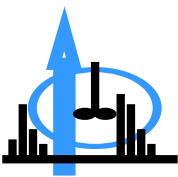

Proteinidentifikation (MALDI, Datenbanksuche) Versuch 6

Grundpraktikum Biowissenschaften für Bioinformatiker
WS 2004/05

Andreas Tholey, Christoph Wittmann & Elmar Heinzle



Institut für Technische Biochemie • Universität des Saarlandes



I Einführung und Versuchsbeschreibung

0. Die in den grau unterlegten Kästchen stehenden Texte geben nähere Informationen über den jeweiligen Themenpunkt an. Sie sind jedoch nicht relevant für die Versuchsvorbereitung, können jedoch für das Verständnis des Textes nützlich sein.

1. Proteine

Proteine sind wesentliche Zellbestandteile mit verschiedenen zentralen Funktionen. Sie spielen in der Erforschung biologischer Systeme auf molekularer Ebene eine herausragende Rolle, was heute und in der Zukunft eine entsprechende Bedeutung gerade für die Bioinformatik hat. Will man Proteine identifizieren und ihre Funktionen charakterisieren, so muss man, wie im Schema unten gezeigt, zunächst Proben von geeigneten biologischen Quellen (Zellen, Gewebe, Zellteile) nehmen. Erst nach Isolierung und Trennung können Identifikation und Funktionscharakterisierung erfolgen.

Fehler in den vorangehenden Schritten führen zwangsläufig zu falschen Messresultaten und weiter zu falschen Interpretationen und Schlussfolgerungen (Abb.3).

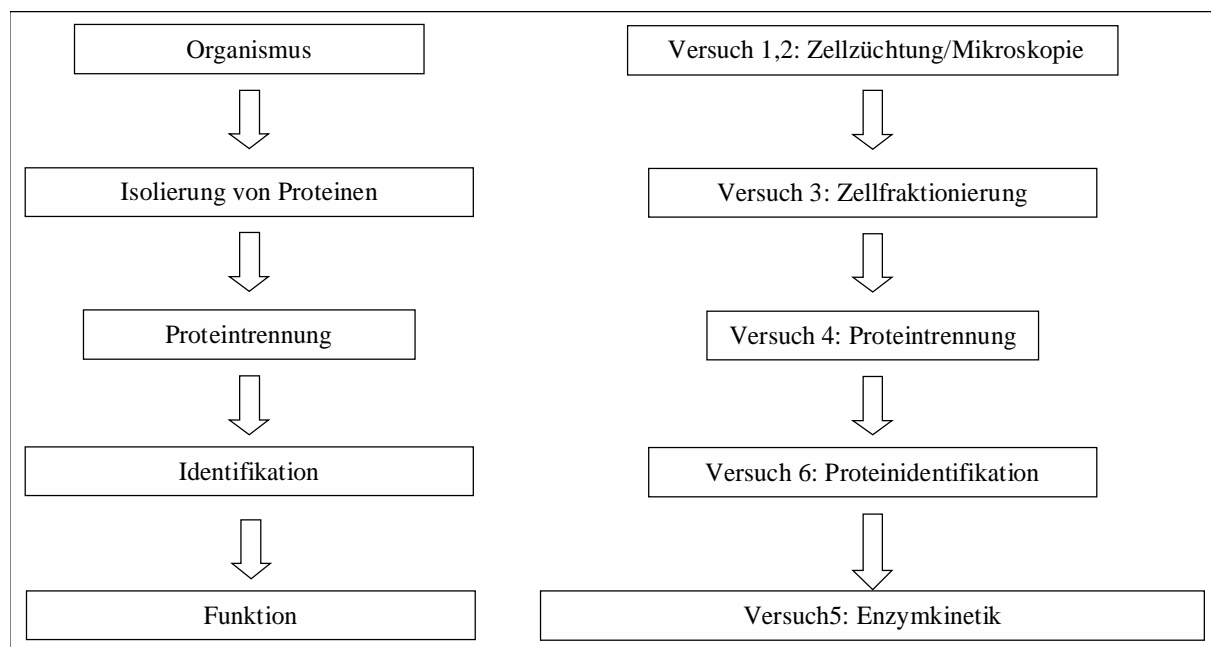


Abbildung 1: Schritte der Proteinidentifizierung und die dazugehörigen Praktikumsversuche.

1.1 Funktion von Proteinen

- Enzymatische Katalyse
- Transport und Speicherung
- Koordinierte Bewegung
- Mechanische Stützfunktion
- Immunabwehr
- Übertragung und Erzeugung von Nervenimpulsen
- Kontrolle von Wachstum und Differenzierung

1.2 Struktur von Proteinen

Die elementare Struktureinheit von Proteinen sind die Aminosäuren. Die Seitenketten dieser Bausteine unterscheiden sich in Größe, Gestalt, Ladung, Wasserstoffbrückenbildungskapazität und chemischer Reaktivität. In Proteinen sind Aminosäuren durch Peptidbindungen zu einer Peptidkette verknüpft (Abb.2). Eine Peptidbindung koppelt die α -Carboxylgruppe der einen mit der α -Aminogruppe der nächsten Aminosäure. Cysteinreste können quervernetzte Disulfidbrücken bilden.

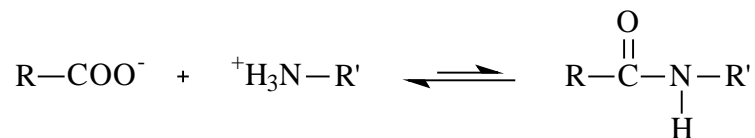


Abbildung 2: Bildung einer Peptidbindung durch Kondensation zweier Aminosäuren.

Ein kritischer Parameter für die biologische Funktion eines Proteins ist seine Konformation, also die dreidimensionale Anordnung der Atome im Molekül. Es existieren vier Strukturebenen von Proteinen. Als Primärstruktur bezeichnet man die Sequenz der Aminosäuren. Die Sekundärstruktur definiert die räumliche Anordnung von Aminosäuren, die in der linearen Sequenz nahe beieinander liegen (α -Helix- und β -Faltblattstruktur). Unter der Tertiärstruktur versteht man die räumliche Beziehung von Aminosäureresten, die innerhalb der linearen Sequenz weit voneinander entfernt sind, sowie das Muster der Disulfidbrücken. Die Quartärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung der verschiedenen Polypeptidketten (Untereinheiten) und die Art der Kontakte.

1.3 Proteintypen: Membranproteine und lösliche Proteine

Ein Aspekt des Aufbaus von Proteinen wird auch in der unterschiedlichen Verteilung von polaren und unpolaren Resten offenbart. Darin zeigen wasserlösliche Proteine (im Cytosol) und Membranproteine (ca. 30% der Proteine) einige Unterschiede.

Membranproteine übernehmen in Membranen Funktionen wie Transport, Kommunikation und Energieübertragung. Man unterscheidet integrale und periphere Membranproteine.

Periphere Membranproteine sind über elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrücken an die Membran gebunden. Die meisten peripheren Proteine sind an die Oberfläche integraler Membranproteine gekoppelt, entweder auf der Innen- (z.B. Cytosol) oder der Außenseite (z.B. Periplasma) der Membran.

Integrale Proteine stehen in intensiver Wechselwirkung mit den Kohlenwasserstoffketten der Membranlipide und sind in die biologische Membran (meist als Transmembranhelices) eingebettet. Lipide, die stark hydrophob sind, bilden die Permeabilitätsschranke von Membranen. Der Teil eines Membranproteins, der diesen Bereich durchspannt, muss also eine hydrophobe Außenseite besitzen.

Bei Proteinen in wässriger Umgebung bestimmt das starke Bestreben hydrophober Reste, dem Wasser zu entkommen, die Proteinfaltung. Da Wasser stark kohäsiv ist, lagern sich die hydrophoben Gruppen im Innern des Moleküls an und sind somit thermodynamisch stabiler, als wenn sie in die wässrige Umgebung ragen. Die Polypeptidkette faltet sich also spontan so, dass die hydrophoben Seitenketten im Innern versteckt sind und polare geladene Reste an der Oberfläche liegen.

2. Identifizierung von Proteinen

Proteine besitzen einige charakteristische Eigenschaften mit deren Hilfe man diese auftrennen und reinigen und somit identifizieren kann.

Man kann diese Eigenschaften in makroskopische Eigenschaften (bzw. Gesamteigenschaften) und in molekulare Eigenschaften (Struktur) einteilen. Zu den makroskopischen Eigenschaften zählt man die Masse des Proteins, den isoelektrischen Punkt, Löslichkeit, Biospezifität, Hydrophobizität, Ladung und Komplexierung. Wesentliche Merkmale eines Proteins sind Aminosäuresequenz und posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, Glykosylierung, Sulfatierung, Methylierung,...).

Mittels dieser charakteristischen Eigenschaften ist eine eindeutige Identifizierung der Proteine möglich.

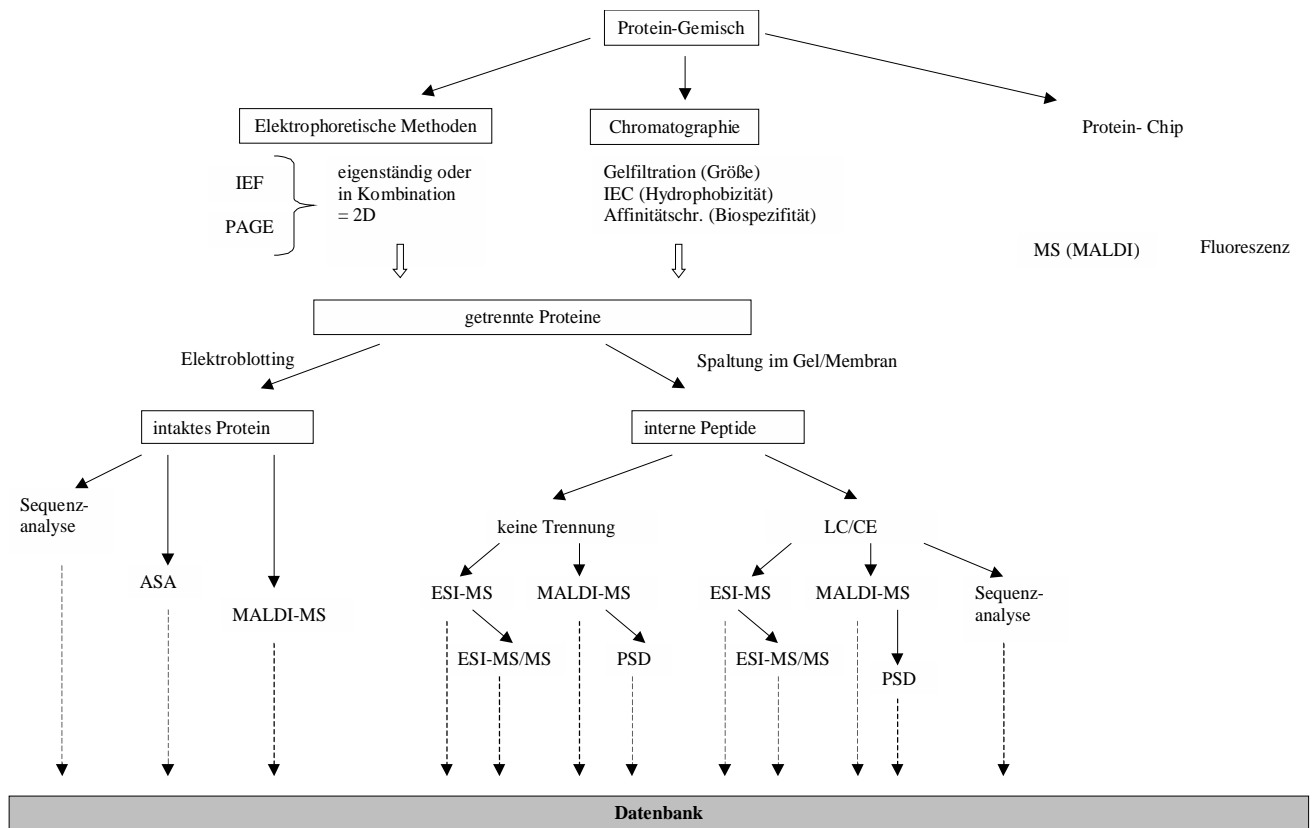


Abbildung 3: Methoden der Proteinidentifizierung. Die Abkürzungen werden im Text und im Anhang erklärt.

2.1 Proteingemisch

Aus einer Zelle extrahiert man die Proteine, die als Proteingemisch vorliegen, d.h. alle Proteine der Zelle sind in diesem Gemisch vertreten.

Um diese Proteine aufzutrennen und schließlich auch zu reinigen werden verschiedene Methoden eingesetzt.

2.2 Proteintrennung

Um Proteine zu trennen werden analytisch *elektrophoretische Methoden* oder chromatographische Methoden eingesetzt.

Eine Methode ist die isoelektrische Fokussierung (IEF). Bei der *IEF* werden die Proteine aufgrund ihrer **Ladung** (Nettoladung = Summe aller negativer und positiver Ladungen einer Aminosäurekette sowie des Amino- und des Carboxyterminus) in einem pH-Gradienten voneinander getrennt. Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins ist der spezifische pH-Wert, an dem die Nettoladung des Proteins null beträgt. Proteine sind bei pH-Werten unterhalb ihres pI positiv und oberhalb ihres pI negativ geladen. Die *SDS-*

Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS= *sodium dodecyl sulfate*, PAGE = *polyacrylamide gel electrophoresis*) trennt die Polypeptidketten von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen hauptsächlich nach ihrer **Masse**. Kombiniert man diese beiden Methoden, bezeichnet man dieses Trennverfahren als 2D-Gelelektrophorese.

Proteine können auch mittels chromatographischer Methoden (*Chromatographie*) voneinander getrennt werden. Hier werden Eigenschaften der Proteine wie **Größe**, **Ladung**, **Hydrophobizität** und **Biospezifität** ausgenutzt.

Bei der *Gelfiltrationschromatographie* werden Proteine aufgrund der **Größe** getrennt. Die Probe wird hierbei auf eine Säule aufgetragen (z.B. Dextran, Agarose). Große Moleküle passieren die Säule schneller und verlassen sie zuerst, weil ihnen ein kleineres Volumen im Gel zugänglich ist. Kleinere Moleküle können leichter in das Gel hineindiffundieren und werden so stärker zurück gehalten.

Trennungen aufgrund der **Ladung** gelingen mit der *Ionenaustauschchromatographie* (IEC= *ion exchange chromatography*). Ein Protein, das bei pH 7 eine positive Nettoladung hat, wird sich in der Regel an eine Säule mit Carboxylatgruppen binden, ein negativ geladenes Protein dagegen nicht. Ein an eine solche Säule gebundenes, positiv geladenes Protein kann anschließend eluiert werden. Die Elution erfolgt mit einer erhöhten Konzentration an NaCl oder einem anderen Salz im Elutionspuffer. Die Natriumionen konkurrieren mit den positiv geladenen Gruppen des Proteins um die Bindungsstellen der Säule. Proteine mit einer geringen positiven Ladungsdichte verlassen die Säule zuerst, dann folgen die mit höherer Ladungsdichte.

Mit Hilfe der RP-HPLC werden Proteine auf Grund ihrer unterschiedlichen Polarität (**Hydrophobizität**) getrennt. Bringt man eine unpolare stationäre Phase in eine Säule und trägt ein Gemisch unpolarer Stoffe auf, binden diese durch hydrophobe Wechselwirkungen an das Material. Spült man dann mit einem polaren Lösungsmittel-Gemisch (mobile Phase), wandern die aufgetragenen Substanzen je nach ihrer Polarität mit verschiedener Geschwindigkeit durch die Säule. Hydrophile Stoffe, die nur schwache Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen, werden zuerst eluiert, hydrophobere später.

Mittels *Affinitätschromatographie* können Proteine an Hand ihrer **Affinität** zu bestimmten chemischen Gruppen getrennt werden. Allgemein kann ein Protein, das die Gruppe X erkennt, wirkungsvoll isoliert werden, wenn man X oder ein Derivat von X kovalent an die Säule bindet, ein Proteingemisch auf die Säule aufträgt und nichtgebundene Proteine mit Puffer auswäscht und anschließend das gewünschte Protein durch Zugabe einer löslichen Form von

X in hoher Konzentration eluiert. Für die Identifizierung eines einzelnen Proteins werden oft monoklonale Antikörper eingesetzt.

Eine weitere Möglichkeit Proteine zu trennen bietet die *Protein-Chip-Technologie*. Das Ziel der Proteomforschung ist, das komplette Proteom einer Zelle oder eines Gewebes, d.h. das Vorkommen, die Menge und die posttranslationalen Modifikationen aller Proteine der Zelle oder des Gewebes zu bestimmten Zeitpunkten zu erfassen. Alternativ zu den auf 2D-Elektrophorese und MS basierenden Techniken werden zur Zeit große Anstrengungen unternommen, um die etablierten Methoden der DNA-Chip-Technologie (Analyse der Expressionsmuster von Tausenden mRNAs aus Gewebe oder Zellen auf einem einzigen Chip) auf Proteine zu übertragen. Die markierten Proteine können so ortsaufgelöst mit entsprechenden Detektionssystemen für radioaktive Strahlung, Fluoreszenz, Chemilumineszenz oder Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

2.3 Analyse des intakten Proteins

Nach der 2D-Gelelektrophorese können die getrennten Proteine durch *Elektroblotting* (Blotting der Proteine auf eine Cellulose-Membran im elektrischen Feld) näher analysiert werden. Mittels *Sequenzanalysen* z.B. durch Aminosäure-Analyse (ASA) oder die Edman-Methode (Abspaltung einer Aminosäure nach der anderen vom Aminoende eines Peptids her) kann die Aminosäuresequenz ermittelt werden. Die aufgetrennten, intakten Proteine können aber auch einer *MALDI-MS* (*matrix assisted laser desorption/ ionisation mass spectrometry*) unterzogen werden (s. Kapitel 3).

2.4 Verdau der getrennten Proteine

Die durch 2D-Gelelektrophorese getrennten Proteine werden im Gel bzw. der Membran gespalten (verdaut). Dazu wird zunächst das zu untersuchende Protein mit einem speziellen Enzym, einer sogenannten Protease, verdaut. Die Aufgabe eines proteolytischen Enzyms besteht darin, Peptidbindungen zu hydrolysieren. Dieses Zerschneiden geschieht dabei aber nicht willkürlich. Wie fast alle Enzyme besitzen auch Proteasen eine Substratspezifität (Substrat=Proteinkette/Peptidkette). So können Proteasen nur an bestimmten Stellen in der Proteinkette schneiden. Trypsin beispielsweise schneidet nur C-terminal zu basischen Resten wie Lysin oder Arginin, während Chymotrypsin C-terminal zu hydrophoben Resten wie Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan oder Leucin schneidet. Wenn man beispielsweise ein

Protein mit Trypsin verdaut, so werden alle entstehenden Peptidfragmente am C-Terminus mit einem Lysin- oder Argininrest besitzen.

Entsprechend ihrem Wirkungsmechanismus und ihrem aktiven Zentrum werden diese Enzyme eingeteilt in Serinproteasen, Cysteinproteasen, Aspartatproteasen und Metalloproteasen. Je nach Angriffsort unterscheidet man weiter nach Endo- und Exoproteasen. Endoproteasen spalten das Proteingerüst an jeweils spezifischen internen Aminosäuren und erzeugen so ein für jedes Protein und das jeweils verwendete Enzym spezifisches Peptidmuster. Endoproteasen werden deshalb in der Regel bei der Primärstrukturanalyse eingesetzt. Exoproteasen bauen Proteine von ihrem C- oder N-terminalen Ende her ab. Sie sind notwendig um N-terminal blockierte, also für den Edman-Abbau nicht zugängliche Aminosäuren abzuspalten oder die blockierende Gruppe zu entfernen.

Tabelle 1: Enzyme in der Proteinstrukturanalytik.

Enzym	Typus	Spezifität	pH-Optimum
Endopeptidasen			
Chymotrypsin	Serin	Tyr, Phe, Trp	7,5-8,5
Trypsin	Serin	Arg, Lys	8,0-9,0
Elastase	Serin	Ala, Val, Ile, Leu, Gly	8,9
Pepsin	Aspartat	Phe, Met, Leu, Trp	8,8
Papain	Cystein	Arg, Lys, Glu, His, Tyr	7,0-9,0
Thrombin	Serin	Arg	7,5
Exopeptidasen			
<i>C-terminal</i>			
Carboxypeptidase P	Serin	Pro-Xaa-COOH	4,0-5,5
Carboxypeptidase C	Serin	C-terminal Pep.unspez	4,0-5,0
<i>N-terminal</i>			
Acylaminoacid-releasing enzyme	Serin	N-Acyl-AS	7,5-9,0
Pyroglutamat-Amino-peptidase	Cystein	Pyroglutamat	7,0-9,0
Glycosidasen			
Phosphatasen/ Kinasen			

Glycosidasen und Phosphatasen katalysieren posttranslationale Modifikationen. Diese Modifikationen sind enzymkatalysierte Veränderungen an oder in einem Protein, welche nach seiner Biosynthese am Ribosom auftreten. Sie tragen entscheidend zur Regulation von Proteinfunktionen dar. Ihre Analyse stellt daher ein besonders wichtiges Teilgebiet der Bioanalytik dar.

2.5 Analyse der Peptide

Die entstandenen Peptidfragmente können so mit Hilfe der ESI-MS (*elektrospray ionization mass spectrometry*) bzw. der MALDI-MS untersucht werden (s. Kapitel 3) oder werden mittels Flüssigkeitschromatographie (*liquid chromatography*) bzw. Kapillarelektrophorese (CE= *capillary electrophoresis*) voneinander getrennt und anschließend identifiziert.

Nachfolgend können spezielle massenspektrometrische Methoden zur Sequenzanalyse eingesetzt werden.

2.6 Datenbanksuche

Die bei der proteolytischen Spaltung eines Peptids hergestellte Mischung von Spaltpeptiden liefert einen sogenannten *peptide mass fingerprint* (PMF), einen Fingerabdruck eines Proteins, wenn sie mit einem Massenspektrometer untersucht werden. Mit einem solchen gemessenen PMF kann man dann im *world wide web* (www) in Datenbanken suchen, ob ein solcher *fingerprint* schon einmal registriert wurde. Mittels der Software lässt sich auch aus einer bekannten Sequenz ein theoretischer Verdau berechnen und mit dem gemessenen vergleichen.

Je mehr Informationen man von dem gesuchten Protein besitzt desto erfolgreicher und sicherer sind die Ergebnisse der Datenbanksuche. Zur Datenbanksuche werden Merkmale wie das verwendete Enzym, der Organismus, die maximale Anzahl an Fehlschnitten (*missed cleavages*), Mindestgröße der Peptidfragmente, monoisotopische Masse bzw. Durchschnittsmasse, Form des Cysteins, Methioninoxidation, C-bzw. N-terminale Modifikationen, Modifikationen der Seitenketten, die Proteinmasse (z.B. abschätzbar im Gel) der pI, die Massentoleranz des Massenspektrometers und schließlich die Massen der einzelnen Peptidfragmente verwendet. Verschiedene Datenbanken wie z.B. Swiss-Prot, TrEMBL, NCBI, Genpept, Owl, pdbEST und dbEST sind für *peptide mass fingerprint* verfügbar.

In diesen Datenbanken wird mit Hilfe der eingegebenen Daten nach den möglichen Proteinen gesucht. Die gefundenen Proteine werden dann mit den prozentualen Übereinstimmungen der

Peptide, dem Namen des Proteins, dem dazugehörigen Organismus und der Masse ausgegeben. Programmnamen und Internet –Adressen sind im Teil II des Skriptes angegeben. Mittels Methoden der Bioinformatik ist so die schnelle Identifikation eines Proteins möglich. Selbstverständlich kann man mit der MS auch das Protein vor dem Verdau messen und so eine Aussage über das Molekulargewicht des Proteins erhalten, jedoch kann es hierbei zu verschiedenen Störmöglichkeiten kommen, die Sie auch während des Versuchs kennenlernen werden.

3. Massenspektrometrie (MS)

3.1 Was ist Massenspektrometrie?

Die Massenspektrometrie ist eine Technik zur Bestimmung der Molekülmasse von Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer besteht aus einer **Ionenquelle**, in der aus einer Substanzprobe ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt wird, einem **Massenanalysator**, der die Ionen hinsichtlich des Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) auftrennt und schließlich einem **Detektor**, der ein Massenspektrum liefert, aus dem abgelesen werden kann, welche Ionen in welchen Mengen gebildet worden sind.

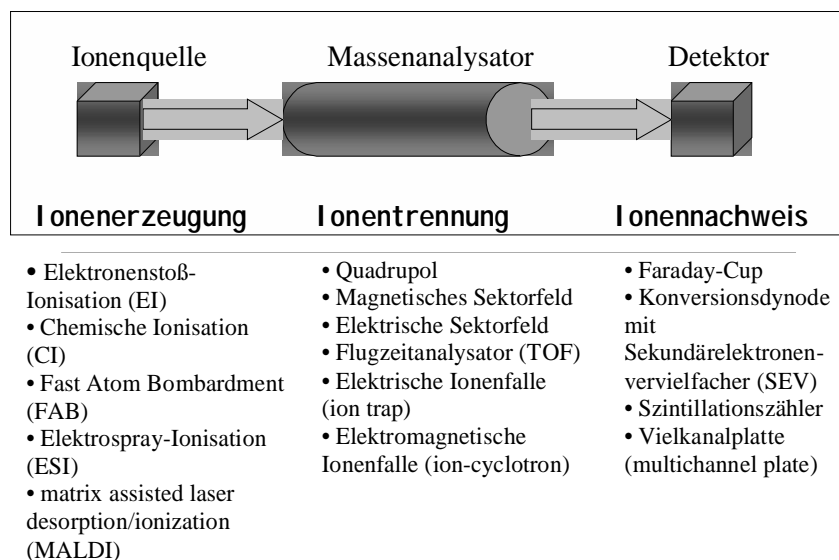


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers.

3.2. Ionisierung

Die Ionisierung der Analytmoleküle kann durch Aufnahme bzw. den Verlust eines Elektrons oder Aufnahme bzw. Verlust eines Protons ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) (aber auch andere Ionen) erfolgen. Dies wird zum Beispiel erreicht durch den Beschuss der Probe mit Elektronen (Elektronenstoß-Ionisation, EI), mit Atomen (*fast atom bombardement*, FAB), auf chemischem Wege (chemische Ionisation, CI) oder mittels Ionisation durch Laserbeschuss (Laser Ionisation, LI). Ionen können auch dadurch erzeugt werden, dass die gelöste Probe in einem elektrischen Feld versprüht wird (Elektrospray-Ionisation, ESI).

Wegen der sehr schonend verlaufenden Ionisation der Probenmoleküle ist die ESI-MS für die Analyse labiler Moleküle, wie z.B. von Proteinen, besonders geeignet. Die anderen Ionisierungstechniken (auch die Laser-Ionisation) führen zu weitgehender Fragmentierung dieser Proben. Werden die Probemoleküle in ein Kristallgitter eingebettet, welches einen großen Teil der Laserenergie absorbiert und einen geringen Teil davon an den Analyten überträgt, so kann die LI auch für die Ionisation labiler Analyten eingesetzt werden (Abb.3). Diese Methode wird MALDI-MS genannt:

MALDI: Ionisation durch Laserbeschuss mit gleichzeitiger Desorption aus einer Matrix (matrix assisted laser desorption/ionisation)

Mittels dieser Technik kann bei bekannter Aminosäuresequenz aus der Differenz der theoretischen Masse und der Masse des maturen Proteins direkt auf posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, Glykosylierung oder Sulfatierung) geschlossen werden. Nach proteolytischer Spaltung von Proteinen kann ohne vorherige Auftrennung des Spaltgemisches die Aminosäuresequenz kleinerer Peptide nach kontrollierter Fragmentierung durch massenspektrometrische Techniken wie PSD (*post source decay*) oder CID (*collision induced decomposition*) bestimmt werden. Aus den Sequenzspektren erhält man direkt die Lokalisierung kovalenter Modifikationen in der Peptidkette.

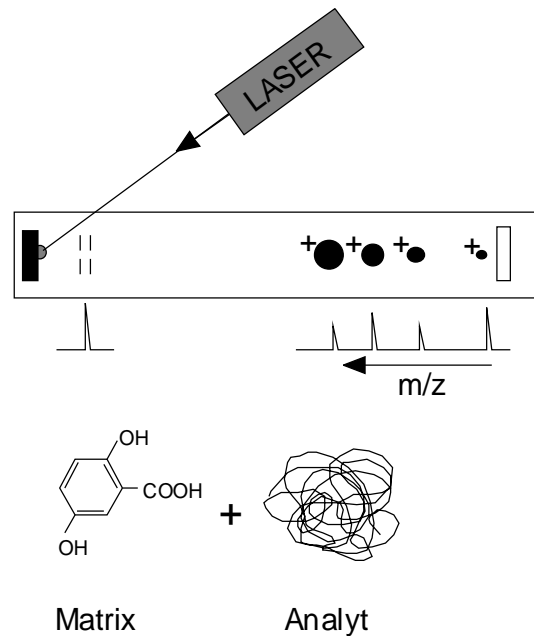


Abbildung 5: Prinzip der Ionisation von Analytmolekülen aus einer Matrix (MALDI-MS).

3.3 Massenanalysator

Der am häufigsten eingesetzte Massenanalysator bei der MALDI-MS ist der sogenannte Flugzeitanalysator (*time of flight*, TOF). Hierbei wird ausgenutzt, daß geladene Teilchen (Ionen) in einem elektrischen Feld beschleunigt werden können, wobei alle gleich geladenen Ionen dieselbe Energie erhalten. Dadurch besitzen sie nach Verlassen der Beschleunigungsstrecke (in einem nun feldfreien Raum, der sogenannten Flugröhre) in Abhängigkeit von ihrer Masse unterschiedliche Geschwindigkeiten. Diese Abhängigkeit wird durch Gleichung 1 wiedergegeben.

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot U \quad (\text{Gleichung 1})$$

m = Masse des Ions

v = Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke

z = Ladungszahl

e = Elementarladung

U = Beschleunigungsspannung

Die Gesamtflugzeit t_{gesamt} der Ionen setzt sich aus der Flugzeit entlang der Beschleunigungsstrecke des elektrischen Feldes ($t_{\text{Beschleunigung}}$) und der Flugzeit entlang der Driftstrecke im Flugrohr (t_{drift}) zusammen.

$$t_{\text{gesamt}} = t_{\text{Beschleunigung}} + t_{\text{drift}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

Für die Beschleunigung im elektrischen Feld gilt:

$$F = m \cdot a = (U/d) \cdot z \cdot e \quad (\text{Gleichung 3})$$

F = Kraft des elektrischen Feldes auf das Ion

a = Beschleunigung im Feld

d = Länge der Beschleunigungsstrecke im elektrischen Feld

Aus

$$d = 0.5 \cdot a \cdot (t_{\text{Beschleunigung}})^2 \quad (\text{Gleichung 4})$$

ergibt sich für die Beschleunigungszeit im elektrischen Feld $t_{\text{Beschleunigung}}$:

$$t_{\text{Beschleunigung}} = d \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot m}{U \cdot e \cdot z}} \quad (\text{Gleichung 5}).$$

Die Flugzeit im Flugrohr t_{drift} ergibt sich aus der Länge der feldfreien Driftstrecke L des Flugrohres und der Geschwindigkeit v :

$$t_{\text{drift}} = L/v \quad (\text{Gleichung 6})$$

Durch Einsetzen von Gleichung (6) in (1) und Umformung ergibt sich für das Masse/Ladungsverhältnis:

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U}{L^2} \cdot t_{\text{drift}}^2 \quad (\text{Gleichung 7})$$

Das Quadrat der Flugzeit ist dem Verhältnis von Masse und Ladung proportional. Damit ergibt sich für die Flugzeit:

$$t_{drift} = L \cdot \sqrt{\frac{m}{2 \cdot e \cdot U \cdot z}}$$

(Gleichung 8)

Durch Einsetzen der Gleichungen 5 und 8 in Gleichung 2 lässt sich die Gesamtflugzeit t_{gesamt} eines Ions bestimmen.

Nach Eichung mit Referenzsubstanzen bekannter Masse lässt sich die Masse von Probesubstanzen anhand ihrer Flugzeit bestimmen.

Unter dem Auflösungsvermögen (R) eines Massenanalysators versteht man die Fähigkeit, Massenpeaks mit geringen Massendifferenzen noch getrennt detektieren zu können (s. Kapitel 3.5). Ein großer Nachteil der linearen TOF-Technik ist die limitierte Massenauflösung, die aufgrund der Energieverteilung der Ionen, von Ladungseffekten der umgebenden Matrixionen oder einer zeitverzögerten Ionendesorption auftritt. Um die Auflösung des Analysators zu verbessern, besitzen viele TOF-Geräte zusätzlich einen **Ionenreflektor** (Abb.4).

Dieser besteht aus einem der Ladung der Ionen gleichpolig geladenen Feld, das die ankommenden Ionen abbremst und in entgegengesetzter Richtung beschleunigt, wo sie von einem zusätzlichen Detektor erfaßt werden. Ionen gleichen Masse-Ladungsverhältnisses dringen hierbei in Abhängigkeit von ihrer kinetischen Energie (zusätzliche Energie bei der Ionisation, welche Abweichungen bei durchlaufenem elektrischen Feld zur Folge hat) unterschiedlich tief in das Reflektorfeld ein, bevor sie in entgegengesetzter Richtung beschleunigt werden. Schnellere Ionen mit gleichem Masse-Ladungsverhältnis dringen tiefer in den Reflektor ein und legen so einen größeren Weg zurück, entsprechend langsamere einen kürzeren. Das Resultat ist eine bessere Fokussierung und damit bessere Auflösung.

Wegen der Limitierung der Reflektorspannung ist diese Technik jedoch nur für Massen bis ca. 5000 Da anwendbar. Bei Anlegen von Spannungen, die für die Umkehrung größerer Moleküle mit entsprechend hoher kinetischer Energie notwendig wäre, würde es im Vakuum des Analysators zu Spannungsüberschlägen mit der Folge von Kurzschlüssen kommen.

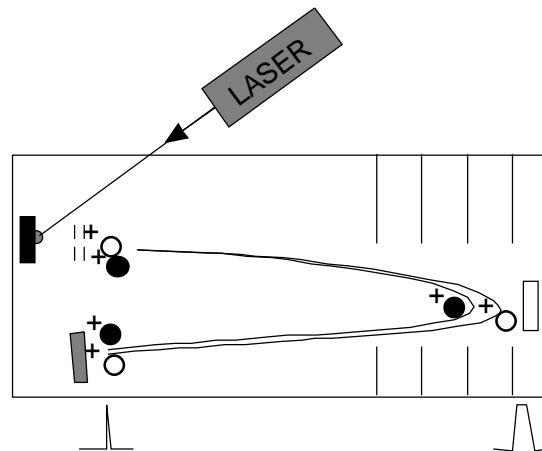


Abbildung 6: Prinzip eines Flugzeitmassenspektrometers mit Reflektor.

3.4. Detektor

Am Detektor werden die auftreffenden Ionen in elektrische Signale und damit in ein auswertbares Spektrum umgewandelt. Die Auftragung im Massenspektrum liefert Informationen über das Mass-Ladungs-Verhältnis (m/z) sowie über die Intensität der Signale.

Für Ionen wird als Detektionssystem im allgemeinen ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) mit einer vorgeschalteten Konversionsdynode, die ein den Ionen entgegengesetztes hohes Potential besitzt, eingesetzt. Die Ionen schlagen beim Auftreffen auf diese Dynode Elektronen heraus und erzeugen so einen Sekundärelektronenstrom (Ionen/ Sekundärelektronen-Konversion). Dieser ersten Dynode ist eine Zweite nachgeschaltet, die ein höheres Potential als die erste besitzt, so daß die Elektroden der ersten Dynode auf die Zweite fliegen und aus ihr wiederum Sekundärelektronen herausschlagen. Durch Hintereinanderschalten mehrerer Dynoden wird das Signal verstärkt.

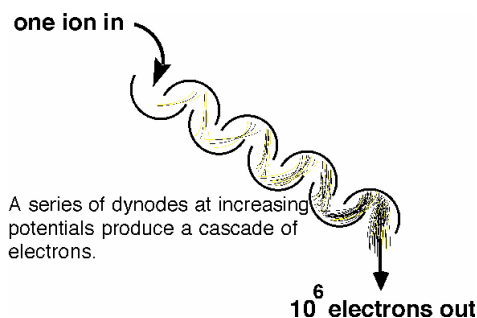


Abbildung 7: Prinzip eines Sekundärelektronenvervielfachers (SEV).

3.5 Kenngrößen der MALDI-Massenspektrometrie

Über die Eigenschaft eines Massenanalysators, nebeneinanderliegende Ionenmassen noch trennen zu können, gibt das Auflösungsvermögen R Aufschluß. Es ist definiert als der

Quotient der Masse m eines Ions und der Differenz seiner Masse zur von ihr zu trennenden Masse Δm :

$$R = m / \Delta m = m_1 / (m_2 - m_1) \quad (\text{Gleichung 9})$$

Hierbei ist auch zu beachten, wie die Trennung zweier Massenpeaks definiert ist. Bei der Quadrupol-MS gelten zwei Peaks als getrennt, wenn die Höhe des Tals zwischen beiden Peaks weniger als 50 % des Peaks mit der geringeren Signalintensität beträgt. Im Gegensatz dazu wird das Auflösungsvermögen bei der Flugzeitmassenspektrometrie aus einem einzigen Peak bestimmt, wobei Δm durch die Halbwertsbreite FWHM (*full width at half maximum*, Abb.8) bestimmt ist.

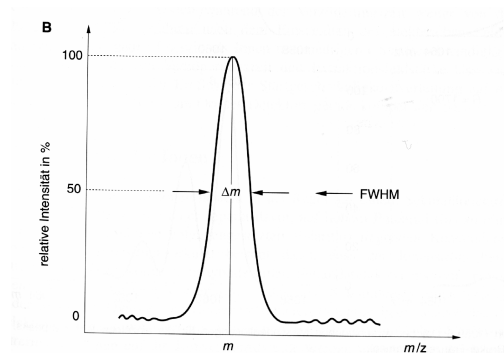


Abbildung 8: Definition der Halbwertsbreite(FWHM) eines Signalpeaks.

Diese Definition ist allerdings problematisch, da sich bei einer Auflösung von z.B. 1000 in der Flugzeitmassenspektrometrie die beiden Peaks noch überlagern. Erst bei einer FWHM von etwa 1400 sind die beiden Peaks voneinander getrennt.

3.6 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung spielt bei der MALDI-Massenspektrometrie eine entscheidende Rolle:

Die Probe wird durch Cokristallisation in die Matrix eingebettet, wobei die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Analytmolekülen vermindert werden. Die Matrix absorbiert die Energie des Lasers und überträgt sie teilweise auf die Analytmoleküle, die hierdurch ionisiert und desorbiert werden. Der genaue Mechanismus der Ionisation ist jedoch weiterhin ungeklärt. Der Analyt sollte möglichst frei von Verunreinigungen sein, da diese die

Kristallisation beeinflussen können. Dazu gehören vor allem Salze oder Detergenzien, jedoch ist die MALDI-MS im Vergleich zu anderen Ionisationsmethoden (v.a. der ESI-MS) relativ tolerant gegenüber diesen Verunreinigungen.

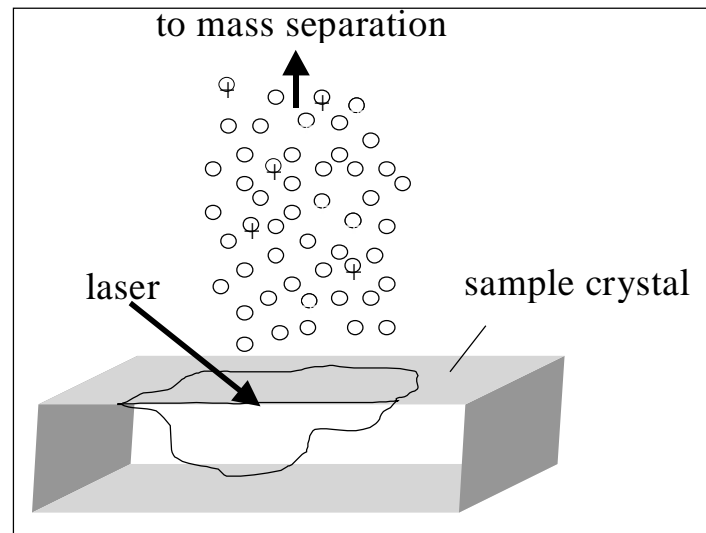


Abbildung 9: Ionisierung der Analytmoleküle durch Laserbeschuss in einer Matrix.

Die am häufigsten verwendeten Matrices für die Messung von Peptiden und Proteinen sind 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), α -Cyano-4-Hydroxycimtsäure (CCA) oder Sinapinsäure (SA).

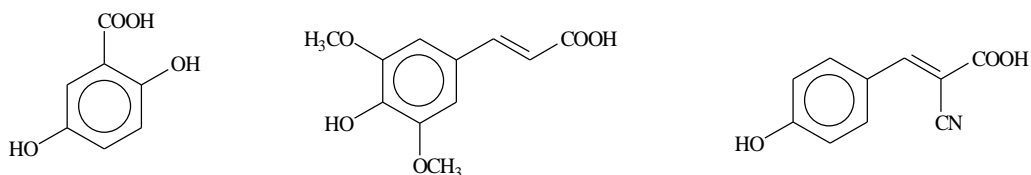


Abbildung 10: Häufig verwendete Matrices: DHB (links), SA (mitte) und CCA (rechts).

Nach dem Mischen von Matrix und Analyt in einem geeigneten Lösungsmittel wird eine geringe Menge dieses Gemischs (in der Regel etwa 0,5 μ l) auf das sogenannte Target – eine Metallplatte – aufgetropft. Nachdem das Gemisch getrocknet ist, wird das Target in das Messgerät eingefahren und ein Hochvakuum angelegt.

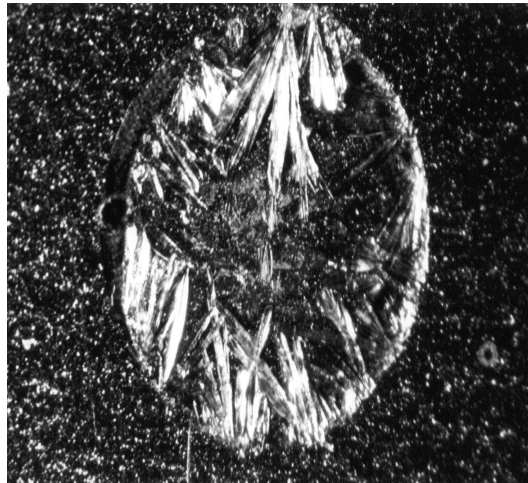


Abbildung 10: Kristalle von DHB auf einem MALDI-Target. Der Analyt ist nicht gleichmäßig in dem Cokristallisat verteilt, sondern in manchen Fällen bevorzugt am Rand, in anderen Fällen in der Mitte des Probenspots.

3.7 MALDI-Spektrum (Massenspektrum)

Bei der MALDI-MS entstehen hauptsächlich einfach geladene Molekül-Ionen. Protonen dienen hierbei als Ladungsträger, so dass die entsandten Ionen eines Analyten M also in der Form $[M+H]^+$ (*positive mode*) oder $[M-H]^-$ (*negative mode*) vorliegen. Bei größeren Molekülen wie Proteinen beobachtet man mit zunehmenden Molekulargewicht neben diesen Ionen auch Dimere der Form $[2M+H]^+$ und in einigen Fällen auch die mehrfach geladenen Monomere $[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$, usw. (allgemein: $[M+nH]^{n+}$). Dieser Effekt ist von mehreren Faktoren abhängig, etwa von den chemischen Eigenschaften des Analyten und dessen Konzentration. Das einfach geladene Molekül-Ion ist aber in der Regel die dominierende Spezies.

3.7.1 Einfluß der Isotope auf das Signal:

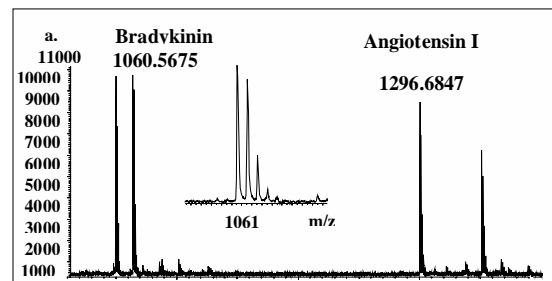
Viele in der Natur vorkommende chemische Elemente sind Gemische von Isotopen. Diese besitzen wegen der bei gleicher Ordnungszahl unterschiedlichen Anzahl an Neutronen im Atomkern verschiedene Massen. Deshalb ergeben sich auch für fast alle natürlichen Moleküle eine der Isotopenverteilung entsprechende Anzahl an unterschiedlichen Massen.

Die Masse eines Moleküls einer gegebenen Elementarzusammensetzung wird wie folgt definiert:

- Durchschnittsmasse: Masse eines Ions, berechnet aus den unterschiedlichen Atomgewichten der einzelnen Elemente unter Berücksichtigung aller Isotope und ihrer Häufigkeit.

- monoisotopische Masse: Masse eines Ions, berechnet aus den exakten Massen des jeweils leichtesten, stabilen Isotops eines Elements.

Eine Zusammenstellung wichtiger natürlicher Isotope und ihre natürliche Häufigkeit ist in Tabelle 3 (Anhang) zu finden.



$$\text{Isotopenverteilung} = (I_{XC} + I_{YC} + I_{ZC} + \dots)^{n_C} * (I_{XH} + I_{YH} + I_{ZH} + \dots)^{n_H} * (I_{XO} + I_{YO} + I_{ZO} + \dots)^{n_O} * \dots$$

mit: H, C, O...: Elemente
 X, Y, Z, ...: Isotopenmassen
 $I_{XC}, I_{YC}, I_{ZC}, \dots$: Isotopenhäufigkeit des Elementes
 n_C, n_H, n_O, \dots : Zahl der Atome eines Elements in der Verbindung

Abbildung 11: MALDI-Massenspektrum von Bradykinin und Angiotensin I (oben), Berechnung der Isotopenverteilung (unten).

3.9 Ergänzende Literatur zur Anwendung der Massenspektrometrie auf biologische Probleme

1. **Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998).** *Bioanalytik*, Verlag Spektrum Akademischer Verlag
2. **Lehmann, W. D. (1996).** *Massenspektrometrie in der Biochemie*, Verlag Spektrum Akademischer Verlag.
3. **Kellner, R., Lottspeich, F & Meyer, H.E. (1994).** *Microcharacterization of proteins*. VCH-Verlag, Weinheim.

4. Fragen zur Versuchsvorbereitung

1. Welche Vorteile bietet die Reflektron-Technik bei der MALDI-TOF MS?
2. Erläutern Sie die Begriffe monoisotopische und durchschnittliche Masse!
3. Schlagen Sie Anwendungsmöglichkeiten für isotonenmarkierte Verbindungen in der Massenspektrometrie vor!

III. Durchführung

0. Hinweise zu den grundlegenden Laborarbeiten

Pipettieren:

Pipetten dienen dazu, ein bestimmtes, vorher festgelegtes Volumen abzumessen.

Mit *Vollpipetten* kann man nur jeweils ein bestimmtes Volumen abmessen. Die Meßgenauigkeit ist sehr hoch.

Mit *Meßpipetten* kann man in einem bestimmten Bereich verschiedene Volumina abmessen. Der relative Fehler ist im Vergleich zu Vollpipetten etwas größer.

Pipettieren ist grundsätzlich nur mit Pipettenhilfen (z.B. Peleusball) erlaubt bzw. mit den entsprechend passenden Pipettenspitzen!

a.) Ansatz des Proteinverdau

Sie bekommen vom Betreuer zwei Proteinlösungen, die Sie verdauen sollen. Als Protease wird Trypsin verwendet. Da der Verdau mindestens 4 Stunden dauert, setzen Sie einen solchen zu Beginn des Versuchs an, arbeiten dann aber mit einem von Ihrem Betreuer vorbereiteten weiter.

Vom Betreuer vorbereitete Ansätze:

- *Puffer*: Ammonium-Bicarbonatpuffer, 25 mmol/L, pH 8-8.5
(Pufferlösungen sind Lösungen, die eine Mischung einer schwachen Säure und ihrer korrespondierenden Base enthalten. Sie ändern ihren pH-Wert nur geringfügig bei Zugabe begrenzter Mengen von Säuren oder Basen.)
- *Protease*: Trypsin; Stock: 2.7 mg/ml in 25 mmol/L $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, entspricht 0.09 mmol/L
- *β -Mercaptoethanol-Lösung*: 0.5 μl auf 25 μl $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ (40 mmol/L)
(Reduktion der vorhandenen Disulfidbrücken in der Peptidkette)

- *Proteine* (für Studenten unbekannt, sie erhalten nur Molekulargewicht bzw. bestimmen dieses selbst und den pI-Wert; aus dem *PMF* und diesen Angaben können die Proteine bei einer Datenbankrecherche eindeutig identifiziert werden).
- *Eichpeptidlösung*, enthält 5 synthetische Peptide bekannter Masse.

Durchführung:

- Stellen Sie eine Lösung von 20 µg Protein in 20 µl 25 mmol/L (NH₄)HCO₃-Puffer her
- Zur Identifizierung von Peptiden aus dem autoproteolytischen Verdau der Trypsin-Endoprotease erstellen Sie einen Blindwert (Verdau ohne Targetproteine).
- Geben Sie jeweils 5 µl β-Mercaptoethanol-Lösung dazu.
- 10 Min. in einem kochendem Wasserbad erhitzen.
- Abkühlen auf RT, Achtung: die Flüssigkeit kondensiert im Deckel des Eppendorff-Tubes.
- Zugabe 10 µl (NH₄)HCO₃-Puffer.
- Zugabe von 0.75 µl Trypsin-Stocklösung (entspricht 2 µg Protease).
- 4 Stunden im Wasserbad (37°C) inkubieren.
- Zugabe von 5 µl 10% ige Ameisensäure-Lösung (Vorsicht: Gasentwicklung) (Stop des Trypsin-Verdaus).

Dieser Proteinverdau ist für die Gruppe des nächsten Versuchtages gedacht. Sie erhalten zwei fertige Protein-Verdaue.

b.) Massenspektrometrische Messung: Gesamtprotein (Molekulargewichtsbestimmung)

Sie messen zunächst einen Teil der unverdauten Proteine, um das Molekulargewicht dieser Proteine zu bestimmen.

Durch welche Experimente könnten Sie noch das Molekulargewicht des Proteins bestimmen?

Vor Beginn der Messung müssen Sie das Massenspektrometer eichen. Dies geschieht mit Hilfe eines Proteins mit bekanntem Molekulargewicht.

- Diese Prozedur wird für das Eichprotein Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin* , BSA) und die beiden Probenproteine durchgeführt.

- Stellen Sie eine Protein/Matrix-Lösung her mit der Zusammensetzung: SA (gesättigt) in 33% Acetonitril, 0.1% TFA, dazu 0.5% Proteinlösung.
- Geben Sie 0.5 µl auf das Proben target.
- Lassen Sie die Ansätze trocknen und bringen Sie dann das Target in das Massenspektrometer.
- Die Messung erfolgt unter Anleitung des Assistenten.

Erklären Sie die Peakform der Proteinspektren. Was könnte die Ursache für die breiten Peaks sein?

c.) Massenspektrometrische Untersuchung des Verdaus

Präparation der Matrices:

Da die durch den tryptischen Verdau entstandenen Spaltpeptide in verschiedenen Matrices unterschiedlich gut desorbiert und ionisiert werden, müssen mehrere Matrices verwendet werden, um eine optimale Sequenzüberdeckung der gespaltenen Proteine zu erreichen.

Matrix 1: gesättigte α -Cyano-4-Hydroxymizsäure (CCA) in 33% Acetonitril, 0.1 % TFA

Matrix 2: 10 mg/ml trans-Ferulasäure (FA) in 33% Acetonitril, 0.1% TFA

Präparation des tryptischen Verdaus auf dem Target:

- Mischen Sie je 1 µl eines tryptischen Verdaus mit je 1 µl einer Matrix in einem 200 µl PCR-Gefäß und geben sie je 2 Spots auf die Targetplatte
- Wiederholen Sie diese Schritte für den autoproteolytischen Blindwert (= nur Trypsin im Verdauansatz).
- Die Standardpeptide, die zur Eichung des Massenspektrometers dienen (5 Eichpeptide, quadratischer Fit!) präparieren Sie nur mit CCA- Matrix
- Trocknen lassen
- Nach dem Trocknen wird das Target in das Massenspektrometer gebracht und vermessen. Beachten Sie hierzu die Anweisungen des Betreuers und führen Sie unter keinen Umständen Operationen am Messgerät ohne vorherige Rücksprache durch.

d.) Auswertung der Massenspektren

Sie erhalten Auflistungen der jeweiligen gefundenen Spaltpeptide. Subtrahieren Sie die Signale der jeweiligen autoproteolytischen Trypsinpeptide und erstellen Sie für beide Target-Proteine je eine Gesamtliste der korrigierten gemessenen Spaltpeptide in beiden Matrices (Messung in FA und CCA). Mehrfachnennungen unterbleiben dabei.

Mit den erhaltenen Massen der beiden Gesamtlisten werden mit Hilfe von speziellen Programmen Proteindatenbanken durchsucht und die Identität der beiden Target-Proteine ermittelt. Als Zusatzinformation dienen dabei der isoelektrische Punkt sowie das Molekulargewicht der beiden Proteine.

Programme für die Datenbanksuche mit Peptidmassen:

- <http://129.85.19.192/prowl-cgi/ProFound.exe>
- <http://prospector.ucsf.edu/>
- <http://www.matrixscience.com>

IV. Auswertung

In das Versuchsprotokoll gehören alle beschrifteten Spektren, alle Ausdrücke der Datenbankrecherchen, weiterhin sollen alle bei den einzelnen Versuchsteilen gestellten Fragen beantwortet werden.

Anhang

Tabelle 2: Natürlich vorkommende Aminosäuren, Drei- - und Einbuchstabencode, Summenformel und durchschnittliches Molekulargewicht

Aminosäure	Symbol	Summenformel	Masse (average)
Alanin	Ala, A	C ₃ H ₇ NO ₂	89.09
Arginin	Arg, R	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.20
Asparagine	Asn, N	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132.12
Aspartat	Asp, D	C ₆ H ₉ NO ₆	133.10
Cystein	Cys, C	C ₃ H ₇ NO ₂	121.16
Glutamin	Glu, E	C ₅ H ₉ NO ₄	147.13
Glutamat	Gln, Q	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.15
Glycin	Gly, G	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07
Histidin	His, H	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.16
Isoleucin	Ile, I	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.18
Leucin	Leu, L	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.18
Lysin	Lys, K	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146.19
Methionin	Met, M	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149.21
Phenylalanin	Phe, F	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.19
Prolin	Pro, P	C ₅ H ₉ NO ₂	115.13
Serin	Ser, S	C ₃ H ₇ NO ₃	105.09
Threonin	Thr, T	C ₄ H ₉ NO ₃	119.12
Tryptophan	Trp, W	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.23
Tyrosin	Tyr, Y	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.19
Valin	Val, V	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.15

Tabelle 3: Natürliche Isotope und ihre natürliche Häufigkeit.

Stabile Isotope	Natürliches Vorkommen
Wasserstoff ^1H ^2H	99.985% 0.015%
Kohlenstoff ^{12}C ^{13}C	98.890% 1.110%
Stickstoff ^{14}N ^{15}N	99.634% 0.366%
Sauerstoff ^{16}O ^{17}O ^{18}O	99.762% 0.038% 0.200%

Tabelle 4: Verwendete Abkürzungen.

IEF	Isoelektronische Fokussierung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
2D-PAGE	zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
IEC	Ionenaustauschchromatography (<i>ion exchange chromatography</i>)
MS	Massenspektrometrie
MALDI	matrix assisted laser desorption/ ionization
ASA	Aminosäureanalyse
ESI	Elektrospray Ionisation
PSD	<i>post source decay</i>
LC	Flüssigchromatography (<i>liquid chromatography</i>)
CE	Kapillarelektrophorese (<i>capillary electrophoresis</i>)

pI	isoelektrischer Punkt
SDS	sodium dodecyl sulfate (Detergenz)
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
EI	Elektronenstoß-Ionisation
FAB	<i>fast atom bombardement</i>
CI	chemische Ionisation
LI	<i>laser ionization</i>
TOF	<i>time of flight</i> (Flugzeitanalysator)
m	Masse der Ions
v	Geschwindigkeit
U	Beschleunigungsspannung
z	Ladungszahl
e	Elementarladung
t _{ges}	Gesamtflugzeit
t _{Beschleunigung}	Beschleunigungszeit im elektrischen Feld
t _{trift}	Driftstrecke im Flugrohr
a	Beschleunigung durch das Feld
L	Länge der feldfreien Driftstrecke
R	Auflösungsvermögen des Massenanalysators
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
FWHM	<i>full width at half maximum</i>
DHB	2,5 Dihydroxyzimtsäure
CCA	α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure
FA	<i>Trans</i> -Ferulasäure
SA	Sinapinsäure
RT	Raumtemperatur
(NH ₄)HCO ₃	Ammonium-Hydrogencarbonat