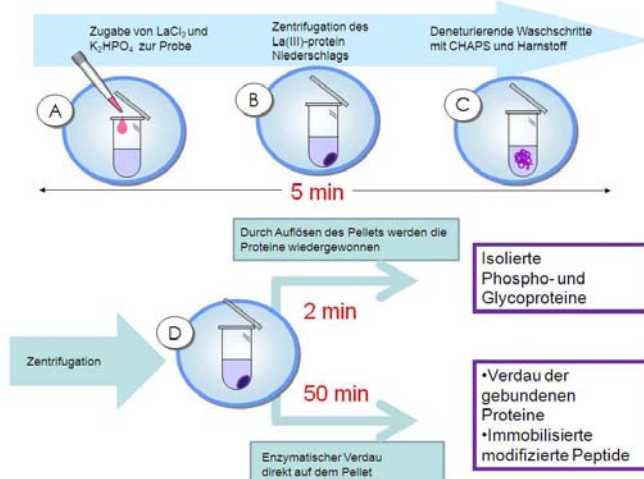


# Lanthan (III) Fällung – Eine neue hoch effiziente Methode für die Analyse von Phospho- und Glycoproteine

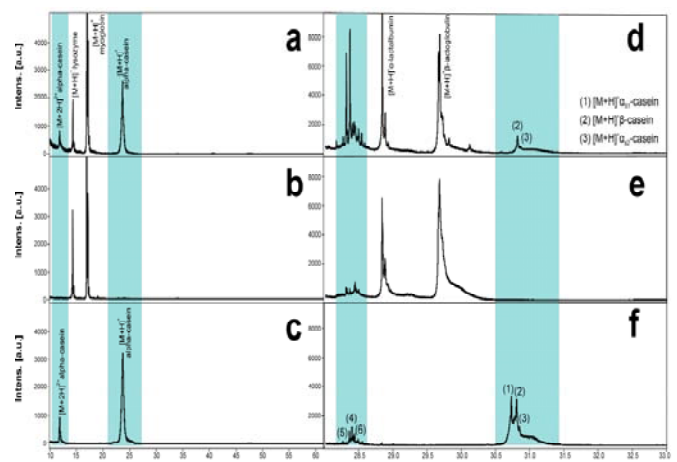
Fabio Polato, Matthias Rainer, Thomas Ringer, Rania Bakry, Johan Gobom, Henrik Zetterberg, Kai Blennow, Christian W. Huck & Günther K. Bonn\*

Das sehr kleine Löslichkeitsprodukt von Lanthanphosphat ( $3.7 \times 10^{-23} \text{ kmol}^2/\text{m}^6$ ) und die hohe Affinität von  $\text{La}^{3+}$  zu Kohlenhydraten wurden auf die Analyse von Phospho- und Glycoproteine übertragen. Durch die entwickelte, hoch selektive und leicht reproduzierbare Methode ist es möglich, innerhalb von zehn Minuten gleichzeitig phosphorylierte und glycosilierte Proteine durch  $\text{La}^{3+}$  zu fällen, isolieren und eine massenspektrometrische oder gelelektrophoretische Analyse durchzuführen. Die Methode wurde mit verschiedenen biologischen Proben (z.B. HeLa Zellysat, Frischmilch und menschlicher Liquor cerebrospinalis) evaluiert und unsere Ergebnisse (im Liquor konnten mit einer einzigen Analyse gleichzeitig 16, in der Literatur als potentielle Biomarker für Alzheimer bekannte, Proteine identifiziert werden) qualifizieren diese Methode als ein neues Werkzeug in die immer wichtiger werdende „top down“ Proteinanalytik. Die gebundenen Proteine können alternativ auch direkt auf dem gewonnenen Pellet mittels Mikrowelle tryptisch verdaut werden und den üblichen „bottom up“ Analysen unterzogen werden. Die nach dem Verdau auf dem Pellet noch gebundene Phosphopeptide können ebenfalls wiedergewonnen werden und die Phosphorylierungsstellen analysiert werden. Neben der einfachen und zeitsparenden Probenvorbereitung, hat diese Methode den Vorteil, dass keine stationäre Phase verwendet wird. Dadurch werden unspezifische Bindungen vermieden und eine hohe Selektivität gewährleistet. Diese wird dadurch erhöht, dass die hohe Stabilität des Lanthan – Phosphoprotein Komplexes sehr intensive, denaturierende Waschschrte erlaubt und somit Protein – Protein Interaktionen mit nicht phosphorylierte Proteinen unterbunden werden können.

Die Proteine werden wie folgt isoliert: zur Probe wird eine  $\text{La}^{3+}$ - Lösung und um das Volumen des Niederschlags zu erhöhen eine  $\text{HPO}_4^{2-}$  - Lösung zugegeben. Der gebildete Niederschlag wird abzentrifugiert und das erhaltene Pellet denaturierend gewaschen. Es folgen dann noch drei Waschschrte mit deionisiertem Wasser. Das Volumen der Waschlösungen sollte 6x das Volumen der Ausgangsprobe haben. Um die intakten Proteine wiederzugewinnen wird das Pellet mit  $\text{H}_3\text{PO}_4$  aufgelöst. Weiter können die gebundenen Proteine wie bereits erwähnt verdaut werden und die folglich noch auf dem Pellet gebundenen Phosphopeptide ebenfalls durch auflösen des Pellets wiedergewonnen und analysiert werden.



Schematischer Überblick der entwickelten Methode für die simultane Analyse von Glycoproteine und Phosphoproteine. Die Methode ermöglicht die Isolierung der Proteine in weniger als zehn Minuten und die Analyse des Mikrowellen - Verdau in überschaubare 50 Minuten.



MALDI-ToF Spektren beweisen die hohe Selektivität der Methode durch den Vergleich einer Proteinmischung bevor (a), nach der Fällung (b) und nach dem Auflösen des Pellets (c). Die Mischung enthält Lysozym, Myoglobin, BSA (je  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und  $\alpha$ -Casein ( $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).  $\alpha$ -Casein wurde nach der Isolierung mit derselben Intensität detektiert. Dasselbe Experiment wurde mit Frischmilch wiederholt. MALDI-ToF Spektren der Milch bevor (d) und nach der Fällung (e). Das Spektrum des Überstandes (e) zeigt erneut die hohe Selektivität der Methode, da kein Casein detektiert werden konnte. Die wiedergewonnen  $\alpha_{s1}$ -Casein  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (1) und  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  (4);  $\beta$ -Casein  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (2) and  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  (5);  $\alpha_{s2}$ -Casein  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (3) and  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  (6) konnten ohne Interferenzen von anderen Proteinen gemessen werden, was die erhöhte Intensität erklärt (f).