

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 3 wiedergegeben.

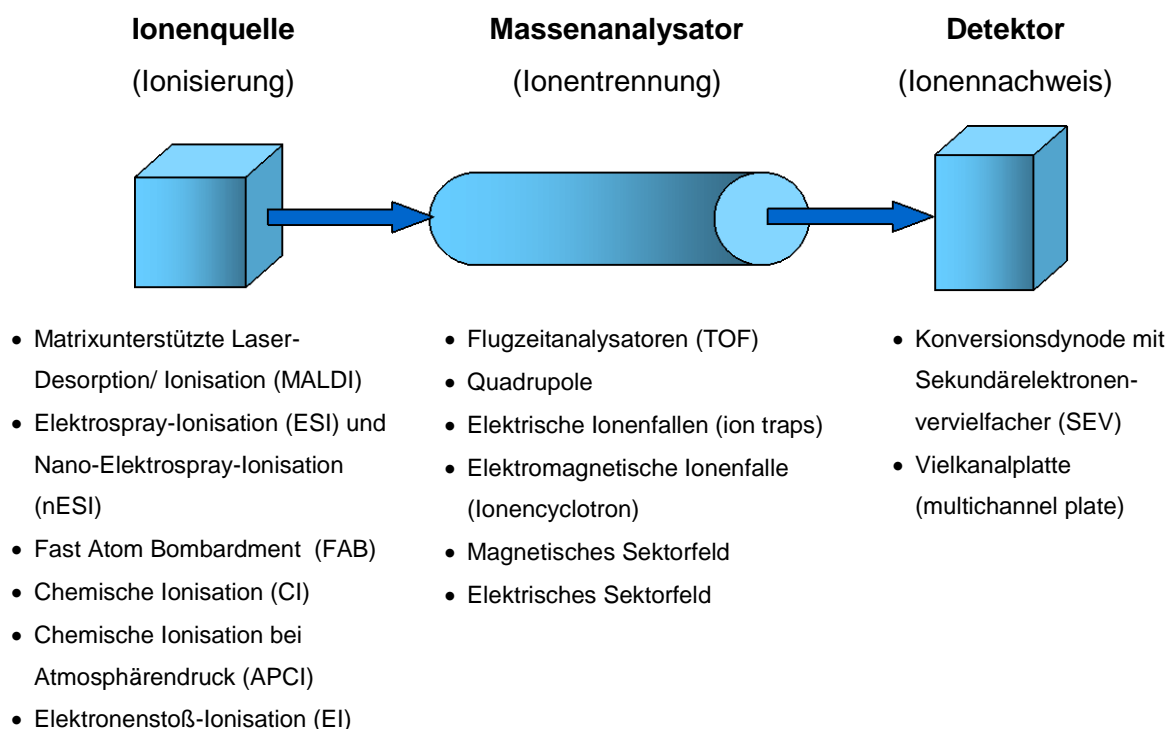


Abbildung 3: Komponenten eines Massenspektrometers [1]

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]

1.2. 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]

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 $[M+H]^+$.

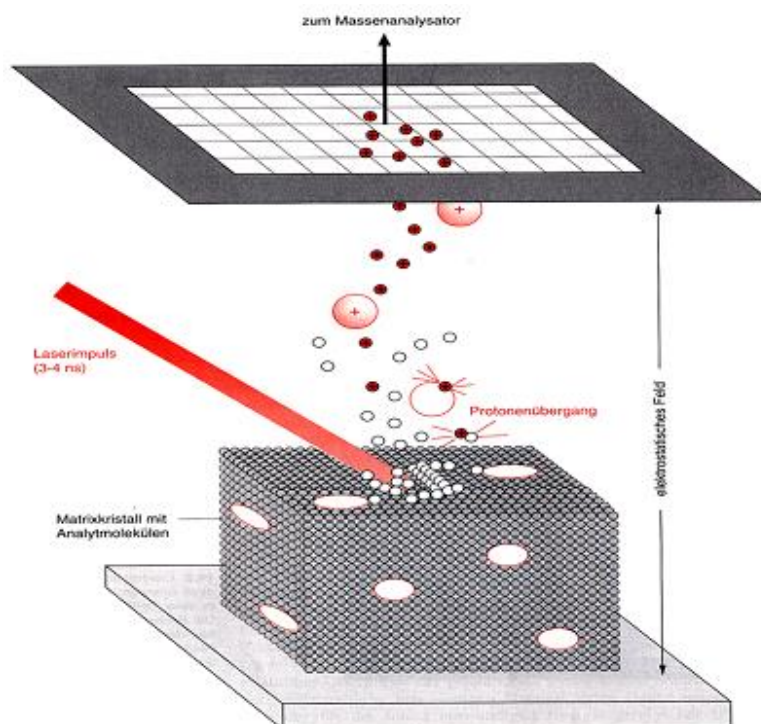


Abbildung 4: Prinzip des MALDI-Prozesses [1]

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 eingestrahelten 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:

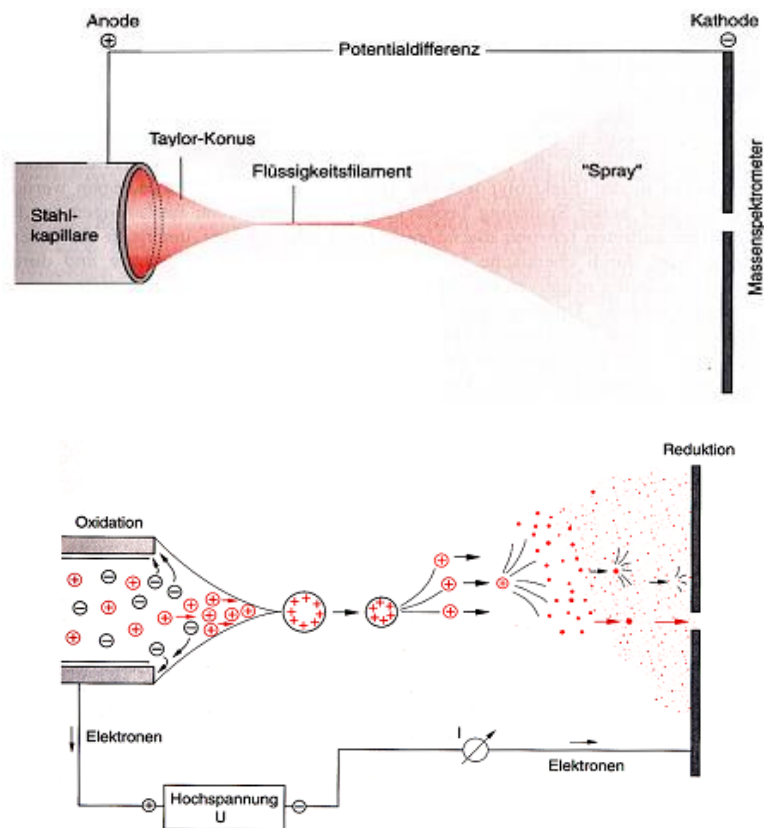


Abbildung 5: Prinzip der ESI [1]

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-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. Massenanalytoren

1.3.1 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):

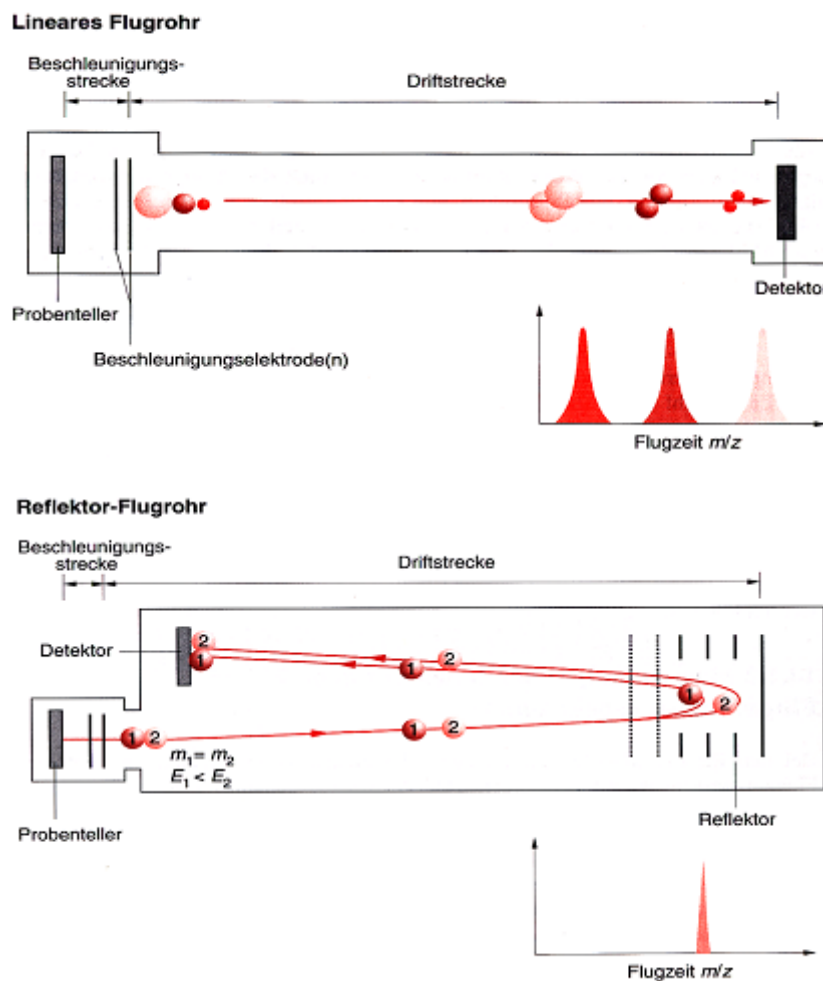


Abbildung 6: Prinzip eines linearen TOF-MS und eines Reflektor-TOF-MS [1]

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]

1.3.2. TOF/TOF-MS

TOF/TOF-Instrumente besitzen zwei hintereinander gekoppelte Massenanalytoren. 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.

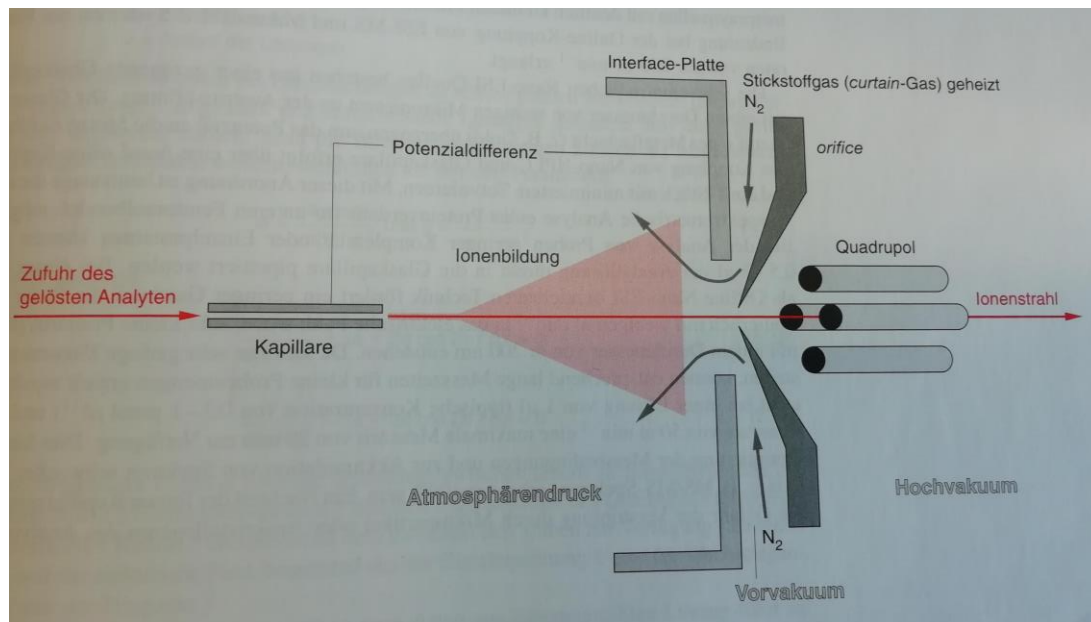


Abbildung 7: Aufbau einer ESI-Quelle mit Interface zu einem Quadrupolmassenspektrometer [1]

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 $f = \omega/2\pi$:

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

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 , Wechselspannungsamplitude V , Feldradius r und Kreisfrequenz ω) und die Parameter des Ions (Ladung $Q = z \cdot e$ und Masse $m = M \cdot m_u$) 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. Mathieuschen Gleichung ergibt sich das unten aufgeführte Stabilitätsdiagramm, nach dem gilt:

$$a/q = 2U/V = \text{konst}$$

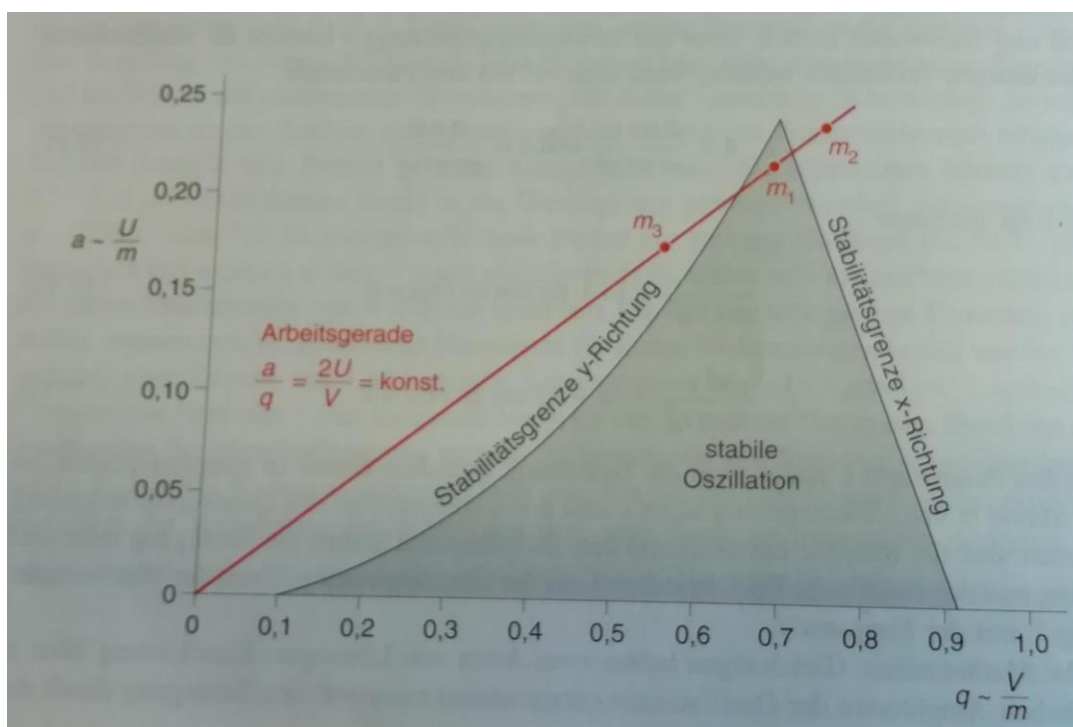


Abbildung 8: Stabilitätsdiagramm für das Quadrupolfeld in x - und y -Richtung [1]

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.

1.2 Proteinidentifikation

In nachfolgender Abbildung 9 sind einige gängige Methoden zur Proteinidentifikation dargestellt:

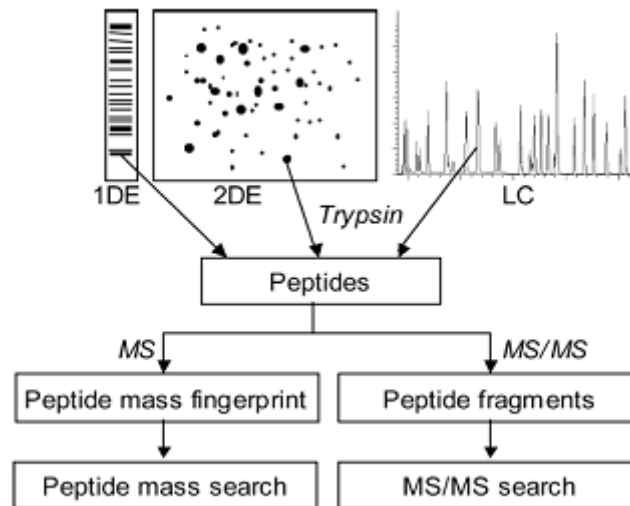


Abbildung 9: Gängige Methoden zur Proteinidentifizierung [7]

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. 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-hydroxycimtsäure 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.

2.1. Spektrenvergleich für unterschiedliche Mischungsverhältnisse

Vergleichen Sie die Spektren für BSA, HSA und Transferrin bei einem jeweiligen Mischungsverhältnis von 1:1 und 1:25. Notieren Sie die Unterschiede.

2.2. Datenbankrecherche Trypsinverdau

Öffnen Sie im Internet die Suchmaske PeptideMass (<https://www.expasy.org/resources/peptidemass>).

Suchen Sie in Uniprot, der Proteinsequenzdatenbank (<https://www.uniprot.org/>), den Eintrag für Rinderalbumin, indem Sie albumin und bovin eingeben.

Geben Sie diesen Namen in die Suchmaske von PeptideMass ein. Nehmen Sie die vorgegebenen Einstellungen. Warum werden diese gewählt?

BSA_1_25_CHCA_B4_3200.txt enthält die Massen der Peptide aus dem Trypsinverdau. Vergleichen Sie die Masseangaben mit denen der angegebenen Peptide. Erstellen Sie eine Liste von Peptiden, die vorhanden sind.

Woher stammen die Massen, für die Sie keine Peptidangabe finden konnten?

Verfahren Sie danach genauso mit HSA und Transferrin.

2.3. Sequenzierung

Vier der erzeugten Peptide wurden über MSMS sequenziert: Die Ionen 927, 1479, 1639 und 2044. Von dreien haben Sie die Liste der detektierten Fragmente:

MSMS_927_BSA_1_25_CHCA_B4_3200.txt, MSMS_1479_BSA_1_25_CHCA_B4_3200.txt,
MSMS_1639_BSA_1_25_CHCA_B4_3200.txt.

Laden Sie die jeweiligen Peptidsequenzen in die Suchmaske von
<http://db.systemsbiochemistry.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html>.

Identifizieren Sie die Massen in Ihren Textdateien und schreiben Sie die jeweiligen Peptide auf. Um welche Art von Ion (B oder Y) handelt es sich? Warum entsprechen die Massedifferenzen nicht den Massen der Aminosäuren?

Warum sollte man in den drei Spektren eine Masse von 175 finden?

Warum konnte das Ion 2044 nicht sequenziert werden?

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, ESI, Prinzip TOF, TOF/TOF-MS, Prinzip Quadrupol, Stabilitätsdiagramm, Bioinformatik, Proteinmodifikationen.