

Proteinanalyse mittels RP-HPLC/MS-Kopplung

Evaluierung kommerzieller Reversed-Phase-Säulen

Analyse von mehreren tausend Proteinen in einer komplexen biologischen Probe ist eine große Herausforderung. Die zu diesem Zweck häufig eingesetzte 2D-Gelelektrophorese ist manuell aufwendig und von den Möglichkeiten limitiert. Bessere Selektivität und gute Nachweisgrenzen bietet hingegen der Einsatz von 2D-HPLC basierend auf Ionenaustausch- und Reversed-Phase-Chromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie. Für den Routineeinsatz werden daher stabile und effiziente Trennsäulen benötigt.



Prof. Dr. Eckhard Reh,
Leiter des ZPA



Dipl.-Ing. (FH) Bettina Hahn
Mitarbeiterin im ZPA

Proteomanalyse mittels zweidimensionaler LC/MS-Kopplung

Die Trennung komplexer Proteinmischungen in biologischen Matrices stellt in vielerlei Hinsicht hohe Anforderungen an das Analyseverfahren. Hauptschwierigkeiten bereiten dabei oft die Separierung relevanter Proteine von vielen tausend Begleitkomponenten, die Differenzierung seltener Proteine von Hauptbestandteilen wie Serum-Albumin oder Immunglobulinen sowie die erforderlichen Nachweisgrenzen für die Quantifizierung physiologisch wichtiger Proteine, die nur in Spuren vorhanden sind, z.B. Tumormarker in menschlichem Blutserum. Besonders die zweidimensionale Flüssigkeitschromatographie (2D-HPLC) gekoppelt mit der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) ist ein modernes Analyseverfahren mit hoher Selektivität und niedrigen Nachweisgrenzen [1–3]. Dabei wird der Proteinmix zuerst nach Ladung und in der zweiten Dimension über hydrophobe Wechselwirkungen mit der stationären Phase aufgetrennt. Die eluierenden Proteine werden massenspektrometrisch analysiert und identifiziert (LC/MS).

Die zweite Dimension

Reversed-Phase-Chromatographie (RPC) basierend auf mit Trifluoressigsäure versetzten Wasser/Acetonitril-Eluenten wird erfolgreich zur Trennung von Peptiden und kleinen Proteinen eingesetzt, ist aber für große Proteine aufgrund der mangelhaften Reproduzierbarkeit bislang problematisch [4, 5].

In den letzten Jahren kamen zahlreiche neue RP-Säulen auf den Markt, die sich hinsichtlich Porengröße, Partikeldurchmesser, Alkylkettenlänge, Oberfläche, Kohlenstoffgehalt und chemischer Bindung unterscheiden (Tab. 1).

Wiederfindung

Mangelnde Wiederfindung in einem RP-Chromatogramm ist vielfach auf Proteindenaturierung beim Passieren der hydrophoben Stationärphase zurückzuführen. Durch Sorption an

Säule	Oberfläche [m ² /g]	Porendurchmesser [nm]	C-Gehalt [%]	Alkylkette	End-capping
Zorbax	45	30	2,8	C18	nein
Gemini	375	11	14	C18	ja
BioWidepore	100	30	3,5	C5	ja
218TP	85	30	8	C18	ja
238Everest	90	30	6	C18	ja
Chromolith	300	-	11	C8	ja
Jupiter	170	30	14	C18	ja
Micra	3	-	ca. 0,8	C18	nein
Poroshell	4,5	30	n.a.	C18	nein

Tab. 1: Parameter von RP-Säulen. Wichtige Aspekte sind die porenfreie Micra- und die Poroshell-Säule mit poröser Schicht auf nichtporösem Kern (minimale Oberfläche). Die Gemini-Säule zeichnet sich durch eine Polymerbeschichtung zusätzlich zu den Alkylketten aus, Zorbax- und Poroshell-Phase weisen eine spezielle Mehrfachbindung der Silanisierung auf. Hervorzuheben ist auch die monolithische Chromolith-Säule mit ihren Nanoporen.

Mit Hilfe von zehn verschiedenen Proteinen wurden einige der gegenwärtig gebräuchlichsten RP-Säulen anhand der Prüfparameter Wiederfindung, Carry Over, Peak-symmetrie und Selektivität beurteilt [7].

Folgende Säulen wurden getestet: Zorbax 300 SBC18, Agilent; Poroshell 300 SBC18, Agilent; Gemini bzw. Jupiter 300, Phenomenex; Bio-Widepore C5, Supelco; Micra ODS1, Bischoff; 218TP5205, Grace-Vydac; 238Everest5205, Grace-Vydac; Chromolith Performance C8, Merck.

aktiven Restsilanolgruppen bleibt das Protein im ungünstigsten Fall irreversibel an der Säulenoberfläche gebunden. Bezüglich der Anzahl der eluierten Peaks zeigen die getesteten Säulen deutliche Unterschiede. Die schlechtesten Wiederfindungen finden sich bei der Gemini-, 218TP-, 238Everest- und Micra-Säule, die nur sieben bis neun der jeweils zehn injizierten Proteine eluierten (Abb. 1). Die absolute Wiederfindung wurde ermittelt, indem die Konzentrationen der einmal mit und einmal ohne Trennsäule eluierten Proteine mittels

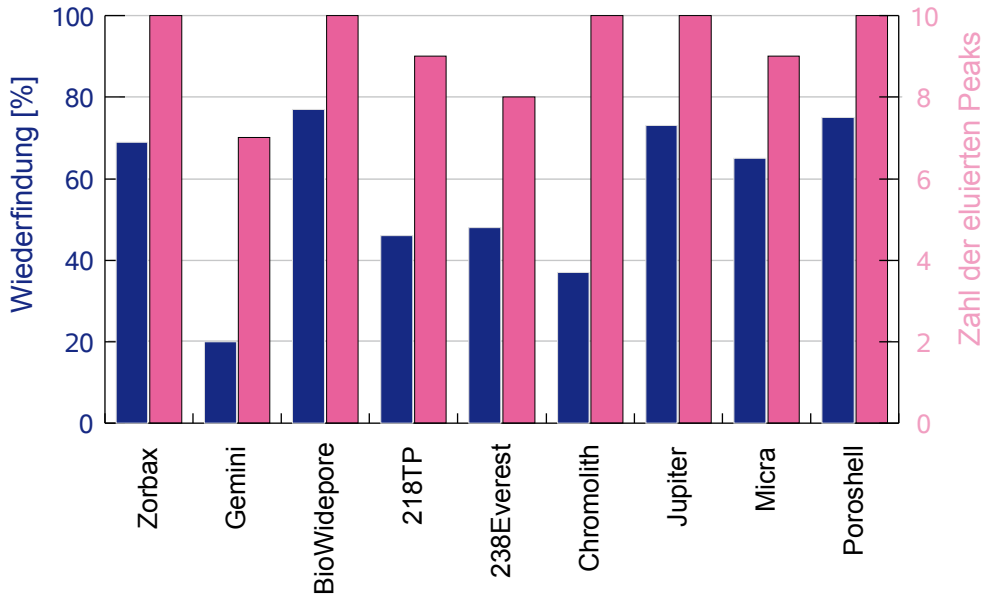


Abb. 1: Mittlere absolute Massenwiederfindung und Zahl der eluierten Proteine untersucht an unterschiedlichen RP-Phasen

Aminosäure-Analyse gemessen wurden. Manche Phasen wie die BioWidopore, Jupiter und Poroshell zeigen recht akzeptable Wiederfindungen von mehr als 90 % für die meisten injizierten Proteine. Glycosylierte Proteine werden dabei generell etwas schlechter eluiert. Bedenklich ist, dass einige Stationärphasen nur verminderte Wiederfindung kleiner 50 % erzielten (Chromolith-, 218TP-, 238Everest- Säule).

Die „falsche“ Säule zu benutzen kann im ungünstigsten Fall zu einer Wiederfindung unter 20% führen (Gemini, Abb. 1). Dies kann für eine validierte chromatographische Aussage nicht akzeptiert werden. Eine Korrelation der Wiederfindung mit Alkylkettenlänge, Oberfläche oder Porengröße konnte nicht nachgewiesen werden. Auch die Verwendung endcappedter Säulen, bei denen die freien Silanolgruppen chemisch abgedeckt sind, scheint nicht die entscheidende Rolle zu spielen. Wahrscheinlich ist diese eher in der optimalen chemischen Bindung der Alkylreste an die Kieselgeloberfläche zu suchen.

Carry Over

Probleme mit der Wiederfindung von Proteinen gehen häufig einher mit dem als Carry Over bezeichneten Effekt der Verschleppung eines eluierten Proteins ins nachfolgende Chromatogramm. Bei einigen Säulen (Gemini, BioWidopore, 218TP) wurde beobachtet, dass in der Folge zweier Injektionen derselben Probe

der Proteinpeak im zweiten Chromatogramm um 40–50 % größer als im ersten war. Häufig zeigt Rinderserum-Albumin diesen unerwünschten Effekt und kann daher leicht als Marker für Carry Over-Probleme verwendet werden. Es ist bekannt, dass die Verschleppung von Analytmolekülen, die vor allem bei neuen RP-Säulen auftritt, durch wiederholte Injektion einer komplexen Proteinprobe verbessert werden kann. Die Proteine bleiben an den Restsilanolgruppen hängen und belegen diese störenden aktiven Zentren möglicherweise auf Dauer. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass der aus der Verwendung von Stationärphasen mit kleiner Partikelgröße (1,4 µm) resultierende hohe Druck bei kleinen Proteinen ebenfalls zu reduziertem Carry Over führen kann [6].

Peaksymmetrie

Proteine eluieren aus RP-Säulen häufig als breite asymmetrische Peaks. Vielfach ist dies auf starke Wechselwirkungen mit aktiven Zentren der stationären Phase zurückzuführen, wodurch die Trennleistung für komplexe Proteinproben erheblich verringert werden kann.

Interessanterweise wurden die asymmetrischsten Peaks bei Phasen mit minimaler Oberfläche detektiert (Micra, Poroshell) während sich Phasen mit gleicher chemischer C18-Bindung (Zorbax, Poroshell) in den Peak-

symmetrien deutlich unterschieden. Die besten Symmetriewerte nahe 1 wurden mit der Zorbax-, BioWidopore- und Chromolith-Säule erreicht, wohingegen die Gemini-, Micra- und Poroshell-Säule mit Werten unter 0.5 nicht überzeugen konnten.

Selektivität

Die Trennung von Proteinisomeren, deren Strukturen nur geringfügig unterschiedlich sind, bleibt bislang eine Herausforderung. Eine besondere Stellung nehmen dabei glycosylierte Proteine ein, die sich allein in der Art der angehängten Zuckermoleküle unterscheiden. Die Trennfähigkeit eines chromatographischen Systems hängt in besonderem Maß von der verwendeten Stationärphase ab. Für die Trennung von Kreatinkinase, Glycerinkinase und zwei β-Lactoglobulin-Isomeren erwiesen sich die Zorbax- und BioWidopore-Säule als besonders selektiv. Die Jupiter- und Zorbax-Säule zeigten gute Trenneffizienz für Glykoproteine wie Fetuin und monoklonale Antikörper (Abb. 2).

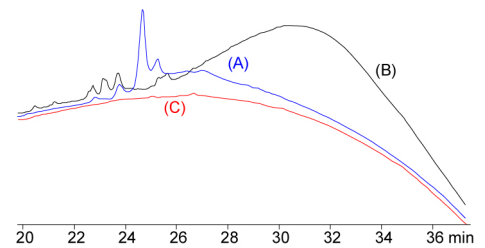


Abb. 2: Elution glycosylierter Proteine (A) Fetuin mit Jupiter-, (B) monoklonaler Antikörper mit Zorbax-Säule und (C) Leergradient

Ausblick

Die Kopplung von zweidimensionaler Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie ist eine zukunftsweisende Methode zur Trennung, Charakterisierung und Identifizierung von komplexen Proteinmischungen. In einer weiteren Studie wurde damit begonnen, verschiedene Ionenaustauschersäulen zu charakterisieren.

Zukünftige Untersuchungen im Arbeitskreis des ZENTRUMS PROTEIN-ANALYSE (ZPA) werden sich verstärkt auf die Quantifizierung von Biomarkern in biologischen Systemen konzentrieren.

Das Potential der LC/MS ist beispielhaft an Hand der Untersuchung von RNase B verdeutlicht (Abb. 3). Da das ZPA als Kooperationspartner für Interessenten aus der Pharma-, Lebensmittel- und Biotechnologiebranche die Durchführung analytischer Aufgabenstellungen anbietet, kann dieses Knowhow auch von externen Arbeitsgruppen genutzt werden.

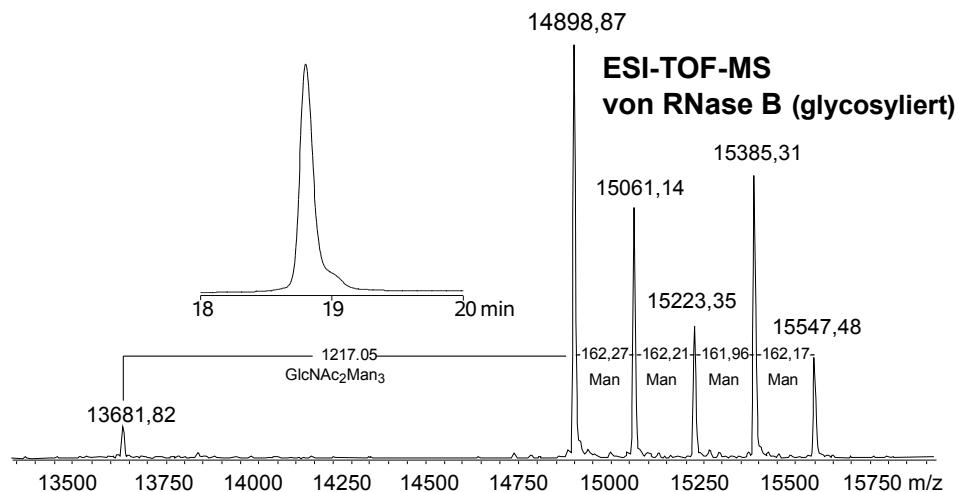


Abb. 3: Darstellung der Chromatographie und Massenspektrometrie von RNase B. Während eine Differenzierung der Glykoformen chromatographisch nicht möglich ist, zeigt die Massenspektrometrie die Heterogenität der Zuckerstrukturen. Die MS-Signale entsprechen den Massen von unglykosylierter RNase A (13681,82), RNase A plus Zuckergrundgerüst (14898,87) und Verlängerungen um jeweils eine Mannose (15061,14 bis 15547,48).

Literatur

- [1] G.J. Opiteck, J.W. Jorgenson, M.A.Moseley, R.J. Anderegg, J. Microcolumn. Sep. 10 (1998) 365-375
- [2] R. Xiang, Y. Shi, D.A. Dillon, B. Negin, C. Horvath, J.A. Wilkins, J. Proteome Res. 3 (2004) 1278-83
- [3] N.G. Coldham, M.J. Woodward, J. Proteome Res. 3 (2004) 595-603
- [4] E. Reh, U. Kapfer, Chromatographia 30 (1990) 663-674,
- [5] R.D. Ricker, L.A. Sandoval, B.J. Permar, B.E. Boyes, J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1995) 93-105
- [6] J. W. Eschelbach, J.W. Jorgenson, Anal. Chem. 78 (2006) 1697-1706
- [7] E. Reh, B. Hahn, S. Lamotte, J. Chromatogr. B, 844/2 (2006) 204-212

Kontakt

Dipl.-Ing. (FH) Bettina Hahn; Prof. Dr. Eckhard Reh; Fachhochschule Bingen; ZENTRUM PROTEINANALYSE; 55411 Bingen
 b.hahn@fh-bingen.de; reh@fh-bingen.de