

Theorieversuch

Analytik von Serumproteinen durch massenspektrometrische Identifikation „peptide mass fingerprint“

1. Theorie Massenspektrometrie

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 1 wiedergegeben.



Abbildung 1: Komponenten eines Massenspektrometers [1]

- | | | |
|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Matrixunterstützte Laser-Desorption/ Ionisation (MALDI)• Elektrospray-Ionisation (ESI) und Nano-Elektrospray-Ionisation (nESI)• Fast Atom Bombardment (FAB)• Chemische Ionisation (CI)• Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI)• Elektronenstoß-Ionisation (EI) | <ul style="list-style-type: none">• Flugzeitanalysatoren (TOF)• Quadrupole• Elektrische Ionenfallen (ion traps)• Elektromagnetische Ionenfalle (Ionencyclotron)• Magnetisches Sektorfeld• Elektrisches Sektorfeld | <ul style="list-style-type: none">• Konversionsdynode mit Sekundärelektronenvervielfacher (SEV)• Vielkanalplatte (multichannel plate) |
|---|--|--|

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]

1.2. Ionisierungstechniken

Zur Ionisierung von Molekülen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (vgl. Abbildung 1). 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]

1.2.1 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 $[M+H]^+$.

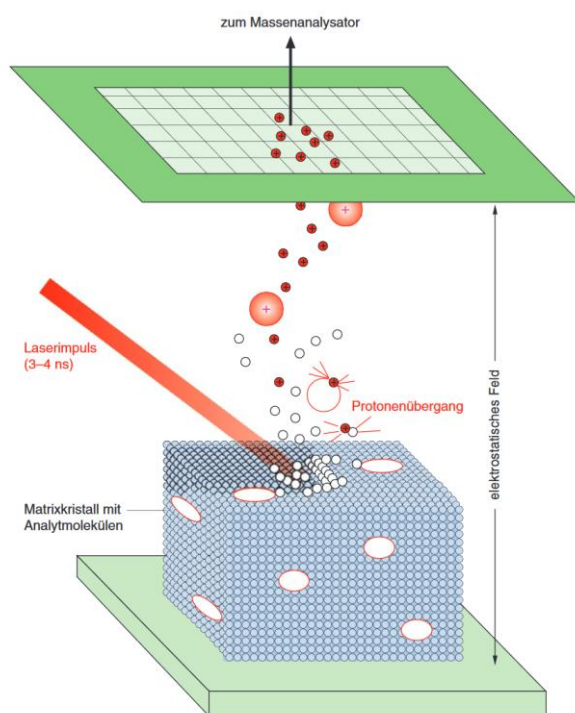


Abbildung 2: Prinzip des MALDI-Prozesses [1]

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]

1.2.2 Elektrospray-Ionisierung (ESI)

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

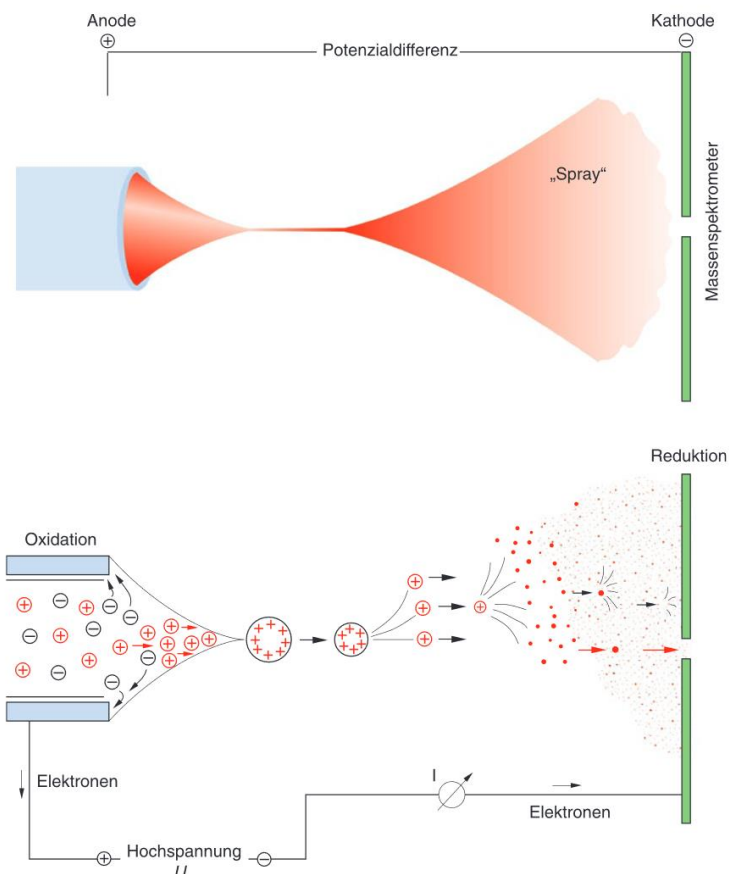


Abbildung 3: Prinzip des ESI [1]

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-Ionisierung 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]

1.3. Massenanalysatoren

1.3.1 Flugzeit- (TOF-) Analysatoren

TOF-Analysatoren (vom engl. time of flight) sind die am häufigsten eingesetzten Massenanalysatoren 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 4):

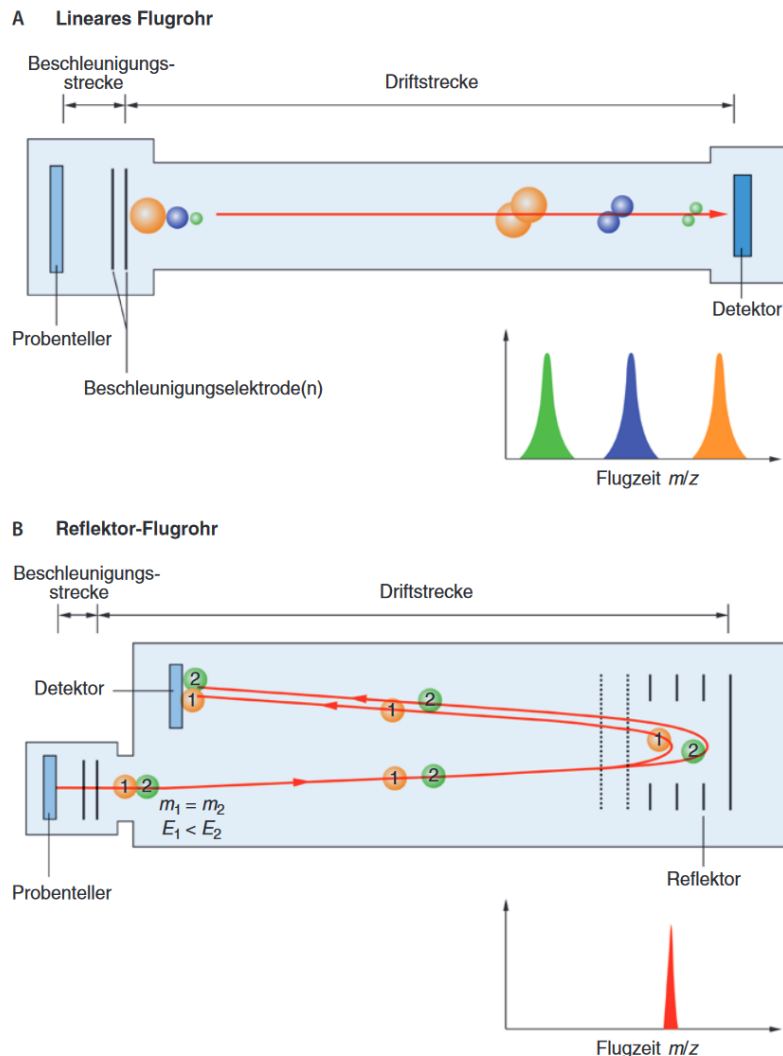


Abbildung 4: Prinzip des linearen Flugzeitmassenspektrometers in A und des Reflektorflugzeitmassenspektrometers in B [1]

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]

1.3.2. 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. [6]

1.3.3. Quadrupol- Analysatoren

Ein Quadrupolmassenspektrometer funktioniert nach dem Prinzip eines Massenfilters. Daher wird diese Art des Analysators gerne mit ESI kombiniert. So werden nur Ionen mit bestimmten m/z-Verhältnis zum Detektor durchgelassen.

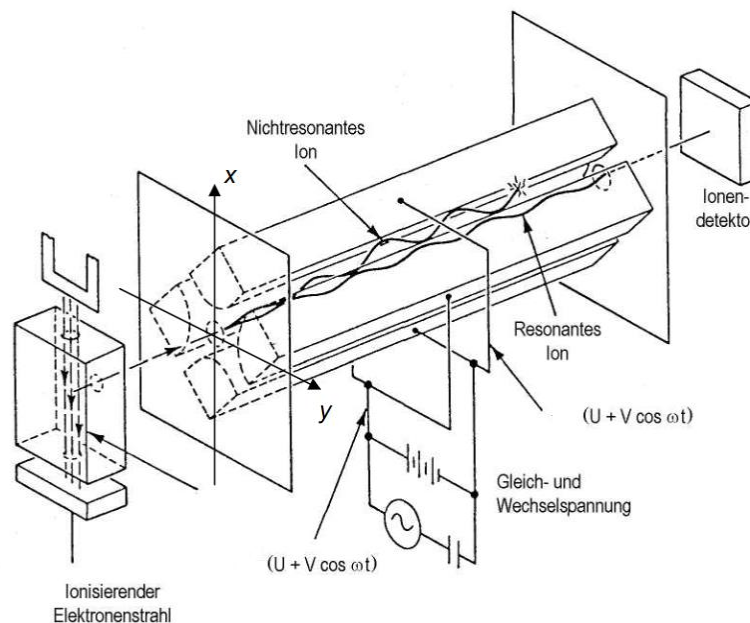


Abbildung 5: Aufbau eines Quadrupolarmassenspektrometers [9]

Ein Quadrupol besteht aus vier parallelen, hyperbolisch geformten, stabförmigen Metallelektroden, an denen eine Kombi aus Wechsel- und Gleichspannungsfeld angelegt ist. Je zwei gegenüberliegende Stäbe sind verbunden. Die angelegte elektrische Spannung zwischen den beiden Stabpaaren setzt sich aus dem Gleichspannungsanteil U und dem Wechselspannungsanteil mit der Amplitude V und der Frequenz $f = \omega/2\pi$ zusammen:

$$U_{\text{quad}} = U + V \cdot \cos(\omega t)$$

Ionen mit definiertem m/z-Verhältnis werden auf einer stabilen oszillierenden Bahn gehalten und durchlaufen so den Quadrupol. Ionen mit abweichendem m/z-Verhältnis bewegen sich auf instabilen Bahnen und kollidieren mit den Metallstäben [1].

Zur Lösung der oben genannten Gleichung führt man zwei sog. Stabilitätsparameter a und q ein (dimensionslose Variablen), welche die Parameter des Quadrupols (Gleichspannung U, Wechselfeldamplitude V, Feldradius r und Kreisfrequenz ω) und die Parameter des Ions (Ladung Q= z*e und Masse m= M*m_u) beinhalten. So erhält man für Ionen mit gegebenen m/z-Verhältnis bestimmte Werte für a und q, bei denen stabile Oszillationen in x- und y-Richtung möglich sind. Mittels der numerischen Lösung der sog. Mathieu'schen Gleichung ergibt sich das unten aufgeführte Stabilitätsdiagramm, nach dem gilt:

$$\frac{a}{q} = \frac{2z * e * U}{m * (\pi * f * r)^2} \frac{m * (\pi * f * r)^2}{z * e * V} = \frac{2U}{V} = konst$$

Zum Scannen des Massenbereichs werden U und V gleichzeitig erhöht, wobei die Verhältnisse a/q sowie U/V konstant gehalten werden. Ionen verschiedener Massen gelangen so nacheinander in den Bereich der stabilen Oszillation. Mit kommerziell genutzten quadrupolaren Massenanalysatoren können Massenbereiche bis m/z = 4000 gemessen werden. Somit findet diese Art des Analysators im Bereich Proteomics nur geringfügig Anwendung.

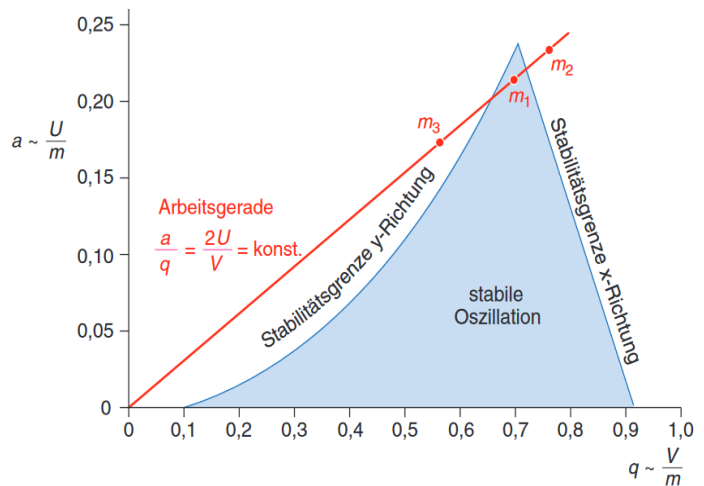


Abbildung 6: Stabilitätsdiagramm für das Quadrupol Feld in x- und y-Richtung [1]

1.2 Proteinidentifikation

In vielen Fällen hilft die Massenspektrometrie bei der Identifizierung, dem Nachweis und der Strukturaufklärung von Proteinen im alltäglichen Leben. In nebenstehender Abbildung 7 sind einige gängige Methoden zur Proteinidentifikation dargestellt.

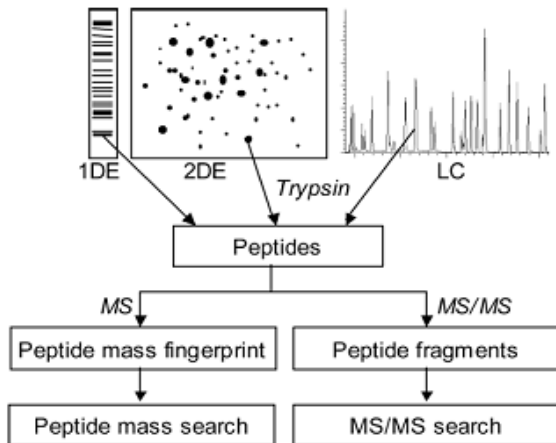


Abbildung 7: Proteinidentifikation [7]

Unbekannte Proteingemische werden beispielsweise mithilfe von 1D (Isoelektrische Fokussierung) - und 2D (SDS-Polyamid)-Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Färbung sichtbar gemachte Proteinbanden bzw. Spots werden aus dem Gel ausgeschnitten und durch enzymatischen Verdau in kürzere Peptide zerlegt. Eines der meist verwendeten Enzyme ist hierbei das 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), wodurch es quantifiziert und identifiziert werden kann. 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]

Was ihr für das Kolloquium wissen solltet: Aufbau und Funktionsweise eines Massenspektrometers, MALDI, ESI, Prinzip TOF, TOF/TOF-MS, Prinzip Quadrupol, Stabilitätsdiagramm, Bioinformatik, Proteinmodifikationen.

2. Durchführung

Dieser Versuch wird anhand vorab durchgeführter Messungen an einem MALDI-TOF Gerät ausgewertet. Die verwendeten Peptidlösungen wurden 1:25 und 1:1 mit MALDI-Matrix (10 mg/mL α -cyano-4-hydroxymethylsäure in ACN/H₂O mit 0,1 % TFA) vermischt und auf das MALDI-Target gespottet. Pro Spot wurden 0,5 μ L aufgetragen. Die Spots wurden an der Luft getrocknet. (Dried-Droplet-Methode)

Ausgegeben werden Spektren und Textdateien mit enthaltenen Peaklisten von Trypsin verdauten Bovine Serum Albumin (BSA) sowie Humanen Serum Albumin (HSA). Neben MALDI-TOF Spektren finden sich auch TOF-TOF Spektren bestimmter Mutterionen des BSA. Mittels Datenbankrecherche sollen die entsprechenden Aminosäuresequenzen der jeweiligen Massen im Spektrum zugeordnet werden.

Bestimmung des optimalen Matrix-Analyt-Verhältnisses

Sie haben MALDI-TOF-Spektren ihrer drei Proteine aufgenommen, um herauszufinden, welche der beiden Verdünnungen zu aussagekräftigeren Spektren führt.

Vergleichen Sie jeweils die zwei Spektren von BSA, HSA oder Transferrin.

1. Wie wirkt sich die Verdünnung auf die Proteinkonzentration sowie das Verhältnis von Analyt und Matrix aus?
2. Wie wirkt sich die Verdünnung auf die Signale in den Spektren aus?
3. Wie verändern sich die Intensitäten?
4. Wie verändert sich die Anzahl der Signale? Womit lassen sich diese Unterschiede erklären?
5. Welche der beiden Verdünnungen würden Sie verwenden?

Vergleich verschiedener Laserintensitäten

Neben der Probenzusammensetzung müssen sie auch die Messparameter, wie zum Beispiel die Laserintensität optimieren. Hierzu haben Sie eine der drei Proben (Transferrin 1:25) mit drei verschiedenen Laserintensitäten gemessen. Vergleichen Sie die drei Spektren.

1. Wie unterscheiden sich die drei Spektren und woran könnte das liegen?
2. Wie kommen die unterschiedlichen Rauschlevel zustande?
3. Welche Laserintensität würden Sie für weitere Messungen empfehlen?

Datenbankabgleich Trypsinverdau

Sie möchten überprüfen, ob zum einen der Trypsinverdau zu den erwarteten Ergebnissen geführt. Zum anderen sind Sie sich nicht sicher, ob Ihre Proben nicht unter Umständen verunreinigt waren.

Suchen Sie zunächst in der Datenbank uniprot (<https://www.uniprot.org/>) das Kürzel für eines der drei Proteine („Entry“ oder „Entry name“). Verwenden Sie das Kürzel, um mit dem Online-Tool PeptideMass (https://web.expasy.org/peptide_mass/) die Fragmente und deren Massen nach Trypsin-Verdau vorherzusagen. Erlauben Sie dabei 1 „missed cleavages“. Warum enden alle Fragmente mit R oder K?

1. Warum endet ein Fragment nicht mit R oder K? Wie können Sie das erklären?
2. Welche Massen können Sie anhand der Liste zuordnen? Erstellen Sie für's Protokoll eine Liste mit den entsprechenden Fragmenten und deren Massen.
3. Warum können Sie nicht alle Massen im Spektrum in der PeptideMass-Liste finden?
4. Warum können Sie umgekehrt nicht alle vorhergesagten Massen im Spektrum finden?
5. Sehen Sie mögliche Verunreinigungen im Spektrum? Worum könnte es sich hier handeln?

Proteinidentifizierung anhand der Fragmente

Sie haben Proben von drei unbekanntem Proteinen erhalten. Diese haben sie mit Trypsin verdaut und MALDI-TOF-Spektren aufgenommen. Identifizieren Sie die 3 Proteine Prot1, Prot2 und Prot3 mit Hilfe von MASCOT (https://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF). Laden Sie hierfür die entsprechenden Masselisten in die Datenbank. Als Database muss Swissprot ausgewählt werden, außerdem als Email maria.silber@kit.edu angegeben werden.

1. Welche möglichen Proteine gibt MASCOT an? Um welche Proteine handelt es sich bei Prot1, Prot2 und Prot3? Von welchem Organismus stammen Sie?
2. Wenn MASCOT mehrere mögliche Resultate angibt – kennen Sie weitere Methoden, die sie ergänzend verwenden könnten, um das Protein eindeutig zu bestimmen?
3. Gleichen Sie die Fragmente mit den von Ihnen zuvor identifizierten ab. Stimmen diese überein?

Sequenzierung

Sie sind sich nicht ganz sicher, ob die Sequenzen der Peptide, die Sie anhand der PeptideMass-Liste den Massen zugeordnet haben korrekt sind. Deshalb haben sie eine MS/MS-Analyse von vier dieser Peptide durchgeführt.

1. Was ist in den vier Spektren jetzt zu sehen?
2. Warum sollte in allen drei Spektren ein Fragment der Masse 175 auftauchen?

Wählen Sie eines der Mutterionen aus und analysieren Sie seine Peptidsequenz mittels FraglonServlet (<http://db.systemsbiology.net/proteomicsToolkit/FraglonServlet.html>)

3. Welche der kurzen Peptide können Sie im Spektrum finden?
4. Ordnen Sie möglichst viele Peaks den entsprechenden Fragmenten zu.
5. Handelt es sich dabei um B- oder Y-Ionen. Was bedeutet B und Y in diesem Zusammenhang?
6. Sind noch weitere Fragmente denkbar? Beispielweise Fragmente die durch das Brechen von zwei Peptidbindungen entstehen? Berechnen Sie die theoretische Masse einiger Di- oder Tripeptidfragmente und suchen Sie im Spektrum die entsprechenden Signale.

7. Warum ist die Masse eines Dipeptidfragments um 18 kleiner als die Summe der Einzelaminosäuren?

Proben und Aufnahme der Spektren

Calmix

Gemisch von Massen von 900 bis 3660 Da.

Verdau

- Trypsin: Stock 1mg/mL, wird dann entsprechend verdünnt 20 µg/ml
- Analytprotein: 1-2 µg/mL (Agilent geht z.B. von 0.5 mg Protein aus)
- Analytprotein:Trypsin in der Regel 10:1 bis 200:1
- Trypsin-Autolyse kann vorkommen, wird durch die Zugabe von Ca²⁺ verhindert
- pH 7,5 bis 8,5 und 37 °C, Verdauzeit zwischen 2 und 30 Stunden
- optional: Protein vorher mit Harnstoff denaturieren

Aufnahme der Spektren

- Massenbereich muss eingestellt werden (idR m/z 800 – 4000)
- Laserintensität wird meistens auf 2600 – 3000 eingestellt (Max 5600)

3. Literaturverzeichnis

- [1] Lottspeich F., Kurreck J., Engels J. W., Bioanalytik, Springer eBook Collection, Heidelberg 2022
- [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
- [9] FH München: Grundlagen Trennsysteme, zuletzt geprüft am 30.05.2019