

NATIVE MASSENSPEKTROMETRIE

ANALYSE VON INTAKTEN PROTEINKOMPLEXEN

Die meisten Funktionen, die Proteine in lebenden Zellen ausüben, beruhen auf ihrer Fähigkeit, gezielt an andere Proteine oder kleinere Liganden zu binden. Die Charakterisierung dieser Proteinkomplexe ist ein wichtiges Anwendungsgebiet der Massenspektrometrie (MS)-basierten Proteomik. Im Bottom-up-Ansatz werden die Proteine vor der MS-Analyse entfaltet und enzymatisch in Peptide gespalten. Die genaue Masse und Primärstruktur der Peptide wird nachfolgend mittels Tandem-MS bestimmt. Die molekulare Zusammensetzung eines Proteinkomplexes kann daher nur indirekt auf Basis der Peptidsequenzen bestimmt werden. Auch fehlen wichtige funktionelle Informationen über die räumliche Struktur der Proteine sowie deren Anordnung und Stöchiometrie im nativen Proteinkomplex.

Im Gegensatz zur Bottom-up-Proteomik kam es in den letzten Jahren zum Durchbruch und breiteren Anwendung sehr leistungsstarker MS-Methoden zur Analyse intakter Proteine. Im Top-down-Ansatz werden die molekulare Masse und die Primärstruktur von intakten, aber zu-

vor entfaltenen Proteinen bestimmt. Die „Native MS“ geht einen Schritt weiter: die Ionisierung erfolgt direkt aus einer wässrigen Lösung mit neutralem pH-Wert, um die räumliche Struktur der Proteine sowie nichtkovalente Bindungen mit anderen Proteinen und Liganden zu erhalten (Abb., oben). Auch die Befreiung der Proteine aus ihrer wässrigen Hülle wird angepasst. Ein erhöhter Restdruck im vorderen Teil des Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometers (Q-TOF) erlaubt es, Proteinionen durch Mehrfachstöße mit inerten Gasmolekülen abzubremsen und zu fokussieren. Der Quadrupolmassenfilter (Q1) ist zudem auf einen sehr hohen Massenbereich getunt, sodass nichtkovalente Proteinkomplexe bis in den Megadalton-Bereich nachgewiesen werden können (MS1-Spektrum). Bei der Tandem-MS-Analyse (Abb., Mitte) werden die im Q1 ausgewählten Proteinkomplexe durch Stöße mit Gasmolekülen gerade so stark aktiviert, dass sie in ihre Untereinheiten zerfallen. Der Zerfall wird durch elektrische Abstoßung der positiven Ladungen an der Oberfläche der Proteinkomplexe eingeleitet. Es

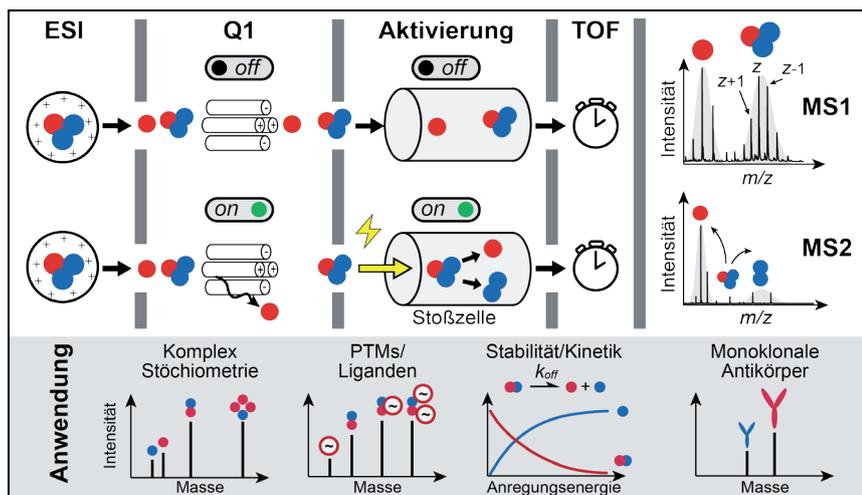


Abb.: Prinzip der Native MS. Intakte Proteinkomplexe werden nach Elektrosprayionisation (ESI) mittels TOF Analyse im MS1 Spektrum nachgewiesen (oben). Bei der Tandem-MS werden im Q1 gefilterte Ionen durch Beschleunigung (gelber Pfeil) aktiviert. Das MS2 Spektrum zeigt die Zerfallsprodukte (Mitte). Anwendungsbeispiele der Native MS (unten).



Deutsche Gesellschaft für
Proteomforschung e.V.

KONTAKT

E-Mail: dgpf@uni-greifswald.de
www.dgpf.org

kommt zumeist zu einer lokalen Entfaltung einer Proteinuntereinheit und einer überproportionalen Anzahl an mitgerissenen Ladungen. Die monomeren Tochterionen werden somit bei kleineren Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen (m/z) im MS2-Spektrum beobachtet. Der Restkomplex verbleibt mit unterproportionaler Ladungszahl [10.1021/cr068289b]. Tandem-MS-Analysen von Multiprotein- oder Protein-Liganden-Komplexen liefern somit wertvolle Informationen über die molekulare Zusammensetzung und Stöchiometrie, die Art und Anzahl von Liganden oder posttranslationalen Modifikationen (PTMs), die Stabilität der Bindungen und die Heterogenität von Proteinproben (z. B. monoklonale Antikörper) (Abb., unten).

Ein spannendes Einsatzgebiet der Native MS ist auch die integrative Strukturanalyse von (Membran-)Proteinkomplexen im Verbund mit der Kryo-Elektronenmikroskopie, chemischer Quervernetzung und molekularer Modellierung [10.1073/pnas.2009502117]. Zukunftsweisende technische Entwicklungen der Native MS umfassen den Einsatz von hochauflösenden Orbitrap Massenanalysatoren [10.1038/nmeth.2208] sowie die Kopplung mit Ionenmobilitäts-Spektrometrie, bei der Moleküle entsprechend ihrer äußeren Konformation vor der Massenanalyse getrennt werden [10.1016/j.cbpa.2017.10.026].

Daniel Wendscheck, Friedel Drepper und
Bettina Warscheid
Biochemie und Funktionelle Proteomik,
Fakultät für Biologie, Universität Freiburg
<https://www.proteomics.uni-freiburg.de>