

Proteinkarakterisering ved massespektrometri

- fra fødevarer til kræftforskning

Af Mette Rindom Nørrellykke, Hans Peter Sørensen og Hans Christian Beck, Teknologisk Institut

Viden om proteiner er vigtig i mange forskellige sammenhænge. Er det rekombinante protein korrekt udtrykt? Er proteinkilden i råvaren som forventet? Hvad er det for et protein, mælkesyrebakterien udskiller - og hvilken rolle spiller det? Hvilke proteiner interagerer med hinanden? Teknologisk Institut har gennem de sidste år har opbygget en ekspertise, der kan give svar på mange af de spørgsmål, der opstår i en forsknings- og udviklingsproces.

For mange bioteknologiske virksomheder er viden om proteiner essentiel - lige fra opdagelsen af et potentielt medicinsk produkt til introduktionen af produktet på markedet. Og dele af fødevarerindustrien har et stort behov for at kunne karakterisere proteiner, både i forhold til kvalitetskontrol, men også mhp. at give proteiner nye egenskaber og dermed skabe højværdiprodukter.

Opbygning af proteiner

Proteiner og deres funktioner i levende organismer er stærkt varierede. Nogle proteiner er samlet i strukturer som muskelfibre eller bundet i cellemembraner og fungerer som receptorer. Andre har friere bevægelighed og deltager i signalkaskader inde i cellerne eller som enzymer i biokemiske omsætningsveje, og endnu andre, f.eks. antistoffer, transporteres rundt i hele kroppen.

Alle proteiner har dog byggestenene til fælles, nemlig de 20 forskellige aminosyrer, som kan sammensættes på så mange måder, at de tusindvis af proteiner, der er defineret af en organismes DNA, er unikke.

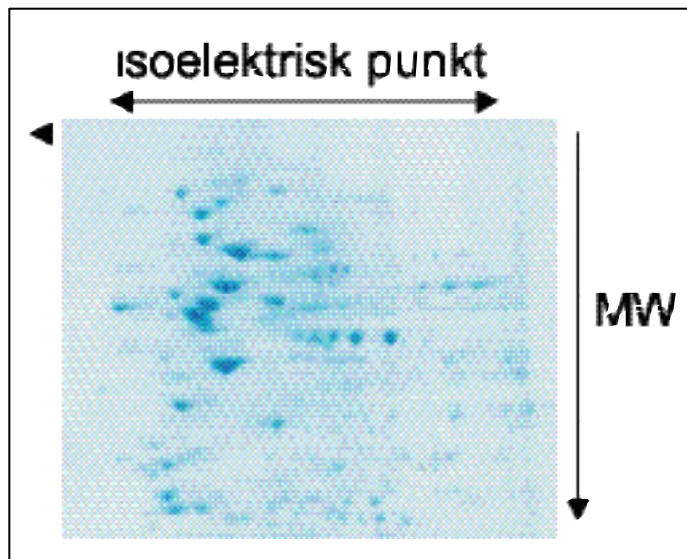
Beslægtede arter kan have homologe proteiner, der er nogenlunde ens i opbygning og virkemåde. De indeholder ofte meget konserverede områder, hvilket betyder, at aminosyresekvensen stort set er uforandret. Mellem homologe proteiner er der typisk forskelle i bestemte områder. Nogle gange ikke ret meget - det kan være en udskiftning eller udeladelse af en aminosyre, eller det kan være en tilføjelse af en hel række af aminosyrer. Det er interessant rent evolutionsmæssigt, men kan også bruges direkte til at identificere proteiner ved sekvenssammenligning. Så ud over at kunne identificere et givet protein er det derfor også ofte muligt at afgøre, hvilken art det stammer fra, hvis man kender dele af proteinets aminosyresekvens.

Karakterisering af proteiner

Tidligere har det været et stort arbejde at identificere et protein. Der kunne foregå et stort karakteriseringsarbejde bestående af aktivitetsmålinger, størrelsesseparation og affinitetsoprensning. Det gik forud for sekventering af en mindre del af proteinet med Edman-degradering, hvor aminosyrer spalttes fra proteinet én efter én og bestemmes. Den opnåede aminosyresekvens kunne derefter sammenholdes med de relativt få kendte sekvenser, for at opnå identifikation af proteinet.

I dag er mange organismers genom sekventeret og oversat til proteinsekvenser, som er tilgængelige i databaser. Dette, sammenholdt med udviklingen inden for massespektrometri, har betydet, at proteiner kan identificeres hurtigere end nogensinde [1]. Ud over at være hurtigere end tidligere anvendte metoder udmærker massespektrometri sig ved stor specificitet og brug af en meget lille prøvemængde og er derfor blevet »the method of choice« til identifikation af proteiner.

Selvom man kan undgå en stor del af det tidligere karakteriseringsarbejde, er de klassiske proteinkemiske metoder imidlertid ofte relevante, når proteiner af særlig interesse skal isole-



Figur 1. Eksempel på separation af proteiner ved todimensional gelelektroforese.

AAS · ICP/MS
UV-VIS · LC/MS
GC/MS · FT-IR/NIR

**Ny LC-MS/MS?
- Så er det også os!**

Thermo
FISHER SCIENTIFIC CORPORATION
48 16 62 00 · Gydevang 17-19 · 3450 Allerød

res og karakteriseres. Kromatografi, isoelektrisk fokusering og gelelektroforese bruges ofte til at separere proteiner før en massespektrometrisk identifikation.

Isoelektrisk fokusering og gelelektroforese anvendes ofte i kombination, og kaldes todimensional-gelelektroforese (2DE). Ved 2DE separeres proteinerne først i forhold til deres isoelektriske punkt, hvorefter de separeres efter størrelse (figur 1). Forskning, der tager udgangspunkt i at sammenligne en celled eller en organismes totale proteinindhold (proteomet) under forskellige påvirkninger, anvender ofte 2DE til at sammenligne mængden af de enkelte proteiner udtrykt ved forskellige betingelser. Interessante protein-pletter på gelen kan dernæst skæres ud til massespektrometrisk analyse.

Proteinidentifikation ved massespektrometri

Identifikation af proteiner med massespektrometri indledes med en enzymatisk spaltning af proteinet til peptider (figur 2, side 16). Det gøres for at opnå mindre fragmenter i nogenlunde ensartet størrelse, som derefter ioniseres og analyseres i massespektrometret.

Det hyppigst anvendte enzym er trypsin, der kløver efter aminosyrerne arginin og lysin. Den ønskelige størrelse på peptiderne er 7-15 aminosyrer, men større og mindre peptider kan også analyseres.

De resulterende peptider introduceres i massespektrometret på to forskellig måder, enten ved »matrix assisted laser desorption« (MALDI) eller ved »elektrospray-ionisering« (ESI).

Ved MALDI fordampes og ioniseres peptiderne ved beskydning med en laserstråle, hvorefter de detekteres i massespektrometret. Teknikken er hurtig, men giver kun information om, hvor store de analyserede peptider er - såkaldt »peptide mapping«. ESI adskiller sig ved, at peptiderne tilføres i en væskefase og ioniseres i spændingsfeltet ved indgangen til massespektrometret. ESI er en langsommere teknik, men giver også mulighed for at få information om aminosyrerækkefølgen af de enkelte peptider.

På Teknologisk Institut karakteriseres proteiner med et massespektrometer med ESI, hvor der før instrumentet er tilkoblet en nanoflow HPLC. Herved separeres den komplekse peptidblanding på en nano-LC-kolonne med en indre diameter på 75 µm og ved flow på 250 nl/min før MS-analyse. Først bestemmes peptidernes masser (masse/ladningsforhold), og derefter fragmenteres de ved tandem-massespektrometri (MS/MS). Det resulterer i forskellig størrelse af peptidfragmenter, som detekteres og samles til præcis information om peptidets aminosyresekvens. Med disse informationer kan proteinet identificeres ved søgning i sekvens-databaser med forskellige søgealgoritmer.

Post-translatoriske modifikationer

Ud over identifikation af de udvalgte proteiner er det relevant ►


www.buhl-bonsoe.dk



Termometer med trådløse følere

Spar tid med Testo 735. Udfør flere målinger på én gang med trådløse følere.

- Op til 6 følere, trådløse/håndholdte
- Lækkert tidsløst design
- Hukommelse og software til PC
- Systemnejagtighed fra 0,05°C
- Måleområde fra -200°C til +1350°C
- Let anvendelig/logisk menu

Vrumgårdvej 12 · 2830 Virum · Tlf.: 45 95 04 10 · info@buhl-bonsoe.dk






Mød os på Hi-messen den 6.-9. september 2005 G-5634

ROTAN tandhjulspumper

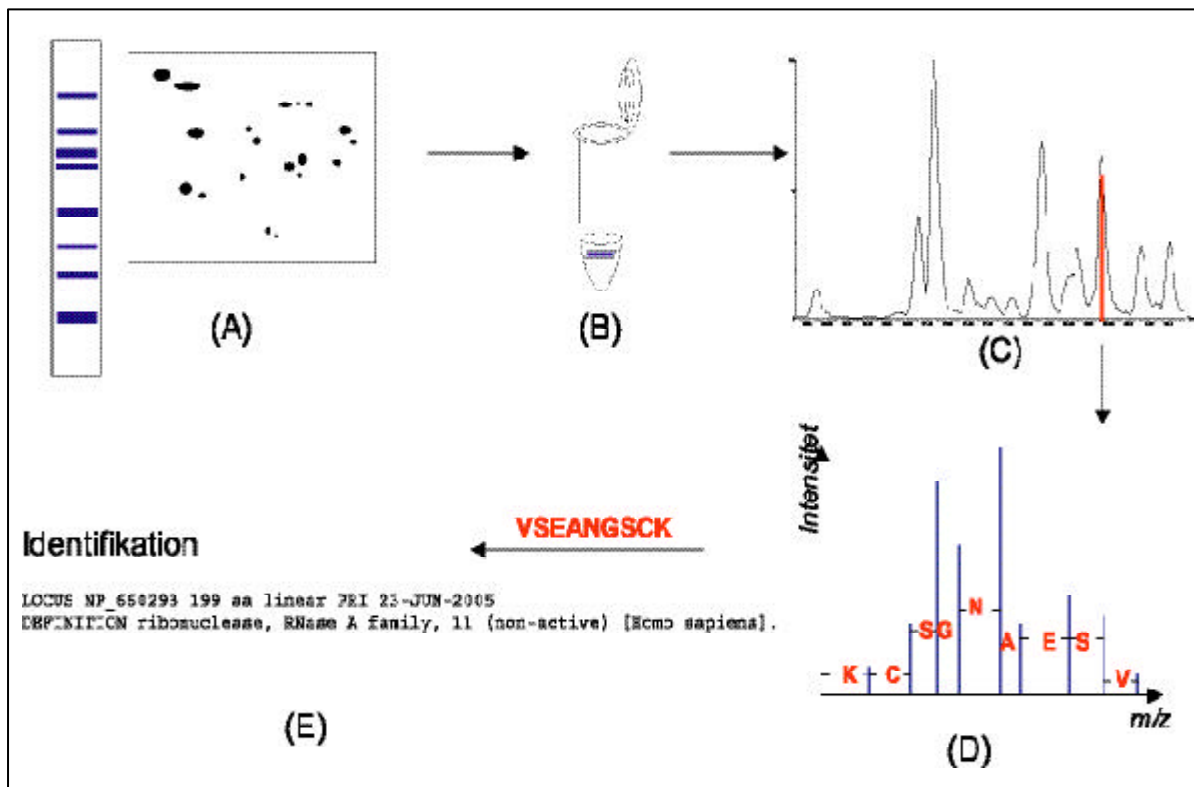
- Pladsbesparende vertikal udførelse
- Elopvarmning - økonomisk alternativ til damp- eller olieopvarmning




Elopvarmning Vertikal udførelse

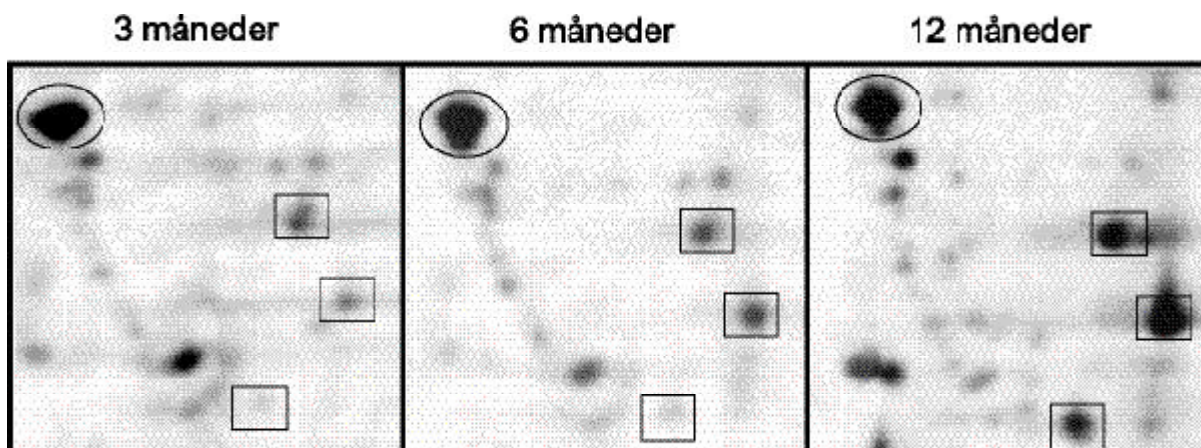
DESMI A/S

www.desmi.com - 96 32 81 11



Figur 2. Proteinidentifikation ved massepektrometri. (A) Den oprensede proteinblanding separeres ved gelelektroforese, 1D eller 2D. (B) Relevante gelbånd eller pletter udskæres og enzymbehandles (in-gel digestion). (C) Peptiderne ekstraheres og analyseres ved nano-LC og full-scan-MS og derefter ved tandem-massepektrometrisk analyse, hvor peptider udvælges til MS/MS-analyse. (D) Sekvensinformation fra MS/MS-spektre bruges til at søge i proteinsekvensdatabaser. (E) for identitet af proteinet.

Figur 3. Proteom-analyse af torskemuskel der har været frosset ved -30°C i 3, 6 eller 12 måneder. Protein i cirklen er identificeret som tropomyosin, mens proteinerne i firkanterne er identificeret som aktinfragmenter.



at se på de kemiske modifikationer. De tilføres ofte reversibelt til proteinet efter endt proteinsyntese, de såkaldte posttranslatoriske modifikationer (PTM). Typer af modifikationer omfatter bl.a. fosforylering, acetylering, methylering og glykosylering.

Modifikationer bidrager til yderligere at differentiere proteinerne efter proteinsyntesen og har bl.a. til formål at regulere deres funktion og aktivitet. PTM er essentielle, når det drejer sig

om f.eks. signaloverførsel i cellen, enzymaktivitet, hormonstimulering og regulering af cellevækst. Undersøgelser af PTM er derfor vigtige for forståelsen af en række cellulære processer.

Massespektrometri er et naturligt værktøj til at analysere PTM [2]. En modifikation afsløres i MS/MS-spektret ved at den aminosyre, hvorpå modifikationen er placeret, opnår en masseforøgelse, svarende til den pågældende kemiske gruppe.

Det kan være vanskeligt at måle, at et protein er modificeret, idet det ofte kun er en mindre del af den samlede mængde, der er modificeret. Derfor kan den modificerede fraktion opkoncentreres på forskellig måde inden massespektrometrisk analyse. Affinitetsoprensning er ofte benyttet. F.eks. kan fosfopeptider oprenses effektivt med Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) inden MS-analyse.

Patenterbare resultater

Ovennævnte teknikker anvendes i vores laboratorium til løsning af mange

Rietschle Thomas
 Vakuumpumper
 Lavtrykskompressorer
 Sidekanalblæsere
 www.rtpumps.dk
 e-mail: rtpumpsdk@rtpumps.com
 +45 59 44 40 50

www.mikrolab.dk
 Alt i udstyr og tilbehør
 til laboratoriet
 Vi bygger også kundespecifiseret udstyr
 Spørg først ML - det betaler sig!
MIKROLAB AARHUS

forskelligartede problemstillinger, både i langvarige forskningsprojekter med virksomheder, sektorforskningen og universiteter, men også i korterevarende, rekvirerede ad hoc-opgaver. Der er mange forskellige eksempler på samarbejdsprojekter, der har ført til spændende, patenterbare resultater.

Et samarbejde med en bioteknologisk virksomhed havde til formål at karakterisere overfladeproteiner fra mælkesyre bakterier. Disse bakterier indtages sammen med syrnede mælkeprodukter og har en helbedsfremmende, en såkaldt probiotisk effekt. Vha. bakteriernes specielle overfladeassocierede proteiner kan de hæfte sig til slimlaget i tarmen og giver dermed en ønskelig bakterieflora. Viden om disse proteiner muliggør en målrettet forskning i at øge den probiotiske effekt.

En anden bioteknologisk virksomhed, der arbejder inden for kræftforskning, er interesseret i at kende en bestemt post-translational modifikation på et protein. Denne modifikation har effekt på cancercellers levedygtighed, og resultaterne skal bruges til at udvikle ny medicin.

Inden for fødevarerforskningen har vi isoleret og karakteriseret skimmelhæmmende proteiner fra plantefrø. Disse proteiner er en naturlig del af spirende frøes forsvarsmekanisme mod netop skimmelsvamp, og det forretningsmæssige ønske er at kunne bruge disse proteiner som erstatning for nuværende konserveringsmidler.

Proteinændringer i fisk

Fryselagringsforsøg med fisk har vist tab af strukturelle og smagsmæssige egenskaber [3]. Danmarks Fiskeriundersøgelser har gennem flere år arbejdet med proteinkvalitet af fisk med en proteomics-orienteret vinkel for at forstå og imødegå kvalitetsændringer på proteinniveau. Ændringerne kan omfatte oxidation, krydsbinding eller nedbrydning af proteinerne. Viden, om hvilke proteiner, der ændrer sig, er vigtig for at kunne forstå mekanismen i kvalitetsændringen under lagring.

I samarbejde med Teknologisk Institut er der identificeret flere proteiner, der ændrer mængde ved langtidsopbevaring, bl.a. aktin og tropomyosin, der stammer fra fiskens muskelfæv. I figur 3 ses udsnit af 2D-geler, hvor intensiteten af de markerede pletter angiver en ændring. Proteom-gelerne er lavet på Danmarks Fiskeriundersøgelser og analyseret af Inger V. H. Kjærsgård. En nærmere beskrivelse af proteomanalysen og MS/MS af forskproteinerne er beskrevet i [4].

Fra forskning til kvalitetskontrol

Karakterisering og identifikation af proteiner ved massespektrometri er relevant i mange forskellige discipliner, både på det klassiske proteinkemiske område, i den bioteknologiske forskning, men også i den fødevarer teknologiske udviklingsproces.

Anvendelsesområdet strækker sig fra forskning til kvalitetskontrol.

E-mailadresser:

Mette Rindom Nørrelykke: mette.rindom.norrelykke@teknologisk.dk
Hans Peter Sørensen: hans.peter.sorensen@teknologisk.dk
Hans Christian Beck: hans.christian.beck@teknologisk.dk

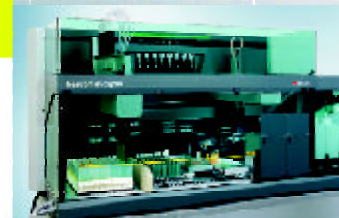
Referencer

1. Lane, C.S. Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005; 62: 848-869
2. Mann, M., Jensen, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotech.* 2003; 21: 255-261.
3. Mackie, I. M. The effects of freezing on flesh proteins. *Food Rev. Int.* 1993; 9: 575-610.
4. Kjærsgård, I.V.H., Nørrelykke, M.R., Jessen, F. Changes in cod muscle proteins during frozen storage revealed by proteome analysis and multivariate data analysis. *Proteomics*. Indsendt.

If you want to save time and money on EIA processing...

Visit us at
Biotech Forum & Scanlab,
Stockholm
Oct 10-12, 2005,
Booth C06:39

Talk to Tecan



Freedom EVOLyzer® for improved automation of Enzyme Immunoassays

The Freedom EVOLyzer is Tecan's new IVD-D compliant Enzyme Immuno Assay (EIA) analyzer family, enabling fully automated microplate processing – from the primary tube to result evaluation. Impressive features like customizable worktable layout, common pre-dilution, up to 12 heated incubation and 32 plate storage positions, continuous loading of samples and combination of different tests in one plate, makes it ideal for every diagnostic laboratory. Parallel pipetting and continuous loading cut process time by up to 40%. Due to scalability in instrument size and numbers of tips, low to high throughput customers are equally well served. The easy-to-use, touch screen compatible EVOLyzer Software is built according to IVD-D standards and allows different operating modes, including bi directional ASTM Interface.

To find out more about the Freedom EVOLyzer systems or any of our products, please talk to Tecan.

www.tecan.com

TECAN

Automated liquid handling | Components | Detection
| Customer support | Applications and solutions

Tecan Nordic AB Denmark Telephone +45 70 224 450

