



PROTEOMICS REVISITED

Zweidimensionale Hochleistungsdünnschichtchromatographie mit massenspektrometrischer Detektion zur Analyse von Proteinen



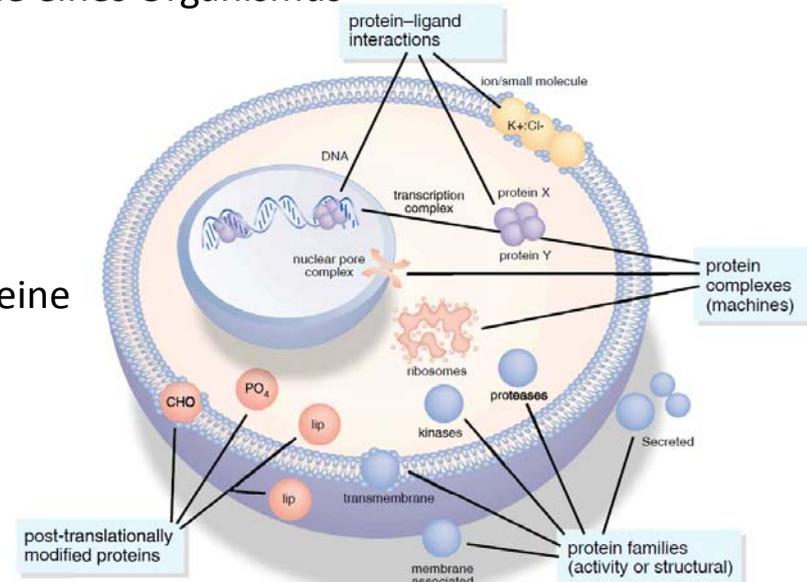
Proteomics

■ 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

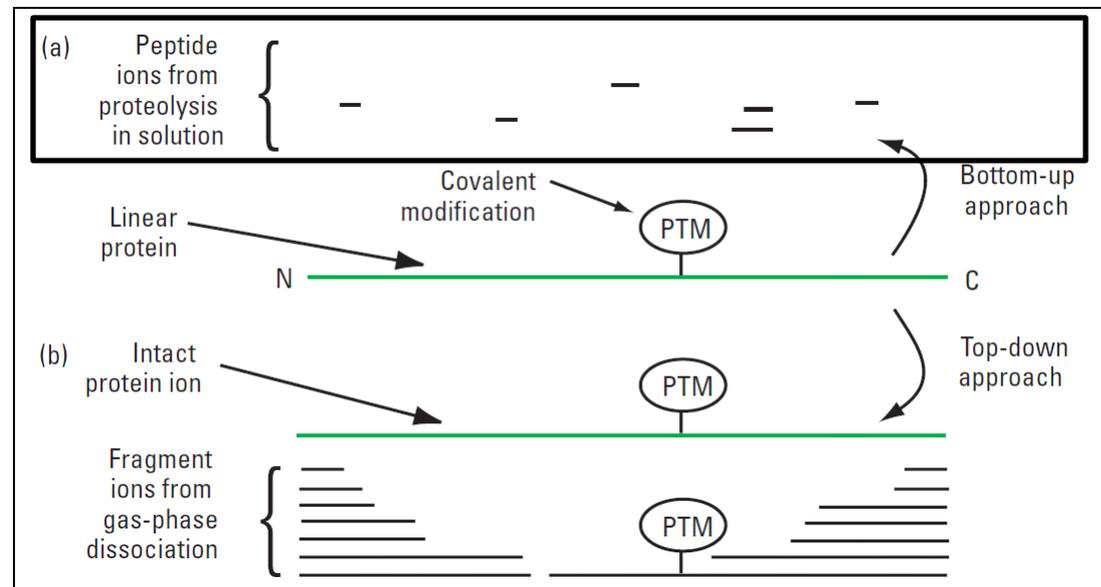


Quelle: Patterson, Aebersold 2003

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

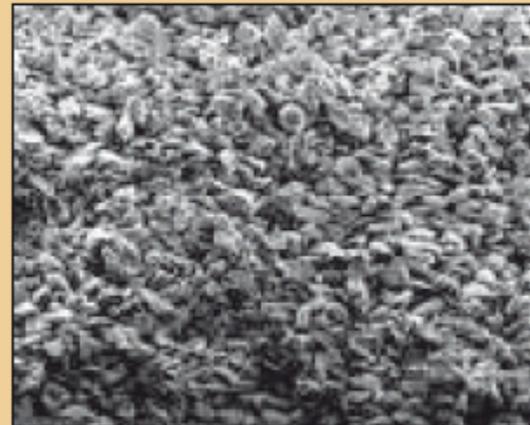
High performance thin-layer chromatography

- 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

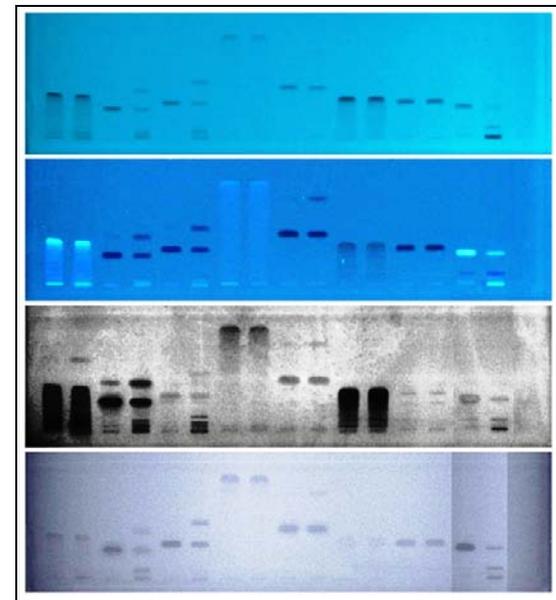
- Visualisierung über Weiß-, UV-Licht, Lumineszenz
- UV- und Fluoreszenz-Scan

■ 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

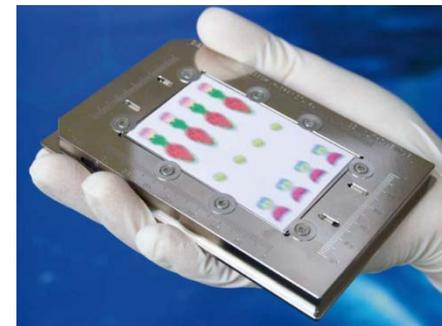
■ Massenspektrometrie

■ 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 μ 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

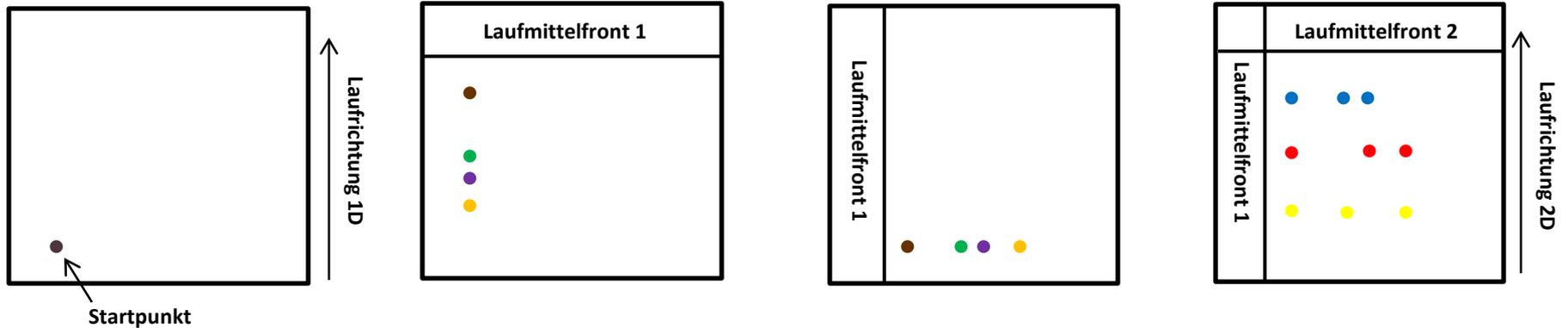
■ Quantifizierung

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



Zweidimensionale HPTLC

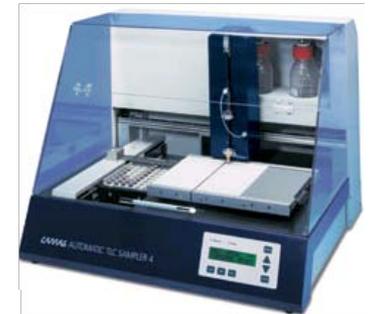
- Entwicklung in erster Dimension → Platte um 90° drehen → Entwicklung in zweiter Dimension



- Auftrennung komplexer Stoffgemische möglich

Zweidimensionale HPTLC

- Proben: tryptisch verdaute Nahrungsproteine
- Probenauftragung:
 - Automatic TLC Sampler 4 (CAMAG)
 - Aufgetragenes Volumen: 10 μ 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

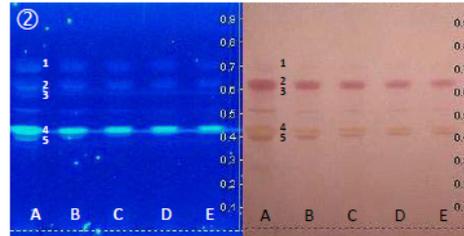
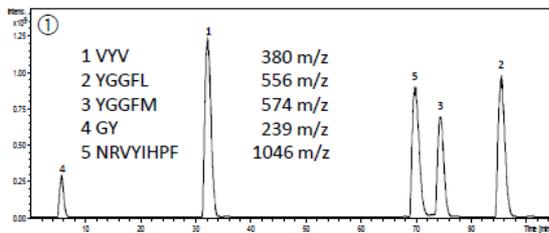
■ HPTLC-MS-Analyse

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

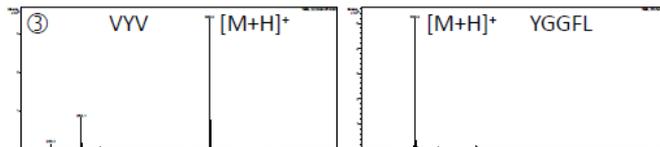
Quelle: Tscherch et al. 2011

HPTLC-Massenspektrometrie

■ HPTLC-ESI-MS zur Identifikation von Peptiden



HPLC-MS



HPTLC-MS

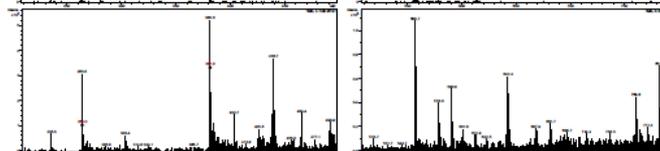


Abbildung 1: (1) HPLC-MS: TIC + All MS Peptidstandard 300 µg/mL; (2) HPTLC: Peptidstandard (A 200 µg/mL, B 100 µg/mL, C 70 µg/mL, D 60 µg/mL, E 50 µg/mL) UV 366 nm, Ninhydrin; (3) MS-Spektren von VYV (Val-Tyr-Val) und Leucin enkephalin (YGGFL)

Quelle: Tscherch et al. 2011

HPTLC-Massenspektrometrie

■ HPTLC-ESI-MS zur Identifikation von Proteinen

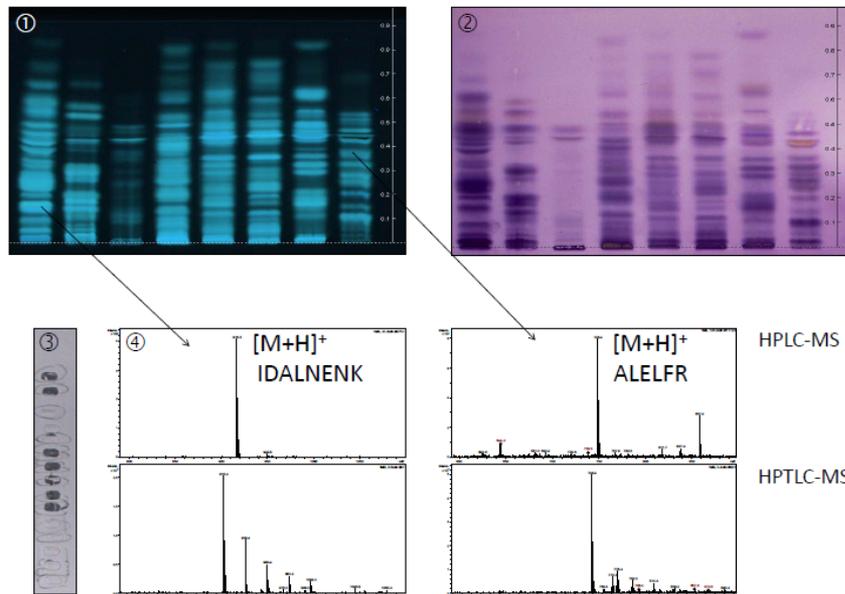
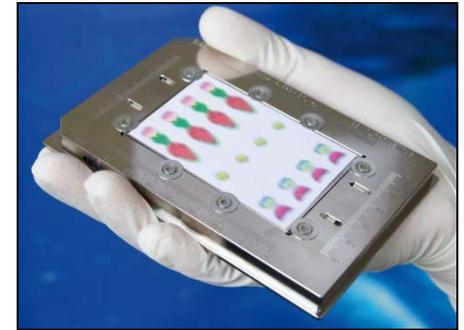


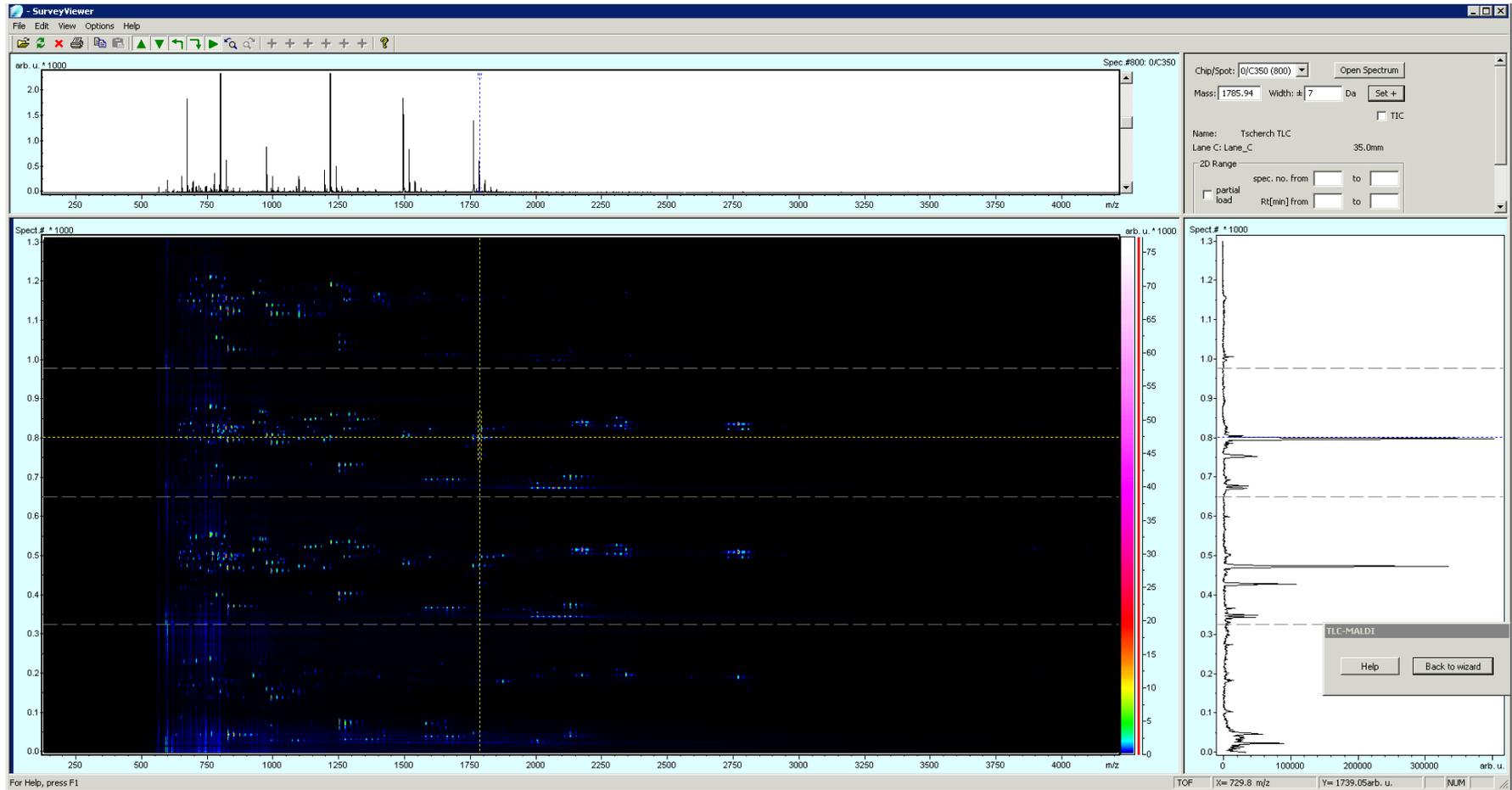
Abbildung 2: tryptisch verdaute Proteine (1) UV 366 Fluorescamin, (2) Ninhydrin (Reihenfolge: β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, Lysozym, BSA, Caseingemisch, α -Casein, β -Casein, Myoglobin), (3) Banden ausgestanzt, (4) MS-Analyse β -Lactoglobulin-Peptid IDALNENK, 916 m/z, MS-Analyse Myoglobin-Peptid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

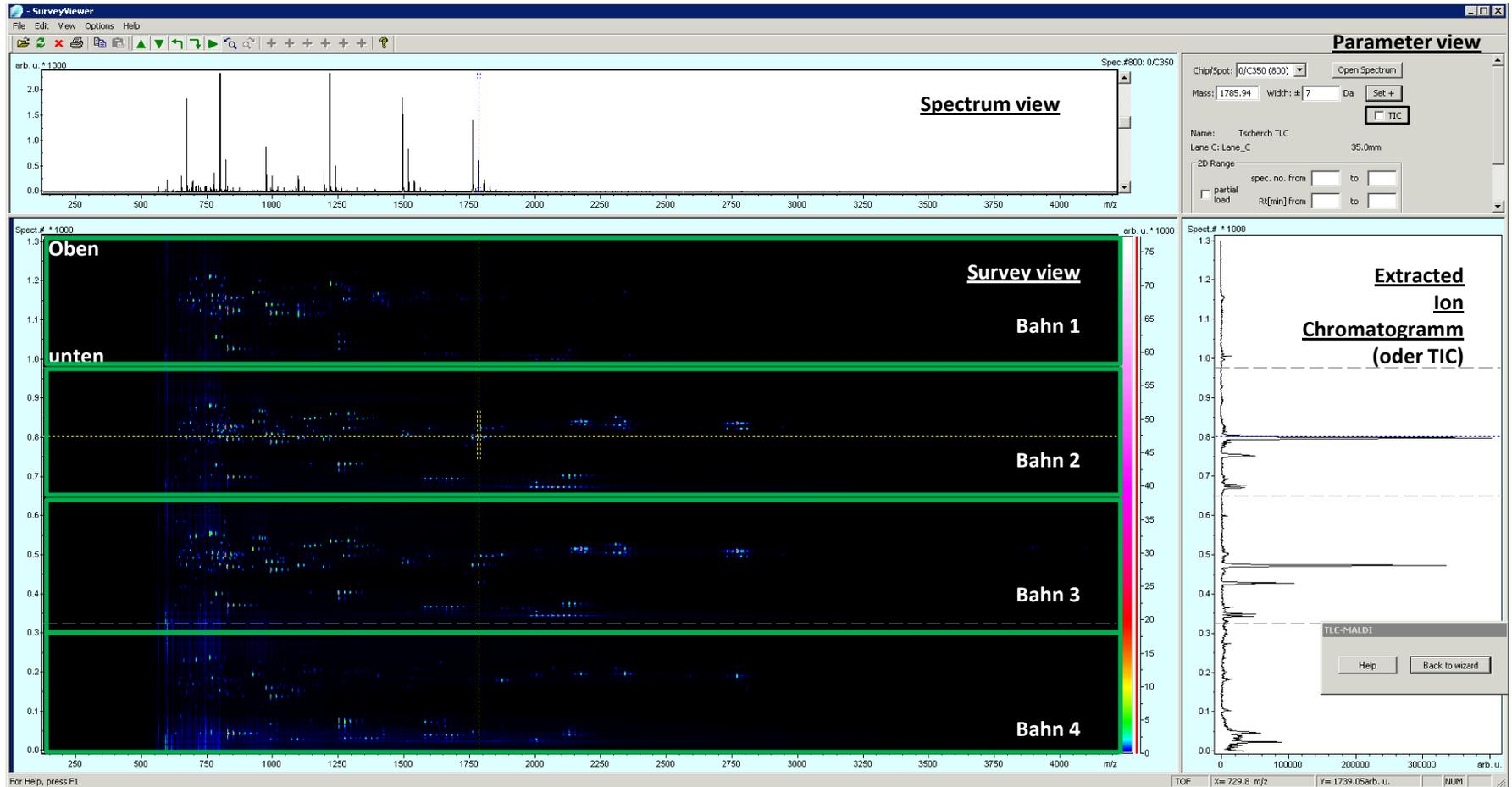
Quelle: Tschersch et al. 2011

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

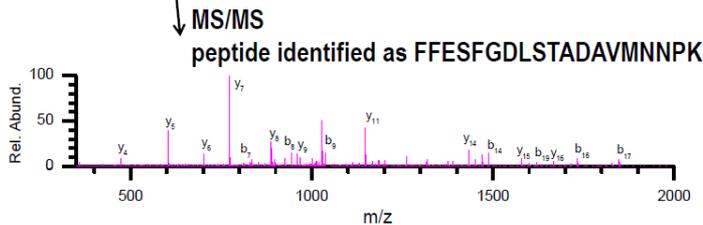
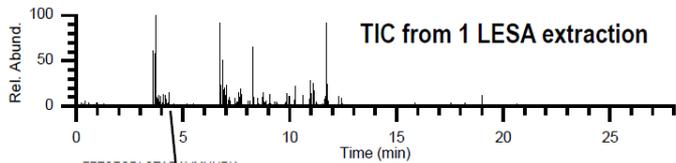
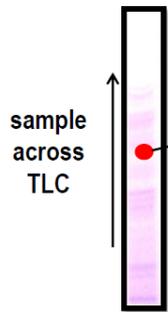
- LESA™ – Liquid Extraction Surface Analysis



HPTLC-Massenspektrometrie

Figure 1 LESA-Enabled TriVersa NanoMate for Surface Sampling

Direct identification of peptides from TLC plates

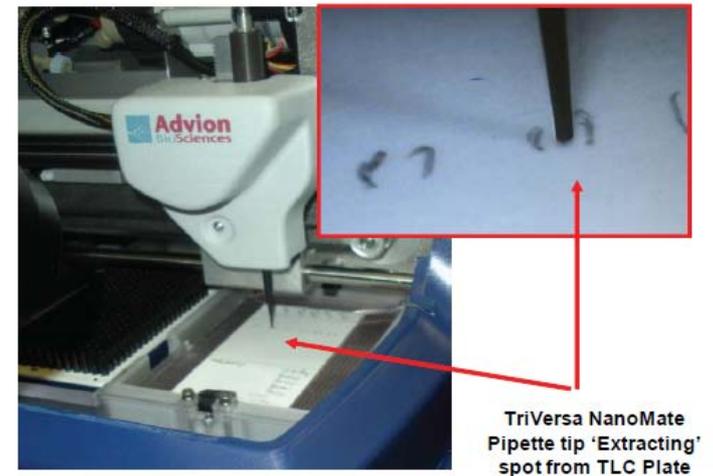


- Spray times 5 – 30 mins.
- Not data dependent scan.
- Ion mapping
 - MS/MS at every m/z .
- LESA-MS can perform proteomics directly from TLC plates.

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

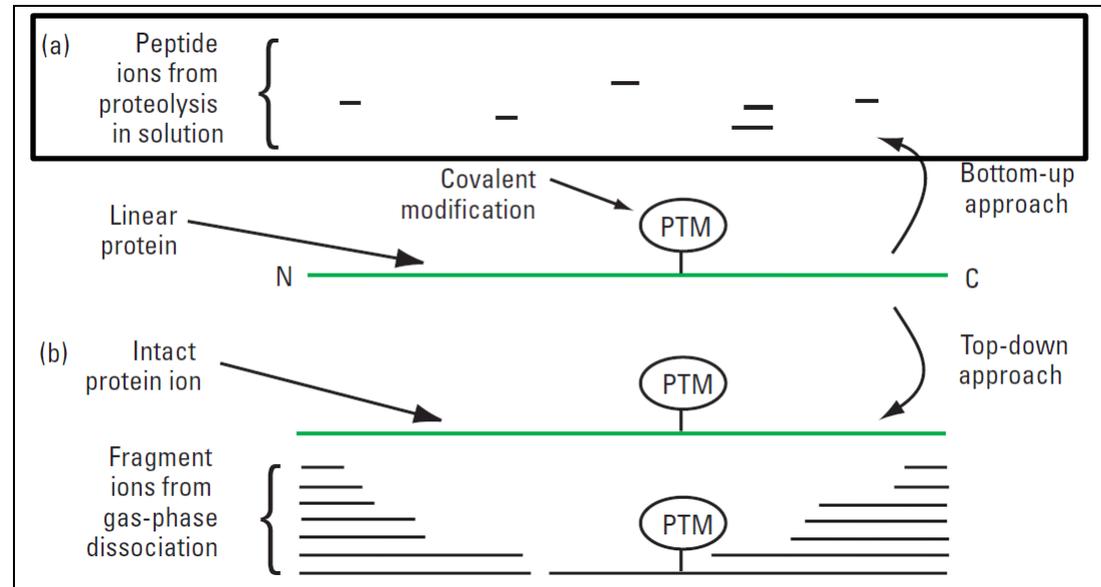
Whitney B. Parson
Matthew J. Walworth
Gary J. Van Berkel
Organic and Biological Mass Spectrometry Group
Chemical Sciences Division
Oak Ridge National Laboratory

Presented at the Advion Users Meeting
ASMS
June 5, 2011

Proteomics

■ Trennung der Peptide

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

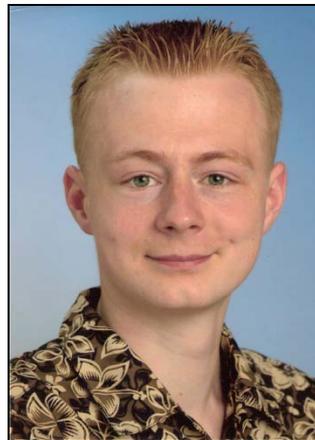


Quelle: Manadas et al. 2010; Kelleher 2204

Danksagung

■ Mein besonderer Dank gilt:

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





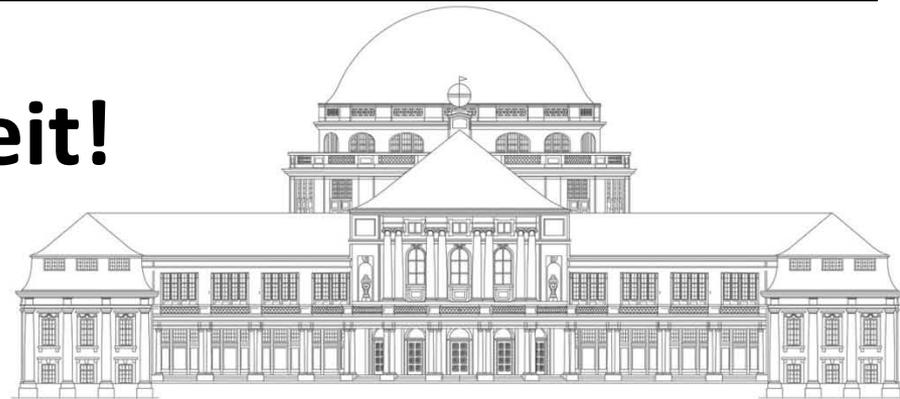
Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG



Vielen Dank

für Ihre Aufmerksamkeit!



Kontakt:

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