köszönöm Papp Dávidnak, hogy segített lebonyolítani a méréseket a tömegspektrométeren, és hogy lelkesen magyarázta a műszer különböző alkatrészeinek működési elvét, és segített kiválasztani a megfelelő mérési módszert.

A Waters Select Series Cyclic IMS tömegspektrométer beszerzése az ELTE Szint+ Témaerületi Kiválósági Program keretében valósult meg, az Innovációs és Technológiai Minisztérium támogatásával.

A 2018-1.2.1-NKP-2018-00005 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a 2018-1.2.1-NKP pályázati program finanszírozásában valósult meg.

A munkát az MTA Lendület programja, valamint a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (OTKA SNN 138407) támogatta.

Tartalom

Rövidítésjegyzék	1
1. Bevezetés	2
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. Tömegspektrometria	3
2.2. Az elektroporlasztásos ionizáció	3
2.3. Analizátorok	5
2.3.1. A repülési idő analizátor (TOF)	5
2.3.2. A kvadrupól analizátor (Q)	6
2.4. A tandem tömegspektrometria (MS/MS)	6
2.5. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)	7
2.6. Proteomika	8
2.6.1. A top-down módszer	8
2.6.2. A bottom-up módszer	9
2.6.3. A middle-down módszer	11
2.6.3. Szoftveres peptidazonosítás	11
2.6.4. A mobilis proton modell	11
2.6.5. Peptidek kötéshasadási preferenciája	14
3. Célkitűzések	17
4. Kísérleti rész	18
4.1. Felhasznált anyagok	18
4.2. Mintaelőkészítés és enzimatis emésztés	18
4.3. HPLC-MS(/MS) mérések	19
5. Eredmények	21
6. Konklúzió	33
7. Irodalomjegyzék	35
8. Függelék	40

Rövidítésjegyzék

*	Az ammóniavesztés jelölése a tandem tömegspektrumokon
$[M + nH]^{n+}$	n-szeresen protonált molekula
°	A vízvesztés jelölése a tandem tömegspektrumokon
ADH	(Élesztő) alkohol dehidrogenáz
BPC	Báziscsúcs kromatogram (<u>B</u> ase <u>P</u> eak <u>C</u> hromatogram)
BSA	Szarvasmarha szérum albumin (<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin)
cB	„B” aminosav C-terminálisán történő kötéshasadás
CID	Ütközésindukált disszociáció (<u>C</u> ollision- <u>i</u> nduced <u>D</u> issociation)
CIR	Kötéshasadás intenzitási arány (<u>C</u> leavage <u>I</u> ntensity <u>R</u> atio)
DTT	(2S,3S)-1,4-diszulfanilbután-2,3-diol (ditiotreitol)
ESI	Elektroporlasztásos ionizáció (<u>E</u> lectrospray <u>I</u> onization)
HPLC	Nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (High-Performance Liquid Chromatography)
IAA	2- jódacetamid (jódacetamid)
int- <i>b</i> [2-5]	<i>b</i> -típusú belső fragmens jelölése a tandem tömegspektrumokon
M	Prekursorion jelölése a tandem tömegspektrumokon
<i>m/z</i>	Tömeg / töltés
MS	Tömegspektrometria (<u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry)
MS/MS	Tandem tömegspektrometria
nB	„B” aminosav N-terminálisán történő kötéshasadás
NMR	Mágneses rezonancia (Nuclear Magnetic Resonance)
PTM	Poszttranszlációs módosítás (<u>P</u> ost <u>t</u> ranslational <u>M</u> odification)
Q	Kvadrupól analízátor
RP-HPLC	Fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (<u>R</u> eversed- <u>P</u> hase <u>H</u> igh- <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
SCX	Erős kationcserélő (<u>S</u> trong <u>C</u> ation <u>E</u> xchange)
TIC	Összes ion kromatogram (<u>T</u> otal <u>I</u> on <u>C</u> hromatogram)
TOF	Repülési idő (<u>T</u> ime- <u>o</u> f- <u>F</u> light)
Xaa	Egy tetszőleges α-aminosav hárombetűs rövidítése
XRD	Röntgen diffrakció (<u>X</u> -ray <u>D</u> iffraction)

1. Bevezetés

A fehérjék szekvenciájának meghatározása alapvető jelentőségű a sejtben történő biológiai folyamatok megértéséhez. A szekvenáláshoz leggyakrabban az ún. *bottom-up* proteomikai módszert használják. Ennek során a vizsgált sejt kultúrából vagy szövetmintából kinyerik a fehérjéket, megbontják a fehérjeláncok közötti kötéseket és kémiai származékképzés útján blokkolják azok visszaalakulását. A fehérjéket ezt követően enzimatis emésztésnek vetik alá. Ilyen módon jobb oldhatóságú és tömegspektrometriával egyszerűbben azonosítható, kisebb peptid keletkezik. Az enzimatis emésztéshez leggyakrabban használt enzim a tripszin, amely nagy hatékonysággal és specifikusan a lizin és arginin aminosavak C-terminálisán hidrolizálja el az amidkötéseket. A keletkező peptidket triptikus peptideknek nevezzük.

Az enzimatis emésztést követően nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) segítségével elválasztják a peptidket és tandem tömegspektrometriával (MS/MS) azonosítják őket. MS/MS során a tömegspektrométerben a peptidkból keletkezett peptidionokat elkülönítik, és valamilyen gerjesztési technikával alkotórészeikre bontják őket (fragmentáció). A peptidionokból keletkező fragmensek jellemzőek a kiindulási peptid szekvenciájára, és adatbázis alapú kereséssel azonosíthatóak. Az MS/MS alapú azonosítás sikeressége nagyban függhet az enzimatis emésztés során nyert peptid fizikai-kémiai tulajdonságaitól, például a peptid méretétől, hidrofobicitásától, gázfázisú bázicitásától, töltöttségi fokától és a gerjesztés energetikájától.

A tripszinnel történő emésztés során általában kis-közepes méretű, jellemzően kétszeresen-háromszorosan töltött peptidionok keletkeznek, amelyek viszonylag könnyen azonosíthatók HPLC-MS/MS technikával. Ugyanakkor előfordulhat, hogy a meghatározni kívánt fehérje túl sok vagy túl kevés bázikus aminosavat tartalmaz. Előbbi azt eredményezi, hogy sok kis méretű peptid keletkezik, amelyeket nehéz tisztítani és HPLC-vel elválasztani, utóbbi esetben pedig túl nagy peptid keletkeznek, amelyek nehezen fragmentálódnak vagy túl kevés informatív fragmens keletkezik belőlük. Ezért a tripszinen kívül más, különféle specifitással rendelkező enzimet is alkalmaznak a gyakorlatban.

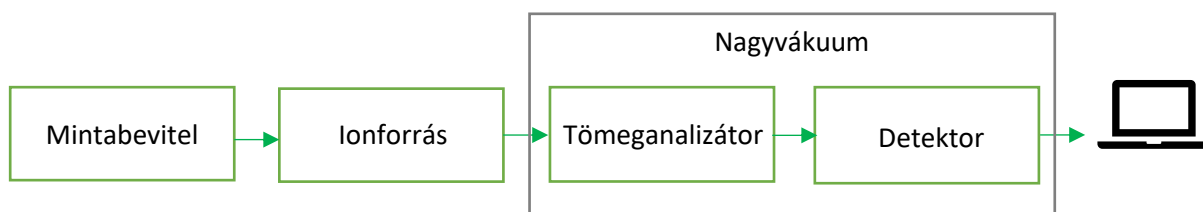
Az egyik ilyen viszonylag új és kevésbé ismert emésztőenzim a ProAlanáz, amely a fehérjeláncot a prolin és alanin C-terminálisánál hasítja el. Kutatómunkám során két modellfehérje, az élesztő alkohol dehidrogenáz (ADH) és szarvasmarha szérum albumin (BSA) enzimatis emésztését végeztem el ProAlanáz enzim segítségével. Ezt követően azonosítottam a keletkező peptidket, azok fragmenseit, meghatároztam az azonosításhoz optimális ütközési energiát, és részletesen vizsgáltam a fragmentációs folyamatokat HPLC-MS/MS technikával.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Tömegspektrometria

A tömegspektrometria (MS) egy olyan nagyműszeres analitikai és szerkezetkutató módszer, amellyel ionokat lehet szétválasztani elektromos és/vagy mágneses térben való viselkedésük alapján tömeg / töltés (m/z) értékük szerint.¹ A módszer minőségi és mennyiségi analízisre is alkalmas. Napjainkban a fehérjék, valamint a peptidek szekvenciájának meghatározását legtöbbször ezzel a technikával végzik.²

Egy tömegspektrométer főbb részei a mintabeviteli rendszer, az ionforrás, a tömeganalizátor és a detektor (1. ábra). Az analízátor és a detektor nagyvákuumtérben helyezkednek el, az ionforrás lehet légköri nyomáson vagy vákuum alatt.³



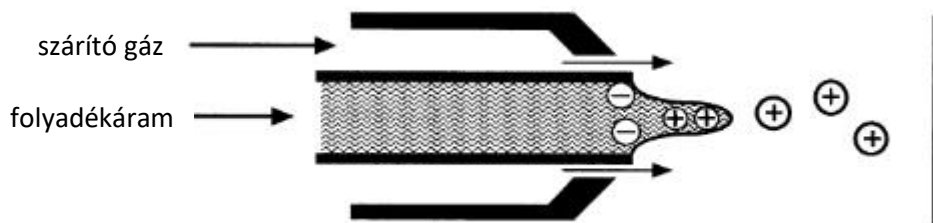
1. ábra A tömegspektrométerek sematikus felépítése

A mintabeviteli rendszer direkt vagy indirekt módon juttatja a mintát a műszerbe. Indirekt injektálásról beszélünk, ha a tömegspektrométer ionforrásához valamilyen elválasztástechnikai eszközt (kromatográf) *on-line* kapcsolnak. Az ionforrás feladata az, hogy a mintából gázfázisú ionokat állítson elő, amelyek így kölcsönhatásba tudnak lépni elektromágneses térrel. Az analízátor szétválasztja az ionokat térben vagy időben m/z értékük szerint. Az analízátor típusa határozza meg a készülék felbontását és pontosságát, a vizsgálható tömegtartomány szélességét, a szkennelés gyorsaságát. A detektor pedig az analízátorból érkező ionok számával arányos jelet generál. A műszer vezérlését szoftveresen oldják meg.⁴

2.2. Az elektroporlasztásos ionizáció

Fehérjék és peptidek vizsgálatához legtöbbször elektroporlasztásos ionizációt használnak (Electrospray Ionization, ESI). ES ionizáció során a mintát tartalmazó oldószert 2-7 kV feszültséggel porlasztják egy tűn keresztül.⁵ A porlasztást egy, az ESI-tűt körülölelő csőben áramló gáz (általában nitrogén) segíti. Pozitív (ES+) és negatív ionizációs módot (ES-) különböztetünk meg attól függően, hogy pozitív vagy negatív ionokat kívánunk detektálni. A porlasztás során keletkező töltött cseppek

szárítását ellenirányban áramló szárítógáz segíti, a detektor irányába való mozgásukat pedig feszültséggradiens. A párolgás következtében a töltéssűrűség, s így a Coulomb-taszítás folyamatosan nő a cseppekben, így végül ún. Coulomb-robbanások következnek be, amelyek egyre kisebb méretű cseppek keletkezését eredményezik (2. ábra).⁶



2. ábra Az elektroporlasztásos ionizáció (ESI) szemléltetése⁷

A teljes elpárolgás után a mintából gázfázisú, többszörösen protonált molekulák $[M + nH]^{n+}$ keletkeznek pozitív módban, forráson belüli fragmentáció megfelelő beállítások mellett nem jellemző. Az ES ionizáció poláros kis-, közepes- és nagymolekulák vizsgálatára alkalmas vezetőképessé oldószerben.⁸ Megfelelő oldószer például az acetonitril vagy metanol és víz elegye, amely 0,1% hangyasavat vagy ecetsavat tartalmaz. Fontos kiemelni, hogy csak illékony adalékanyagok használhatók. Az oldószerben vagy a mintában előforduló szerves ionok adduktot képezhetnek a mintával, mint például a $[M + Na]^+$ pozitív módban vagy a $[M + Cl]^-$ negatív módban.⁷

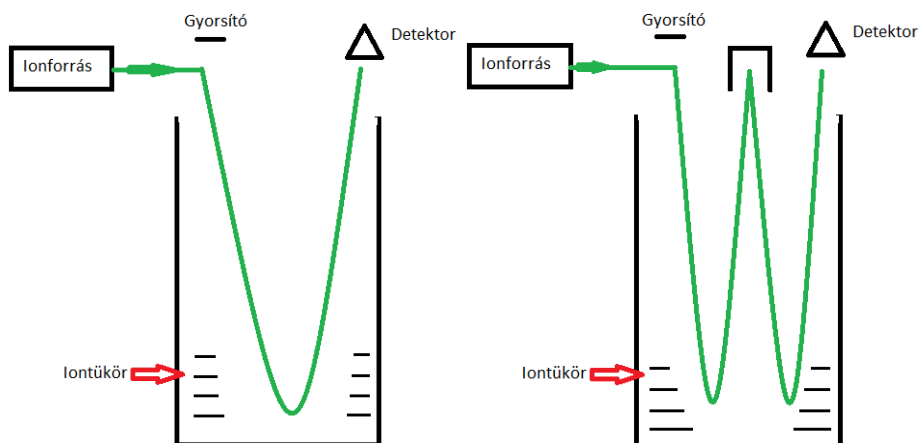
Mivel az ionizáció mértéke függ a mérendő komponensek polaritásától és protonálhatóságától, ezért előfordulhat, hogy többkomponensű mintákban a könnyebben protonálható komponensek nagyobb intenzitással detektálhatók, és elnyomják a többi jelét. Ezt a jelenséget ionszuppresszióknak nevezzük.⁹ A minta esetleges sótartalmának is jelentős szuppresszív hatása van a többi komponensre nézve.⁷

2.3. Analizátorok

2.3.1. A repülési idő analízátor (TOF)

A peptid- és fehérjeszekvenálási vizsgálatok céljára leggyakrabban repülési idő, orbitrap, kvadrupól, és ioncsapda analízátorok kombinációit tartalmazó tömegspektrométereket használnak (ún. hibrid analízátoros tömegspektrométerek).¹⁰

Ezek közül az ún. reflektoron repülési idő analízátor (TOF) nagy felbontással és pontossággal rendelkezik. Működési elve elektromos térrel csomagokba gyűjtött, majd felgyorsított ionok repülési idejének mérésén alapul egy erre a célra kialakított térmentes repülési csőben. Először az ionokat a haladási irányukra merőleges irányba térítik el, majd az ún. iontükör visszafordítja azokat a detektor irányába oly módon, hogy az ionok pályája V-alakú legyen (V mód). A repülési idő egyenesen arányos a m/z érték négyzetgyökével (3. ábra).¹¹ Ha a repülési csőben egy második iontükört helyeznek el, azzal a felbontás tovább javítható (ún. W mód).



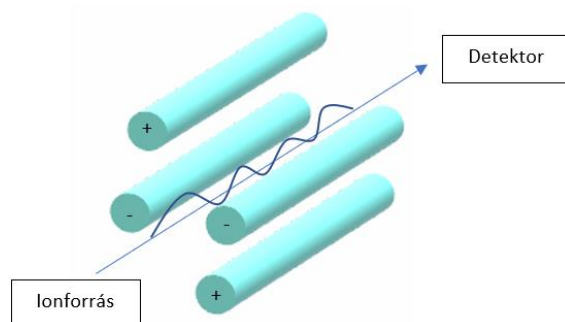
3. ábra A reflektoron típusú repülési idő analízátor (TOF) általános felépítése V-módban (bal) és W-módban (jobb)

TOF analízátor esetében gyakori kalibrálás szükséges. A külső kalibrációt általában egy standard vegyületkeverék mérésével végzik. A másik lehetőség, hogy egy olyan só (pl. nátrium-formiát, cézium-jodid) oldatát használják, amely változatos tömegű klasztereivel lefedi a teljes mért m/z tartományt.¹²

Belső kalibráció céljára egy ismert vegyület meghatározott koncentrációjú oldatát alkalmazzák, amelyet egy referenciaágon keresztül juttatnak a tömegspektrométerbe. A mérés során a műszer adott időközönként vált a mintaág és a referenciaág között, ezzel biztosítva a folytonos tömegkorrekció, s így a pontos tömegmérés lehetőségét.¹³

2.3.2. A kvadrupól analízátor (Q)

A kvadrupól analízátor (Q) négy párhuzamos fémrúdból áll, amelyekre egyen- és váltóáramot kapcsolnak oly módon, hogy a két szemben lévő rúd feszültségének mindig azonos az előjele, míg a két szomszédosé ellentétes (4. ábra).¹⁴ Minden egyen- és váltóáram értékpárhoz csak egy adott m/z értékű ion tartozik, amely stabil oszcillációs pályán el tud jutni a detektorig vagy az ütközőcelláig, a többi ion instabil pályával rendelkezik, és nem jut tovább. Az egyen- és váltóáram feszültségének változtatásával végig lehet pásztázni a teljes mérhető m/z tartományt, megkapva így a tömegspektrumot.¹⁵



4. ábra A kvadrupól (Q) analízátor általános felépítése

A kvadrupól analízátorok viszonylag kedvező árúak és gyorsak, viszont alacsony a felbontásuk és általában szűk az általuk vizsgálható tömegtartomány. Manapság alkalmaznak hexa- és oktopól analízátorokat is ionoptikai és iontranszmissziós célokra.⁴

2.4. A tandem tömegspektrometria (MS/MS)

Szerkezeti információ szerzése lágy ionizációs technikák alkalmazásakor – mint amilyen az ESI – csak abban az esetben lehetséges, ha az ionokkal többletenergiát közölnek, s ily módon szerkezeti elemeire bontják azokat. Erre szolgál a tandem tömegspektrometria (MS/MS).

MS/MS mérés során az adott iont (pontosabban egy annak megfelelő szűk m/z tartományt) kiválasztják egy analízátorral, alkalmas módszerrel gerjesztik, és a gerjesztés során keletkezett fragmentumokat egy másik analízátorral pásztázzák. A gerjesztés céljára kiválasztott ionokat prekursorionoknak (precursor ion) nevezzük, míg a keletkező fragmentumokat termékionoknak (product ion).¹⁶

A két analízátor között egy ioncsapda vagy ütközőcella található, ahol valamilyen gerjesztési technika segítségével váltható ki a prekursorionok fragmentációja. A leggyakrabban alkalmazott gerjesztési technika az ütközésindukált disszociáció (collision-induced dissociation, CID), melynek során a prekursorionokat inert gáz atomjaival (He, Ar) vagy molekuláival (N_2) ütköztetik.¹⁷ Az ütközések hatására a prekursorionok belső energiája megnő, amely végül a kovalens kötések felszakadásához, és

semleges molekulák, ill. termékionok keletkezéséhez vezet. A semleges molekulákat (ún. semlegesvesztések) tömegspektrométer segítségével nem lehet detektálni, a termékionokat viszont igen. A semlegesvesztések bekövetkeztére a termékionok közötti jellegzetes tömegkülönbségből lehet következtetni.¹⁸

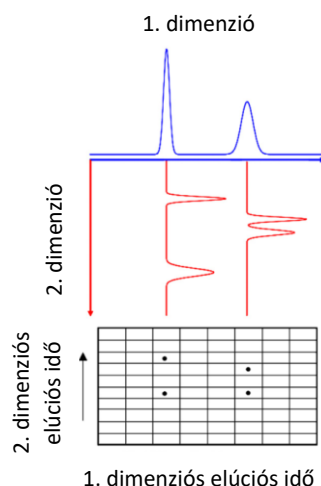
Tandem tömegspektrometriás méréseknél a kvadrupól analizátor kedvező ára és gyorsasága miatt kiválóan használható tömegszelektorként és ütközőcellaként. Utóbbi esetben csak váltóáramot kapcsolnak a rudakra, egyenáramot nem.¹⁴

2.5. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

Többkomponensű minták vizsgálata során az ionszupresszió miatt, valamint, hogy egyszerre optimális esetben csak egy komponens jusson a műszerbe, az MS-t elválasztástechnikával kapcsolják össze online. Leggyakrabban nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC) használnak erre a célra.⁹ Ez egy olyan elválasztástechnikai módszer, amely a minta molekuláinak egy állófázissal való kölcsönhatásán, és egy vele érintkező mozgófázis kölcsönhatásán alapszik. Az elúció (minta komponenseinek mozgása az állófázisból a mozgófázisba) hajtóereje a két fázis közötti kémiai potenciál-kiegyenlítődé. A minta különböző komponensei különböző mértékű fizikai kölcsönhatást alakítanak ki az állófázissal, ezért különböző lesz a retenció idejük.¹⁹

Peptidek vizsgálatára apoláris töltetű állófázissal ellátott kromatográfiás oszlopokat használnak. Ezen állófázisok felülete leggyakrabban 18 szénatom hosszúságú szénláncokból áll, mozgófázisa pedig általában acetonitril-víz elegy.²⁰ Az ilyen elrendezést fordított fázisú folyadékkromatográfiának nevezik (RP-HPLC). Az acetonitril-víz elegyben az acetonitril arányát az elválasztás során egy meghatározott gradiensprogram szerint növelik az idő függvényében. A minta komponensei így növekvő hidrofobicitásuk szerint eluálódnak a kromatográfiás oszlopról.²¹

Rendkívül komplex minták esetében az elválasztás hatékonysága javítható például többdimenziós folyadékkromatográfia alkalmazásával (2D LC). Ekkor két különböző állófázisú kromatográfiás oszlopot kötnek sorba, amelyek között váltószelep, és opcionálisan egy detektor helyezkedik el. A fehérjeszekvenáláshoz legtöbbször egy erős kationcserélő állófázissal (SCX) ellátott és egy fordított fázisú kromatográfiás oszlop kombinációját alkalmazzák. A 2D LC kromatográfiának két fő fajtája létezik: az egyik az ún. átfogó (comprehensive) 2D LC (LC x LC). Ekkor az első oszlopról eluálódó komponensek folytonosan áramlanak át a másik oszlopra. A másik módszer során viszont az első oszlopról eluálódó mintának csak egy adott részletét engedik tovább a második oszlopra. Mindkét esetben egy kétdimenziós kromatogramot kapunk (5. ábra).²²



5. ábra Kétdimenziós kromatogramok szemléltetése²²

HPLC-MS kapcsolás esetén többféleképpen is megjeleníthető a felvett kromatogram. Az egyik az össziónáram kromatogram (*total ion chromatogram*, TIC), amely tartalmazza a tömegspektrométer által detektált összes iont az adott időpillanatban. Egyes esetekben célszerű lehet az ún. báziscsúcs kromatogram (*base peak chromatogram*, BPC) használata, amely a báziscsúcsok – azaz minden spektrum legnagyobb beütésszámú csúcsainak – intenzitását ábrázolja az idő függvényében. Ha egyetlen iont monitorozunk/detektálunk a teljes kromatográfiás futási idő alatt, akkor single ion chromatogramot (SIC) kapunk.²³

2.6. Proteomika

Proteomikának nevezzük azt a tudományterületet, melynek során biológiai mátrixokban azonosítanak fehérjéket, és sok esetben meghatározzák azok mennyiségét és térbeli eloszlását a mátrixon belül.²⁴ Erre a célra a legalkalmasabb technika a HPLC-MS/MS, de használnak egyéb, például gélelektroforézis-alapú, MALDI-TOF tömegspektrometriás, valamint más típusú kromatográfiával csatolt tömegspektrometriás módszereket is.²⁵ Tömegspektrometria alapú módszerekkel főleg vírusokban és mikroorganizmusokban található fehérjéket kutatnak, valamint sejten belüli poszttranszlációs módosításokat azonosítanak, ezenkívül komplex fehérjemátrixok alkotóelemeinek mennyiségét és minőségét határozzák meg.²⁶

A továbbiakban csak a tömegspektrometria alapú proteomikai módszerek bemutatásával foglalkozom. Ezen belül három főbb stratégiát különböztethetünk meg: a top-down, a bottom-up, és a middle-down módszereket.

2.6.1. A top-down módszer

Top-down szekvenálás során a fehérjéket intakt formában, azaz enzimatis emésztés és kémiai módosítás nélkül vizsgálják MS/MS méréssel. Fehérjemonomerek vizsgálata ES ionizációval történik, oligo- és polimerek analízise viszont mátrix elősegítette lézer deszorpcióval/ionizációval

(MALDI) történik, ugyanis utóbbiak nehezen vihetők oldatba.²⁷ A vizsgálat során, amennyiben lehetséges, megőrzi a fehérje harmadlagos szerkezetét. A top-down szekvenálás egy proteomikai vizsgálatnak gyakran az első lépése, ugyanis információt szolgáltat a teljes fehérje proteoformjáról — azaz egy adott fehérje különböző szekvenciájú változatairól, vagy ugyanazon szekvencia poszttranszlációsan különbözőképpen módosított formáiról²⁸—, valamint egy fehérjekomplex sztöchiometriájáról. Ütközőcellában történő fragmentációval megvizsgálható, hogy a fehérje mely részei kapcsolódnak gyengébb kötésekkel a többi részéhez.

A módszer előnye a gyors mintaelőkészítés, illetve, hogy nem szükséges enzimatis emésztést és származékképzést alkalmazni. Ugyanakkor komoly hátránya, hogy nagyon nagy felbontást és tömegpontosságot igénylő technika, továbbá nagyobb fehérjék teljes szekvenciáját nem lehet vele meghatározni.²⁷

2.6.2. A bottom-up módszer

Bottom-up szekvenálás (6. ábra) során egy sejtekből álló minta emésztésének első lépése a mátrix homogenizálása lizálást, azaz a sejtmembrán megbontását követően. A lizátumot ezt követően ultrahangos szonikálásnak vetik alá a hatékony oldatba vitel érdekében. Az oldhatatlan komponenseket ezután centrifugálással távolítják el. A fenti műveleteket alacsony hőmérsékleten, proteázinhibitorok jelenlétében végzik, a fehérjék degradálódásának megakadályozása céljából. Fontos, hogy ezek az inhibitorok ne lépjenek kölcsönhatásba a mérendő komponensekkel. Ezután ditiotreitollal (DTT) megbontják a diszulfidhidakat, majd általában jód-acetamiddal (IAA) való származékképzés útján megakadályozzák azok visszaalakulását. Ezután pufferrel megfelelő értékre állítják be a reakcióelegy pH-ját, majd emésztőenzimet adnak a mintához.²⁹

Az enzimatis emésztés célja egy nagyméretű fehérje kisebb peptidekre bontása. Ez olyan enzimekkel történik, amelyek meghatározott aminosavak között elhidrolizálják az amidkötéseket. Erre a célra leggyakrabban tripszint használnak enyhén bázikus körülmények között (~pH 8), amely specifikusan a lizin és az arginin C-terminálisánál hasítja el a láncot.²⁹

A tripszines emésztést gyakran kémiai módosított tripszin és LysC enzim hozzáadásával végzik. A tripszin kémiai módosítására az önemésztés megakadályozásának érdekében van szükség. A LysC/tripszin keveréke kevesebb hasítási helyet hagy ki, mint a tripszin, mely utóbbi kisebb hatékonysággal hasít a lizin mellett.³⁰

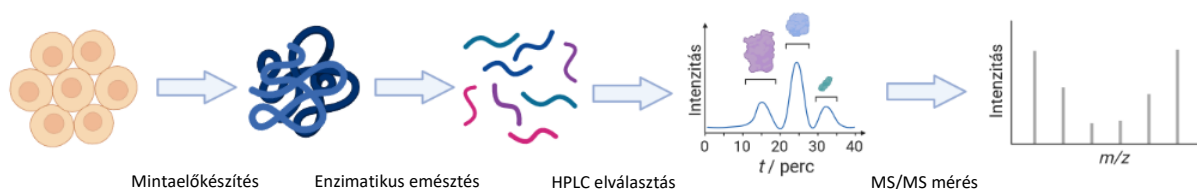
Ha a vizsgált fehérje túl kevés bázikus aminosavat tartalmaz, akkor a keletkező peptidek túl nagyok és CID-val nehezen fragmentálhatók lesznek, ezért nem szolgáltatnak megfelelő mennyiségű szerkezeti információt. Ellenkező esetben pedig túl sok kisméretű, kromatográfiás szempontból nehezen elválasztható peptid keletkezik.³¹

Ilyen esetekben a tripszin valamelyik alternatíváját célszerű használni. Gyakran használt egyéb enzimek például a kimotripszin, a GluC, az ArgC, a pepszin, vagy a LysC önmagában.³²

Kevésbé ismert, új típusú enzim a ProAlanáz, mely 2020 óta kapható kereskedelmi forgalomban.³³ A ProAlanáz az *Aspergillus niger* nevű gombából származó enzim, amely a prolin és az alanin C-terminálisán hasít. Az enzimatis émesztéshez alacsony pH szükséges, és alkalmazása kevésbé időigényes, mint a tripszin esetében.³⁴ Legnagyobb specicitás pH 1,5-en, kétórás émesztés során érhető el. ProAlanázzal történő émesztést követően a peptidekben rendszerint kétszer annyi láncközi alanin található, mint amennyi láncvégi, illetve kétszer annyi láncvégi prolin található, mint amennyi láncközi.³⁴ Ez alapján az enzim prolin után sokkal nagyobb specicitással hasít. A ProAlanáz kiválóan alkalmas hisztonokban található fehérjék vizsgálatára, illetve kollagén émesztésére, melynek köszönhetően lehetőségünk van ősi csontmintákban található kísérőfehérjék meghatározására.³⁴

A minta sótartalmát, a reagenseket, illetve a puffereket a mérést megelőzően el kell távolítani a problémamentes ionizáció és HPLC szeparáció biztosítása érdekében, amely leggyakrabban szilárd fázisú extrakcióval történik.³²

Az émesztés után a peptideket HPLC-vel elválasztják, és MS/MS analízist hajtanak végre. Adatfüggő analízis (*data-dependent acquisition, DDA*) során a mintáról először egy tömegspektrumot vesz fel a szoftver, majd egy kritériumrendszer alapján – például adott spektrum legintenzívebb 3-10 ionját kiválasztva – végez MS/MS mérést.³⁵



6. ábra A *bottom-up* szekvenálás sematikus folyamatábrája

A másik módszer az adatfüggetlen analízis (*data-independent acquisition, DIA*), melynek során egy m/z tartományt kisebb ablakokra bontva az ablakok minden ionját egyszerre fragmentálják intenzitástól függetlenül.^{35,36}

MS/MS mérés során a peptidek fragmensekre bomlanak, amelyekből adatbázis alapú kereséssel lehet következtetni a prekursor szekvenciájára. A *bottom-up* módszer egyik nagy hátránya a hosszadalmas mintaelőkészítés, valamint, hogy a poszttranszlációs módosítások pontos helyét gyakran nehéz meghatározni.³¹

2.6.3. A middle-down módszer

A middle-down szekvenálás abban különbözik a top-downtól, hogy ebben az esetben vizsgálat előtt a fehérjét kisebb alegységekre bontják, és azokról vesznek fel HPLC-MS/MS méréseket. Ez a bontás történhet kémiai úton, például a diszulfidhidak bontásával, vagy szerkezetspecifikus enzimek alkalmazásával. Az így keletkező peptidek nagyobb méretűek, mint a bottom-up során keletkező peptidek.²⁷ A middle-down szekvenálás alkalmasabb lehet például a poszttranszlációs módosítások (PTM) lokalizálására, mint a bottom-up, mely utóbbi során csak az egymáshoz közel eső módosítási helyeket van lehetőségünk egy MS/MS spektrumon belül azonosítani.³⁷

2.6.3. Szoftveres peptidazonosítás

Egy tandem tömegspektrum manuális kiértékelése időigényes, és sok tapasztalatot igénylő folyamat. Egy komplex peptidkeverék összes MS/MS spektrumának kézi kiértékelése már nem lehetséges, ezért ezekben az esetekben szoftveres azonosítást alkalmaznak.

Az egyik ilyen megoldás a SEQUEST algoritmus. A program az összes spektrumban szereplő fragmensionnt összehasonlítja elméletileg keletkező fragmensionokkal, és ez alapján azonosítja a peptideket. Az elméleti spektrumokat korábban azonosított fehérjéket tartalmazó adatbázisok segítségével generálja le.³⁸

A Mascot keresőmotor egy fehérjéből enzimatis emésztés során keletkező peptidek MS/MS spektruma alapján azonosítja a szekvenciát oly módon, hogy a kísérleti adatokat összehasonlítja adatbázisokban szereplő korábbi kísérleti adatokkal.³⁹ A program úgy tekint egy LC-MS/MS tömegspektrumra, mint a fehérje tömegujjlenyomatára, és egy összehasonlítás során információt ad arról, hogy a mért ujjlenyomat mekkora valószínűséggel egyezik az adatbázisban szereplő egyes tételek ujjlenyomatával. Az azonosítás megbízhatósága a valószínűségi értékkel számolható. Ez az érték egy kísérleti és egy elméleti spektrum korrelációjának a valószínűségét adja meg, valamint azt, hogy mennyivel jobb egy peptidtalálat, mint egy véletlenszerű találat.⁴⁰

2.6.4. A mobilis proton modell

Proteomikai vizsgálat során ESI alkalmazásakor a peptideket gyakorlatilag mindig pozitív módban mérik, ugyanis általában több nagyságrenddel nagyobb jelintenzitás érhető el, mint negatív módban. Pozitív módban a peptidekből tipikusan többszörösen protonált molekulák keletkeznek. A töltés a bázikus aminosavak oldalláncán, illetve az *N*-terminálison lokalizálódik, esetleg amidkötések O-atomjain.

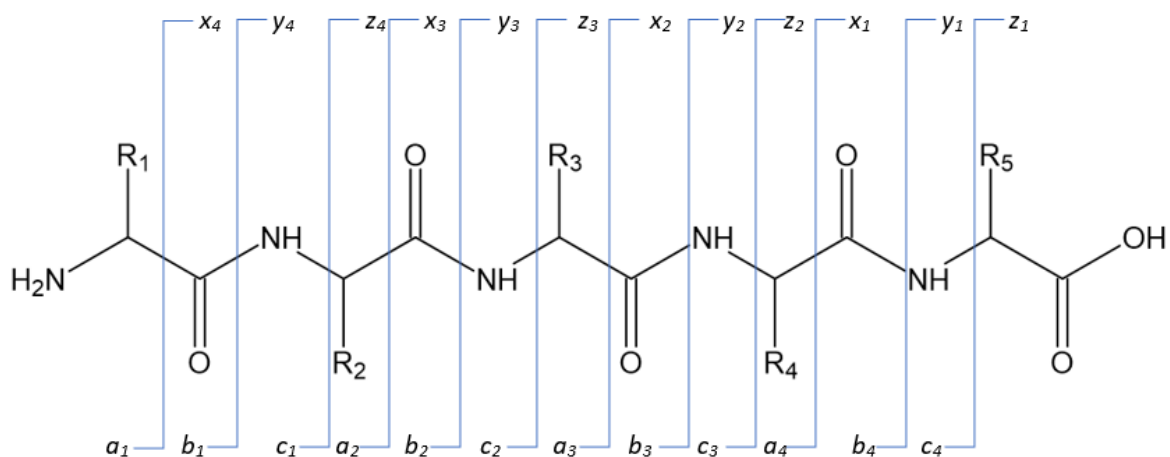
Ütközésindukált aktiválás hatására a peptid belső energiája megnő, és így megtörténhet, hogy termodinamikailag kevésbé kedvező helyekre vándorolnak az ionizáló protonok. Ilyen kedvezőtlen hely az amidkötés nitrogénje, amely a kötés gyengüléséhez, s végül felbomlásához vezet.

A fragmentáció értelmezésére szolgál az ún. mobilis proton modell⁴¹, mely szerint az amidkötések akkor tudnak leghatékonyabban és viszonylag egyenletes valószínűséggel hasadni, ha a töltést okozó proton a CID gerjesztést követően elegendően mozgékony ahhoz, hogy az amidkötések nitrogénjéhez vándorolva a fragmentációt kiváltsa. Ha a töltést okozó protont megköti egy erősen bázikus csoport, például arginin oldallánc, akkor a protonvándorláshoz nagyobb gerjesztési energia szükséges, a fragmentáció ilyenkor alternatív útvonalon mehet végbe.⁴²

A mobilis proton elmélet szerint a protonált peptidek a töltést okozó („ionizáló”) protonok és a peptiden rendelkezésre álló protonálható (bázikus) helyek aránya alapján csoportosíthatók:

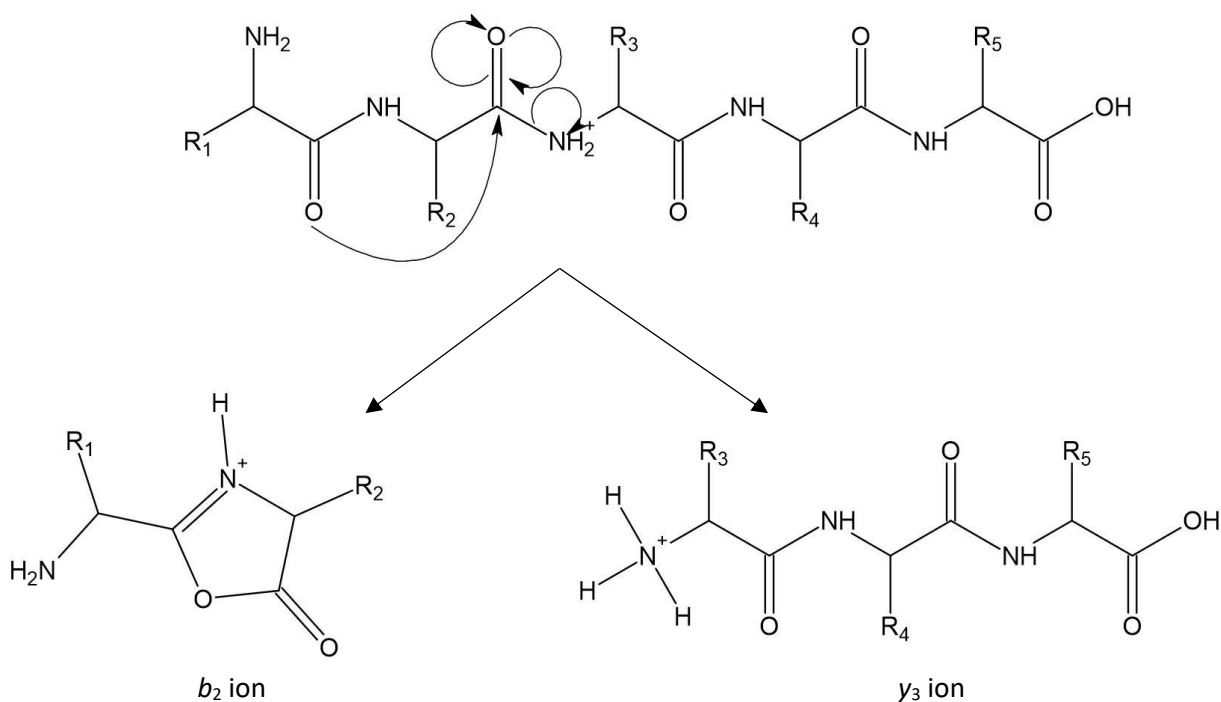
- immobilis: ha a peptidion kevesebb vagy azonos mennyiségű protont tartalmaz, mint ahány arginint
- parciálisan mobilis: ha a peptidion több protont tartalmaz, mint ahány arginint, de kevesebbet, mint a lizinek, argininek és hisztidinek száma összesen
- mobilis: ha a peptidion több protont tartalmaz, mint ahány bázikus aminosav van benne.⁴¹

A többszörösen protonált peptidprekursorok különböző gerjesztési módszerekkel nyert termékionjait a Roepstorff–Fohlman–Biemann nómenklatúra segítségével nevezzük el (7. ábra)⁴³. a_m -mel, b_m -mel és c_m -mel jelöljük azokat az ionokat, amelyek az eredeti peptid *N*-terminálisát tartalmazzák, az *m* pedig azt jelöli, hogy egy fragmens hány aminosav-maradékot tartalmaz az *N*-terminális felől számolva. Hasonlóképpen x_m -mel, y_m -mel vagy z_m -mel jelöljük a *C*-terminálist tartalmazó ionokat, és az *m* index ilyenkor azt jelöli, hogy egy fragmens hány aminosav-maradékot tartalmaz a *C*-terminális felől számolva. *a*- és *x*-ionok keletkeznek az C_α -C(=O) közti kötések hasadásakor, *b*- és *y*-ionok az amidkötés hasadásakor, *c*- és *z*-ionok pedig az N- C_α kötés hasadásakor keletkeznek (7. ábra).



7. ábra A Roepstorff-Fohlman-Biemann nómenklatúra⁴³

A bottom-up proteomikai módszerrel nyert peptideket is leggyakrabban CID segítségével fragmentálják, melynek során általában a peptidgerinc amidkötései hasadnak, így főleg *b* és *y* típusú ionok keletkeznek (8. ábra).



8. ábra Egy általános peptid $b_x - y_{N-x}$ fragmentációs útvonalának mechanizmusa⁴⁴

Ilyenkor gyakran $b_x - y_{N-x}$ ionpár keletkezik addíciós-eliminációs nukleofil szubsztitúcióval, ahol x a fragmension sorszámát, N pedig a peptidet felépítő összes aminosav számát jelöli. A reakció során ciklikus átmeneti állapot alakul ki, és végül elhasad az amidkötés.⁴⁴

A prekursor- és fragmensionok oldalláncaiból semleges molekulák is eliminálódhatnak, mint például az ammónia és a víz. Ezeket nevezzük semlegesvesztésnek.⁴³ Ammóniavesztés jellemző a Lys, Arg, Asn, Gln aminosavakat tartalmazó prekursorokra/fragmensekre, míg vízvesztés a Ser, Thr, Asp és Glu aminosavak tartalmazókra.⁴⁵

Előfordulhat, hogy a prekursorion egyszerre két helyen is elhasad, ekkor ún. belső fragmens keletkezik, amely a protonált peptid egyik terminálisát sem tartalmazza. A belső fragmensek megnehezíthetik a proteomikai vizsgálatokat, mert könnyen összetéveszthetők más belső fragmensekkel és egyéb ionokkal.⁴⁶

A *b*-ionok szén-monoxid eliminációjával a megfelelő *a*-ionokká alakulhatnak át, amelyekből további lánchasadással belső *a*-ionok keletkezhetnek.

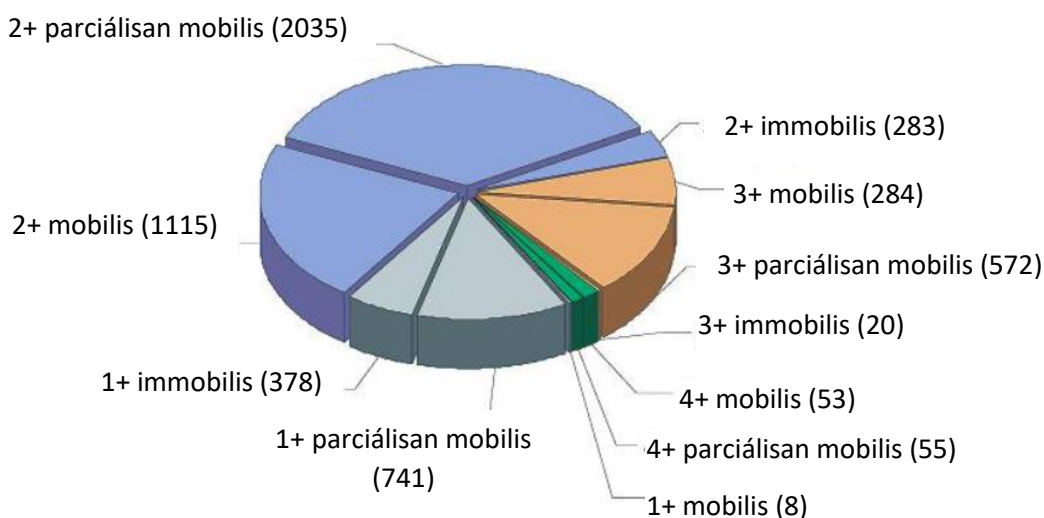
Jellegzetes fragmensek még az imíniumionok ($^+NH_2=CH-R$), melyek egy-egy aminosavra lehetnek szelektívek, így ezek gyakran fontos információt szolgáltatnak.⁴⁴

2.6.5. Peptidek kötéshasadási preferenciája

A szekvencia meghatározására olyan szoftvereket használnak, amelyek a mért adatokat szimulált adatokkal hasonlítják össze. Ezek a programok jellemzően csak a keletkező fragmensek *m/z* értékének egyezését vizsgálják, és nem veszik figyelembe azok egymáshoz viszonyított intenzitását. Utóbbiak viszont szintén szolgáltathatnak információt a felépítő aminosavak kémiai minőségére vonatkozóan.

Kapp és munkatársai egy 5500 egyedi triptikus peptidet tartalmazó adatbázis CID MS/MS fragmentációja során keletkező *b* és *y* fragmensionok egymáshoz viszonyított intenzitását vizsgálták. Az adatbázis ioncsapda (QIT) készülékkel felvett MS/MS spektrumokat tartalmazott.

A kutatócsoport az adatbázist alkotó peptideket protonmobilitás és töltöttségi fok szerint osztották csoportokba (9. ábra).



9. ábra Kapp és munkatársai által vizsgált peptidek töltés- és protonmobilitás-megoszlása⁴¹

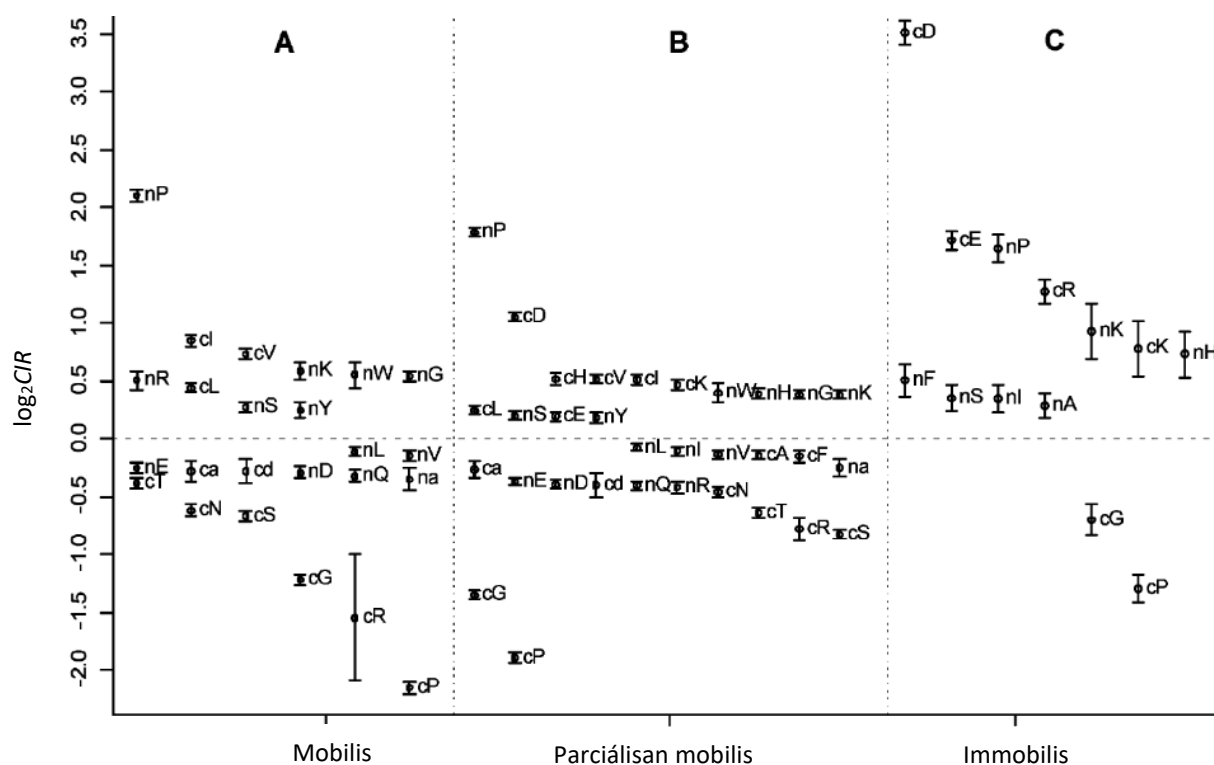
Ezt követően céljuk annak kiderítése volt, hogy mely aminosavak között kedvezményezett, ill. mely aminosavak között nem kedvezményezett a kötőhasadás. Ennek kvantitatív jellemzésére definiálták az úgynevezett hasadási intenzitásarányt (Cleavage Intensity Ratio, *CIR*). Ez a mérőszám megmutatja, hogy egy adott peptid adott amidkötésének kötőhasadási preferenciája hogyan aránylik a peptiden belüli összes kötés átlagos kötőhasadási preferenciájához. A *CIR* értékek számítási módja egy adott hasadási helyhez a következő⁴¹:

$$CIR_s = \frac{\sum_{z=1}^Z b_s^{z+} + y_s^{z+}}{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{z=1}^Z (b_i^{z+} + y_i^{z+})} \quad (1)$$

Ahol *s* a vizsgált hasadási hely, *N* a hasadási helyek száma a peptidben, *Z* a prekursor ion töltése, b^{z+} és y^{z+} pedig a *b*- és *y*-típusú ionokat jelölik, *z*-szeresen pozitív töltéssel.⁴¹ Ha a *CIR_s* értéke nagyobb, mint 1, akkor az adott kötőhasadás a peptiden belül preferáltabb, mint az átlagos kötőhasadás, ha kisebb, akkor a kötőhasadás az átlagosnál kedvezőtlenebb/gátoltabb.

Kapp és munkatársai az adott amidkötésekre kapott *CIR* értékeket átlagolták, majd azok kettes alapú logaritmusát ábrázolták protonmobilitás szerint lebontva (10. ábra). Kutatómunkájuk eredményeképpen sikerült számos, peptidek MS/MS fragmentációja során tapasztalt jelenség általános voltát statisztikai módszerekkel igazolni. Az adatokból például megállapítható, hogy a prolin *N*-terminálisán igen preferált a hasadás mobilis peptidek esetében, amely parciálisan mobilis és mobilis peptidek esetében is viszonylag jelentős marad. Jelentős még az immobilis peptidekre jellemző kedvezményezett Asp-Xaa hasadás, amely kismértékben a parciálisan mobilis peptideknél is megjelenik. Erősen kedvezőtlen például a kötőhasadás prolin és glicin *C*-terminálisán mindhárom protonmobilitási osztályon belül. Mobilis peptidek esetén megfigyelhető még, hogy az arginin *C*-terminálisán való hasadás szintén nem kedvezményezett, viszont az ábra azt mutatja, hogy ez az

eredmény nagy hibával terhelt. Ennek oka feltehetően a peptidek triptikus természetében keresendő. Ekkor csak azon peptidek esetében van lehetőség az arginin C-terminálisán való hasadásra, amelyek láncközi arginint tartalmaznak, ez pedig tripszines emésztés esetében csak hibás hasítás esetén áll fenn.



10. ábra Kapp és munkatársai által vizsgált hasítási helyekhez tartozó $\log_2CIR$ értékek⁴¹ Az ábrán az aminosav egybetűs jelölését megelőző „n” és „c” jelöli, hogy az adott aminosav N- vagy C-terminálisán történő hasadásról van-e szó. „a” jelöli a metionin-szulfoxidot, „d” pedig a piridil-etil-ciszteint.

3. Célkitűzések

A bottom-up szekvenálás során gyakran tripszines enzimatisz emésztést alkalmaznak, így a láncvégi aminosav a keletkező peptidekben túlnyomórészt arginin vagy lizin. Ez a fragmentációs folyamatokat nagymértékben befolyásolja: általában y -ion sorozatokat kapunk, mert a bázikus aminosavakat tartalmazó termékionok intenzívebb jelet adnak.⁴⁷ A keletkező peptidek általában kis-közepes méretűek (~500-2000 Da) és töltésűek (2+ vagy 3+). Ezen tulajdonságaik viszonylag könnyen azonosíthatóvá teszik a triptikus peptideket.

Ezzel szemben az új típusú ProAlanáz emésztőenzim segítségével nyert peptidek nagyobb méretűek lehetnek, mint a triptikusak, főként prolinra és alaninra végződnek, így a bázikus aminosavak láncközi pozíciókban jelennek meg. Ezen tulajdonságok jelentős mértékben befolyásolhatják a fragmentációt, és így az adatbázis alapú azonosítás hatékonyságát is, melynek vizsgálata kulcsfontosságú lehet. Ezért kutatásom során két fehérjét, az élesztő alkohol dehidrogenázt (ADH, UniProt azonosító: P00330) és a szarvasmarha szérum albumint (BSA, UniProt azonosító: P02769) terveztem enzimatisz úton emésztetni ProAlanáz enzimmal, majd a keletkező peptideken HPLC-MS/MS méréseket végezni.

A peptideket különböző ütközési energiák alkalmazása mellett terveztem fragmentálni, hogy megállapítsam, mely energián keletkezik a legtöbbféle b és y típusú fragmension. Kapp módszerét alkalmazva célul tűztem ki a peptideken belüli amidkötések hasadási preferenciájának meghatározását is, hogy felderítsem a triptikus peptidekhez képest jelentkező esetleges különbségeket, ill. az ebből eredő potenciális előnyöket-hátrányokat.

4. Kísérleti rész

4.1. Felhasznált anyagok

1. táblázat A HPLC-MS/MS mérésekhez felhasznált vegyszerek, modellfehérjék és emésztőenzim adatai

Anyag	Gyártó	Tisztaság
Acetonitril	Sigma-Aldrich	LC-MS
Élesztő alkohol dehidrogenáz (ADH)	Sigma-Aldrich	≥98%
Hangyasav	Sigma-Aldrich	LC-MS
ProAlanáz	Promega	MS
Sósav	Sigma-Aldrich	Reagens
Szarvasmarha szérum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	≥98%
Víz	Sigma-Aldrich	LC-MS

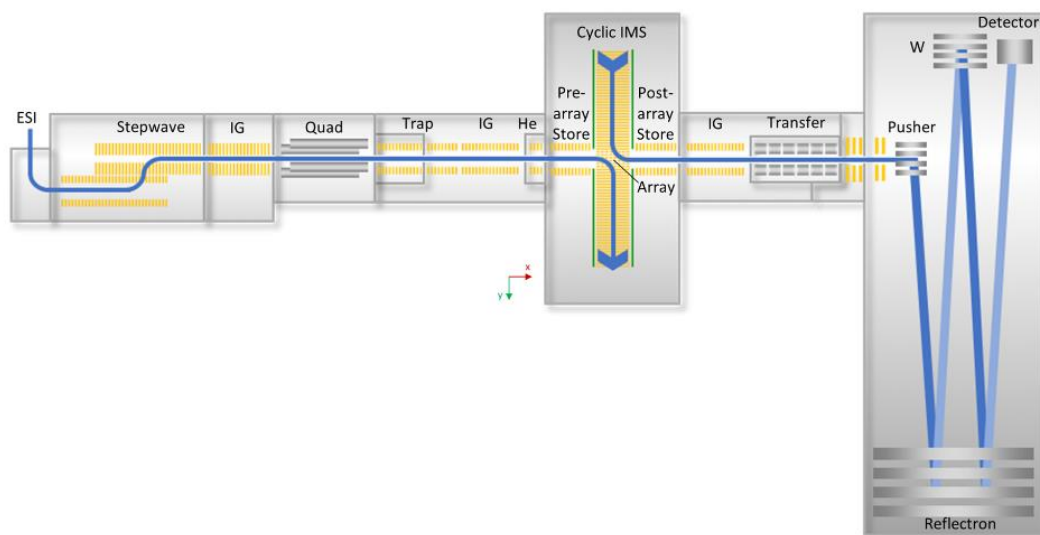
4.2. Mintaelőkészítés és enzimatis emésztés

Az élesztő alkohol dehidrogenázból (ADH) és a szarvasmarha szérum albuminból (BSA) 2,00 ill. 3,76 µg/µL (teljes anyagmennyiség: kb. 3-3 nmol) koncentrációjú vizes oldatokat készítettem 50 – 50 µL végtérfogatban biztonsági záras Eppendorf-csövekben. A diszulfidhidak redukálása céljából a fehérjeoldatokhoz 5,5 µL 0,1 M koncentrációjú ditiotreitolt (DTT) adtam (DTT végkoncentráció: 10 mM), majd 30 percen keresztül 37 °C-on inkubáltam az oldatokat fűthető keverő (Thermomixer) segítségével 300 rpm keverés mellett. A fehérjék szulfhidrilcsoportjainak alkilezéséhez (karbamidometilezés) 6,17 µL 0,15 M jóacetamidot (IAA) adtam az oldatokhoz (IAA végkoncentráció: 55 mM), majd 30 percen keresztül sötétben, 25 °C-on inkubáltam az oldatokat.

A ProAlanáz enzim 4 µL térfogatú, 0,2 µg/µL koncentrációjú vizes törzsoldatához 50 µL 0,1 M koncentrációjú sósavat adtam, majd az oldat teljes térfogatát a mintához adtam. Az elegyet 37 °C-on egész éjszakán át inkubáltam 300 rpm-es rázatás mellett. Az enzimatis reakciót másnap 10 percig tartó 90 °C-os melegítés segítségével állítottam le, majd a reakcióelegyet 3 pmol/µL koncentrációra hígítottam.

4.3. HPLC-MS(/MS) mérések

A peptidek tájékozódó tömegspektrometriás és célzott tandem tömegspektrometriás vizsgálatához egy hibrid QTOF készüléket használtam (Waters SELECT SERIES Cyclic IMS, Waters Corporation, Milford, UK, 11. ábra), amelyhez online kapcsoltam HPLC-t.



11. ábra A Waters SELECT SERIES Cyclic IMS sematikus rajza (IG és Stepwave: iontovábbító, Quad: kvadrupól, Trap és Transfer: ütközőcellák, Cyclic IMS: ciklikus ionmobilitás elválasztástechnika, Pusher: akcelerátor, Reflectron: iontükör)²⁵

A folyadékkromatográfiás elválasztáshoz 0,1% hangyasavat tartalmazó vizet (A eluens), ill. 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitrilt használtam. Az elválasztáshoz gradiens elúciót alkalmaztam (2. táblázat).

A spektrumok kiértékeléséhez, illetve a számítógépes emésztéshez az mMass szoftvert használtam (verzió: 5.5.0), melynek segítségével könnyen és gyorsan ki lehet értékelni a peptidek tömegspektrumait, illetve képes *in silico* emésztést is végrehajtani.⁴⁸

2. táblázat A HPLC-MS/MS futások során használt gradienstáblázat

Idő / perc	Áramlási sebesség / (mL * perc ⁻¹)	A %	B %
0,0	0,300	95,0	5,0
1,0		95,0	5,0
15,0		40,0	60,0
15,5		5,0	95,0
17,0		5,0	95,0
17,1		95,0	5,0
20,0		95,0	5,0

A HPLC-MS/MS vizsgálatokhoz egy fordított fázisú ACQUITY PREMIER CSH C18 1.7 µm, 2,1 x 150 mm típusú kromatográfiás oszlopot használtam, melyet a mérés során 60 °C-on termosztáltam.

A QTOF-készülék mérés során alkalmazott ionforrás-paramétereit a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat A Waters SELECT SERIES Cyclic IMS ionforrásának beállításai a HPLC-MS/MS mérések során

Ionizáció fajtája	ESI
Polaritás	Pozitív
Porlasztógáz nyomása / bar	6,0
Deszolvatációs gáz áramlási sebessége / (L * h ⁻¹)	800
Deszolvatációs gáz hőmérséklete / °C	400
Ionforrás hőmérséklete / °C	120
Kapillárisfeszültség / kV	2,80
Leucin enkafoalin belső standard koncentrációja / pg * µL ⁻¹	50

Az MS/MS mérések paramétereit a 4. táblázat tartalmazza.

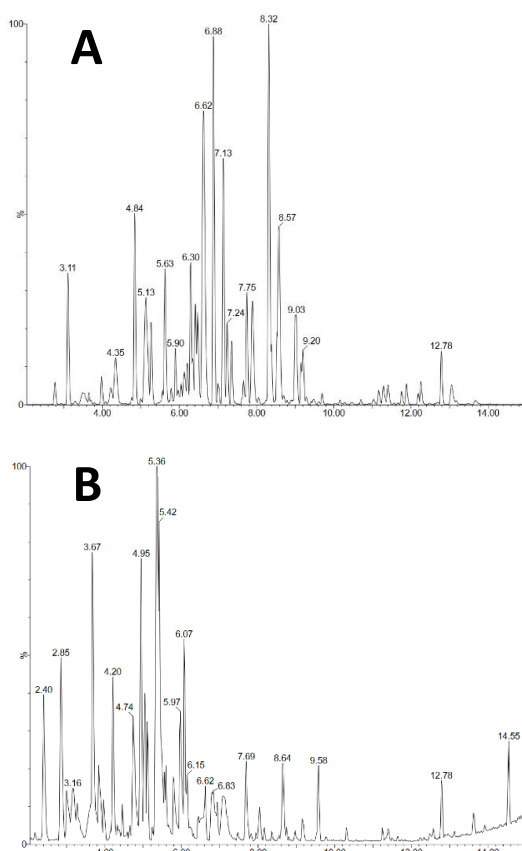
4. táblázat A tandem tömegspektrometriás energiafüggő vizsgálatok paramétereit

Fragmentáció helye	Transfer ütközési cella
Ütközési energia tartománya / V	15-60
Ütközési energia lépésköze / V	5
Ütközőgáz fajtája	Nitrogén

5. Eredmények

A kutatásom során két modell fehérje, az élesztő alkohol dehidrogenáz (ADH) és a szarvasmarha szérum albumin (BSA) enzimatiskus emésztését végeztem ProAlanáz enzimmal.

A kísérletsorozat első részében tájékozódó LC-MS méréseket készítettem az ADH- és BSA-emésztményekről (12. ábra). A fehérjéken *in silico* emésztést (UniProt azonosítók: ADH: P00330, BSA: P02769) végeztem az mMass szoftver segítségével, majd az LC-MS kromatogramok kromatográfias csúcsait összevetettem az *in silico* emésztés által kapott peptidlistával. A kísérletsorozat második részében csak azokról a prekursorokról vettem fel célzott LC-MS/MS spektrumokat (SIC-MS/MS), amelyek esetében a spektrális intenzitás elérte a 10^5 beütésszámú abszolút intenzitást, és a spektrális csúcs környezetében nem volt egyéb zavaró háttér- vagy más peptidhez tartozó csúcs. A kromatográfias csúcsok alapvonalon való elválasztása tehát nem volt kritérium. Az LC-MS/MS spektrumokat 15-60 V között 5 V-onként vettem fel a műszer Transfer ütközési cellájában. Az így kapott MS/MS spektrumok közül azokat értékeltem ki, amelyekben a legtöbbféle, 5 ppm-es hibahatáron belül azonosítható *b*- és *y*-iont találtam az mMass szoftver segítségével. A sikeresen azonosított peptidok listáját és a hozzá tartozó optimális ütközésienergia-értékeket az 5. táblázat foglalja össze.



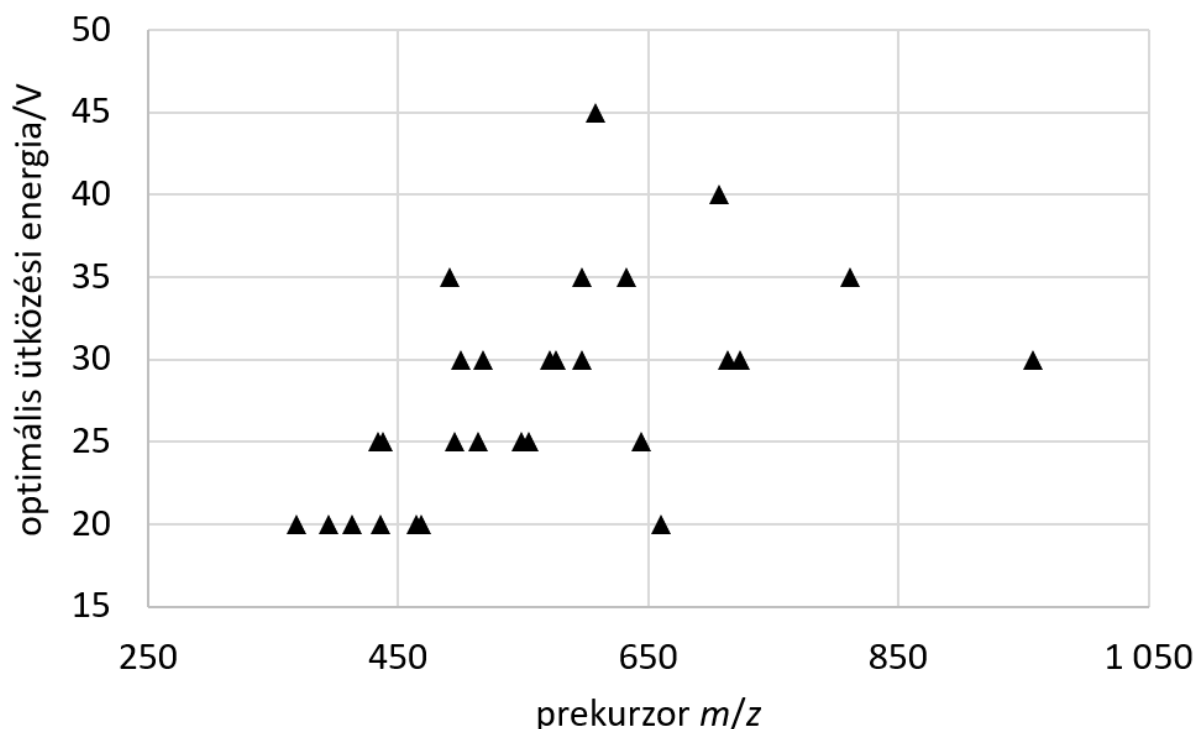
12. ábra Az ADH (A) és a BSA fehérje (B) ProAlanázzal történő emésztményének báziscsúcs-kromatogramja

5. táblázat Az ADH és a BSA fehérjék ProAlanázzal történő emésztéséből azonosított, MS/MS-mérésre kiválasztott peptidek listája és adatai. A C' a karbamidometilezett ciszteint jelöli.

ADH-peptidek szekvenciája	Töltés	Ütközési energia / V	Mért monoizotópos m/z érték	Számolt monoizotópos m/z érték
DVFNQVVKISIVGSYVGNRADTREA	4	40	706,8718	706,8702
EVFIDFTKEKDIVGA	3	30	570,9716	570,9698
GIKWLNG	2	20	394,2283	394,2267
GIKWLNKS	2	25	437,7445	437,7427
GITVYKALKSA	2	30	575,8467	575,8452
GVC'HTDLHAWHGDWP	3	35	596,5977	596,5951
KANELINVKYS	3	20	464,6037	464,6013
KANELINVKYSGVC'HTDLHAWHGDWP	5	35	632,9158	632,9143
LDFFARG	2	20	413,2176	413,2163
LVKSPIKVVLSTLP	3	30	517,6699	517,6675
MGYRVLGIDGGEGKEELFRS	4	25	554,0316	554,0309
NELINVKYS	2	30	596,8334	596,8322
NGTTVLVGMP	2	25	494,7620	494,7602
NLMAGHWVA	2	30	499,7490	499,7475
STRYVRANGTTVLVGMP	3	45	607,9948	607,9928
TVYKALKSA	2	35	490,7942	490,7924
VQAAHIP	2	20	368,2120	368,2110
BSA-peptidek szekvenciája	Töltés	Ütközési energia / V	Mért monoizotópos m/z érték	Számolt monoizotópos m/z érték
C'TEDYLSLILNRLC'VLHEKTP	4	25	644,3323	644,3318
DEKKFWGKYLEIARRHP	5	20	468,0526	468,0518
DETYVP	1	30	723,3199	723,3196
DPNTLC'DEKADEKKFWGKYLEIA	6	25	514,2510	514,2512
EDKDVC'KNYQEAQDAFLGSFLYEYSRRHP	5	30	713,9423	713,9419
ELLYYANKYNGVFQEC'C'QAEDKGA	3	30	957,4317	957,4302
LTADFAEDKDVC'KNYQEAQDA	3	35	811,0417	811,0409
TLVEVSRLGKVGTRC'CTKP	4	25	548,5477	548,5476
VSEKVTKC'C'TESLVNRRP	5	25	433,4265	433,4260
VSVLLRLA	2	20	435,7927	435,7922
YFYAP	1	20	660,3031	660,3028

A két fehérjeemésztményből összesen 28 egyedi peptidet (17-et az ADH-fehérjéből és 11-et a BSA-fehérjéből) sikerült azonosítani és elemezni. A peptidek átlagosan 15 aminosavból épültek fel, átlagos töltöttségi fokuk 3 volt. Megfigyelhető az is, hogy az egész éjszakás emésztés eredményeképpen az enzim specificitása csökkent, és C-terminálisán szerint, ill. glicint tartalmazó peptidek is keletkeztek. Az optimális ütközésienergia-értékek meghatározására az F1 és F2 táblázat adatai szolgáltak. Az optimális ütközésienergia-értékek >79%-a 20-30 V, >93%-a 20-35 V közé estek,

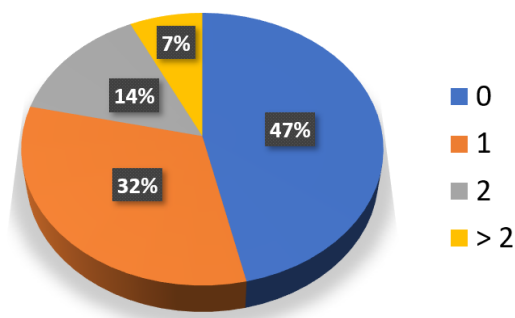
20-45 V-os energiával pedig a teljes szett lefedhető (13. ábra). Utóbbi tartomány gyakorlatilag megegyezik a készülégyártó által triptikus peptidek azonosítására használt lépcsőzetes (ramped) ütközési energia-intervallummal (19-45 V).^{49,50}



13. ábra Az ADH és BSA-emésztményből származó peptidek optimális ütközésienergia-értékei a prekursor m/z függvényében

Az egyes peptidekhez tartozó optimális ütközésienergia-értékeken felvett MS/MS-spektrumokat vettem alapul a CIR és $\log_2 CIR$ értékek kiszámításához, melyhez saját készítésű Python nyelven írt programokat használtam, és az eredményeket grafikusán ábrázoltam (F1-F25. ábra). A $\log_2 CIR$ értékek kiszámítását az (1) egyenlet alapján végeztem, és az MS/MS spektrumokon a monoizotópos csúcsokhoz tartozó intenzitásértékeket vettem figyelembe.

A $\log_2 CIR$ vs. aminosavkapcsolat ábrákon $-\infty$ szimbólummal jelöltem a $CIR=0$ érték miatt matematikailag értelmezhetetlenné vált $\log_2 CIR$ -értékeket. Ezek azok a pozíciók, amelyeknél az amidkötés nem hasadt el, hasadásra utaló b és y -fragmensionok nem keletkeztek. Mivel ezek az azonosítást negatívan befolyásolják, így mind a 28 db vizsgált peptid esetén kigyűjtöttem a nem hasadt amidkötések számát, és ezek megoszlását kördiagramon ábrázoltam (14. ábra).



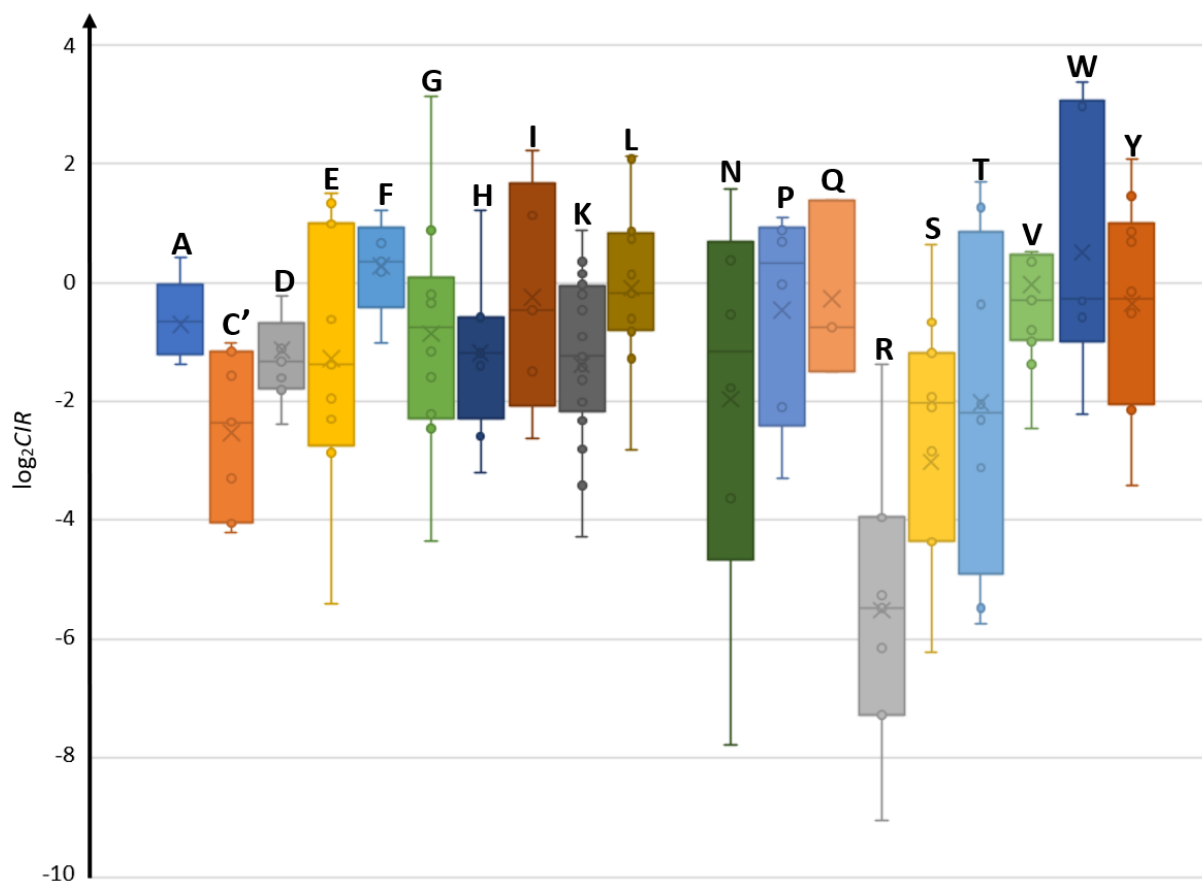
14. ábra Peptidek nem hasadt amidkötéseinek száma és azok százalékos aránya

A 14. ábra adatai alapján a peptidek kb. fele (47%) minden amidkötésnél elhasadt az optimális ütközésienergia-értéken fragmentálva, közel egyharmaduk (32%) esetében egyetlen amidkötés nem hasadt el, kb. egyötödük (21%) pedig 2 vagy annál több helyen nem sikerült amidkötésnek megfelelő *b-y* szekvenciafragmenseket detektálni.

Külön érdemes kiemelni két peptidet, az egyik (szekvencia: DVFNQVVKISIVGSYVGNRADTREA) 5, a másik (szekvencia: DPNTLC'DEFADEKKFWGKYLEIA) 18 helyen nem mutatott egyáltalán amidkötés-hasadást.

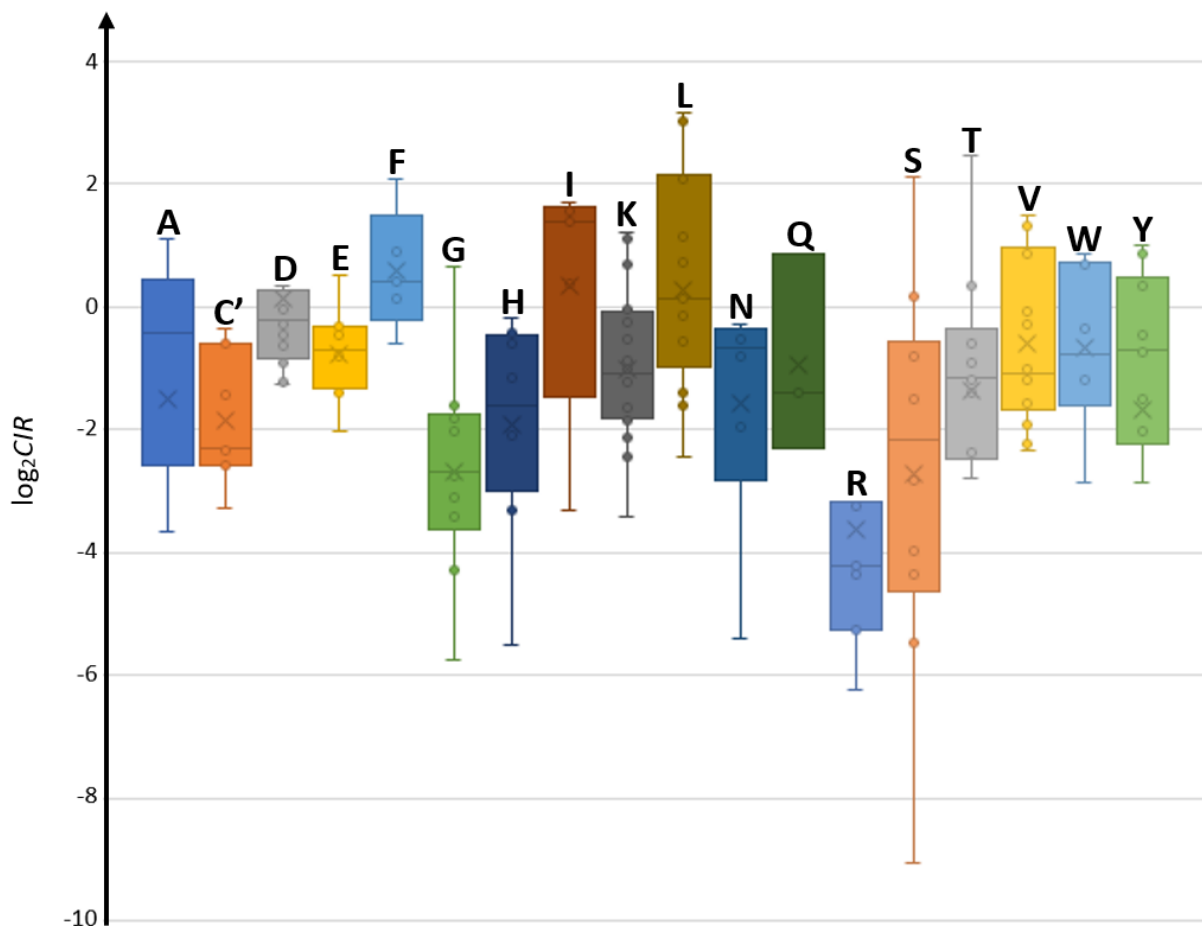
A Kapp és munkatársai által a 10. ábrán bemutatotthoz hasonló módon az egyes aminosavak *N*- és *C*-terminálisán való kötés-hasadási preferenciáit ábrázoltam a peptidek protonmobilitása alapján csoportosítva (15 – 18. ábra). Mivel a $\log_2 CIR$ érték akkor 0, ha $CIR=1$, ezért az $y=0$ vonal jelöli az átlagos kötés-hasadási preferenciát. Tehát minden $\log_2 CIR > 0$ érték esetében az átlagoshoz képest kedvezményezett, és minden $\log_2 CIR < 0$ érték esetében az átlagoshoz képest gátolt amidkötés-hasadásról beszélünk. A relatíve alacsony mintaszám, ill. a peptidek nagy heterogenitása miatt a mért értékek nagy hibával terheltek és sok esetben kiugró adatokat is tartalmaznak, ezért a medián értékeket vizsgáltam (a medián értékeket a dobozdiagramban található vízszintes vonalak jelölik).

Parciálisan mobilis szekvenciák esetén az eredményeim azt mutatták, hogy a kötés-hasadás az aminosavak *N*- terminálisánál (15. ábra) az esetek többségében nem volt kedvezményezett. Ebben az esetben is kiugróan gátolt az argininek *N*-terminálisának („nR”) hasadása, mely nem ennyire markáns a triptikus peptidek esetében (10. ábra, B panel). A két csoport között hasonló hasadási preferenciát csak az „nL”, az „nI”, az „nE”, az „nD” és az „nV” mutatott. Az „nP” hasadása triptikus peptidek esetén nagy mértékben kedvezményezett ($\log_2 CIR$ kb. 2,1), míg ProAlanázzal emésztett peptidek esetén ennek értéke kb. 0,1-nek adódott. Hasonló tendenciát mutatott az „nG”, az „nH”, az „nW” és az „nK” hasadása, mely triptikus peptideknél kedvezményezett, ProAlanázzal emésztett peptideknél viszont nem.



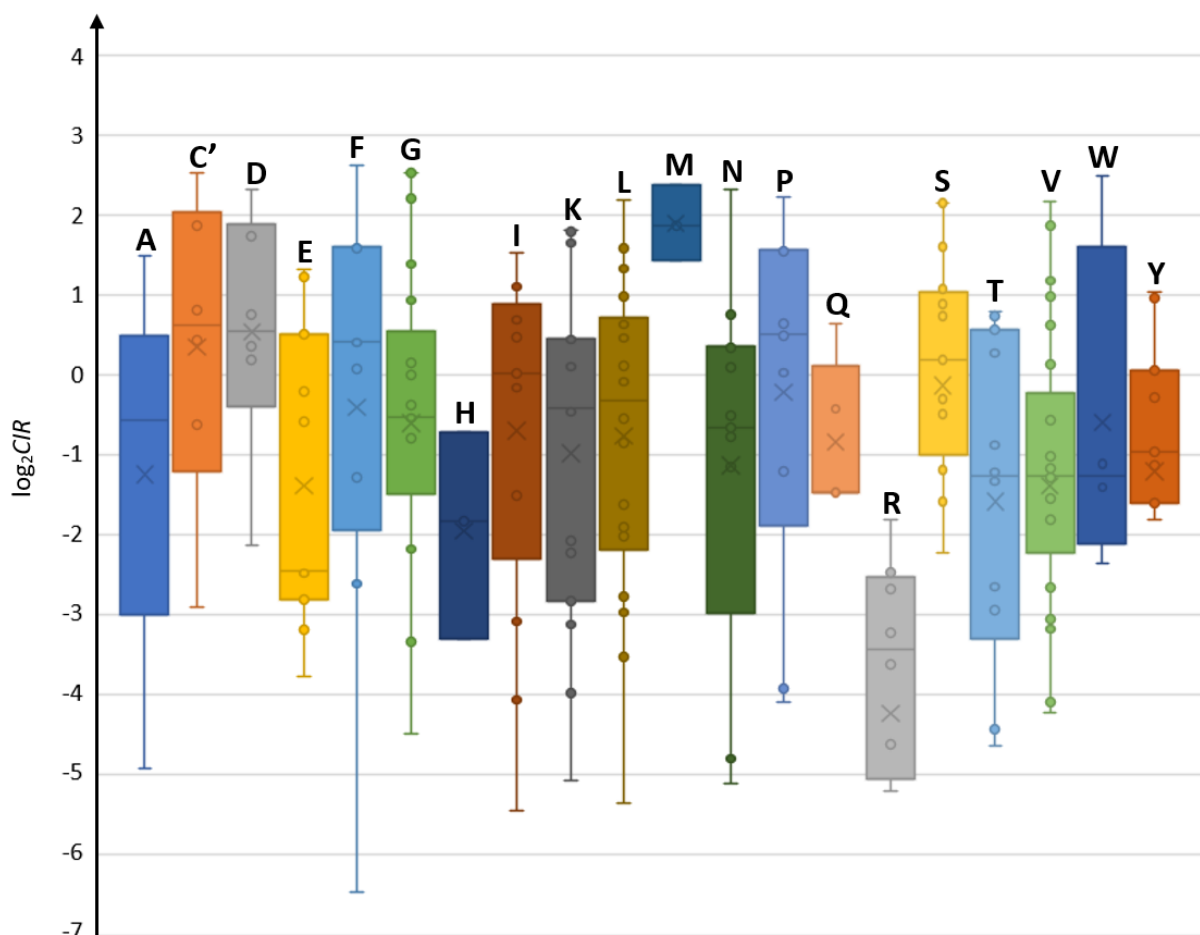
15. ábra Az adott aminosavak N-terminálisán való kötőhasadás preferenciája ($\log_2CIR$) parciálisan protonmobilis peptidszekvenciák esetében. A C' a karbamidometilezett ciszteint jelöli.

Parciálisan mobilis szekvenciák esetén eredményeim azt mutatták, hogy az aminosavak többségének C-terminálisán a kötőhasadás gátolt (16. ábra), különösen az Arg esetében ($\log_2CIR < -4$). Triptikus peptidek esetén ez az érték kb. -1 (10. ábra, B panel, „cR”). A „cL” és „cI” a ProAlanázzal emésztett peptidekre is enyhén pozitív $\log_2CIR$ -értéket adott. A „cG”, „cS”, „cT”, „cN”, „cA”, hasadás mind a tripszinnel emésztett irodalmi, mind a ProAlanázzal emésztett saját mérésből származó peptidekre nézve negatív. A „cF” a ProAlanázzal emésztett peptidekre enyhén pozitív értéket adott, míg a triptikus peptidekre ez enyhén negatív. A „cH” és „cK” és „cV” kötőhasadást viszonylag gátoltnak találtam, míg triptikus peptidek esetében ennek az ellenkezője volt megfigyelhető az irodalmi adatok szerint.



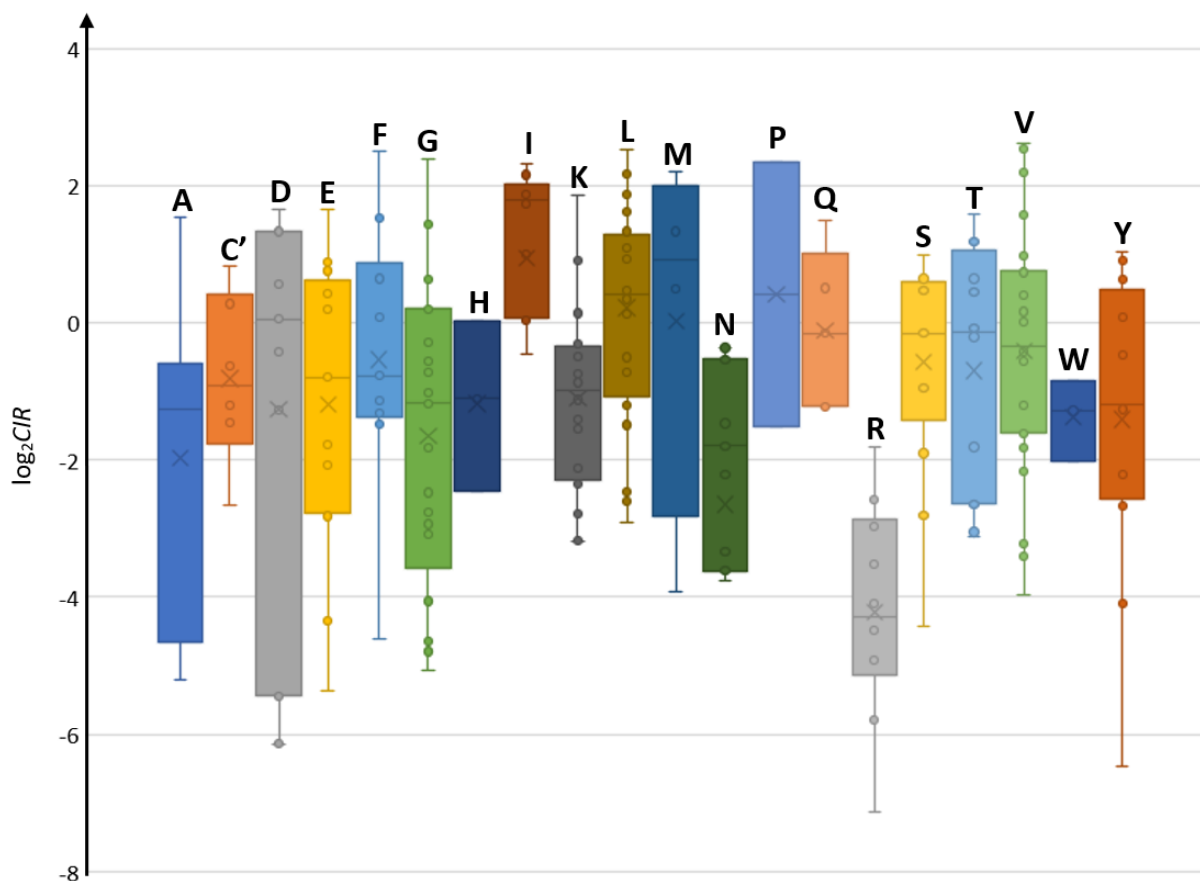
16. ábra Az adott aminosavak C-terminálisán való kötőhasadás preferenciája ($\log_2CIR$) parciálisan protonmobilis peptidszekvenciák esetében. A C' a karbamidometilezett ciszteint jelöli.

Mobilis szekvenciák esetén a kötőhasadás az aminosavak N- terminálisánál (17. ábra) az esetek többségében szintén nem kedvezményezett. ProAlanázzal emésztett peptidek esetén a legkevésbé az „nR” hasadása volt kedvezményezett ($\log_2CIR \sim -3,5$), míg triptikus peptideknél ennek $\log_2CIR$ -értéke kb. 0,5-nek adódott (10. ábra, A panel). Utóbbiaknál az „nP” hasadása volt a leginkább preferált ($\log_2CIR \sim 2,2$), ProAlanáz emésztményből származó peptideknél viszont ez az érték kb. 0,5-nek adódott. Kiemelkedő hasadási preferenciát figyeltem meg a Met N-terminálisánál. Az „nG”, „nY”, „nW”, „nS” hasadás triptikus peptideknél enyhén kedvezményezett volt ($\log_2CIR \sim 0,25 - 0,5$), míg ProAlanázzal emésztett peptideknél az „nS” kivételével (mely kb. 0,1 értéket adott) mindegyik $\log_2CIR$ érték negatívnak adódott.



17. ábra Az adott aminosavak N-terminálisán való kötéshasadás preferenciája ($\log_2CIR$) protonmobilis peptidszekvenciák esetében. A C' a karbamidometilezett ciszteint jelöli.

Mobilis szekvenciák esetén az eredményeim azt mutatták, hogy a kötéshasadás az aminosavak C- terminálisánál (18. ábra) az esetek többségében szintén gátolt, a „cR” $\log_2CIR$ -értéke ebben az esetben is kiugróan alacsony ($CIR < -4$). Ez utóbbi jelenség megfigyelhető triptikus peptidek vizsgálata során is, különösen az Arg esetében, ahol a legnagyobb a hibahatár (10. ábra, A panel). A legmagasabb $\log_2CIR$ -érték mindkét eredetű peptidcsoportnál a „cI” kötéshasadásnál figyelhető meg, azonban ez ProAlanáz emésztés esetében kb. 1,8-nak adódott, míg triptikus peptideknél kb. 0,75-nek. A „cI” kötéshasadás mind triptikus, mind ProAlanáz emésztményből származó peptidek esetében hasonlóan kedvezményezett, a „cV” hasadás az ábra adatai alapján viszont csak triptikus peptidek esetén tűnik preferáltnak. ProAlanáz emésztésből származó peptidek esetén látványos eltérést mutat a „cP” $\log_2CIR$ -értéke a triptikus peptidekhez képest, mely előbbi esetben kb. 0,5-nek, utóbbi esetben kb. -2,5-nek adódott.

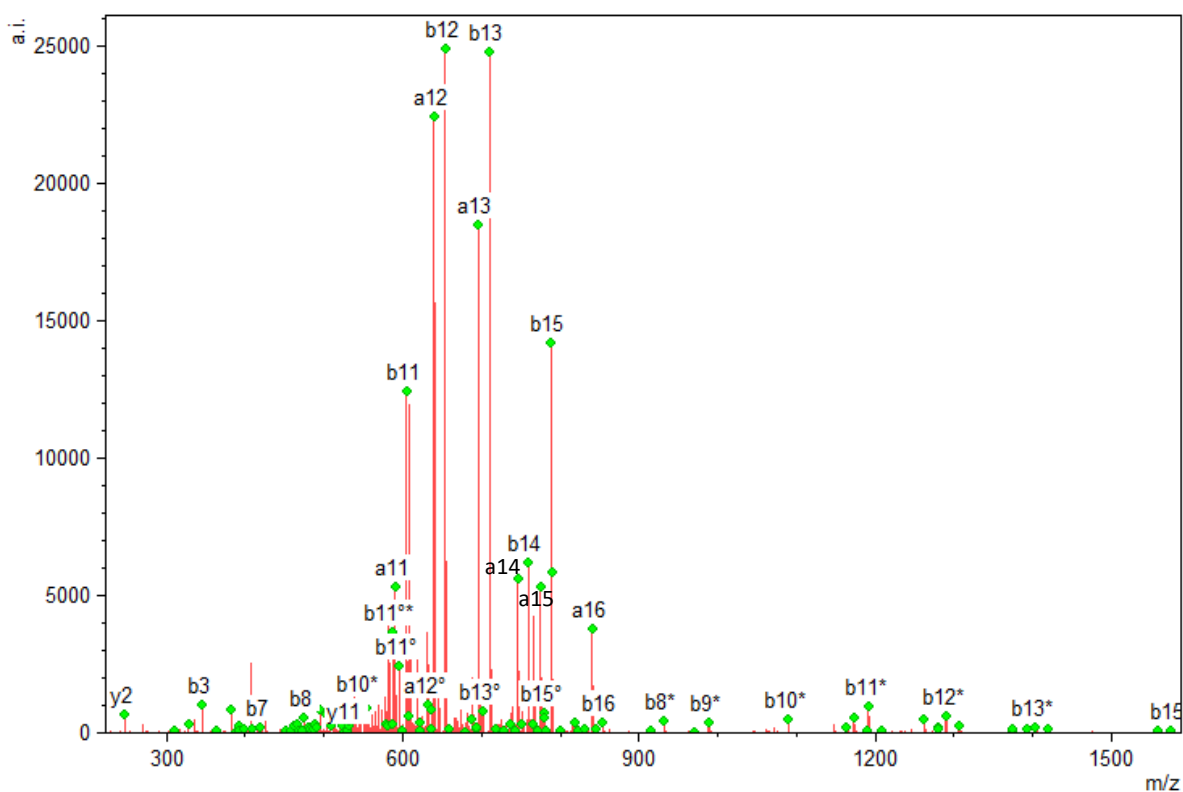
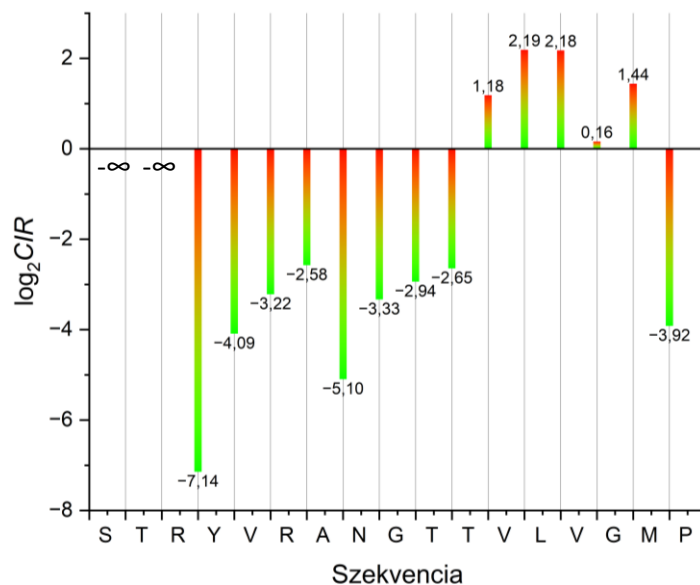


18. ábra Az adott aminosavak C-terminálisán való kötőhasadás preferenciája ($\log_2 CIR$) protonmobilis peptidszekvenciák esetében. A C' a karbamidometilezett ciszteint jelöli.

Az általam részletesen elemzett 28 peptid között nem volt a mobilis proton elmélet szempontjából immobilisnak tekinthető szekvencia, ezért ilyen típusú adatok sajnos még nem állnak rendelkezésemre. Az argininek és lizinek fehérjén belüli viszonylag nagy gyakoriságát alapul véve az immobilis peptidok ProAlanázzal történő enzimatis emésztés során vélhetőleg igen ritkák.⁴¹

Az alábbiakban néhány konkrét peptid példáján szeretném bemutatni a kötőhasadási preferenciák szekvencián belüli alakulását. Ennek érzékeltetésére a $\log_2 CIR$ -értékeket ábrázoltam a szekvenciát felépítő aminosavak közötti amidkötések függvényében (19-21. ábra), ill. a további peptidok esetében: Függelék F1-F25.

A STRYVRANGTTVLVGMP szekvenciájú háromszorosan protonált, mobilis peptid $\log_2 CIR$ értékeit vizsgálva (19. ábra) megfigyelhető, hogy legintenzívebb a kötőhasadás a Val-Leu és a Leu-Val között, amely a triptikus peptidokra is jellemző (10. ábra, A panel).



19. ábra A STRYVRANGTTVLVGM szekvenciájú, háromszorosan protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 45 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó $\log_2CIR$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.

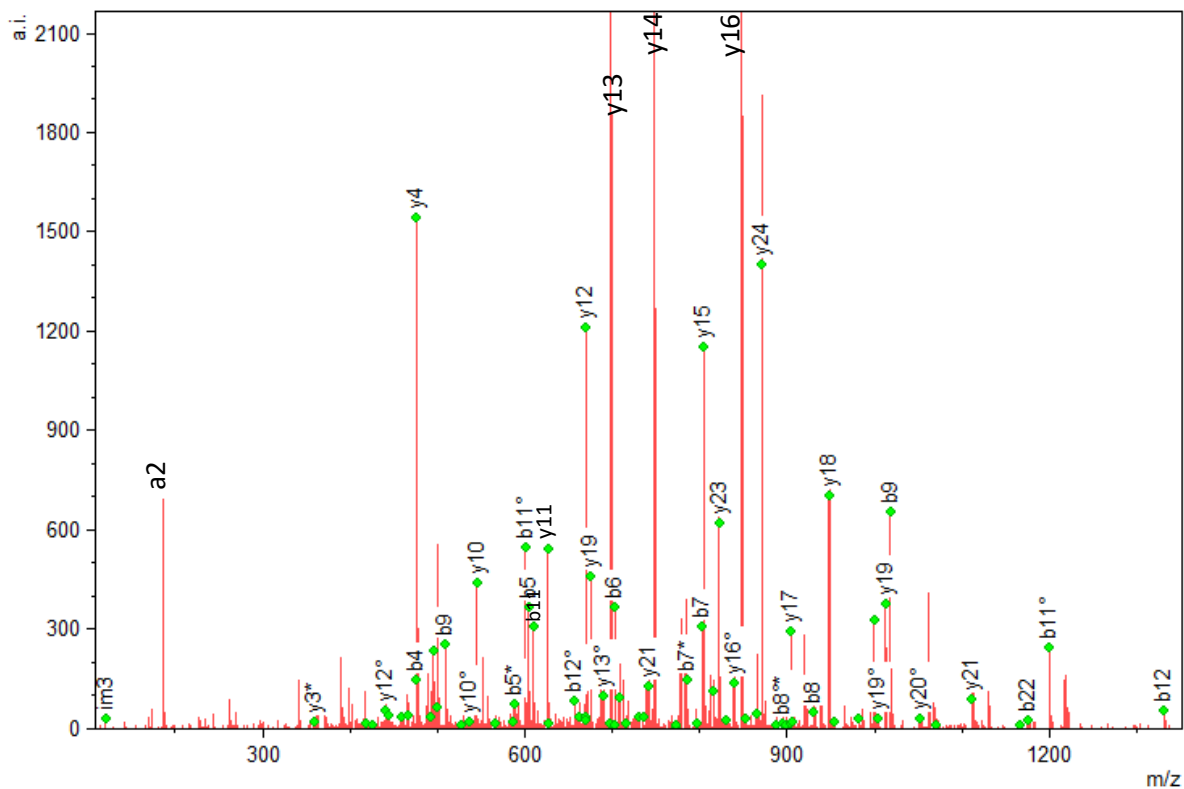
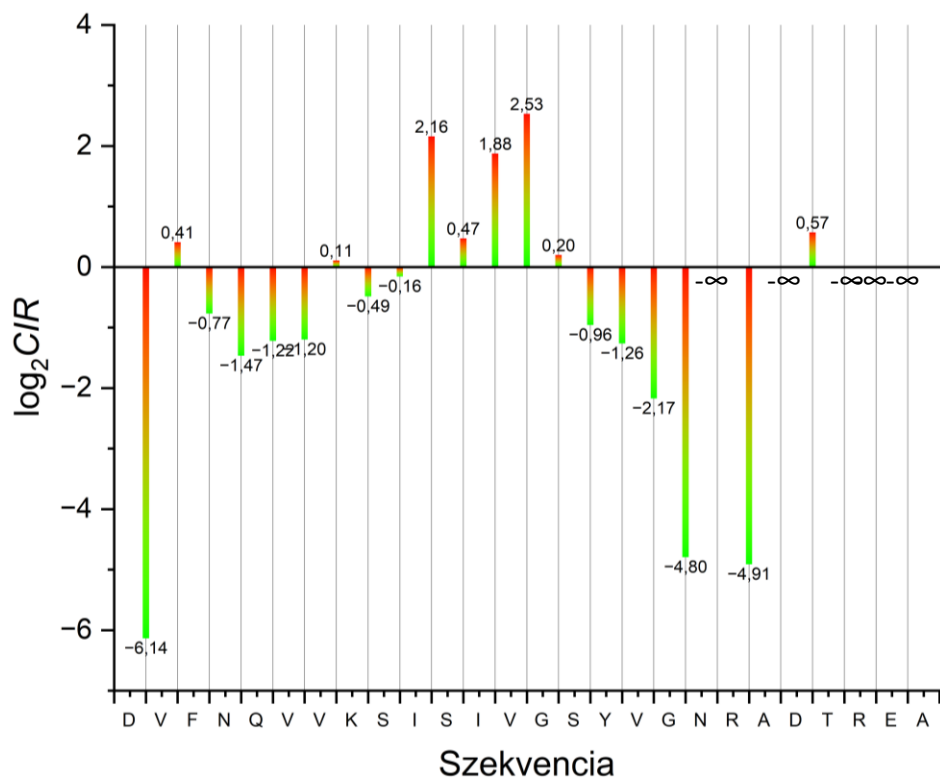
Egyáltalán nem volt tapasztalható hasadás a Ser-Thr és a Thr-Arg között, amely egyfelől összhangban van a triptikus peptidok Ser és Thr C-terminálisán való gátolt kötéshasadásával, viszont ellentétes az arginin N-terminálisán megfigyelt megnövekedett kötéshasadási preferenciával. A prolin N-terminálisán való hasadást ebben az esetben erősen gátoltnak tapasztaltam a triptikus peptidok

tapasztaltakkal ellentétben. A Gly-Met amidkötés szintén kedvezően hasadt, amely szintén ellentétes a triptikus peptidek viselkedésével. A spektrumban az α - és b -ionok intenzitása dominál, ugyanis a szekvencia N -terminális felőli végéhez közel helyezkednek el erősen bázikus aminosavak.

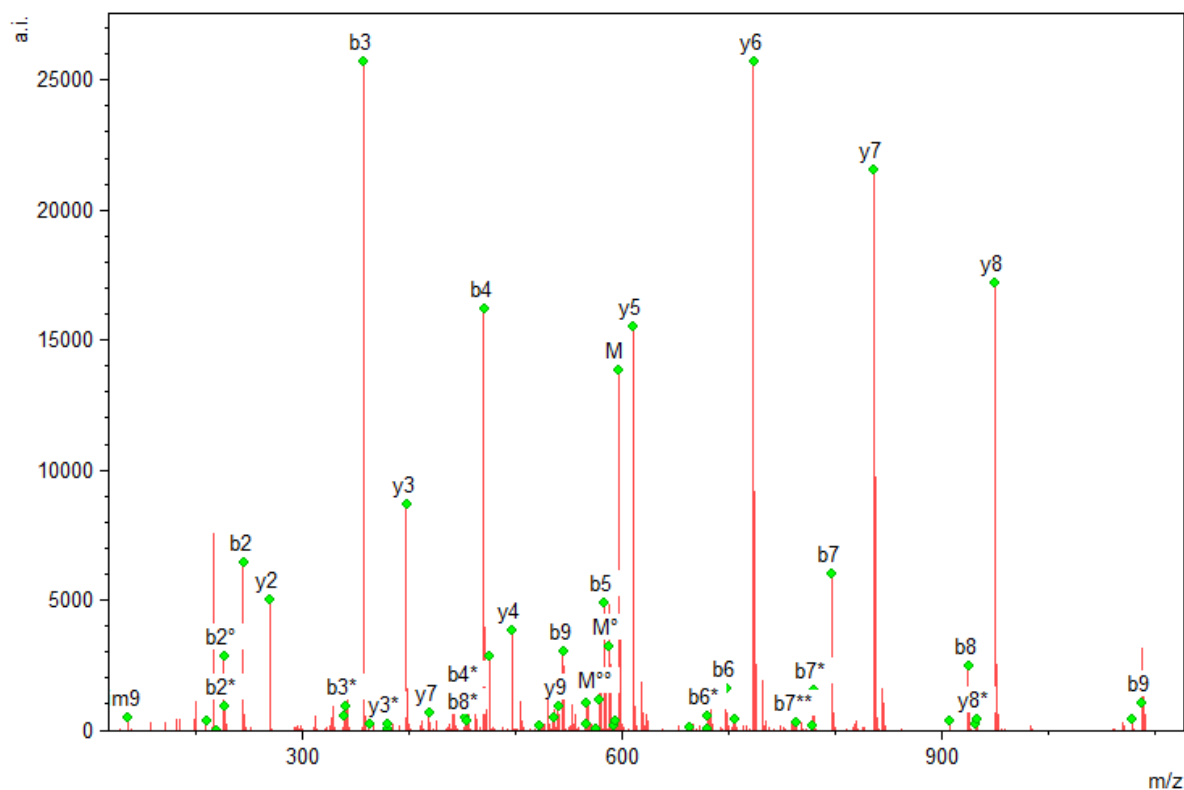
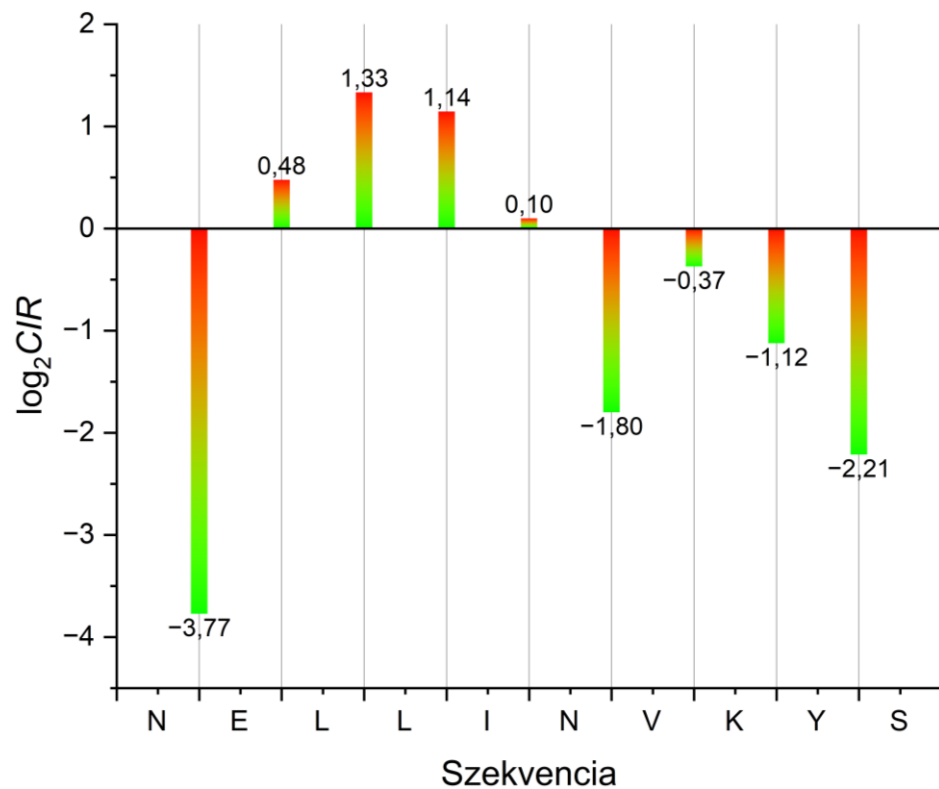
A DVFNQVVKISIVGSYVGNRADTREA szekvenciájú négyszeresen protonált, mobilis peptid $\log_2CIR$ értékeit vizsgálva (20. ábra) erős hasadási preferenciát figyeltem meg a Val-Gly, valamint az Ile-Ser és Ile-Val amidkötések esetében, amely jellemző a triptikus peptidek esetében is.

Egyáltalán nem keletkeztek az Asn-Arg, Ala-Asp, Thr-Arg, Arg-Glu és Glu-Ala amidkötések hasadásának megfelelő b - és y -ionok. Triptikus peptidek mobilis szekvenciáira $\log_2CIR > 0$ „nR” hasadásakor, és $\log_2CIR < 0$ „cN”, „nD”, „cT”, „nE” hasadásakor (10. ábra, A panel), amely utóbbiak csak részben magyaráznák az extrém gátolt kötés-hasadást. Úgy tűnik tehát, hogy a ProAlanázzal emésztett peptidek esetén az arginin N - és C -terminálisán egyaránt gátolt a kötés-hasadás, és hatással lehet a távolabbi kötések hasadásának preferenciájára is. A spektrumban az y -ionok intenzitása dominál a két arginin láncvégi helyzete miatt.

A NELLINVKYS szekvenciájú kétszeresen protonált, mobilis peptid $\log_2CIR$ értékeit vizsgálva (21. ábra) a legintenzívebb kötés-hasadásokat a Leu-Leu és Leu-Ile között figyeltem meg, mely összhangban van a triptikus peptidekkel kapcsolatos tapasztalatokkal. Az Asp-Glu, a Tyr-Ser kötések és az Asn-Val amidkötések hasadása bizonyult viszont leginkább nem preferáltnak. Triptikus peptideknél az Xaa-Glu, az Xaa-Val és az Asn-Xaa hasadás szintén nem kedvezményezett, viszont az Xaa-Ser hasadása preferált. Így az Asn-Val és az Asp-Glu gátolt kötés-hasadás a triptikus peptidek tulajdonságai alapján is jól értelmezhető. A spektrumban az y -ionok intenzitása dominál, ugyanis a bázikus aminosavak a szekvencia C -terminális felőli végéhez közel helyezkednek el.



20. ábra A DVFNQVVKISIVGSGSYVGNRADTREA szekvenciájú, négyszeresen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 40 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseéhez tartozó log₂CIR értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



21. ábra A NELLIVKYS szekvenciájú, kétszeresen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 30 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseéhez tartozó $\log_2 C/R$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.

6. Következtetések

Mind az arginin, mind pedig a prolin jelenléte és szekvencián belüli pozíciója igen jelentős befolyással bír az ütközés-indukált disszociációs folyamatokra,⁵¹ így különösen hasznos lehet egy újszerű, és nagy érdeklődésre számot tartó emésztőenzim, a ProAlanáz fragmentációs hatékonyságot befolyásoló hatásának vizsgálata.

Kutatásom során ezért ProAlanázzal emésztett fehérjékből keletkező peptidek fragmentációs tulajdonságait vizsgáltam HPLC-MS/MS módszerekkel. Céлом volt az azonosításhoz szükséges fragmensek maximális számának meghatározása az ütközési energia függvényében, a peptideket felépítő aminosavaknak a fragmentációs profilra gyakorolt hatásának vizsgálata, valamint ezen fragmentációs profil összehasonlítása a triptikus peptidekével.

Kutatómunkám eredményeképpen sikerült 17 ADH-ból és 11 BSA-ból származó egyedi peptid teljes fragmentációs profilját feltérképezni, melyek jó kiindulási alapot nyújthatnak egy későbbi, sokkal nagyobb – akár több száz vagy ezer peptidet magába foglaló – adatbázis elkészítéséhez is.

Eredményeim alapján az alábbi következtetésekre jutottam:

- A készülékgyártó által triptikus peptidekre megadott 19-45 V-os optimális ütközésienergia-tartomány gyakorlatilag megegyezik a ProAlanázzal emésztett minták általunk meghatározott optimális tartományával (~20-45 V).^{49,50} Érdeemes megjegyezni, hogy a peptidek >93%-a egy valamivel szűkebb, 20-35 V tartományban adott optimális MS/MS-spektrumot.
- A peptidek 53%-a tartalmazott egy vagy több olyan aminosavkapcsolatot, melyek között az amidkötés egyáltalán nem hasadt el még az optimális ütközésienergia-értéken sem.
- A 28 vizsgált peptid esetében az amidkötések többségének hasadása az átlagosnál kevésbé volt preferált, amely a szekvenciafragmensek eloszlásának egyenetlenségére utal.
- Mindkét vizsgált protonmobilitási csoportban (parciálisan mobilis és mobilis) az arginin *N*- és *C*-terminálisán mutatkozott a legkisebb kötéshasadási hajlam a többi aminosavkapcsolathoz képest.

A fentiekben elmondottak következménye, hogy a peptidek csak kb. fele azonosítható teljes szekvenciafedettséggel, így a fennmaradó esetekben egy vagy több aminosav szekvencián belüli azonosítása kétségesse válhat. Ez problémát jelenthet akkor, ha a célunk egy eddig teljesen ismeretlen, adatbázisban nem szereplő fehérje *de novo* szekvenálása vagy ha az arginin közelében nehezen azonosítható poszttranszlációs módosítások találhatók.⁵²

Ugyanakkor előnyös lehet a ProAlanáz használata, ha olyan argininmódosítás vizsgálata a cél, amely jelentősen csökkenti az arginin bázicitását.⁵³ Ilyenkor ugyanis az azonos szekvenciájú, de az arginint egyik esetben módosított, másik esetben nem módosított formában tartalmazó peptid könnyebben megkülönböztethetővé válik MS/MS segítségével. Ilyen esetben a tripszin a módosult arginin C-terminálisánál már nem hasítana,⁵⁴ így különböző hosszúságú peptidek keletkeznének, a közvetlen összehasonlítás pedig nem volna lehetséges.

Kutatási eredményeim alapján a jövőben további modellfehérjék enzimátikus emésztését tervezem ProAlanázzal a rendelkezésre álló adatbázis bővítése érdekében. Az adatbázis kiterjesztésével lehetőség nyílna a hibahatárok csökkentésére és specifikusabb következtetések levonására. Jelen kísérlet az amidkötésekben résztvevő aminosavak kémiai minőségének vizsgálatára korlátozódott, ugyanakkor érdekes lehet a távolabbi aminosavak fragmentációt befolyásoló hatásának vizsgálata is, amely szintén az adatbázis-bővítés révén érhető el.

7. Irodalomjegyzék

- (1) Glish, G. L.; Vachet, R. W. The Basics of Mass Spectrometry in the Twenty-First Century. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, 2 (2), 140–150. <https://doi.org/10.1038/nrd1011>.
- (2) Domon, B.; Aebersold, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Tools for biochemistry* **2006**, 312 (5771), 212–217. <https://doi.org/10.1126/science.1124619>.
- (3) Glish, G. L.; Vachet, R. W. The Basics of Mass Spectrometry in the Twenty-First Century. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, 2 (2), 140–150. <https://doi.org/10.1038/nrd1011>.
- (4) Gross, J. H. *Mass Spectrometry*, 3rd ed.; Springer International Publishing: Heidelberg, **2017**. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7>.
- (5) Zook D.R.; Bruins A.P. On Cluster Ions, Ion Transmission, and Linear Dynamic Range Limitations in Electrospray (Ionspray) Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1997**, 162 (1–3), 129–147. [https://doi.org/10.1016/S0168-1176\(96\)04511-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1176(96)04511-9).
- (6) Kebarle Paul; Tang Liang. From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase - the Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1993**, 65 (22), 972–986. <https://doi.org/10.1021/ac00070a001>.
- (7) Bruins, A. P. Mechanistic Aspects of Electrospray Ionization. *J. Chromatogr. A* **1998**, 794 (1–2), 345–357. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01110-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01110-2).
- (8) Rohner, T. C.; Lion, N.; Girault, H. H. Electrochemical and Theoretical Aspects of Electrospray Ionisation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6 (12), 3056–3068. <https://doi.org/10.1039/b316836k>.
- (9) Muller, C.; Schafer, P.; Stortzel, M.; Vogt, S.; Weinmann, W. Ion Suppression Effects in Liquid Chromatography-Electrospray-Ionisation Transport-Region Collision Induced Dissociation Mass Spectrometry with Different Serum Extraction Methods for Systematic Toxicological Analysis with Mass Spectra Libraries. *J. Chromatogr. B* **2002**, 773 (1), 47–52. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00142-3](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00142-3).
- (10) Henzel, W. J.; Watanabe, C.; Stults, J. T. Protein Identification: The Origins of Peptide Mass Fingerprinting. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2003**, 14 (9), 931–942. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(03\)00214-9](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(03)00214-9).
- (11) Cotter, R. J. Time-of-Flight Mass Spectrometry : An Increasing Role in the Life Sciences. *Biomed Environ Mass Spectrom* **1989**, 18 (8), 513–532. <https://doi.org/10.1002/bms.1200180803>.
- (12) Anacleto, J. F.; Pleasance, S.; Boyd, R. K. Calibration of Ion Spray Mass Spectra Using Cluster Ions. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, 27 (6), 660–666. <https://doi.org/10.1002/oms.1210270603>.
- (13) Cox, J.; Michalski, A.; Mann, M. Software Lock Mass by Two-Dimensional Minimization of Peptide Mass Errors. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2011**, 22 (8), 1373–1380. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0142-8>.
- (14) El-Aneed, A.; Cohen, A.; Banoub, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl Spectrosc Rev* **2009**, 44 (3), 210–230. <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>.

- (15) Dawson P. Experimental Measurements Of Quadrupole Mass Analyser Performance And Comparison With Theoretical Predctions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **1976**, 21 (3–4), 317–332. [https://doi.org/10.1016/0020-7381\(76\)80130-1](https://doi.org/10.1016/0020-7381(76)80130-1).
- (16) Murray, K. K.; Boyd, R. K.; Eberlin, M. N.; John Langley, G.; Li, L.; Naito, Y. Definitions of Terms Relating to Mass Spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Pure Appl. Chem.* **2013**, 85 (7), 1515–1609. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-06-04-06>.
- (17) Molina, H.; Matthiesen, R.; Kandasamy, K.; Pandey, A. Comprehensive Comparison of Collision Induced Dissociation and Electron Transfer Dissociation. *Anal. Chem.* **2008**, 80 (13), 4825–4835. <https://doi.org/10.1021/ac8007785>.
- (18) Mitchell Wells, J.; McLuckey, S. A. Collision-Induced Dissociation (CID) of Peptides and Proteins. *Methods Enzymol.* **2005**, 402, 148–185. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)02005-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)02005-7).
- (19) Balla József. *A Gázkromatográfia Analitikai Alkalmazásai*, 1st ed.; Edison House Kft.: Budapest, **2006**.
- (20) J Wilce, M. C.; Aguilar, M.-I.; W Heam, M. T. Physicochemical Basis of Amino Acid Hydrophobicity Scales: Evaluation of Four New Scales of Amino Acid Hydrophobicity Coefficients Derived from RP-HPLC of Peptides. *Anal. Chem.* **1995**, 67 (7), 349. <https://doi.org/10.1021/ac00103a012>.
- (21) Krokhin, O. v. Sequence-Specific Retention Calculator. Algorithm for Peptide Retention Prediction in Ion-Pair RP-HPLC: Application to 300- and 100-Å Pore Size C18 Sorbents. *Anal. Chem.* **2006**, 78 (22), 7785–7795. <https://doi.org/10.1021/ac060777w>.
- (22) Stoll, D. R.; Li, X.; Wang, X.; Carr, P. W.; Porter, S. E. G.; Rutan, S. C. Fast, Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1168 (1–2), 3–43. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2007.08.054>.
- (23) Danielsson, R.; Bylund, D.; Markides, K. E. Matched Filtering with Background Suppression for Improved Quality of Base Peak Chromatograms and Mass Spectra in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 454 (2), 167–184. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01574-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01574-4).
- (24) McDonnell, K.; Howley, E.; Abram, F. The Impact of Noise and Missing Fragmentation Cleavages on de Novo Peptide Identification Algorithms. *Comput Struct Biotechnol J* **2022**, 20, 1402–1412. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.03.008>.
- (25) Giles, K.; Ujma, J.; Wildgoose, J.; Pringle, S.; Richardson, K.; Langridge, D.; Green, M. A Cyclic Ion Mobility-Mass Spectrometry System. *Anal. Chem.* **2019**, 91 (13), 8564–8573. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01838>.
- (26) Patterson, S. D.; Aebersold, R. H. Proteomics: The First Decade and Beyond. *Nat Genet* **2003**, 33 (3S), 311–323. <https://doi.org/10.1038/ng1106>.
- (27) Lermyte, F.; Tsybin, Y. O.; O'Connor, P. B.; Loo, J. A. Top or Middle? Up or Down? Toward a Standard Lexicon for Protein Top-Down and Allied Mass Spectrometry Approaches. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2019**, 30 (7), 1149–1157. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02201-x>.
- (28) Aebersold, R.; Agar, J. N.; Amster, I. J.; Baker, M. S.; Bertozzi, C. R.; Boja, E. S.; Costello, C. E.; Cravatt, B. F.; Fenselau, C.; Garcia, B. A.; Ge, Y.; Gunawardena, J.; Hendrickson, R. C.;

- Hergenrother, P. J.; Huber, C. G.; Ivanov, A. R.; Jensen, O. N.; Jewett, M. C.; Kelleher, N. L.; Kiessling, L. L.; Krogan, N. J.; Larsen, M. R.; Loo, J. A.; Ogorzalek Loo, R. R.; Lundberg, E.; Maccoss, M. J.; Mallick, P.; Mootha, V. K.; Mrksich, M.; Muir, T. W.; Patrie, S. M.; Pesavento, J. J.; Pitteri, S. J.; Rodriguez, H.; Saghatelian, A.; Sandoval, W.; Schlüter, H.; Sechi, S.; Slavoff, S. A.; Smith, L. M.; Snyder, M. P.; Thomas, P. M.; Uhlén, M.; van Eyk, J. E.; Vidal, M.; Walt, D. R.; White, F. M.; Williams, E. R.; Wohlschlager, T.; Wysocki, V. H.; Yates, N. A.; Young, N. L.; Zhang, B. How Many Human Proteoforms Are There? *Nat Chem Biol* **2018**, *14* (3), 206–214. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2576>.
- (29) Kruszewska, J.; Zajda, J.; Matczuk, M. How to Effectively Prepare a Sample for Bottom-up Proteomic Analysis of Nanoparticle Protein Corona? A Critical Review. *Talanta* **2021**, 226. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122153>.
- (30) *Trypsin/Lys-C protease mix for enhanced protein mass spectrometry analysis*. <https://www.nature.com/articles/nmeth.f.371> (accessed 2022-11-01).
- (31) Révész, Á.; Rokob, T. A.; Jeanne Dit Fouque, D.; Hüse, D.; Háda, V.; Turiák, L.; Memboeuf, A.; Vékey, K.; Drahos, L. Optimal Collision Energies and Bioinformatics Tools for Efficient Bottom-up Sequence Validation of Monoclonal Antibodies. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (20), 13128–13135. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03362>.
- (32) Giansanti, P.; Tsiatsiani, L.; Low, T. Y.; Heck, A. J. R. Six Alternative Proteases for Mass Spectrometry-Based Proteomics beyond Trypsin. *Nat Protoc* **2016**, *11* (5), 993–1006. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.057>.
- (33) Hosfield, C. *ProAlanase: A Proline-and Alanine-Specific Protease for Proteomics*. https://scv10mr-cdnpre-p-cus-00.azureedge.net/-/media/files/products-and-services/mass-spectrometry/proalanase-standford-mass-spec-presentation-oct-28-2020.pdf?rev=0d2555f8d80c402bbaeed58bccd6178f&sc_lang=en (accessed 2022-11-04).
- (34) Samodova, D.; Hosfield, C. M.; Cramer, C. N.; Giuli, M. v.; Cappellini, E.; Franciosa, G.; Rosenblatt, M. M.; Kelstrup, C. D.; Olsen Correspondence, J. v. ProAlanase Is an Effective Alternative to Trypsin for Proteomics Applications and Disulfide Bond Mapping. *Mol Cell Proteomics* **2020**, *19* (12), 2139–2156. <https://doi.org/10.1074/mcp.TIR120.002129>.
- (35) Schessner, J. P.; Voytik, E.; Bludau, I. A Practical Guide to Interpreting and Generating Bottom-up Proteomics Data Visualizations. *Proteomics* **2022**, *22* (8). <https://doi.org/10.1002/pmic.202100103>.
- (36) Fernández-Costa, C.; Martínez-Bartolomé, S.; McClatchy, D. B.; Saviola, A. J.; Yu, N. K.; Yates, J. R. Impact of the Identification Strategy on the Reproducibility of the DDA and DIA Results. *J. Proteome Res.* **2020**, *19* (8), 3153–3161. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00153>.
- (37) Sidoli, S.; Garcia, B. A. Middle-down Proteomics: A Still Unexploited Resource for Chromatin Biology. *Expert Rev Proteomics* **2017**, *14* (7), 617–626. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1345632>.
- (38) Bailey, A. O.; Miller, T. M.; Dong, M. Q.; Velde, C. vande; Cleveland, D. W.; Yates, J. R. RCADiA: Simple Automation Platform for Comparative Multidimensional Protein Identification Technology. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (16), 6410–6418. <https://doi.org/10.1021/ac070585g>.

- (39) Helsens, K.; Martens, L.; Vandekerckhove, J.; Gevaert, K. MascotDatfile: An Open-Source Library to Fully Parse and Analyse MASCOT MS/MS Search Results. *Proteomics* **2007**, *7* (3), 364–366. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600682>.
- (40) Zhang, Y.; Fonslow, B. R.; Shan, B.; Baek, M. C.; Yates, J. R. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (4), 2343–2394. <https://doi.org/10.1021/cr3003533>.
- (41) Kapp, E. A.; Schütz, F.; Reid, G. E.; Eddes, J. S.; Moritz, R. L.; O’Hair, R. A. J.; Speed, T. P.; Simpson, R. J. Mining a Tandem Mass Spectrometry Database to Determine the Trends and Global Factors Influencing Peptide Fragmentation. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (22), 6251–6264. <https://doi.org/10.1021/ac034616t>.
- (42) Fukui, K.; Naito, Y.; Akiyama, Y.; Takahashi, K. Charge-State Selective Fragmentation Analysis for Protonated Peptides in Infrared Multiphoton Dissociation. *Int. J. Mass spectrom.* **2004**, *235* (1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2004.03.004>.
- (43) Steen, H.; Mann, M. The ABC’s (and XYZ’s) of Peptide Sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, *5* (9), 699–711. <https://doi.org/10.1038/nrm1468>.
- (44) Paizs, B.; Suhai, S. Fragmentation Pathways of Protonated Peptides. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24* (4), 508–548. <https://doi.org/10.1002/mas.20024>.
- (45) Harrison, A. G. To b or Not to b: The Ongoing Saga of Peptide b Ions. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28* (4), 640–654. <https://doi.org/10.1002/mas.20228>.
- (46) Ballard, K. D.; Gaskell, S. J. Sequential Mass Spectrometry Applied to the Study of the Formation of “Internal” Fragment Ions of Protonated Peptides. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1991**, *111*, 173–189. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(91\)85054-P](https://doi.org/10.1016/0168-1176(91)85054-P).
- (47) Tabb, D. L.; Huang, Y.; Wysocki, V. H.; Yates, J. R. Influence of Basic Residue Content on Fragment Ion Peak Intensities in Low-Energy Collision-Induced Dissociation Spectra of Peptides. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (5), 1243–1248. <https://doi.org/10.1021/ac0351163>.
- (48) Strohal, M.; Kavan, D.; Novák, P.; Volný, M.; Havlíček, V. MMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (11), 4648–4651. <https://doi.org/10.1021/ac100818g>.
- (49) Heringer, A. S.; Reis, R. S.; Passamani, L. Z.; de Souza-Filho, G. A.; Santa-Catarina, C.; Silveira, V. Comparative Proteomics Analysis of the Effect of Combined Red and Blue Lights on Sugarcane Somatic Embryogenesis. *Acta Physiol Plant* **2017**, *39* (2), 39–52. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2349-1>.
- (50) Poleti, M. D.; Regitano, L. C. A.; Souza, G. H. M. F.; Cesar, A. S. M.; Simas, R. C.; Silva-Vignato, B.; Oliveira, G. B.; Andrade, S. C. S.; Cameron, L. C.; Coutinho, L. L. Longissimus Dorsi Muscle Label-Free Quantitative Proteomic Reveals Biological Mechanisms Associated with Intramuscular Fat Deposition. *J Proteomics* **2018**, *179*, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.028>.
- (51) Leymarie, N.; Berg, E. A.; McComb, M. E.; O’Connor, P. B.; Grogan, J.; Oppenheim, F. G.; Costello, C. E. Tandem Mass Spectrometry for Structural Characterization of Proline-Rich Proteins: Application to Salivary PRP-3. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (16), 4124–4132. <https://doi.org/10.1021/ac0255835>.

- (52) Dančik, V.; Addona, T. A.; Clauser, K. R.; Vath, J. E.; Pevzner, P. A. De Novo Peptide Sequencing via Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Computational Biology* **1999**, *6* (3–4), 327–342.
<https://doi.org/10.1089/106652799318300>.
- (53) Steckel, A.; Schlosser, G. Citrulline Effect Is a Characteristic Feature of Deiminated Peptides in Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2019**, *30* (9), 1586–1591.
<https://doi.org/10.1007/s13361-019-02271-x>.
- (54) Gehrig, P. M.; Hunziker, P. E.; Zahariev, S.; Pongor, S. Fragmentation Pathways of NG-Methylated and Unmodified Arginine Residues in Peptides Studied by ESI-MS/MS and MALDI-MS. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2004**, *15* (2), 142–149.
<https://doi.org/10.1016/j.jasms.2003.10.002>.

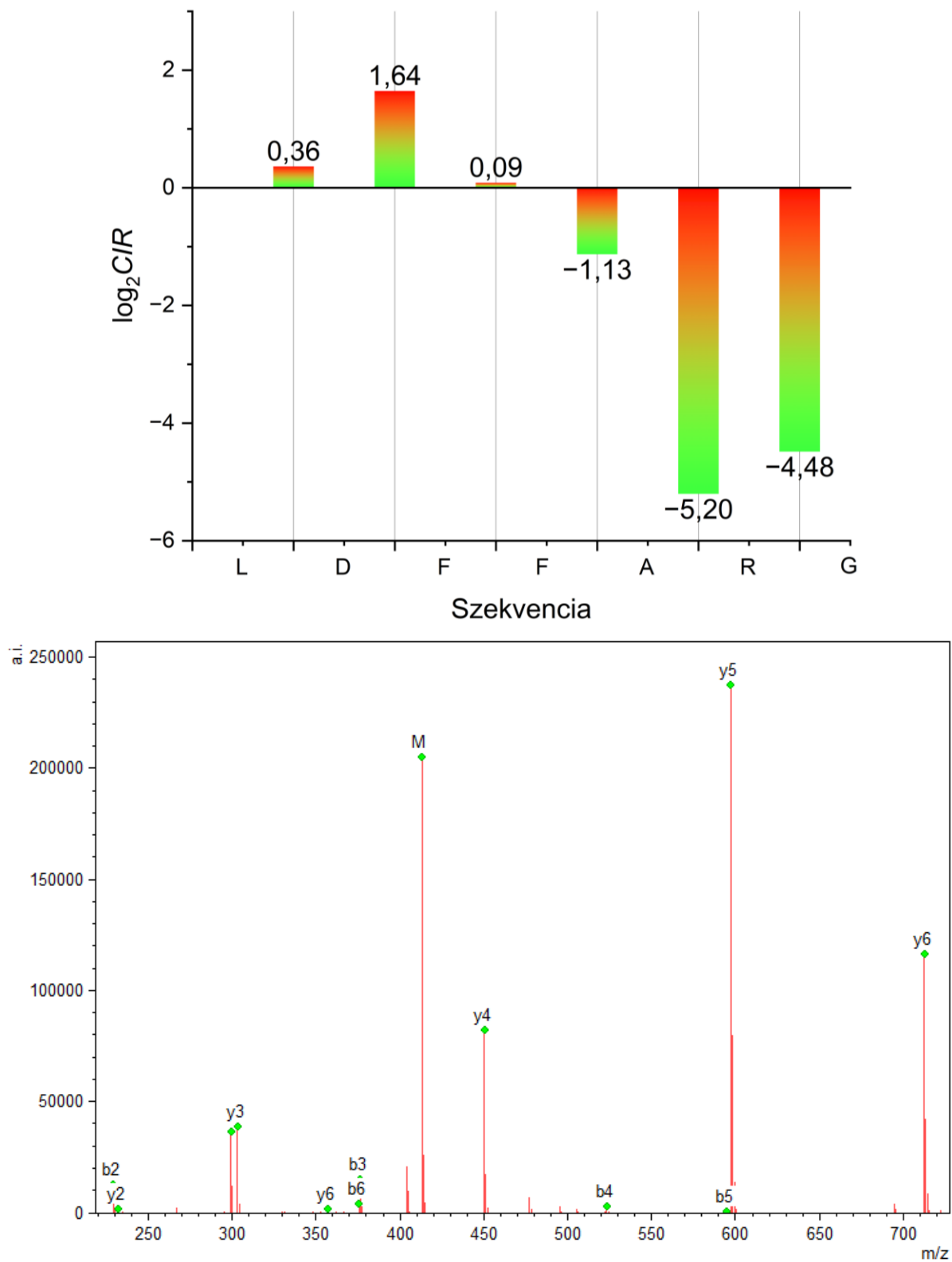
8. Függelék

F1. táblázat Az ADH fehérje enzimatis emésztéséből származó peptidek ütközési energiájának optimalására használt táblázat. A táblázat celláiban az azonosított *b* és *y* típusú fragmensek számának összegei találhatók. A C' a karbamidometilezett ciszteint jelöli.

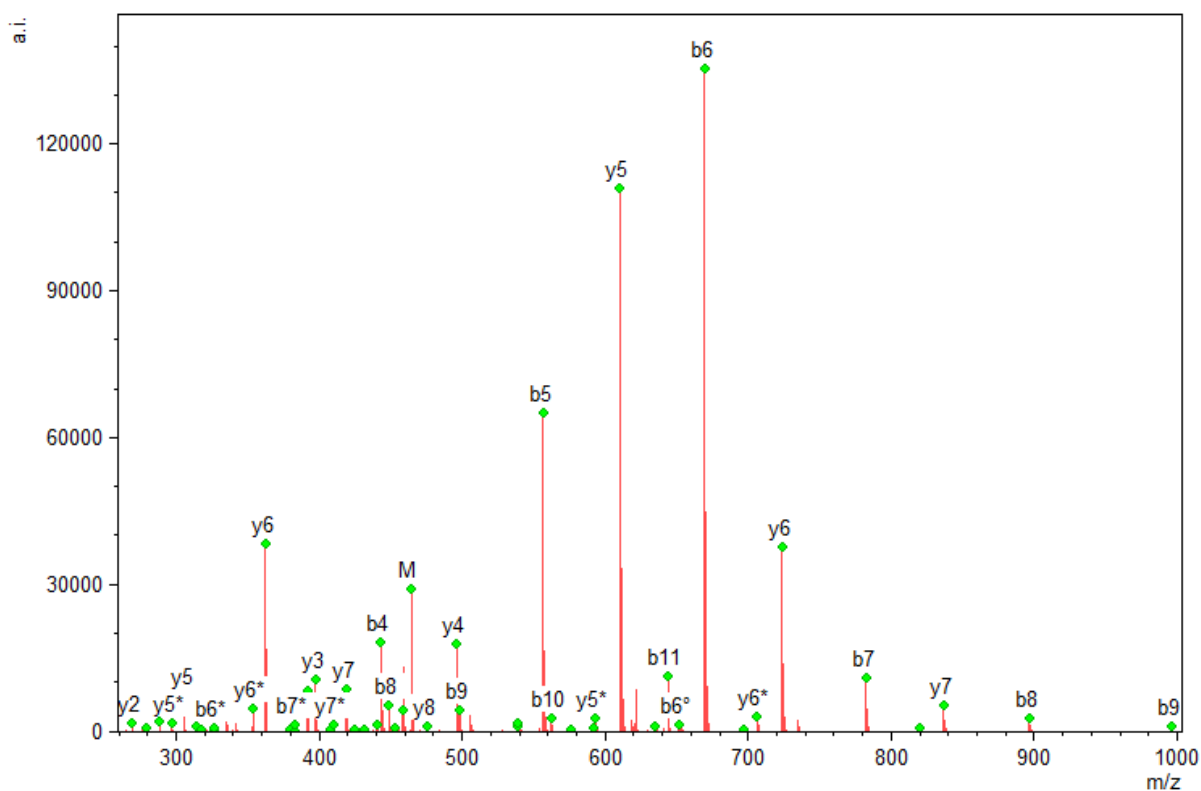
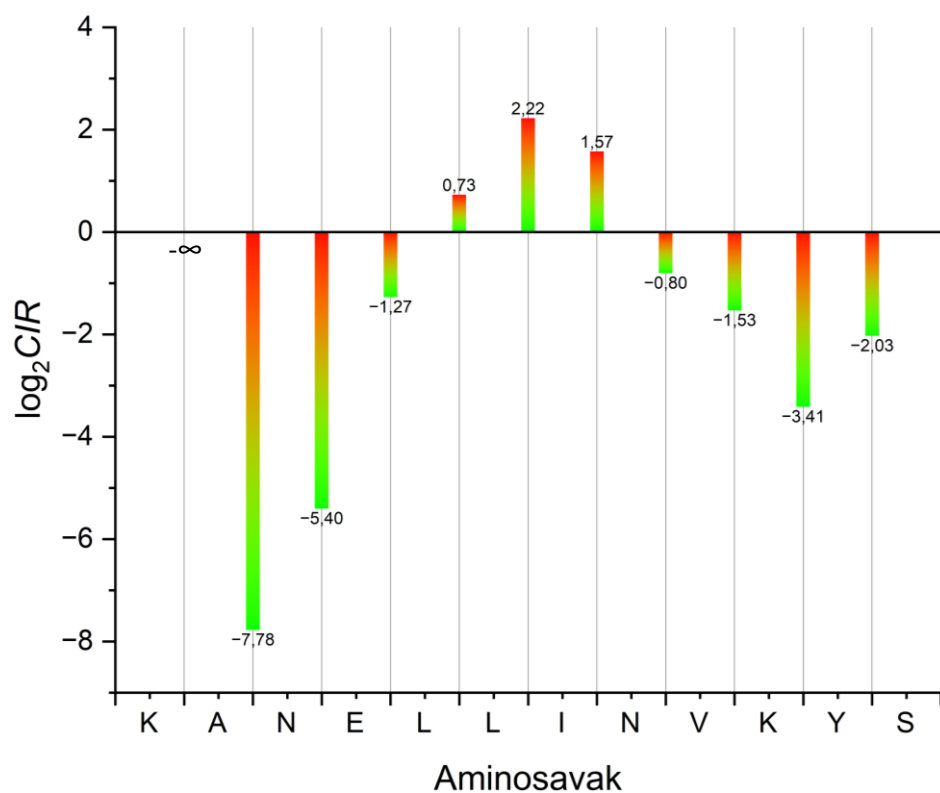
	15V	20V	25V	30V	35V	40V	45V
LDFFARG	8	12	10	8	5	5	5
KANELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWP	1	3	12	53	62	53	
LVKSPIKVVGSLTLP	9	15	20	23	19		
NLMAGHWVA	7	14	14	18	13		
GITVYKALKSA	0	1	9	21	23		
STRYVRANGTTVLVGMP	1	12	15	13			
GVC'HTDLHAWHGDWP	0	5	15	20	24	0	
EVFIDFTKEKDIVGA	2	12	16	25	14		
NGTTVLVGMP	15	16	17	11			
TVYKALKSA	0	4	12	15	17	12	
DVFNQVVKISIVGSYVGNRADTREA	9	21	25	27	28	37	27
VQAAHIP	11	12	10	10	5		
KANELLINVKYS	23	26	23	17			
GIKWLNGS	11	13	15	14	9		
NELLINVKYS	4	17	20	22	20	15	
GIKWLNG	10	13	13	13	9		
MGYRVLGIDGGEGKEELFRS	2	20	39	38	35	26	

F2. táblázat A BSA fehérje enzimatis emésztéséből származó peptidek ütközési energiájának optimalására használt táblázat. A táblázat celláiban az azonosított *b* és *y* típusú fragmensek számának összegei találhatók. A C' a karbamidometilezett ciszteint jelöli.

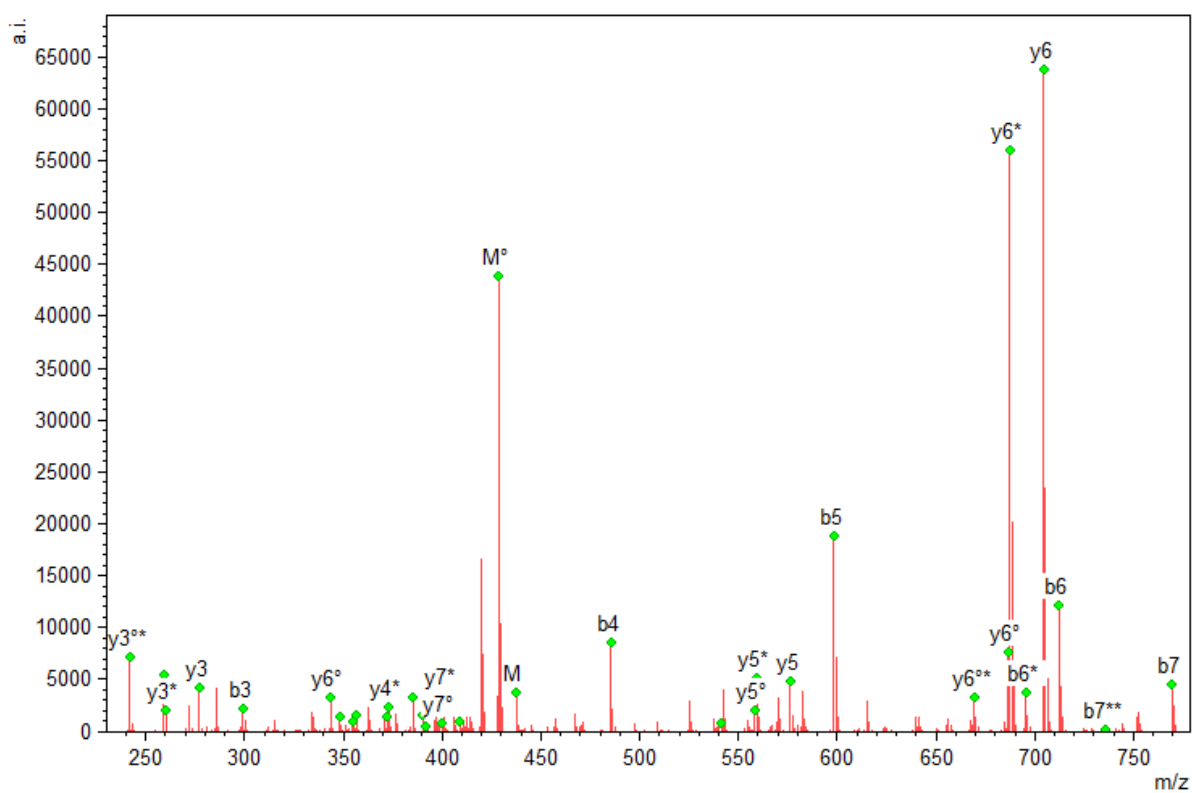
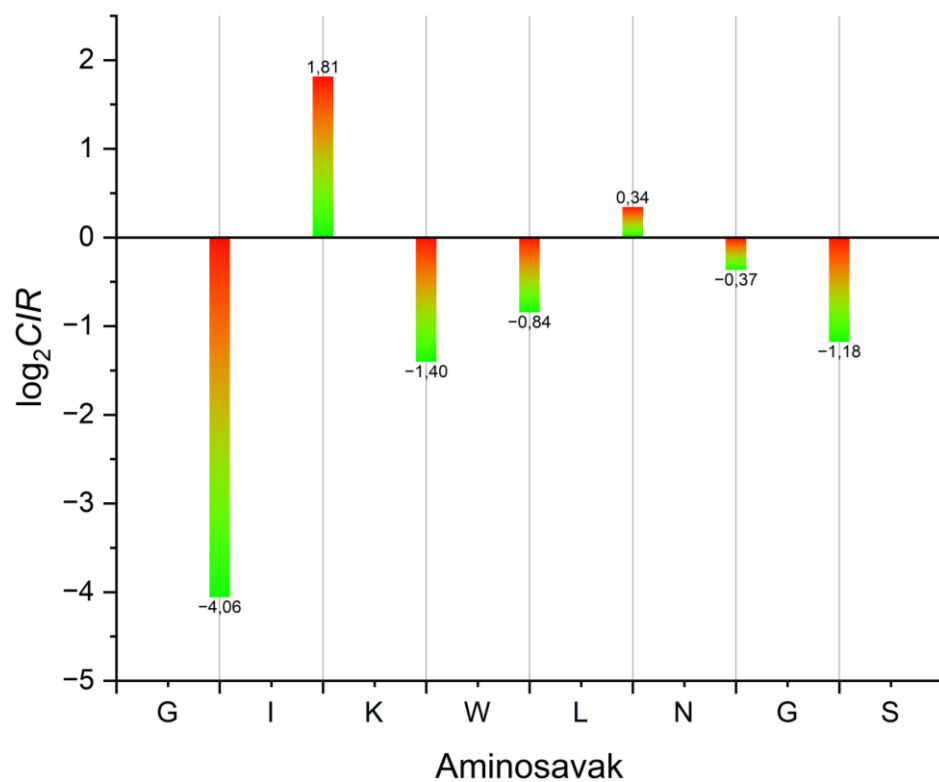
	15V	20V	25V	30V	35V	40V	45V
VSVLLRLA	0	15	13	10			
TLVEVSRLGKVGTRC'CTKP	0	1	44	39			
DPNTLC'DEFADEKKFWGKYLEIA	0	7	5	5	4		
C'TEDYLSLILNRLC'VLHEKTP	0	63	68	63			
VSEKVTKC'C'TESLVNRRP	27	40	52	38			
DEKKFWGKYLEIARRHP	52	65	40				
DETYVP	0	8	8	8	7		
YFYAP	6	7					
ELLYYANKYNGVFQEC'C'QAEDKGA	0	47	64	71	67		
EDKDVC'KNYQEAQDAFLGSFLYEYSRRHP	2	48	71	89	76		
LTADFAEDKDVC'KNYQEAQDA	0	2	6	19	29	27	22



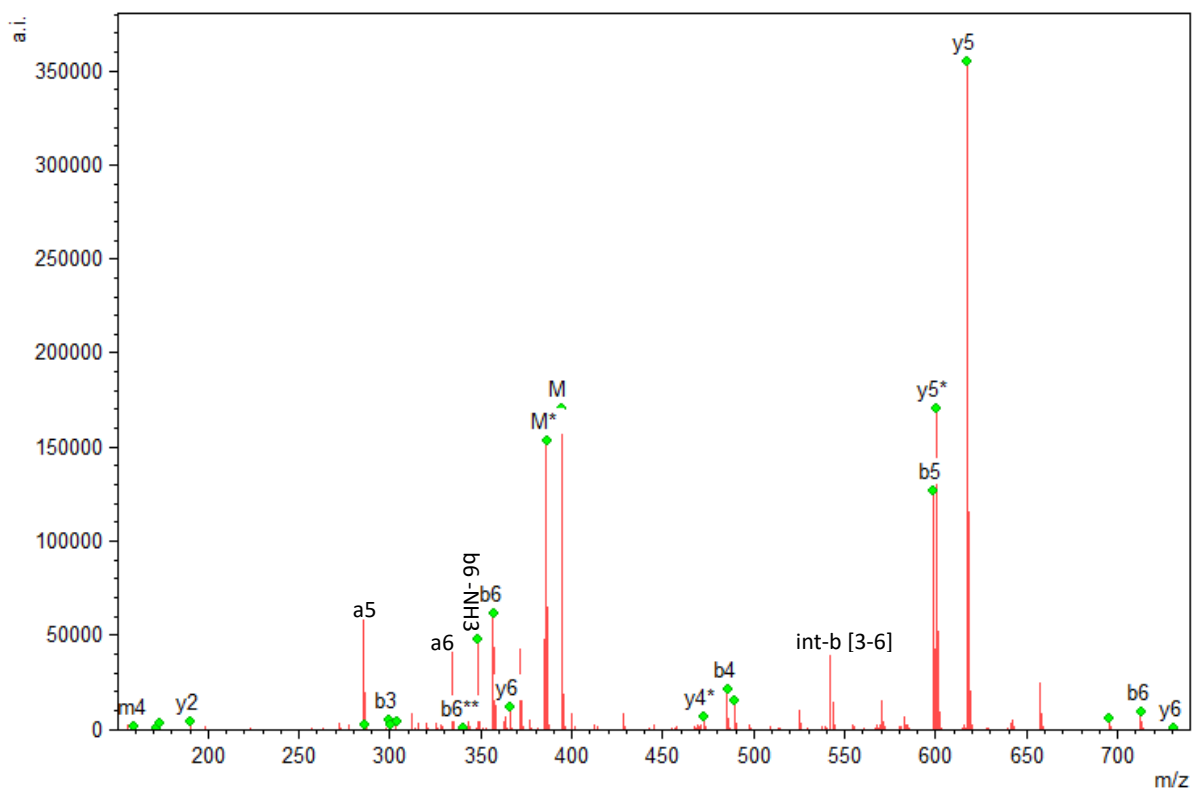
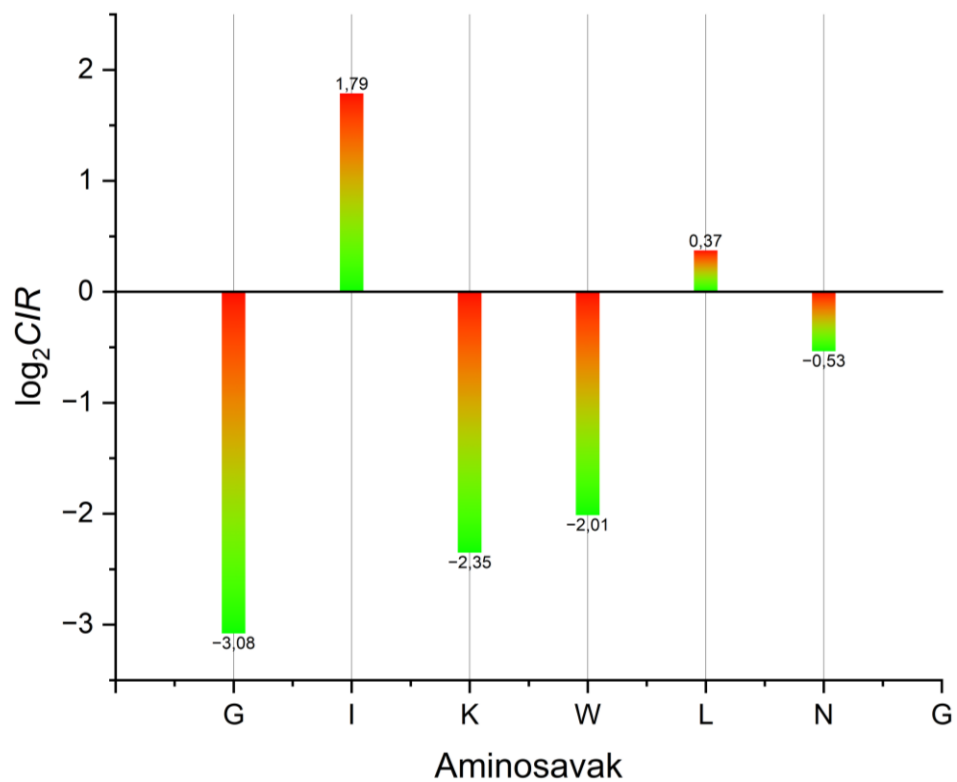
F1. ábra A LDFFARG szekvenciájú, kétszeresen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 20 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó $\log_2CIR$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



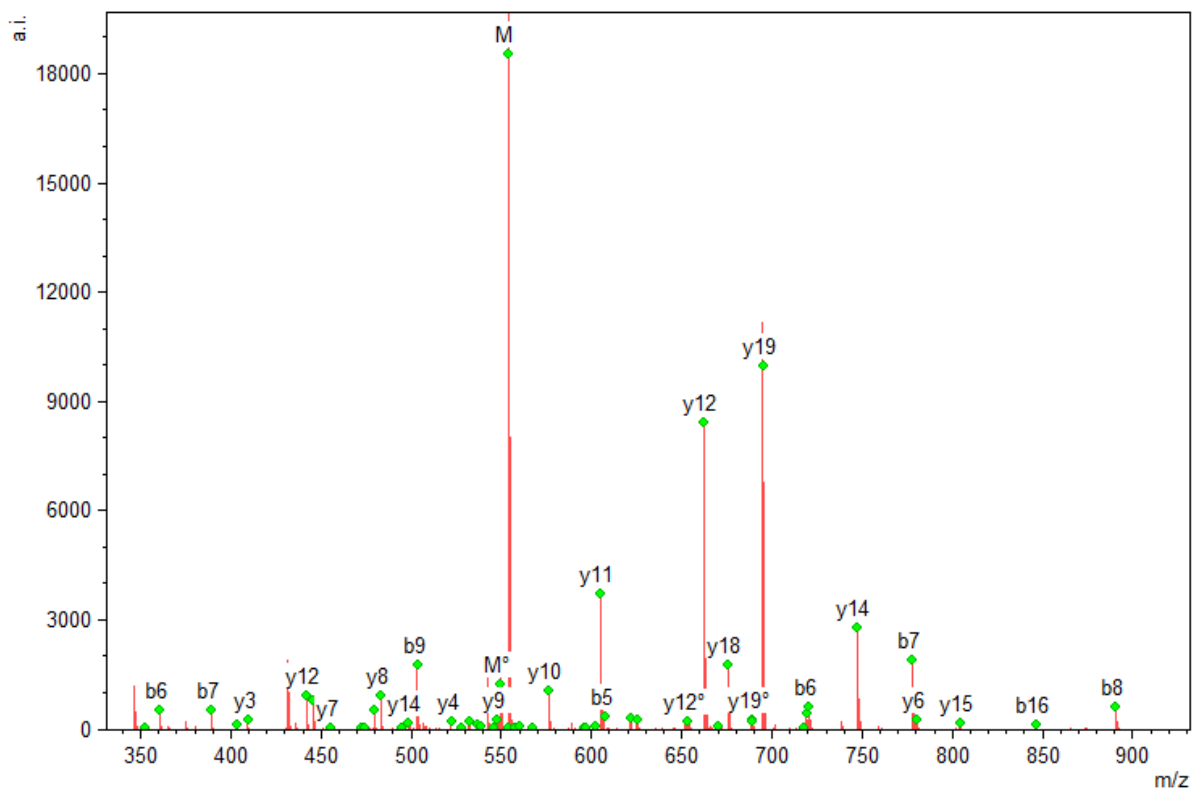
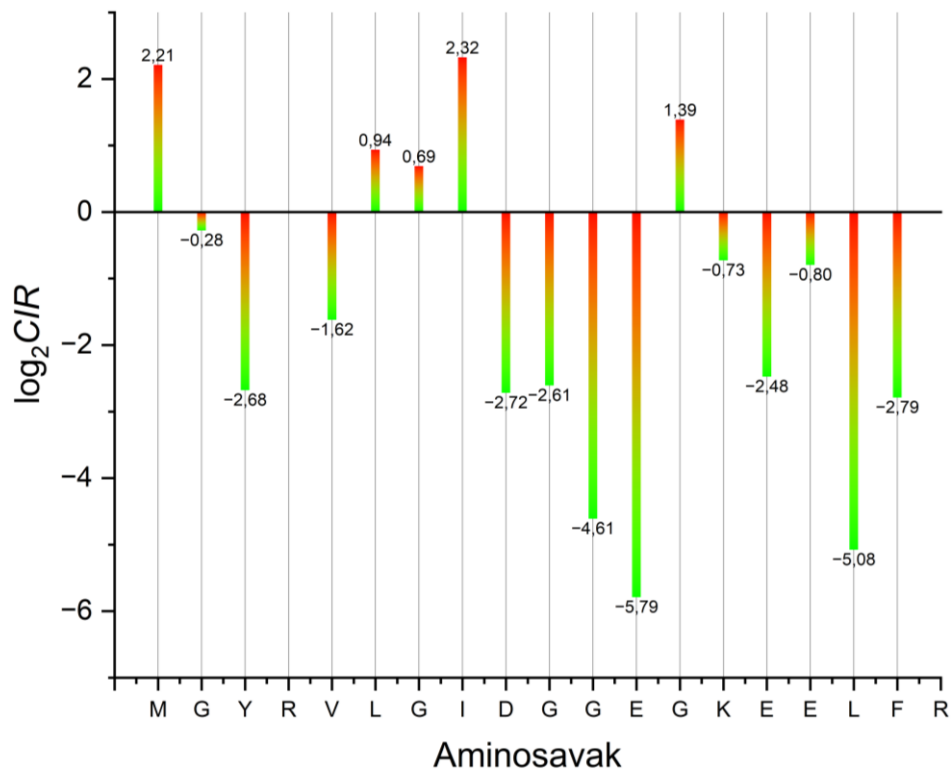
F2. ábra A KANELLINVKYS szekvenciájú, háromszorosan protonált, parciálisan protonmobilis peptid MS/MS spektruma 20 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó $\log_2 \text{CIR}$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



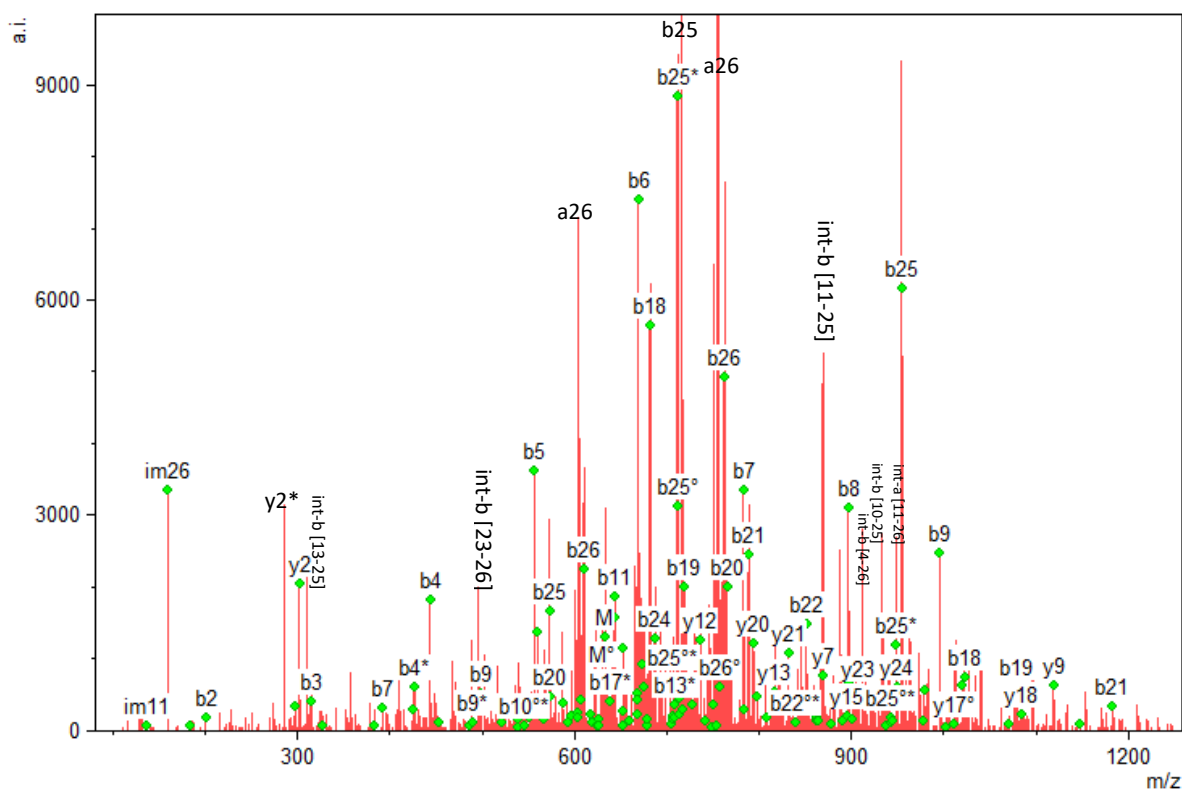
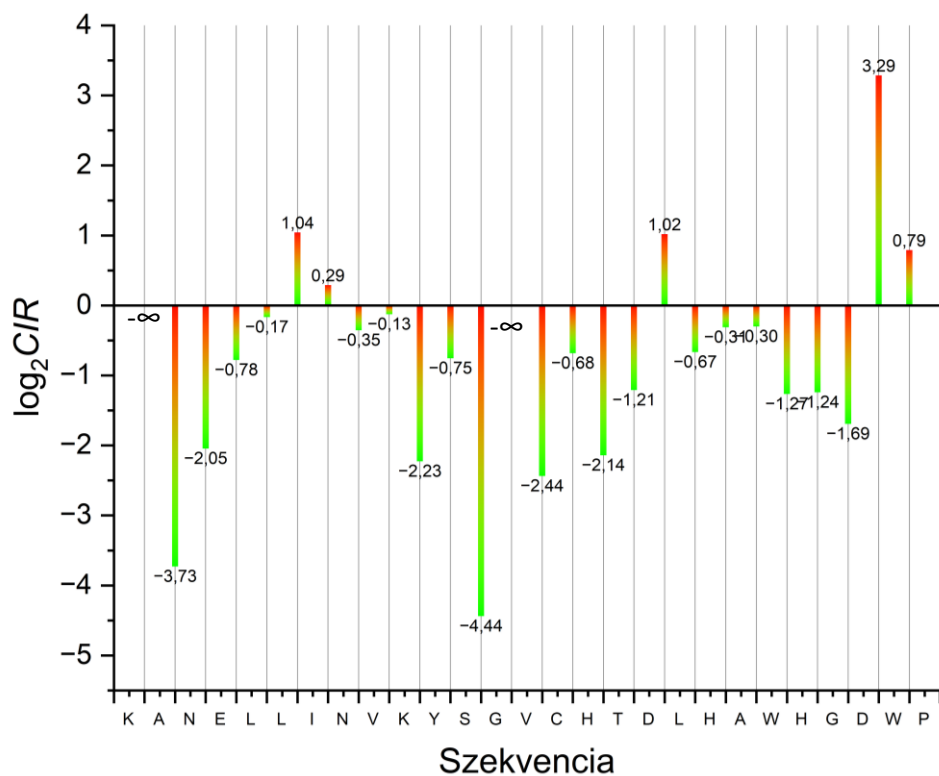
F3. ábra A GIKWLNGS szekvenciájú, kétszeresen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 25 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó $\log_2CIR$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



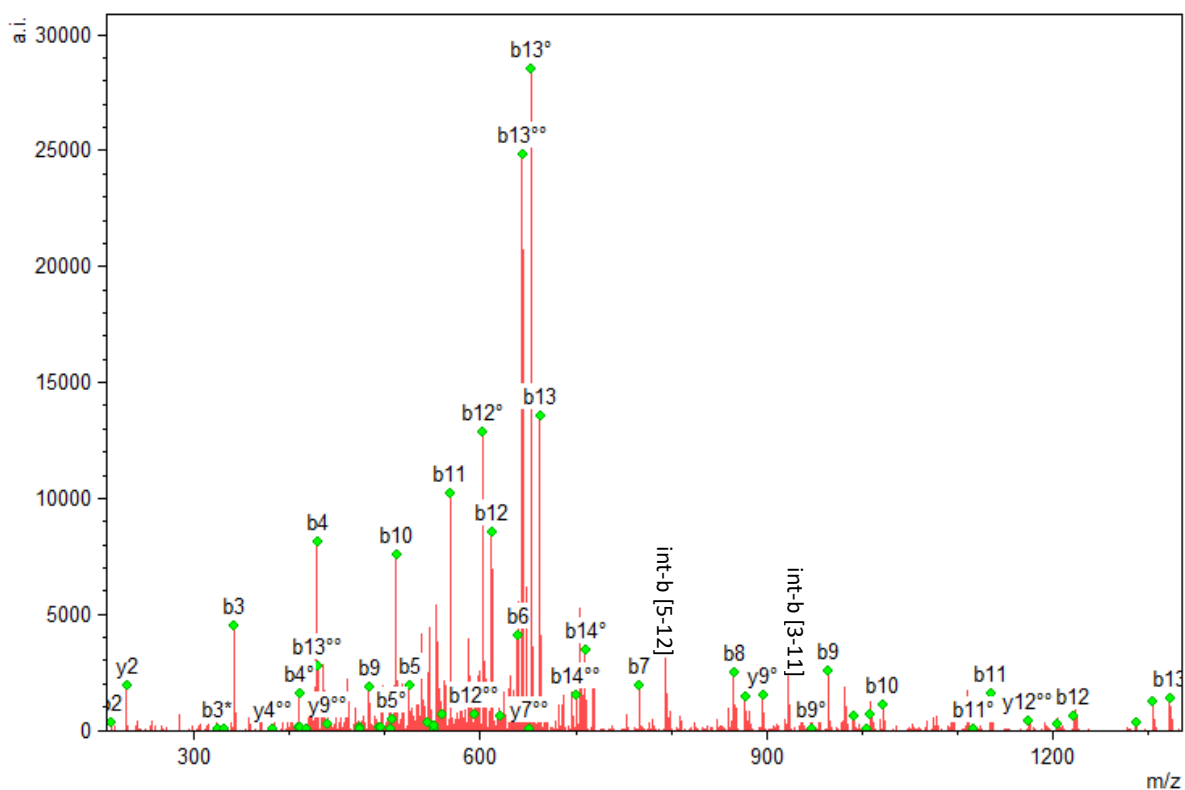
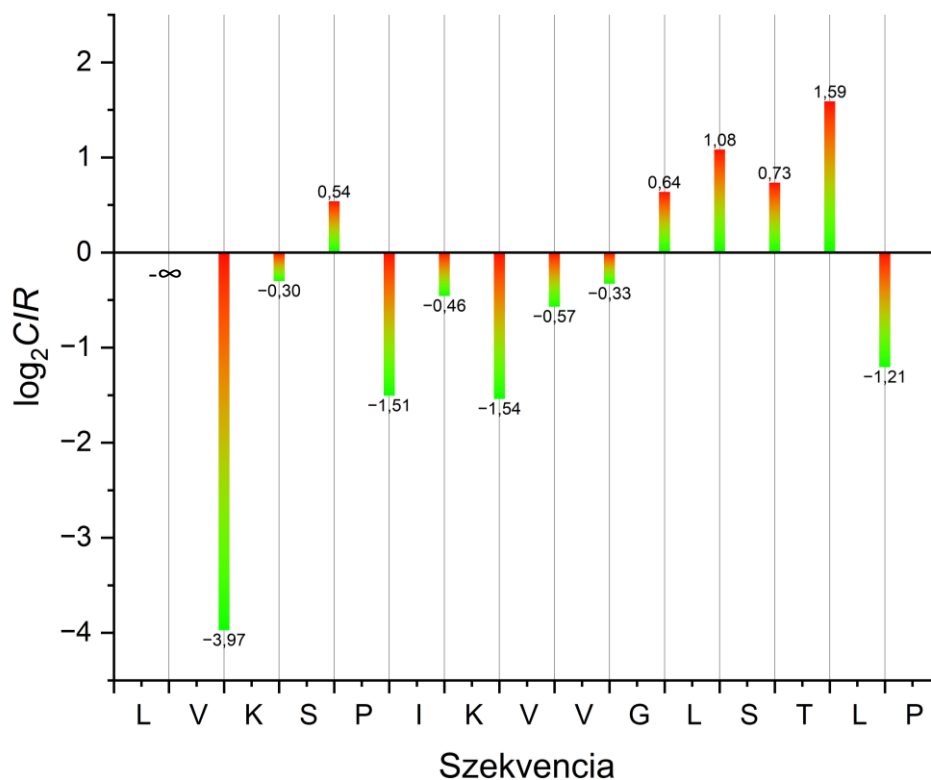
F4. ábra A GIKWLNG szekvenciájú, kétszeresen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 20 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó $\log_2 CIR$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



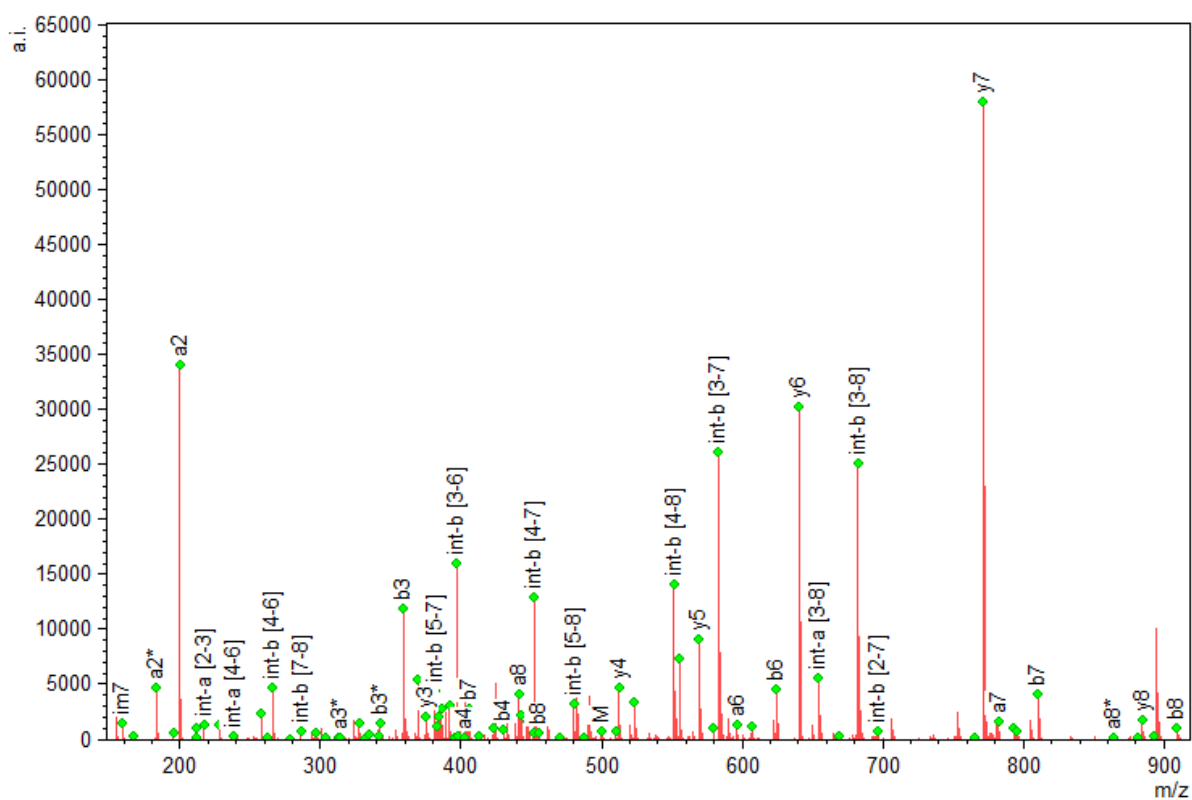
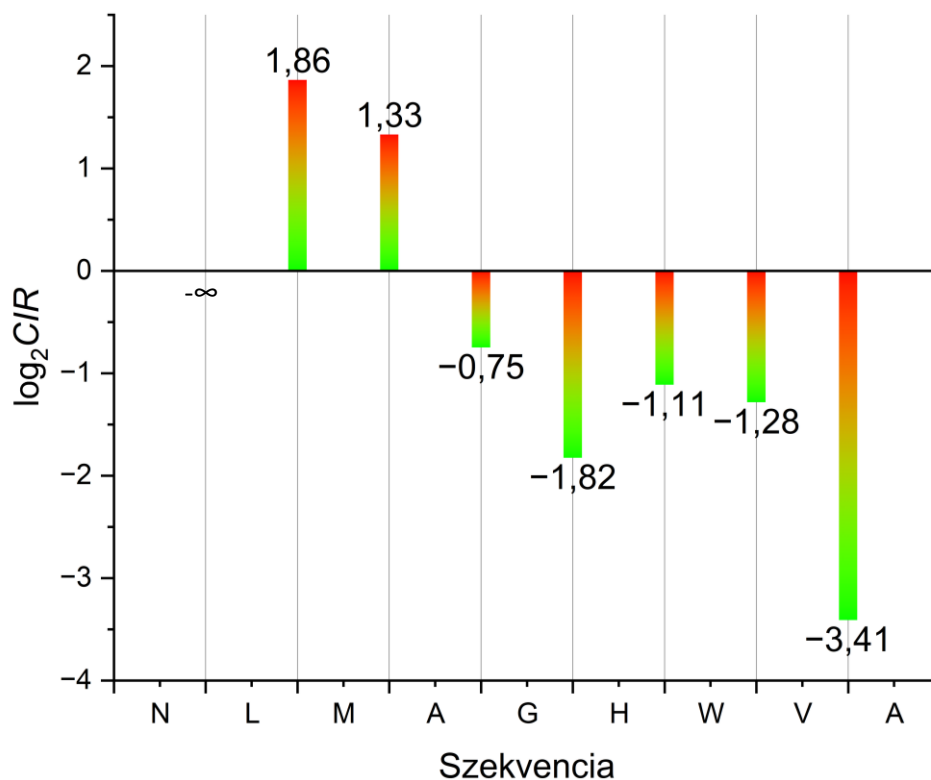
F5. ábra A MGYRVLGIDGGEGKEELFRS szekvenciájú, négyszeresen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 25 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseéhez tartozó $\log_2CIR$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



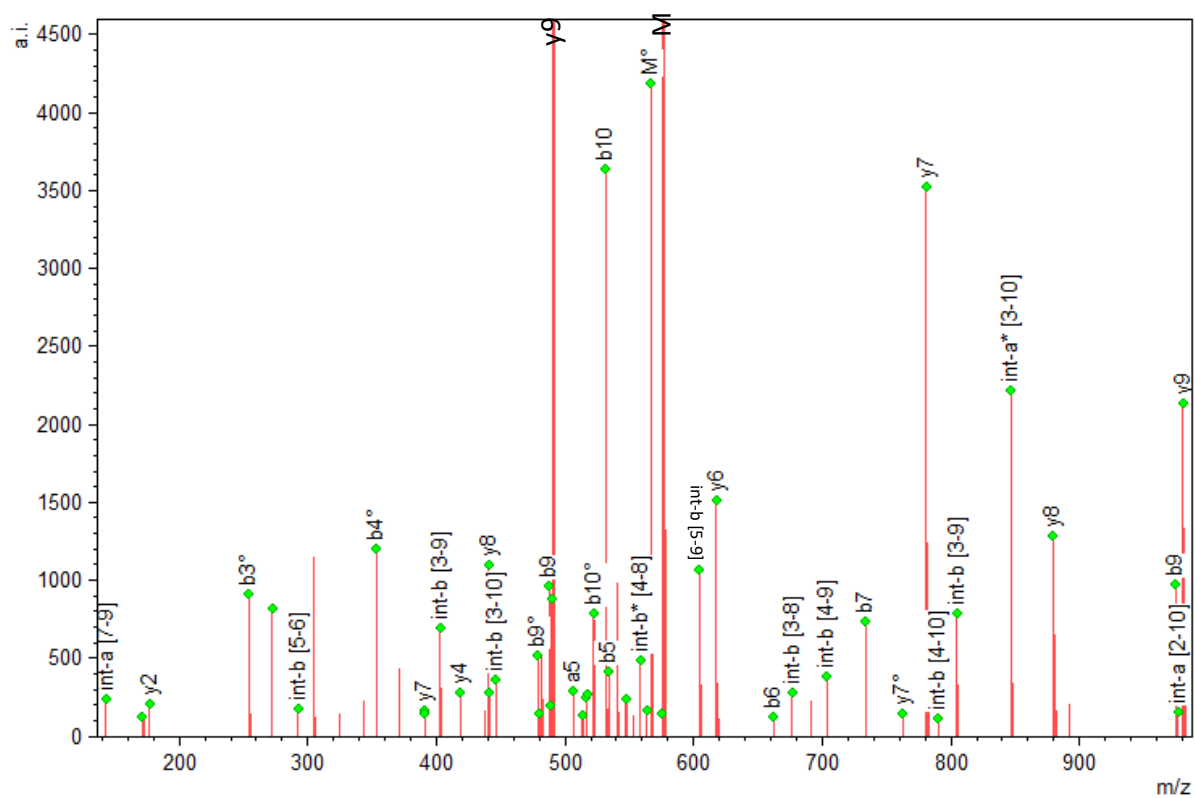
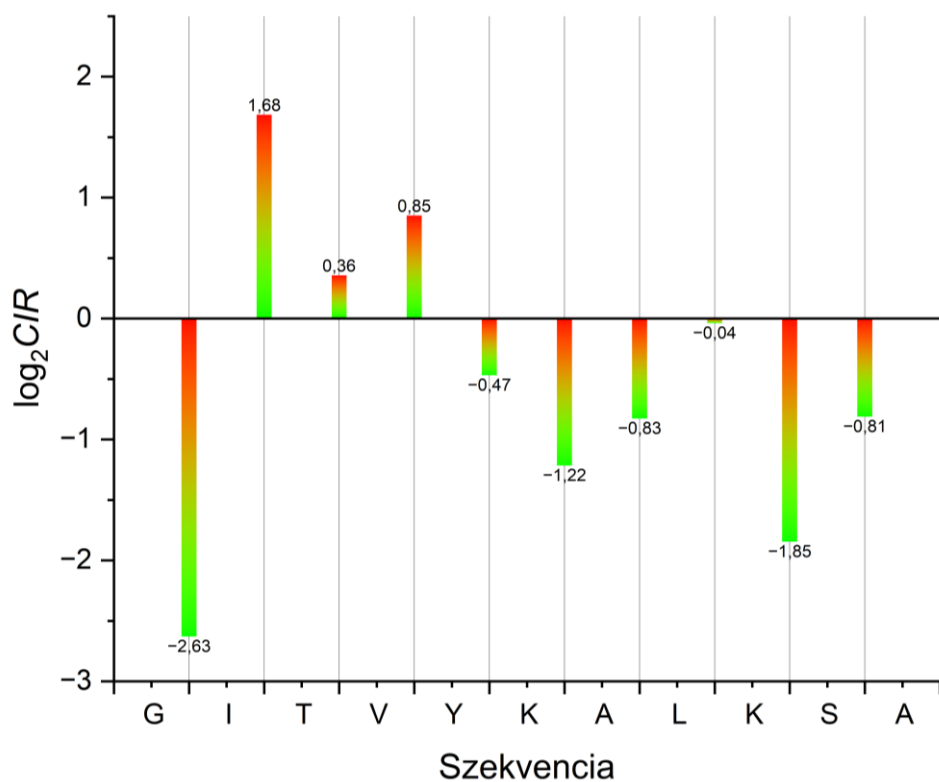
F6. ábra A KANELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWP szekvenciájú, ötszörösen protonált, parciálisan protonmobilis peptid MS/MS spektruma 35 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó log₂CIR értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



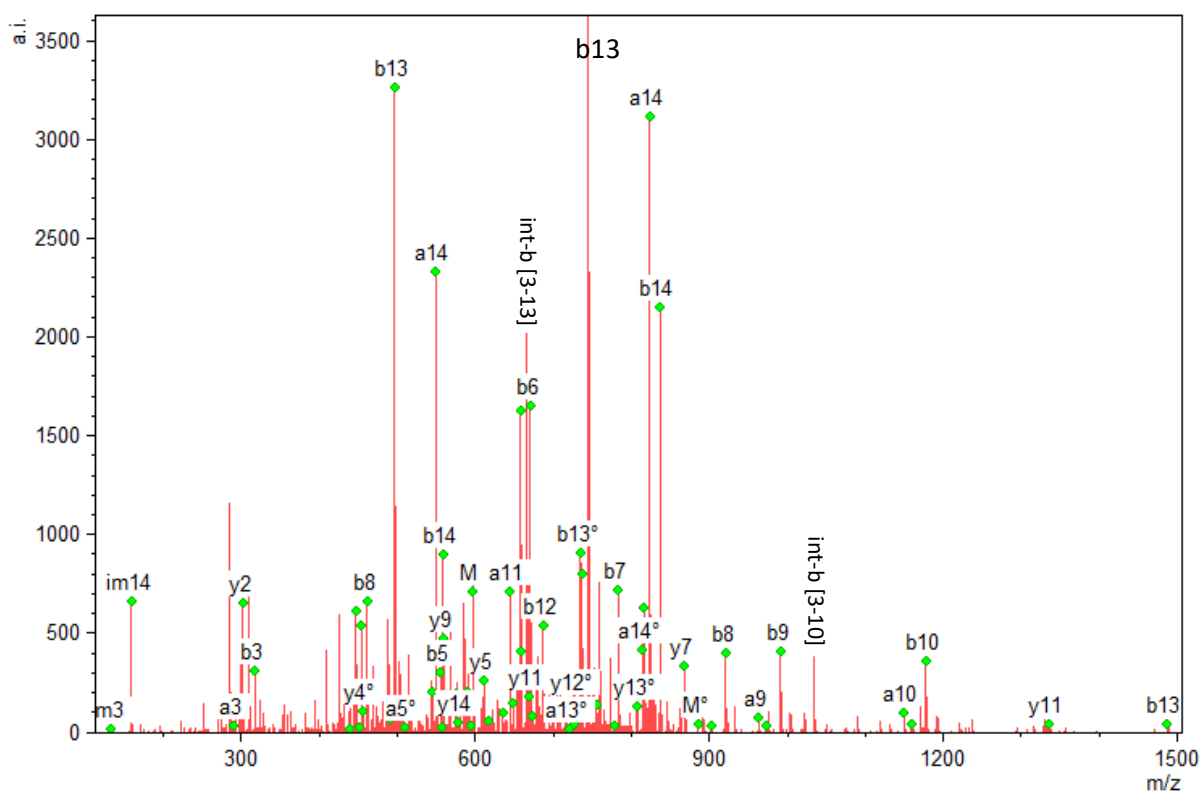
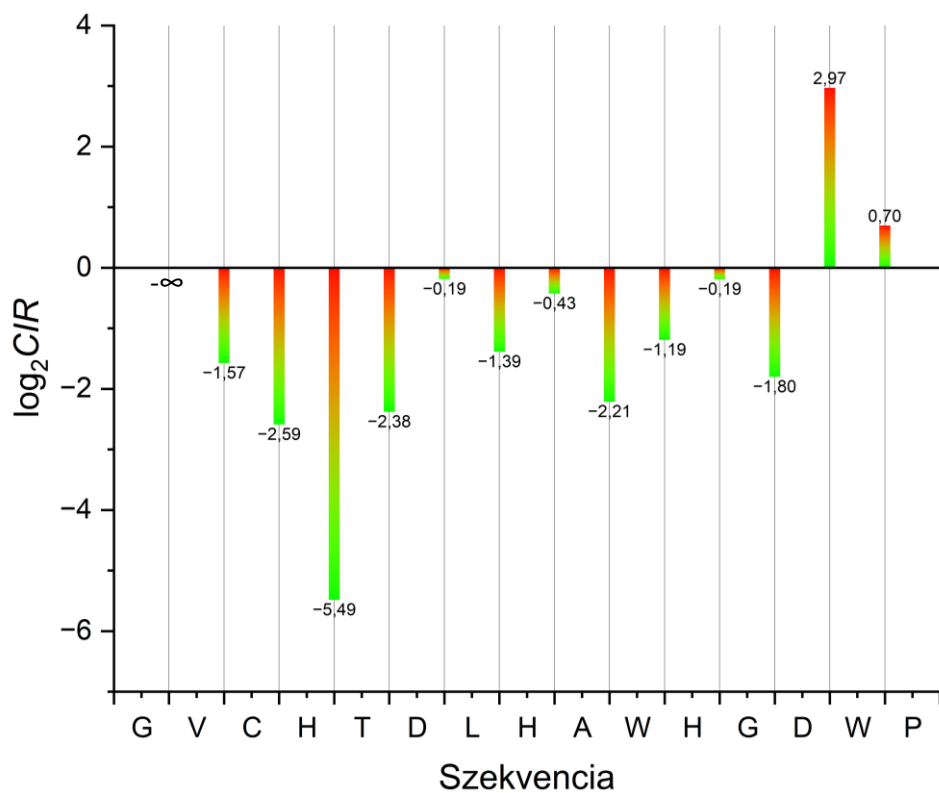
F7. ábra A LVKSPIKVVGLSTLP szekvenciájú, háromszorosan protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 30 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó log₂CIR értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



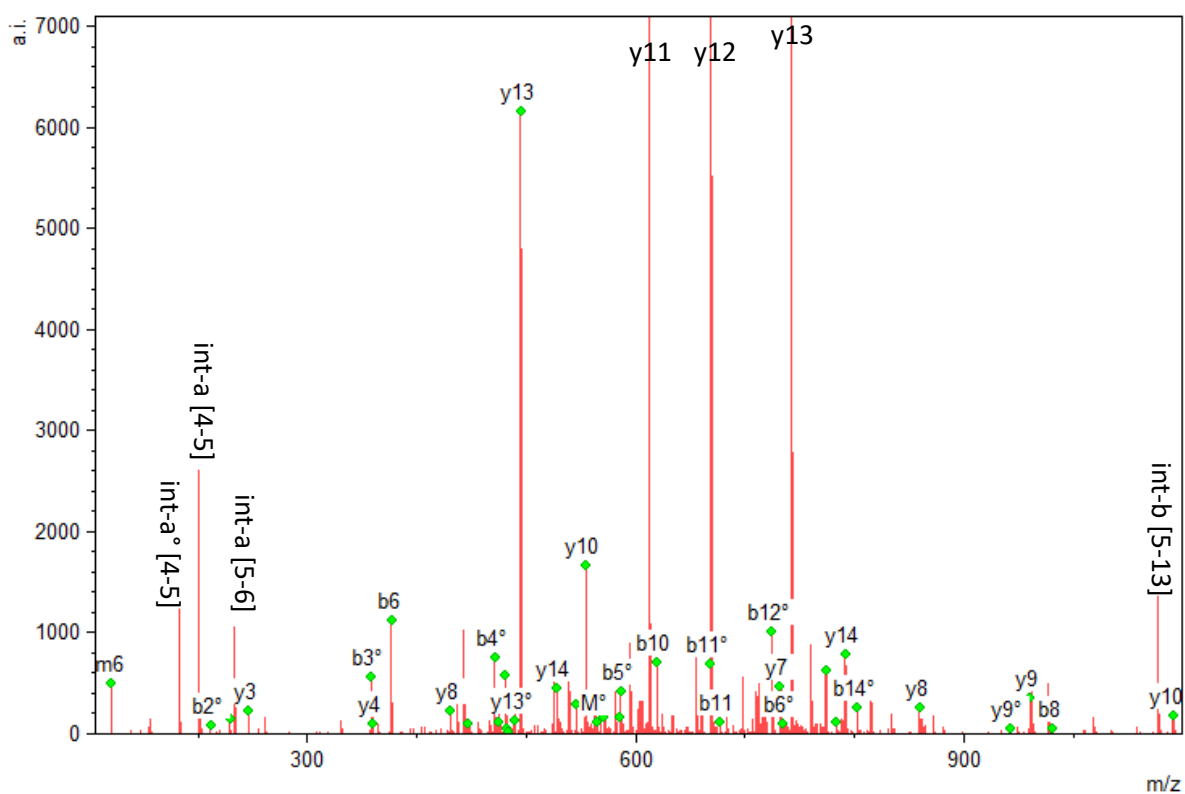
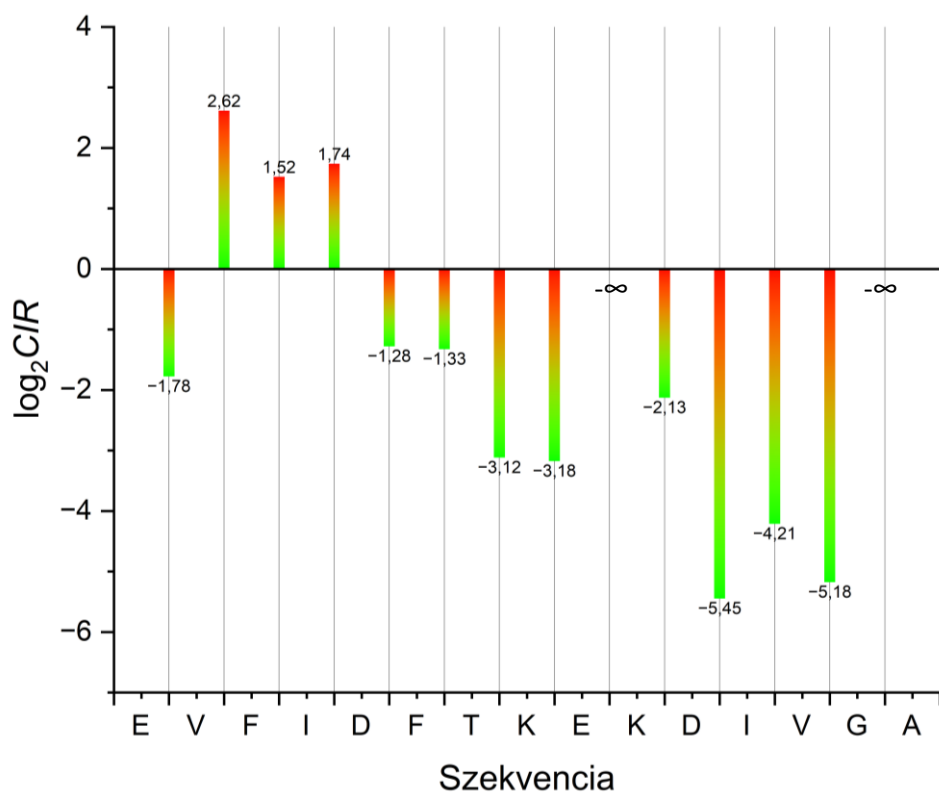
F8. ábra A NLMAGHWVA szekvenciájú, kétszeresen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 30 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó log₂CIR értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



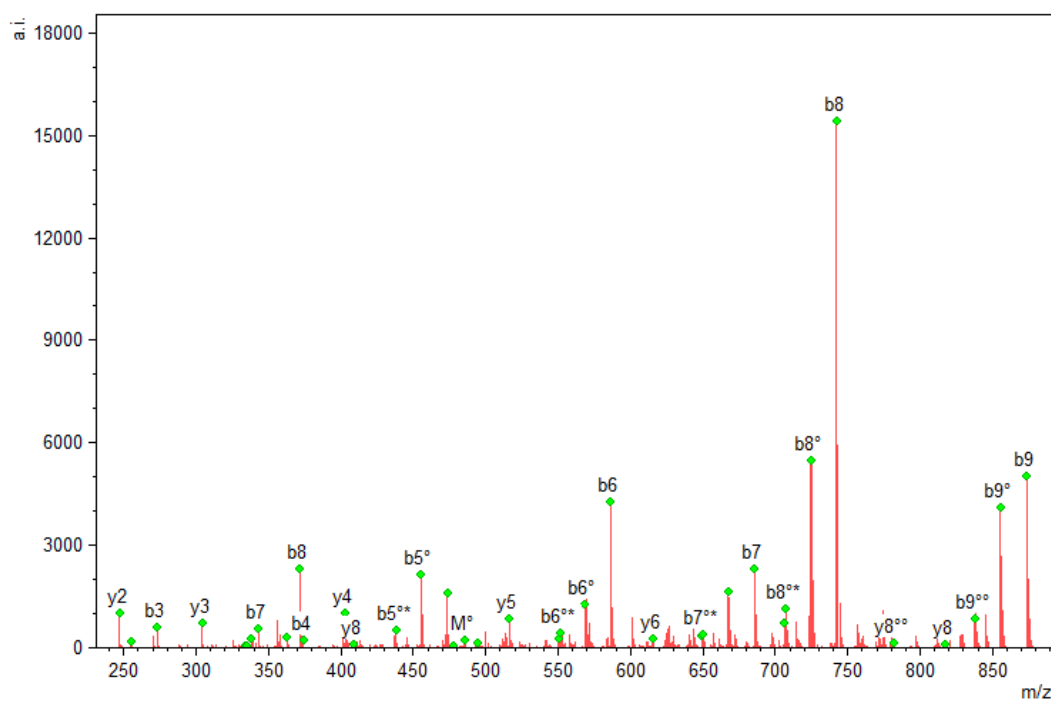
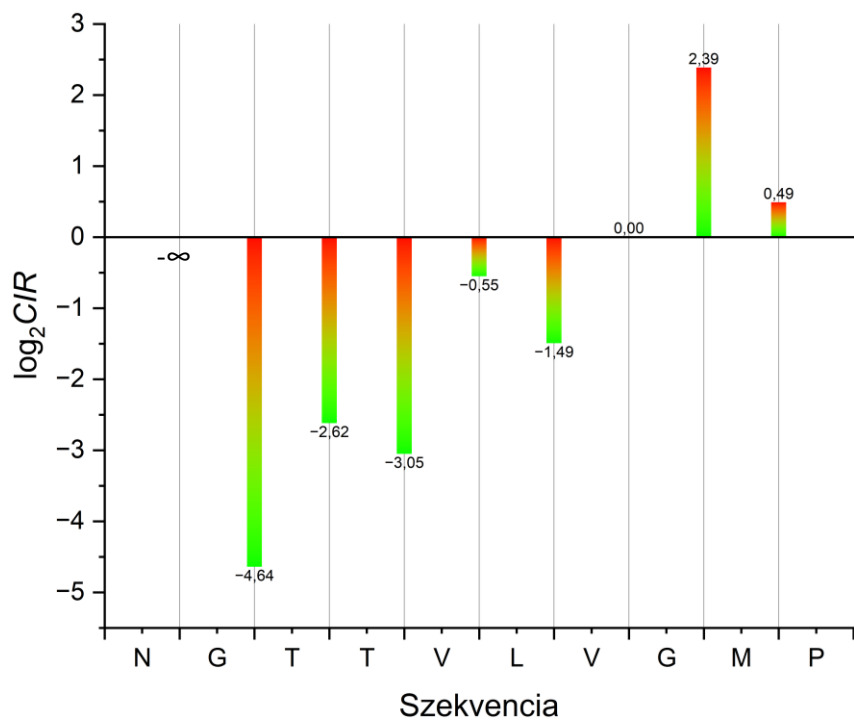
F9. ábra A GITVYKALKSA szekvenciájú, kétszeresen protonált, parciálisan protonmobilis peptid MS/MS spektruma 30 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó $\log_2 CIR$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



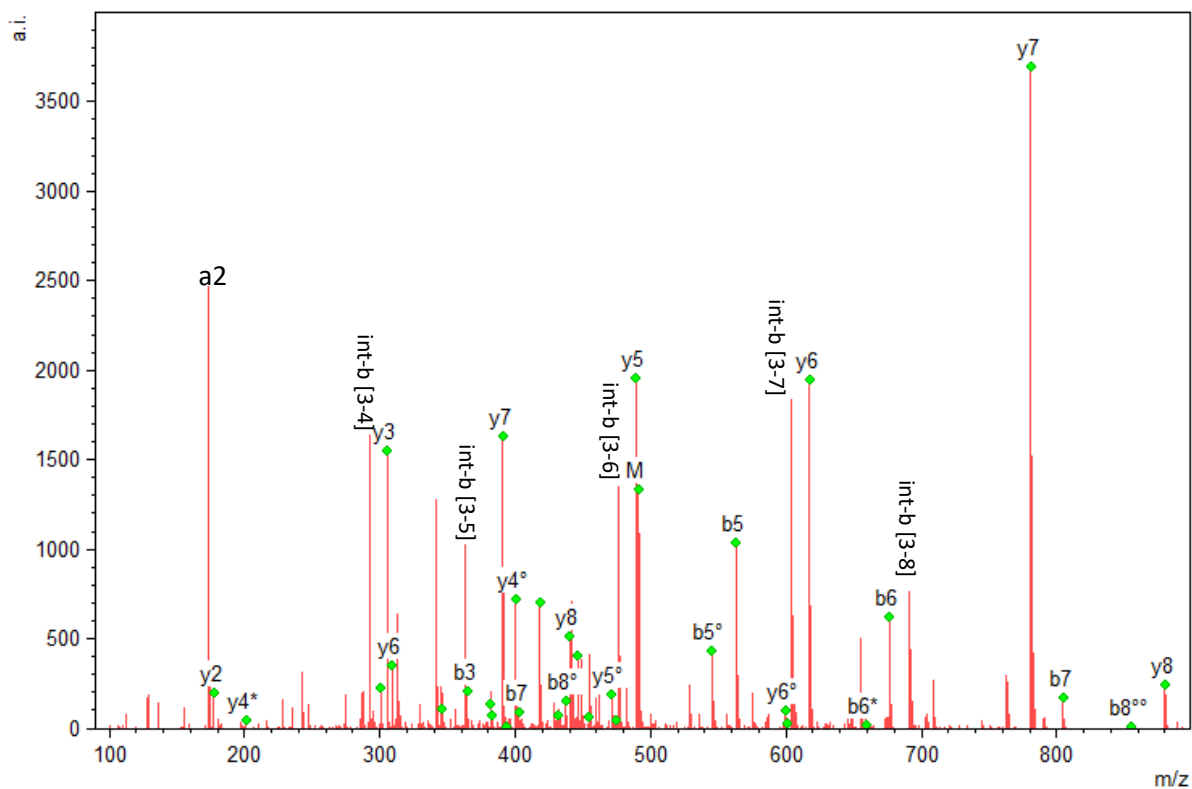
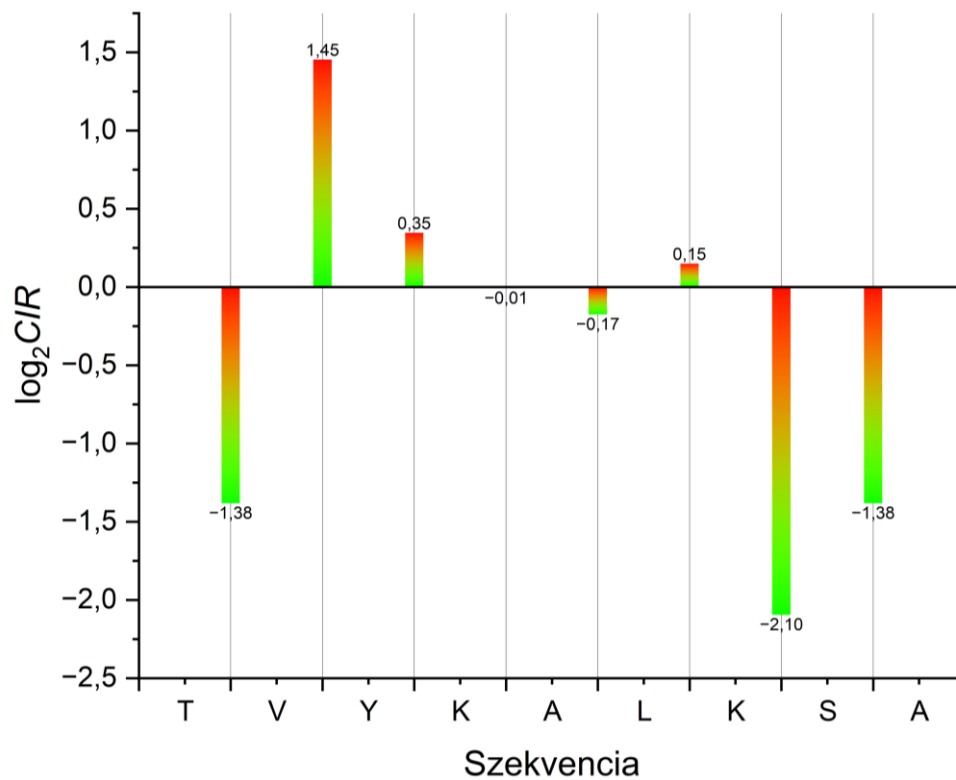
F10. ábra A GVCHTDLHAWHGDWP szekvenciájú, háromszorosan protonált, parciálisan protonmobilis peptid MS/MS spektruma 35 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó log₂CIR értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



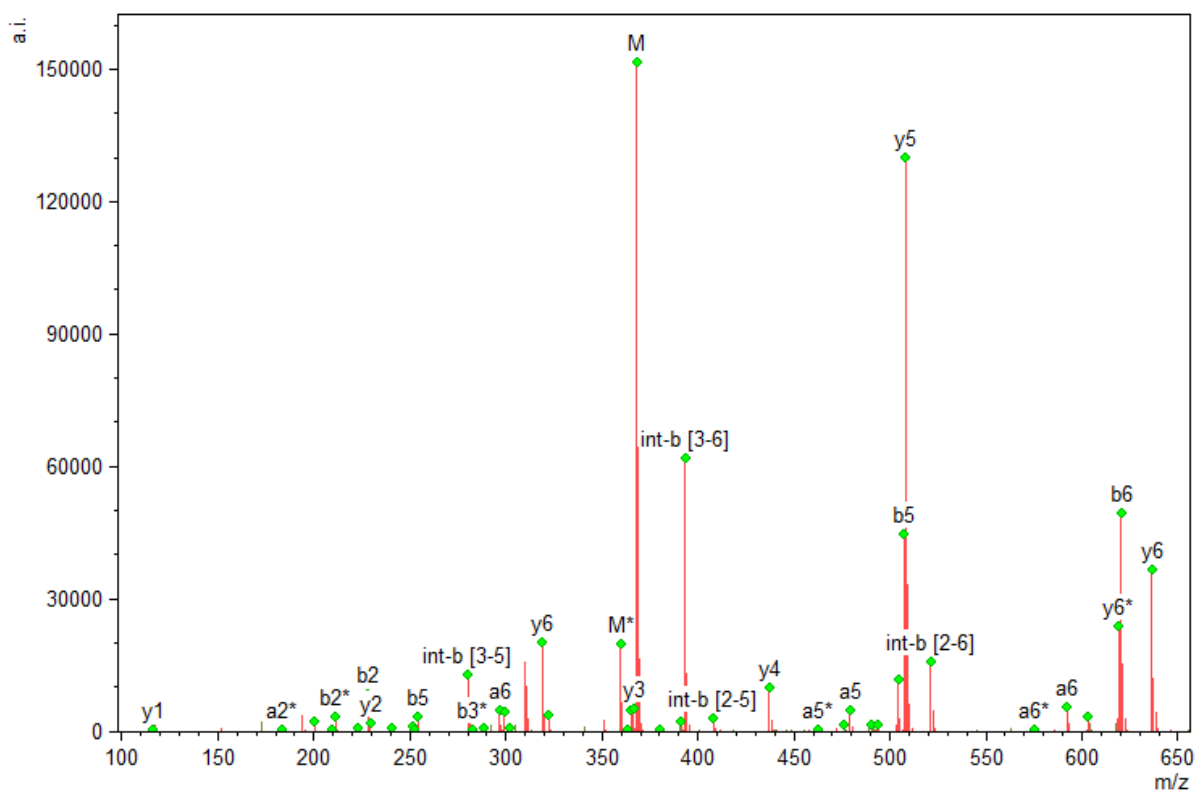
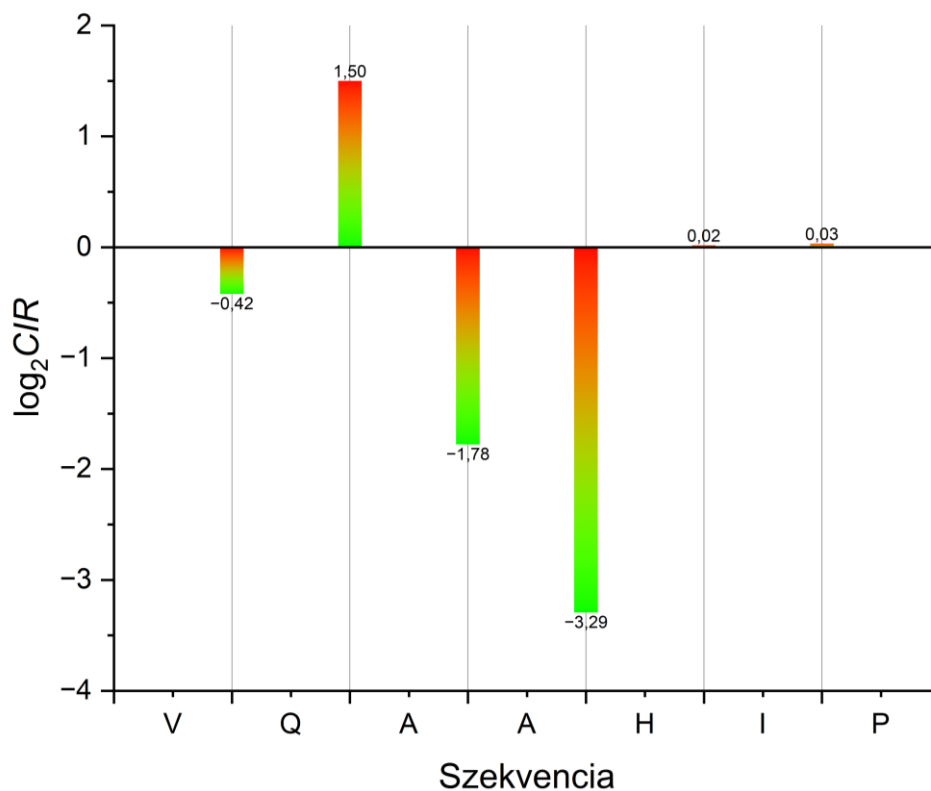
F11. ábra A EVFIDFTKEKDIVGA szekvenciájú, háromszorosan protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 30 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseéhez tartozó $\log_2 CIR$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



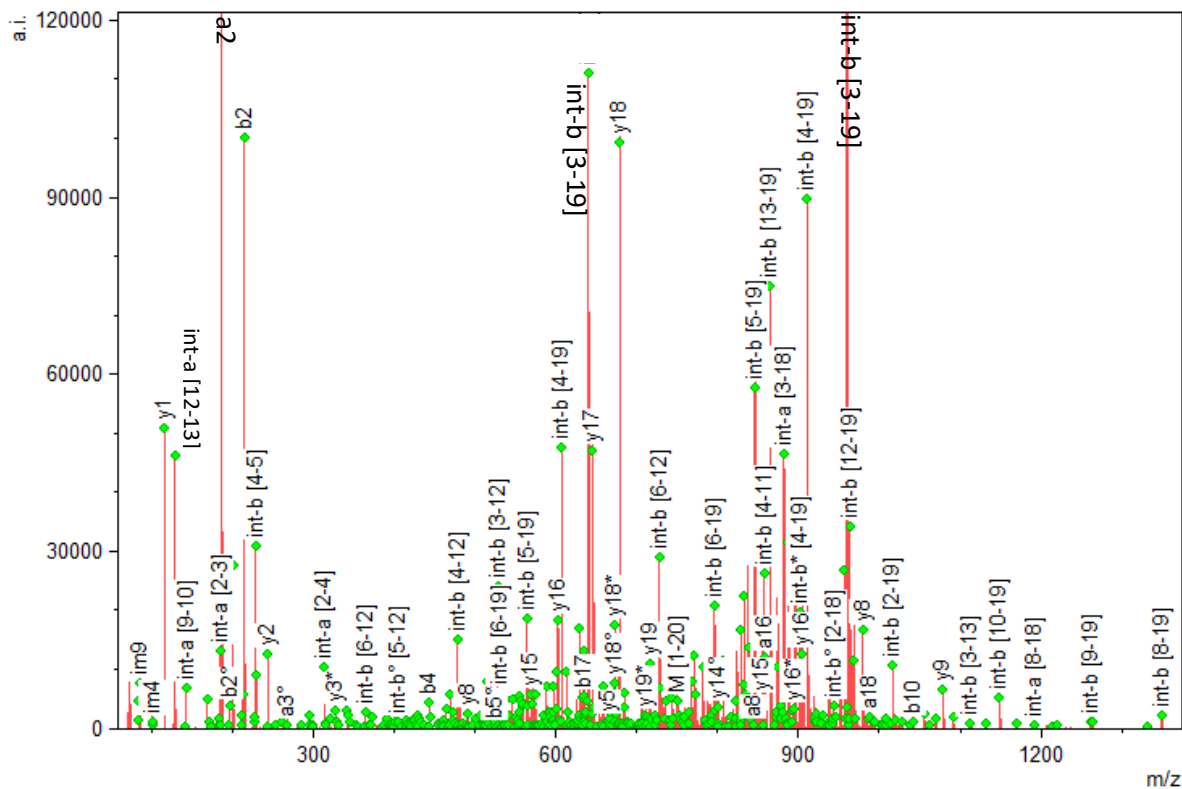
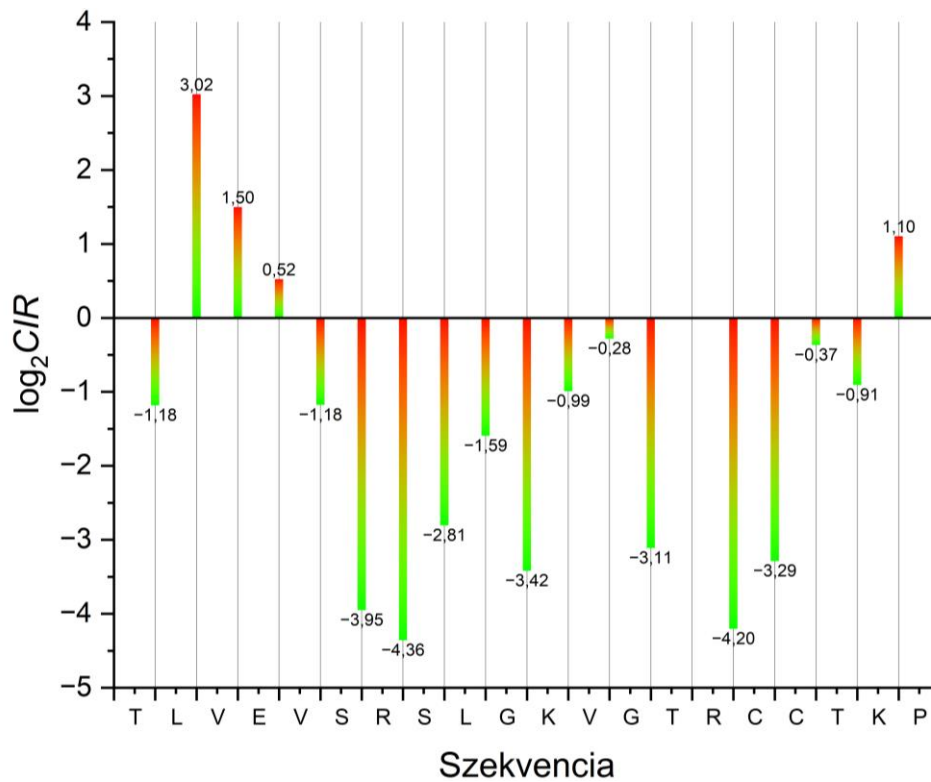
F12. ábra A NGTTVLVGMP szekvenciájú, kétszeresen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 25 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó log₂CIR értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



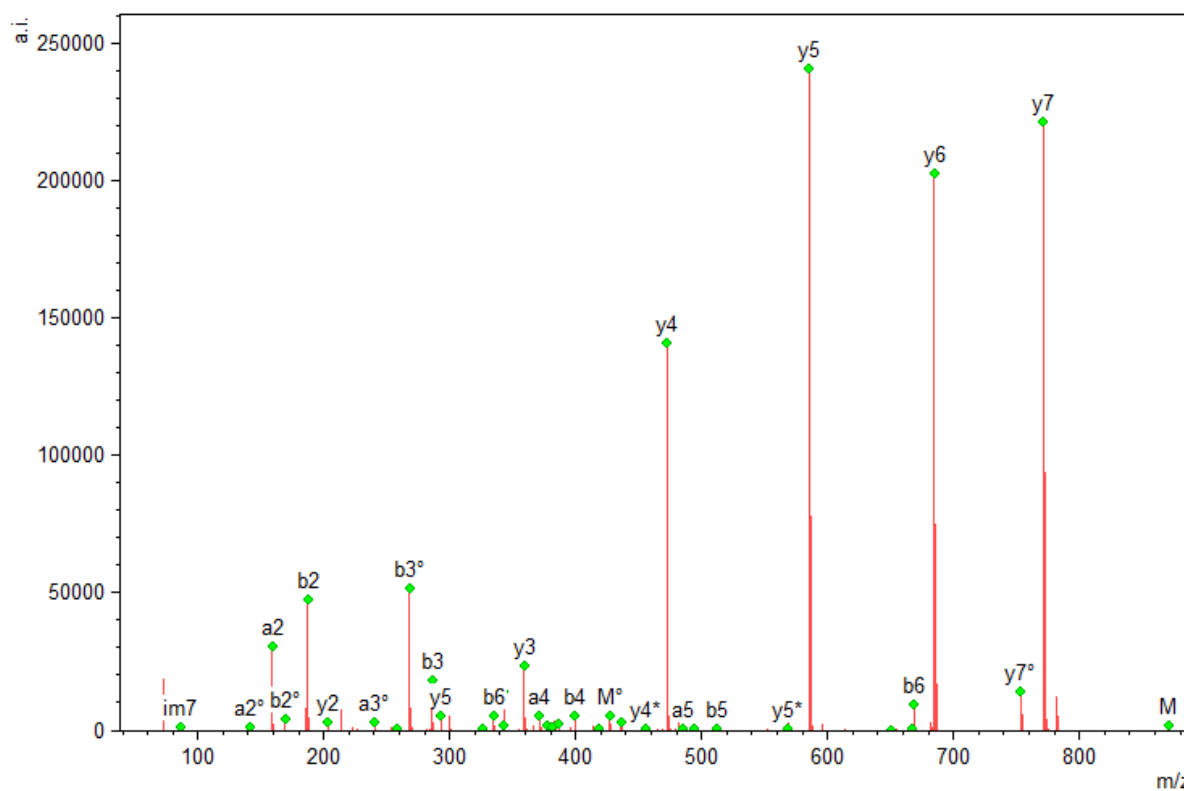
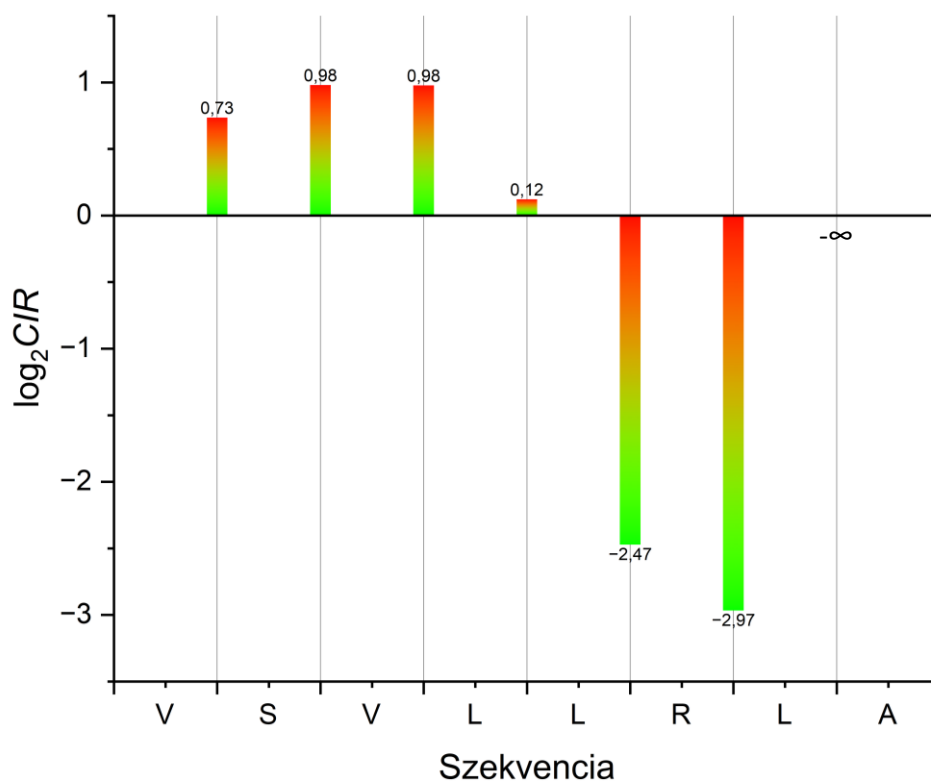
F13. ábra A TVYKALKSA szekvenciájú, kétszeresen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 35 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó log₂CIR értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



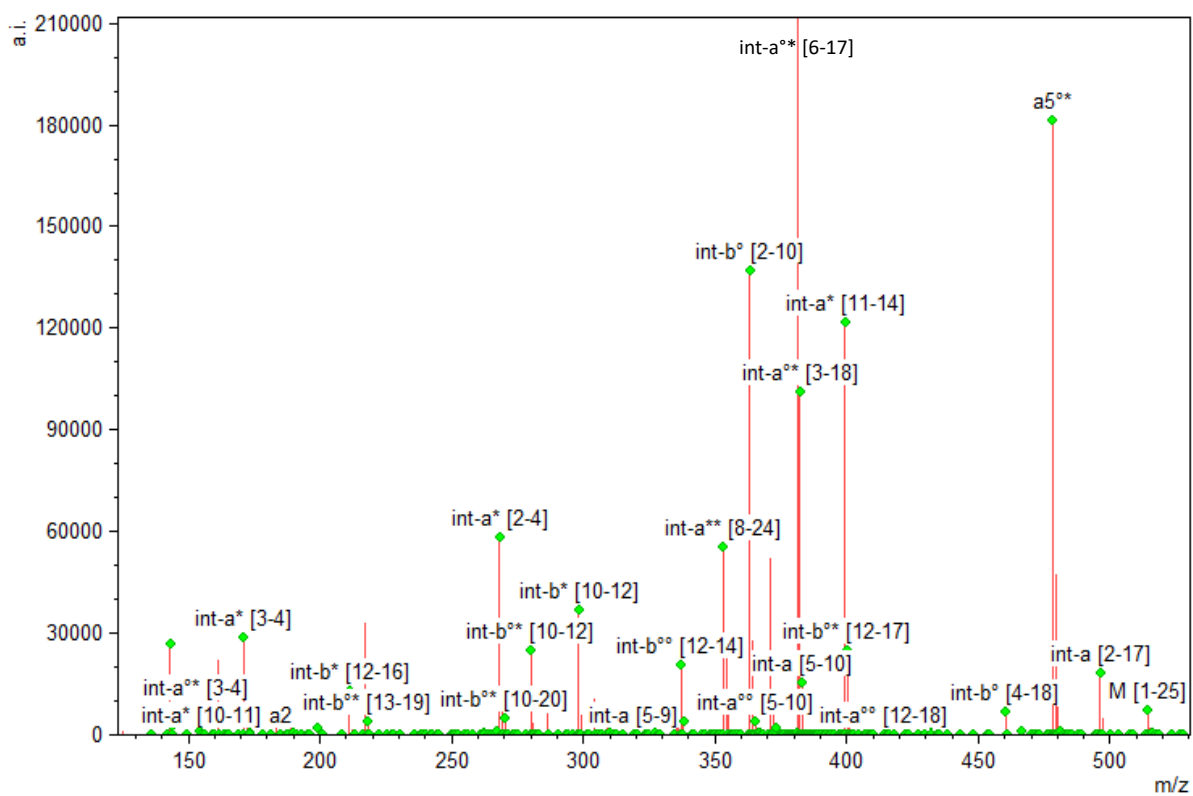
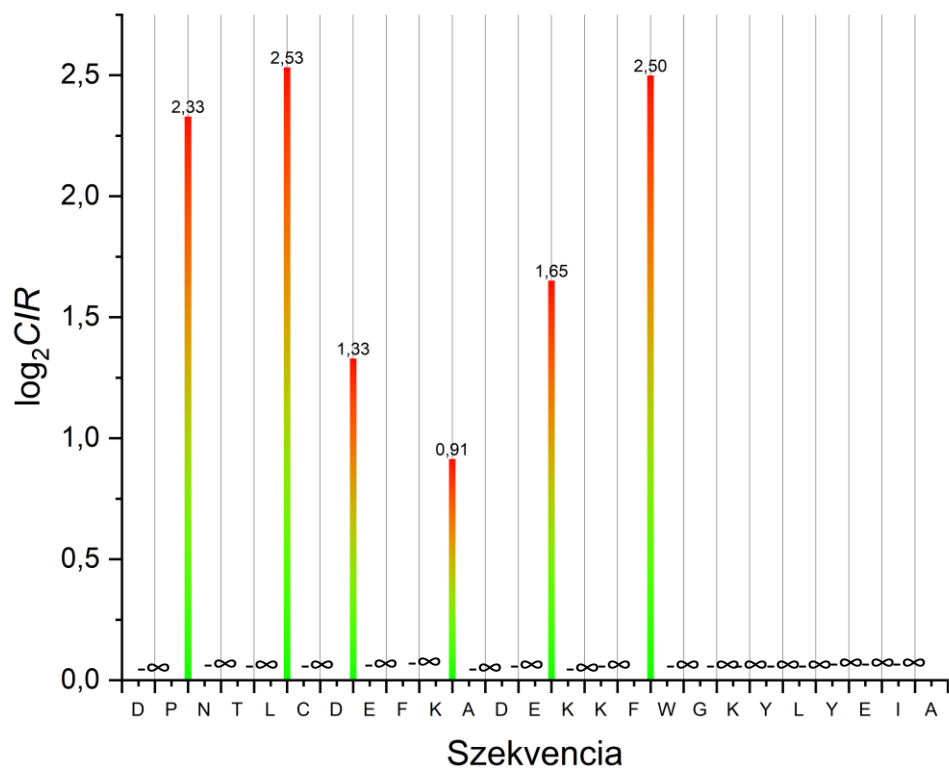
F14. ábra A VQA AHIP szekvenciájú, kétszeresen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 20 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó $\log_2CIR$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



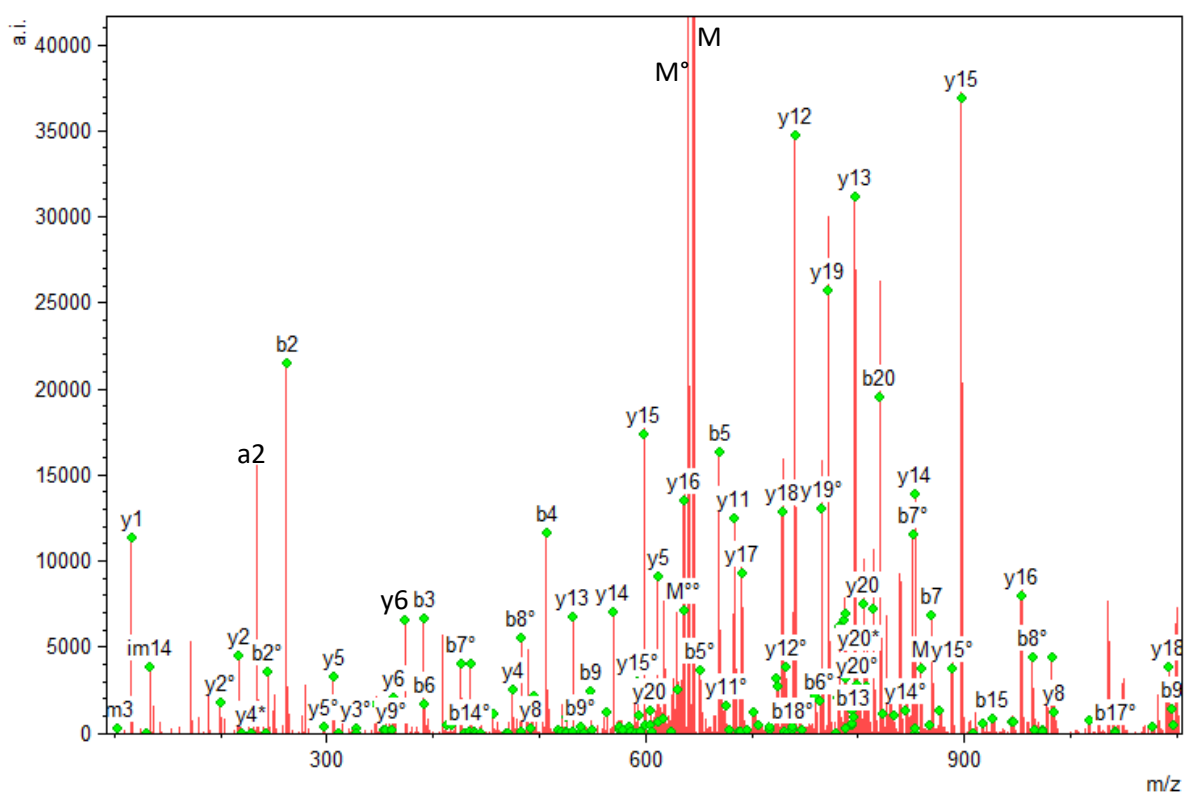
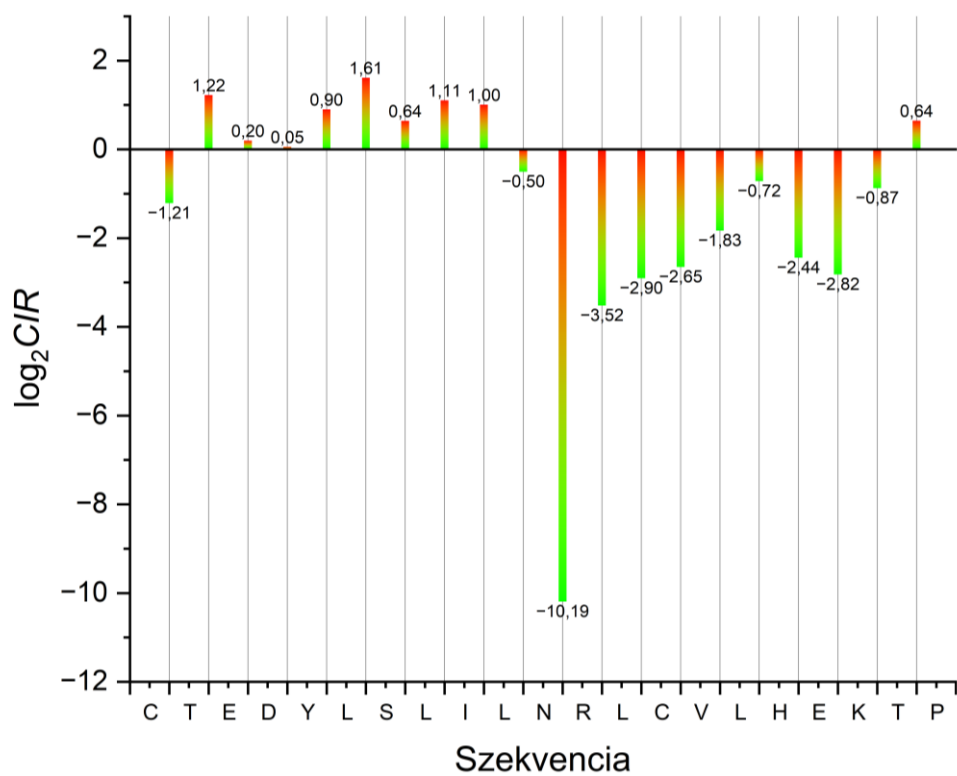
F15. ábra A TLVEVSRSLGKVGTRCCTKP szekvenciájú, háromszorosan protonált, parciálisan protonmobilis peptid MS/MS spektruma 30 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó log₂CIR értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



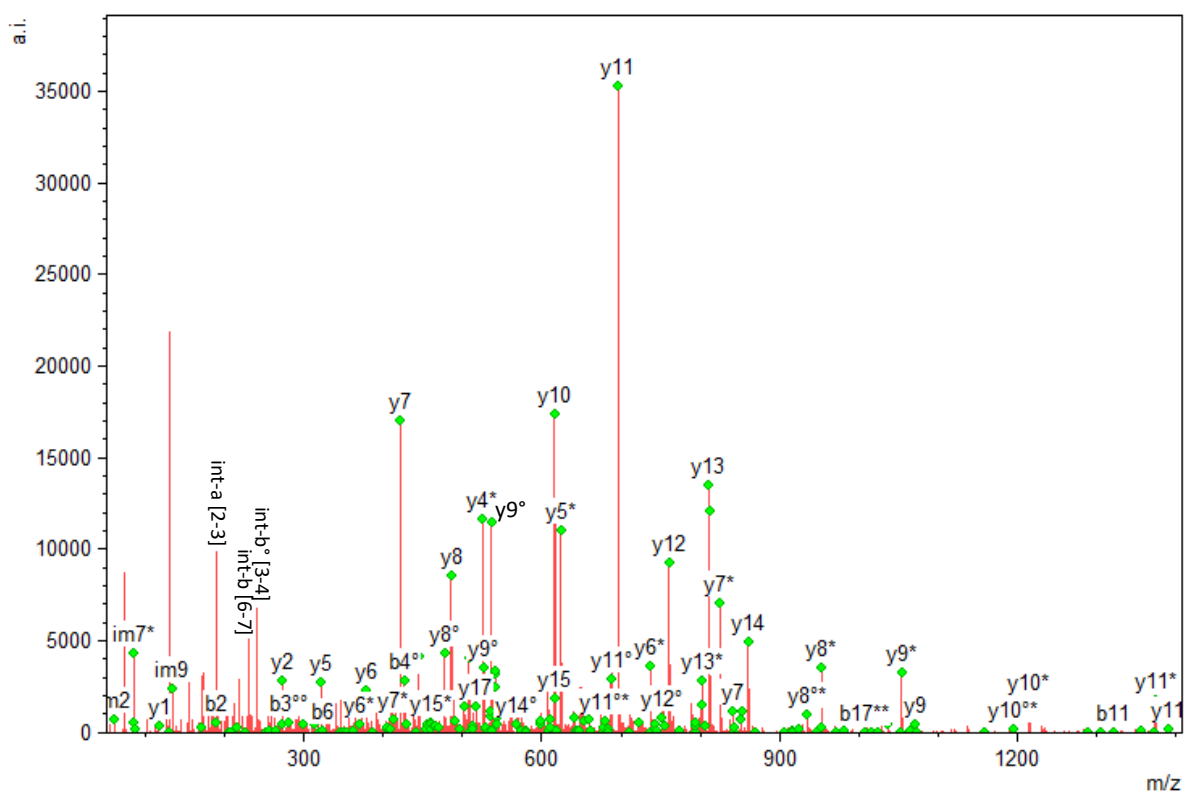
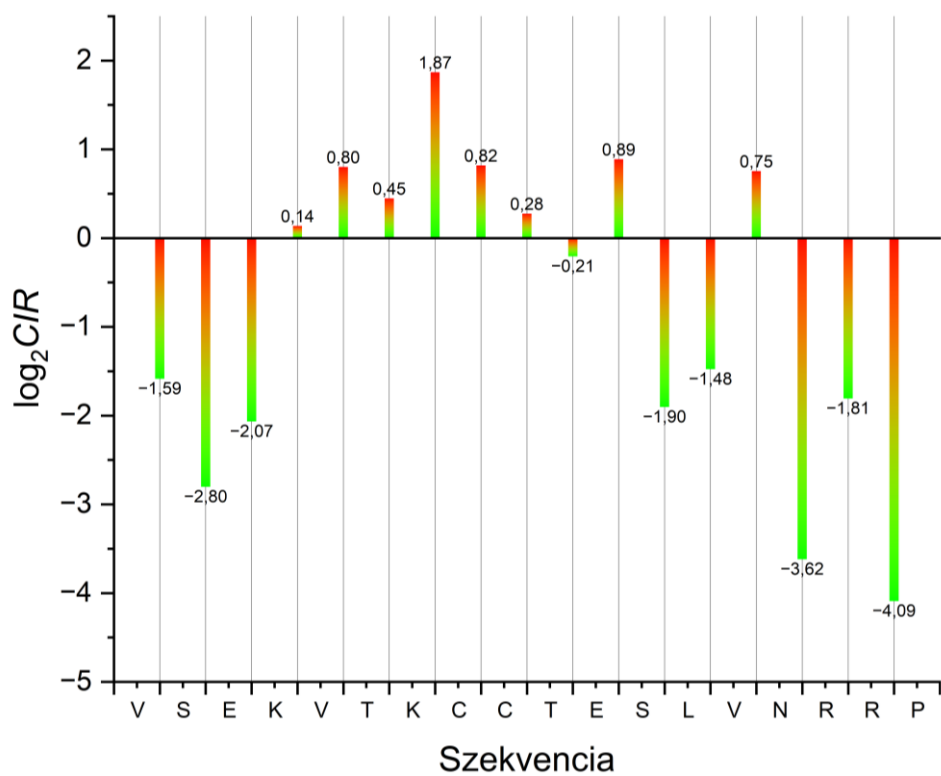
F16. ábra A VSVLLRLA szekvenciájú, kétszeresen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 20 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó $\log_2 C/R$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



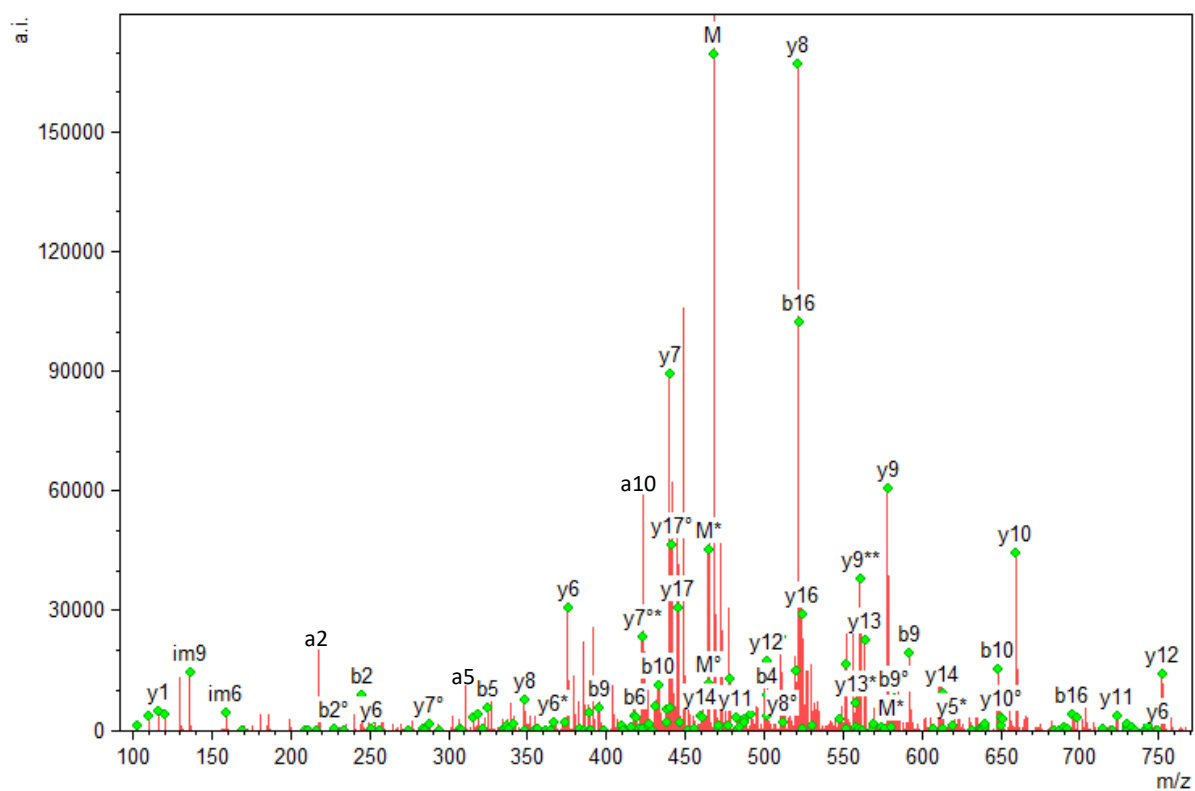
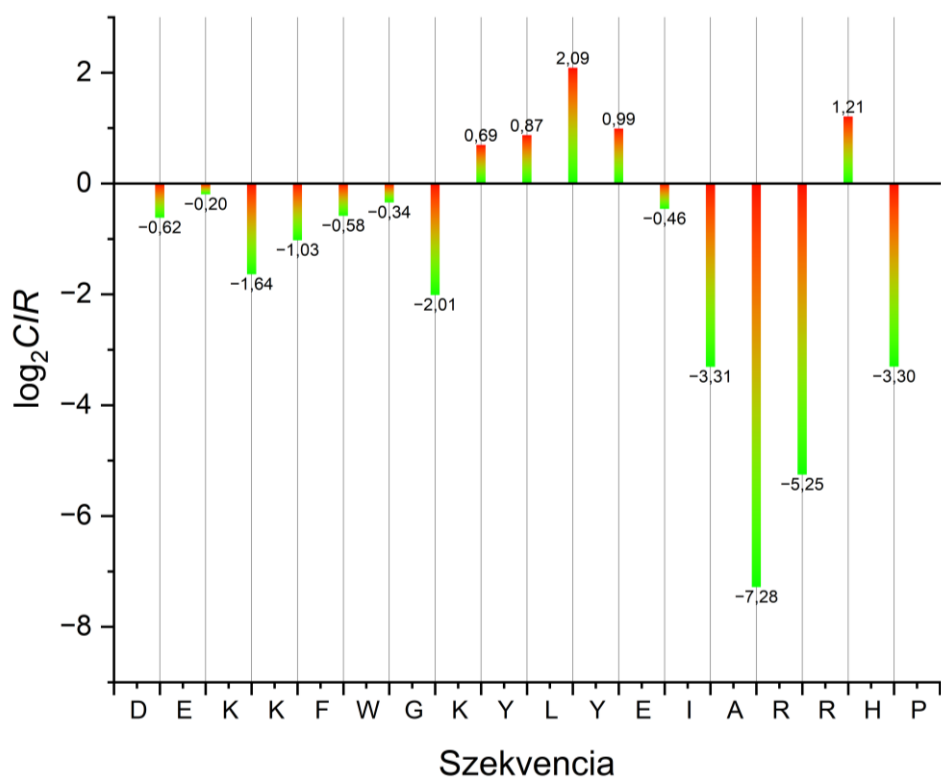
F17. ábra A DPNTLCDEFEKKADEKKFWGKYLEIA szekvenciájú, hatszorosan protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 25 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó log₂CIR értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



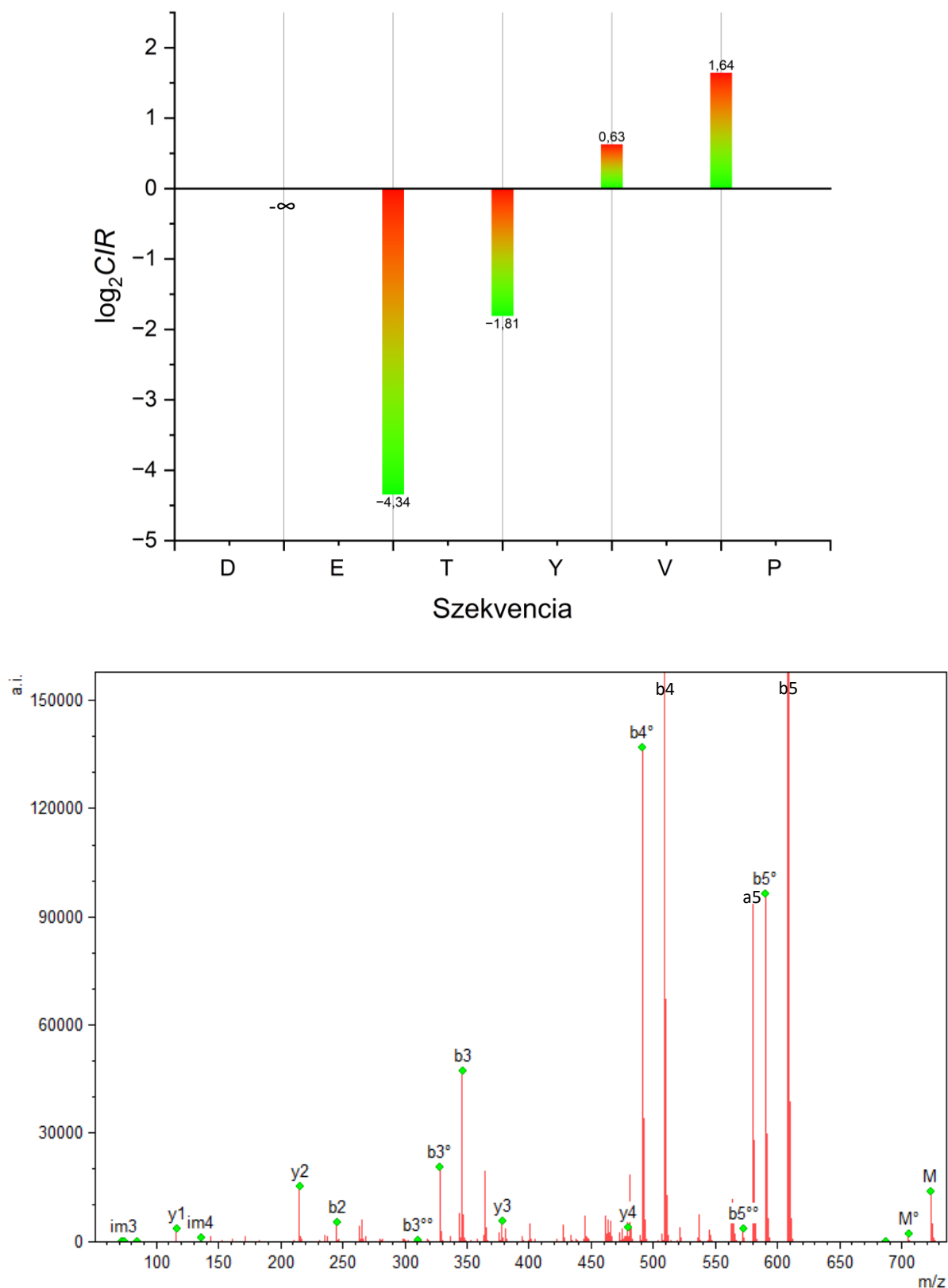
F18. ábra A CTEDYLSLILNRLC V L H E K T P szekvenciájú, négyszeresen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 25 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó log₂CIR értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



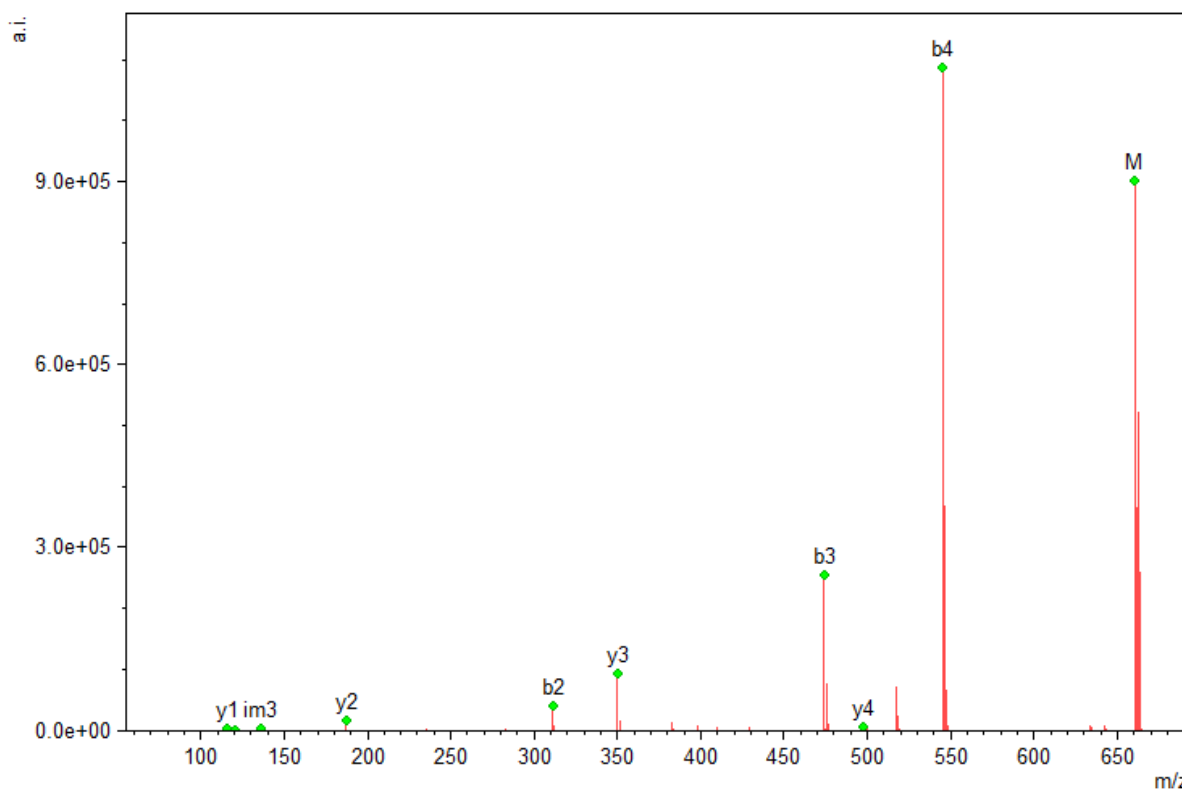
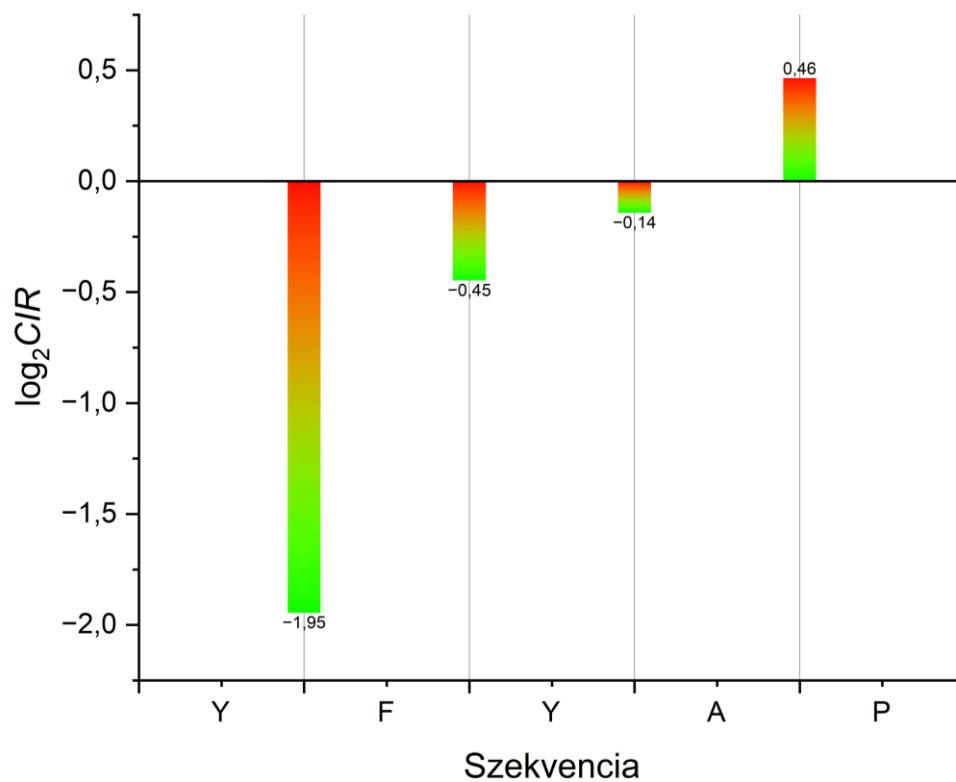
F19. ábra A VSEKVTKCTESLVNRRP szekvenciájú, ötszörösen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 25 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó log₂CIR értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



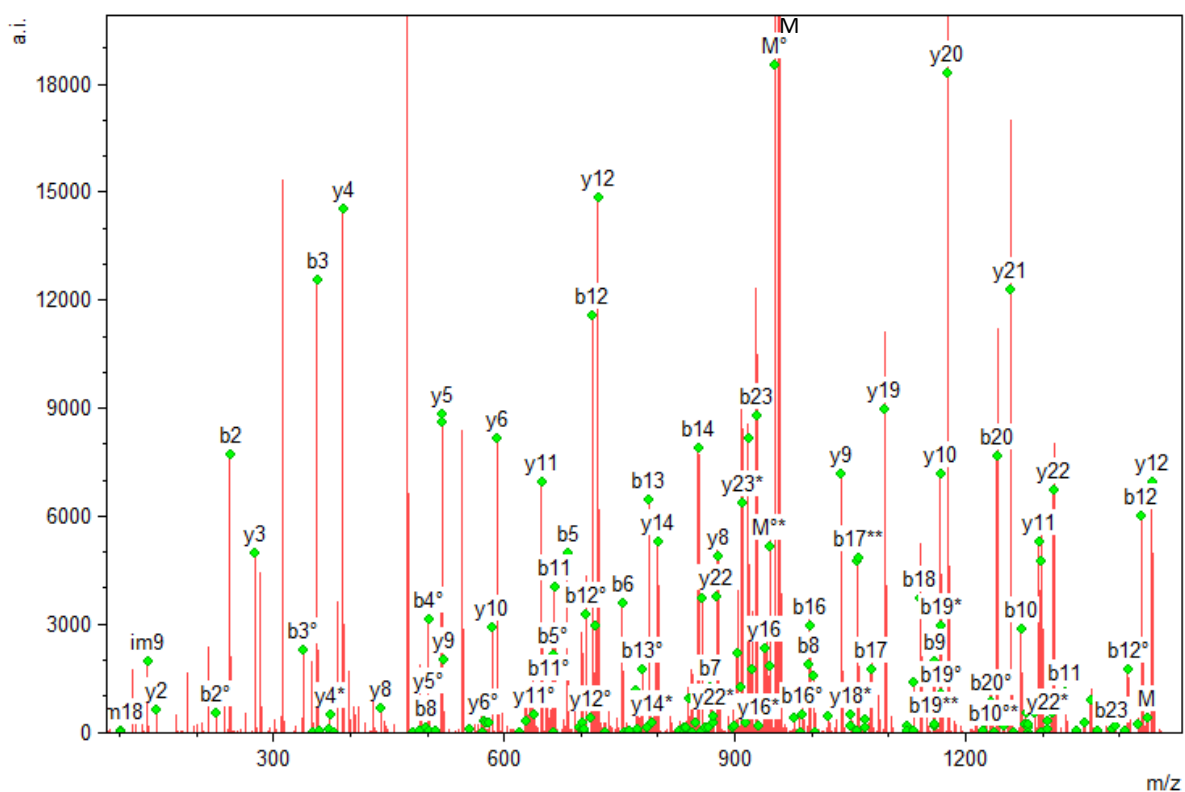
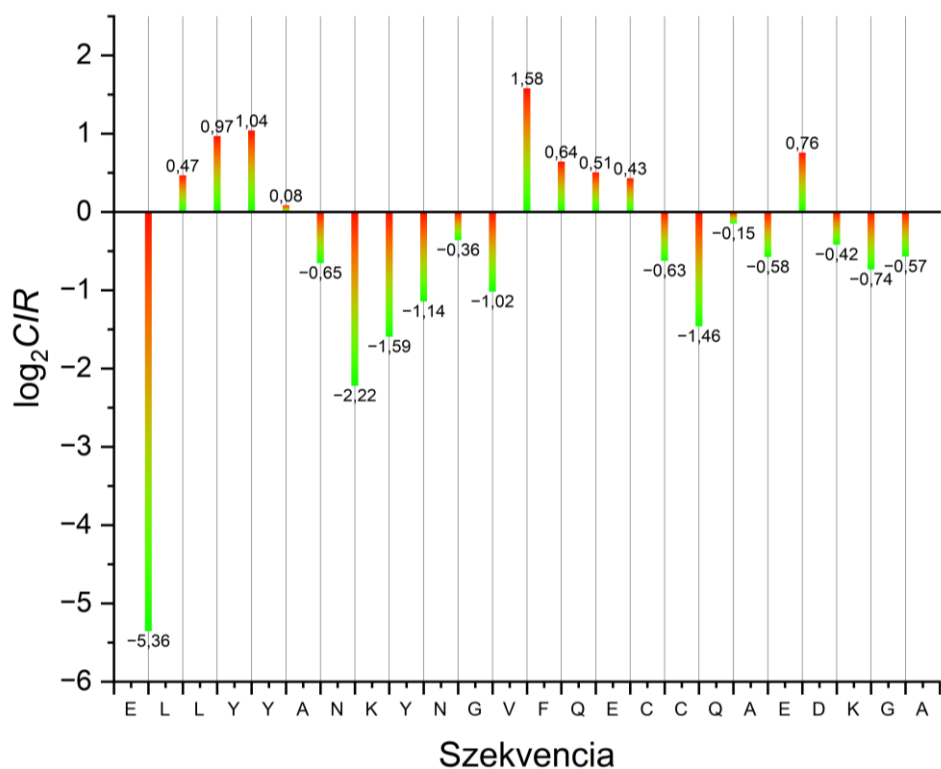
F20. ábra A DEKKFWGKYLLEYEIRRHHP szekvenciájú, ötszörösen protonált, parciálisan protonmobilis peptid MS/MS spektruma 20 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötésiéhez tartozó $\log_2 C/R$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



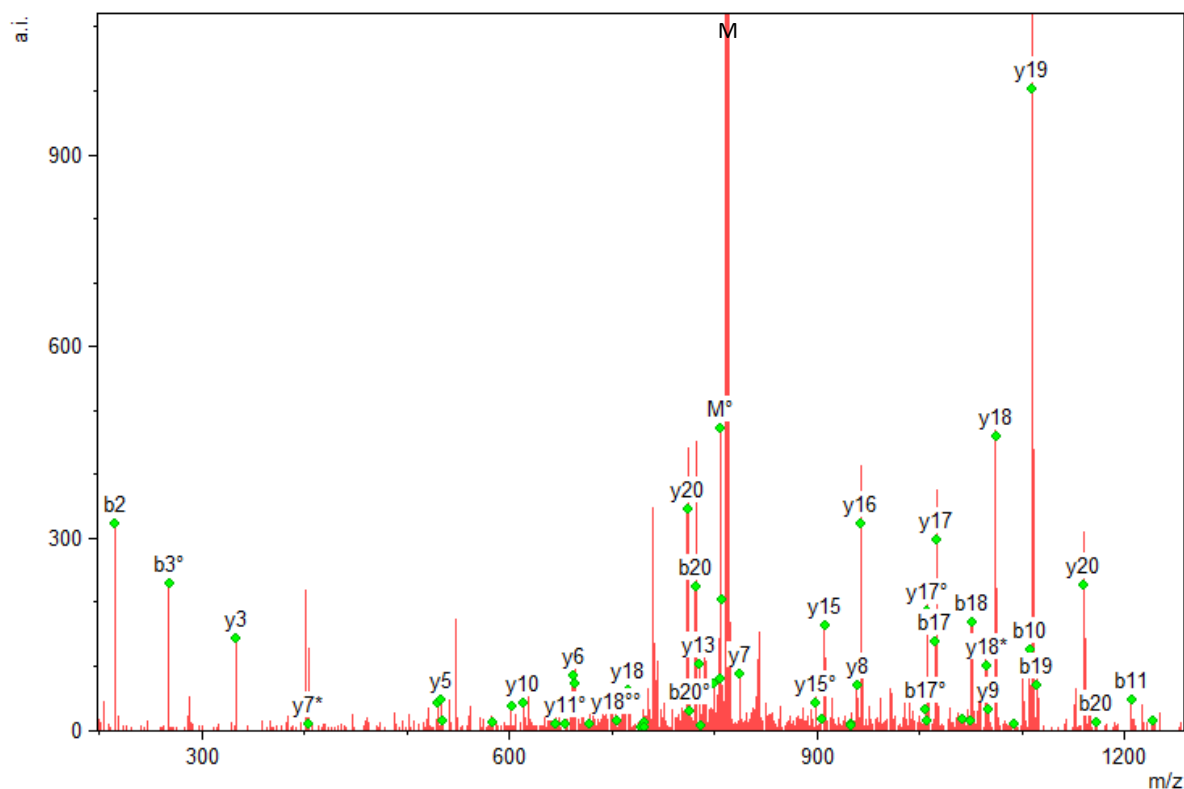
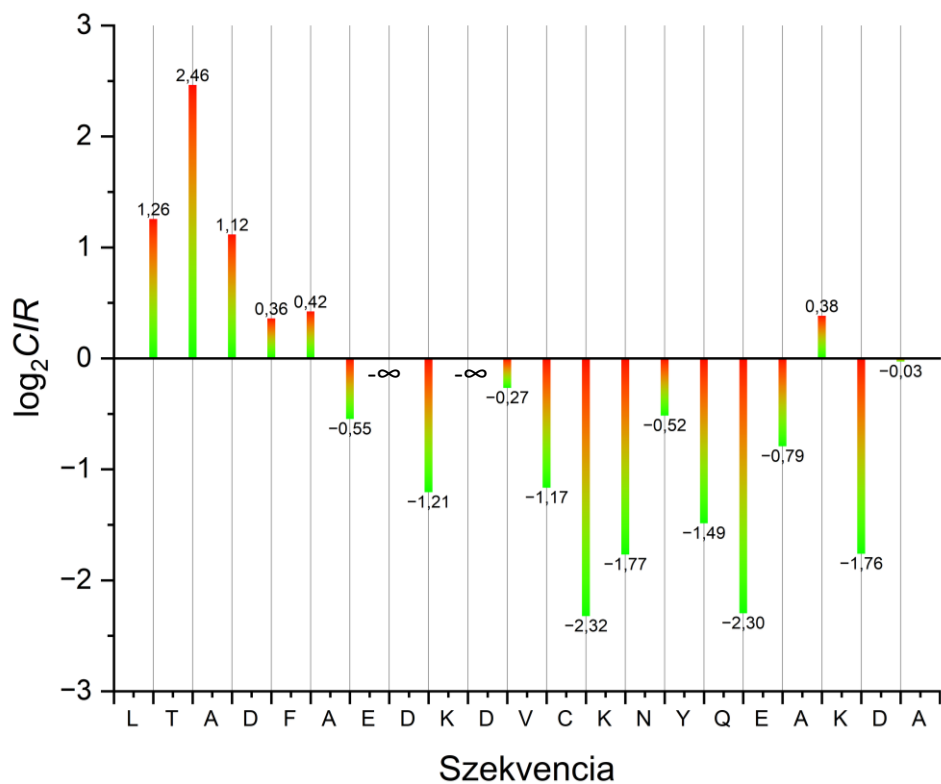
F21. ábra A DEITYVP szekvenciájú, egyszerűen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 30 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó $\log_2 C/R$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



F22. ábra A YFYAP szekvenciájú, egyszeresen protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 20 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó log₂CIR értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



F23. ábra A ELLYYANKYNGV FQECCQAEDKGA szekvenciájú, háromszorosan protonált, protonmobilis peptid MS/MS spektruma 30 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó log₂CIR értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.



F25. ábra A LTADFAEDKDVCKNYQEAKDA szekvenciájú, háromszorosan protonált, parciálisan protonmobilis peptid MS/MS spektruma 35 V ütközési energián a készülék Transfer cellájában (lent) és a kötéseikhez tartozó $\log_2 CIR$ értékek (fent). M a prekursoriont jelöli, * az ammóniavesztést, ° a vízvesztést.