NEUE TECHNOLOGIEN I

Höhere Effizienz in der Proteinanalyse

In der Proteomanalyse gab es in den vergangenen Jahren bahnbrechende Erfindungen und Weiterentwicklungen in der instrumentellen Analytik, vor allem bei der HPLC und der Massenspektrometrie. Dadurch treten die weniger spektakulären, aber genauso wichtigen Entwicklungen in den Hintergrund. Hier werden einige Technologien vorgestellt, die kürzlich von LSR-Firmen eingeführt wurden.

Der Erfolg massenspektrometrischer Analysen von Proteinen hängt maßgeblich von einer guten Probenvorbereitung ab. Proteine müssen zunächst mit Hilfe von Proteasen in kleine Bausteine, die Peptide, zerlegt werden, damit sie massenspektrometrisch eindeutig identifiziert und quantifiziert werden können.

Goldstandard Trypsin

Der Proteinverdau mit der Serinprotease Trypsin ist fester Bestandteil der Sequenzierung und Identifizierung von Proteinen. Die Endoprotease Trypsin spaltet die Proteine carboxyterminal von Lysin (Lys) und Arginin (Arg). Natives Trypsin kann durch reduktive Methylierung und TPCK-Behandlung chemisch modifiziert werden. Dadurch werden die autokatalytische Aktivität und die daraus folgende Chymotrypsin-Aktivität des prozessierten Pseudotrypsins inhibiert. Trypsin ermöglicht es, Proteine zuverlässig, sicher und flexibel zu spalten – im Gel und in Lösung.

Ein unvollständiger Proteinverdau und die damit geringe Peptidausbeute zählen zu den häufigsten Herausforderungen bei der Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie. Oftmals sind die durch den Trypsinverdau entstandenen Peptide zu groß oder zu klein, um gute Sequenzinformationen liefern zu können. Schätzungen zu Folge lassen sich 20% bis 30% der Peptide nicht vollständig spalten, auch wenn die „Standardprotease" Trypsin verwendet wird. Verantwortlich hierfür sind neben der Löslichkeit der Proteine die Größe der entstandenen Peptidfragmente sowie die Zugänglichkeit der Proteasen für ihre Zielsequenz und deren Aminosäureabfolge. Folgt beispielsweise auf Arginin oder Lysin ein Prolin kann Trypsin innerhalb dieser Zielsequenz nicht spalten. Außerdem können post-translationale Modifikationen in der Region der proteolytischen Schnittstelle die Effizienz der Proteasen herabsetzen.

Kombinierte Protease-Power

Unterschiede in ihrer Sequenzspezifität, ihrem pH-Optimum und ihrer Toleranz gegenüber Detergenzien sind Gründe, warum neben Trypsin auch alternative Proteasen in der Probenvorbereitung eingesetzt werden.

In Zellextrakten und anderen komplexen Proteinproben steigt mit der Anzahl identifizierter Proteine und einer besseren Sequenzabdeckung die Qualität der Proteom-weiten Analysen – die allein durch technische Replikate mit nur einer Protease nicht erreicht werden kann [1]. Auch bei einzelnen Proteinen führen alternative Proteasen zu einer verbesserten Sequenzabdeckung und ermöglichen es, post-translationale Modifikationen signifikanter zu identifizieren.

Interessant ist der kombinierte Einsatz von Proteasen. Durch einen sequenziellen Verdau von Lys-C und Trypsin können Proteine nahezu vollständig verdaut werden (s Abb.). Lys-C besitzt eine hohe Spezifität und unterstützt Trypsin bei der carboxyterminalen Spaltung an Lysin-Resten. Lys-C toleriert stark denaturierende Bedingungen (bis zu 8 M Harnstoff) unter denen Trypsin bereits komplett inhibiert vorliegt. Im Anschluss an den nur wenige Stunden dauernden sehr effizienten Lys-C-Verdau kann nach Verringerung der Harnstoffkonzentration zusätzlich über Nacht mit Trypsin verdaut werden.

Um die ineffiziente Spaltung durch Trypsin innerhalb der Zielsequenz Arg-Pro und Lys-Pro zu unterstützen, kann analog ein kombinierter proteolytischer Verdau mit Arg-C und Trypsin gewählt werden. Insbesondere in der quantitativen MS ist ein vollständiger proteolytischer Verdau wichtig, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Additive wie SDS oder Harnstoff können den Proteinverdau unterstützen, haben aber einen negativen Einfluss auf die nachfolgende MS-Analyse. Reagenzien wie ein Trypsin Enhancer verbessern den Trypsinverdau insbesondere bei Membranproteinen und erhöhen die Peptidausbeute bei Gelextraktionen. Die Detergenzien sind so konzipiert, dass sie über den Verlauf eines Trypsinverdaus degradieren und daher die MS-Analyse nicht stören. Derartige Reagenzien minimieren zudem die unspezifische Adsorption von Peptiden und Proteinen an Plastikoberflächen. Eine signifikant höhere Sequenzabdeckung wird meist schon nach drei Stunden proteolytischem Verdau erreicht. (*Fortsetzung folgt in ltranskript 5/13*).

Reiner Westermeier, Susanne Hanke, Daniel Wehrhahn, Ausschuss Wissenschaftsdialog der Fachgemeinschaft LSR

LSR Life Science Research im VDGH

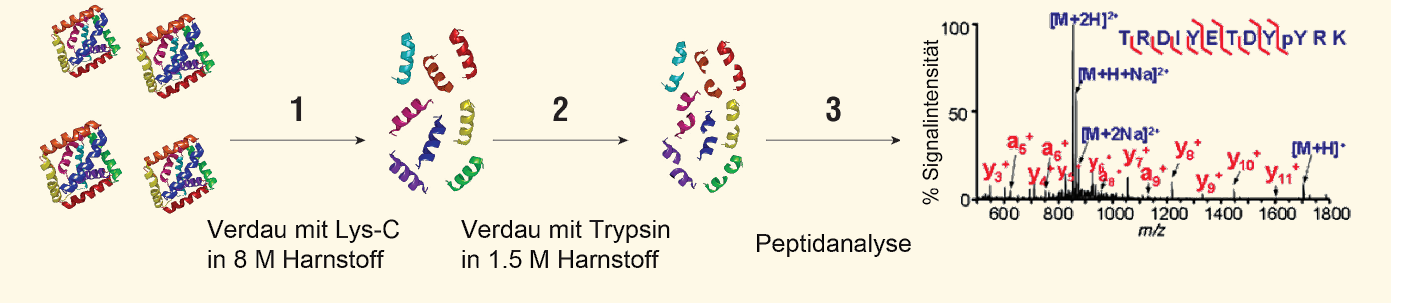
Termine für LSR-Firmen

25. April 2013, Berlin
Fachabteilungssitzung
10.00 Uhr bis 16.00 Uhr

http://lsr.vdgh.de/

Literatur

[1] Swaney DL, Wenger CD , Coon JJ. (2010) Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics. J Proteome Res. 9: 1323-1329.



Sequenzieller Verdau mit Lys-C und Trypsin