

# Proteinanalytik im Detail – Anwendungsmöglichkeiten der nanoESI-MS zur Identifizierung von Proteinen und dem Nachweis von Proteinmodifikationen

Lena Morschheuser<sup>\*a</sup>, Julia Biller<sup>\*a</sup>, Maria Trusch<sup>b</sup>, Sascha Rohn<sup>a</sup>

<sup>a</sup> HAMBURG SCHOOL OF FOOD SCIENCE, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg

<sup>b</sup> Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg

Ansprechpartnerin: Lena.Morschheuser@chemie.uni-hamburg.de

FOOD SCIENCE & SCHOOL OF FOOD SCIENCE HAMBURG

In der Proteinanalytik sind die Identifizierung unbekannter Proteine sowie deren Modifikationen von besonderem Interesse. Der Fokus liegt dabei unter anderem in der Aufklärung sogenannter posttranslationaler Modifikationen (PTM)<sup>[1]</sup>. Ein mögliches Werkzeug zur Identifizierung von gereinigten Proteinen und möglichen Modifikationen stellt ein offline nanoESI-MS-System (bspw. TriVersa Nanomate<sup>®</sup> Advion, USA) dar. Die davon ausgehenden Analysemöglichkeiten werden anhand des Beispielproteins Myoglobin gezeigt. Speziell die Analytik des intakten Proteins mittels ETD/PTR-Messung profitiert von der langen Messzeit des offline nanoESI-MS-Systems.

Darüber hinaus bietet die Kopplung des MS an eine Nanomate-Quelle die Option, mittels *Liquid Extraction Surface Analysis* (LESA<sup>™</sup>) Analyten direkt von einer hochauflösenden Dünnschichtchromatographie-Platte (HPTLC) zu messen. So kann das Protein nach enzymatischem Verdau zunächst mittels HPTLC getrennt und die Peptide im Anschluss durch ein gekoppeltes HPTLC-nanoESI-MS analysiert werden<sup>[2]</sup>, <sup>[3]</sup>. Durch die gezielte Ansteuerung einzelner Peptide verlängert sich deren Messzeit. Zudem ist die Generierung von MS/MS-Spektren möglich, die weitere Rückschlüsse auf eventuelle Modifikationen zulassen<sup>[1]</sup>.

## Material und Methoden

### Probenvorbereitung

- **Intaktes Protein** 10 pmol/μL Myoglobin in bidest.Wasser/Acetonitril (70/30) (v/v) lösen
- **Tryptischer Verdau** 1,5 mg Myoglobin in Harnstoff-Lösung (6M) denaturieren, mit Iodacetamid alkylieren, mit Trypsin Lösung (Verhältnis Protein/Enzym; 1/100) versetzen und bei 37 °C 16 h inkubieren, Verdau durch Zugabe von Ameisensäure stoppen

### HPTLC Analyse der Myoglobinpeptide<sup>[2]</sup>, <sup>[4]</sup>

- stationäre Phase: Kieselgel (Merck KGaA), mobile Phase: 2-Butanol/Pyridin/Ammoniak (25%)/Wasser (39/34/10/26) (v/v/v/v), Detektion bei 366 nm nach Entwicklung & nach Derivatisierung mit Fluorescamin

### ETD/PTR Analyse

- amaZon ETD (Bruker Daltonik GmbH), pos. Ionenmodus
- Messdauer: 60 min, Spannung: 1,77 kV, Druck: 0,3 psi
- eingesetztes Volumen: 5 μL o.g. Probenlösung (intaktes Protein)

### LESA<sup>™</sup> Messung

- Extraktionsmittel: bidest.Wasser/Acetonitril (70/30) (v/v)
- amaZon ETD (Bruker Daltonik GmbH), pos. Ionenmodus



Abbildung 1 Darstellung des TriVersa<sup>®</sup> Nanomate (Advion, Ithaka, NY, USA).

## Ergebnis

### ETD/PTR-Analyse von Myoglobin

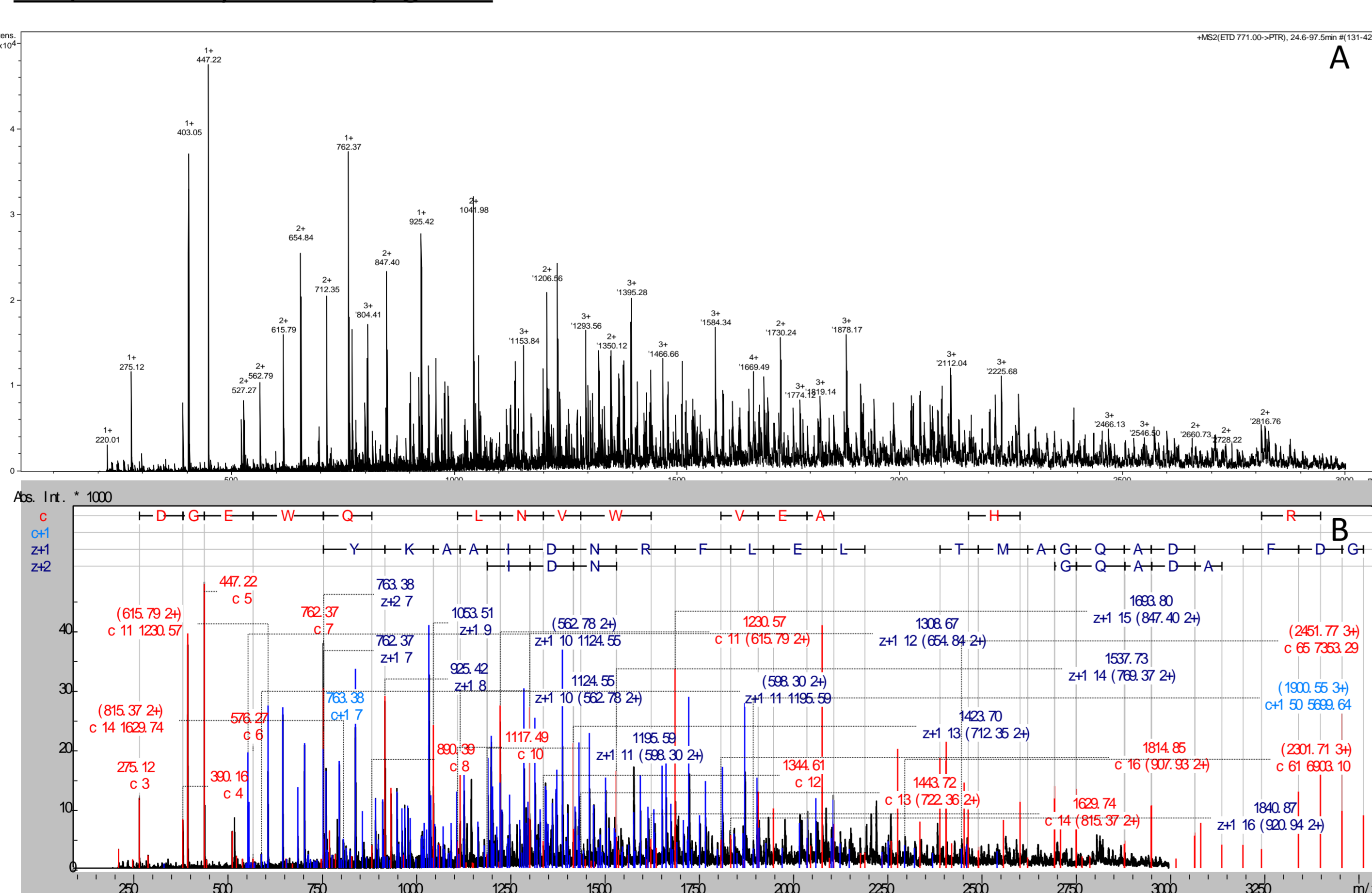


Abbildung 2 Mittels ETD/PTR erhaltenes Fragmentspektrum. A gesamtes ETD/PTR Spektrum ausgehend von Myoglobin (intakt), isolierte Masse 771 m/z, Massenbereich 200-3000 m/z. B Ergebnis der Sequenzbestimmung durch BioTools, Mascot Search Results: MOWSE Score 700; Chain A, Ferric Horse Heart Myoglobin.

Die Identität des untersuchten Proteins konnte mittels ETD/PTR-Messung bestätigt werden.

Parallel zur angewandten *top down* Analytik wurde die Identifizierung des Modellproteins auch anhand der *bottom up* Strategie verfolgt. Die nachfolgenden Spektren resultieren aus tryptisch verdautem Myoglobin, die Trennung der Peptide erfolgte mittels HPTLC.

### LESA<sup>™</sup> tryptisch verdauter Myoglobin-Peptide

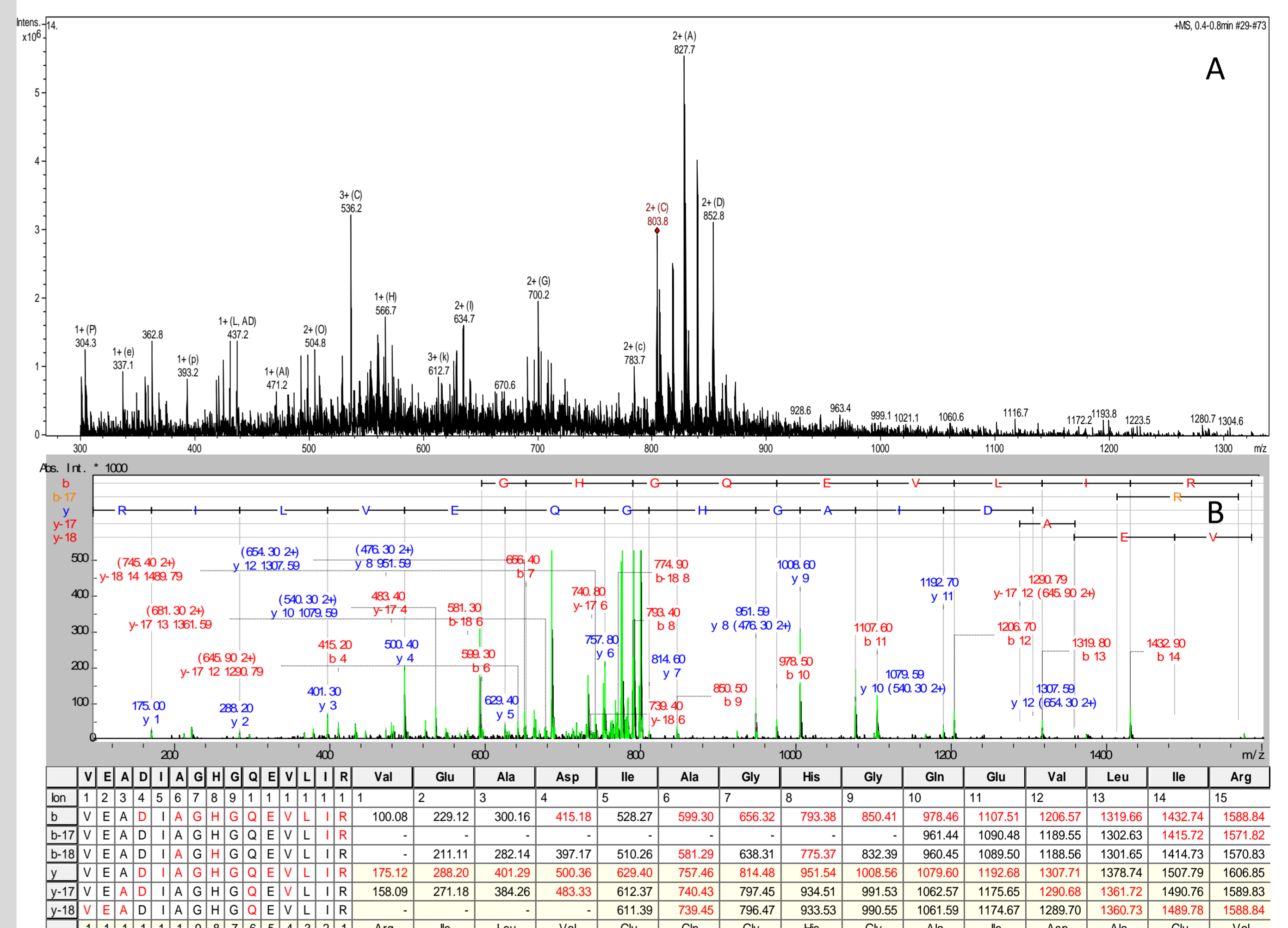


Abbildung 3 Mittels LESATM erhaltenes MS/MS-Spektrum zum Peptid der Masse 1605 Da, Fragmentenmasse 803 m/z (HPTLC), Messbereich 100-2000 m/z. A MS/MS-Spektrum ausgehend von 803 m/z. B Ergebnis der Sequenzbestimmung durch BioTools, Peptidsequenz nach Uniprot VEADIAGHDEVILIR.

Mittels LESATM wurde eine Vielzahl an detektierten Spots (HPTLC) eluiert und massenspektrometrisch detektiert sowie fragmentiert. Beispielhaft ist dies an oben stehender Abbildung gezeigt (Peptidmasse 1605 Da, Precursorion 803 m/z). Mit Hilfe von BioTools konnte die Sequenz des Peptides ermittelt werden. Ausgehend von dieser Sequenz kann auf das zur Untersuchung eingesetzte Protein rückgeschlossen werden. Es stellt jedoch ausschließlich einen Hinweis dar. Um das Protein zu identifizieren, müssten weitere Peptide charakterisiert werden. Mittels LESATM kann eine lange Messzeit pro Peptid gewährleistet werden. Dies ist speziell bei der Identifizierung von PTM's von zentraler Bedeutung.

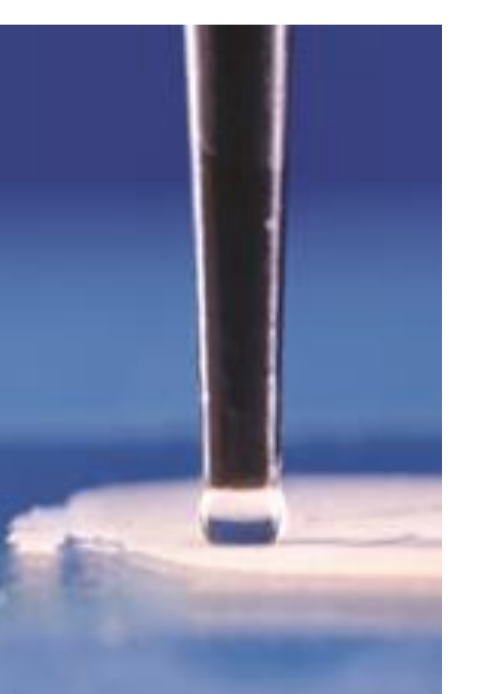


Abbildung 4 LESATM Extraktionstropfen (Advion, Ithaka, NY, USA).

## Zusammenfassung

Die Identifizierung des Modellproteins Myoglobin konnte in intakter Form mittels ETD/PTR-Messung realisiert werden: Es konnte Myoglobin aus Pferdeherz (Score: 700) nachgewiesen werden. Die Analyse der Myoglobinpeptide mittels LESATM Technologie konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Durch MS/MS-Messung einzelner Peptide wurde deren Sequenz bestimmt und eventuelle PTM's nachgewiesen.

## Literatur

- [1] Parson, Walworth, Van Berkel, *Advion User Meeting ASMS*, 2011; [2] Pasilis et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008. **391**(1): 317-324; [3] Morlock and Schwack, *Trends Anal. Chem.*, 2010. **29**(10): 1157-1171; [4] Pasilis et al., *J. Mass Spectrom.*, 2008. **43**(12): 1627-1635.