

Die dritte Dimension

Proteinanalytik mittels mehrdimensionaler
Flüssigkeitschromatografie
mit monolithischen Phasen
und Massenspektrometrie

Jens Sproß, Fakultät für Chemie, Institut für Organische Chemie I –
Massenspektrometrie, Universität Bielefeld



Polarlichter entstehen wenn geladene Teilchen
des Sonnenwindes durch das Erdmagnetfeld
abgelenkt und in die Polregionen geleitet werden,
wo sie Gasmoleküle in der Atmosphäre
zum Leuchten anregen.

Bei Sektorfeld-Massenspektrometern
(magnetischer Sektor) und Fouriertransformation-
Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometern
(magnetische Ionenfalle) nutzt man diese Eigenschaft
von Magnetfeldern zur Analyse
von ionisierten Molekülen.

Proteine spielen in unserem täglichen Leben eine wichtige Rolle. Dank der Proteine können wir reden, uns bewegen und denken, sie beschützen uns vor Krankheiten oder reparieren Schäden. Auch als pharmazeutische Wirkstoffe werden Proteine immer populärer, so lag 2012 in Deutschland der Anteil von Biopharmazeutika am Umsatz bei 21 % (aus dem Branchenreport „Medizinische Biotechnologie in Deutschland 2013“). Um zu verstehen, wie Proteine biochemische Prozesse steuern und wie dadurch Krankheiten behandelt werden können, ist die Kenntnis der Aminosäuresequenz und die Art, Anzahl und Lokalisation von Aminosäuremodifikationen von elementarer Bedeutung. Beispielsweise werden beim Austin-Syndrom zwar Sulfatasen im Körper produziert, allerdings fehlt ein Enzym, welches in diesen eine Aminosäure modifiziert. Dadurch können die Sulfatasen ihre Aufgabe im Körper nicht wahrnehmen. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen werden heute vor allem massenspektrometrische Methoden eingesetzt [1].

Proteinanalytik

Die Analyse der Proteine erfolgt folgendermaßen: Die extrahierten und gereinigten Proteine werden einer enzymatischen Spaltung unterworfen, bevorzugt mit Trypsin, einer Protease, die C-terminal von Arginin und Lysin spaltet. Dieser Prozess dauert in der Regel mehrere Stunden. Die entstandene komplexe Mischung an Spaltpeptiden wird anschließend mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie (HPLC) aufgetrennt. So können durch Affinitätschromatografie gezielt Peptide mit bestimmten posttranslationalen Modifikationen, beispielsweise Biotinylierungen, Phosphorylierungen oder Glykosilierungen, angereichert werden, während in der Umkehrphasenchromatografie (RP – reversed phase) Peptide aufgrund ihrer Hydrophobizität getrennt werden. Anschließend erfolgt die Analyse der eluierten Peptide in einem Massenspektrometer. Dabei werden die ionisierten Peptide in die Gasphase überführt und im Hochvakuum nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt und detektiert. Die Aminosäuresequenz eines Peptids wird durch ein Fragmentierungsexperiment mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bestimmt. Dazu wird ein Peptid mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnis isoliert und mit einem Stoßgas in Kontakt gebracht, wodurch es zu Brüchen an den Amidbindungen des Aminosäurerückgrats kommt. Die dabei entstehenden Fragmentionen, b- und y-Ionen genannt, ermöglichen die Bestimmung der Aminosäuresequenz im Peptid und somit auch im Protein. Auch die Art und Lokalisation von posttranslationalen Modifikationen kann dadurch bestimmt werden.

Durch eine Automatisierung kann dieser sehr zeitaufwändige Ablauf beschleunigt werden, besonders die enzymatische Spaltung ist in diesem Fall ein Flaschenhals. Durch die Verwendung von Enzymreaktoren kann die enzymatische Spaltung deutlich beschleunigt werden. Aber auch die Durchführung mehrerer chromatografischer Trennschritte verlängert die Analysenzeit, zudem kann es durch die Vielzahl manueller Bearbeitungsschritte zu Verunreinigungen und Probeverlust kommen. Diese Probleme können durch die Verwendung mehrdimensionaler HPLC, bei der die einzelnen komplementären Trenndimensionen direkt miteinander verknüpft sind, reduziert werden.

Monolithische Phasen für die Chromatografie

Für die Flüssigkeitschromatografie fanden in den letzten Jahren verstärkt monolithische stationäre Phasen Anwendung [2, 3]. Monolithe werden durch Polymerisation von Monomeren in Gegenwart inerter Lösungsmittel hergestellt und weisen eine schwammartige Struktur auf (Abb. 1). Im Gegensatz zu klassischen partikelbasierten Trägermaterialien weisen monolithische Medien einige Vorteile auf [4]. Da die flüssige Polymerisationsmischung in jede beliebige Form gefüllt werden kann, lassen sich auch Kapillarsäulen einfach und billig herstellen. Durch die Wahl der geeigneten Lösungsmittel und ihr Mischungsverhältnis können zudem die Poreneigenschaften des Monolithen maßgeschneidert werden. Im Vergleich zu Partikelsäulen ist der Gegendruck bei

gleichem Säulendurchmesser reduziert, was höhere Flussraten und somit kürzere Analysenzeiten ermöglicht. Zudem weisen Monolithen einen schnellen Massentransfer auf, bedingt durch die konvektive Strömung innerhalb der sehr unregelmäßig aufgebauten, schwammartigen Monolithen. Dies verbessert die Trenneigenschaften oder – im Fall von Enzymreaktoren – die Effizienz des Reaktors. Dadurch ist die enzymatische Spaltung einer Proteinprobe bei einer Verweilzeit von weniger als vier Minuten mit einem monolithischen Trypsinreaktor möglich, während eine Spaltung in Lösung bis zu 24 Stunden benötigen kann [5]. Zudem steigt durch die Immobilisierung die Toleranz des Enzyms gegen Denaturanzien. Selbst bei der Verwendung von 6 M Harnstoff wird das Trypsin nicht inaktiviert, bei einer Spaltung in Lösung wäre das bereits bei einer Konzentration von mehr wie 1 M Harnstoff der Fall.

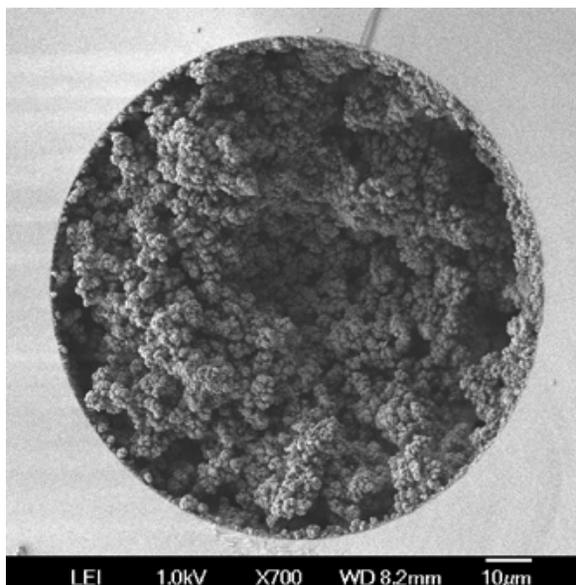


Abb. 1 Elektronenmikroskopiebild einer monolithischen stationären Phase in einer Quarzglaskapillare (Innendurchmesser 100 µm). Genaue Angaben zur Herstellung siehe [5].

Automatisierte Proteinanalyse – ein Beispiel

Zur Analyse von biotinylierten Proteinen wurde ein 3-dimensionales nano-HPLC System (Flussraten 300 nL/min bzw. 500 nL/min) mit 3 verschiedenen chromatografischen Säulen etabliert, welches direkt mit einem Quadrupol/Flugzeit-Massenspektrometer (Q-ToF – quadrupole/time-of-flight) mit Elektrosprayionisation (ESI) gekoppelt ist (3D-nano-HPLC/nano-ESI-Q-ToF-MS/MS, schematischer Aufbau Abb. 2) [6]. In der ersten Dimension wurde der monolithische Trypsinreaktor verwendet, um die injizierten Proteine zu spalten. Die Spaltpeptide wurden anschließend über die zweite Dimension geleitet, eine monolithische Affinitätssäule,

welche zur Anreicherung der biotinylierten Peptide dient [7]. Diese Affinitätssäule nutzt die Eigenschaften von monomeres Avidin, Biotin reversibel zu binden. Durch die gezielte Anreicherung der biotinylierten Peptide ist es möglich, die Sensitivität der Analyse für diese Peptide stark zu erhöhen. Bei einer simultanen Analyse von biotinylierten neben nicht biotinylierten Peptiden ist die Identifikation der niederabundanten biotinylierten Peptide hingegen erschwert. Eine Analyse der nicht biotinylierten Peptide erfolgt nicht, erst die biotinylierten Peptide werden nach ihrer Elution mittels Umkehrphasen-HPLC getrennt und mit einem Q-ToF Massenspektrometer analysiert.

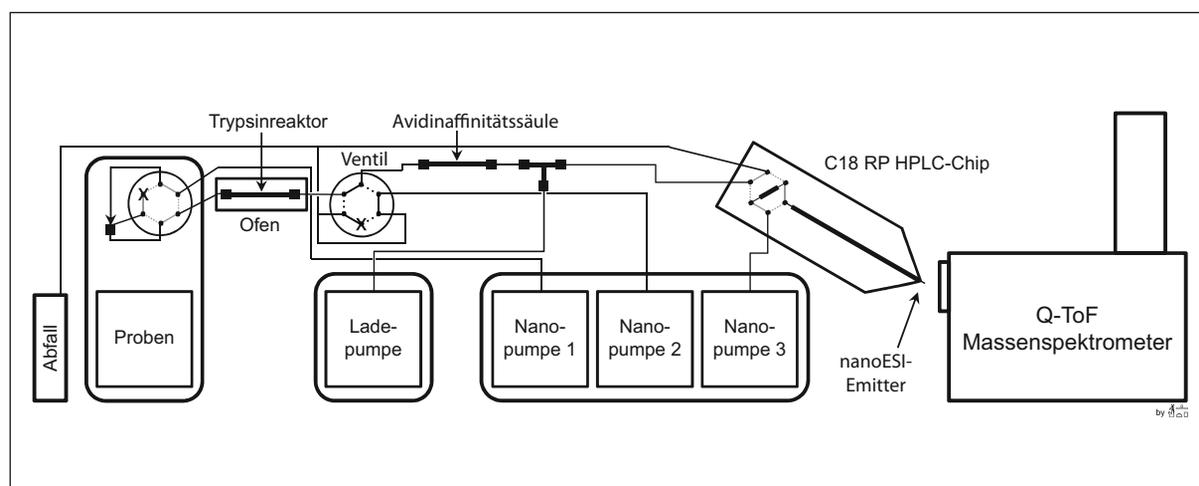


Abb. 2 Schematischer Aufbau des 3-dimensionalen HPLC Systems mit direkter Kopplung zu einem Q-ToF Massenspektrometer (aus [6], Copyright 2013, Springer). Genauere Angaben zum experimentellen Ablauf, vgl. [6].



Jens Sproß, geb. 1981, studierte Chemie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena und promovierte an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Seit Juni 2012 ist er am Institut für Organische Chemie I der Universität Bielefeld als Leiter der Abteilung Massenspektrometrie beschäftigt. Er forscht auf dem Gebiet der Proteinanalytik mittels HPLC und Massenspektrometrie und beschäftigt sich mit neuen Anwendungen für monolithische stationäre Phasen.

Abbildung 3 zeigt ein Chromatogramm der extrahierten Ionenspuren der auf diesem Weg identifizierten Peptide [6]. Das biotinylierte Protein wurde mit anderen Proteinen gemischt, die in einem Überschuss vorlagen. Obwohl die Biotinylierung artifiziell eingeführt wurde und somit eine Vielzahl an möglichen biotinylierten Peptiden vorhanden war (alle mit unterschiedlichen Konzentrationen), konnten 22 Peptide identifiziert werden, davon 19 biotinyliert. Peptide ohne Biotinylierung wurden praktisch nicht identifiziert, ebenso Peptide der Überschussproteine. Durch das automatisierte, dreidimensionale HPLC-MS System war es möglich, die Analyse und Identifikation des biotinylierten Proteins innerhalb von 2 Stunden und 15 Minuten durchzuführen. Im Vergleich dazu nimmt die Analyse bei Durchführung der Einzelschritte 2–3 Tage in Anspruch.

Ausblick

Monolithische stationäre Phasen wurden seit ihrer Einführung vor 20 Jahren kontinuierlich weiter entwickelt. Sie sind ein leicht herzustellendes und vielseitig einsetzbares Trennmedium. Dabei spielt es keine Rolle, ob man große Säulendurchmesser für präparative Produktsolierung benötigt oder mit Kapillarsäulen Analysen durchführt. Besonders bei der Miniaturisierung („lab-on-a-chip“) sind monolithische Säulen Partikelsäulen überlegen. Die direkte Verknüpfung mehrerer Trenndimensionen wird heute nicht routinemäßig eingesetzt, da sie große Anforderung an die apparative Ausstattung stellt. Die Massenspektrometrie hingegen ist in den letzten Jahren in der Proteinanalytik unverzichtbar geworden. Besonders die rasante Entwicklung der massenspektrometrischen Methoden ist dafür ausschlaggebend: Egal, ob Analysen von Proteinkomplexen mit einem Molekulargewicht von mehreren 100 kDa bis hin zur Sequenzierung von Peptiden, möglich ist heute (fast) alles.

■ j.spross@uni-bielefeld.de

Literatur

- [1] Doman, B. & Aebersold, R. (2006), *Science*, 312, 212-217
- [2] Svec, F. & Frechet, J.M.J. (1996), *Macromolecular Symposia*, 110, 203-216
- [3] Tanaka, N. et al. (2002), *J. Chromatogr. A*, 965, 35-49
- [4] Guiochon, G. (2007), *J. Chromatogr. A*, 1168, 101-168
- [5] Sproß, J. & Sinz, A. (2010), *Anal. Chem.*, 82, 1434-1443
- [6] Sproß, J. et al. (2013), *Anal. Bioanal. Chem.*, 405, 2163-2173
- [7] Sproß, J. & Sinz, A. (2012), *Anal. Bioanal. Chem.*, 402, 2395-2405

Foto: ©panthermedia.net | Stephen Mcsweeney

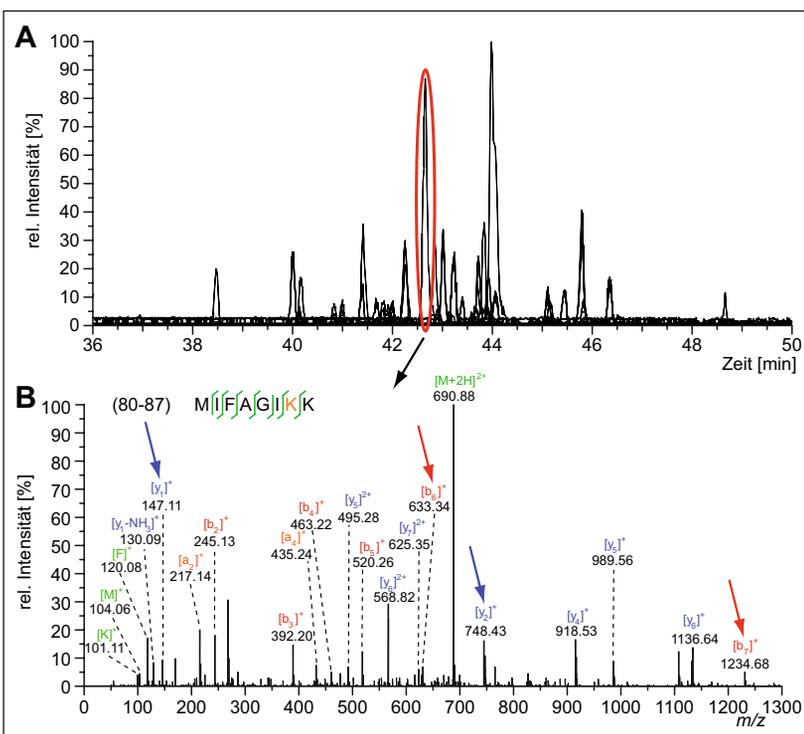


Abb. 3 A Extrahiertes Ionen-Chromatogramm der identifizierten biotinylierten Peptide. **B** Fragmentmassenspektrum eines biotinylierten Peptids. Die Masse der Fragmentionen y_1^+ und y_2^+ (blaue Pfeile) sowie b_6^+ und b_7^+ (rote Pfeile) ermöglicht die eindeutige Lokalisierung der Biotinylierung an Lysin 86 von Cytochrom c (aus [6], Copyright 2013, Springer).