

Identifikation und Lokalisierung von β -Asp Modifikationen in Peptiden

Frederick Schützeberg

Bachelor-Thesis, Molecular Life Sciences, Chemie

Auftraggeber: Dr. Adrien Nyakas, Bachem AG
Experte: Dr. Markus Ehrat, EK Biosciences
Begleitdozent: Prof. Dr. Götz Schlotterbeck, Hochschule für Life Sciences FHNW

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit konnte mit dem Q-TOF Massenspektrometer und vorgeschalteter U(H)PLC der Bachem AG eine Identifizierung von β -Asp modifizierten Peptiden untersucht werden. Die dabei ausgearbeitete Methodik, basierend auf Arbeiten von Lehmann et al.[1], konnte erfolgreich eingesetzt werden. Das Intensitätsverhältnis der Immoniumionen m/z 88/84 wies für β -Asp modifizierte Peptide, im Vergleich zu unmodifizierten Peptiden, deutliche Unterschiede auf. Beim Vergleich der beiden Immoniumionenverhältnisse konnten β -Asp Strukturisomere, mit nur einer Asparaginsäure in der AS-Sequenz, ab einem Immoniumionenverhältnis von grösser drei eindeutig von der Asp Form unterschieden werden.

EINLEITUNG

Peptide sind Substanzen, die aus mehreren miteinander verbundenen Aminosäuren bestehen. Die Verwendung von Peptiden im Bereich der Pharmazie oder auch der kosmetischen Industrie hat sich in den vergangenen Jahren deutlich erhöht.[2] Da diese Substanzklasse in sehr viele biochemische Prozesse involviert ist, sind die industrielle Produktion und die Erforschung weiterer Peptide für die kommerzielle Nutzung von grossem Interesse.[3]

Die Reinheit und Qualität dieser Peptide hat daher eine hohe Bedeutung. In diesem Zusammenhang ist die Isomerisierung von Asparaginsäure (Asp) zu β -Asparaginsäure (β -Asp) als Abbauprodukt von besonderem Interesse. Diese Isomere lassen sich nicht über eine Massenverschiebung differenzieren. Es können aber, aufgrund der strukturellen Unterschiede, verschieden intensive Massensignale mittels Tandem-Massenspektrometrie induziert werden. Über die Intensitätsverhältnisse von Signalen soll eine Identifikation von β -Asp Peptiden getestet werden.

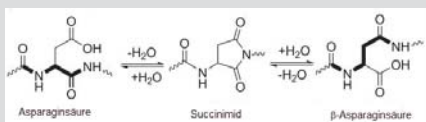


Abb. 1: Isomerisierung von Asp zu β -Asp [4]

RESULTATE

Bei der entwickelten MS-Methode per Direktinfusion wurde ein Ionenverhältnis über das Immoniumion der Asparaginsäure mit m/z 88 zu einem Immoniumion-verwandten Fragment mit m/z 84 gebildet. Dabei waren die Intensitäten des Immoniums m/z 88 von β -Asp Peptiden stets kleiner als die Intensitäten der nativen Asp Peptide. Durch den Vergleich der beiden Immoniumionenverhältnisse konnte eine Unterscheidung von Asp Peptid zu β -Asp Peptid getroffen werden. Es wurden Kollisionsenergien von 70 eV bis 200 eV gescannt. Durch dieses Vorgehen wurde das Maximum an möglicher Unterscheidungsfähigkeit des Asp-haltigen und β -Asp-haltigen Peptids festgelegt. Es wurde festgelegt, dass ab einem Verhältnis Asp/ β -Asp von drei die Unterscheidung eindeutig ist.

Differenzierbarkeit von Asp Peptid vs. β -Asp Peptid

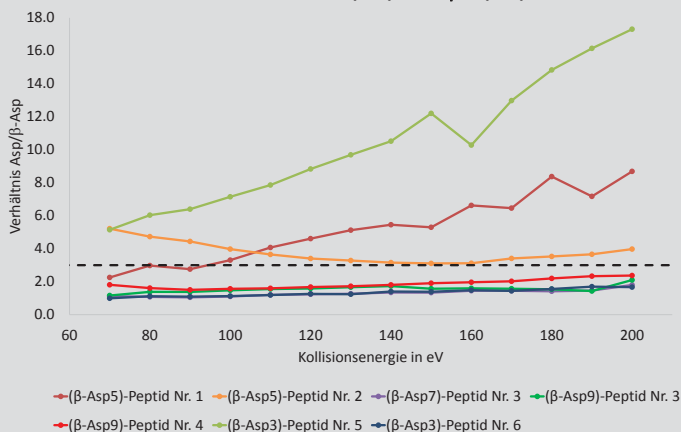


Abb. 2 Differenzierbarkeit von sieben Peptidpaarungen über die Unterscheidung der Immoniumionenverhältnisse, schwarz gestrichelt dargestellt ist der Grenzwert von 3.0

Bei der LC-Methodenentwicklung wurde festgestellt, dass bei den untersuchten Peptiden, das β -Asp Peptid vor dem nativen Peptid eluierte. Beim Peptid Nr. 1 wurde ein Retentionszeitunterschied von etwa 4 min beobachtet. Die Elution einer isomeren Verunreinigung vor dem Hauptpeak kann somit auch ein Anhaltspunkt für eine β -Asp Modifikation sein.

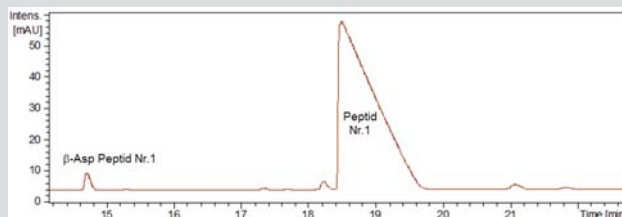


Abb. 3 Chromatogramm des Peptids Nr. 1 mit 1% β -Asp Peptid Nr. 1 Spike

Die erfolgreiche Unterscheidung per Direktinfusion für die Peptide Nr. 1 und Nr. 2, konnte mittels LC-MS/MS reproduziert werden.

Identifikation β -Asp Peptid mit LC-MS/MS

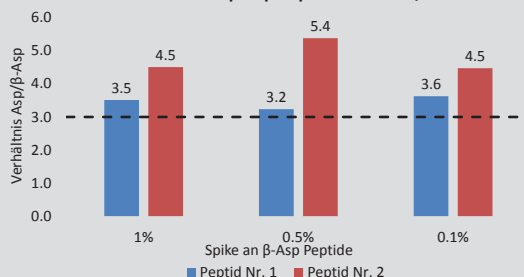


Abb.4 Identifikation von β -Asp Peptid in verschiedenen Spiking-Levels

SCHLUSSFOLGERUNG

Durch die LC-MS/MS Analysen von Peptide Nr. 1 und Nr. 2 war es möglich, simulierte Verunreinigungslevel mit Konzentrationen von 0.1%, 0.5% und 1.0% Spike an β -Asp Peptid erfolgreich nachzuweisen (Abb. 4). Hierbei konnte durch den Nachweis über die Immoniumionen eine eindeutige Unterscheidung getroffen werden, da der Unterschied der Intensitätsverhältnisse von nativen Peptid zum β -Asp Peptid stets grösser als der Grenzwert von drei war. Durch die Methodik über das Immoniumion ist kein falsch positives Resultat möglich, da das native Peptid stets eine grössere Intensität an Markersignal (m/z 88) aufweist als das β -Asp Peptid. Jedoch gelingt dadurch der Nachweis bei teilweiser Koelution der Peaks nur, solange über ausreichend nicht interferierte Datenpunkte vom β -Asp Peptid gemittelt werden kann. Ansonsten würde das Verhältnis dieser beiden Intensitäten stets kleiner werden. Bei einem Peptid mit zwei Asp erhöht der noch vorhandene Asp Rest die Intensität des Markersignals so stark, sodass der Einfluss einer einzelnen β -Asp Modifikation auf das gesamte Immoniumionenverhältnis vernachlässigbar wird. Dadurch ist der Nachweis über die Immoniumionen auf Peptide mit einer Asparaginsäure limitiert.

REFERENZEN

- [1] Lehmann, W. D. , Schlosser, A. , Erben, G. , Pipkorn, R. , Bossemeyer, D. , and Kinzel, V. Analysis of isoaspartate in peptides by electrospray tandem mass spectrometry. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* **2000**, 9, 2260–2268.
- [2] Lupo, M. P. Cosmeceutical peptides. *Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et Al.]* **2005**, 31, 832–836; discussion 836.
- [3] Sewald, N. and Jakubke, H.-D. Peptides: Chemistry and Biology. **2015**.
- [4] Ni, W. , Dai, S. , Karger, B. L. , and Zhou, Z. S. Analysis of isoaspartic Acid by selective proteolysis with Asp-N and electron transfer dissociation mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2010**, 82, 7485–7491.