



# *PROTEOMICS REVISITED*

## Zweidimensionale Hochleistungsdünnschichtchromatographie mit massenspektrometrischer Detektion zur Analyse von Proteinen



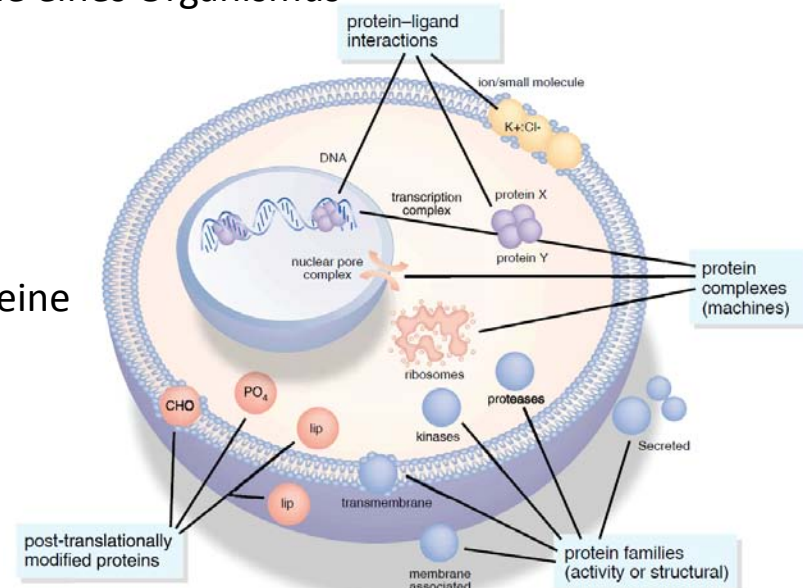
# Proteomics

## ■ Proteom

- Gesamtheit der durch das Genom codierten Proteine eines Organismus
- unterliegt ständigen Veränderungen (Dynamik)

## ■ Proteomics

- Systematische Erforschung der Funktionen der Proteine
- z.B. Verteilung, Menge, Modifikation, katalytische Aktivität, Struktur
- zwei Ansätze: Top down, Bottom up

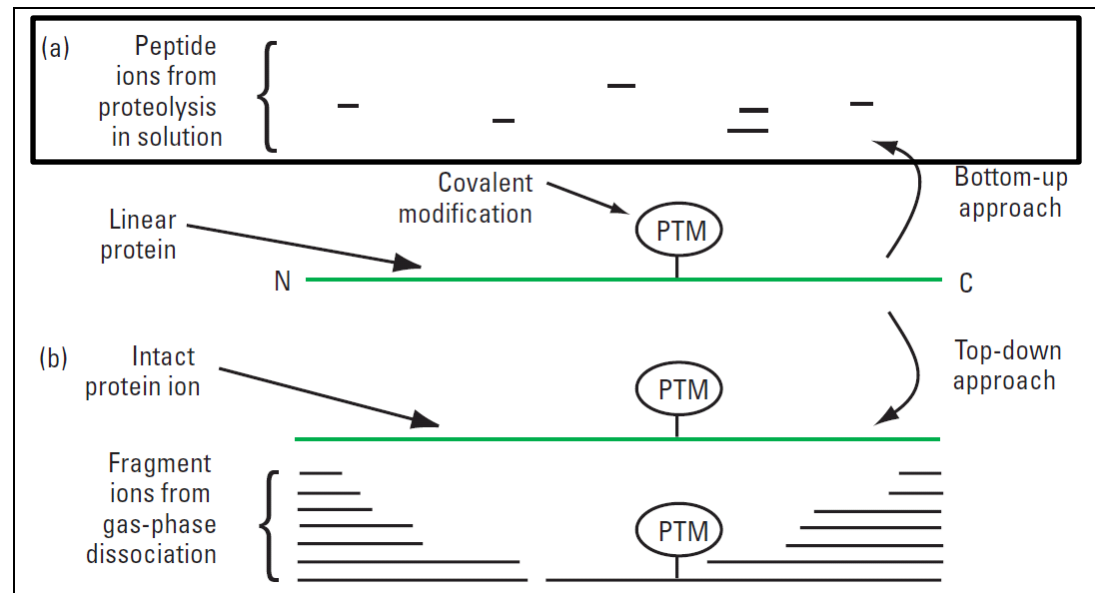


Quelle: Patterson, Aebersold 2003

# Proteomics

## ■ Trennung der Peptide

- Ionenaustauschchromatographie
- Umkehrphasenchromatographie
- Hydrophile Interaktionsflüssigkeitschromatographie
- 2D Flüssigkeitschromatographie
- Isoelektrische Fokussierung
- HPTLC ?



Quelle: Manadas et al. 2010; Kelleher 2204

## Warum HPTLC?

- → MS-Detektion erfolgt zeitlich unabhängig von der chromatographischen Trennung
- Freiheitsgrade in der Wahl des chromatographischen Systems erhöht
- Stationäre Phase
  - Kieselgel (NP, RP), Cellulose, Polyamid, Aluminiumoxid usw.
- Mobile Phase
  - alle denkbaren Laufmittel, welche die chromatographische Trennung ermöglichen
- Nicht-diskriminierender Ansatz
- Spezifische Derivatisierung möglich
- Selektive MS-Detektion

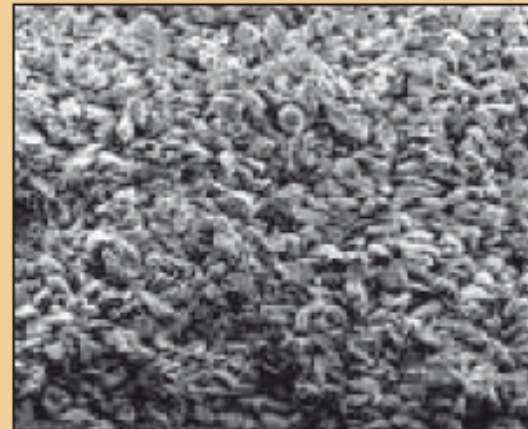
# High performance thin-layer chromatography

- Verbesserung des Schichtmaterials

TLC



HPTLC



Quelle: Broschüre *Fast and precise* 03/2010, Merck, S. 8

# High performance thin-layer chromatography

## ■ verschiedenste Detektions- und Kopplungsmöglichkeiten

### ■ Physikalisch

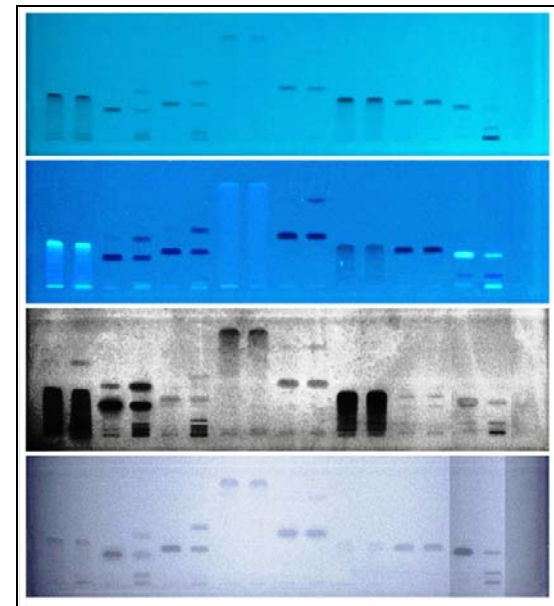
- Visualisierung über Weiß-, UV-Licht, Lumineszenz
- UV- und Fluoreszenz-Scan

### ■ Mikrochemisch

- verschiedene Derivatisierungsreagenzien
- Tauchen, Sprühen, Drucken

### ■ Effekt-gerichtet

- Biochemisch (Immunfärbung, Enzyminhibition)
- Mikrobiologisch (Bioautographie)



Quelle: Morlock, Schwack 2010; Baumgartner et al. 2007

# High performance thin-layer chromatography

## ■ verschiedenste Detektions- und Kopplungsmöglichkeiten

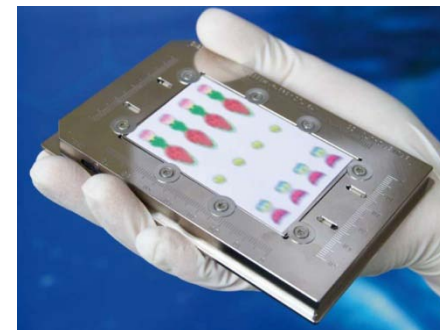
### ■ Massenspektrometrie

#### ■ elutionsbasiert

- HPTLC-ESI-MS (CAMAG, Schweiz)
- LESA (Advion, Inc., USA)
- HPTLC-NMR

#### ■ desorptionsbasiert

- HPTLC-MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics GmbH, Deutschland)
- HPTLC-DART
- HPTLC-DESI-MS



Quelle: Morlock, Schwack 2010

# Eindimensionale HPTLC

- Proben: tryptisch verdaute Nahrungsproteine
- Probenauftragung:
  - Automatic TLC Sampler 4 (CAMAG)
  - Aufgetragenes Volumen: 10  $\mu$ L
  - Form: Bande (Länge 6 mm)
- Entwicklung des Chromatogramms:
  - Automated multiple development-system 2 (CAMAG)
  - Laufmittel 1D: 2-Butanol/Pyridin/Wasser/Ammoniak (25 %) (AMD 2, CAMAG)





# Eindimensionale HPTLC

## ■ Dokumentation

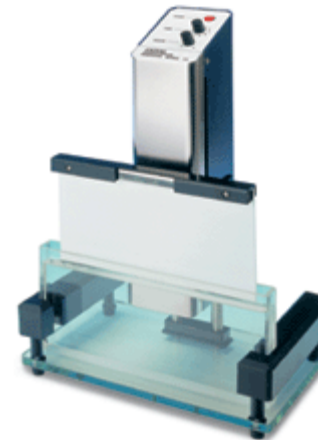
- TLC Visualizer (CAMAG)
- Weißlicht und UV-Licht (366 nm und 254 nm)

## ■ Derivatisierung

- Fluorescamin
- Ninhydrin
- Weitere Derivatisierungsreagenzien möglich

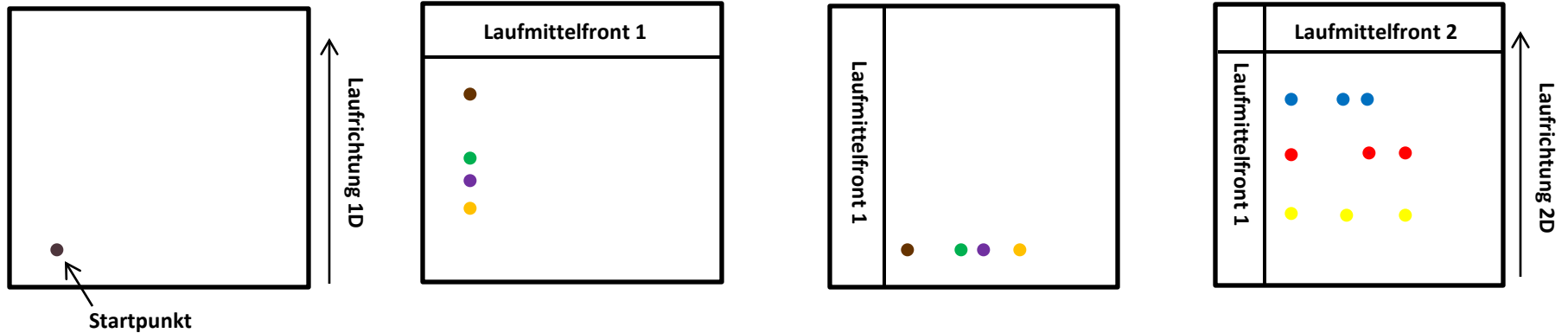
## ■ Quantifizierung

- TLC Scanner 3 (CAMAG)
- Wellenlängenscan bei 220 nm



## Zweidimensionale HPTLC

- Entwicklung in erster Dimension → Platte um 90° drehen → Entwicklung in zweiter Dimension



- Auftrennung komplexer Stoffgemische möglich

## Zweidimensionale HPTLC

- Proben: tryptisch verdaute Nahrungsproteine
- Probenauftragung:
  - Automatic TLC Sampler 4 (CAMAG)
  - Aufgetragenes Volumen: 10  $\mu$ L
  - Form: Spot bzw. Bande
- Entwicklung des Chromatogramms:
  - Automated multiple development-system 2 (CAMAG)
  - Laufhöhe: 75 mm



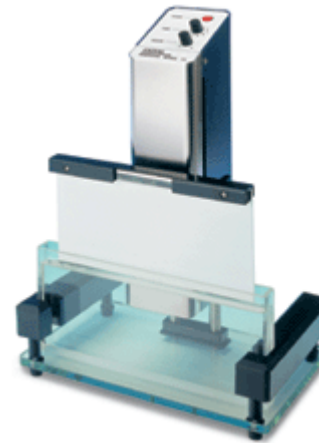
## Zweidimensionale HPTLC

### ■ Dokumentation

- TLC Visualizer (CAMAG)
- Weißlicht und UV-Licht (366 nm und 254 nm)

### ■ Derivatisierung

- Fluorescamin
- Ninhydrin
- Weitere Derivatisierungsreagenzien möglich



# HPTLC-Massenspektrometrie

## ■ HPTLC-ESI-MS zur Identifikation von Peptiden

### ■ Probenvorbereitung

- Peptid-Standard-Mix: Gly-Tyr, Val-Tyr-Val , Angiotensin II, Methionin enkephalin, Leucin enkephalin
- Tryptischer Verdau von Nahrungsproteinen

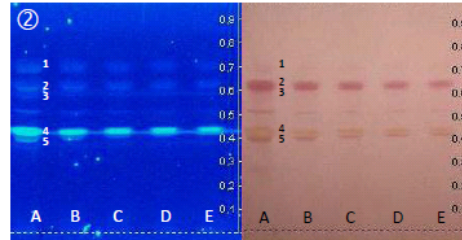
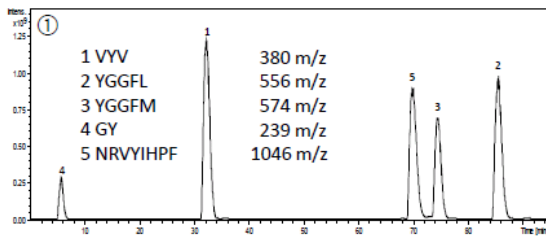
### ■ HPTLC-MS-Analyse

- TLC-MS-Interface (CAMAG)
- Massenspektrometrie: Amazon ETD (Bruker Daltonics GmbH), positiver Ionenmodus

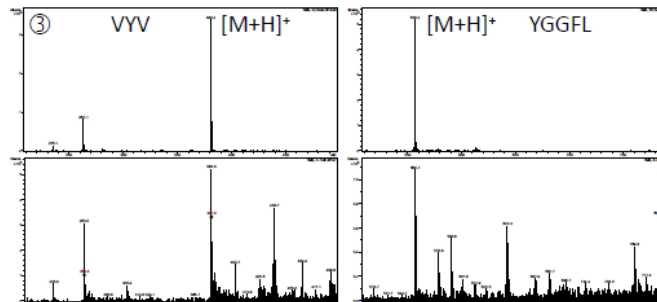
Quelle: Tscherch et al. 2011

# HPTLC-Massenspektrometrie

## ■ HPTLC-ESI-MS zur Identifikation von Peptiden



HPLC-MS



HPTLC-MS

Abbildung 1: (1) HPLC-MS: TIC +All MS Peptidstandard 300 µg/mL; (2) HPTLC: Peptidstandard (A 200 µg/mL, B 100 µg/mL, C 70 µg/mL, D 60 µg/mL, E 50 µg/mL) UV 366 nm, Ninhydrin; (3) MS-Spektren von VYV (Val-Tyr-Val) und Leucin enkephalin (YGGFL)

Quelle: Tschersch et al. 2011

# HPTLC-Massenspektrometrie

## ■ HPTLC-ESI-MS zur Identifikation von Proteinen

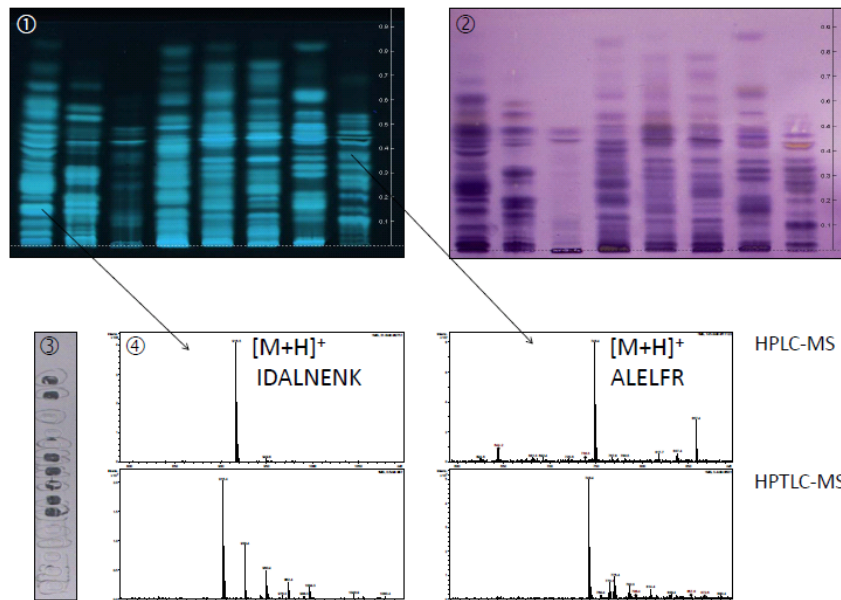
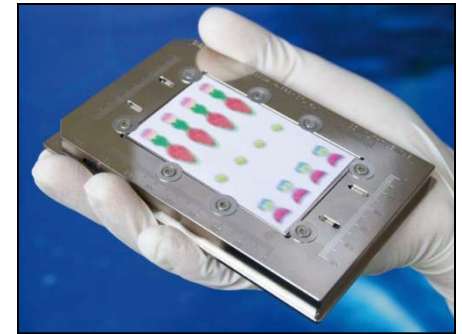


Abbildung 2: tryptisch verdaute Proteine (1) UV 366 Fluorescamin, (2) Ninhydrin (Reihenfolge:  $\beta$ -Lactoglobulin,  $\alpha$ -Lactalbumin, Lysozym, BSA, Caseingemisch,  $\alpha$ -Casein,  $\beta$ -Casein, Myoglobin), (3) Banden ausgestanzt, (4) MS-Analyse  $\beta$ -Lactoglobulin-Peptid IDALNENK, 916 m/z, MS-Analyse Myoglobin-Peptid ALELFR 748 m/z

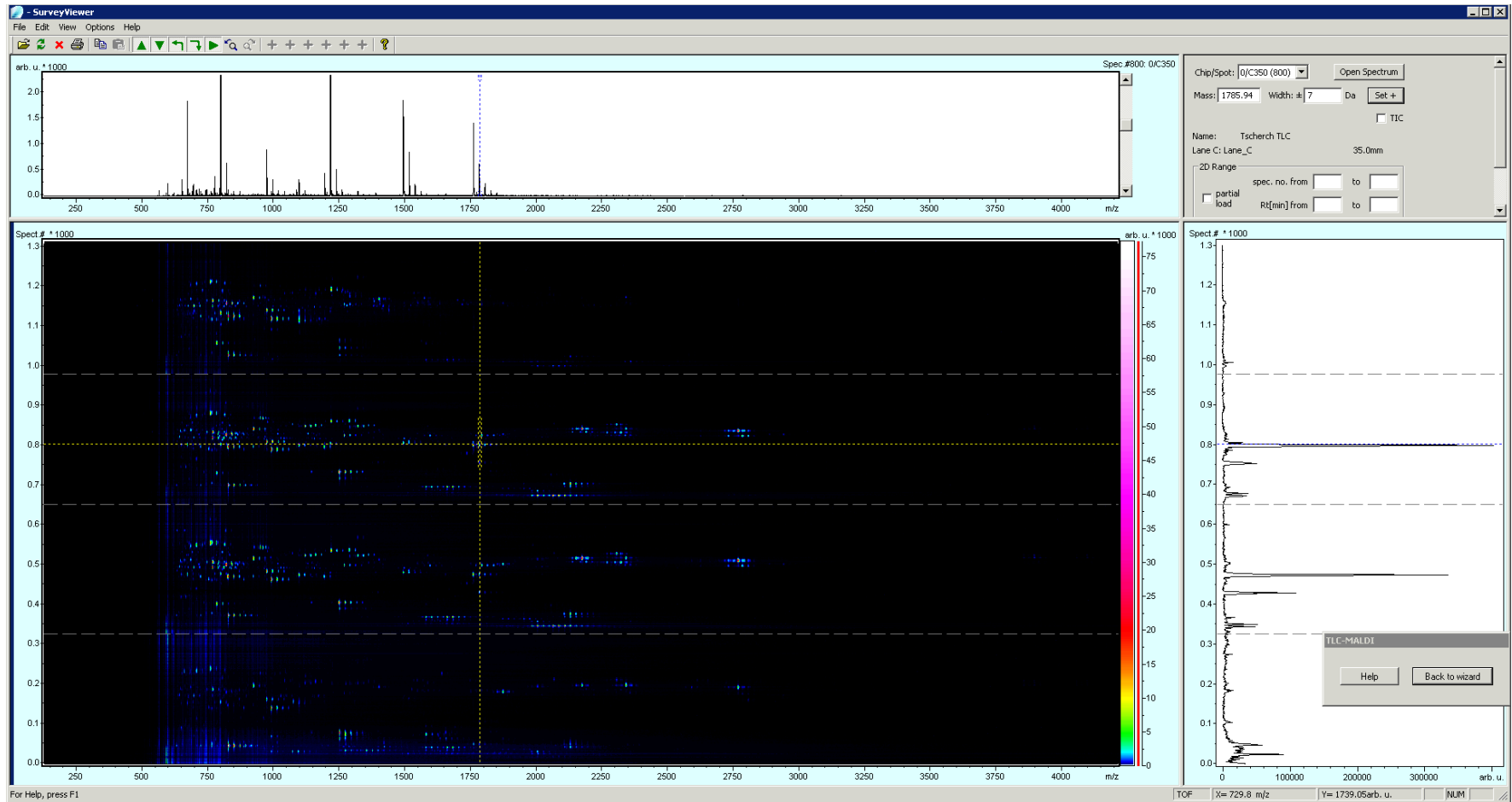
Quelle: Tschersch et al. 2011

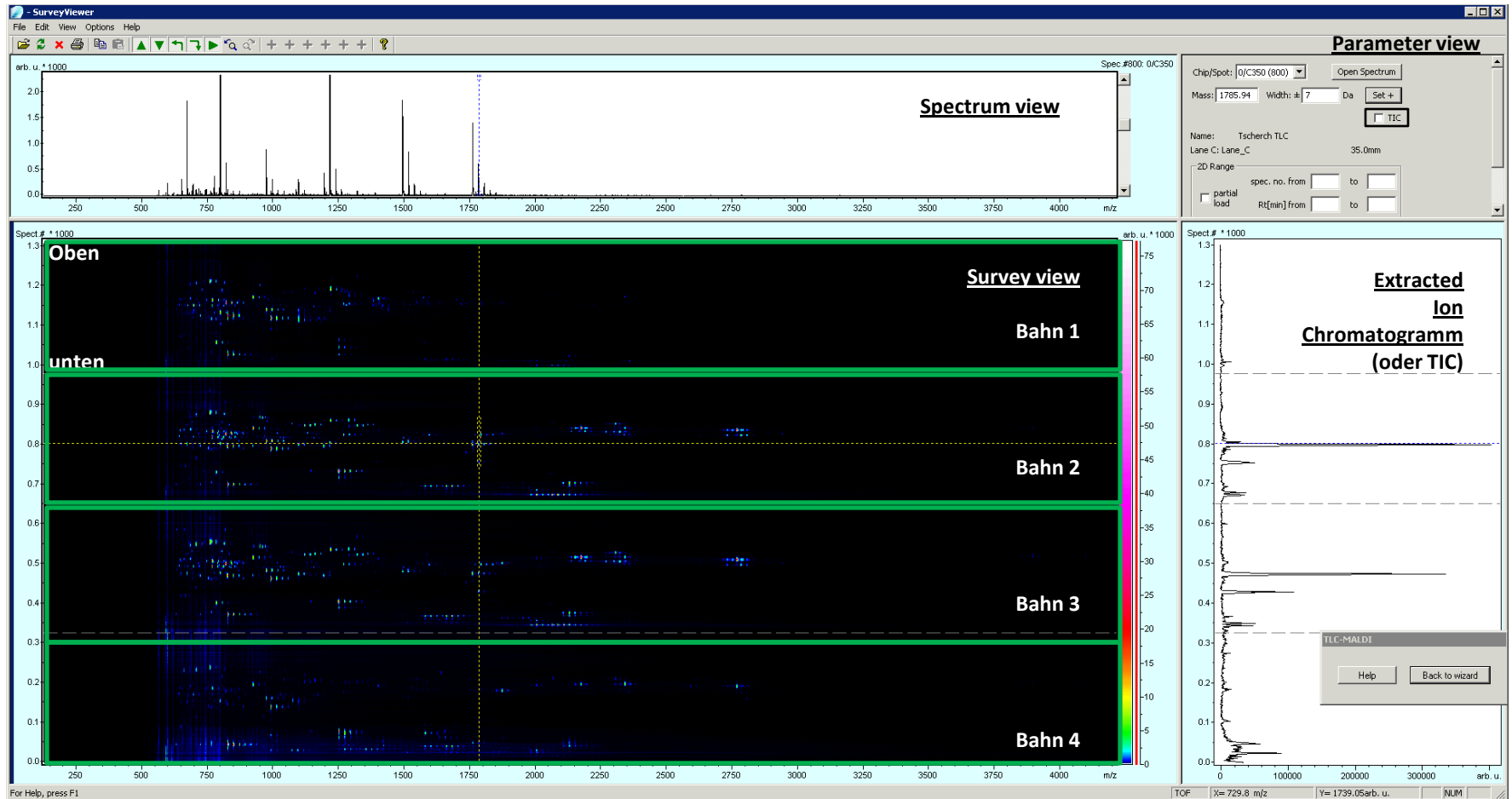
# HPTLC-Massenspektrometrie

- HPTLC-MALDI-TOF-MS zur Identifikation von Proteinen
- Vorbereitung der HPTLC-Platte:
  - 7.5x5 cm HPTLC-Alufolie; max. 4 Bahnen möglich
  - Beschichtung der Platte mit Matrix
    - Dip coating protocol (200 g/L DHB) oder Image Prep® (beide Bruker Daltonic GmbH)
- Messung mit UltrafleXtreme (Bruker Daltonics GmbH)
  - TLC-MALDI-Adapter
  - TLC-MALDI Software









# HPTLC-Massenspektrometrie

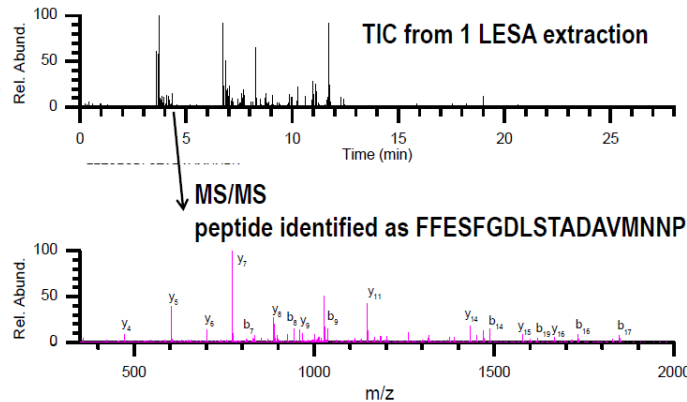
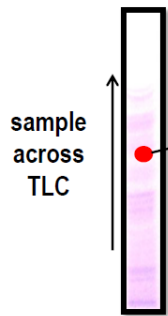
- LESA™ – Liquid Extraction Surface Analysis



# HPTLC-Massenspektrometrie

Figure 1 LESA-Enabled TriVersa NanoMate for Surface Sampling

## Direct identification of peptides from TLC plates



- Spray times 5 – 30 mins.
- Not data dependent scan.
- Ion mapping
  - MS/MS at every  $m/z$ .
- LESA-MS can perform proteomics directly from TLC plates.

*E. coli* tryptic digestion

Proteins	Peptide IDs	FDR%
909	2385	0.7

Walworth et al. MP 036



**Direct Surface Analysis by LESA-MS: From Small Molecules to Proteins**

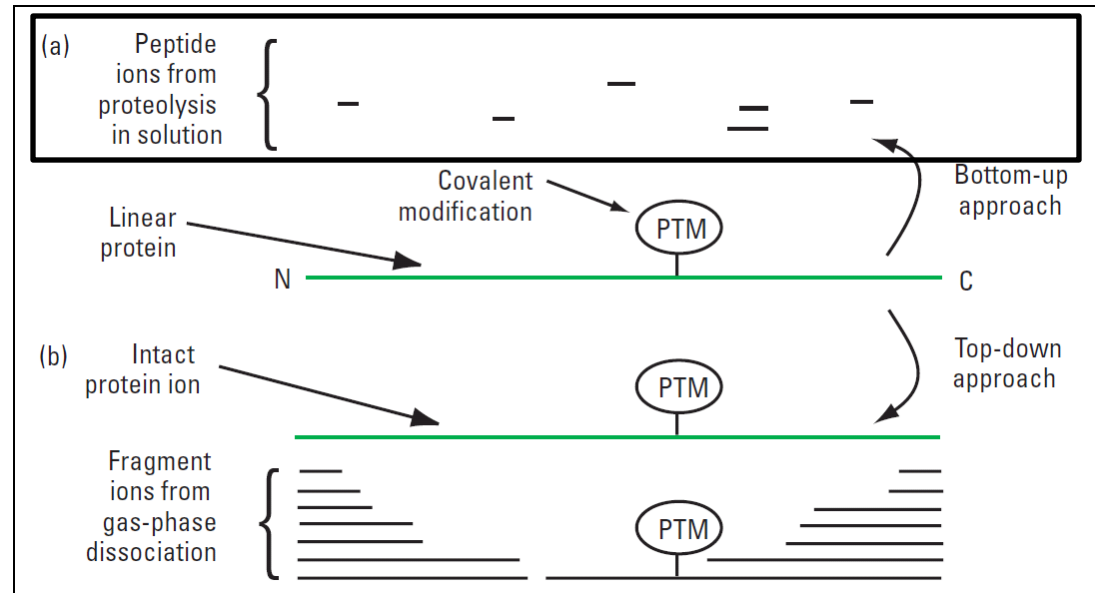
Whitney B. Parson  
Matthew J. Walworth  
Gary J. Van Berkel  
Organic and Biological Mass Spectrometry Group  
Chemical Sciences Division  
Oak Ridge National Laboratory

Presented at the Advion Users Meeting  
ASMS  
June 5, 2011

# Proteomics

## ■ Trennung der Peptide

- Ionenaustauschchromatographie
- Umkehrphasenchromatographie
- Hydrophile Interaktionsflüssigkeitschromatographie
- 2D Flüssigkeitschromatographie
- Isoelektrische Fokussierung
- HPTLC !



Quelle: Manadas et al. 2010; Kelleher 2204

# Danksagung

■ Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. Sascha Rohn
- meinen Diplomandinnen und Diplomanden
  - Julia Biller
  - Mareen Lehmann
  - Eduard Becker





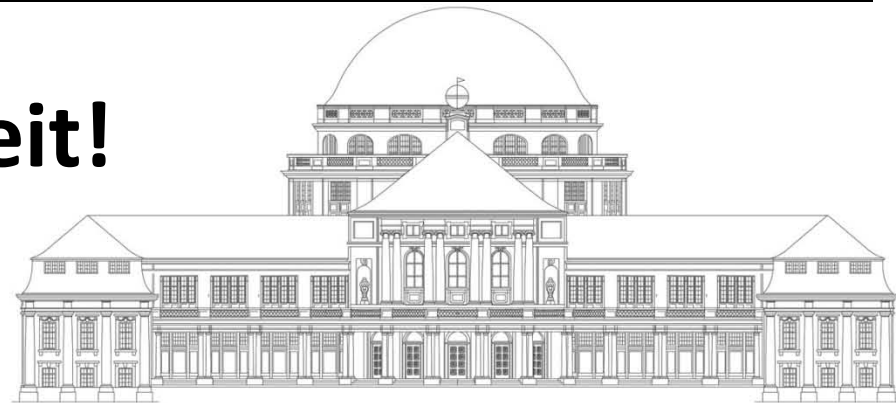
Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG



**Vielen Dank**

**für Ihre Aufmerksamkeit!**



Kontakt:

Kathrin Tscherch, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Email: [tscherch@chemie.uni-hamburg.de](mailto:tscherch@chemie.uni-hamburg.de), Tel: 040 42838 5340