

Elementmassenspektrometrie

Schwefel als Schlüsselement für die quantitative Proteinanalytik durch Kopplung von Kapillar-Flüssigchromatographie und Elementmassenspektrometrie**

Mathias Wind, Ansgar Wegener, Andreas Eisenmenger, Roland Kellner und Wolf D. Lehmann*

Aktuelle biologisch relevante Fragestellungen machen es erforderlich, Proteine in (sub)picomolaren, komplexen Lösungen möglichst quantitativ zu analysieren; die quantitative Proteinbestimmung im Sub- μ g-Bereich wird jedoch durch zu geringe Probenmengen oder Inkompatibilität von Matrix und Methode limitiert. Die klassische Aminosäureanalyse setzt hohe Probenreinheit voraus und erfordert eine empfindliche Modifizierungsreaktion für die Detektierung der Aminosäuren.^[1,2] Die relative Quantifizierung von zwei identischen Peptiden oder Proteinen in zwei biologischen Proben kann mit der ICAT-Methode erreicht werden (ICAT = isotope coded affinity tag),^[3] eine absolute Quantifizierung ist allerdings nicht möglich.

Die Kopplung von Kapillar-HPLC und Elementmassenspektrometrie (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) wird hier als quantitative Bestimmungsmethode für Peptide und Proteine vorgestellt. Dabei werden zwei Arten von analytischer Information erhalten: erstens eine Speziesinformation über die Retentionzeit und zweitens eine Teilinformation über die elementare Zusammensetzung mit quantitativem Charakter.^[4,5] Zur weiteren Charakterisierung der Analyten bietet sich die Kombination mit der HPLC-ESI-MS-Methode an. Peptide und Proteine können mithilfe dieser beiden Kopplungsmethoden sowohl quantifiziert als auch sequenziert werden.

Hochauflösende ICP-MS-Systeme eignen sich nicht nur zur Analyse von Metallen, sondern auch zur spezifischen und empfindlichen Bestimmung der Elemente S, Se, I und P. Wegen seines natürlichen Vorkommens in zwei Aminosäuren (Cystein, Methionin) kommt dem Schwefel eine Schlüsselrolle zu. Die durchschnittliche Häufigkeit, mit der diese Aminosäuren in natürlichen Proteinen auftreten, beträgt etwa 5%. Bei der Direktmessung von Schwefel mittels Elementmassenspektrometrie^[4,6] handelt es sich um eine

allgemein anwendbare Quantifizierungsmethode für Peptide und Proteine, da das Integral des Signales für ein Element direkt mit der Absolutmenge korreliert und nicht von der chemischen Struktur des Analyten abhängt.

Das Konzept der Protein-Quantifizierung mittels μ LC-ICP-MS und Detektion von Schwefel wird am Beispiel des Humaninsulins (ca. 5800 Da, sechs Cysteineinheiten) demonstriert. Damit die Konzentration dieses Peptid absolut quantifiziert werden kann, muss der Probe eine bekannte Menge eines schwefelhaltigen internen Standards zugesetzt werden, im vorliegenden Beispiel Thiamin (ein Schwefelatom). Um die Stabilität und Vergleichbarkeit der Analysebedingungen zu gewährleisten, wird der Analyt Insulin zusammen mit einem 5,6-fachen molaren Überschuss an Thiamin injiziert und isokratisch eluiert. Das Auftreten schwefelhaltiger Komponenten im Eluat wird mittels ICP-MS bei selektiver ^{32}S -Detektion direkt erfasst.

Abbildung 1a zeigt die Trennung mit spezifischer ^{32}S -Detektion für drei Injektionen (durch Pfeile gekennzeichnet) eines längeren Messzyklus. Aus den Integralen der Signale

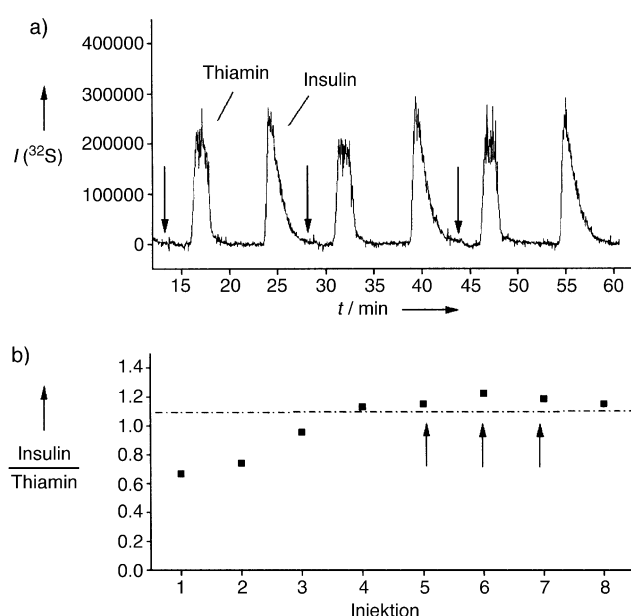


Abbildung 1. Direktquantifizierung von Insulin (sechs Schwefelatome pro Molekül) mit μ LC-ICP-MS und ^{32}S -Detektion. Interner Standard: Thiamin (ein Schwefelatome pro Molekül). a) Isokratische RP- μ LC-ICP-MS. Mit Pfeilen markierte Probeninjektionen korrelieren mit den in (b) markierten Messpunkten. b) Integralverhältnis Insulin/Thiamin. Der theoretische Wert ist durch die gestrichelte Linie hervorgehoben.

kann durch Quotientenbildung der relative Schwefelgehalt beider Proben ermittelt werden, dieser ist für einen Messzyklus von acht aufeinander folgenden Injektionen in Abbildung 1b gezeigt. Bereits nach der vierten Injektion bleibt das Integralverhältnis konstant bei ca. 1,15. Zu Beginn der Messung stellt sich während der ersten drei Probeninjektionen eine Adsorptionssättigung ein, ein Überbefund wird durch isokratische Trennbedingungen vermieden. Nach der dritten Messung erreicht man einen stabilen Zustand, die Messwerte sind gut reproduzierbar (5% RSD). Der so

[*] Prof. Dr. W. D. Lehmann, Dr. M. Wind, Dr. A. Eisenmenger
Zentrale Spektroskopie
Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-42-4554
E-mail: wolf.lehmann@dkfz-heidelberg.de
Dr. A. Wegener, Dr. R. Kellner
Global Technologies TRB, Merck KGaA
64271 Darmstadt (Deutschland)

[**] Wir danken Herrn Dr. K. Sauber (Aventis Pharma) für hilfreiche Diskussionen und die Überlassung einer Probe Humaninsulin.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

bestimmte Wert weicht nur geringfügig (< 10 %) vom theoretischen Verhältnis 1.07 ab, die berechnete Insulinkonzentration ist um 7 % zu hoch. Eine vergleichbar gute, direkte Quantifizierung eines Peptides oder Proteins, unabhängig von dessen Aminosäurezusammensetzung, ist mit alternativen Methoden zurzeit nicht realisierbar.

Mit der μ LC-ICP-MS können nicht nur absolute, sondern auch relative Peptidquantifizierungen durchgeführt werden, beispielsweise um enzymatische Veränderungen von Proteinen zu verfolgen. Als Beispiel für diese Anwendung soll der proteolytische Verdau eines Gemisches zweier rekombinanter Proteindomänen dienen. Zwei funktionelle Domänen des bakteriellen Chemotaxisproteins cheA,^[7] cheA-H (3-137) und cheA-C (257-513), wurden nach Levit et al.^[8] durch Überexpression in *E. coli* hergestellt. Die Expression als Fusionproteine mit den Affinitätstags 6xHis (cheA-H) und Streptag (cheA-C) ermöglicht es, die Proteindomänen bis zu einer Reinheit von > 95 % zu isolieren. Zur quantitativen Proteinanalytik wurde eine Mischung aus 90 % cheA-H und 10 % cheA-C einem tryptischen Verdau unterzogen. Die Peptidfragmente wurden danach durch μ LC getrennt und direkt massenspektrometrisch untersucht. Das Auftreten schwefelhaltiger Peptide im Eluat wurde mittels ICP-MS bei selektiver ^{32}S -Detektion direkt verfolgt (Abbildung 2 a).

Zur Identifizierung der Peptide wurde ein Aliquot dieser Probe unter identischen LC-Bedingungen zusätzlich mit μ LC-ESI-MS bei Detektion positiver Ionen analysiert. Das Basispeak-Chromatogramm dieser Analyse ist in Abbildung 2 b gezeigt, Tabelle 1 fasst die Sequenzen der entsprechenden tryptischen Peptide und die quantitative Auswertung der Analysen zusammen. Bei vollständigem tryptischen Verdau eines Proteins erwartet man, dass die tryptischen Peptide in äquimolarem Verhältnis vorliegen; die quantitative Auswertung der ^{32}S -Spur stimmt hiermit gut überein (Abbildung 2 a, Tabelle 1).

Die Integrale der ^{32}S -ICP-Signale ergeben für alle beobachteten tryptischen Peptide des cheA-H einen Durch-

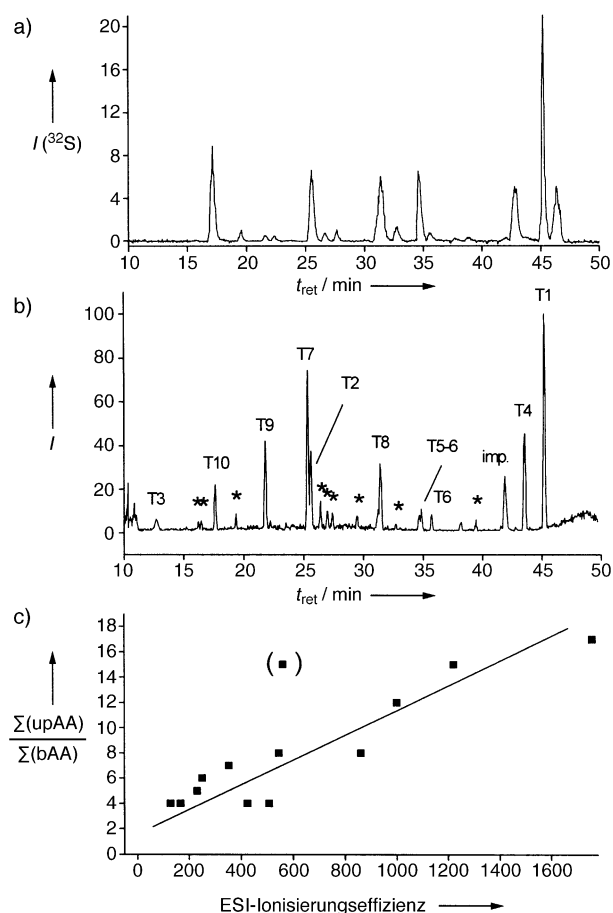


Abbildung 2. Tryptischer Verdau von cheA-H (90 %) und cheA-C (10 %). a) μ LC-ICP-MS mit ^{32}S -Detektion. b) μ LC-ESI-MS, dargestellt als Basispeak-Chromatogramm. Sterne indizieren die tryptischen Fragmente von cheA-C, T-Beschriftungen diejenigen von cheA-H. c) Korrelation der ESI-Ionisierungseffizienz mit dem Quotienten aus der Zahl der unpolaren Aminosäuren (upAA) und der der basischen Aminosäuren (bAA) des entsprechenden Peptides ($R=0.94$; der eingeklammerte Messpunkt wurde nicht berücksichtigt).

Tabelle 1: Sequenz, ICP-MS-Signalintensität, ESI-MS-Signalintensität (Summe aller Ladungszustände), ESI-Ionisierungseffizienz und Charakteristika der analysierten Peptide.

t_{ret} [min]	Sequenz ^[a]	Protein	Intensitäten			Peptidzusammensetzung		
			ICP-Integral	ESI-Integral	Ionisierungseffizienz	basisch/ sauer	unpolar	polar
17.1	GETPSAMR	cheA-H; T10	3.17	406	128	1/1	4	2
19.5	MGGHVEIQSK	cheA-C; T26	0.29	67	231	1/1	5	2
21.6	?		0.18					
22.4	GVGMDVVK	cheA-C; T23	0.16	40	250	1/1	6	0
25.5	DIMQEQLDAYK	cheA-H; T7	2.67	1133	424	1/3	4	3
26.6	DLQESVMSIR	cheA-C; T7	0.26	147	565	1/2	4	5
27.6	SSELDPVNHGDLITSMGQLQR	cheA-C; T5	0.29	250	862	1/3	8	7
31.3	QSQEPDAASFYICQALR	cheA-H; T8	3.23	1138	352	1/3	7	7
32.7	NSVGNLILSAEHQCGNICIEVTDGAGLNR	cheA-C; T19	0.57	696	1221	1/4	15	14
34.6	RGEMQLNTDIINLFLETK	cheA-H; T5-6	2.42	405	167	2/3	8	5
35.5	GEMQLNTDIINLFLETK	cheA-H; T6	0.33	180	545	1/3	8	5
37.7	?		0.08					
38.8	VDQLINLVGELVITQSMLAQR	cheA-C; T4	0.13	130	1000	1/2	12	6
42.8	GGAGTFGFVLQETTHLMENLLDEAR	cheA-H; T4	2.81	1575	560	1/3	15	6
45.2	MDISSFYQTFDEADELLADMEQHLLVLQPEAPDAER	cheA-H; T1	5.31/2	4670	1759	1/10	17	7
46.4	?		2.61					

[a] Schwefelhaltige Aminosäuren sind fett gedruckt.

schnittswert von 2.8 pro Schwefelatom (maximale Abweichung: 0.4), für die tryptischen Peptide des cheA-C liegen die Werte erwartungsgemäß um eine Größenordnung niedriger (Tabelle 1, ICP-Integral). Die relativen Schwankungen der ICP-Integrale von cheA-C sind erheblich größer (0.13 bis 0.57) als diejenigen der Signale für cheA-H. Für die relativ niedrigen ICP-Integralwerte von cheA-C T4 (0.13) und cheA-C T23 (0.16) könnte eine reduzierte Spaltungseffizienz von Trypsin verantwortlich sein, wie sie beim Auftreten von basischen^[9] oder sauren^[10] Aminosäuren direkt neben Arginin oder Lysin beschrieben wurde. Abweichungen zu größeren ICP-Integralwerten (z. B. cheA-C T19) könnten durch unvollständige Spaltungen oder nichttryptische Nebenprodukte der Hauptkomponente cheA-H verursacht sein.

Definiert man die Integrale der Signale aus dem ³²S-Profil der ICP-MS-Messung als absolutes Maß für die Peptidmenge, so kann aus dem Vergleich mit den Integralen der jeweiligen Molekülspezies im Elektrospray-Massenspektrum die relative Elektrospray-Ionisierungseffizienz des betreffenden Peptids abgeleitet werden. Als Maß der Ionisierungseffizienz (Tabelle 1) dient der Quotient aus den Peakintegralen des μ LC-ESI-MS-Laufs (Summe aller Ladungszustände) und den entsprechenden Integralen des μ LC-ICP-MS-Laufs (Abbildung 2b bzw. 2a). Bei der Korrelation der Ionisierungseffizienz mit der Peptidzusammensetzung ergeben sich für die hier vermessenen tryptischen Peptide folgende Abhängigkeiten: 1) Die Ionisierungseffizienz steigt mit der Größe der Peptide sowie bei Anwesenheit unpolarer Aminosäuren (upAA); 2) sie wird vermindert durch basische Aminosäuren (bAA) (siehe T6/T5-6; andere Beispiele sind bekannt); 3) saure Aminosäuren haben keinen Einfluss auf die Ionisierungseffizienz. Die Auftragung des Quotienten $\Sigma(\text{upAA})/\Sigma(\text{bAA})$ gegen die Ionisierungseffizienz ergibt einen linearen Zusammenhang (Abbildung 2c), es wird nur ein abweichendes Signal (cheA-H T4) mit zu niedriger ESI-Ionisierungseffizienz beobachtet. Prinzipiell bestätigt diese Korrelation das „Ion Evaporation“-Modell^[11] zur Erklärung der Elektrospray-Ionisierung: Tendenziell reichern sich unpolare Peptide auf der Oberfläche der ESI-Tröpfchen an und werden daher bevorzugt ionisiert.^[12–14]

Die experimentellen Daten dieser Studie zeigen, dass die Elementmassenspektrometrie mit ³²S-Detektion zur quantitativen Spurenanalytik von schwefelhaltigen Peptiden und Proteinen geeignet ist. Die gleichzeitige ICP-MS-Relativmessung von ³²S und ³¹P wurde bereits zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von Phosphoproteinen durchgeführt.^[4] Angesichts der essenziellen Bedeutung quantitativer Daten für die Proteomanalytik und der wenigen verfügbaren Quantifizierungsmethoden hat die beschriebene Kombination von Element- und Elektrospray-Massenspektrometrie ein großes Anwendungspotenzial als neue instrumentell-analytische Methode.

Experimentelles

Säulen: Peptide: 300 $\mu\text{m} \times 25\text{ cm}$; Insulin: 300 $\mu\text{m} \times 12.5\text{ cm}$ jeweils gefüllt mit Vydac C₁₈ 5 μm , 300 Å. Eluenten: A: Wasser, 0.065 % TFA (Trifluoressigsäure), B: 80 % Acetonitril, 0.05 % TFA. Gradient:

Peptide: 5 min 7 % B, 5–50 min 7–100 % B; Insulin: isokratisch 36.8 % B. Trennung auf 25 °C thermostatisiert.

Die Probenlösung für die Insulinmessung enthielt: 6 μM Humaninsulin (100 Units mL^{-1} , Aventis Pharma) und 33.6 μM Thiamin in 0.1 % TFA. Das entspricht bei 5 μL -Injektion: 180 pmol Schwefel aus Insulin; 168 pmol Schwefel aus Thiamin. Schwefelverhältnis: theoretisch: 1.07; experimentell: 1.15 (5 % RSD).

Die Konstrukte zur Expression der Domänen cheA-H und cheA-C des *E. coli*-Chemotaxisproteins (SwissProt Accession No. P07363) wurden nach Levit et al.^[8] aus PCR-Amplifikaten des entsprechenden Genabschnittes erzeugt, an deren 3'-Ende kodierende Sequenzen für 6xHis bzw. StreptagII gebunden wurden. Die Expressionskonstrukte enthalten die Sequenzen 3–137 (H-Domäne) bzw. 257–513 (C-Domäne) von P07363 (siehe Hintergrundinformationen). Als Expressionssystem diente pASK75 (IBA, Göttingen) in *E. coli* W3110. Die Reinigung der Proteine erfolgte über die Affinitätsmatrizes NiNTA (Qiagen, Hilden) für cheA-H-His und Streptactin (IBA, Göttingen) für cheA-C-Strep.

Die Elementmassenspektrometrie wurde an einem hochauflösenden Sektorfeldgerät Typ Element 2 (ThermoFinnigan, Bremen) durchgeführt. Mittlere Auflösung: 4000, Scanzeit: 1.7 s, Scanbreite: 100 mDa. Für die μ LC-ESI-MS-Analysen wurde ein Tandem-Massenspektrometer Q-ToF 2 (Micromass, Manchester) verwendet. Alle MS-Messungen wurden mit Positivionen-Detektion durchgeführt. Die Integration der Rohdaten erfolgte mit dem Programm Origin 5.0.

Die Nachweisempfindlichkeit (S/N-Verhältnis 3:1) der ³²S-Detektion wurde für Peptide auf 10 pmol und für Proteine auf 25 pmol abgeschätzt. Der dynamische Bereich der Quantifizierungsmethode ist bei der Anwendung auf Peptide und Proteine weniger durch die ICP-MS begrenzt als durch das chromatographische Verhalten der Analyten.

Eingegangen am 14. November 2002 [Z50547]

Stichwörter: Analytische Chemie · Elektrosprayionisation · Massenspektrometrie · Peptide · Proteine

- [1] M. Weiss, M. Manneberg, J.-F. Juranville, H.-W. Lahm, M. Fountoulakis, *J. Chromatogr. A* **1998**, 795, 263–275.
- [2] R. Kellner, H. E. Meyer, F. Lottspeich in *Microcharacterization of Proteins*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**, S. 119–140.
- [3] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 994–999.
- [4] M. Wind, H. Wesch, W. D. Lehmann, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 3006–3010.
- [5] M. Wind, M. Edler, N. Jakubowski, M. Linscheid, H. Wesch, W. D. Lehmann, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 29–35.
- [6] E. Svantesson, J. Pettersson, K. E. Markides, *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, 17, 491–496.
- [7] A. M. Bilwes, L. A. Alex, B. R. Crane, M. I. Simon, *Cell* **1999**, 96, 131–141.
- [8] M. Levit, Y. Liu, M. Surette, J. Stock, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 32057–32063.
- [9] B. Keil, *Specificity of Proteolysis*, Springer, Berlin, **1992**, S. 335.
- [10] B. Thiede, S. Lamer, J. Mattow, F. Siejak, C. Dimmler, T. Rudel, P. R. Jungblut, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, 14, 496–502.
- [11] B. A. Thomson, J. V. Iribarne, *J. Chem. Phys.* **1979**, 71, 4451–4463.
- [12] N. B. Cech, J. R. Krone, C. G. Enke, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 210–213.
- [13] N. B. Cech, C. G. Enke, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2717–2723.
- [14] K. Tang, R. D. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, 12, 343–347.