

Moderne Proteindiagnostik: das Potential zeit- aufgelöster Fluoreszenz

Thomas Kreisig, Susen Mairif, Dr. Thole Züchner, Institut für Bioanalytische Chemie, Fakultät für Chemie und Mineralogie, Biotechnologisch-Biomedizinisches Zentrum, Universität Leipzig

In der proteinbasierten Diagnostik stehen heute zwei Hauptprobleme im Vordergrund. Dies ist zum Einen – bedingt durch die Komplexität des humanen Proteoms und die niedrigen Proteinexpressionslevel einer Vielzahl von Biomarkern – die Sensitivität der eingesetzten Methoden. Zum Anderen ist für viele Anwendungsbereiche der Zeitfaktor entscheidend, zum Beispiel in der Notfallmedizin („point of care-Diagnostik“), um eine patientenspezifische und zeitnahe Diagnostik zu ermöglichen. Die seit langem etablierte Technik der zeitaufgelösten Fluoreszenz hat durch neuentwickelte Farbstoffe und Fluoreszenzscanner das Potential, diesen Herausforderungen zu begegnen.

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass die Analyse des Proteoms zentral für das Verständnis und Monitoring von Krankheitsprozessen ist. Veränderungen auf Proteinebene sind Folge oder Ursache eines Großteils der bekannten Krankheitsbilder. Somit sind viele Methoden der quantitativen Proteindiagnostik Schlüsseltechnologien für die Pharma- und Biotechnologiebranche, aber auch für den Forschungsmarkt. Seit langem kämpfen die Marktteilnehmer mit altbekannten Problemen, die mit der Analyse komplexer Proteingemische einhergehen. An dieser Stelle sei nur kurz auf die an anderer Stelle ausführlich geschilderte Problematik eingegangen.

In erster Linie stellt die Komplexität von Proteomen ein zentrales Problem dar: die Zahl der Proteinvarianten zum Beispiel im Humanproteom wird auf 100.000 bis 1.000.000 geschätzt^{1a-c}. Diese Proteine werden gewebeabhängig in den unterschiedlichsten Konzentrationen pro Zelle exprimiert. Zu der großen Varianz an Proteinen kommen die vielfältigsten Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikation (z.B. Phosphorylierung, Acetylierung, Glykosylierung, Methylierung, Ubiquitylierung) dieser Proteine hinzu. Mehr als 300 unterschiedliche Arten der posttranslationalen Modifikationen sind heute bekannt², die in unterschiedlichsten



We know bioprocessing

As the industry leader for benchtop bioprocessing solutions, we have defined the state-of-the-art in Parallel Bioreactor Systems. Our best-in-class configurable control systems coupled to innovative information management solutions support interconnectivity to 3rd party offerings.

DASGIP – We know bioprocessing – since 1991.

Please visit us at BIOTECHNICA 2011, Hall 9/Booth G27



www.DASGIP.com

DAS
GIP
TECHNOLOGY

DASGIP – Parallel Bioreactor Systems for Unparalleled Results.

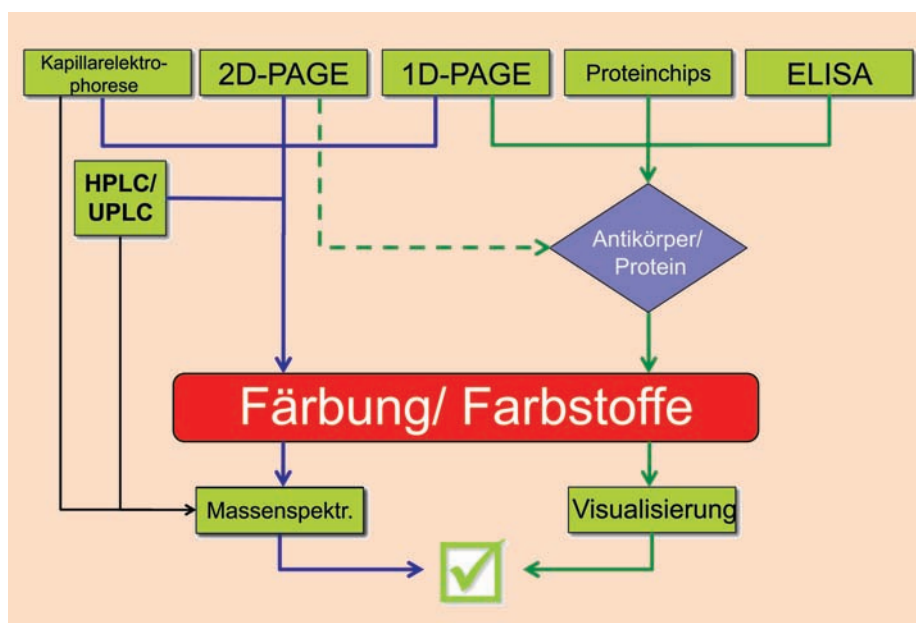


Abb. 1: Die meisten analytischen Nachweisverfahren für Proteine basieren auf der Anwendung von Färbemethoden zur Visualisierung. Klassisches Beispiel ist dabei die 2D-Gelelektrophorese (2D-PAGE), bei der die Proteine zunächst angefärbt werden müssen, bevor sie verdaut und massenspektrometrisch analysiert werden können. Ein anderes Beispiel ist der Einsatz von fluorophor- oder enzymmarkierten Antikörpern im Bereich ELISA/Immunoblot.

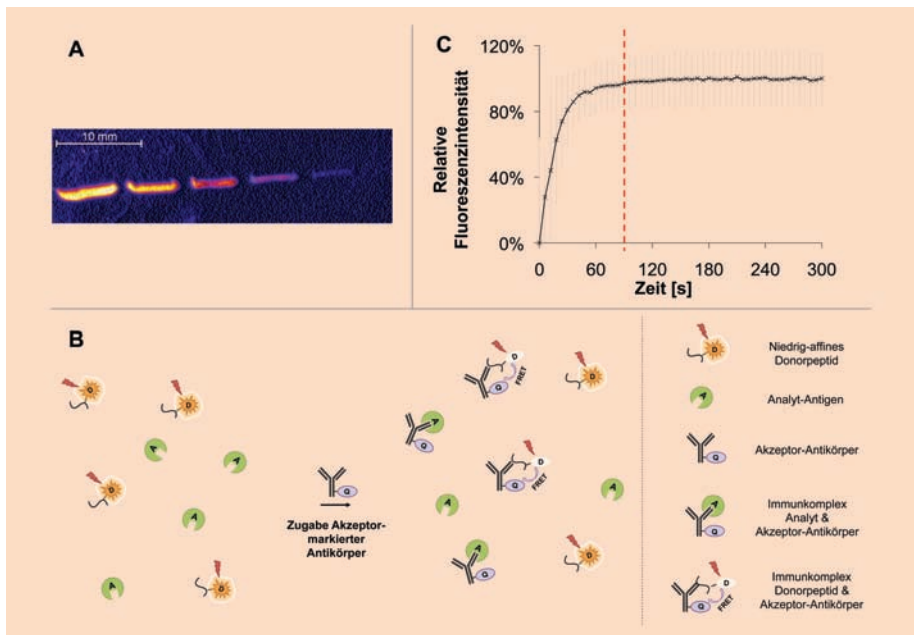


Abb. 2 A: Zeitaufgelöster Fluoreszenzscan eines SDS-Polyacrylamidgels (Detektionswellenlänge 616 nm). Aufgetragen wurde eine Verdünnungsreihe (10 pmol bis 3 fmol) eines mit einem Lanthanidfarbstoff⁵ markierten Proteins (Lysozym). Der Farbverlauf von blau über lila, rot, gelb bis weiß entspricht zunehmenden Signalintensitäten. B: Prinzip des schnellen homogenen Immunoassays. Die Probe wird mit einer definierten Menge an niedrig-affinem Peptid versetzt. Dieses trägt das Donorfluorophor. Nach der Zugabe von Akzeptor-markiertem Antikörper bindet dieser sowohl an die Donorpeptid- als auch an die Analytmoleküle. Je mehr Analytmoleküle vorliegen, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal, da weniger Donorpeptidmoleküle durch den Akzeptorantikörper gebunden werden und dessen Fluoreszenz gelöscht wird. C: Kinetik des homogenen FRET-Immunoassays. Eine Signalsättigung ist nach 90 Sekunden erreicht (nach (10)).

Kombinationen bei jedem Protein auftreten können. Das Resultat ist ein äußerst komplexes Bild des Proteoms, das zudem ständigen Veränderungen unterliegt.

Von großer Bedeutung bei der Proteomanalyse ist die Notwendigkeit, Proteine spezifisch zu detektieren sowie zumindest semiquantitativ bestimmen zu können. Diese quantitative Analyse stellt im Falle des Proteoms eine besondere Herausforderung dar, da die Expressionslevel von Proteinen innerhalb eines Proteoms enormen Schwankungen unterliegen: stark exprimierte Proteine können so um neun bis zwölf Größenordnungen konzentrierter vorliegen³ als schwach exprimierte Proteine wie beispielsweise einige Transkriptionsfaktoren oder Zelloberflächenrezeptoren. Dementsprechend müsste eine ideale Quantifizierungsmethode für Proteome eine Linearität des Signal- zu Proteinkonzentrationsverhältnisses von ebenso neun bis zwölf Größenordnungen aufweisen. Eine solche Methode existiert nicht.

Linearer Bereich aktueller Methoden der Proteinquantifizierung

Weitverbreitete Färbemethoden bei der Gelelektrophorese, zum Beispiel die Coomassie- oder Silberfärbung, erreichen im besten

Fall zwei Größenordnungen an Linearität. Auch andere Färbeverfahren⁴ übertreffen selten mehr als drei Größenordnungen an Linearität. Diese unbefriedigenden Linearitätsbereiche verhindern so unter Umständen, dass die eigentlich interessanten quantitativen Proteinexpressionsveränderungen gar nicht oder inkorrekt detektiert werden können, weil sich das Messsignal entweder im Untergrund oder bereits teilweise oder vollständig im Sättigungsbereich der Quantifizierungsmethode befindet. Langwierige und sehr kostenintensive Optimierungsverfahren sind die Folge. Aufgrund limitierten biologischen Probenmaterials müssen sie oft auch ganz ausbleiben. Daher gibt es einen hohen Bedarf, Methoden mit größeren linearen Detektionsbereichen für die Proteindiagnostik zu etablieren. Oft steht zugleich der Bedarf im Raum, auch mit kleinen Probenmengen noch gut quantifizieren zu können, so dass die Methoden gleichzeitig ein sehr gutes Detektionslimit aufweisen müssen, um klinisch relevante Proteinkonzentrationen überhaupt nachweisen zu können.

Für die Proteinanalytik stehen heute eine ganze Reihe von etablierten Techniken zur Verfügung. Eine Übersicht über die bekanntesten Techniken – ohne Anspruch auf Vollständigkeit – ist in Abbildung 1 gezeigt.

Auffallend ist, dass die aufgeführten Techniken mit wenigen Ausnahmen alle auf eine Methode zur Visualisierung der Proteine angewiesen sind, zum Beispiel Färbeverfahren. Ein klassisches Beispiel stellt hierbei die ein- oder zweidimensionale Gelauswertung mit anschließender massenspektrometrischer Proteinidentifizierung dar: um entsprechende Proteinspots massenspektrometrisch identifizieren zu können, muss die Lage des Proteins im Gel zunächst bekannt sein. Klassischerweise kommen hierzu Coomassie- oder Fluoreszenzfärbungen zum Einsatz, deren Nachweisgrenzen nach wie vor um mehrere Größenordnungen schlechter als die der im Anschluss einsetzbaren Massenspektrometrie sind. Somit werden die Forderungen nach sensitiven Visualisierungsmethoden verbunden mit weiten linearen Quantifizierungsbereichen immer lauter.

Ultrasensitive Proteinquantifizierung mit erweitertem linearem Bereich

Ansatzpunkte für solche Nachweisverfahren liegen neben den seit langem existierenden radioaktiven Assays mit all ihren Nachteilen unter anderem Methoden, die zeitaufgelöste Fluoreszenz zur Detektion einsetzen. Zeitaufgelöste Fluoreszenz meint hierbei den Einsatz von lanthanidbasierten Farbstoffen mit langer Fluoreszenzlebenszeit nach Anregung. Da sich die Lebenszeiten solcher Farbstoffe mit bis zu einigen Millisekunden deutlich von den Lebenszeiten fluoreszenter Trägermaterialien oder biologischer Proben (wenige Nanosekunden) abheben, ist durch ihren Einsatz eine Fluoreszenzmessung möglich, die störende Hintergrundsignale ausblendet, indem das Signal erst nach Abklingen der Hintergrundfluoreszenz quantifiziert wird. Die Folge solcher Messungen sind interessanterweise nicht unbedingt starke Messsignale, aber hervorragende Signal zu Rauschverhältnisse, die eine sensitive Diagnostik ermöglichen. Hinzu kommt, dass – durch die geringen Hintergrundsignale bedingt – dramatisch verbesserte Signal-linearitäten von fünf Größenordnungen erreicht werden können⁵. Durch unlängst am Markt etablierte Fluoreszenzscanner und neuartige Lanthanidfarbstoffe, die auch im nahen UV-Bereich anregbar sind⁵, ist es aktuell zudem möglich, auch gelbasierte Diagnostik mit zeitaufgelösten Fluoreszenzfarbstoffen effizient durchzuführen. Der hochauflösende Scan eines mit einem solchen lanthanidbasierten Farbstoff kovalent markierten Proteins ist in Abbildung 2A dargestellt. Hierzu wurde Lysozym als Modellprotein mit dem lanthanidbasierten

Farbstoff Eu[LH] markiert und mittels SDS-PAGE und zeitaufgelöster Fluoreszenz direkt im Gel analysiert. Aufgrund des geringen Hintergrundsignals ist eine Quantifizierung so weitgehend unabhängig von der Matrix möglich und erlaubt nicht nur eine sensitive Proteindetektion, sondern auch weite lineare Quantifizierungsbereiche.

Über die Fragestellung der sensitiven Detektion hinaus drängt sich für viele Anwendungsaspekte im Bereich Proteindetektion ein weiterer Faktor in den Vordergrund: die Frage des Zeitbedarfs. Gelbasierte Methoden wie SDS-PAGE und immunchemische Verfahren wie ELISA benötigen mehrere Stunden bis einige Tage, bis ein Analyseergebnis vorliegt. Für einige Anwendungen sind diese Methoden jedoch schlicht zu langsam. Dazu zählen die Diagnostik in Notfallsituationen, wie etwa bei Herzinfarkt und Schlaganfall, oder die Überwachung relevanter Analysenparameter während einer Operation. Daneben ist auch die vor-Ort-Diagnostik eine wichtige Anwendung. Schnelle und einfache Assays werden über die Proteinanalytik hinaus zum Beispiel auch für die Analytik von Drogen, Toxinen, explosionsgefährlichen oder anderen Risikostoffen benötigt. Hier ist neben der Zeit vor allem die einfache Anwendbarkeit wichtig.

Für diese Anwendungsfälle kommen homogene Immunoassays in Frage, in denen die Immunreaktion in homogener, flüssiger Phase stattfindet und oft über Fluoreszenztechniken wie Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) detektiert wird. Beim FRET-Assay findet die Fluoreszenzlöschung eines Donorfluorophors durch die räumliche Nähe eines Akzeptormoleküls statt. Dazu werden der Detektionsantikörper und das dazugehörige Antigen mit je einem Farbstoff des Donor-Akzeptor-Paares markiert. Bindet der Antikörper das Antigen, kommt es zunächst zur messbaren Fluoreszenzlöschung. Zugabe der zu analysierenden Probe mit dem Ziel-Analyten führt zur Verdrängung des markierten Antigens aus dem Immunkomplex, das Donor-/Akzeptor-Farbstoffpaar

wird räumlich getrennt, und der gemessene Anstieg der Donorfluoreszenz korreliert mit der Konzentration an Analyt.

Durch die Einsparung von mehreren arbeits- und zeitintensiven Wasch- und Inkubationsschritten, die bei heterogenen Immunoassays wie ELISA nötig sind, kann bei den homogenen Immunoassays die Assayzeit auf zehn Minuten bis wenige Stunden verringert werden⁶⁻⁹. Das ist zwar kurz, aber für einige Anwendungen, wie die beschriebenen Notfallsituationen, immer noch zu langsam. Daher besteht weiterer Optimierungsbedarf.

In der Literatur beschriebene homogene FRET-Immunoassays funktionieren gewöhnlich so, dass in einem ersten Schritt der Immunkomplex aus markiertem Antigen und Antikörper hergestellt wird. Erst dann wird durch Zugabe des Analyten das markierte Antigen aus dem Komplex verdrängt. Dieser Prozess dauert mindestens zehn Minuten⁶, bis das Signal Sättigung erreicht. Verändert man diese Vorgehensweise dahingehend, dass die Probe im ersten Schritt mit einer definierten Menge an markiertem Antigen versetzt und erst dann Antikörper zugegeben wird, kann die Assayzeit erheblich verkürzt werden¹⁰, da alle Antikörper-bindenden Moleküle dem Antikörper gleichzeitig ausgesetzt werden und keine Verdrängungsprozesse mehr stattfinden müssen. Dieses relativ einfache und auf konventionellen Fluorophoren basierende Prinzip ist in Abbildung 2B und die resultierende Assaykinetik in dem Antikörper 2C gezeigt (nach (10)). Das Signal erreichte bereits nach 90 s eine stabile Sättigung. Das bedeutet eine entscheidende Verkürzung der Assayzeit, die neue Anwendungsgebiete wie die Diagnostik im Notfallbereich und die Proteinanalyse innerhalb kürzester Zeit eröffnet. Aufgrund der lange bekannten Limitationen homogener Assays erreicht auch der hier beschriebene Assay nur moderate Sensitivitäten. Für die Zukunft ist es also auch in diesem Bereich eine Herausforderung, die bereits erreichte, sehr kurze Assayzeit mit verbesserter

Sensitivität zu kombinieren. Wie bei vielen anderen Proteinanalysemethoden bietet sich auch beim homogenen Assay vor dem Hintergrund des üblicherweise vorhandenen biologischen Hintergrundsignals die zeitaufgelöste Fluoreszenz an, um Sensitivitäten und lineare Quantifizierungsbereiche weiter zu optimieren.

Literatur

- [1a] Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J et al. Science. 2005; 309:1559-1563.
- [1b] Claverie JM. Science. 2005; 309:1529-1530.
- [1c] Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, Veenstra TD, Adkins JN, Pounds JG, Fagan R, Lobley A. Mol Cell Proteomics. 2004; 3:311-326.
- [2] UniProt Knowledgebase: Swiss-Prot Protein Knowledgebase, TrEMBL Protein Database: Controlled vocabulary of posttranslational modifications (PTM) <http://www.uniprot.org/docs/ptm>
- [3] Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JG. Electrophoresis. 2000; 21:1104-1115.
- [4] Weiss W, Weiland F, Görg A. Methods Mol Biol. 2009; 564:59-82.
- [5] Zuchner T, Schumer F, Berger-Hoffmann R, Mueller K, Lukas M, Zeckert K, Marx J, Hennig H, Hoffmann R. Anal Chem. 2009; 81:9449-9453
- [6] Qin QP, Peltola O, Pettersson K. Clin Chem. 2003; 49:1105-1113.
- [7] Tan C, Gajovic-Eichelmann N, Stöcklein WF, Polzius R, Bier FF. Anal Chim Acta. 2010; 658:187-192.
- [8] Claret EJ, Ouled-Diaf J, Seguin P. Comb Chem High Throughput Screen. 2003; 6:789-794.
- [9] Mayilo S, Ehlers B, Wunderlich M, Klar TA, Josel HP, Heindl D, Nichtl A, Kürzinger K, Feldmann J. Anal Chim Acta. 2009; 646:119-122.
- [10] Kreisig T, Hoffmann R, Zuchner T. Anal Chem. 2011; 83:4281-4287

Korrespondenzadresse

Dr. Thole Züchner
 Bioanalytik - Ultrasensitive Proteindetektion
 Biotechnologisch-Biomedizinisches
 Zentrum
 Institut für Bionalytische Chemie
 Universität Leipzig
 Deutscher Platz 5
 04103 Leipzig
 Tel.: +49-(0)341-97 313-90
 zuechner@rz.uni-leipzig.de
 www.uni-leipzig.de/uspdu



VERABSCHIEDEN SIE SICH VON LATEX.

Schützen Sie Ihre Mitarbeiter, Ihre Prozesse und die Umwelt mit **KIMTECH SCIENCE* Nitrilhandschuhen**.

Bestellen Sie **KOSTENLOS** Ihren **persönlichen Probehandschuhpack** und erhalten Sie einen **Reisewecker** mit dazu www.kcplatexfree.com/de

Starten Sie in einen latexfreien Tag!



KIMTECH
SCIENCE* BRAND