

Proteomics

Analytik von humanen Serumproteinen durch massenspektrometrische Identifikation „peptide mass fingerprint“

1. Theorie

1.1 Massenspektrometrie

1.1.1 Überblick

Die Massenspektrometrie ist eine Untersuchungstechnik zur Bestimmung der Molmasse freier, gasförmiger Ionen im Hochvakuum. Der prinzipielle Aufbau eines Massenspektrometers wird in Abbildung 3 wiedergegeben.

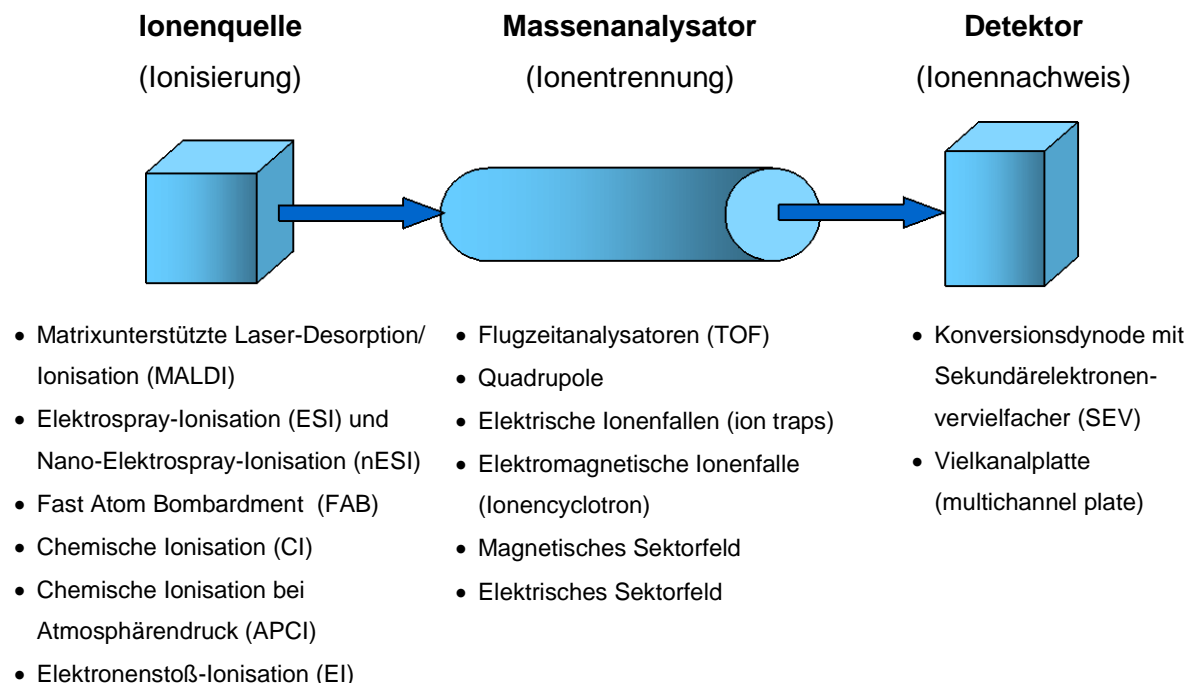


Abbildung 3: Komponenten eines Massenspektrometers [1]

In der Ionenquelle wird aus einer Probe ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt. Diese werden in einem Massenanalysator hinsichtlich des Masse/Ladungs-Verhältnisses aufgetrennt. In

einem nachgeschalteten Detektor wird mit entsprechender Datenverarbeitung ein Massenspektrum erzeugt. [1]

1.1.2 Ionisierungstechniken

Zur Ionisierung von Molekülen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (vgl. Abbildung 3). Durch die Aufnahme oder Abgabe eines Protons oder Elektrons werden die Analytmoleküle ionisiert. Hierzu beschießt man die Probe beispielsweise mit Elektronen (Elektronenstoß-Ionisation, EI), mit Atomen oder Ionen (Fast atom bombardement, FAB) oder mit Photonen (Laser-Desorption/Ionisation, LDI). Ein anderer Weg zur Erzeugung von Ionen ist das Versprühen einer flüssigen Phase in einem elektrischen Feld (Elektrospray-Ionisation, ESI). [4,1]

Matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)

Die MALDI-MS zählt zu den „weichen“ Ionisierungsmethoden, da die Probenmoleküle bei der Ionisierung nicht in Fragmente zerfallen. Bei der Ionisierung entstehen vorrangig Ionen der Form $[M+H]^+$.

Das Prinzip eines MALDI- Prozesses ist in Abbildung 4 dargestellt.

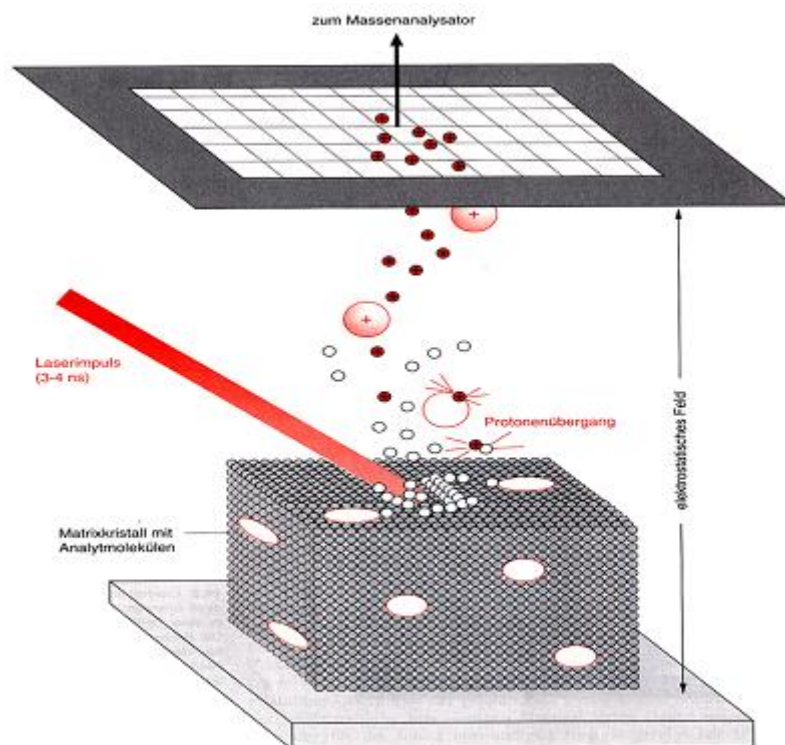


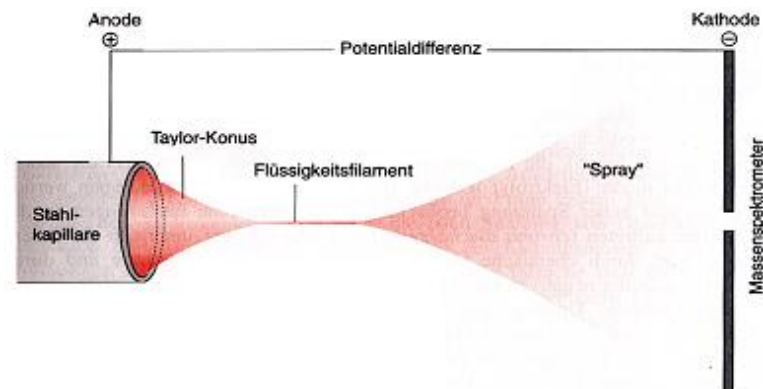
Abbildung 4: Prinzip des MALDI-Prozesses [1]

Proben, die mittels MALDI analysiert werden, müssen zunächst mit einer Matrix gemischt und anschließend auf eine Edelstahlplatte als Probenträger aufgebracht werden. Beim Verdunsten der Lösungsmittelmoleküle kommt es zur Cokristallisation von Matrix und Probenmoleküle, d.h. die Analytmoleküle werden in das Kristallgitter der Matrixmoleküle eingebaut. Im Hochvakuum wird die präparierte Probe mit einem gepulsten UV-Laser beschossen. Als Laser werden meist Stickstofflaser ($\lambda = 337 \text{ nm}$) mit einer Impulsdauer von 3-5 ns oder Nd-YAG-Laser ($\lambda = 355 \text{ nm}$) mit einer Impulsdauer von 5-15 ns eingesetzt. Durch den Beschuss verdampfen und ionisieren die Probenmoleküle mit Hilfe der im Überschuss vorhandenen Matrix.

Die verwendeten Matrices sind meist kleine organische Moleküle, die bei der eingestrahnten Wellenlänge einen Großteil der zugeführten Energie absorbieren. Die Matrix, in die die Probe eingebettet ist, hat mehrere Aufgaben. Da sie die Energie aus dem Laserpuls absorbiert, wird die Probe vor photolytischer Zersetzung geschützt. Des Weiteren dient die Matrix der Übertragung der zur Desorption notwendigen Energie auf die Probe. Die für die Ionisierung erforderlichen Protonen werden von der beigefügten Trifluoressigsäure (TFA) zur Verfügung gestellt. [1,4,5]

Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Das Prinzip der ESI-Technik ist in folgender Abbildung dargestellt:



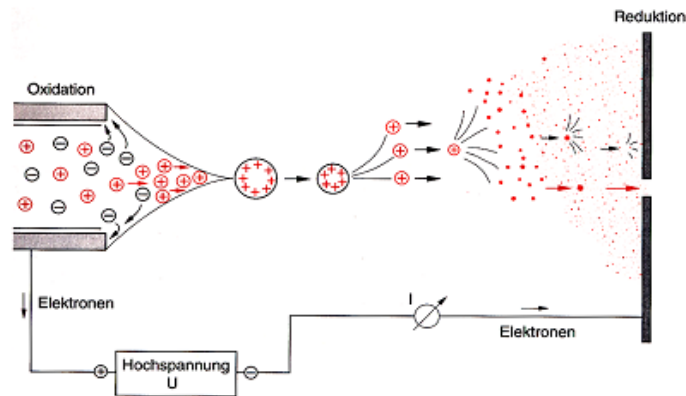


Abbildung 5: Prinzip der ESI [1]

Bei dieser Ionisierungsart wird ein Flüssigkeitsstrom durch eine Kapillare, an der ein elektrisches Feld anliegt in das MS geleitet. Die Flüssigkeit bildet hierdurch beim Austreten aus der Kapillare einen Kegel aus, den Taylor-Konus. Je nach Feldrichtung bilden sich negative oder positive Ionen, die sich an der Spitze des Kegels ansammeln und geladene Tröpfchen bilden. Ist das anliegende elektrische Feld ausreichend groß, wird ein anhaltender Flüssigkeitsstrom von wenigen Mikrometern Durchmesser erzeugt.

Beim ESI-Prozess entstehen charakteristischerweise mehrfach geladene Ionen, Moleküle kleiner 1000 Da bilden mitunter nur einfach geladene Ionen. Die Elektrospray-Ionisation zählt wie die Ionisierung mittels MALDI zu den „weichen“ Ionisierungsarten, d.h. auch hier tritt bei der Ionisierung kein Zerfall in Fragmente auf. [1,5]

1.1.3 Massenanalytoren

Flugzeit- (TOF-) Analytoren

TOF-Analytoren (vom engl. time of flight) sind die am häufigsten eingesetzten Massenanalytoren in der MALDI-MS. Die Bestimmung der Ionenmassen erfolgt über die Messung der Zeit, die die Ionen zum Zurücklegen der Strecke von der Quelle bis zum Detektor benötigen. Schwere Ionen sind langsamer als leichte und treffen daher später am Detektor an. Den erzeugten Ionen wird durch ein elektrisches Feld eine bestimmte kinetische Energie zugeführt, sie werden hierdurch beschleunigt und treten in ein Flugrohr ein. Hierin durchlaufen sie eine feldfreie Driftstrecke und werden aufgetrennt. Diese Auftrennung erfolgt, da Ionen mit unterschiedlichen Masse/Ladungs-Verhältnissen in der Quelle die gleiche kinetische Energie zugeführt wird, sie hierdurch aber auf unterschiedliche Geschwindigkeiten beschleunigt werden. Die kinetische Energie der Ionen beträgt nach Durchlaufen der Beschleunigungsspannung U :

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot U$$

Hierin ist:

m = Masse des Ions

v = die Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke

z = Ladungszahl

e = Elementarladung

Aus der Gesamtflugzeit t und der Länge L der feldfreien Driftstrecke des Flugrohres lässt sich die Geschwindigkeit v berechnen, gemäß:

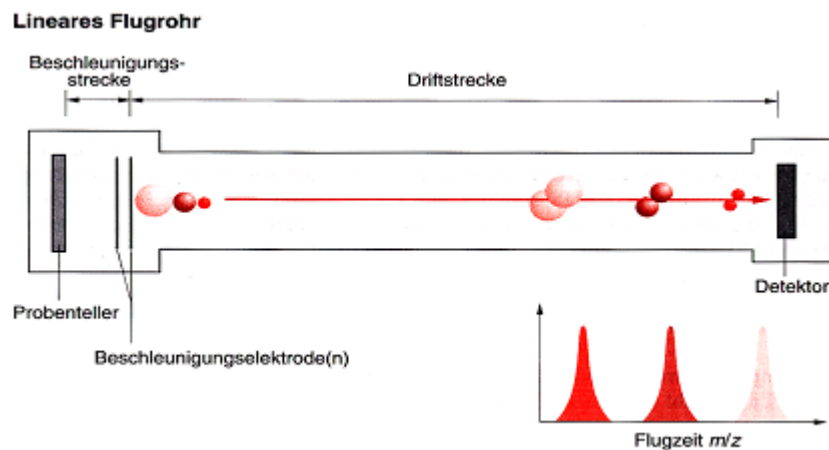
$$v = \frac{L}{t}$$

Einsetzen in obige Gleichung und Umstellung nach m/z liefert:

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U}{L^2} \cdot t^2$$

Das Masse/Ladungsverhältnis ist in einem TOF-MS dem Quadrat der Flugzeit proportional, daher lässt sich aus der gemessenen Flugzeit die jeweilige Masse ermitteln. [1,4,5]

Es gibt zwei unterschiedliche Arten von Flugrohren (vgl. Abbildung 6):



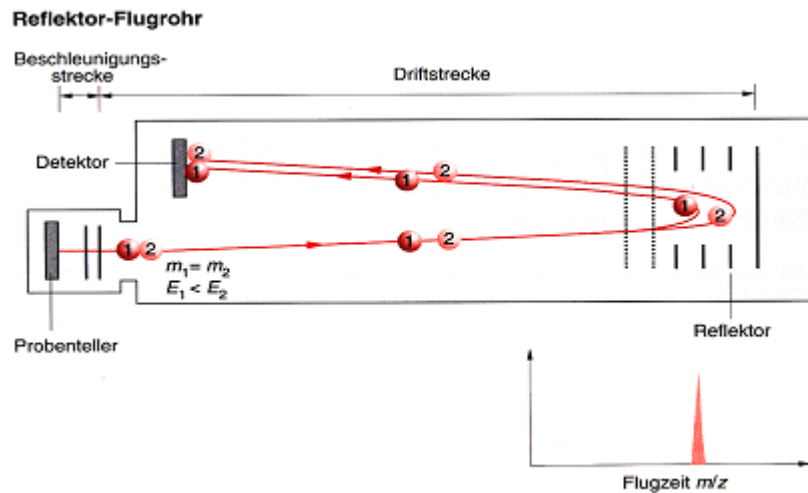


Abbildung 6: Prinzip eines linearen TOF-MS und eines Reflektor-TOF-MS [1]

Bei einem linearen Flugrohr befindet sich der Detektor am Ende des Flugrohres. Mit dieser Methode lassen die Massen großer Moleküle gut bestimmen, allerdings ist Auflösung in diesem Modus nicht optimal. Die schlechte Auflösung kommt dadurch zustande, dass Ionen gleicher Massen mit einer gewissen Verteilungsbreite der Energie starten.

Bei einem Reflektor-Flugrohr wird die Auflösung der Peaks wesentlich verbessert, da der Unterschied in der zugeführten Energie gleich schwerer Teilchen durch den Einbau eines Reflektors kompensiert wird. In einem elektrischen Gegenfeld wird die Richtung der Ionen umgekehrt. Ionen mit gleicher Masse und höherer Geschwindigkeit dringen weiter in das Gegenfeld ein, legen einen weiteren Weg im Reflektor zurück und holen die langsameren Ionen auf dem Weg zum Detektor wieder ein. Bei richtiger Einstellung befindet sich an dieser Stelle der Detektor, beide Ionen werden gleichzeitig erfasst, was in einer besseren Auflösung resultiert. [1,5]

TOF/TOF-MS

TOF/TOF-Instrumente besitzen zwei hintereinander gekoppelte Massenanalysatoren. Im ersten TOF-Analysator werden die Mutter-Ionen mit einem bestimmten Masse/ Ladungsverhältnis („precursor ions“) isoliert. Dem zweiten Analysator lässt sich eine Kollisionszelle vorschalten, in der die betreffenden Ionen mit einem Kollisionsgas zusammenstoßen und infolgedessen fragmentiert werden. Durch diese Fragmentierung wird oftmals eine Struktur- aufklärung ermöglicht. In ExpASy unter Peptide Mass (https://web.expasy.org/peptide_mass/) lassen sich die einzelnen Fragmente durch Eingabe des Namens Kürzel von z.B. Uniprot und der entsprechenden Protease hier Trypsin anzeigen. [6]

1.2 Proteinidentifikation

In nachfolgender Abbildung 7 sind einige gängige Methoden zur Proteinidentifikation dargestellt:

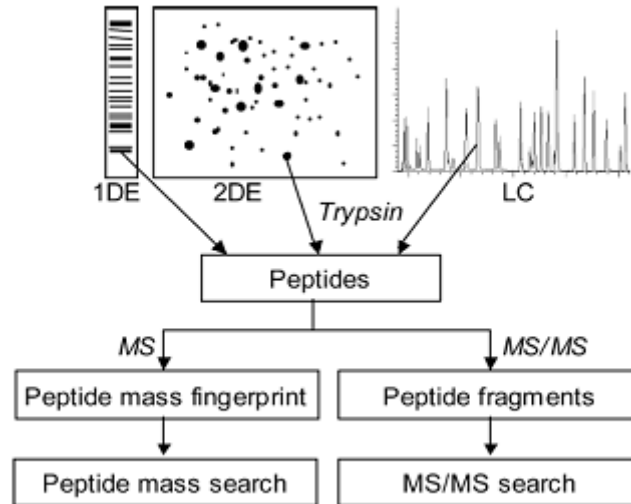


Abbildung 7: Gängige Methoden zur Proteinidentifizierung [7]

Proteingemische werden beispielsweise durch 1D- oder 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Färbung sichtbar gemachte Proteinbanden bzw. Spots werden aus dem Gel ausgeschnitten und durch enzymatischen Verdau in Peptide zerlegt. Eines der meist verwendeten Enzyme ist Trypsin, eine Serinprotease, deren katalytischer Mechanismus auf einem reaktiven Serinrest beruht. Trypsin katalysiert die Hydrolyse nach den Aminosäuren Arginin und Lysin.

1.2.1 „Peptide mass fingerprint“

Das beim tryptischen Verdau entstehende Peptidgemisch ist charakteristisch für das jeweilige Protein (peptide mass fingerprint). Im Internet kann über verschiedene Suchmasken (Profound, Mascot), anhand der gemessenen Peptidmassen, das zugehörige Protein ermittelt werden. Hierfür stehen mehrere Datenbanken wie SwissProt, MSDB, Uniprot oder NCBI zur Verfügung. [7]

2. Material und Methoden

2.1. Aufnahmen und Auswertung eines MALDI-TOF/MS-Spektrums

Spotten der Probe

Die Peptidlösung wird 1:25 und 1:1 mit MALDI-Matrix (10 mg/mL α -cyano-4-hydroxizimtsäure in ACN/H₂O mit 0,1% TFA) vermischt und auf das MALDI-Target gespottet. Pro Spot werden 0,5 μ L aufgetragen. Die notwendige Kalibration führt man mit einem Kalibrationsmix („Calmix“) durch, der Massen von 900 bis 3660 Da enthält. Der Calmixspot sollte direkt neben dem Probenspot oder zentral in einem Gebiet von bis zu zwölf Spots liegen. Die Spots werden an der Luft getrocknet und der Probenträger ins MS eingebracht. (Dried-Droplet-Methode)

Aufnahme der Spektren

Vor der Aufnahme des Spektrums lädt man im 4800 Explorer die verwendete Methode (hier Reflektor und positiver Modus) ein. Im Massenbereich bis etwa 4000 Da ist der Reflektormodus die Methode der Wahl, bei höheren Massen wird der Linearmodus benutzt. Zu den Parameter, die eingestellt werden müssen, zählen vor allem die Laserintensität, der zu untersuchende Massenbereich (i.d.R. $m/z=800-4000$) und die verwendete Matrix (α -Cyano-4-Hydroxizimtsäure). Bei welcher Laserintensität das Spektrum aufgenommen wird, muss im Einzelfall getestet werden. In den meisten Fällen wird die Intensität auf 3100 eingestellt. Die maximale Intensität liegt bei 5600. Die Abtastung des Spots durch den Laser wird bei einheitlichem Kristallbild automatisch kontrolliert (Acquisition Control – automatic). Bei ungleichmäßigem Kristallbild kann auch eine manuelle Steuerung des Lasers erfolgen. Aufgenommene Spektren werden unter „Spectrum Save to File“ abgespeichert und können im Data Explorer kalibriert und bearbeitet werden. Die Namen der Spektren sollten alle nötigen Infos der aufgenommenen Probe enthalten, da diese im Spektrum selbst nicht hinterlegt werden können. Der File sollte beinhalten Mischungsverhältnis Probe/Matrix, Matrix, Probenspot, Laserintensität sowie bei den Calmix Proben ist das entsprechende Kürzel hinten anzufügen.

Für die Sequenzierung werden die entsprechenden Acquisition und Processing Methoden aus dem Ordner Praktikum Bioanalytik eingeladen und mit dem Button „Set as Active“ auf grün geschaltet. Beim Feld „precursor ion“ wird die zu fragmentierende Masse des Peaks eingegeben. Die Laserintensität sollte so variiert werden, dass das Rauschen so gering wie möglich ist.

Kalibration

Im Data Explorer öffnet man das Spektrum des Calmixspots und führt eine manuelle Kalibration durch („*process*“ – „*mass calibration*“ – „*manual calibration*“). Hierbei öffnet sich das Kalibrationsfenster im Vordergrund des Spektrums. Bevor die Kalibration gestartet wird, muss eine Referenzdatei angegeben werden, in denen die monoisotopischen Kalibrationsmassen aufgeführt sind. Man zieht nun mit gehaltener rechter Maustaste ein Rechteck über einen monoisotopischen (Kalibrations-)Peak auf und lässt die Maustaste los. Es öffnet sich ein Fenster („*select or create reference...*“), wo die Masse des gewählten Peaks mit der Kalibrationsdatei verglichen wird. Ist als „*type*“ „*resolved*“ zu sehen, mit „*ok*“ bestätigen. Dieses Vorgehen mit allen Kalibrationspeaks wiederholen. Die Kalibration wird mit „*Plot*“ und „*Apply calibration*“ abgeschlossen.

Zur Kalibration der Probenspektren öffnet man diese und wählt über „*process*“ – „*mass calibration*“ – „*import calibration*“ die zuvor erstellte Kalibrationsdatei (*.cal) aus. Ein kalibriertes Spektrum erkennt man an dem „*MC*“ in der Überschrift.

Die Spektren können nur kopiert und dann in eine Power Point Datei eingeladen werden. Hierzu wird unter Edit→ Copy→ Trace Image das Spektrum in die Zwischenablage kopiert und anschließend in die entsprechende Power Point File einkopiert. Für die Auswertung der einzelnen Peaks lässt sich jedoch gut mit den Peaklisten (siehe Sequenzierung) arbeiten.

Sequenzierung

Das aufgenommene MS/MS Spektrum wird in den Data Explorer eingeladen. Mit dem Button „*peak list*“ können Textfiles mit allen Peaks erstellt werden. Zuvor sollte jedoch unter Peaks→ Peak Detection die S/N-Threshold auf 20 hochgesetzt werden, da sonst auch die irrelevanten Peaks aus dem Rauschen mitgenommen werden. Über den Ion Fragmentation Calculator können die möglichen Fragmente angezeigt werden. Ein direkter Vergleich mit den in ExPASy berechneten Fragmenten reicht jedoch auch aus.

Nicht zu vergessen ist, dass alle erstellten Dateien (außer den Spektren selbst), also ppt- und txt-files, noch auf den Z-Server gespeichert werden müssen. Anschließend können Sie vom Rechner aus per Mail verschickt werden.

Die Datenbankrecherche

Mit dem Makro „Get Peak List“ wird eine Liste der monoisotopischen Peptidmassen des kalibrierten Spektrums erstellt und im Result Window ausgegeben. Diese Liste wird mit Strg-a und Strg-c in die Zwischenablage kopiert.

Im Internet wird die Suchmaske Mascot geöffnet (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF).

In der Suchmaske werden folgende Eingaben gemacht:

Database	NCBIInr
Enzyme	Trypsin
Allow up to	1 missed cleavages
Taxonomy	all entries
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications	--- none selected ---
Protein mass	-leer-
Peptide tol.	0.15
Mass values	MH+
Monoisotopic	yes
Query	Peakliste aus der Zwischenablage einfügen

Die Suche wird mit „Start Search ...“ gestartet.

3. Literaturverzeichnis

- [1] Lottspeich F., Zorbas H. (Hrsg.), Bioanalytik, Spektrum, Heidelberg 1998
- [2] Richter G., Praktische Biochemie, Thieme, Stuttgart 2003
- [3] Stryer L., Berg. J., Tymoczko J., Biochemie, Spektrum, 5. Auflage, Heidelberg 2003
- [4] Budzikiewicz H., Massenspektrometrie, WILEY-VCH, Weinheim 1998
- [5] Lehmann W., Massenspektrometrie in der Biochemie, Spektrum, Heidelberg 1996
- [6] http://www.bmss.org.uk/what_is/whatis.html [14.03.2005]
- [7] Thiede B. et al., Methods, 2005 (Artikel im Druck)
- [8] Küster B. et al, Analytical Biochemistry 250 (1997), 82-101, Article No. AB972199

Was Sie wissen sollten: Aufbau und Funktionsweise eines Massenspektrometers, MALDI-TOF, TOF/TOF-MS, Bioinformatik, Proteinmodifikationen.