

Anwendung Tandem-massenspektrometrischer Methoden zur Charakterisierung von Proteinpolymorphismen in der Klinischen Proteomforschung

Cornelia Koy¹, Marcus Mreyen², Martin Resch² und Michael O. Glocker¹,

¹ Proteom-Zentrum Rostock, Medizinische Fakultät, Universität Rostock,

² Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg

Das Proteom-Zentrum Rostock

► Die am Proteom-Zentrum Rostock etablierten hochempfindlichen Trenn- und Analysemethoden erfüllen alle erforderlichen Leistungsmerkmale für die klinische Proteomforschung insbesondere dank der etablierten „standard operating procedures“ (SOPs). Mithilfe von Internet-zugänglichen Nukleotid- und Aminosäuresequenzdatenbanken können 2D-gelseparierte Proteine sowohl für prokaryotische als auch für eukaryotische (z.B. murine und humane) Proben rasch identifiziert werden. Für den Fall, dass ein Protein von Interesse nicht in den Datenbanken enthalten ist, ermöglicht die massenspektro-

metrische „*de-novo*“-Sequenzierung des fragmentierten Partialpeptids die rasche Identifizierung des zugrunde liegenden Proteins, bzw. die Identifizierung von post-translationalen Modifizierungen. Durch das im Proteom-Zentrum Rostock vorhandene LIM-System (Proteo Base) steht eine bewährte elektronische Infrastruktur zur Unterstützung sowohl der experimentell arbeitenden Gruppen („wet-lab“) als auch der Auswertegruppen („dry-lab“) zur Verfügung. Die ProteoBase ist modular aufgebaut und ermöglicht die problemlose Integration modernster Analysengeräte auch für die nachgeschaltete Datenauswertung im klinischen Kontext.

Klinische Proteomanalyse

Im Proteom-Zentrum Rostock sind alle wesentlichen Methoden zur Proteomanalyse etabliert worden (2D-Gelelektrophorese, Visualisierungs-/Imagingmethoden, Spot-picking und in-gel proteolytische Abbauprozesse, massenspektrometrische Proteinidentifizierung, Datenbankanalysen). Darüber hinaus ist die Entwicklung von standardisierten durchführbaren Proteomanalysen mithilfe fluoreszenzmarkierter Proteine Gegenstand unserer Forschung. Mithilfe der massenspektrometrischen Fragmentierungsmethoden (PSD-Modus, QIT-ToF-MSⁿ) können Partialsequenzen von 2D-gelseparierten Proteinen sowie die Modifizierungsstellen der Proteine direkt identifiziert werden (s.u.).

Im Rahmen der bisher bearbeiteten Projekte wurden Erfahrungen für die Isolierung und biochemische Charakterisierung von Proteinen aus biologischen Materialien z.T. in enger Kooperation mit Biologen, Biochemikern und Medizinern gewonnen, sowie Erfahrungen im Umgang mit klinischen Proben wie z.B. Synovialflüssigkeit, Pan-nusgewebe, zelluläre Materialien etc. für die Proteomanalyse gesammelt. Eine zentrale Schlüsseltechnologie in der Proteomforschung ist die Kombination der 2D-Gelelektrophorese (Abb. 1) mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung der separierten Proteine. Mithilfe von Internet-zugänglichen Nukleotid- und Aminosäuresequenzdatenbanken können

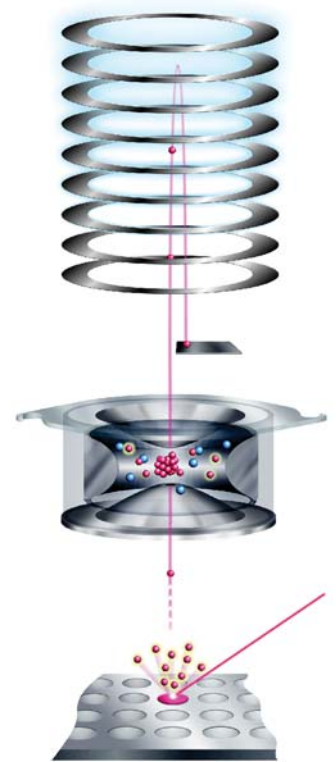


Abb. 2: Schematische Darstellung der Ionenoptik und des Analysatorbereichs eines MALDI-QIT-ToF Hybrid-Massenspektrometers.

mit dieser Analysenstrategie 2D-gelseparierte Proteine rasch identifiziert werden^[1].

Unsere Entwicklungen haben die Anwendbarkeit der Massenspektrometrie für die direkte Analyse von komplexen Gemischen durch neu entwickelte Probenpräparationsmethoden entscheidend erweitert. In unseren Untersuchungen wurden erstmals multiple Präfraktionierungsmethoden für klinische Proben etabliert (Free-flow Elektrophorese, Immunpräzipitation, usw.), die für kleinste Proteinmengen, etwa nach mehrfachen chromatographischen Trennungsschritten z.B. durch HPLC geeignet sind.

Darüber hinaus haben wir für die Struktur-/Funktionskorrelation von Proteinen neue Methoden der limitierten Proteolyse entwickelt. Hierfür finden MALDI-MS- und ESI-MS-Molekulargewichtsbestimmungen in Kombination mit Mikro-Trennverfahren (*on-line* Mikro-LC-MS Kopplung) sowie neue von uns entwickelte Verfahren der massenspektrometrischen Peptide-mapping Analyse direkt



Abb. 1: Präparationsschritt für die Vorbereitung der elektronischen Visualisierung eines 2D Gels nach Entwicklung der Proteinspots durch Silberfärbung.

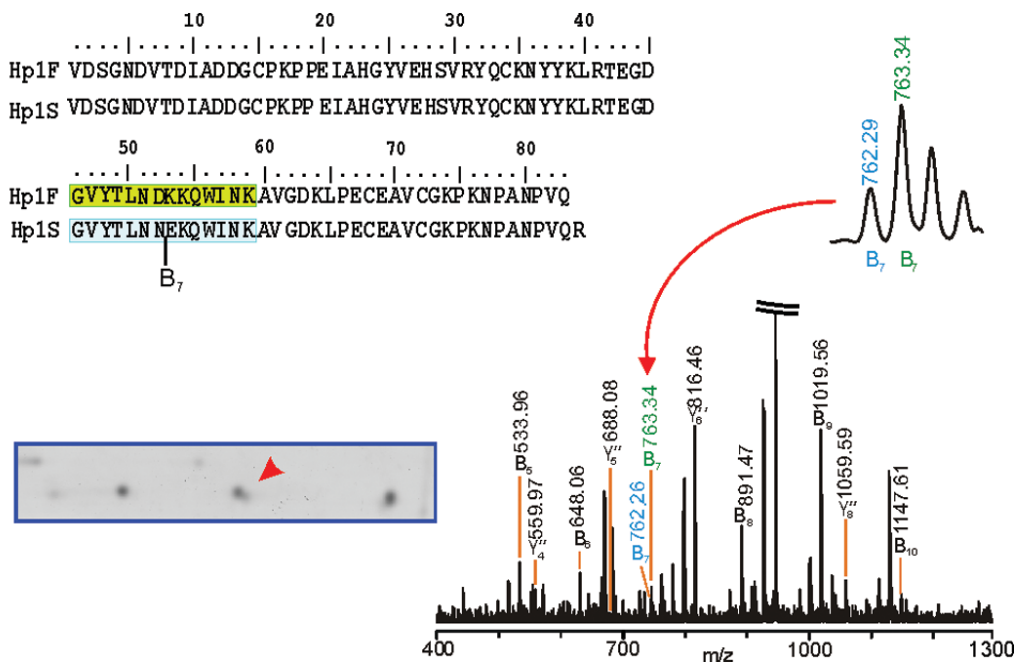


Abb. 3: Massenspektrometrie-basierte Identifizierung von Proteinparsialsequenzen in der Proteomanalyse. Das MS³-Spektrum (rechts) zeigt intensive Fragment-Ionen aus deren Abständen die Sequenzen abgelesen werden können. Das Vorhandensein zweier ¹²C-Isotopensignale beim B₇-Fragment-Ion (Ausschnittsvergrößerung) zeigt die Gegenwart zweier überlagernder Proteine mit nahezu identischen Massen (Sequenzen: oben links). Die fragmentierten Partialsequenzen sind hervorgehoben und die Lage des B₇-Ions ist angegeben. Das 2D Gel (Ausschnitt; unten links) wurde vom Gellabor des Proteom-Zentrums Rostock angefertigt. Die Pfeilspitze kennzeichnet den analysierte Proteinspot.

nach 2D-Gelelektrophorese/ SDS-PAGE Trennung (*in-gel* Proteinabbau) Verwendung.

Massenspektrometrische Sequenzierung mittels QIT-ToF MSⁿ

Für den Fall, dass ein Protein von Interesse nicht in der Datenbank enthalten ist, ermöglicht die massenspektrometrische „*de-novo*“-Sequenzierung des fragmentierten Partialpeptids eine rasche Identifizierung. Die dadurch ermittelte Peptidsequenz kann z.B. zur Rekonstruktion der DNA-Sequenz herangezogen und für die Bestimmung des Gens mit molekularbiologischen Methoden (Hybridisierungsexperimenten und PCR-Techniken) eingesetzt werden.

Zur Strukturaufklärung von Proteinen und auch zur Charakterisierung von posttranslationalen Modifizierungen wie z.B. Protein-Phosphorylierung oder Glykosylierung, wird die Tandem-Massenspektrometrie mit so genannten Hybridgeräten

ebenfalls erfolgreich eingesetzt. Hinter dem Begriff Hybridgerät verbirgt sich ein Geräteaufbau, der zwei wichtige Funktionen kombiniert. Zuerst kann man mit diesen Geräten Moleküle, die von Interesse sind, schnell und gezielt aufgrund ihrer Masse isolieren; anschließend können diese mittels Fragmentierungsanalysen charakterisiert werden. Die Massenspektren der erzeugten Fragment-Ionen lassen Rückschlüsse auf die Struktur des Ursprungsmoleküls zu. Teilweise erlauben diese Geräte eine rekursive Experimentführung, so dass einzelne Fragmente wieder als Zielmolekül isoliert und weiter fragmentiert werden können, bevor man auf einer MSⁿ-Stufe das Ergebnis als Massenspektrum ausliest.

Als Ionisierungsmethoden für diese Anwendung kommen Elektrospray-Ionisation (*electrospray ionisation*, ESI) und Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation (*matrix assisted laser desorption ionisation*, MALDI) in Betracht. Erstere koppelt das

Massenspektrometer „on-line“ an eine HPLC-Anlage, so dass für Fragmentspektren nur die Zeit der chromatographischen Peakbreite zur Verfügung steht. Für MALDI-MS werden die Proben auf einem Probenhalter präpariert und es steht „off-line“ eine beliebig lange Messzeit zur Verfügung, was besonders bei der gezielten Suche nach Proteinmodifizierungen sehr hilfreich sein kann.

Die hier vorgestellten Ergebnisse (s.u.) wurden auf einem AXIMA-QIT MALDI-ToF-Massenspektrometer (Shimadzu Biotech, Manchester) durchgeführt (Abb. 2). Dieses kombiniert als Hybridgerät eine dreidimensionale Ionenfalle (quadrupol ion storage trap, quistor; QIT) mit einem Flugzeitanalysator (ToF-MS)^[2]. Zur Ionisierung der MALDI-Proben wird ein gepulster Stickstofflaser (337 nm, 3–5 ns Peakbreite FWHM) benutzt. Die durch einen Laserschuss erzeugten Ionen werden durch ein speziell angepasstes elektrostatisches Linsensystem in die Ionenfalle geleitet. Zu die-

sem Zeitpunkt ist die normalerweise an der Ringelektrode der Falle anliegende Radiofrequenz abgeschaltet. Die Einlass-*endcap*-Elektrode und die Ringelektrode der Ionenfalle sind geerdet, die Auslass-*endcap*-Elektrode liegt auf einem statischen Potential, durch das in die Falle eintretende Ionen abgebremst werden.

Sobald alle Ionen des interessierenden Massenbereichs in der Ionenfalle angekommen sind, wird schlagartig eine Radiofrequenz an der Ringelektrode angelegt und die Ionen sind für den weiteren Verlauf des Experiments in der Falle gefangen. Diese ist an zwei regelbare Gasversorgungen angeschlossen, durch die normalerweise Helium für die Kühlung und Argon zur Stoßfragmentierung der eingefangenen Ionen eingeleitet wird.

In der Ionenfalle eingefangene Ionen einer ausgewählten Masse werden durch entsprechende an die *endcap*-Elektroden angelegten Frequenzen (*filtered noise field*, FNF) isoliert, wobei die übrigen Massen aus der Falle entfernt werden. Die selektierten, in der Ionenfalle verbliebenen Ionen können nun durch eine entsprechende Anregungsfrequenz in Gegenwart des Stoßgases Argon zu Fragmentierungen angeregt werden. Die erzeugten Fragment-Ionen werden durch das Heliumgas gekühlt und sammeln sich in der Mitte der Falle. Der Selektions- und Fragmentierungs-Zyklus kann nun falls gewünscht wiederholt werden, so daß die Aufnahme von MSⁿ-Spektren möglich wird.

Für die Massenanalyse werden die in der Mitte der Ionenfalle gesammelten, gekühlten Ionen in ein Reflektion-Flugzeitmassenspektrometer extrahiert. Dafür wird die Radiofrequenz auf der Ringelektrode schlagartig abgeschaltet und auf den *endcap*-Elektroden eine Potentialdifferenz angelegt. Entsprechend dieser Potentialdifferenz werden die Ionen aus der Mitte der Ionenfalle in das Flugzeitmassenspektrometer beschleunigt und mit einer ihrer

Masse entsprechenden Flugzeit auf einem MCP-Detektor registriert. Dieser die Massenauflösung und Massengenauigkeit bestimmende Vorgang ist bei der Aufnahme von MS- und MSⁿ-Spektren identisch. Daher können diese Experimente mit derselben Massenkali- brierung erfolgen. Massenauflösung und Massengenauigkeit sind unabhängig von der benutzten Laserintensität und den mechanischen und elektrischen Eigenschaften des MALDI-Targets, da die Massenanalyse in der Mitte der Ionenfalle und nicht auf dem Target beginnt.

Proteinstrukturcharakterisierung mit klinischen Material

Ziel der Projektschwerpunkte im Rahmen der klinischen Proteomanalyse ist die Suche nach krankheitsrelevanten Genen und Proteinen (Targets) für den Krankheitskomplex der Autoimmunerkrankungen mit Schwerpunkt auf dem Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis. Diese „Targets“ sollen in neue Ansätze für Prognose, Diagnose und Therapie dieser Krankheiten münden. Als Untersuchungsgegenstand dienen u.a. Körperflüssigkeiten, in denen gezielt krankheitsassoziierte Proteinmuster gesucht und die molekularen Ursachen analysiert werden. So konnten am Beispiel der Haptoglobinproteine subtile Proteinpolymorphismen (Abb. 3) mittels massenspektrometrischer Partialsequenzierung analysiert werden^[3]. Derartige Proteinpolymorphismen sind im Kontext des klinischen Hintergrundes der ermittelten Proteinstrukturdetails in Bezug zur vermuteten genetisch bedingten Assoziation dieser Krankheit diskutiert worden.

Ausblick

Durch die Zusammenführung der vorhandener Expertise des Proteom-Zen-

trums Rostock^[4] auf dem Gebiet der klinischen Proteomforschung mit den von Shimadzu Deutschland GmbH^[5] entwickelten „state of the art“ Technologien ist es gelungen eine fruchtbare Kooperation zu etablieren. Das Proteom-Zentrum Rostock fungiert als europäisches Referenzlabor für Technologieentwicklungen der Shimadzu Deutschland GmbH. Auch in Zukunft soll die Zusammenarbeit weiter ausgebaut werden. Shimadzu unterstützt daher die Organisation des „2. Rostocker Proteom Forums“ am 2./3. 9. 2003, für das Koichi Tanaka (Nobelpreis für Chemie), als Sprecher gewonnen werden konnte.

Literatur

- [1] **A. Sinz, M. Bantscheff, S. Mikkat, B. Ringel, S. Drynda, J. Kekow, H.-J. Thiesen, und M.O. Glocker** (2002). Mass Spectrometric Proteome Analyses of Synovial Fluids and Plasmas from Patients Suffering from Rheumatoid Arthritis and Comparison to Reactive Arthritis or Osteoarthritis. *Electrophoresis*, 23, 3445–3456.
- [2] **L. Ding, E. Kawatoh, K. Tanaka, A. Smith, und S. Kumashiro** (1999). High efficiency MALDI-QIT-TOF mass spectrometer. *Charged Particle Optics IV*, 3777, 144–155.
- [3] **C. Koy, S. Mikkat, E. Raptakis, C. Sutton, M. Resch, K. Tanaka und M.O. Glocker** (2003). MALDI-QIT-ToF-MS sequencing resolves structures of unidentified peptides obtained by *in-gel* tryptic digestion of haptoglobin derivatives from human plasma proteomes. *Proteomics*, 3, 851–858.
- [4] <http://www.proteome-alliance.de>
- [5] <http://www.shimadzu.de>

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Michael O. Glocker
Proteom-Zentrum Rostock
Medizinische Fakultät
Universität Rostock
Joachim-Jungius-Str. 9
D-18059 Rostock
Tel.: 0381-4059 770
Fax: 0381-4059 686
michael.glocker@med.uni-rostock.de