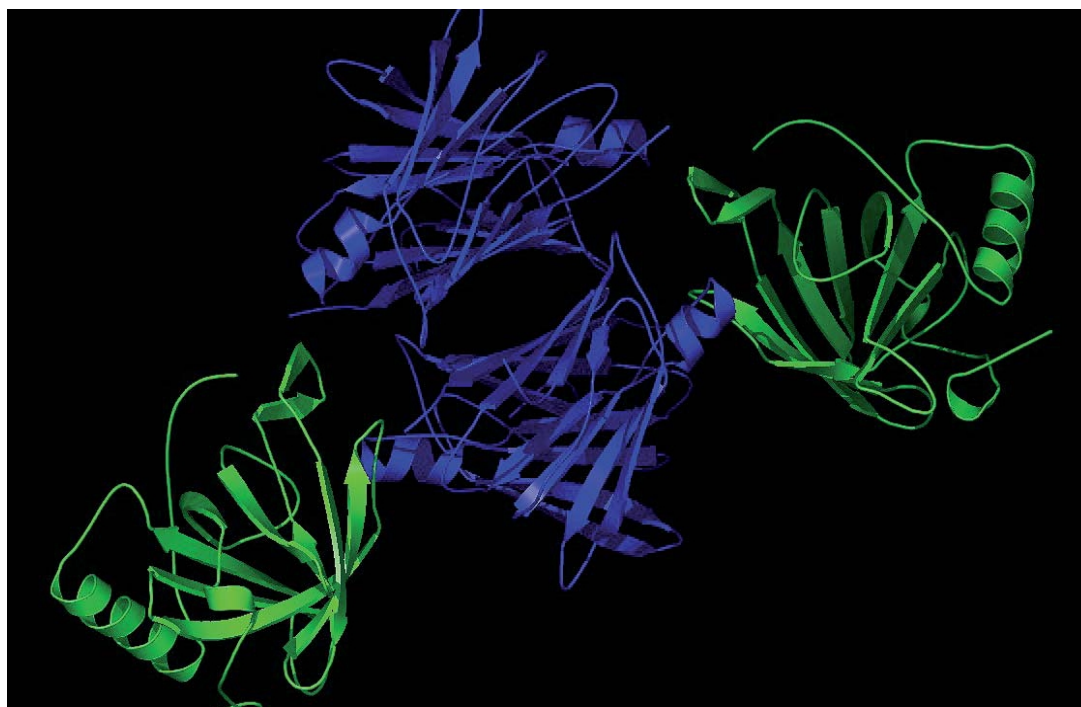


Methoden zur Proteinquantifizierung im Vergleich

Bettina Hahn und Eckhard Reh*



Die Quantifizierung von Proteinen zählt zu den großen Herausforderungen der modernen Analytik. Mittlerweile stehen hierfür gut etablierte Methoden zur Auswahl. Im ZENTRUM PROTEINANALYSE stehen die Analysengeräte und im folgenden Beitrag beschriebenen Verfahren auch externen Kooperationspartnern zur Verfügung.

Einleitung

Nach intensiver Erforschung des Genoms ist in vielen biochemischen Labors die Proteinchemie wieder in den Vordergrund gerückt. Die Quantifizierung von Proteinen insbesondere in komplexen Matrices ist dabei nach wie vor eine Herausforderung. Valide Trennmethode wie Kapillarelektrophorese (CE), HPLC gekoppelt mit der Massenspektrometrie (MS) erlauben in vielen Fällen eine sichere Quantifizierung.

Reinheit von Protein Einsatzstoffen

Für die CE von Proteinen sind die Kapillargelelektrophorese (cGEL) und Kapillarisoelektrische Fokussierung (cIEF) und von besonderer Bedeutung. Im ersten Fall erfolgt die Trennung in einer hochviskosen Polymerlösung nach der Molmasse. Hier kann allerdings nur wenig Probe injiziert werden.

Bei der cIEF bildet ein Trägerampholyt einen pH-Gradienten in der Kapillare aus, in dem die Proteine ihrem pI-Wert entsprechend fokussieren (s. Abb. 1). Vorteilhaft ist die Injektion eines größeren Probenvolumens, nachteilig die UV-Detektion bei 280 nm, da die Ampholyte bei 210 nm eine große Eigenabsorption aufweisen. Die Verfahrenskennzahlen wie Linearität, Reproduzierbarkeit von Peakhöhe ($s_{rel} = 2,5\%$) und Migrationszeit ($s_{rel} = 0,3\%$) entsprechen denen der HPLC.

Die Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) trennt Proteine in Abhängigkeit ihrer Nettoladung. Nachteilig ist die mögliche Bildung chromatographischer Artefakte aufgrund starker ionischer Wechselwirkungen. Zudem bleiben manche Proteine an den Ionenaustauschergruppen irreversibel gebunden.

Während Peptide und kleine Proteine erfolgreich mit RP-HPLC analysiert werden können, ist die Trennung großer Proteine aufgrund der mangelhaften Wiederfindung problematisch.

Tabelle 1: Wiederfindung 10 verschiedener Proteine von unterschiedlichen RP-Säulen

Säule	Proteinanzahl eluiert	Massenwiederfindung (Mittelwert)
Zorbax 300 SBC18 (Agilent)	10	69%
Gemini (Phenomenex)	7	22%
BioWidopore C5 (Suppelco)	10	77%
218TP5205 (Grace-Vydac)	9	46%
238Everest5205 (Grace-Vydac)	8	48%
Chromolith C8 (Merck)	10	37%
Jupiter 300 (Phenomenex)	10	73%
Micra ODS1 (Bischoff)	9	65%
Poroshell 300 SBC18 (Agilent)	10	75%

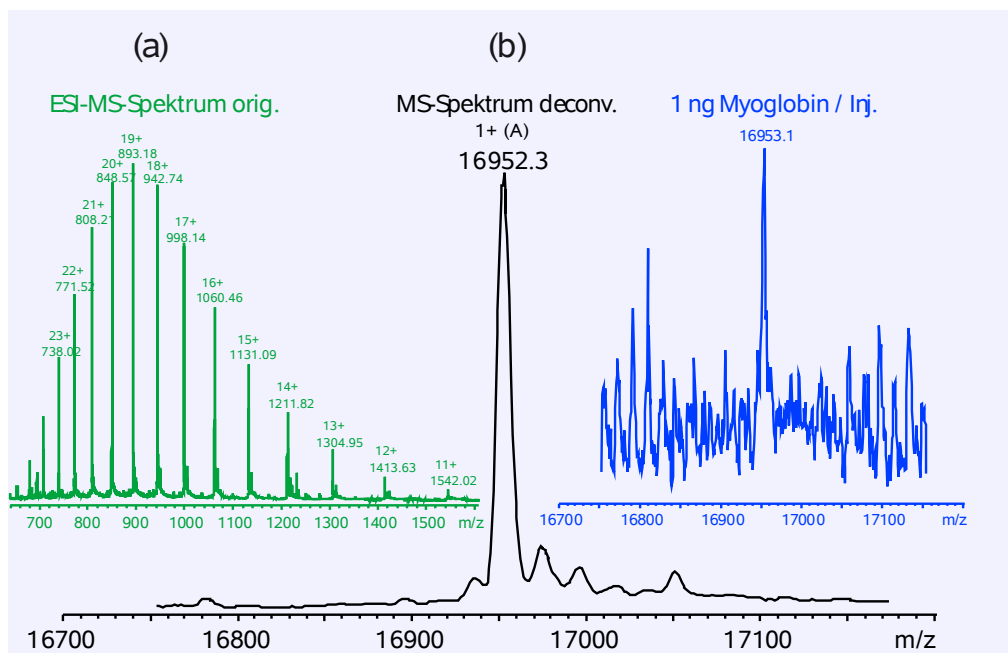
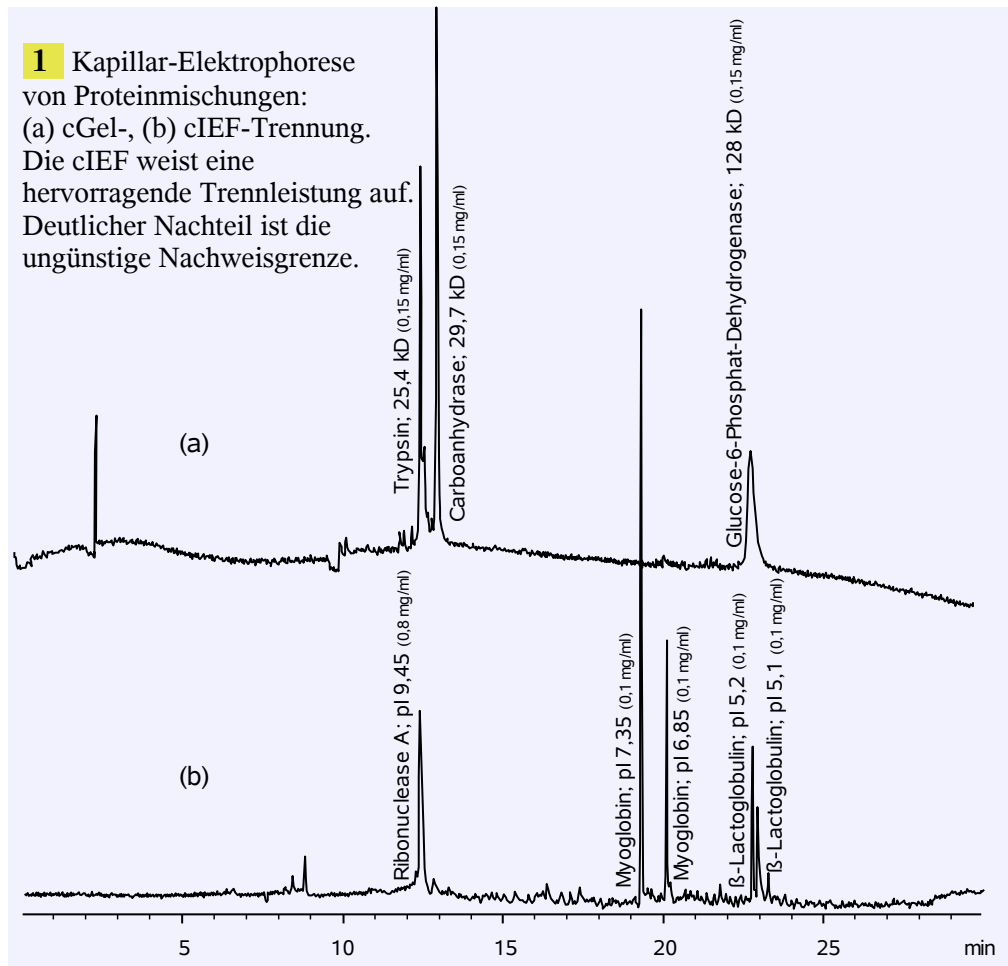
Vielfach denaturieren sie an der Stationärphase und bleiben irreversibel gebunden. Dieses Phänomen wurde mithilfe verschiedener Proteine bei gebräuchlichen RP-Säulen untersucht (s. Tab. 1) [1, 2]. Aufgrund der ungünstigen Wiederfindung sind Protein-Chromatogramme quantitativ häufig nicht aussagekräftig.

Massenspektrometer können Masse und Intensität auch größerer Moleküle exakt bestimmen. Mittels Elektrospray-Vorgang werden Proteine schonend ionisiert und durch Flugzeitmessung schnell und nachweisstark quantifiziert. Die Fließinjektionsanalyse (FIA) erlaubt eine Messung in weniger als einer Minute [3]. Die numerische Behandlung der Massenspektren ergibt eine exakte Massendarstellung von Proteinmischungen (s. Abb. 2). Nachteilig ist die Abhängigkeit des Elektrospray-Vorgangs von der Probenmatrix (Ionensuppression).

cGEL, cIEF, IEC, RP-HPLC und ESI-MS sind valide Methoden für die Reinheitskontrolle von Protein-Einsatzstoffen.

Quantifizierung ohne Standard

Die Analyse niedermolekularer Analyte erfordert nahezu immer eine Kalibration mit definierten Standards. Das Zielprotein ist selten als Reinsubstanz kommerziell verfügbar, sodass es definiert gespalten werden muss, um Analyte für die Standards zu erhalten. Bei bekannter Sequenz können Proteine über die Aminosäure-Analyse quantifiziert werden, indem die freigesetzten Aminosäuren des vollständig hydrolysierten Proteins chromatographisch bestimmt werden. Nachteilig bei der sauren Hydrolyse ist der vorzeitige Abbau instabiler Aminosäuren wie Serin, Threonin, Tyrosin und Tryptophan. Die quantitative Analyse des Proteinhydrolysats erfolgt durch Vor- oder Nachsäulenderivatisierung mit Fluoreszenz-Reagenzien,



2 FIA-ESI-MS-Analyse von Myoglobin (a) Natives MS-Spektrum mit Mehrfachladungen, (b) dekonvoliertes Spektrum. (c) Verdeutlichung der Nachweisgrenze durch Messung von 1 ng Protein.

gekoppelt mit chromatographischer Trennung (RP-HPLC oder IEC).

Besonders die Ionenaustausch-Trennung mit Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenz-Detektion ist robust und nachweistark.

Die Methode ist in einem weiten Messbereich linear und besitzt eine günstige Nachweisgrenze von 500 Femtomol pro Injektion.

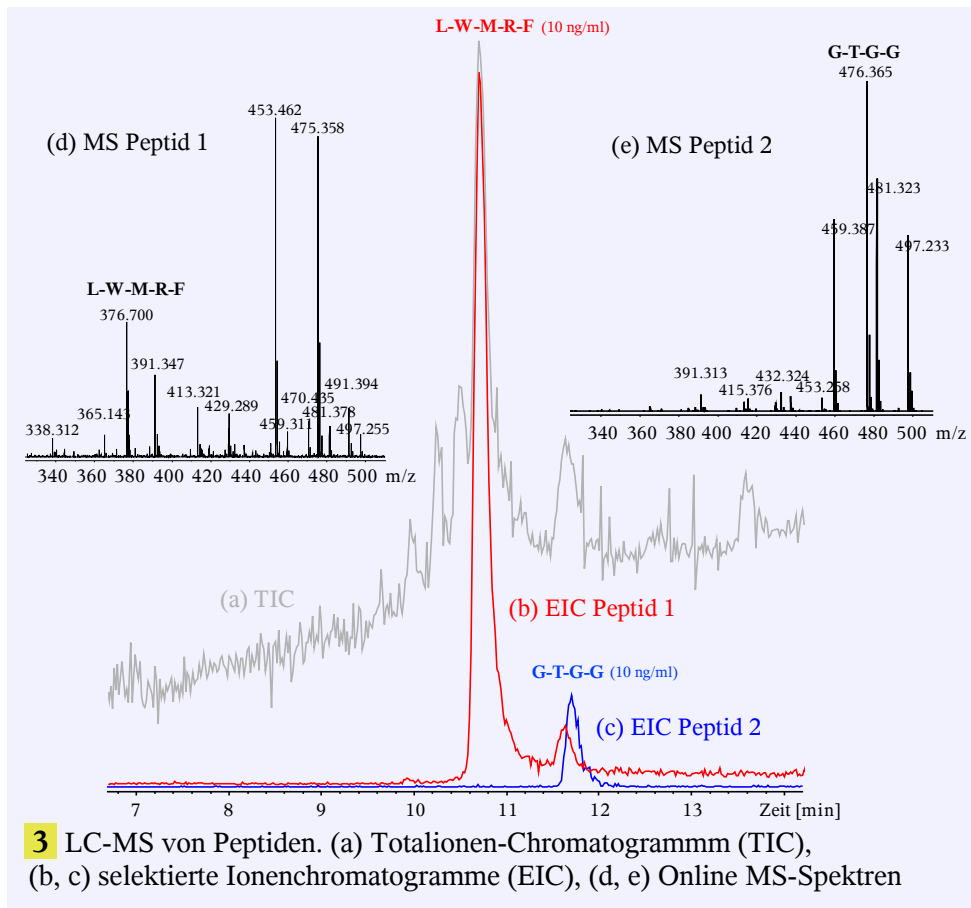
Durch Proteolyse können Proteine reproduzierbar zu Peptiden gespalten, mittels Online-RP-HPLC/ESI-MS-Kopplung getrennt und massenspektrometrisch analysiert werden. Im Peptide-Map erfolgt die Auswahl eines geeigneten Leitpeptids, welches ohne Precursor-Selektierung im MS/MS-Modus eindeutig sequenziert werden kann. Durch definierte Zugabe eines entsprechend synthetisierten ^{13}C -markierten Peptids steht ein optimaler interner Standard zur Verfügung. Die Quantifizierung erfolgt unabhängig von der Probenmatrix, da sich Matrixeffekte auf natives und synthetisches Leitpeptid gleichermaßen auswirken. Aufgrund

Quantifizierung ohne Sequenz

Müssen Proteine mit unbekannter Aminosäure-Sequenz quantifiziert werden, kann bei Enzymen mit definierten Schwermetallen die Elementanalyse genutzt werden. In anderen Fällen ist ein Fremdprotein als interner Standard sinnvoll.

Etwa ein Drittel aller Enzyme enthalten ein Schwermetallion in der prosthetischen Gruppe in festem stöchiometrischem Verhältnis. Dies ermöglicht eine Elementspuren-Analyse mittels Atomabsorption oder ICP-MS zur Metallquantifizierung und indirekten Proteinbestimmung. Selektive Messungen im oberen ppt-Bereich können z.B.

Empfindlichkeiten für Analyt und internen Standard mithilfe von Rein-substanzen ermittelt werden. Hierzu wird einmalig eine ausreichende Menge Analyt (unter 0,5 mg) semipräparativ aufgereinigt und eingewogen. Nach Analyse der bekannten Konzentrationen von Analyt und internem Standard wird das Peakflächenverhältnis festgelegt. In nachfolgenden Messungen wird die Analytkonzentration aus dem Peakflächenverhältnis zum internen Standardprotein ermittelt. Von Vorteil ist die einfache Durchführung mit reproduzierbarer isokratischer Elution und guter Wiederfindung der GPC. Nachteilig ist die geringe Trennleistung.



3 LC-MS von Peptiden. (a) Totalionen-Chromatogramm (TIC), (b, c) selektierte Ionenchromatogramme (EIC), (d, e) Online MS-Spektren

der selektiven MS-Messung können mit konventionellen HPLC-Anlagen Nachweisgrenzen bis zu 500 pg/ml erreicht werden (s. Abb. 3). Durch Nanobore-HPLC wird dies deutlich verbessert. Die Reproduzierbarkeit von Peakfläche (s_{rel} mit 2,5 %) bzw. Peptid-Masse (s_{rel} mit 2,1 ppm) ist sehr gut. Die Linearität liegt im Bereich von 1 bis 1000 ng/ml.

mit der elektrothermischen Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) durchgeführt werden. Wichtig ist, den störenden Anteil an freiem Metallion zu beachten, der nach Ultrafiltration ermittelt werden kann.

Die GPC (Gelpermeations-Chromatographie) trennt Proteine nach ihrer Größe. Für den Einsatz eines internen Standards müssen die

In biologischer Matrix quantifizieren

Für die Protein-Quantifizierung in geringer Konzentration (unter 10 ng/ml) eignet sich die Massenspektrometrie gekoppelt mit einer mehrdimensionalen Chromatographie [4]. Zur Differenzierung des Proteoms verschiedener Zelllinien oder Quantifizierung definierter Proteine sind unterschiedliche kommerzielle Methoden verfügbar (z.B. cICAT, iTRAQ von Applied Biosystems). Wu et al. haben die Methoden vergleichend untersucht und bewertet [5].

Das cICAT-Verfahren (cleavable isotope coded affinity tag) basiert auf der Kopplung eines Markers an freie SH-Gruppen des Zielproteins. Als Marker wird bei der ersten Probe ein mit Biotin verknüpfter ^{12}C -Linker eingesetzt, wohingegen die zweite Probe bzw. der Standard mit dem analogen ^{13}C -Linker gekoppelt wird. Beide Proben werden vereint (Multiplexing) und durch Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie aufgearbeitet. Nach Proteolyse und Abspaltung des Biotin-Rests werden die markierten ^{12}C - und ^{13}C -Peptidfragmente mittels RP-HPLC gereinigt und über MS quantifiziert. Durch die Vereinigung der markierten Proben wird ein interner Standard mitgeführt.

Wu und Mitarbeiter haben eine akzeptable Reproduzierbarkeit S_{rel} von etwa zehn Prozent ermittelt. Nachteilig bleibt die Markierung über SH-Gruppen, von denen in einer proteinchemischen Verknüpfung nur zehn Prozent reagieren. Proteine mit weniger als acht freien SH-Gruppen werden häufig nicht markiert. Weiterhin treten Verluste von bis zu 90 Prozent der biotinylierten Peptide bei der Affinitätsreinigung mittels Avidin-Phase auf.

Bei iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification) werden zwei (oder mehr) Proben bzw. Probe und Standard zuerst getrennt proteolytisch gespalten und über freie NH_2 -Gruppen mit einem Reagenz markiert, das eine masseausgleichende Balance- und eine Reporter-Gruppe enthält. Das Molekulargewicht der Reporter-Gruppe variiert zwischen 114 bis 117 D, abhängig davon beträgt die Masse der Balancegruppe 31 bis 28 D entsprechend der jeweils mehrfachen ^{13}C -Markierung. Die Gesamtmasse des Reagenz ist mit 145 D immer gleich. Nach der Derivatisierung werden die Proben vereinigt und aufgearbeitet. Die Mischung eines definierten Peptids erscheint im MS-Modus als einzelnes Ionensignal. Nach MS/MS-Fragmentierung werden die Reportergruppen freigesetzt und parallel quantifiziert. Das Verfahren zeichnet sich durch Markierung vieler Peptide aus. Zudem werden bei der MS-Quantifizierung nur definierte Reporter-Fragmente berücksichtigt. Nachteil ist, dass viele getrennte Schritte vor der Probenvereinigung erfolgen und so die Reproduzierbarkeit leidet. Beide Verfahren sind für eine robuste Quantifizierung nicht gut geeignet.

Das MeCAT-Verfahren verknüpft Proteine mit einer Komplexbildner-Gruppe und markiert sie mit Seltenen Erden, um sie mittels ICP-MS zu quantifizieren. Eine andere Variante, QCONCAT, stellt gentechnisch ein Fremdprotein

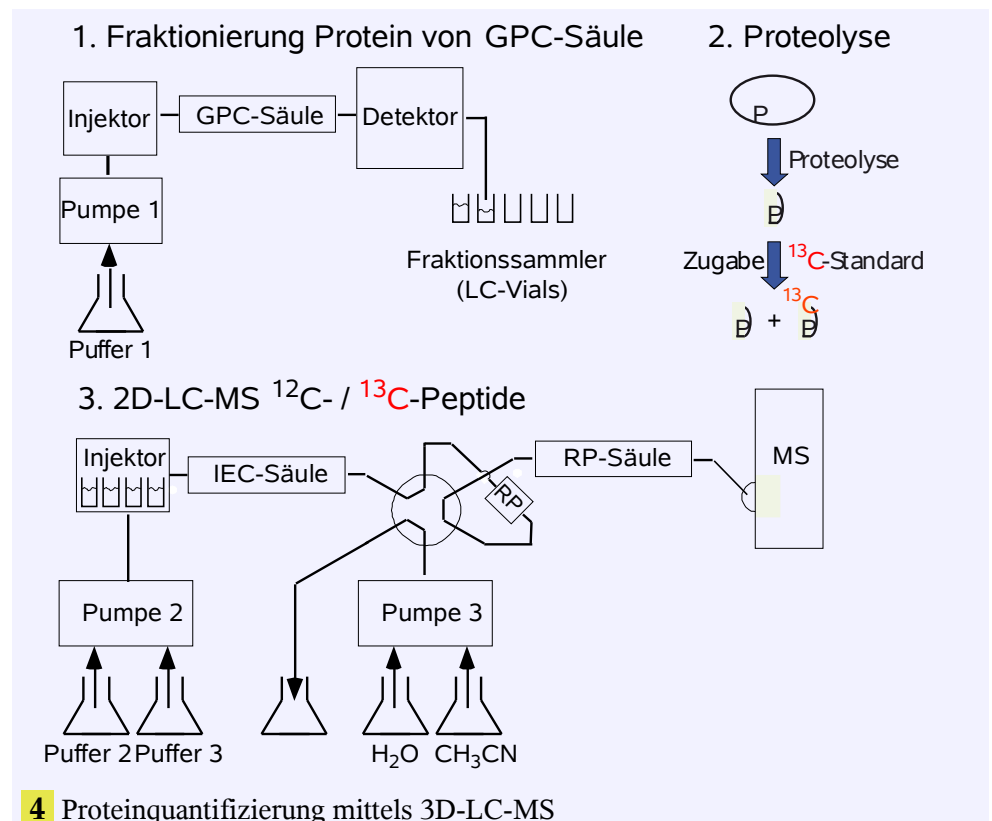
mit gewünschter ^{13}C -markierter Peptid-Sequenz her. Fremd- und natives Protein der Probe werden vereint und zusammen proteolytisch gespalten. Die resultierenden ^{13}C - bzw. ^{12}C -markierten Peptide werden mittels LC-MS quantifiziert. Der Weg zum markierten Peptid ist aufwändig, auch die Proteolyse von Fremd- und Zielprotein verläuft nicht immer identisch.

3D-LC-MS

Im ZENTRUM PROTEINANALYSE wurde ein Verfahren zur Proteinquantifizierung in biologischen Matrices entwickelt, das auf dreidimensionaler HPLC-Trennung mit anschließender MS-Quantifizierung von nativen und ^{13}C -markierten Peptiden basiert (s. Abb. 4).

Als erste Dimension wird der Proteinmix mittels GPC aufgetrennt und in HPLC-Vials fraktioniert. Nach proteolytischer Spaltung und Zugabe von zwei synthetisch hergestellten ^{13}C -markierten Peptiden aus der Sequenz des zu untersuchenden Proteins als internem Standard, wird die Mischung in der zweiten Dimension mittels IEC getrennt und nach bekannten Retentionszeiten der

relevanten Peptide online auf eine RP-Vorsäule fraktioniert (heart-cut). In der dritten Dimension werden mittels RP-HPLC die Fraktionen der Vorsäule separiert und durch ESI-MS-Kopplung analysiert. Aufgrund der hohen MS-Auflösung und Reproduzierbarkeit sowie der ^{13}C -markierten Standards ist eine zuverlässige Quantifizierung möglich. Das Verfahren ist reproduzierbar und weitgehend automatisierbar. Ionenaustausch- und RP-Trennungen erfolgen auf Peptid-Ebene und zeigen hohe Trennleistung und Wiederfindung. Im Vergleich zu Proteinen sind die Peptid-Nachweisgrenzen bei der MS-Quantifizierung wesentlich niedriger. Die Verwendung von zwei Peptiden aus der Sequenz hat den Vorteil, dass nach der Quantifizierung ein Signalquotient aus beiden Intensitäten gebildet werden kann, der einen definierten Wert annehmen muss. Eine signifikante Abweichung wäre ein Indiz für die Beeinträchtigung der Quantifizierung durch ein Fremdpeptid. Nachteilig ist die manuelle Proteolyse, die aber durch Zugabe des markierten Peptids kompensiert wird.



Referenzen

- [1] Reh, E.; Hahn, B.; Lamotte, S.: J. Chromatogr. B 844/2, 204-212 (2006)
- [2] Hahn, B.; Reh, E.: Bioforum 3, 42-43 (2007)
- [3] Chen, J.; Yang, L.; Kapron, J.T.: J. Chromatogr. B 809, 205-210 (2004)
- [4] Hamler, R.L.; Zhu, K.; Buchanan, N.S.; Kreunin, P.; Kachman, M.T.; Miller, F.R.; Lubman, D.M.: Proteomics. 4, 562-77 (2004)
- [5] Wu, W.W.; Wang, G.; Baek, S.J.; Shen, R.F.: J. Proteome Research 5, 651-658 (2006)

Kontakt

* Dipl.-Ing. B. Hahn und Prof. Dr. E. Reh, Fachhochschule Bingen, ZENTRUM PROTEINANALYSE, 55411 Bingen