

# Untersuchung von 18 MDa großen Viruspartikeln mit nativer Massenspektrometrie\*\*

Joost Snijder, Rebecca J. Rose, David Veesler, John E. Johnson und Albert J. R. Heck\*

Seit John Fenns Nobelpreisvortrag („Molekulare Elefanten lernen das Fliegen“)<sup>[1]</sup> hat sich die native Massenspektrometrie (MS) zu einer leistungsstarken Analysemethode zur Untersuchung großer, nichtkovalent gebundener Proteinkomplexe entwickelt.<sup>[2]</sup> Durch sanfte Nanoelektrosprayionisation (nESI) können solche Proteinkomplexe intakt, d.h. ohne signifikante Verluste der Quartär- oder Tertiärstruktur in die Gasphase transferiert werden. Geringfügige Modifizierungen an kommerziell verfügbaren MS-Geräten<sup>[3]</sup> können die Transmission von großen Ionen enorm verbessern und so die exakte und präzise Massenanalyse von intakten Proteinkomplexen ermöglichen. Die Stöchiometrie von Proteinkomplexen kann auf diese Weise direkt mittels nativer MS bestimmt werden. Die Untersuchung der Dissoziation von Proteinkomplexen in flüssigen und gasförmigen Zuständen zusammen mit dem Einsatz von MS in Kombination mit Ionenbeweglichkeitsmessungen liefert wertvolle Informationen über die Stabilität und Topologie der Komplexe.<sup>[4]</sup>

Native MS wurde bereits zur Untersuchung von intakten Viren und Viruskapsiden eingesetzt.<sup>[5]</sup> Neben ihrer Rolle in der viralen Pathogenese sind Kapside in der Nanotechnologie und Medizin durch ihre mögliche Verwendung als Nanocontainer und Nanoreaktoren sowie als Assemblierungsgerüste von Interesse.<sup>[6]</sup> Native MS ermöglichte bereits die Untersuchung von intakten Viruskapsiden zur Quantifizierung von (nichtnativer) Frachteinkapselung und der Kapsid-Assemblierung.<sup>[7]</sup> Frühere Studien konzentrierten sich hauptsächlich auf kleinere Kapside (bis zu 10 MDa) mit Caspar-Klug-Triangulationsnummern  $T=1, 3$  und  $4$ . 10 MDa große Norovirus-Kapside wurden mittels MS detektiert, ihre exakte Masse konnte wegen des nicht ausreichenden Auflösungsvermögen einzelner Ladungszustände aber nicht bestimmt werden.<sup>[7b]</sup> Spektren mit einem zur Auf trennung aufeinanderfolgender Ladungszustände ausreichenden Auflösungs-

vermögen waren bisher auf Partikel bis ca. 5 MDa beschränkt, was als oberes Massenlimit vermutet wurde.

Die meisten nativen MS-Studien werden mit Quadrupol-Flugzeit(Q-ToF)-Geräten durchgeführt, die bei höheren Drücken arbeiten, um die Transmission großer Moleküle zu ermöglichen. Das Q-ToF-Verfahren wird normalerweise wegen der in höheren  $m/z$ -Bereichen überlegenen Empfindlichkeit des ToF-Massenanalysators gewählt. Obwohl ToF-Massenanalysatoren kein theoretisches oberes Massenlimit aufweisen, ist es nicht trivial, Spektren guter Qualität von Molekülen im MDa-Bereich zu erzielen.

Wir beschreiben hier die Verwendung eines modifizierten Q-ToF-Instrument zur Analyse von intakten 18 MDa großen Kapsiden des Bakteriophagen HK97. HK97 ist ein wichtiges Modellsystem zur Untersuchung der Assemblierung und Reifung von Bakteriophagen.<sup>[8]</sup> Das Kapsid mit  $T=7$  assembliert *in vitro* aus einer Mischung von pentameren und hexameren Kapsomeren (zusammengesetzt aus dem Kapsidprotein gp5) sowie der viralen Protease gp4, wobei zunächst ein ikosaedrischer, Prohead-1 genannter Übergangszustand gebildet wird. Durch die Assemblierung werden die verkapselten Protease-Moleküle aktiviert und initiieren so den Reifungsprozess, der über einen gequellten Übergangszustand zum reife Kapsid führt (Abbildung 1a).<sup>[9]</sup> Die Überexpression des Kapsidproteins in Abwesenheit der viralen Protease führt zur Bildung eines nahezu identischen ikosaedrischen Partikels, das in der Prohead-1-Phase verharrt (Prohead-1<sup>gp5</sup>).<sup>[10]</sup> Hier berichten wir über die Analyse von Prohead-1<sup>gp5</sup> sowie der freien Kapsomere (die beim Zerfall bei hohen pH-Werten entstehen) mittels nativer MS und zeigen zum ersten Mal für ein Partikel dieser Größe Massenspektren mit aufgelösten Ladungszuständen.

Abbildung 1 zeigt Massenspektren freier Kapsomere und des Prohead-1<sup>gp5</sup>-Partikels. Basierend auf dem MS-Signal beträgt der Anteil der Pentone innerhalb der Kapsomer-Mischung  $0.25 \pm 0.04$  (SD,  $n=3$ ) (Abbildung 1b), was etwas größer ist als erwartet, da das Kapsid aus 12 Pentonen und 60 Hexonen zusammengesetzt ist. Teilweise zerfallene Komplexe und freie Kapsidprotein-Monomere (gp5) waren ebenfalls im Spektrum sichtbar, wenn die Kapsomer-Mischung unter basischen Bedingungen analysiert wurde. Dadurch gelang die Bestimmung der exakten Masse eines Monomers zu  $42151 \pm 1$  Da (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Aus der Sequenz des exprimierten Kapsidproteins errechnet sich eine theoretische Masse von 42243 Da, was darauf hindeutet, dass das N-terminale Methionin enzymatisch geschnitten und der N-Terminus acetyliert wurde (entsprechend einer theoretischen Masse von 42154 Da). Die experimentell bestimmten Massen der pentameren und hexameren Kapsomere betragen  $210807 \pm 9$  Da bzw.  $252973 \pm 9$  Da, was dem

[\*] J. Snijder, Dr. R. J. Rose, Prof. Dr. A. J. R. Heck

Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences and Netherlands Proteomics Centre, Utrecht University Padualaan 8, 3584 CH, Utrecht (Niederlande)

E-Mail: a.j.r.heck@uu.nl

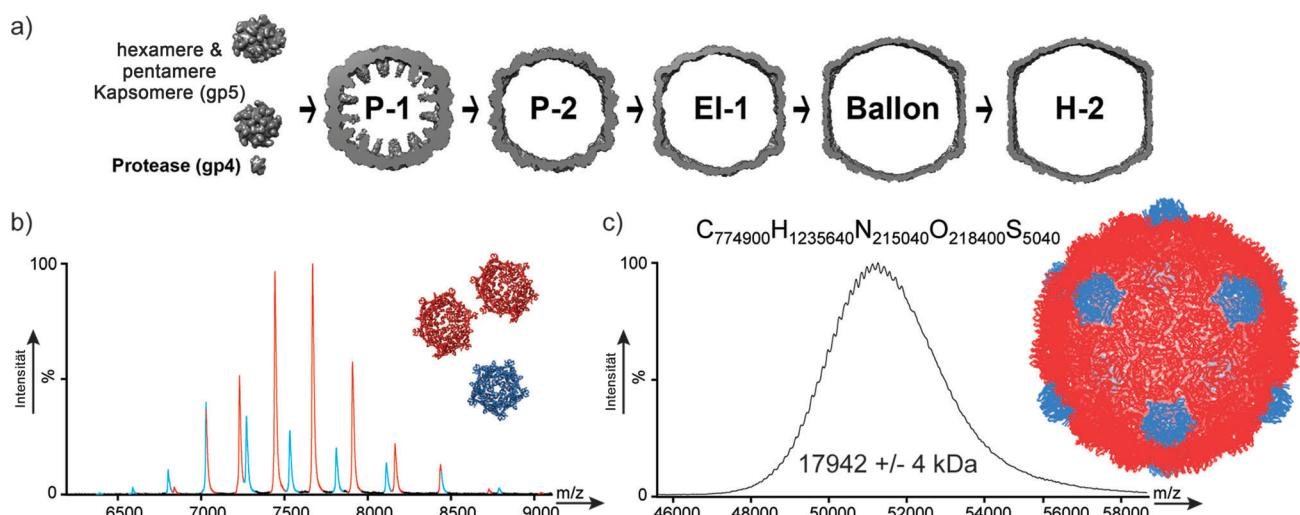
Homepage: <http://bioms.chem.uu.nl>

Dr. D. Veesler, Prof. Dr. J. E. Johnson

Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute La Jolla, CA 92037 (USA)

[\*\*] Dieses Projekt wurde durch die NIH (R01 AI040101) und ein FP7 Marie Curie IOF Fellowship (D.V.) unterstützt. Wir danken Christian K. Frese für die Übersetzung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201210197> zu finden.



**Abbildung 1.** Analyse der Assemblierung von HK97-Kapsiden mit nativer ESI-MS. a) Assemblierung und Reifung von HK97. b) Freie Kapsomere als Pentone (blau) oder Hexone (rot). c) Intaktes Prohead-I-Partikel. Eine gut aufgelöste Serie von Ladungszuständen ermöglicht die Berechnung der exakten Masse.

5.001- bzw. 6.002-fachen der experimentellen Masse eines Monomers entspricht. Prohead-1<sup>gp5</sup> besteht aus 420 gp5-Molekülen, und die prognostizierte Gesamtmasse liegt daher bei ungefähr 18 MDa. Wie in Abbildung 1c veranschaulicht, konnte das Partikel in unserem Massenspektrum trotz seiner massiven Größe detektiert werden. Die Transmission solch großer Partikel wurde durch Anpassung des Steering-Parameters, der den Eintrittswinkel des Ionenstrahls in die Pusher-Region des ToF-Analysators reguliert, um das Zweifache verbessert (Abbildung S2).

Die unzureichende Desolvatisierung großer Proteinkomplexe ist oftmals die Ursache einer schwachen Spektrenqualität. Um die Desolvatisierung zu verbessern und so einzelne Ladungszustände auflösen zu können, haben wir zunächst die Kollisionsenergie auf den an unserem Gerät maximal möglichen Wert eingestellt (400 V).<sup>[11]</sup> Dies war jedoch nicht ausreichend, um einzelne Ladungszustände in Ammoniumacetatpuffer von üblicher Ionenstärke (50–200 mM) aufzulösen. Durch den Einsatz eines Puffers mit geringerer Ionenstärke (12.5 mM) in Kombination mit der maximal möglichen Kollisionsenergie von 400 V und Xenon als Kollisionsgas wurde jedoch eine Serie von Ladungszuständen deutlich erkennbar (Abbildung 1c). Unter diesen Bedingungen erzielten wir eine Grundlinienintensität von ungefähr 10 Impulsen pro 2-sekündiger Aufnahme, sodass ungefähr 50 Minuten für ein Spektrum erforderlich waren.

Wie ursprünglich durch Fenn und Mann demonstriert wurde, können die Ladungszustände aus den  $m/z$ -Werten benachbarter Peaks bestimmt werden.<sup>[12]</sup> Dies ist trivial für kleinere Proteinkomplexe, jedoch wird die Zuordnung der Ladungszustände bei großen, schlecht desolvatisierten Komplexen zunehmend schwieriger. Die hier angewendete Strategie zur Bestimmung der Ladungszustände bestand darin, eine Serie von Ladungszuständen systematisch zu testen und diejenige Zuordnung zu bestimmen, die die geringstmögliche Varianz zur Gesamtmasse aufweist (Abbildung S3). Dies ist im Prinzip die gleiche Strategie, die in der kürzlich beschrie-

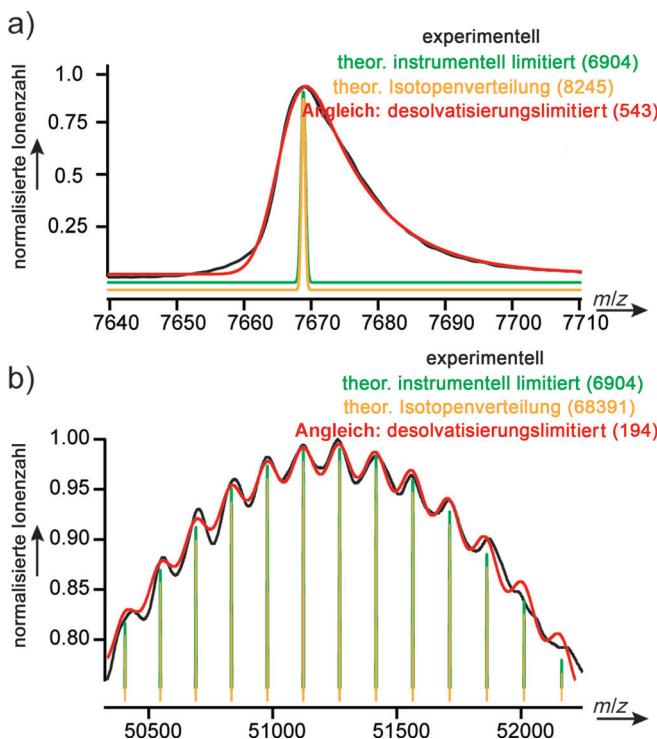
benen LeastMass-Software zum Einsatz kommt.<sup>[13]</sup> Die Vorgehensweise wurde für drei individuelle Messungen wiederholt, und die Zuordnungen der Ladungszustände wurde so auf Konsistenz hin geprüft. Diese Strategie zur Zuordnung der Ladungszustände ergab über drei Wiederholungen gemittelt eine durchschnittliche Masse von  $17942 \pm 4$  kDa. Dies entspricht einer Abweichung von +1.3 % zur theoretischen Masse des Prohead-1<sup>gp5</sup>-Moleküls. Wir schreiben diese Diskrepanz einer unvollständigen Desolvatisierung zu.

Das Ergebnis demonstriert, dass native MS zur Untersuchung größerer Systeme wie  $T=7$ -Kapsiden im Fall von HK97 eingesetzt werden kann. Dadurch eröffnen sich neue Möglichkeiten zum Studium verschiedener Kapsidstrukturen und ihrer Rolle als Pathogene und nanotechnologische Plattformen. Das Ergebnis bestätigt ebenfalls die Annahme, dass die Analyse von Proteinkomplexen mittels nativer MS auf einem Q-ToF-Instrument durch ein oberes Massenlimit begrenzt ist. Da die einzelnen Ladungszustände im Spektrum des Prohead-1<sup>gp5</sup>-Partikels gerade noch aufgelöst werden konnten, schätzen wir, dass das obere Massenlimit ungefähr 20 MDa beträgt. Um zu belegen, dass tatsächlich die Desolvatisierung und nicht etwa die eingesetzte Gerätehardware der limitierende Faktor bei der Analyse von Proteinkomplexen mittels nativer MS ist, haben wir die theoretische Peakbreite von Kapsomeren und Prohead-1<sup>gp5</sup> unter Berücksichtigung der inhärenten Isotopenverteilung des Konstrukts und des Auflösungsvermögen des Massenanalysators berechnet.

Die inhärente Breite eines Ladungszustandes in der  $m/z$ -Dimension ist proportional zur Breite der Isotopenverteilung und umgekehrt proportional zur Anzahl der Ladungen. Die Isotopenverteilung ist binomisch und skaliert daher mit der Quadratwurzel der Masse. Die Anzahl der Ladungen skaliert deshalb erwartungsgemäß mit der Quadratwurzel der Masse unter der Annahme des „Charge-Residue“-Modells der Elektrosprayionisation.<sup>[14]</sup> Wir zeigen hier jedoch, dass sie empirisch etwas stärker skaliert (Masse<sup>0.55</sup>), woraus folgt, dass die Peaks mit zunehmender Größe des Komplexes

schmäler werden (Abbildung S4). Das instrumentelle Auflösungsvermögen unseres Q-ToF-Geräts wurde aus der Peakbreite von einfach geladenen CsI-Clustern, die keine natürlichen Isotopenvarianten aufweisen, empirisch bestimmt (Abbildung S5). CsI-Cluster wurden mittels nESI generiert, und das daraus bestimmte Auflösungsvermögen der hier eingesetzten Q-ToF-Methode war mit einer Halbwertsbreite (FWHM) von 7000 über den gesamten  $m/z$ -Bereich nahezu konstant.

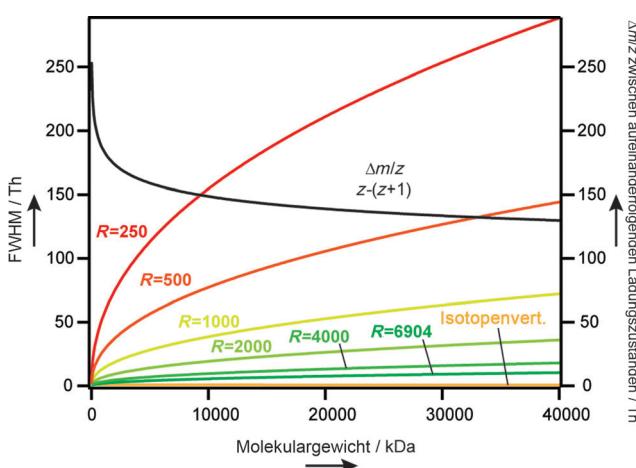
Wir verglichen die experimentell aufgenommenen Spektren der freien Kapsomere und Prohead-1<sup>g5</sup>-Moleküle mit der theoretischen Peakbreite, die sich entweder durch die natürliche Isotopenverteilung oder das instrumentelle Auflösungsvermögen definiert (Abbildung 2). Bei beiden Vergleichen fällt auf, dass sowohl Kapsomere als auch die Prohead-1<sup>g5</sup>-Moleküle deutlich breitere Peaks aufweisen als auf Basis des instrumentellen Auflösungsvermögen oder der natürlichen Isotopenverteilung berechnet wird. Weiterhin sind die Peaks der Kapsomere eindeutig asymmetrisch, was vermutlich durch die überlagerten binomischen Verteilungen der Puffer- und Salzaddukte verursacht wird. Das experimentelle Auflösungsvermögen, ausgedrückt als Masse-Ladungs-Verhältnis dividiert durch die Peakbreite, wurde für Kapsomere



**Abbildung 2.** Unvollständige Desolvatisierung ist der limitierende Faktor bei der Erzielung möglichst schmaler Peakbreiten von Proteinkomplexen mittels nativer MS. Vergleich von experimentell erhaltenen Peaks von a) Hexonen und b) Prohead-1<sup>g5</sup> mit theoretischen Peaks, die basierend auf dem instrumentellen Auflösungsvermögen oder der natürlichen Isotopenverteilung berechnet wurden. Die „desolvatisierungslimitierten“ Kurven wurden simuliert und an die experimentell erhaltenen Daten angeglichen ( $m/z$ -Werte der Peaks wurden auf Basis der experimentell bestimmten Masse festgelegt; die Peakbreite wurde dem Signal entsprechend angeglichen). Die Zahlen in Klammern bezeichnen das effektive Auflösungsvermögen (FWHM).

und Prohead-1<sup>g5</sup> auf ungefähr 500 bzw. 200 bestimmt. Der Unterschied im Auflösungsvermögen zwischen diesen beiden Konstrukten zeigt, dass die Effizienz der Desolvatisierung mit zunehmender Komplexgröße abnimmt.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass native MS von einer effizienteren Desolvatisierung profitieren würde. Das effektive instrumentelle Auflösungsvermögen könnte damit gesteigert werden, und praktische obere Massenlimits, mit Ausnahme von transmissions- und detektionsbedingten Limitierungen, ließen sich aufheben (wir vertreten daher die Auffassung, dass das überlegene Auflösungsvermögen des kürzlich für native MS adaptierten Orbitrap-Exactive-Systems hauptsächlich einer effizienteren Desolvatisierung zuzuschreiben ist).<sup>[15]</sup> Dies ist in Abbildung 3 illustriert, in der wir die erwartete Auftrennung zwischen aufeinanderfolgenden Ladungszuständen (ausgehend vom empirischen Ladungsverhalten von Proteinkomplexen) berechnet und mit



**Abbildung 3.** Theoretisches oberes Massenlimit bei nativer MS von Proteinkomplexen als Funktion des effektiven Auflösungsvermögen. Gezeigt wird die Auftrennung zwischen aufeinanderfolgenden Ladungszuständen (schwarze Linie, rechte y-Achse) und der berechneten Peakbreite als Funktion des Molekulargewichts (farbliche Linien, linke y-Achse).

der Peakbreite bei zunehmend effektivem Auflösungsvermögen (FWHM) verglichen. Der Schnittpunkt dieser zwei Kurven entspricht dem Punkt, an dem aufeinanderfolgende Ladungszustände bei FWHM aufgelöst sind. Die aus den Isotopenverteilungen bestimmte Peakbreite ist immer kleiner als die Auftrennung zwischen aufeinanderfolgenden Ladungszuständen. Daraus folgt, dass nESI der Analyse von Proteinkomplexen mit Ladungszustandsauflösung mittels nativer MS kein inhärentes, oberes Massenlimit auferlegt. Das instrumentelle Auflösungsvermögen ist ebenfalls kein limitierender Faktor. Selbst bei einem moderaten Auflösungsvermögen von 7000, wie bei dem hier eingesetzten modifizierten Q-ToF-Instrument der Fall, liegt der Punkt, an dem Peakauftrennung und Peakbreite überlappen, bei ungefähr 40 GDa. Aufgrund der Abnahme des effektiven Auflösungsvermögens durch die unvollständige Desolvatisierung der Spezies reduziert sich das Limit vom GDa- in den MDa-Bereich.

Zusammenfassend haben wir demonstriert, wie native MS auf einem Q-ToF-Instrument zur Untersuchung von bis zu 20 MDa großen Proteinkomplexen mit Ladungszustandsauflösung verwendet werden kann. Die Methode wurde verwendet, um den ersten Übergangszustand bei der Assemblierung des Bakteriophagen HK97 (Prohead-1) zu charakterisieren. Die Ergebnisse zeigen das Potenzial nativer MS zur weiteren Erforschung der Assemblierung und Reifung von Bakteriophagen auf. Sie deuten außerdem darauf hin, dass das Leistungsvermögen gegenwärtiger MS-Instrumente durch eine effizientere Desolvatisierung großer Biomoleküle deutlich gesteigert werden könnte.

## Experimentelles

Freie Kapsomere wurden in 50 mM Ammoniumacetatpuffer bei pH 7.4 analysiert; partiell denaturierte Kapsomere in 50 mM Puffer, pH 9.5; intakte Prohead-1<sup>gfp</sup>-Partikel in 12.5 mM Puffer, pH 7.4. Jeweils 1–2 µL einer Probe wurden in goldbeschichtete BorosilikatnESI-Kapillaren (Eigenbau) appliziert. Die Proben wurden mit einem modifizierten Q-ToF-II-Gerät, das für Proteine großer Masse optimiert war, analysiert. Für die Messungen wurde Xenon als Kollisionsgas eingesetzt. Der Steering-Parameter wurde für Prohead-1<sup>gfp</sup> angepasst, um die Transmission großer Moleküle zu verbessern. Die ESI-Ionenquelle wurde für alle Proben wie folgt eingestellt: Kapillarenspannung 1300–1500 V, Cone 160 V, Extraktionsspannung 0 V, 10 mbar Vakuum. Das Vakuum in der Kollisionszelle wurde auf  $2 \times 10^{-2}$  mbar eingestellt. Die Kollisionsenergie wurde auf 60 V (freie Kapsomere) bzw. 400 V (Prohead-1<sup>gfp</sup>) eingestellt. Weitere Details zur Datenanalyse sind in den Hintergrundinformationen verfügbar.

Eingegangen am 21. Dezember 2012  
Online veröffentlicht am 28. Februar 2013

**Stichwörter:** Analysemethoden · Kapside · Massenspektrometrie · Nanopartikel · Viren

- [1] a) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, 246, 64–71; b) J. B. Fenn, *Angew. Chem. 2003*, **115**, 3999–4024; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, **42**, 3871–3894.

- [2] a) M. Sharon, C. V. Robinson, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, **76**, 167–193; b) A. J. R. Heck, *Nat. Methods* **2008**, **5**, 927–933.
- [3] a) I. V. Chernushevich, B. A. Thomson, *Anal. Chem.* **2004**, **76**, 1754–1760; b) N. Tahallah, M. Pinkse, C. S. Maier, A. J. R. Heck, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, **15**, 596–601; c) K. Lorenzen, C. Versluis, E. van Duijn, R. H. H. van den Heuvel, A. J. R. Heck, *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, **268**, 198–206; d) R. H. H. Van Den Heuvel, E. Van Duijn, H. Mazon, S. A. Synowsky, K. Lorenzen, C. Versluis, S. J. J. Brouns, D. Langridge, J. Van Der Oost, J. Hoyes, A. J. R. Heck, *Anal. Chem.* **2006**, **78**, 7473–7483.
- [4] C. Utrecht, R. J. Rose, E. Van Duijn, K. Lorenzen, A. J. R. Heck, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, **39**, 1633–1655.
- [5] a) S. D. Fuerstenau, W. H. Benner, J. J. Thomas, C. Brugidou, B. Bothner, G. Siuzdak, *Angew. Chem.* **2001**, **113**, 559–562; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, **40**, 542–544; b) C. Utrecht, A. J. R. Heck, *Angew. Chem.* **2011**, **123**, 8398–8413; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, **50**, 8248–8262.
- [6] T. Douglas, M. Young, *Science* **2006**, **312**, 873–875.
- [7] a) C. Utrecht, C. Versluis, N. R. Watts, W. H. Roos, G. J. L. Wuite, P. T. Wingfield, A. C. Steven, A. J. R. Heck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, **105**, 9216–9220; b) G. K. Shoemaker, E. Van Duijn, S. E. Crawford, C. Utrecht, M. Baclayon, W. H. Roos, G. J. L. Wuite, M. K. Estes, B. V. V. Prasad, A. J. R. Heck, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, **9**, 1742–1751; c) M. Brasch, A. De La Escosura, Y. Ma, C. Utrecht, A. J. R. Heck, T. Torres, J. J. L. M. Cornelissen, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, **133**, 6878–6881; d) C. Utrecht, I. M. Barbu, G. K. Shoemaker, E. Van Duijn, A. J. R. Heck, *Nat. Chem.* **2011**, **3**, 126–132.
- [8] J. E. Johnson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, **20**, 210–216.
- [9] R. W. Hendrix, J. E. Johnson, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, **726**, 351–363.
- [10] R. K. Huang, R. Khayat, K. K. Lee, I. Gertsman, R. L. Duda, R. W. Hendrix, J. E. Johnson, *J. Mol. Biol.* **2011**, **408**, 541–554.
- [11] J. L. P. Benesch, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, **20**, 341–348.
- [12] M. Mann, C. K. Meng, J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **1989**, **61**, 1702–1708.
- [13] Y.-H. Tseng, C. Utrecht, A. J. R. Heck, W.-P. Peng, *Anal. Chem.* **2011**, **83**, 1960–1968.
- [14] a) J. Fernandez De La Mora, *Anal. Chim. Acta* **2000**, **406**, 93–104; b) M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, D. O. Chemistry, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J. Chem. Phys.* **1968**, **49**, 2240–2249.
- [15] R. J. Rose, E. Damoc, E. Denisov, A. Makarov, A. J. R. Heck, *Nat. Methods* **2012**, **9**, 1084–1086.