

Abschlußbericht zum Verbundprojekt

**Entwicklung eines Verfahrens zur differentiellen, multidimensionalen Chromatographie für die Proteomanalyse an Modellen der neuronalen Apoptose - Teilprojekt:
Zweidimensionale Gelelektrophorese zur Validierung der DMDLC-
Technik/Datenbankaufbau**

- PTJ-BIO/ 0313029A -

**Zuwendungsempfänger: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften
e.V. (MPG), Postfach 101062, 80084 München**

Laufzeit des Vorhabens (incl. Aufstockungs- und Verlängerungsantrag):

01.04. 2003 bis 30. 04. 2006

I. Kurze Darstellung

I. 1 Aufgabenstellung

Ziel des Projektes war die Entwicklung einer differentiellen multidimensionalen Proteomicstechnologie zur quantitativen und qualitativen Erfassung von Proteinen, die während der Apoptose modifiziert wurden. Apoptose wird durch eine Reihe von post-translationalen Prozessen wie zum Beispiel die Prozessierung von Substraten durch Proteasen der Caspasefamilie gesteuert. Umfassende Proteomanalysen mithilfe der 2D-Gelelektrophorese waren zum Zeitpunkt des Projektstartes bereits durchgeführt worden. Jedoch wurde vermutet, dass die bekannten Limitierungen der 2DE-Technologie im Bereich der Auftrennung stark geladener und hydrophober Proteine, sowie bei der Quantifizierung von Proteinen durch die Entwicklung einer neuen Technologie ohne isoelektrische Fokussierung als Auftrennmethode überwunden werden können. Deshalb sollte nach einer Vorfraktionierung der Proteine die Flüssigkeitschromatographie der tryptischen Peptide durch direkte Analyse über MALDI-MS und ESI-MS/MS folgen. Um die Peptide quantifizieren zu können, sollten Methoden mit Einbau von stabilen Isotopen (e.g., ^{13}C , ^2H , ^{18}O) etabliert werden. Proteine sollten über die automatische Verarbeitung der Ergebnisse identifiziert und quantifiziert werden.

I. 2 Voraussetzungen

Im Verbundprojekt brachten kompetente Partner die für die Durchführung erforderlichen Expertisen ein (siehe auch I.5). So sollte das biologische Material von der AG Nitsch (Schlaganfallmodell) und der AG Zipp (Multiple Sklerose) bereitgestellt werden. In der AG Rudel sollten die Vergleichsproteome mit der herkömmlichen 2DE-Technik nach Klose erstellt und die Verfahren zur quantitativen Proteomanalyse SILAC, (*stable isotope labelling of amino acids in cell culture*) erarbeitet werden. Die AG Rudel bereitete auch die Proben für die Massenspektrometrie vor. Die WITA GmbH etablierte die nanoLC-ESI-MS/MS Kopplung zur direkten Identifizierung und Quantifizierung der differentiellen Proteine. In enger Zusammenarbeit mit der AG Backhaus sollten bioinformatische Werkzeuge für die Vereinfachung der Auswertung sowie für die relative Quantifizierung von differentiellen Peptiden hergestellt werden.

I. 3 Planung und Ablauf

Planung:

Projektstruktur und Beitrag der Kooperationspartner:

- a) Gewinnung und Präparation von Proteinproben der neuronalen Apoptose (AG Nitsch, HU Berlin, Charité, Inst. f. Anatomie),
- b) Gewinnung und Präparation von Proteinproben der neuronalen Apoptose (AG Zipp, HU Berlin, Charité, Klinik f. Neurologie)
- c) Proteomanalytik und Bereitstellung der Proben für die MS; sekundäre Datenauswertung (AG Rudel, Projektkoordinator, MPI f. Infektionsbiologie, Berlin)
- d) Entwicklung der DMDLC-Technik; massenspektrometrische Analysen, primäre Datenanalyse (AG Graack, WITA GmbH, Teltow)
- e) Bioinformatische Begleitung der Datenanalyse; Entwicklung einer weitestgehend automatisierten Daten-Analyse-Software (AG Backhaus, Bioinformatik, TU Berlin)

Die Etablierung der Probenvorbereitung für die Vergleichsproteome in Kooperation mit den klinischen Partnern und die Entwicklung von differentiellen Markierungsmethoden sollten parallel durchgeführt werden. Weil die Planung sowohl Arbeiten mit Zellen (MS-Modell) als auch mit Gewebeschnitten (Schlaganfall) vorsah, wurde die metabolische Markierung sowie die enzymatische und chemische Modifizierung von Proteinen angewandt und optimiert. Ebenfalls parallel zu diesen Arbeiten etablierte die WITA GmbH die nanoLC - ESI-MS/MS Kopplung. Dann sollten die Vergleichsproteome über 2-DE erstellt und die differentielle Markierung der klinischen Proben durchgeführt werden. Die differentiell-markierten Proben sollten in der AG Rudel vorfraktioniert, tryptisch verdaut und dann der WITA GmbH für die Analyse über LC-ESI-MS/MS übergeben werden.

Ablauf:

Die Planungsvorgaben bezüglich der Technologieentwicklung konnten weitgehend eingehalten werden. Im Projekt kam es jedoch zu einer Verzögerung bei der Technologieentwicklung, weil die LC-Anlage und das ESI-MS erst ca. ein Jahr nach Projektbeginn geliefert wurden und erst ab dem Sommer 2004 verfügbar waren. Die Messung differentiell markierter Proben, die für eine zuverlässige Quantifizierung unerlässlich ist, ließen sich deshalb innerhalb der Projektlaufzeit nicht mehr etablieren. Außerdem ergaben sich unerwartete Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung der klinischen Proben. Bei den MS-Proben gab es Schwierigkeiten mit der Reproduktion der 2DE-Spotmuster, weil immer wieder degradierte Protein detektiert wurden. Im Falle der komplexen Schlaganfall-Proben konnte

das Material vom klinischen Partner nicht in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt werden. Deshalb wurde kurz vor Ablauf der ersten Förderperiode beschlossen, die Technologieentwicklung mit der robusten, etablierten Leukämiezelllinie Jurkat durchzuführen, die von der AG-Rudel bereitgestellt werden konnte.

I. 4 Wissenschaftlicher und technischer Stand; verwendete Verfahren und Schutzrechte; verwendete Fachliteratur

Die 2-DE Gelelektrophorese galt lange Zeit als Technik der Wahl für die differentielle Proteomanalyse. Die schnelle Identifizierung der Proteine erfolgt meist über Massenspektrometrie. Jedoch hat diese Technologie Nachteile, die eine umfassende differentielle Analyse von eukaryontischen Zellen in naher Zukunft unwahrscheinlich werden lassen. Zu nennen sind mangelnde Sensitivität der Identifizierung, hoher technischer Aufwand, Probleme bei der Reproduzierbarkeit, die unbefriedigende Quantifizierbarkeit der Proteine sowie eine schlechte Auflösung von stark geladenen oder lipophilen Proteinen. Neben den gelbasierten Trennmethoden wurden chromatographische Trenntechniken mit anschließender Massenspektrometrie entwickelt. Diese Techniken schneiden im Vergleich zur 2-DE-Proteomics im Bereich Sensitivität, geladene und lipophile Proteine deutlich besser ab und bieten zusätzlich die Möglichkeit, Proteine zu quantifizieren. Der Nachteil der letztgenannten Technik liegt bei der bisherigen Vorgehensweise in der begrenzten Einsatzfähigkeit für die qualitativ differentielle Proteomanalyse, weil sich Modifikationen von Proteinen nur schwer auffinden lassen.

Ziel dieses Teilprojektes war daher die Entwicklung einer differentiellen multidimensionalen Flüssigkeitschromatographie mit direkter Analyse der Proteine über ESI-MS/MS, automatischer Identifikation und Quantifizierung und automatischer Verarbeitung der Ergebnisse. Aus der Literatur war bekannt, dass die Quantifizierung mit differentiell-markierten Proben Vorteile gegenüber densitometrischen Verfahren bietet. Dafür können die Proteine aus unterschiedlichen biologischen Situationen (z. B. behandelt und nicht-behandelt) so markiert werden, dass sich definierte Massenveränderungen ergeben. Die Peptidpärchen können dann im Massenspektrometer relativ quantifiziert werden. Als Methode der Wahl für die Markierung von Zellen in Kultur ist die SILAC-Methode, die sich durch Zugabe von schweren Aminosäuren wie z.B. Leucin oder Arginin zu den wachsenden Zellen durchführen lässt. Eignen sich Proben nicht für die SILAC-Markierung, weil sie wie z.B. Biopsien metabolisch nicht markierbar sind, bieten sich enzymatische oder chemische Markierungen an. Um die während der Apoptose modifizierten differentiell-markierten Proteine zu identifizieren mussten modifizierte und nicht-modifizierte Proteine zunächst in einem ersten Chromatographieschritt getrennt werden. Analysiert man dann die Zusammensetzung der

einzelnen Fraktionen, lassen sich modifizierte und nicht-modifizierte Proteine allein durch die Quantifizierung detektieren und über ESI-MS/MS identifizieren.

Verwendete Fachliteratur

Aebersold,R. and Leavitt,J. (1990). Sequence analysis of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis: towards an integrated protein database. [Review] [89 refs]. *Electrophoresis* 11, 517-527.

Anderson,N.L. and Anderson,N.G. (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. [Review] [41 refs]. *Electrophoresis* 19, 1853-1861.

Banks,J.F. and Gulcicek,E.E. (1997). Rapid peptide mapping by reversed-phase liquid chromatography on nonporous silica with on-line electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 69, 3973-3978.

Berndt,P., Hobohm,U., and Langen,H. (1999). Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints. *Electrophoresis* 20, 3521-3526.

Blackstock,W.P. and Weir,M.P. (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. [Review] [44 refs]. *Trends Biotechnol.* 17, 121-127.

Brockstedt,E., Rickers,A., Kostka,S., Laubersheimer,A., Dorken,B., Wittmann-Liebold,B., Bommert,K., and Otto,A. (1998). Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3 [published erratum appears in *J Biol Chem* 1998 Dec 11;273(50):33884]. *Journal of Biological Chemistry* 273, 28057-28064.

Brockstedt,E., Otto,A., Rickers,A., Bommert,K., and Wittmann-Liebold,B. (1999). Preparative high-resolution two-dimensional electrophoresis enables the identification of RNA polymerase B transcription factor 3 as an apoptosis-associated protein in the human BL60-2 Burkitt lymphoma cell line. *J. Protein Chem.* 18, 225-231.

Chen,X., Smith,L.M., and Bradbury,E.M. (2000). Site-specific mass tagging with stable isotopes in proteins for accurate and efficient protein identification. *Anal. Chem.* 72, 1134-1143.

Conrads,T.P., Anderson,G.A., Veenstra,T.D., Pasa-Tolic,L., and Smith,R.D. (2000). Utility of accurate mass tags for proteome-wide protein identification. *Anal. Chem.* 72, 3349-3354.

Ducret,A., Van,O., I, Eng,J.K., Yates,J.R., and Aebersold,R. (1998). High throughput protein characterization by automated reverse-phase chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Protein Sci.* 7, 706-719.

Eckerskorn,C., Strupat,K., Schleuder,D., Hochstrasser,D., Sanchez,J.C., Lottspeich,F., and Hillenkamp,F. (1997). Analysis of proteins by direct-scanning infrared-MALDI mass spectrometry after 2D-PAGE separation and electroblotting. *Analytical Chemistry* 69, 2888-2892.

Fenn,J.B., Mann,M., Meng,C.K., Wong,S.F., and Whitehouse,C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. [Review] [25 refs]. *Science* 246, 64-71.

Fenyo,D., Qin,J., and Chait,B.T. (1998). Protein identification using mass spectrometric information. *Electrophoresis* 19, 998-1005.

Figeys,D., Van,O., I, Ducret,A., and Aebersold,R. (1996). Protein identification by capillary zone electrophoresis/microelectrospray ionization-tandem mass spectrometry at the subfemtomole level. *Analytical Chemistry* 68, 1822-1828.

Gagne,J.P., Hunter,J.M., Labrecque,B., Chabot,B., and Poirier,G.G. (2003). A proteomic approach to the identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as a new family of poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Biochem. J.* 371, 331-340.

Gerner,C., Frohwein,U., Gotzmann,J., Bayer,E., Gelbmann,D., Bursch,W., and Schulte-Hermann,R. (2000). The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis. *J. Biol. Chem.* 275, 39018-39026.