

Das methodische Paper:
Phospho-Proteom in Freiburg

Kleines Moos, viel los

■ Ein Moos für Pharming, Systembiologie und grüne Biotechnologie? Am Institut für Biologie in Freiburg ist man auf dem Weg dorthin.

Die Phosphorylierung ist ein zentrales Steuerelement im Zellgeschehen. Von einem experimentellen Zugang zum jeweiligen Status des Phosphoryloms in verschiedenen Situationen versprechen sich Forscher weltweit daher neue Erkenntnisse über das Zusammenspiel der Proteine bei der Regulation zellulärer Funktionen. Dimitri Heintz, der kürzlich am Lehrstuhl für Pflanzenbiotechnologie der Freiburger Albert-Ludwigs-Universität promovierte, konnte nun zusammen mit Eric Sarnighausen und „Boss“ Ralf Reski eine Methode veröffentlichen, die das Screenen des „Phosphoryloms“, also des Anteils phosphorylierter Proteine am Proteom, ermöglicht (*Electrophoresis* 25, S. 1149).

Ralf Reski und seine Mitarbeiter arbeiten in mehreren Projekten mit *Physcomitrella patens*, dem Kleinen Blasenmützenmoos – ein Organismus, mit dem auch die Industrie große Hoffnungen verbindet. Nicht von ungefähr unterstützt BASF das relativ junge Institut für Pflanzenbiotechnologie; in den letzten fünf Jahren stellte das Unternehmen Reski und Co. 10 Millionen Euro zur Verfügung.

Mutanten in Winterstarre

Physcomitrella patens ist ein idealer Modellorganismus für höhere Pflanzen allgemein. Seine vergleichsweise einfache Struktur prädestiniert das Moos geradezu für Anwendungen in der Biotechnologie. Mittels homologer Rekombination können einzelne Gene gezielt manipuliert werden, ein Verfahren das mit pflanzlichen Zellen bisher nicht gelingt. Wegen des haploiden Chromosomensatzes wirken sich Änderungen des Erbguts stärker auf den Phänotyp aus, Rückschlüsse auf die Funktion einzelner Gene lassen sich so leichter ziehen.



Sorgen für Bewegung im Bioreaktor: Ralf Reski (r.), Dimitri Heintz (3.v.r.), Eric Sarnighausen (3.v.l.) samt Team.

In ihrem zentralen Projekt züchten die Freiburger Forscher Mutanten, die sie anschließend auf Eigenschaften wie Resistenz gegen Dürreperioden oder extremer Kälte testen. Im Zentrum für Angewandte Biowissenschaften, einer Forschungseinrichtung der Universität, lagern auf diese Weise bereits 75.000 Moosmutanten – schockgefroren, bis sie für weitere Experimente aus der künstlichen Winterstarre befreit werden.

Aceton statt Harnstoff

Auf dem Weg zum Phosphorylom brachte Heintz zuerst die gezüchteten Zellen in ein einheitliches Entwicklungsstadium. Mit diesen Proben wollte er verfolgen, wie externe Signale im Zellinneren weitergeleitet werden. Ähnliche Untersuchungen könnten in Zukunft wichtige Daten für die Konstruktion einer Zelle *in silicio* liefern, da hier Proteine nicht isoliert betrachtet werden, sondern als Teil einer Signalkaskade, mit der die Zelle auf Reize reagiert. Solch weiterführende Arbeiten planen auch Reski und Co. – und spähen schon nach kompetenten Kooperationspartnern im neu genehmigten Freiburger Zentrum für Biosystemanalyse (ZBSA).

Doch zurück zu Heintz. Messungen von Low-abundance-Proteinen – Proteinen also, die nur in sehr geringer Anzahl vorliegen – stellen hohe Ansprüche an die Probenvorbereitung. Das Peptidgemisch muss hierbei jede Stufe unverändert passieren. Doch bereits der initiale Schritt, die Fragmentierung der Proteine mittels Trypsin, brachte Heintz in Schwierigkeiten. Ansonsten übliche Methode konnte er nicht anwenden.

Die Lösung brachte schließlich ein Protokoll aus der 2D-Elektrophorese, welches auf Harnstoff basiert. Obwohl es anfangs vorkam, dass 16 Stunden nach Zugabe des Trypsins plötzlich keine Proteine mehr da waren. Wie Heintz schließlich realisierte, hemmte Harnstoff nur in größeren Konzentrationen alle Enzymaktivitäten. Vor der Zugabe von Trypsin musste er den Ansatz aber verdünnen, da dieses sonst ebenfalls nicht gewirkt hätte. Dabei rena-

turierten indes auch einige zelluläre Proteasen und hinterließen einen unverwertbaren Molekülmix. Schließlich sorgte die Extraktion mit Aceton für die gewünschte irreversible Denaturierung und befreite die Ansätze gleichzeitig von Fremdstoffen.

Für die Trennung von phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Proteinen benutzten Heintz und Co. die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC). Eine Methode zur Durchführung dieser Analysen mit pflanzlichem Material war jedoch nicht bekannt. Und das Protokoll einer US-Gruppe, die vielversprechende Ergebnisse mit Hefe veröffentlicht hatte, ließ sich nicht auf *P. patens* übertragen: Bei der Aufarbeitung gingen große Teile der Probe als Niederschlag verloren, und die Behandlung mit Phenol führte zu Modifikationen, die den späteren Nachweis der Proteine verhinderten.

Auf der Suche nach einer geeigneten IMAC-Matrize erihlet Heintz schließlich die besten Ergebnisse mit einer Eisen(III)-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Matrix. Diese drängte die Störungen durch unspezifisch gebundene Fragmente weit genug zurück und hob die Auflösung bis in den Bereich der Low abundance-Proteine an.

Reiche Beute

Der Erfolg all dieser Basteleien: Im IMAC-Eluat fanden die Freiburger 253 Peptide. Für einen großen Teil davon konnten sie Ein- oder Mehrfachphosphorylierungen nachweisen. Und über EST-Datenbanken konnten sie einige Proteine bereits identifizieren. Darunter auch typische Vertreter aus Signaltransduktionswegen.

Diese Peptididentifizierung per Massenspektrometrie übernahmen Alain Van Dorsseleer und sein Team im Laboratoire de spectrométrie de masse Bio-Organique der Universität Straßburg. Eric Sarnighausen: „Das ist eine der erfreulichsten und effizientesten Kooperationen, die ich je erlebt habe.“ Und Reski ergänzt: „Ein Paradebeispiel für Synergien im trinationalen BioValley.“

NILS FALKE