

PP Proteomics**Versuch: Proteinidentifizierung und relative Quantifizierung mittels
Massenspektrometrie**

Projektleitung: Stefanie Wienkoop

Inhaltsverzeichnis

1 Aufgabenstellung	1
2 Grundlagen	1
2.1 Proteomanalyse	1
2.2 Struktur von Proteinen.....	2
2.3 Elektrospray Ionisierung von Proteinen und Peptiden	3
2.3.1 Ionenfallen Massenanalysator.....	4
2.3.2 Bestimmung der Masse eines Ions	4
2.4 Sequenzbestimmung von Peptiden mit Tandem-Massenspektrometrie	5
2.5 Enzymatische Spaltung von Proteinen.....	6
2.6 Identifizierungsstrategien für Proteine	6
2.6.1 2D PAGE Proteomics	7
2.6.2 Shotgun Proteomics	7
2.7 Methoden der Proteinidentifizierung durch Massenspektrometrie	8
2.7.1 Peptid-Massenfingerprinting	8
2.7.2 Peptid Fragment Fingerprinting	8
3 Versuchsdurchführung.....	9
3.1 Übersicht	9
4 Auswertung Vortrag und Protokoll	10

1 Aufgabenstellung

In diesem Versuch sollen Proteine aus *Medicago truncatula* mittels Flüssigchromatographie-Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS) identifiziert werden.

2 Grundlagen**2.1 Proteomanalyse**

Die Gesamtheit aller exprimierten Proteine in einer biologischen Probe wird in Anlehnung an den Begriff des Genoms (Gesamtheit aller Gene eines Organismus) PROTEOM genannt. Das Proteom ist im Gegensatz zum Genom dynamisch und ändert seine Zusammensetzung in Abhängigkeit von Zeit, Entwicklungsstadium des Organismus und Umwelt. *Arabidopsis thaliana* besitzt ein Genom von ca. 27.000 Genen. Die davon ableitbare Zahl von Proteinen muss durch den Prozess des Splicens und den physiologisch wichtigen Vorgang der posttranslationalen Protein-Modifikation wie GLYKOSYLIERUNG und PHOSPHORYLIERUNG als sehr viel höher angesetzt werden, z. B. bei ca. 100.000 möglichen sogenannten PROTEIN-SPEZIES. Diese Zahl von Proteinen ist glücklicherweise nicht in allen Zuständen und

zu jeder Zeit exprimiert. Dennoch stellt diese enorme Komplexität eine Aufgabe dar, die nur mit modernsten bioanalytischen Methoden gelöst werden kann.

Eine Proteom-Analyse zwei wichtige Teilschritte:

1. Identifizierung der Proteine
2. Quantifizierung der Proteine

Da es sich um eine sehr komplexe Mischung verschiedenster Komponenten handelt, ist für die Analyse vorerst eine Trennung erforderlich. Als Trennmethode eignen sich dazu besonders die Elektrophorese und die Chromatographie. Für die Identifizierung wird heutzutage in den meisten Fällen die Massenspektrometrie herangezogen.

2.2 Struktur von Proteinen

Aminosäuren sind Carbonsäuren, welche eine α -ständige Aminogruppe tragen. Es gibt 20 genetisch codierte Proteinamino-säuren. Die Strukturen und die Kurzbezeichnungen sind in der folgenden Tabelle zu finden. Peptide entstehen durch kettenartige Verknüpfung von Aminosäuren zu einem Polyamid. Die Aminosäuren sind über Peptidbindungen verbunden.

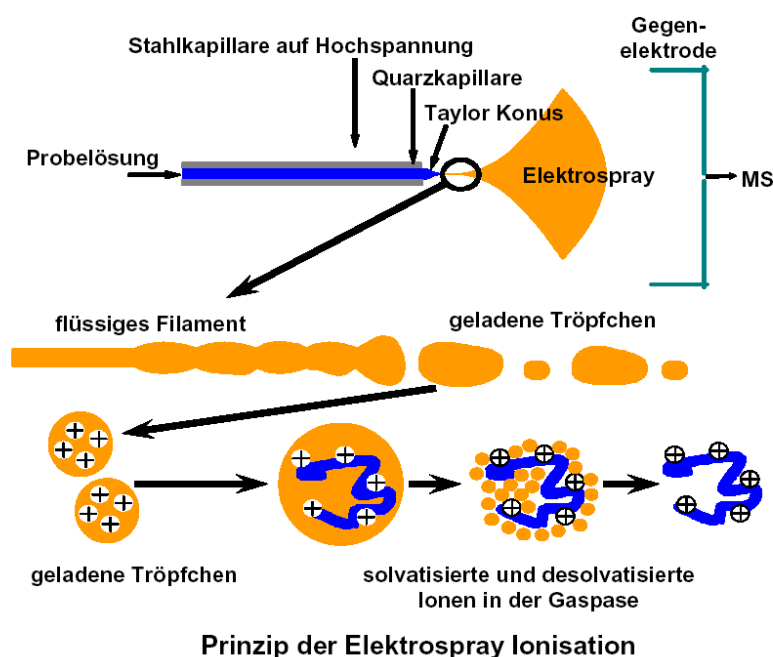
Als Peptid bezeichnet man Ketten im Längenbereich von 2 bis circa 100 Aminosäuren. Polypeptidstränge über einer Länge von 50 Aminosäuren werden üblicherweise als Proteine bezeichnet. Die Anordnung der Aminosäuren in bestimmter Reihenfolge bezeichnet man als Sequenz.

Struktur der in Proteinen vorkommenden Aminosäuren.

Name	Symbol	Struktur	Name	Symbol	Struktur
Glycin	Gly (G)		Glutamat	Glu (E)	
Alanin	Ala (A)		Glutamin	Gln (Q)	
Valin	Val (V)		Arginin	Arg (R)	
Leucin	Leu (L)		Lysin	Lys (K)	
Isoleucin	Ile (I)		Histidin	His(H)	
Serin	Ser (S)		Phenylalanin	Phe (F)	
Threonin	Thr (T)		Tyrosin	Tyr (Y)	
Cystein	Cys (C)		Tryptophan	Trp (W)	
Methionin	Met (M)		Prolin	Pro (P)	
Aspartat	Asp (D)		Sarkosin	Sar	
Asparagin	Asn (N)				

2.3 Elektrospray Ionisierung von Proteinen und Peptiden

Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur Bestimmung der molekularen Masse von chemischen Verbindungen. Die Bestimmung der Masse erfolgt in den meisten Fällen durch die Manipulation von Ionen mit elektromagnetischen Feldern in der Gasphase. Dieses Messprinzip setzt daher voraus, dass die zu untersuchenden und normalerweise als Feststoff oder in Lösung vorliegenden Moleküle zuerst in den gasförmigen Zustand überführt werden müssen, was vor allem bei Proteinen und Peptiden nicht durch thermische Verdampfung erfolgen kann. Die zerstörungsfreie Überführung von Proteinen und Peptiden in die Gasphase wird durch die Elektrospray Ionisation (ESI, s. Abbildung) und die Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI) ermöglicht. Bei der ESI wird eine Lösung der Probe durch eine dünne Kapillare zu einer Metallspitze (1-100 µm Innendurchmesser) geführt, an die eine Spannung von 1-5 kV angelegt ist. Unter dem Einfluss der Spannung wird elektrische Ladung auf die Lösung übertragen. Durch die gegenseitige Abstoßung der Ladungen in der Flüssigkeit entsteht ein Flüssigkeitsfilament, aus dem sich kleine Tröpfchen im Mikrometerbereich abschnüren.



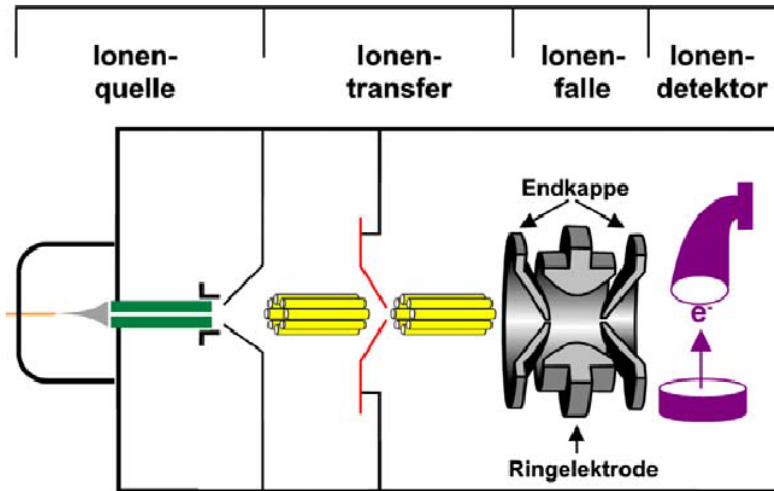
Durch Verdampfung des Lösungsmittels in den Tröpfchen und weitere Abspaltungen werden diese immer kleiner, so lange, bis pro Tropfen nur noch ein einziges, geladenes Proteinmolekül vorhanden ist. Nach Verdampfen

des restlichen Lösungsmittels verbleibt nur mehr das geladene Protein in der Gasphase, welches anschließend zur Massenbestimmung in den Massenanalysator überführt wird.

Im Praktikum werden als Beispiel zwei verschiedene Massenanalytoren verwendet: Eine Ionenfalle und ein Quadrupol-Flugzeit Hybrid Massenspektrometer.

2.3.1 Ionenfallen Massenanalysator

Das Prinzip des Ionenfallen-Massenanalysators ist das Einfangen von Ionen in einem geeigneten elektrischen Feld. Die Ionen können für variable Zeiten auf stabilen Bahnen gehalten und dann nach ihrer Masse analysiert werden. Eine Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode und zwei Endkappen, an die Wechselspannungen angelegt werden.



Ionenfallen-Massenspektrometer

In der Mitte der Endkappen befinden sich kleine, zentrische Öffnungen zum Einlass sowie Auswurf der Ionen. Die in der Ionenquelle gebildeten Ionen werden durch die Ionen-transfer-Optik in die Ionenfalle befördert, wo sie durch Anlegen bestimmter elektrischer Felder für eine kurze Zeit

eingefangen werden.

Nach dem Befüllen werden die Ionen massenselektiv durch das Anlegen elektrischer Felder wieder aus der Falle entfernt.

2.3.2 Bestimmung der Masse eines Ions

Der gemessene Wert eines Peaks in einem Massenspektrum entspricht nicht der Masse, sondern dem Masse zu Ladungs- Verhältnis (m/z).

Proteine oder Peptide können durch Protonierung an mehreren Aminosäuren positive Ladungen aufnehmen und sind nach ESI meistens zwei- oder dreifach geladen. Aus dem Masse zu Ladungs- Verhältnis lässt sich die Masse berechnen:

Messwert=Masse/Ladung

Masse=Messwert*Ladung

Die Masse eines Ions lässt sich also berechnen, wenn man den Ladungszustand kennt. Eine Möglichkeit zur Ermittlung der Ladung ist die Betrachtung der Isotopenverteilung eines Ions. Isotope (=Elemente mit gleicher Ordnungszahl aber unterschiedlicher Massenzahl) kommen in mit Massenspektrometrie untersuchten Substanzen in der gleichen Verteilung wie in der gesamten Natur vor.

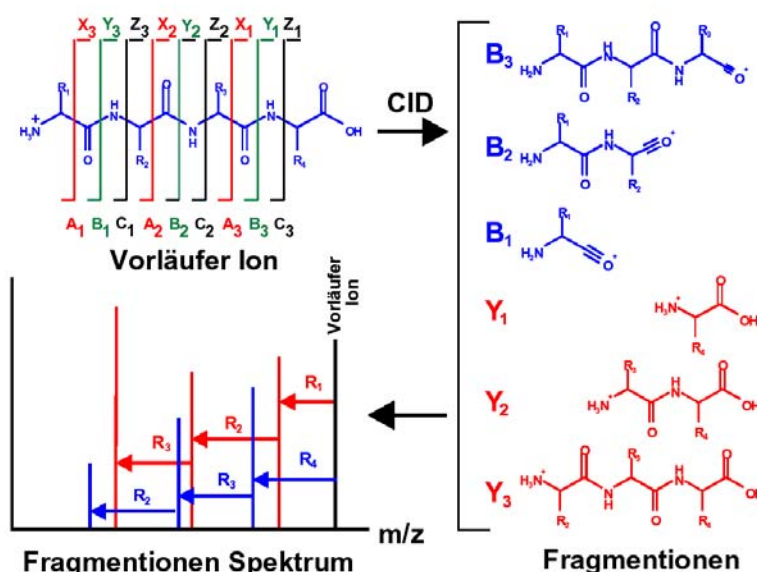
Proteine zeigen im Massenspektrum ein typisches Isotopenmuster (Abb. 2), welches hauptsächlich auf das Vorkommen der Kohlenstoffisotope ^{12}C und ^{13}C zurückzuführen ist, wobei der Hauptpeak von ^{12}C und der folgende Peak hauptsächlich von ^{13}C verursacht ist. Da sich die Massenzahl dieser Kohlenstoffisotope um eins unterscheidet, ist die messbare Massendifferenz zwischen den Isotopenpeaks 1 ($1/1=1$) bei einfacher, 0,5 ($1/2=0,5$) bei zweifacher, 0,33 ($1/3=0,33$) bei dreifacher, 0,25 ($1/4=0,25$) bei vierfacher Ladung usw. (Abb. 2). So lässt sich von dem Abstand der Isotopenpeaks auf den Ladungszustand des Ions schließen.

2.4 Sequenzbestimmung von Peptiden mit Tandem-Massenspektrometrie

Bei der ESI werden Makromoleküle so gut wie nicht fragmentiert. Aus der Messung der molekularen Masse eines Peptids lässt sich deswegen noch nicht dessen Sequenz ableiten. Um an solche Sequenzinformationen zu kommen, wird das Peptid in der Gasphase fragmentiert, d. h. in mehrere Bruchstücke gespalten. Dieser Prozess ist für beide im Praktikum verwendeten Massenspektrometer ähnlich.

Zur Durchführung eines sog. Tandem-MS Experimentes wird zuerst ein Vorläuferion, das ist das zu sequenzierende Peptid-Ion, isoliert, indem man alle anderen Ionen durch Resonanzanregung entfernt. Durch eine Reihe von Stößen mit Gas erhält das Ion so viel innere Energie, dass es in Produktionen zerfällt (**kollisionsinduzierte Dissoziation, CID**). Die Massen dieser Fragmentationen werden anschließend massenanalysiert.

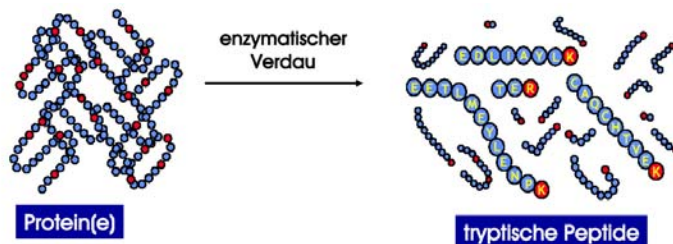
Die Spaltung der Peptide erfolgt an bevorzugten Soll-Bruchstellen des Peptides (A, B, C bzw. X, Y, Z, je nachdem, auf welches Bruchstück die Ladung übergeht). Es entstehen dabei Serien von Fragmentationen eines Peptides, die sich in der Masse jeweils um eine Aminosäure (s. Abbildung). Aus den Massendifferenzen können daher die zugehörigen Aminosäuren und in Folge auch die Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Die Schwierigkeit in der Interpretation der Massenspektren besteht im Auffinden der zueinander gehörenden Ionenserien.



Fragmentierung von Peptiden, MS/MS Fragmentationenserien und dazugehöriges MS/MS Fragmentationenspektrum.

2.5 Enzymatische Spaltung von Proteinen

Die Fragmentierung von intakten Proteinen mittels CID ist nicht möglich, da die Stoßenergie bei derart großen Molekülen sehr rasch über das ganze Molekül verteilt wird und deshalb für einen Bindungsbruch an einer bestimmten Stelle nicht ausreicht. Aus diesem Grund müssen die zu sequenzierenden Proteine zuerst enzymatisch oder chemisch in kleinere Teilstücke zerlegt werden. Die entstandenen Teilstücke (im Falle eines enzymatischen Verdauens mit Trypsin werden diese als tryptische Peptide



Enzymatische Spaltung von Proteinen durch Proteasen.

bezeichnet) können im Falle einfacher Mischungen direkt massenspektrometrisch untersucht werden. Bei komplexeren Peptidmischungen, die aus dem gleichzeitigen Verdau von sehr vielen Proteinen oder eines kompletten Proteoms

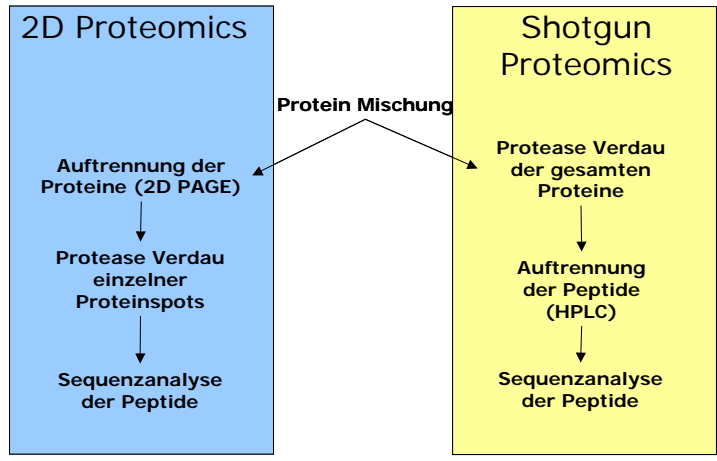
entstehen, ist eine Auftrennung der verschiedenen Peptide notwendig.

Das zu untersuchende Protein wird mit einem speziellen Enzym, einer sogenannten Protease, verdaut. Die Aufgabe eines proteolytischen Enzyms besteht darin, Peptidbindungen zu hydrolysieren. Dieses Zerschneiden geschieht dabei aber nicht willkürlich. Proteasen können nur an bestimmten Stellen in der Proteinkette schneiden. Trypsin beispielsweise schneidet nur C-terminal zu basischen Resten wie Lysin oder Arginin. Wenn man beispielsweise ein Protein mit Trypsin verdaut, so werden alle entstehenden Peptidfragmente am C-Terminus einen Lysin- oder Argininrest besitzen.

2.6 Identifizierungsstrategien für Proteine

Proteine besitzen charakteristische Eigenschaften mit deren Hilfe man diese auftrennen, reinigen und identifizieren kann: molekulare Masse, isoelektrischer Punkt, Löslichkeit, Proteinsequenz, Biospezifität, Hydrophobie, Ladung, und Komplexierung. Wesentliche Merkmale eines Proteins sind die Aminosäuresequenz und posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, Glykosylierung, Sulfatierung, Methylierung,...). Die Messung der charakteristischen Eigenschaften erfolgt über geeignete analytische Methoden. In vielen Fällen ist die Bestimmung einer einzigen Eigenschaft nicht ausreichend, um ein Protein eindeutig identifizieren zu können, so dass mehrere unterschiedliche Parameter bestimmt werden müssen. Mit Hilfe der Massenspektrometrie ist eine hochempfindliche, schnelle und vergleichsweise sichere Identifizierung über verschiedene Verfahren möglich.

In diesem Praktikum sollen 2 komplementäre Strategien verwendet werden (2D basierende und Shotgun Proteomics), die beide die Identifizierung von Proteinen durch Bestimmung von partiellen Aminosäuresequenzen mittels Massenspektrometrie beinhalten, sich jedoch auch grundsätzlich unterscheiden (s. Abbildung).



2.6.1 2D PAGE Proteomics

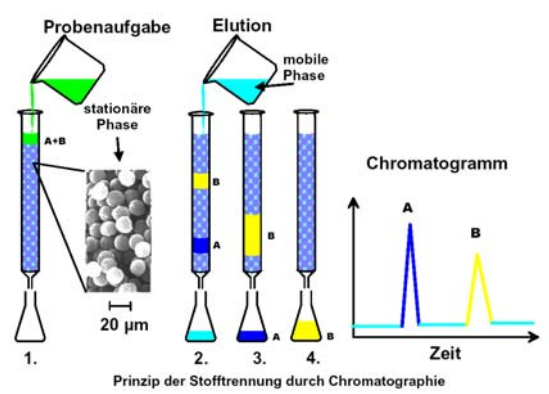
Für dieses Verfahren werden alle Proteine aus einer Probe isoliert und durch 2D PAGE aufgetrennt.

Die 2D PAGE ist eine Kombination von Isoelektrischer Fokussierung und denaturierender SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE). Bei der 2D PAGE werden die Proteine nicht nur nach ihrem Molekulargewicht (zweite Dimension), sondern in der ersten Dimension auch nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Dies ermöglicht eine Trennung mehrerer tausend Proteine und somit auch komplexer Proteingemische. Anschließend werden die Proteine im Gel angefärbt. Protein Spots können nach der Auftrennung durch 2D PAGE einzeln aus dem Gel ausgeschnitten, mit einer Protease verdaut und massenspektrometrisch analysiert werden.

2.6.2 Shotgun Proteomics

In diesem Verfahren werden alle Proteine eines interessierenden Proteoms gemeinsam isoliert und die gesamte Proteinmischung wird mit Trypsin verdaut, wobei einige 100.000 Peptide entstehen können. Diese komplexe Mischung wird anschließend mittels HPLC aufgetrennt und die getrennten Peptide werden mittels Massenspektrometrie untersucht.

Die Flüssigchromatographie basiert auf der Verteilung der Komponenten eines Gemisches zwischen einer festen (stationären) Phase und einer flüssigen (mobilen) Phase. Die stationäre Phase ist als ein fein verteiltes Pulver mit Korngrößen von einigen Mikrometern in ein Säulenrohr gefüllt. Zu Beginn eines Trennvorganges wird am Anfang der Trennsäule die Mischung der zu trennenden Probenkomponenten aufgegeben. Bei ihrer Wanderung durch die Säule treten nun die Komponenten der Mischung in Abhängigkeit von deren physiko-chemischen Eigenschaften unterschiedlich stark bzw. oft mit der Oberfläche der stationären Phase in Wechselwirkung.



Je stärker die Wechselwirkung, desto länger wird eine Probenkomponente zurückgehalten und desto langsamer bewegt sie sich durch die Säule bevor sie schlussendlich die Säule wieder verlässt (=Elution). Trägt man die Konzentration von aus der Säule austretenden Komponenten als Funktion der Trennzeit auf, so erhält man ein Chromatogramm, in dem die Berge (Peaks) den aufgetrennten Probesubstanzen entsprechen.

In der modernen Form der Flüssigchromatographie, der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) wird die mobile Phase mittels Hochdruckpumpen durch die Trennsäule gepumpt. Die Identifizierung der aufgetrennten Peptide erfolgt durch Einleiten des Säuleneluates in ein Massenspektrometer.

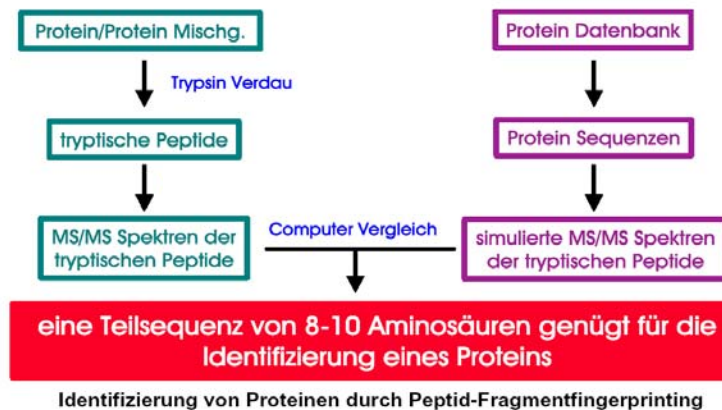
2.7 Methoden der Proteinidentifizierung durch Massenspektrometrie

2.7.1 Peptid-Massenfingerprinting

Beim Peptid-Massenfingerprinting wird das Protein durch einen enzymatischen Verdau in Peptide gespalten. Da die verwendeten Enzyme an spezifischen Stellen spalten, erhält man ein Satz von Peptiden, der für ein bestimmtes Protein charakteristisch ist und daher als Fingerprint dienen kann. Man bestimmt experimentell die Massen der erhaltenen Peptide und vergleicht die Messwerte mit den Massen, die man durch in silico Verdau aller in der DNA- oder Protein Datenbank enthaltenen Proteine berechnet. Um ein Protein mit guter Sicherheit identifizieren zu können, muss eine möglichst große Anzahl von Peptiden mit übereinstimmender Masse gefunden werden.

2.7.2 Peptid Fragment Fingerprinting

Eine Zunahme der Spezifität der Protein-Identifizierung erreicht man dadurch, dass man Teilsequenzen von Peptiden bestimmt und mit Proteinen in Datenbanken vergleicht.



Bei der Proteinidentifizierung macht man sich dabei zunutze, dass eine Teilsequenz eines Peptides von ca. 8-10 Aminosäuren vielfach genügt, um eindeutig dem entsprechenden Protein

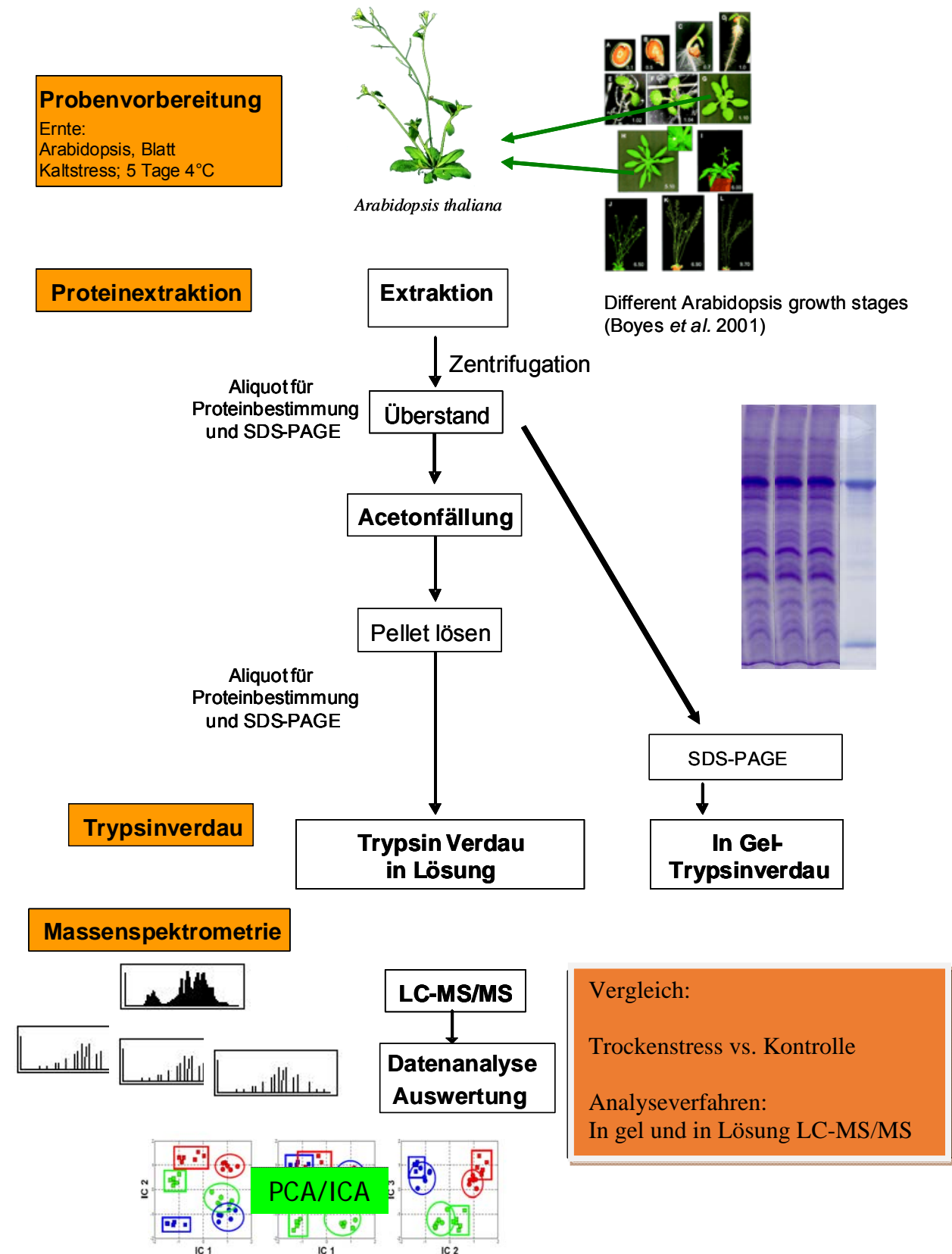
zugeordnet werden zu können. Es reicht also im Idealfall die Sequenz eines einzigen Peptides, um das zugehörige Protein identifizieren zu können, daher ist diese Methode auch für komplexe Mischungen anwendbar.

Aus der Tandem Massenspektrometrie von Peptiden erhält man zwei Arten von Informationen:

- die Masse des intakten Peptides: eine genaue Peptidmasse schränkt die möglichen Sequenzen stark ein, wenn man die Information mit der Spezifität des spaltenden Enzyms miteinbezieht. Seite 8 von 10
- Das Spektrum enthält eine Fragmentationenstruktur, die für eine spezielle Sequenz typisch ist. Diese kann mit den theoretischen Fragmentationen eines Proteins verglichen werden oder es kann mittels Software die Aminosäuresequenz ermittelt werden.

3 Versuchsdurchführung

3.1 Übersicht



Probensammlung, Proteinextraktion und Verdau siehe zusätzlich ausgeteilte Protokolle!!!

4 Auswertung Vortrag und Protokoll

Auswertungen Vorträge und Protokolle bitte als Gruppenarbeit durchführen! Angabe der Personen (Namen) entsprechender Abschnitte.

1. Kurze Durchführungsbeschreibung mit genauen Angaben über die verwendeten Reagenzien, Inkubationszeiten usw.
2. Durchführungsbeschreibung MS Experimente.
3. Ergebnisse (Vergleich der Daten)
4. Diskussion (auch Misserfolge bitte diskutieren)
5. Die folgenden Fragen sollten bitte im Vortrag und Protokoll ausgearbeitet werden.
 - Was versteht man unter einem Proteom?
 - Welche Aussagen möchte man aus der Analyse eines Proteoms treffen?
 - Warum werden Proteine vor der massenspektrometrischen Analyse mit Proteasen verdaut?
 - Schneidet Trypsin an jedem Arginin oder Lysin?
 - Warum müssen Moleküle für eine massenspektrometrische Analyse als Ionen in der Gasphase vorliegen?
 - Was ist der Unterschied zwischen MALDI-MS und ESI-MS?
 - Woran kann man die Ladung eines Ions erkennen?
 - Warum ist bei komplexen Mischungen eine Trennung vor der massenspektrometrischen Untersuchung von Vorteil?
 - Welche Informationen muss man aus einem Massenspektrum entnehmen, um daraus eine Peptidsequenz ablesen zu können?
 - Wie werden Proteine im Massenspektrometer fragmentiert und was für Fragmente entstehen?
 - Aufgrund welcher Eigenschaften wandern bestimmte Substanzen schneller, andere langsamer durch Gele bzw. chromatographische Trennsäulen?
 - Was für Färbemethoden für Proteingele gibt es und was sind ihre Vor- und Nachteile?
 - Gibt es andere Methoden für die Sequenzbestimmung von Proteinen und wie funktionieren sie?
 - Was versteht man unter einem Massenfingerprint und einem Fragmentfingerprint?
 - Beschreiben Sie die prinzipiellen Unterschiede zwischen zweidimensionaler Gelelektrophorese und „Shotgun proteomics“ zur Trennung und Identifizierung von Proteinen.