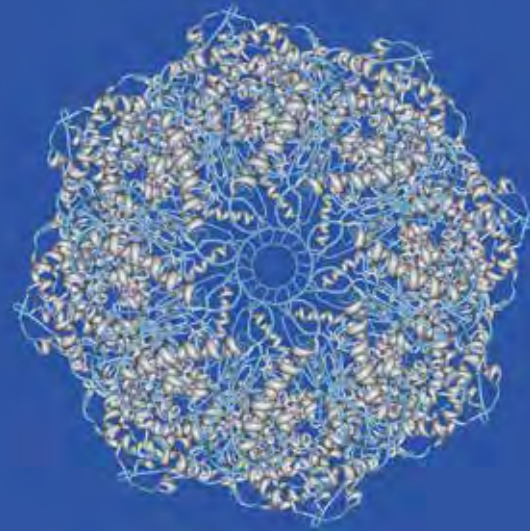


**PROTEIN- UND PROTEOMANALYTIK
IDENTIFIZIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND
EXPRESSIONSANALYSE VON PROTEINEN**







2

PROTEINE – PROTEOMICS

Proteine, aus Aminosäuren aufgebaute Makromoleküle, gehören zu den Grundbausteinen aller Zellen. Sie geben der Zelle ihre Struktur und sind als molekulare »Maschinen« beispielsweise für den Transport von Substanzen, die Katalyse chemischer Reaktionen und die Erkennung von Signalstoffen verantwortlich. Als Bausteine dienen Aminosäuren, die über Peptidbindungen zu Ketten von bis zu mehreren tausend Einheiten verbunden sind. Dabei bestimmt die Abfolge der Aminosäuren die räumliche Struktur und die Funktion des Proteins.

Die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment zu exakt definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt wird als Proteom bezeichnet. Durch die fortlaufende Neusynthese und den gleichzeitigen Abbau von Proteinen ist es ständigen Änderungen in seiner Zusammensetzung unterworfen. Diese Änderungen werden durch Stimuli der Umgebung beeinflusst und durch komplexe Regulationsprozesse gesteuert. Je nach Art kann das Proteom bis 1 000 000 Proteinspezies umfassen und übersteigt damit die Zahl der im Genom kodierten Gensequenzen üblicherweise um ein Vielfaches. Dies wird hauptsächlich durch mRNA-Splicing und nachträgliche (posttranslationale) Modifikationen des Primärproteins verursacht. Posttranslationale Proteinmodifikationen sind Veränderungen von Proteinen, die nach der Translation stattfinden. Diese werden zumeist durch den Organismus oder durch die Zellen selbst ausgelöst und können durch die Umwelt beeinflusst sein.

Beispiele für die vielfältigen Möglichkeiten sind die durch Proteinkinasen verursachte Phosphorylierung, die Hydroxylierungen von Prolin-Resten oder Glycosylierungen. Einige dieser Prozesse finden am Synthesort des Proteins statt, andere in bestimmten Organellen oder auch außerhalb der Zelle.

Anwendungen

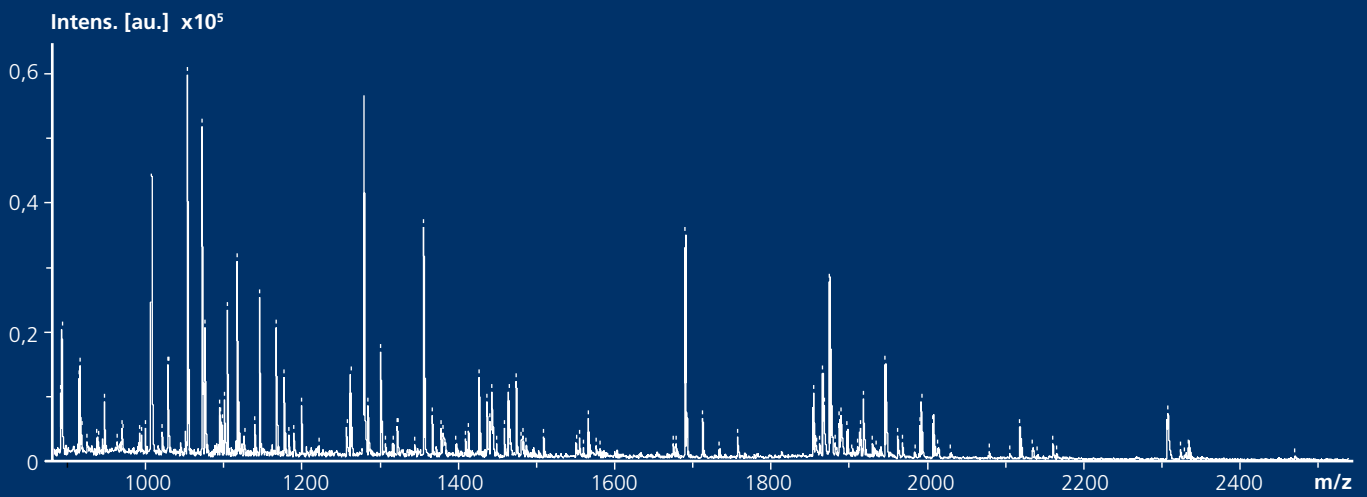
Im vergangenen Jahrzehnt hat die Massenspektrometrie eine immer größere Bedeutung für die Analyse von Proteinen gewonnen. Sie kann sowohl zur Identifizierung eines Proteins eingesetzt werden als auch zur Analyse seiner Aminosäuresequenz. Dabei lassen sich auch mögliche Veränderungen der Seitenketten nachweisen, wie sie beispielsweise bei posttranslationalen Modifikationen auftreten. In Kombination mit unterschiedlichen Verfahren der Probenvorbereitung stellt die Massenspektrometrie ein bedeutendes Werkzeug im Repertoire aktueller Methoden zur Analyse einzelner Proteine oder ganzer Proteome dar.

Die am Fraunhofer IGB eingesetzten Techniken zur Proteinanalytik beinhalten gelelektrophoretische, chromatographische und massenspektrometrische Verfahren, die sich für ein breites Anwendungsspektrum einsetzen lassen:

- Proteinidentifizierung
- Proteincharakterisierung – posttranslationale Modifikationen
- Expressionsanalyse – Proteomics
- Biomarkersuche
- Qualitätskontrolle exprimierter Proteine

1 Gelelektrophorese unter UV-Licht. ©BioRegio STERN / Lichtenscheidt.

2 3-D-Darstellung eines Chaperonin Proteins.



PROTEINIDENTIFIZIERUNG

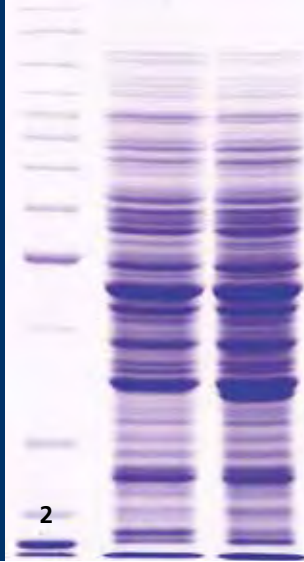
Mit Hilfe der Massenspektrometrie können sehr kleine Mengen eines oder mehrerer verschiedener Proteine identifiziert werden. Eine Möglichkeit zur Identifizierung sehr kleiner Mengen von Proteinen stellt deren Analyse durch einen sogenannten *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) dar. Dieser wird im Anschluss an eine Spaltung der Proteine durch sequenzspezifische Proteasen durchgeführt. Durch einen Vergleich der experimentell ermittelten Massen der Peptide mit den durch die Protease-Spaltung theoretisch entstehenden Fragmentmassen von bekannten Proteinen einer Datenbank kann auf die Identität des Proteins geschlossen werden. Diese Methode ist aufgrund der umfassend vorhandenen Genomsequenzen einer Vielzahl von Organismen häufig erfolgreich. Zusätzlich können MS/MS-Analysen ausgewählter Peptide zur Bestimmung von PSD-Fragmenten (*Post Source Decay*, PSD) durchgeführt werden. Die hierbei gemessenen Zerfallsmuster der Peptide beinhalten Sequenzinformationen und können zu deren Identifizierung eingesetzt werden. Damit lassen sich auch potenzielle Peptide (Massen) untersuchen, die sich mit dem zuvor erfolgten PMF keinem Protein sicher zuordnen ließen, z. B. im Falle der Identifizierung eines Proteins aus einer Gelbande oder einem Gelspot (SDS-PAGE, 2-D-PAGE). Dadurch lassen sich zusätzliche Proteine identifizieren. Ist eine hohe Abdeckung der Proteinsequenz gefordert, kann das Peptidgemisch vor der massenspektrometrischen Analyse durch den Einsatz einer *Reversed-phase*-Chromatographie im analytischen Maßstab aufgetrennt werden. Dies ermöglicht es, eine größere Anzahl von Peptiden mittels MS zu detektieren und durch MS/MS zu analysieren.

Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung eines Proteins erfordert keine zuvor durchgeführte proteolytische Spaltung. Durch die massenspektrometrische Analyse der ISD-Fragmente (*In Source Decay*, ISD) des intakten Proteins kann die Aminosäuresequenz sowohl vom N- wie auch vom C-Terminus ausgelesen und für die Identifizierung genutzt werden.

Anwendungsbeispiele

Bottom-up-Proteinidentifizierung

Latex-Kontaktallergien werden durch Proteine des Gummibaums (*Hevea brasiliensis*) ausgelöst, die in Latexprodukten wie Einmalhandschuhen oder Kathetern als Rückstände vorkommen. Zur Identifizierung allergener Latex-Proteine haben wir am Fraunhofer IGB Proteine aus unterschiedlichen, im Produktionsprozess von Latexprodukten anfallenden Fraktionen einschließlich der Produkte (medizinische Handschuhe) über ein- bzw. zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (1-D-, 2-D-PAGE) aufgetrennt. Allergieauslösende Proteine wurden mit Hilfe von Blutseren aus Latex-Allergikern identifiziert. Die Identität dieser Proteine wurde anschließend mittels PMF- und MS/MS-Analyse ermittelt. Zur Identifizierung wurde dazu auf dem MASCOT-Server eine Datenbank eingerichtet mit 10 829 EST-Sequenzen (*Expressed Sequence Tag*, EST) von *Hevea brasiliensis* (aus National Center for Biotechnology Information NCBI extrahiert). Insgesamt konnten wir 15 Proteine identifizieren, von denen fünf bisher nicht im Zusammenhang mit Latex-Allergien beschrieben wurden.

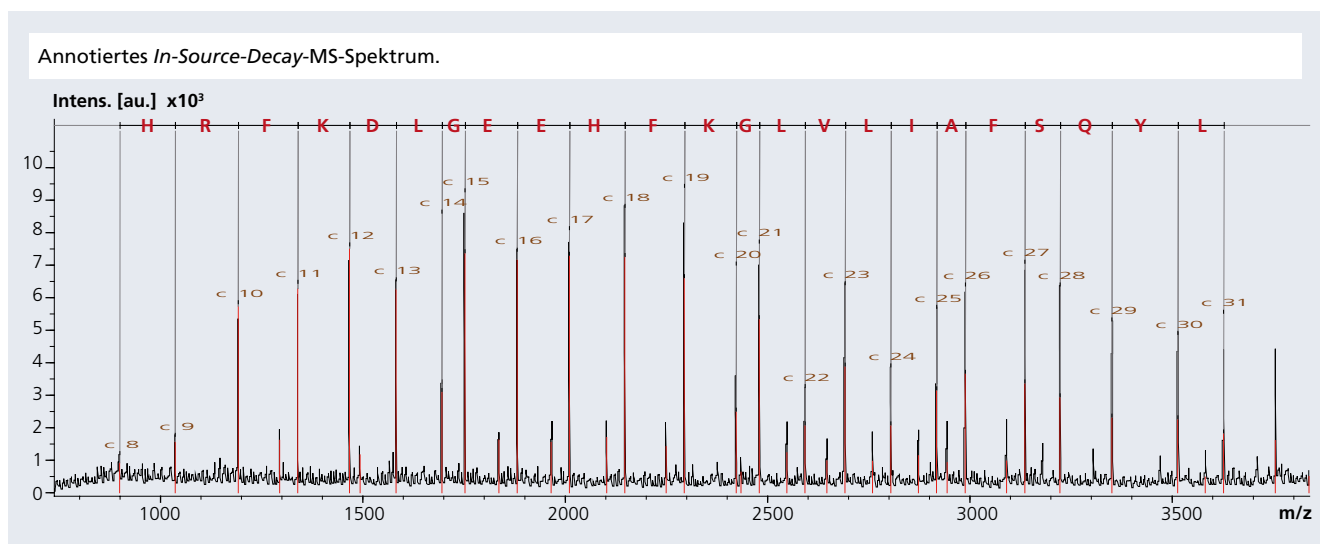


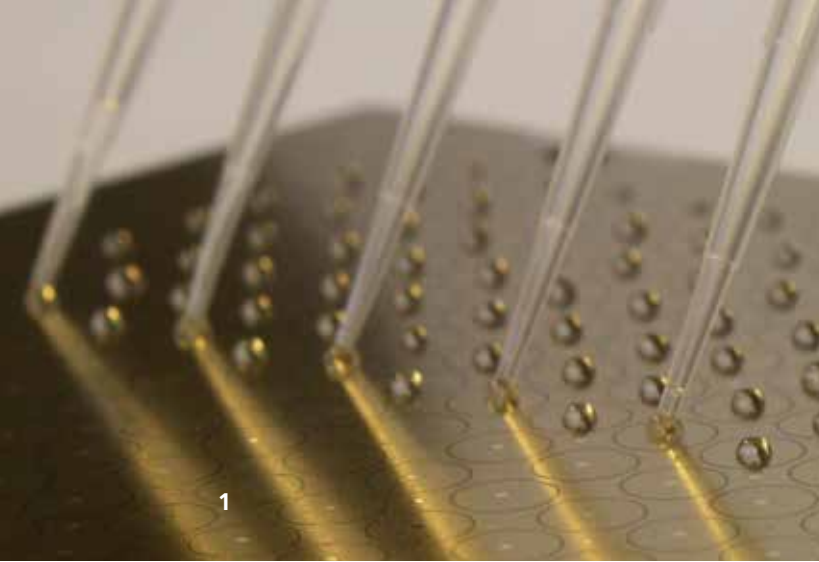
Top-down-Proteinidentifizierung

Im Rahmen einer von der Protein Sequencing Research Group der *Association of Biomolecular Resource Facilities* im Jahre 2009 organisierten Studie wurden zwei Proben mit je einem nicht näher beschriebenen Protein an die Teilnehmer versendet. Diese sollten die Identität der Proteine und einen möglichst großen Bereich der jeweiligen N-terminalen Aminosäuresequenz ermitteln. Zu diesem Zweck erfolgte am Fraunhofer IGB eine massenspektrometrische Analyse der ISD-Fragmente dieser Proteine. Mit deren Hilfe war es möglich, die

N-terminale Sequenz von bis zu 32 Aminosäuren auszulesen und die Proteine, wie auch von der Expression verbliebene Tags, zu identifizieren. Weiterhin ließ sich ein Teil der C-terminalen Sequenz ermitteln. Die Identität der Proteine wurde durch die *Peptide-Mass-Fingerprint-Analyse* und anschließende MS/MS-Untersuchungen bestätigt.

- 1 *MS-Spektrum eines Peptide Mass Fingerprint.*
- 2 *Auftrennung eines Proteingemisches mittels SDS-PAGE.*
- 3 *Naturlatex wird aus dem Saft des Gummibaumes gewonnen.*





1

PROTEINCHARAKTERISIERUNG – POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN

Eine erste Charakterisierung eines Proteins kann durch die Aufnahme unterschiedlicher Parameter erfolgen. Mittels der isoelektrischen Fokussierung lassen sich Aussagen zum relativen Gehalt an sauren und basischen Aminosäuren des Proteins treffen. Die quantitative Bestimmung der ein Protein aufbauenden Aminosäuren kann durch die chromatographische Aminosäureanalytik in der Serviceeinheit der zentralen Analytik am Fraunhofer IGB durchgeführt werden.

Der Einsatz der Massenspektrometrie erlaubt es darüber hinaus, Informationen über die exakte Masse, die Aminosäuresequenz und möglicherweise vorhandene (posttranslationale) Modifikationen zu gewinnen. Durch die massenspektrometrische Analyse der ISD-Fragmente eines Proteins lässt sich die Aminosäuresequenz sowohl vom N- wie auch vom C-Terminus her auslesen. Wird das Protein durch eine oder mehrere unterschiedliche Proteasen gespalten, können die entstehenden Peptide durch LC-MALDI und MS/MS analysiert und auch sequenziert werden, so dass sich Sequenzinformationen über weitere Bereiche eines Proteins gewinnen lassen. Die Sequenzdaten können auch zur Untersuchung posttranslati- onaler Modifikationen eingesetzt werden, die sich aus den Veränderungen der Massendaten ablesen lassen.

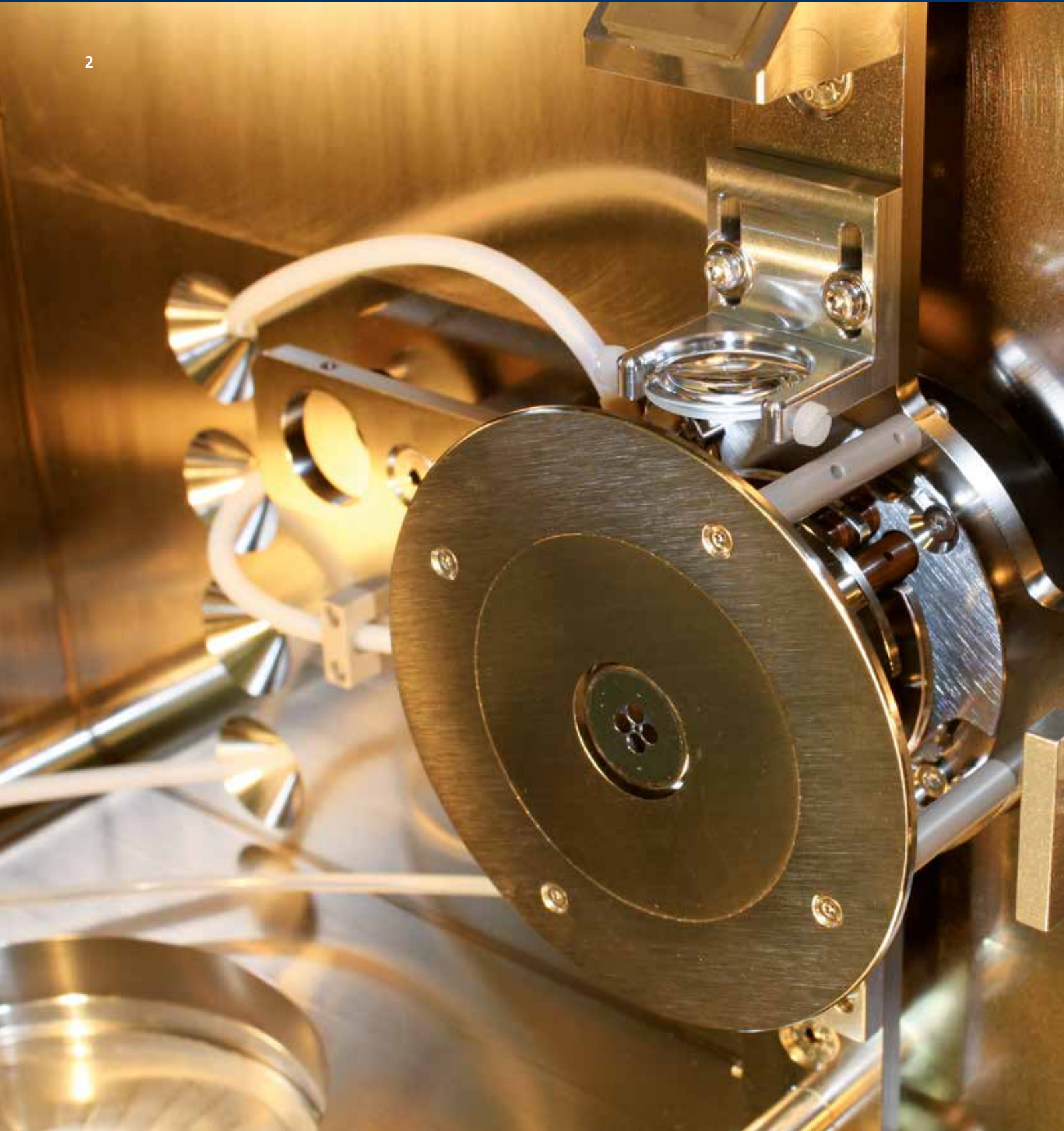
Anwendungsbeispiel

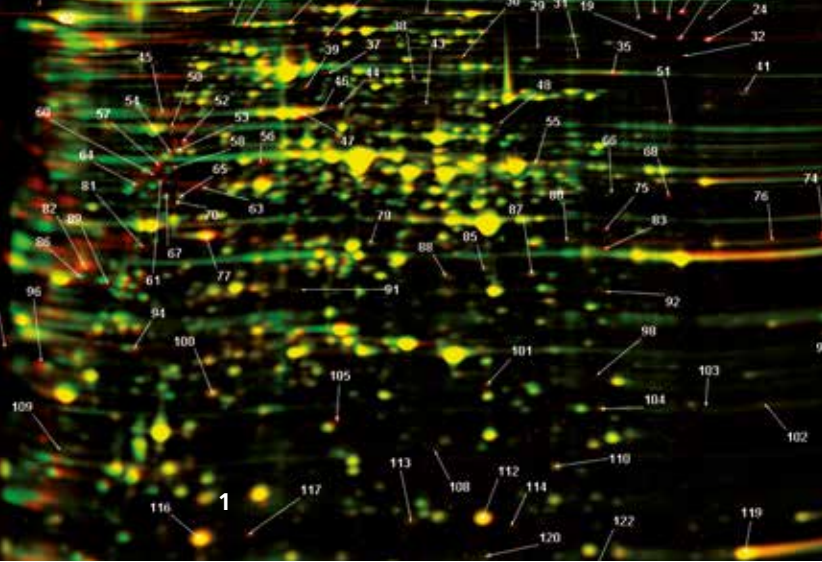
Charakterisierung des Matrixproteins Kollagen

Kollagen, eines der häufigsten Proteine im Proteom von Säugern, ist von hoher Bedeutung für die Medizin und die Biotechnologie. So wird es beispielsweise in der Gewebekultur

(Tissue Engineering) als natürliche dreidimensionale Matrix für Säugerzellen eingesetzt. Am Fraunhofer IGB wurde Kollagen, das über eine alternative Isolierungstechnik in möglichst nativem Zustand gewonnen werden konnte, massenspektrometrisch charakterisiert. Die massenspektrometrische Charakterisierung des so aufgereinigten Kollagens ergab, dass es im Vergleich zum herkömmlich isolierten Kollagen eine um 2,3 kDa höhere Masse aufwies. Dies konnten wir anhand der MS/MS-Analyse auf einen geringeren Abbau des Kollagens durch die Aufreinigungsprozedur zurückführen. Weiterhin wurden posttranslationale Modifikationen identifiziert, die neue Erkenntnisse über die Struktur des Kollagens *in vivo* lieferten.

- 1 MALDI-Proben-träger.
- 2 MALDI-Ionenquelle.





EXPRESSIONSANALYSE – PROTEOMICS

Das Proteom eines Organismus ist ständigen Änderungen in seiner Zusammensetzung unterworfen. Die hohe Komplexität stellt die besondere Herausforderung bei dessen Untersuchung dar. Um die Vielschichtigkeit eines Proteoms zu reduzieren, wird es üblicherweise in mehrere Fraktionen aufgetrennt. Am Fraunhofer IGB wird die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D-PAGE) verwendet, um Proteinextrakte nach dem isoelektrischen Punkt und der Molekülmasse aufzutrennen und mittels Fluoreszenzfärbung zu detektieren und zu quantifizieren. Die ermittelte Häufigkeit eines Proteins in verschiedenen Proben wird unter Verwendung statistischer Verfahren miteinander verglichen. Damit kann das Expressionsverhalten des Proteins unter unterschiedlichen Bedingungen verfolgt werden. Diejenigen Proteine, deren Expressionslevel sich unter den gewählten Bedingungen unterscheiden, werden nachfolgend über Massenspektrometrie identifiziert.

Anwendungsbeispiel

Pathogenitätsmechanismen von *Candida albicans*

Candida albicans ist ein fakultativ pathogener Hefepilz, der besonders bei immunsupprimierten Patienten ein großes Spektrum an Erkrankungen verursachen kann. Diese reichen von oberflächigen Schleimhautinfektionen bis hin zur systemischen Candidose. Um die Proteine zu identifizieren, die für das Infektionspotenzial des Pathogens wichtig sind, wurden am Fraunhofer IGB differenzielle Proteomanalysen mittels 2-D-PAGE durchgeführt. In diesen Untersuchungen wurde die Infektion durch *C. albicans* auf humanem Epithelgewebe *in vitro* nachgestellt. Die differenzielle Proteinexpressionsanalyse

zeigte eine deutliche Regulation von Proteinen, die zu unterschiedlichen Stoffwechselwegen gehören. Die Identifizierung der Proteine aus den Gelspots erfolgte nach einem tryptischen Verdau durch die Analyse der entstandenen Peptide mittels *Peptide Mass Fingerprint*. Verifiziert wurden die Identifizierungen durch anschließende MS/MS-Untersuchungen. Die Eignung dieser Proteine als Biomarker wird aktuell untersucht.

Die von *Candida albicans* sekretierten Proteine sind an der Interaktion des Pilzes mit dem Wirt beteiligt und können beispielsweise auch als Biomarker einer Candidose dienen. Um die von *C. albicans* ausgeschleusten Proteine zu identifizieren, wurden diese aus dem Kulturmedium isoliert und einem tryptischen Verdau unterzogen. Das daraus resultierende Peptidgemisch wurde über eine *Reversed-phase*-Chromatographie aufgetrennt und in 192 Fraktionen auf einem MALDI-Proben-träger abgelegt (LC-MALDI). Durch eine anschließende MS/MS-Analyse von ca. 400 Peptiden konnten wir 30 Proteine identifizieren.



BIOMARKERSUCHE

Im Körper ablaufende Prozesse sind häufig durch charakteristische biologische Merkmale, sogenannte Biomarker, gekennzeichnet. Bei diesen kann es sich beispielsweise um Peptide oder Proteine handeln, die in einer komplex zusammengesetzten Probe nur im Falle einer Krankheit vorkommen, und somit für diese kennzeichnend sind. Auf diesen Biomarkern können neue diagnostische Tests entwickelt werden.

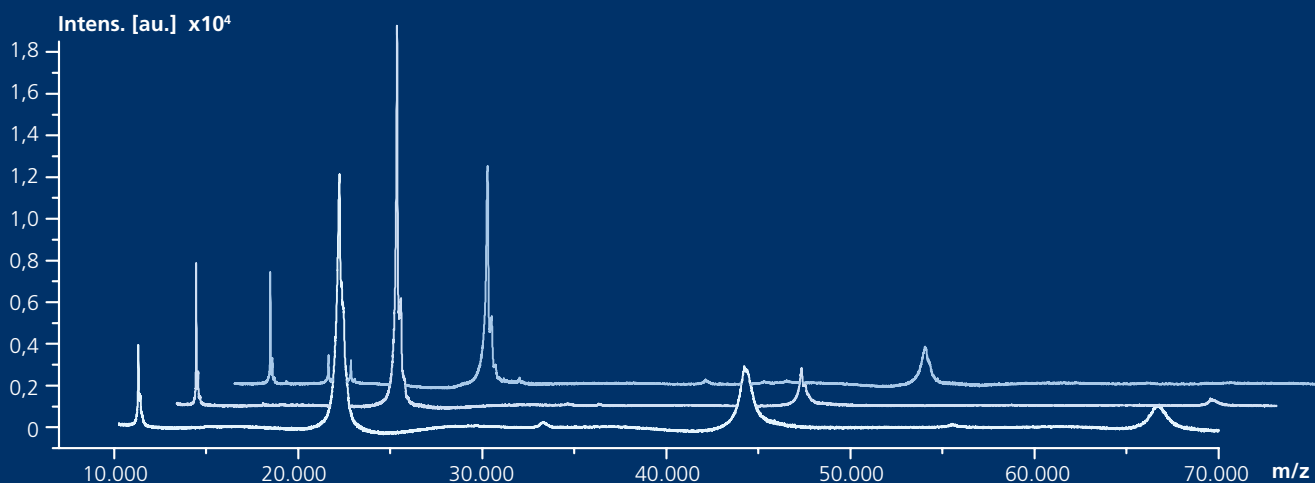
Die Herausforderung bei der Suche nach neuen Biomarkern besteht dabei darin, sie aus der Vielzahl an Molekülen herauszufiltern, die eine übliche Blut- oder Gewebeprobe enthält. Üblicherweise geschieht dies durch eine chromatographische Auftrennung der Probenbestandteile und einen anschließenden Vergleich unterschiedlicher Proben. Durch die Verwendung von speziellen Aufreinigungstechniken, der *Reversed-phase*-Chromatographie mit Nano- oder Mikroliter-Flussraten im analytischen Maßstab, und der hochsensitiven Massenspektrometrie als Nachweisttechnik ist es möglich, auch die niedermolekularen Bestandteile ($\leq 10\,000$ Da) komplexer Proben zu erfassen. Das zur Auswertung der Daten anschließend verwendete statistische Verfahren der Hauptkomponentenanalyse erlaubt es, unterschiedliche Proben zu vergleichen und die für einen speziellen Zustand charakteristischen Bestandteile zu identifizieren.

Bei Proteinen kann die zweidimensionale Gelelektrophorese zum Einsatz kommen, die in Verbindung mit einer graphischen Auswertungssoftware den Vergleich unterschiedlicher, komplexer Proben erlaubt. Diese Technologie ist ebenfalls in der Lage, unterschiedliche posttranslationale Modifikationen darzustellen. Die Massenspektrometrie wird dann im Anschluss eingesetzt, um ein als Biomarker verwendbares Protein aus dem Gel heraus zu identifizieren.

Spielt die räumliche Verteilung einer Substanz eine besondere Rolle, kann ebenfalls die Massenspektrometrie eingesetzt werden. Die abbildende MALDI-MS oder MALDI-*Imaging*-Massenspektrometrie erlaubt die Darstellung der zweidimensionalen Verteilung von Proteinen, Peptiden oder anderer Substanzen auf Dünnschnitten einer Probe. Das dabei erzeugte Bild der Verteilung einer untersuchten Masse kann auch mit lichtmikroskopischen Bildern aus histologischen Färbungen überlagert werden und so beispielsweise zur Untersuchung potenzieller Biomarker genutzt werden.

- 1 *Auftrennung eines Proteingemisches mittels 2-D-Gelelektrophorese.*
- 2 *Candida albicans.*
- 3 *Nano-LC mit angeschlossenem LC-MALDI-Fraktionssammler.*

1



QUALITÄTSKONTROLLE EXPRIMIERTER PROTEINE

An für einen medizinischen Einsatz hergestellte Proteine werden besondere Anforderungen gestellt. So muss unter anderem die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins exakt reproduzierbar hergestellt werden können. Mittels einer massenspektrometrischen Analyse kann die Sequenz sowohl vom N- als auch vom C-Terminus her überprüft werden (ISD). Nach entsprechenden Probenvorbereitungen, die auch eine gezielte Spaltung des Proteins durch Proteasen und die chromatographische Auftrennung der dabei entstehenden Produkte beinhalten kann, ist es möglich, die korrekte Aminosäureabfolge mit hoher Sequenzabdeckung zu prüfen (LC-MALDI-MS/MS). Bei dieser Untersuchung können auch eventuell vorhandene posttranslationale Modifikationen untersucht werden.

Anwendungsbeispiel

Modifikationen von Pharmaproteinen

Biopharmazeutisch genutzte Wirkstoffe oder Diagnostika können auf chemischem Wege mit Polyethylenglykol (PEG) konjugiert werden. Dadurch erfolgt eine Umhüllung, die im Körper zu einer deutlichen Verringerung der Immunogenität, einer erhöhten Stabilität gegen Proteasen und einer verlangsamten Ausscheidung führt. Somit kann der Wirkstoff (oder das Diagnostikum) seine Wirkung deutlich effizienter entfalten. Am Fraunhofer IGB wurde die Massenspektrometrie über MALDI-TOF/TOF eingesetzt, um bei entsprechend modifizierten Proteinen den Nachweis über eine erfolgte Konjugation zu führen und diese zu charakterisieren.

- 1 MS-Spektren von Proteinen.
- 2 MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer.

Geräteausstattung

Massenspektrometer

- Ultraflex II MALDI-TOF/TOF
- Finnigan LCQ^{DECA} Massenspektrometer

HPLC

- Ultimate 3000 nano-LC
- Surveyor LC System

LC-MALDI-Fraktionssammler

- Proteiner fc

Isoelektrische Fokussierung

- Ettan IPGphor II

2-D-Elektrophorese

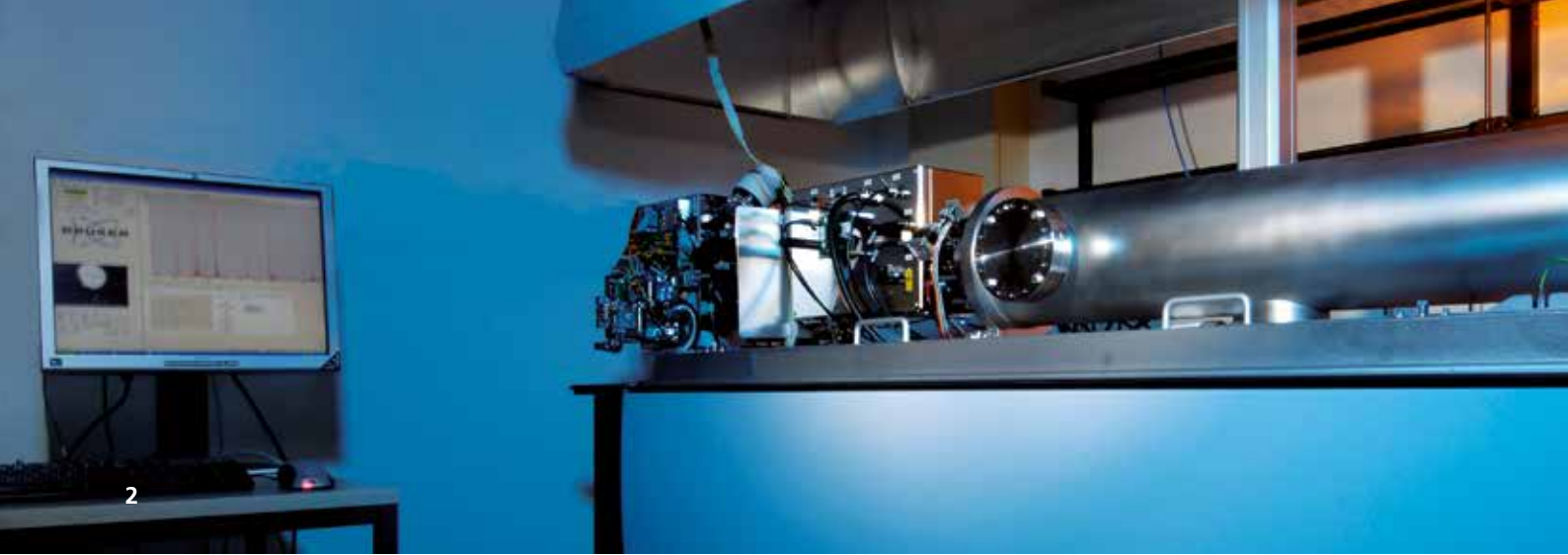
- Protean[®] plus DodecaTM cell
- Protean II xi Cell

Laser-Gelscanner

- Image Reader FLA-5000 Series

Software

- Bruker Compass
- MASCOT Server
- Xcalibur
- Proteome Discoverer
- Delta2D
- Advanced Image Data Analyzer (Aida)



UNSERE LEISTUNGEN IM ÜBERBLICK

Das Fraunhofer IGB bietet Forschungsdienstleistungen rund um die Plattform Massenspektrometrie an. Unsere Schwerpunkte liegen dabei auf dem Gebiet der Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen sowie der Expressionsanalyse. Dabei übernehmen wir die gesamte Durchführung, wie auch Teilaspekte der geplanten Untersuchungen im Kundenauftrag.

Proteinidentifizierung und -charakterisierung

- Aufreinigung oder Aufkonzentrierung der Proteine
- Identifizierung der Proteine über ISD-Analyse
- Ein- oder zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
- In-Gel-Verdau ausgewählter Banden oder Spots
- Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Peptide
- *Reversed-phase*-chromatographische Auftrennung von Peptidgemischen
- Auswahl/Aufbau einer geeigneten MASCOT-Datenbank für die Identifizierung
- Identifizierung der Proteine über PMF und MS/MS
- De-novo-Sequenzierung von Peptiden
- Spezifische Aufreinigung von modifizierten Proteinen oder Peptiden
- Identifizierung der posttranslationalen Modifikationen in den MS/MS- oder ISD-Spektren

Expressionsanalyse und Biomarkersuche

- Probengenerierung inklusive Qualitätskontrolle
- Aufreinigung oder Aufkonzentrierung der Proteine oder Peptide
- Ein- oder zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

- Auswertung der Gele mit statistischer Analyse zur Detektion differenziell exprimierter Proteine
- Identifizierung der Proteine
- *Reversed-phase*-chromatographische Auftrennung von Peptidgemischen
- Sensitive Detektion der Inhaltsstoffe einer Probe durch MALDI-MS
- Vergleichende Analyse unterschiedlicher Proben mittels Hauptkomponentenanalyse
- Identifizierung der Peptide durch MS/MS

Zusammen mit der am Fraunhofer IGB vorhandenen Mikroarray-Facility, der klassischen chemischen Analytik und der im Hause vorhandenen Fermentationstechnologie können auch systembiologische Ansätze verfolgt werden. Schwerpunkte hierbei liegen in der Kultivierung von Mikroorganismen und eukaryontischen Zellen im Bioreaktor sowie in der quantitativen Analytik von Nukleinsäuren, Proteinen und Metaboliten.

Kontakt

Dr. Anke Burger-Kentischer
Telefon +49 711 970-4023
anke.burger-kentischer@igb.fraunhofer.de

apl. Prof. Dr. Steffen Rupp
Telefon +49 711 970-4045
steffen.rupp@igb.fraunhofer.de

**Fraunhofer-Institut
für Grenzflächen- und
Bioverfahrenstechnik IGB**

Nobelstraße 12
70569 Stuttgart

Telefon +49 711 970-4401
Fax +49 711 970-4200
info@igb.fraunhofer.de
www.igb.fraunhofer.de

Fraunhofer IGB Kurzprofil

Das Fraunhofer IGB entwickelt und optimiert Verfahren, Produkte und Technologien für die Geschäftsfelder Gesundheit, Chemie und Prozessindustrie sowie Umwelt und Energie. Wir verbinden höchste wissenschaftliche Qualität mit professionellem Know-how in unseren Kompetenzfeldern – stets mit Blick auf Wirtschaftlichkeit und Nachhaltigkeit. Komplettlösungen vom Labor- bis zum Pilotmaßstab gehören dabei zu den Stärken des Instituts. Kunden profitieren auch vom interdisziplinären Austausch zwischen den fünf FuE-Abteilungen in Stuttgart und den Institutsteilen an den Standorten Leuna und Straubing. Das konstruktive Zusammenspiel der verschiedenen Disziplinen am Fraunhofer IGB eröffnet neue Ansätze in Bereichen wie Medizintechnik, Nanotechnologie, industrieller Biotechnologie oder Umwelttechnologie. Das Fraunhofer IGB ist eines von 69 Instituten und Forschungseinrichtungen der Fraunhofer-Gesellschaft, Europas führender Organisation für angewandte Forschung.

www.igb.fraunhofer.de

Bleiben Sie mit uns in Verbindung:

