

# Die Masse macht's!

## Massenspektrometrie als interdisziplinäres Werkzeug

Die biochemische Beschreibung funktioneller Proteininteraktionsnetzwerke hat in den letzten Jahren einen starken Wandel erfahren. Mittels hochauflösender biologischer Massenspektrometrie (MS) ist es möglich Netzwerkkomponenten, wie Proteine schnell und zuverlässig zu identifizieren und auf ihre Modifikationen hin zu untersuchen.

Innerhalb des Promotionskollegs (PK) Proteomics der Universität Kassel bietet die MS neue Ansatzpunkte für die Beantwortung molekularbiologischer Fragestellungen und liefert Ergänzungen zu den bislang genutzten klassischen Methoden der Biochemie.

### Das PK Proteomics – Massenspektrometrie in der Biologie

Das Promotionskolleg Proteomics wurde im Jahr 2006 an der Universität Kassel gegründet und setzt sich aus verschiedenen Arbeitsgruppen des Fachbereichs 18/Naturwissenschaften sowie externen Experten zusammen, die auf einem jährlich stattfindenden „Proteomics Day“ ihre eigenen Forschungsprojekte vorstellen und diskutieren (Abb. 1). Fragestellungen der Kollegiaten umfassen die Beschreibung von posttranslationalen Modifikationen (PTMs) an Histonen, die Untersuchung der krankheitsassoziierten Biofilmbildung von Bakterien, die Analyse von Proteinkomplexen in Pilzen, *Dictyostelium discoideum* und *Drosophila melanogaster* sowie die Analyse des Phosphostatuses von Proteinkinasen.

Die enge Verzahnung zwischen klassischer und funktioneller Biochemie mit der Massenspektrometrie (vgl. Abb. 2) spiegelt sich in zahlreichen Arbeiten innerhalb des PK Proteomics wider.

### Proteinphosphorylierung – eine der wichtigsten PTMs

Die Phosphorylierung von Proteinen ist eine der häufigsten PTMs. Im menschlichen Proteom wird die Anzahl von Phosphorylierungsstellen (P-Stellen) auf über 100.000 geschätzt [1]. Die Analyse des Phosphostatus der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA-C)



Abb. 1: Mitglieder des PK Proteomics auf dem Proteomics Day 2008 in Rotenburg an der Fulda

kann als ein Beispiel für die Verzahnung von Biochemie und MS-basierter Proteomics dienen (vgl. Abb. 3). Für die PKA-C sind Phosphorylierungen an den Aminosäuren Serin 10, Serin 139, Threonin 197 und Serin 338 bekannt, welche Aktivität und Stabilität dieses Enzyms signifikant beeinflussen [2, 3]. Die Entdeckung neuer, isoformspezifischer P-Stellen der PKA-C kann im Hinblick auf die Entwicklung spezifischer Inhibitoren von pharmakologischem Interesse sein.

### Klassische Biochemie – Reinigung der PKA-C

Mittels klassischer biochemischer Methoden wird die in *E. coli* überexprimierte PKA-C über Kationenaustausch-

chromatographie mittels Phosphocellulose-Säulenmaterial (P11 Harz) gereinigt [4].

### MS-basierte Proteomics – Untersuchung des Phosphostatus der PKA-C

Über Massenspektrometrie (nano-LC-ESI-MS/MS, 4.000 QTrap, ABI) wird der Phosphostatus der PKA-C (1.) am intakten Protein („top-down“-Ansatz) und (2.) an durch enzymatischen Verdau erzeugten Peptiden („bottom-up“-Ansatz) untersucht. Im dekonvulierten MS-Spektrum der intakten PKA-C im „top-down“-Ansatz können aufgrund der theoretischen Molekulargewichte vier verschiedene Phosphoisoformen (mit 3 bis 6 Phosphorylierungsstellen pro Protein) mit einer cha-

rakteristischen Massenabweichung von jeweils 80 Da detektiert werden [5]. Um nicht nur die Anzahl, sondern auch die exakte Position der Phosphorylierungen zu bestimmen, wird ein „bottom-up“-Ansatz gewählt. Erst mittels Proteinidentifizierung auf Peptidebene lässt sich eine Phosphorylierung über die Masse der Phosphatgruppe (80 Da) an einer bestimmten Aminosäure nachweisen. Die Beobachtung, dass für das intakte Protein maximal 6, auf Peptidebene jedoch 8 P-Stellen nachgewiesen werden, wirft die Frage nach einer räumlich und zeitlich definierten Reihenfolge innerhalb des Phosphorylierungsmuster auf, wodurch einfach, zweifach und vielfach-phosphorylierte Isoformen auftreten, die

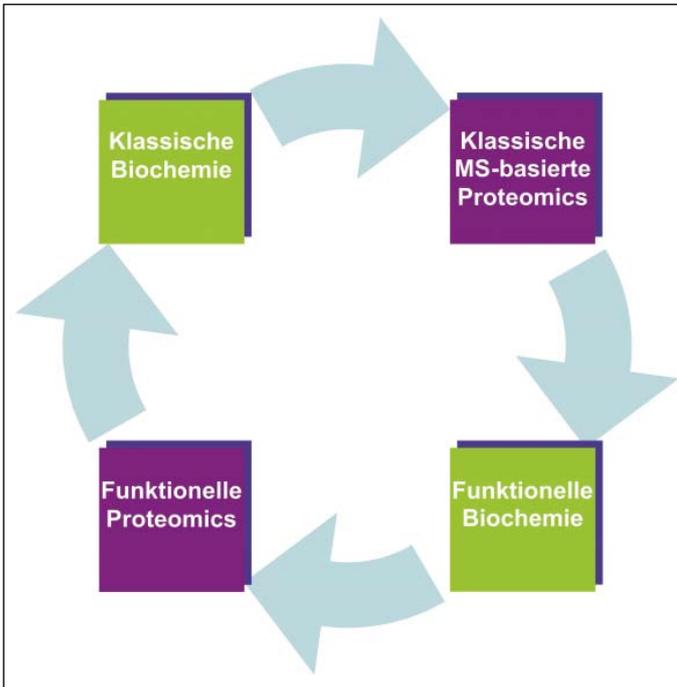


Abb. 2: Verzahnung von Biochemie und Massenspektrometrie

**Klassische Biochemie:**

Isolierung und Reinigung funktioneller Proteinkomplexe

**Klassische MS-basierte Proteomics:**

Proteinidentifizierung über PMF („Peptide Mass Fingerprint“)

**Funktionelle Biochemie:** Interaktionsanalyse, Bestimmung von Aktivitäten, Bindungskonstanten und ProteinLokalisation

**Funktionelle Proteomics:**

PTM (Posttranslationale Modifikationen) – Analyse funktioneller Proteinkomplexe

jede für sich als molekularer Schalter dienen können.

### Funktionelle Biochemie – zielgerichtete Mutagenese von P-Stellen

Durch zielgerichtete Mutagenese werden die phosphorylierbaren Aminosäuren der PKA-C zum einem durch ei-

nen „Phosphomimic“ (z. B. Glutamat) und zum anderen durch eine neutrale, den unphosphorylierten Zustand imitierende Aminosäure (z. B. Alanin) ersetzt. Mit verschiedenen Methoden der funktionellen Biochemie werden diese mutierten Proteine auf Unterschiede zum Wildtyp bezüglich ihrer Aktivität und

### Was ist Proteomics?

Der Begriff „Proteom“ wurde in den neunziger Jahren von Marc R. Wilkins in Anlehnung zu den Begriffen Genom und Transkriptom geprägt. Während über die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms ~24.000 Gene nachgewiesen werden konnten, wird die Anzahl der menschlichen Proteine auf ein Vielfaches geschätzt. Die gültige Definition des Proteoms beschreibt „die quantitative Darstellung des gesamten Proteinexpressionsmuster in einer Zelle, einem Organ oder einem gesamten Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter einem bestimmten physiologischen Zustand [10]“. In der Proteomforschung (Proteomics) werden neben der Identifizierung und Strukturaufklärung von Proteinen (klassische Proteomics) quantitative Verhältnisse, Modifikationen, Protein-Protein-Interaktionen sowie subzelluläre Lokalisation von Proteinen untersucht (funktionelle Proteomics).

**PROKASSEL  
TEOMICS  
PROMOTIONSKOLLEG**

Substratspezifität sowie auf ihr Bindungsverhalten, z.B. an physiologische Inhibitoren, getestet. Einen quantitativen Vergleich des Phosphostatus liefert die massenspektrometrische Analyse des Wildtyps sowie der mutierten Proteine.

**Funktionelle Proteomics – Anreicherungsstrategien für Phosphopeptide**

Innerhalb der letzten Jahre hat sich die MS-Analyse zu einer Alternative zu den klassischen Nachweisverfahren von Proteinphosphorylierungen über phosphospezifische Antikörper oder radioaktives Markieren der Phosphatgruppen mit <sup>32</sup>P entwickelt. Limitierende Faktoren bleiben jedoch (1.) der geringe Anteil von Phosphoproteinen in einer Zelle (durchschnittlich nur 1–2% des Gesamtproteoms) sowie (2.) die hohe Dynamik dieser PTM [6].

Für die gezielte Analyse von Phosphopeptiden der PKA-C werden einfache „bottom-up“-Ansätze mit spezifischen Anreicherungsstrategien wie IMAC („Immobilised Metall Affinity Chromatography“) und Anreicherung über TiO<sub>2</sub> (Titaniumdioxid) kombiniert. Bei IMAC wird die Wechselwirkung zwischen negativ geladenen Phosphatgruppen der Protein/Peptide und positiv geladenen immobilisierten Metallionen genutzt [7], während Titaniumdioxid einen bidendalen Oberflächenkomplex mit Phosphatgruppen eingeht [8].

**Funktionelle Proteomics – Detektion von Phosphopeptiden in komplexen Proben**

In Zusammenarbeit mit Applied Biosystems werden die Phosphopeptide der PKA-C mit den Methoden PI-79 (Precursor Ion Scan), NL (Neutral Loss) und MRM (Multiple Reaction Monitoring) untersucht [9]. Die Einstellungen des Massenspektrometers werden dabei so vari-

iert, dass aus einer komplexen Probe, die sowohl phosphorylierte als auch nicht phosphorylierte Peptide enthält, gezielt nur Phosphopeptide detektiert und analysiert werden können.

**Fazit**

In den letzten 10 Jahren hat die Massenspektrometrie ihren Einzug in viele molekularbiologische und biochemische Labore gefeiert. Die

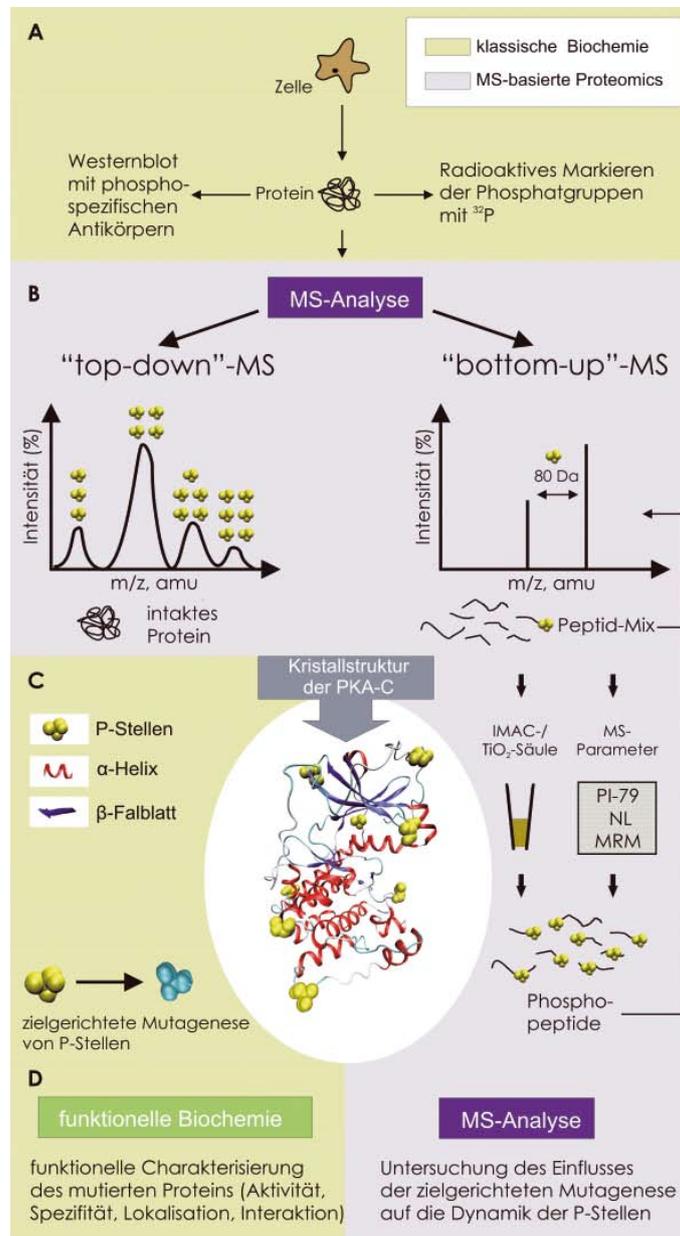
Einsatzmöglichkeiten wie z. B. innerhalb des PK Proteomics sind vielfältig. Die klassische Biochemie profitiert von dem Fortschritt auf dem Gebiet der Massenspektrometrie. Aber auch andersherum ist die Massenspektrometrie auf Weiterentwicklungen innerhalb der klassischen Biochemie und Molekularbiologie angewiesen. Die Kombination beider wird in den kommenden Jahren vielerlei neue Versuchsperspektiven in der Proteomforschung eröffnen.

**Danksagung**

Die Autoren danken C. Lenz (Applied Biosystems) für die Unterstützung bei der Entwicklung neuer Strategien zum Nachweis von Phosphorylierungen über das 4.000 QTrap. Dieses Projekt wurde innerhalb des Graduiertenkollegs „Proteomics“ der Universität Kassel gefördert.

**Referenzen**

[1] Zhang H. und Zha X.: J. Biol Chem 277, 379–387 (2002)  
 [2] Yonemoto, W. und Garrod S. M.: J Biol Chem 25, 626–632 (1993)  
 [3] Yonemoto W.: Protein Eng 10, 915–925 (1997)  
 [4] Herberg F. W. und Bell S. M.: Protein Eng 6, 771–777 (1993)  
 [5] Gesellchen F. und Bertinetti, O.: Biochim et Biophys Acta 12, 1788–1800 (2006)  
 [6] Reinders J. und Sickmann A.: Proteomics 5, 4052–4061 (2005)  
 [7] Andersson L. und Porath J.: Anal. Biochem. 154, 250–254 (1986)  
 [8] Larsen M. R. und Thingholm T. E.: Mol. Cell. Proteomics 4, 873–886 (2005)  
 [9] Lenz C. und Bertinetti O.: Applied Biosystems, Technical Note (2005)  
 [10] Müller-Esterl W.: Spektrum Akademischer Verlag, 2004, 120 ff



**Abb. 3: Verzahnung von Biochemie und MS-basierter Proteomics am Beispiel der Analyse des Phosphostatuses der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA-C)**  
 [A] Die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA-C) wird über Kationenaustauschchromatographie aus E. coli Zellen gereinigt. Phosphorylierungen können über den Nachweis mit phosphospezifischen Antikörpern oder über radioaktives Markieren mit <sup>32</sup>P nachgewiesen werden. [B] Über „top-down“-Massenspektrometrie (MS) lassen sich die verschiedenen Phosphoisoformen der intakten PKA-C nachweisen (MS-Analyse). In der „bottom-up“-MS wird die PKA-C enzymatisch verdaut und das Peptidgemisch massenspektrometrisch analysiert (MS/MS-Analyse). In Kombination mit der Anreicherungsstrategie IMAC („Immobilised Metall Affinity Chromatography“) oder Veränderung der MS-Parameter über PI-79 („Precursor Ion Scan“), NL („Neutral Loss“) und MRM („Multiple Reaction Monitoring“) lassen sich gezielt nur Phosphopeptide untersuchen. [C] In der Kristallstruktur der PKA-C (1 CMK; Darstellung mit VMD 1.8.5) sind über MS-Analyse nachgewiesene Phosphorylierungsstellen (P-Stellen) gelb hervor gehoben. Durch zielgerichtete Mutagenese wird die biologische Relevanz der neuen P-Stellen untersucht. [D] Die mutierten Proteine werden im Vergleich zum Wildtyp-Protein biochemisch und massenspektrometrisch charakterisiert.

**Kontakt:**  
 Dipl.-Biol. Susanne Roth  
 Oliver Bertinetti  
 Prof. Dr. Friedrich W. Herberg  
 FB18, Abteilung Biochemie  
 Universität Kassel  
 Tel.: 0561/804-4511  
 Fax: 0561/804-4466  
 herberg@uni-kassel.de  
 www.biologie.uni-kassel.de/  
 biochemistry/biochemistry.htm