

Desorption durch impulsive Anregung intramolekularer Vibrationszustände – eine Methode zur schnellen Extraktion von Proteinen aus intakten Geweben**

Marcel Kwiatkowski, Marcus Wurlitzer, Maryam Omidi, Ling Ren, Sebastian Kruber, Refat Nimer, Wesley D. Robertson, Andrea Horst, R. J. Dwayne Miller und Hartmut Schlüter*

Abstract: Mithilfe eines Pikosekunden-IR-Lasers (PIRL) können Proteine in weniger als einer Millisekunde aus intakten Geweben in die Gasphase katapultiert werden. Die ultraschnelle Desorption erfolgt durch eine impulsive Anregung intramolekularer Vibrationszustände (DIVE) der Wassermoleküle, die die Proteine innerhalb des Gewebes umgeben. PIRL-DIVE extrahiert mit hohen Ausbeuten eine große Vielzahl unterschiedlicher Proteine, von wenigen kDa bis zu mehreren MDa. Die chemische Zusammensetzung der Proteine wird durch die Energie des PIRL nicht verändert. Der Nachweis von Enzymaktivitäten in den PIRL-Extrakten weist darauf hin, dass die Konformation der Enzyme erhalten bleibt.

Die Extraktion von Proteinen aus biologischen Geweben ist ein kritischer und zeitaufwendiger Schritt in jedem proteinanalytischen Experiment. Die Proteine müssen aus ihren zellulären Kompartimenten freigesetzt werden, was ein Aufbrechen der zellulären Strukturen durch Homogenisierung des Gewebes erfordert. Die Art der Homogenisierung hängt von der Beschaffenheit des Gewebes ab. Während ein Aufschluss von Gehirn- und Lebergewebe durch Ultraschalbehandlung möglich ist,^[1] werden für Muskel-, Knochen- und Knorpelgewebe mechanische Homogenisatoren benötigt.^[2] Für eine effiziente Proteinisolierung ist die Wahl des Extraktionspuffers von großer Bedeutung. So kann eine Abweichung vom physiologischen pH-Wert zu einer Denaturierung der Proteine führen. Gegebenenfalls müssen dem Extraktionspuffer Additive zur Stabilisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen oder Enzymen zugesetzt werden. Die Proteine sollten zudem durch die Komponenten des Extraktionspuffers nicht chemisch modifiziert werden.^[3]

Nach erfolgtem Zellaufschluss müssen Zellbruchstücke und andere unlösliche Komponenten entfernt und die Proteine von anderen Biomolekülen und organischen Verbindungen abgetrennt werden. Dies kann durch Zentrifugations- und Präzipitationsverfahren oder einer Kombination aus beiden erreicht werden.^[4]

Aufgrund der unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften der Proteine ist es fast unmöglich, die Gesamtheit aller vorhandenen Proteine aus einem Gewebe mit einer einzigen Methode zu extrahieren. Die meisten Protokolle sind auf die Extraktion einer definierten Gruppe von Proteinen optimiert.^[5-7] Es wäre daher erstrebenswert, Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen, eine möglichst große Zahl individueller Proteine zu extrahieren. Die Extraktion sollte unter sanften Bedingungen erfolgen, um Enzymaktivitäten zu erhalten. Um den nativen Zustand von Proteinen analysieren zu können, sollten chemische und enzymatische Reaktionen während der Extraktion vermieden werden.

Romano und Levis haben gezeigt, dass es mit einem UV-Laser und der Verwendung eines Chromophors möglich ist, hochmolekulare DNA-Einzelstrangmoleküle zu ablatieren und für weitere Untersuchungen aufzufangen.^[8] Andere Gruppen nutzten die Laserablation („laser ablation sample transfer“, LAST) zur Probenvorbereitung für die massenspektrometrische MALDI-Bildgebung (MALDI-MSI) oder für ESI-MS-Analysen.^[9-14] MALDI-MSI ermöglicht prinzipiell die Desorption und Analyse intakter Peptide und Proteinen aus intakten Geweben.^[15,16] In den erwähnten Arbeiten wurden die Proteine allerdings nicht direkt, sondern mithilfe zusätzlicher Reagenzien wie der MALDI-Matrix aus dem intakten Gewebe ablatiert (siehe die Hintergrundinformationen für eine detailliertere Diskussion).

Kürzlich hat die Forschungsgruppe von Dwayne Miller ein neues Konzept in der Laserchirurgie entwickelt. Dabei wird ein Pikosekunden-IR-Laser (PIRL) so abgestimmt, dass er speziell die Vibrationsmoden der O-H-Bindung in den Wassermolekülen anregt. Durch diesen äußerst gewebe-schonenden Ablationsprozess lassen sich Proteine intakt aus dem bestrahlten Gewebe in die Gasphase überführen.^[17] Ein wesentliches Merkmal des Ablationsprozesses ist der impulsive und selektive Phasenübergang der sich im Gewebe befindenden Wassermoleküle. Hierdurch wird eine unkontrollierte Nukleation verhindert, die sonst zu extrem starken Schockwellen führen würde, wodurch sowohl das angrenzende Gewebe als auch die darin enthaltenen Proteine beschädigt werden würden.^[18-20] Der Ablationsprozess läuft schneller ab als der akustische Energietransfer an das anlie-

[*] M. Kwiatkowski, M. Wurlitzer, M. Omidi, R. Nimer, Priv.-Doz. Dr. A. Horst, Prof. Dr. H. Schlüter

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Klinische Chemie

Martinistraße 52, Hamburg, 20246 (Deutschland)

E-Mail: h.schlüter@uke.de

L. Ren, S. Kruber, Dr. W. D. Robertson, Prof. Dr. R. J. D. Miller

Max-Planck-Institut für Struktur und Dynamik der Materie

CFEL (Gebäude 99)

Luruper Chaussee 149, Hamburg, 22761 (Deutschland)

[**] Wir danken dem SUREPIRL-Projekt (ERC advanced grant) und dem virtuellen Institut „In vivo studies of biodegradable magnesium based implant materials“ MetBioMat (Helmholtz-Gesellschaft) für die finanzielle Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201407669> zu finden.

gende Gewebe, und die erzeugten akustischen Wellen im 100-GHz-Bereich tragen ebenso zum Ablationsprozess bei. Die gesamte eingestrahlte Energie wird bevorzugt in Translationsfreiheitsgrade der Wassermoleküle umgewandelt und geht nicht durch thermische und akustische Übertragung an das anliegende Gewebe verloren. Darüber hinaus ist die Zeitskala des Ablationsprozesses so kurz, dass die thermische Energie der Wassermoleküle nicht durch Kollisionen auf die Proteine im Gewebe übertragen werden kann. Hierfür sorgt eine einzigartige Eigenschaft der Wassermoleküle: Die Vibrationszustände des Wassermoleküls sind sowohl innerhalb eines einzelnen Moleküls als auch unter benachbarten Wassermolekülen stark gekoppelt, was zu extrem kurzen Relaxationszeiten führt. Die Übertragung der Laserenergie über die direkte Anregung von Vibrationszuständen des Wassermoleküls hin zur Translationsenergie geschieht auf einer Zeitskala von 100 fs, was um etwa ein hundertfaches schneller ist als die thermische Relaxation der Proteine.^[20,21] Durch diesen quantenmechanischen Effekt werden bei der Desorption durch impulsive Anregung von intramolekularen Vibrationszuständen („desorption by impulsive vibrational excitation“, DIVE) Wassermoleküle zusammen mit Proteinen in die Gasphase transportiert, ohne dass die Proteine im Gewebe durch thermische Übertragung oder Schockwellen beschädigt werden.^[18] Es wird daher angenommen, dass es zu einer Desorption der Proteine kommt, ohne dass sich dabei die chemische Zusammensetzung der Proteine ändert.

Um die Frage zu beantworten, ob PIRL zur Extraktion von Proteinen geeignet ist, wurde eine Reihe unterschiedlicher Experimente durchgeführt. Verschiedene Mausgewebe (Muskel, Leber) wurden ablatiert und die Ablationsprodukte mit SDS-PAGE analysiert. Hierdurch sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß Proteine aus dem Gewebe extrahiert werden konnten und ob diese mittels Immunblot nachweisbar sind. Darüber hinaus wurde die Intaktheit und Enzymaktivität ablatierter Proteine massenspektrometrisch untersucht (siehe die Hintergrundinformationen für eine Beschreibung der Methoden).

Zunächst wurde bei einem Mausmuskel mit PIRL eine Fläche von 25 mm^2 mit 1.5 mm Tiefe ablatiert und die Ablationsprodukte mit einer Kühlzelle (Abbildung S1) aufgefangen. Das Kondensat hatte ein Volumen von $50 \mu\text{L}$ und eine Proteinkonzentration von $19.33 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$. Somit konnte eine Proteinmenge von knapp 1 mg in einem einzigen Schritt aus 37.5 mm^3 Gewebe extrahiert werden. Zum Vergleich betrug die extrahierte Proteinmenge des gleichen Gewebsvolumens bei der konventionellen Extraktion mittels Mörsers und Pilstill 175 µg. Die konventionelle Isolierung benötigte mehr als drei Tage, wohingegen die Extraktion mit PIRL nur 5 Minuten dauerte und eine knapp 6mal so hohe Ausbeute lieferte. Für die SDS-PAGE wurden $7.5 \mu\text{L}$ des Kondensationsvolumens ohne weitere Probenvorbereitung verwendet. Die SDS-PAGE zeigt eine Vielzahl von Banden über den gesamten Trennbereich des Gels (Abbildung 1). Die Banden wurden tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Die LC-ESI-MS/MS-Analyse ergab, dass die Bande knapp unterhalb der 250-kDa-Markerbande verschiedene Myosin-Proteine enthielt. Die Position der Bande stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht der Proteine ($M_r = 222 \text{ kDa}$) überein. Die Sequenzabdeckung von Myosin-4 (35 %, $M_r = 222720 \text{ Da}$) sowie die Anzahl der identifizierten Peptide ($n = 66$) und deren Verteilung über das gesamte Protein deuten darauf hin, dass es intakt und in großer Menge aus dem Gewebe extrahiert werden konnte. In der obersten Bande direkt unter der Ladungstasche wurde das Muskel-assoziierte Protein Titin nachgewiesen. Es wurden 86 verschiedene Peptide dieses 3.9 MDa großen Proteins identifiziert. Die Peptide decken einen Sequenzbereich von 32212 Aminosäuren ab, was $M_r = 3.57 \text{ MDa}$ entspricht. Aufgrund der Ergebnisse und der Position des Titins im Gel kann angenommen werden, dass das Protein wie die Myosin-Proteine intakt desorbiert wurde.

Ein Vergleich der SDS-PAGE des PIRL-Extrakts mit der SDS-PAGE des konventionellen Extrakts (Abbildung S3) ergab, dass alle ausgeprägten Banden im Gel der konventionellen Extraktion auch im Gel der ablatierten Probe detektiert werden konnten. Dies spricht dafür, dass beide Verfahren eine ähnliche Mischung von Proteinen extrahierten. Darüber hinaus zeigt die SDS-PAGE des PIRL-Extrakts fünf ausgeprägte Banden, die bei der konventionellen Extraktion nicht detektiert werden konnten.

Um zu untersuchen, ob nach der PIRL-Extraktion Proteine mit der Western-Blot-Analyse nachweisbar sind, wurde das Gewebe einer Mausleber ablatiert, für den Immunblot $40 \mu\text{g}$ auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine nach dem Transfer auf die Blotmembran mit einem Anti-CEACAM1-Antiserum-P1-Antikörper inkubiert.^[22] In Abbildung 2 ist das Lebergewebe nach dem Ablationsprozess

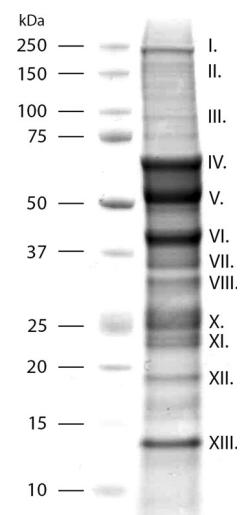


Abbildung 1. SDS-PAGE von Proteinen, die mit PIRL extrahiert wurden. Links: Proteinstandard. Rechts: extrahierte Mausmuskelproteine (145 µg). Römische Ziffern: Banden, die sowohl in der Gelelektrophorese der ablatierten als auch in der Gel-elektrophorese der konventionell extrahierten (Abbildung S3) Gewebsprobe detektiert wurden, sind mit identischen Ziffern gekennzeichnet.

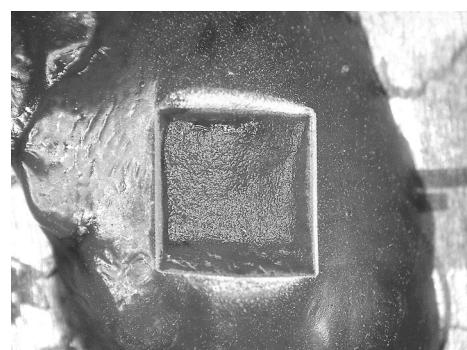


Abbildung 2. Mit PIRL bestrahltes Mauslebergewebe. Eine Fläche von $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ wurde mit PIRL für 5 min bestrahlt. Die Abbildung zeigt die ablatierte Fläche des Lebergewebes.

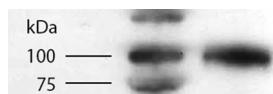


Abbildung 3. Detektion von ablatierten CEACAM1 aus Lebergewebe mit Anti-CEACAM1-Antiserum P1. Links: Proteinstandard. Rechts: Ablatierte Mausleberproteine ($m=40\text{ }\mu\text{g}$). Die Bande in der rechten Spur läuft knapp über 100 kDa und wird hervorgerufen durch das glykosylierte Leberprotein CEACAM1.

dargestellt; die ablatierte Fläche von 25 mm^2 ist deutlich zu sehen. Das Kondensat hatte ein Volumen von $40\text{ }\mu\text{L}$ und eine Proteinkonzentration von $20.1\text{ }\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$. Der Western-Blot in Abbildung 3 zeigt knapp über der 100-kDa-Markerbande ein Signal für das glykosylierte Leberprotein CEACAM1.^[23,24] Das Molekulargewicht von nichtmodifiziertem CEACAM1 beträgt 53517.8 Da. Die Detektion des Proteins bei knapp über 100 kDa deutet darauf hin, dass labile posttranskriptionale Modifizierungen wie die Glykosylierung den DIVE-Prozess intakt überstehen.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit PIRL eine große Vielfalt unterschiedlicher Proteine – einschließlich Proteine im MDa-Bereich – ohne signifikante Fragmentierung extrahiert werden. Der Nachweis ablatierter Proteine mittels Immunblot lässt vermuten, dass der Laser die Struktur der Epitope, die für die Antikörperbindung entscheidend sind, nicht verändert.

Mithilfe der Massenspektrometrie wurde untersucht, ob die Energie des PIRL einen Einfluss auf die chemische Zusammensetzung der Proteine hat, da eine Extraktionsmethode die chemische Zusammensetzung der Proteine nicht verändern sollte. Hierfür wurde ablatierte und nicht-ablatierte RNase A mit der MALDI-MS und LC-ESI-MS analysiert. Die MALDI-Spektren der ablatierten und nicht-ablatierten Probe sind nahezu identisch und zeigen Signale für die einfach, zweifach und dreifach protonierte Form der intakten RNase A (Abbildung 4).

Eine genauere Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung der ablatierten und nicht-ablatierten RNase A erfolgte per LC-MS-Analyse auf der Protein- und

per LC-MS/MS-Analyse auf der Peptidebene. Ein Vergleich der Chromatogramme und Massenspektren der intakten Proteine und tryptischen Peptide ergab, dass keine signifikanten Signale in den ablatierten Proben detektiert wurden, welche nicht auch in den nicht-ablatierten Proben vorhanden waren und umgekehrt (Abbildung S4 und S5 sowie Schema S1 und S2).

Darüber hinaus wurde PIRL-ablatiertes und nicht-ablatiertes Alpha-S1-Casein mit der MALDI-MS analysiert. Die Spektren zeigen Signale für die einfach und zweifach protonierte Variante des intakten Alpha-S1-Caseins mit 8 Phosphatgruppen (Abbildung S12). Beide Spektren sind nahezu identisch, und die Detektion des mehrfach phosphorylierten Alpha-S1-Caseins in beiden Proben bestätigt den sanften Prozess der PIRL-Ablation.

Zusätzlich wurde untersucht, ob ablatierte Proteine ihre Enzymaktivität behalten. Hierfür wurde Trypsin mit PIRL ablatiert, das Ablationsprodukt mit Alpha-Casein inkubiert und per LC-ESI-MS/MS analysiert. Nicht-inkubiertes Alpha-Casein wurde als Kontrolle ebenfalls per LC-ESI-MS/MS analysiert. Das Chromatogramm des Inkubats zeigt eine Reihe von Signalen tryptischer Casein-Peptide, wohingegen keine Signale der intakten Casein-Proteine detektiert werden konnten (Abbildung S13, Abbildung S15 und Schema S3-4). Im Unterschied dazu konnten in der Kontrolle keine tryptischen Peptide identifiziert werden, wohingegen sowohl in den Massenspektren als auch in dem Chromatogramm auftretende Signale der intakten Casein-Proteine nachgewiesen wurden (Abbildung S13 und S14 sowie Schema S5). Dieses Ergebnis zeigt, dass das Trypsin nach der PIRL-Ablation enzymatisch aktiv war.

Um zu untersuchen, ob Angiotensin I (Ang 1–10) metabolisierende proteolytische Aktivitäten^[25] nach PIRL-Extraktion aus humanem Blutplasma nachgewiesen werden können, wurde dieses mit PIRL ablatiert. Das ablatierte Plasma wurde mit Ang 1–10 inkubiert. Im MALDI-Spektrum des Inkubats nach 6 Stunden Inkubationszeit wurden Signale für Angiotensin II (Ang 1–8, m/z 1047.5) und Ang 6–9 (m/z 651.12) detektiert (Abbildung 5). Es waren daher nach der Ablation mindestens zwei verschiedene Plasmaproteasen enzymatisch aktiv (Abbildung 5). Die zusätzlichen Signale für Ang 4–10 (m/z 927.47) und Ang 1–7 (m/z 900.48) im MALDI-Spektrum des Inkubats nach 24 Stunden Inkubationszeit weisen auf die Aktivitäten zweier weiterer Proteasen hin. Als Kontrollexperiment wurde die gleiche Menge nicht-ablatiertes humanes Plasma mit der gleichen Menge Ang 1–10 inkubiert. Im MALDI-Spektrum des Inkubats nach 24 Stunden ist ein vergleichbares Muster von Angiotensin-Peptidsignalen zu sehen (Abbildung S16), was darauf hin deutet, dass nahezu die gesamte Enzymaktivität nach der PIRL-Bestrahlung erhalten blieb.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass es sich bei PIRL-DIVE um ein sehr effektives und schonendes Extraktionsverfahren handelt. Die Proteine werden schnell und direkt aus dem Gewebe heraus in die Gasphase transportiert, ohne dass dabei ihre chemische Zusammensetzung verändert wird. Der Nachweis enzymatischer Aktivitäten in den ablatierten Proteinfaktionen unterstreicht die sanfte Natur des Ablationsprozesses. Insgesamt war sowohl die qualitative als

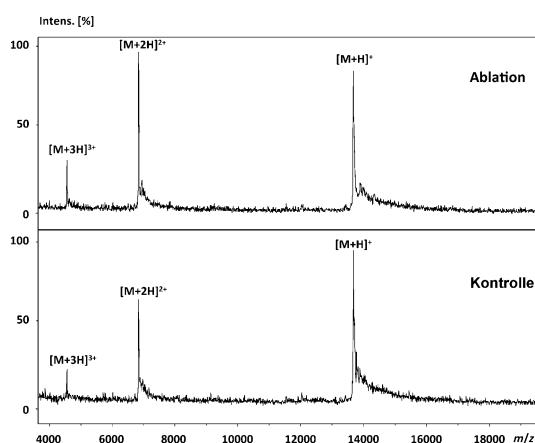


Abbildung 4. MALDI-TOF-Massenspektren der mit PIRL-ablatierten RNase A (Ablation) und nicht-ablatierter RNase A (Kontrolle). Matrix: 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP).

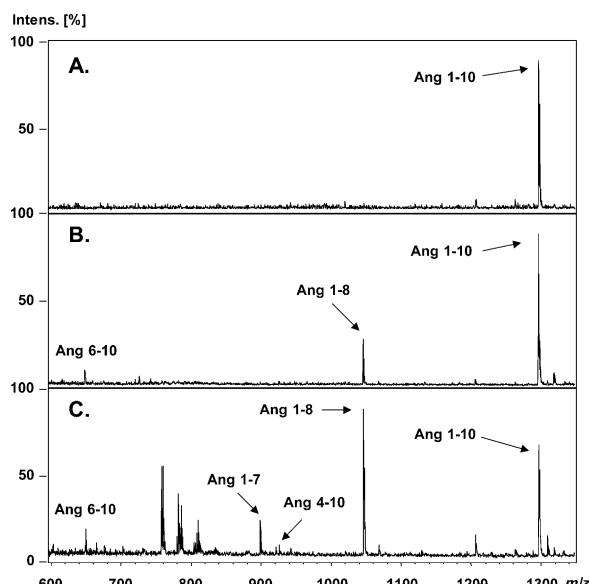


Abbildung 5. MALDI-TOF-Massenspektren von Ang 1-10 ($c=10^{-5}$ M) inkubiert mit ablatierten humanen Plasmaproteinen. Die Reaktionsprodukte wurden mit MALDI-TOF-MS nach 0 h (A), 6 h (B) und 24 h (C) detektiert. Signale für entstandene Angiotensin-Peptide sind mit Pfeilen markiert. Matrix: 2,5-Dihydroxybenzoësäure (DHB).

ausch die quantitative Ausbeute der extrahierten Proteine sehr hoch. Die PIRL-basierte Proteinextraktion könnte daher für viele Anwendungen interessant sein, bei denen es darum geht, Proteine aus Geweben zu isolieren. Hierzu zählen sowohl proteomanalytische Ansätze in der Grundlagenforschung als auch der gezielte Nachweis diagnostischer Biomarker.

Eingegangen am 28. Juli 2014
Online veröffentlicht am 24. Oktober 2014

Stichwörter: Gewebeproben · Massenspektrometrie ·
Pikosekunden-IR-Laser · Proteinextraktion · Proteomik

-
- [1] A. Bodzon-Kulakowska, A. Bierczynska-Krzysik, T. Dylag, A. Drabik, P. Suder, M. Noga, J. Jarzebinska, J. Silberring, *J. Chromatogr. B* **2007**, 849, 1.
 [2] B. Canas, C. Pineiro, E. Calvo, D. López-Ferrer, J. M. Gallardo, *J. Chromatogr. A* **2007**, 1153, 235.
 [3] V. S. Stoll, J. S. Blanchard, *Methods Enzymol.* **2009**, 463, 43.
 [4] B. Storrie, E. A. Madden, *Methods Enzymol.* **1990**, 182, 203.
 [5] C. Ericsson, M. Nister, *Methods Mol. Biol.* **2011**, 675, 307.
 [6] C. Ericsson, I. Peredo, M. Nister, *Acta Oncol.* **2007**, 46, 10.
 [7] C. Lee, *Methods Mol. Biol.* **2007**, 362, 385.
 [8] L. J. Romano, R. J. Levis, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9665.
 [9] O. S. Ovchinnikova, V. Kertesz, G. J. Van Berk, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 1874.
 [10] S. G. Park, K. K. Murray, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, 22, 1352.
 [11] S. G. Park, K. K. Murray, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 3240.
 [12] S. G. Park, K. K. Murray, *J. Mass Spectrom.* **2012**, 47, 1322.
 [13] S. G. Park, K. K. Murray, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, 27, 1673.
 [14] E. Kaufman, W. Smith, M. Kowalski, I. Beech, J. Sunner, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, 27, 1567.
 [15] K. Chughtai, R. M. Heeren, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 3237.
 [16] P. M. Angel, R. M. Caprioli, *Biochemistry* **2013**, 52, 3818.
 [17] K. Franjic, University of Toronto (Toronto), **2010**.
 [18] K. Franjic, M. L. Cowan, D. Kraemer, R. J. Miller, *Opt. Express* **2009**, 17, 22937.
 [19] K. Franjic, D. Miller, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 5225.
 [20] R. J. Miller, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2014**, 65, 583.
 [21] M. L. Cowan, B. D. Bruner, N. Huse, J. R. Dwyer, B. Chugh, E. T. Nibbering, T. Elsaesser, R. J. Miller, *Nature* **2005**, 434, 199.
 [22] A. K. Horst, T. Bickert, N. Brewig, P. Ludewig, N. van Rooijen, U. Schumacher, N. Beauchemin, W. D. Ito, B. Fleischer, C. Wagner, U. Ritter, *Blood* **2009**, 113, 6726.
 [23] C. Kannicht, L. Lucka, R. Nuck, W. Reutter, M. Gohlke, *Glycobiology* **1999**, 9, 897.
 [24] K. D. McEntire, J. Mowery, D. C. Hixson, *Cancer Res.* **1989**, 49, 6795.
 [25] D. Hildebrand, P. Merkel, L. F. Eggers, H. Schluter, *PLoS One* **2013**, 8, e64027.