

Free Flow Elektrophorese: Eine neue hochauflösende Dimension für die Trennung komplexer Protein- und Peptidgemische

Christoph Eckerskorn, Robert Wildgruber, Mikkel Nissum, Gerhard Weber

BD Diagnostics, Martinsried

► Das Human Genome Project wurde 2001 erfolgreich abgeschlossen. Entscheidend für den Erfolg und das rasche Erreichen der Ziele war unter anderem, dass die notwendigen analytischen Werkzeuge vorhanden waren, wie zum Beispiel Hochdurchsatz-Kapillarelektrophorese und PCR. Allerdings reicht die aus dem Genom extrahierbare Information nicht aus, um die Vorgänge im lebenden Organismus auf molekularer Ebene zu verstehen. Die Funktionsträger für diese Vorgänge sind die Proteine. Bis heute ist die Anzahl der Proteine einer Zelle, trotz der mittlerweile vollständigen Sequenzdaten, aufgrund der zahlreichen posttranslationalen Modifikationen nur grob abschätzbar. Zahlen zwischen 50.000 und mehr als 1 Million unterschiedlicher Proteine bzw. deren Isoformen werden diskutiert. Hinzu kommt, dass die Zusammensetzung der Proteinexpression, wie auch der kovalenten Modifikationen in Abhängigkeit der Dynamik zellulärer Vorgänge sich verändert.

Um die zellulären Prozesse auf Proteinebene zu verstehen, sind eine robuste und reproduzierbare Probengewinnung und deren Aufarbeitung für die weitere Proteinanalytik unabdingbar. Die biologischen Ausgangsmaterialien sind meist Zellen oder Körperflüssigkeiten und bestehen aus einer außerordentlich komplexen Zusammensetzung unterschiedlicher Proteine, Nucleinsäuren, Lipide, Zucker, Salze und einer Vielzahl kleiner organischer Moleküle. Die vielen Versuche der letzten Jahre, die Proteine einer Zelle oder die des Plasmas zu untersuchen, zeigten relativ rasch die Grenzen der zurzeit zur Verfügung stehenden Methoden auf, solche

komplexen biologischen Systeme hinsichtlich ihrer einzelnen Bestandteile quantitativ und ausreichend reproduzierbar zu trennen oder gar zu isolieren. Dies liegt vor allem an den extrem unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Proteine, wie beispielsweise der Löslichkeit, und den Wechselwirkungen vieler Proteine untereinander oder mit anderen Molekülen der Zelle und jeder Art von Oberfläche. Außerdem kommt erschwerend hinzu, dass die verschiedenen Proteine in sehr unterschiedlichen Mengen vorhanden sind, vom gering exprimierten bis zum hoch abundanten Protein, wie beispielsweise Albumin im Plasma.

Die Anforderungen an eine Methode zur Trennung komplexer Protein- oder Peptidgemische als ersten Schritt für eine weiterführende Analytik, sind durch die biologische Komplexität demnach vorgegeben: gewünscht sind eine hohe Selektivität, unabhängig von der Größe der Analyten, eine ausreichende Durchsatzkapazität, kurze Trennzeiten, niedrige Temperaturen und quantitativ unverfälschte Ausbeuten. Eine Technologie, die diese Anforderungen bereits weitgehend er-

füllen kann, ist die Free Flow Elektrophorese (FFE).

Prinzip der Free Flow Elektrophorese

Die FFE arbeitet nach dem Prinzip einer trägerfreien Elektrophorese, bei welcher der Trennprozess in Abwesenheit einer festen Matrix, wie beispielsweise Acrylamid in der Gelelektrophorese oder Trennphasen in der Chromatographie, stattfindet. Stattdessen werden die Analyte in einem kontinuierlichen laminaren Fluss von Pufferlösungen in einem senkrecht zum Fluss angelegten elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung und ihrer elektrophoretischen Mobilität getrennt. Der laminare Fluss wird am Ende der Trennkammer in 96 Kapillaren abgegriffen, wodurch eine kontinuierliche Fraktionierung im Mikrotiterplattenformat ermöglicht wird (Abb. 1). Entsprechend der Zusammensetzung der Trennmedien können drei völlig verschiedene Trennprinzipien angewendet werden: Isoelektri-

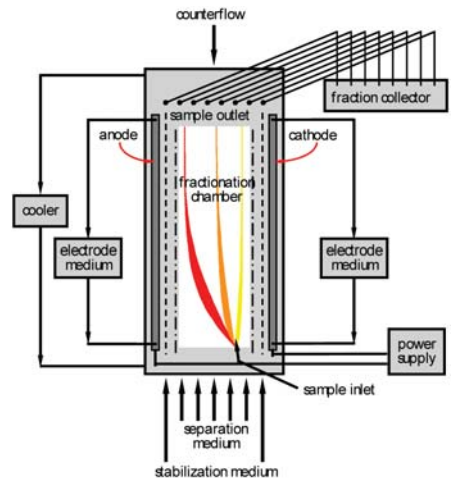


Abb. 1: BD™ Free Flow Elektrophorese System.

sche Fokussierung (IEF), Zonenelektrophorese (ZE) und Isotachophorese (ITP).

Ein weiterer genereller Unterschied zu anderen Trennverfahren ist die Probenaufgabe. Die Probe wird nicht als Batch aufgegeben sondern kontinuierlich in den laufenden laminaren Fluss injiziert. Die Probenvolumen können wenige 100 µl in einigen Minuten bis hin zu 100 ml in einem 24-stündigem Lauf entsprechen. Dabei können Probenmengen von bis zu über 30 mg/h getrennt werden. Die Trennzeit und damit auch die Verweildauer der Probe im elektrischen Feld ist abhängig von der Flussrate und beträgt in Abhängigkeit der elektrophoretischen Methode nur etwa 15–25 Minuten.

Aufgrund einer fehlenden Trennmatrix und den damit auch nicht vorhandenen Wechselwirkungen mit den Analyten können sowohl kleinste Moleküle (Peptide) wie auch große Polymere (Proteine) bis hin zu Partikeln (Zellorganellen) aufgetrennt werden, sofern diese eine Ladung tragen oder durch Modifikation geladen werden können. Neben denaturierenden Trennbedingungen sind auch native Fraktionierungen möglich, die beispielsweise zur

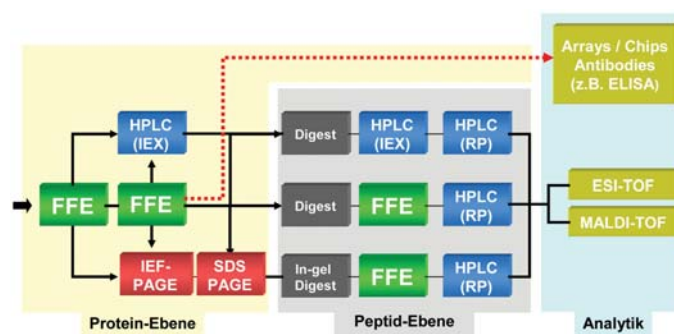


Abb. 2: Kombination der Free Flow Elektrophorese mit chromatographischen und geleelektrophoretischen Trenntechniken.

Tab. 1: Merkmale der FFE-Methode

Analyten, die getrennt werden können	Zellen, Mikroorganismen, Organellen, Proteinkomplexe, Membranproteine; Protein-Isoformen; Enzyme, Peptide, etc.
Elektrophoretische Trennverfahren	Isoelektrische Fokussierung (IEF) Zonenelektrophorese (ZE) Isotachophorese (ITP)
IEF	Lineare oder Stufen-pH-Gradienten, flache Gradienten bis zu 1 pH-Einheit
Immuno FFE	„Elektrophoretischer Shift“ nach Zugabe von Antikörpern
Trennbedingungen	nativ, denaturierend
Tolerierbare Additive (Beispiele)	CHAPS, CHAPSO, Digitonin, Dodecyl- β -D-maltoside, Octyl- β -D-glucoside, Triton X-100, Tween (IEF), SDS (ZE), DTT,
Probenvolumina	50 μ l (analytisch) bis >100 ml (präparativ)
Durchsatz	max. 30–40 mg/Stunde
Trennzeit bzw. Verweildauer des Analyten in der Trennkammer (Kontinuierliches Verfahren)	15–25 min

Trennung von Zellorganellen oder Proteinkomplexen eingesetzt werden. Die FFE ist darüber hinaus mit nichtionischen und zwitterionischen Detergenzien kompatibel, wodurch ansonsten schwerlösliche periphere wie auch transmembrane Membranproteine getrennt werden können. Die besonderen Eigenschaften des FFE-Verfahrens mit seinen über den Trenn- und Fraktionierungsprozess kontinuierlichen gleich bleibenden Bedingungen sowie fehlenden Wechselwirkungen zwischen Analyten und Trennmatrices sind der Grund für eine hohe Reproduzierbarkeit mit hohen Ausbeuten der FFE-Methode. Die wichtigsten Merkmale der FFE-Methode sind in *Tabelle 1* zusammengefasst.

FFE als ein integrierter Bestandteil des Proteomics-Workflows

Aufgrund der hohen Komplexität der molekularen Zusammensetzung biologischer Proben, wie beispielsweise Zellysate oder Körperflüssigkeiten, ist für eine Analyse der molekularen Komponenten eine Kombination von mehreren Trennschritten erforderlich. Dies gilt beispielsweise besonders für jene Proteine, die nur in wenigen Kopien exprimiert werden. Mit der FFE steht neben der klassischen zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) und

der Chromatographie eine weitere Trenndimension zur Verfügung. Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften des FFE-Verfahrens ist dieses besonders für die ersten Trennschritte einer komplexen biologischen Probe geeignet (*Abb. 2*). Solche können beispielsweise die Fraktionierung kompletter Zellysate sein (*Abb. 3*), aber auch die Isolierung verschiedener Zellorganellen^[1, 2], oder die Fraktionierung von Plasma in drei Pools mit vorwiegend aciden oder alkalischen Plasmaproteinen sowie in einen nahezu reinen Albuminpool (*Abb. 4*). In nächsten Schritten können die FFE-Fractionen dann einzeln entweder in einem anderen FFE-Verfahren oder in der hochauflösenden 2D-PAGE sowie alternativ in weiteren chromatographischen Schritten aufge-

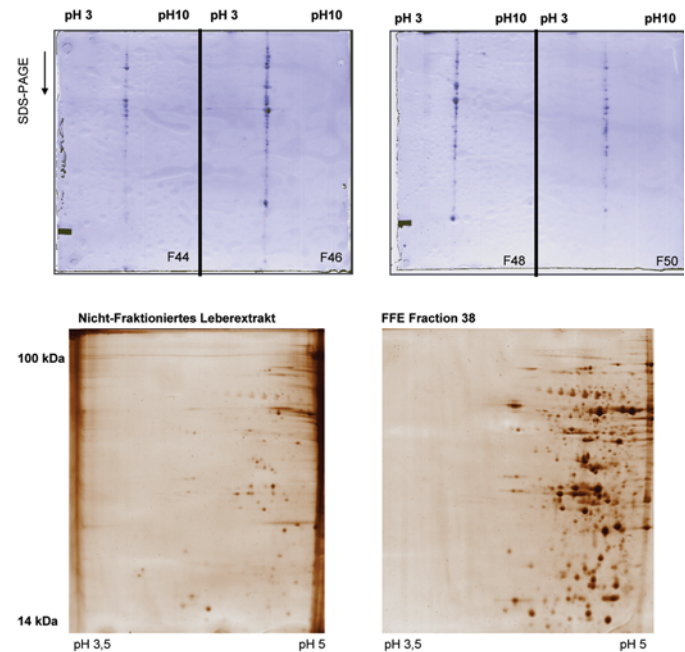


Abb. 3: Beispiele von FFE-Fractionen eines Rattenleberextraktes, aufgetrennt mit 2D-PAGE (pH 3–10 und pH 3,5–5). Die Auflösung der FFE-Auftrennung entspricht etwa 0,05 pH-Einheiten. In einem weiteren Schritt können nun einzelne FFE-Fractionen beispielsweise auf 2D-PAGE mit engen pH-Gradienten (unten) oder alternativ über chromatographische Verfahren weiter aufgetrennt werden.

trennt werden. Da die Analytmenge jeder FFE-Fraktion nur von der eingesetzten Menge an Ausgangsmaterial abhängig ist, können für die nachfolgenden Trennverfahren ausreichende Mengen zur Verfügung gestellt werden. Unter der Voraussetzung ausreichender Ausgangsmengen lassen sich somit prinzipiell über Kombinationen von mehreren Trennschritten auch Proteine mit sehr geringen zellulären Konzentrationen isolieren und im Empfindlichkeitsbereich der nachfolgenden Analy-

tik, wie z. B. Massenspektrometrie, LC-MS/MS, ELISA, etc. anreichern.

Die meisten Proteintrennungen werden unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, d. h. unter Bedingungen, bei denen nahezu alle Protein-Protein Wechselwirkungen aufgehoben werden um möglichst viele Proteine eines komplexen Gemisches reproduzierbar auftrennen zu können. In den letzten Jahren versucht man mehr und mehr Proteine in ihrem biologisch aktiven Kontext als Komplexe zu isolieren. Das FFE-Verfahren mit seinen kurzen Trennzeiten in matrixfreiem Puffer eignet sich besonders für solche nativen Trennungen, die in Kombination mit engen pH-Gradienten eine sehr hohe Auflösung bieten. Beispiele für solche Trennungen sind Proteinkomplexe, Enzyme oder Isoformen von rekombinanten Proteinen (*Abb. 5*). Die getrennten Proteinisoformen können zum Beispiel einzeln für den Nachweis der Wirkstoffzusammensetzung von Medikamentenproben getestet werden.

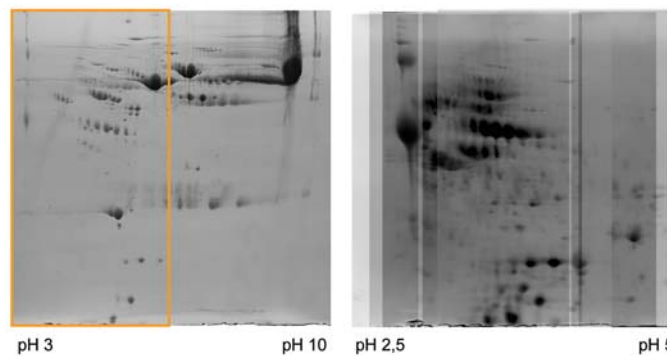


Abb. 4: Ein Vergleich zwischen nicht-prozessiertem humanem Plasma (links) und den sauren, Fractionen einer FFE-Trennung (rechts). Der vergleichbare pH-Bereich ist auf dem 2D-Gel (pH 3–10) eingerahmt. Die rechte Abbildung repräsentiert eine Überlagerung der einzelnen, über 2D-PAGE getrennten, FFE-Fractionen.

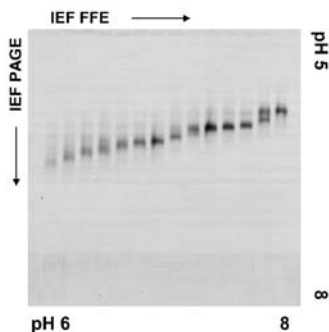


Abb. 5: Beispiel einer nativen Trennung von Protein-Isoformen eines Enzyms. Aliquots der einzelnen FFE-Fraktionen wurden in einem Gel mit immobilisiertem pH-Gradienten aufgetrennt.

Zusammenfassung

Die FFE bietet eine einzigartige Möglichkeit, nahezu alles, was eine Ladung trägt oder geladen werden kann, zu trennen. Unter diesen Bedingungen gibt es kaum Einschränkungen in der Größe des Analyten, die von kompletten Zellen und Mikroorganismen, über Organellen, Proteine, Peptide bis zu kleinen Molekülen variieren kann. Die Trennbedingungen können sowohl nativ wie auch denaturierend sein und je nach Trennziel elektrophoretisch angepasst werden. In Kombination mit den etablierten chromatographischen und gelelektrophoretischen Trenntechniken kann somit die Komplexität biologischer Proben weiter reduziert werden, um auch Proteine mit sehr geringen zellulären Konzentrationen isolieren zu können.

Literatur

- [1] **Voelkl, A., et al. (1998):** Isolation of peroxisome subpopulations from rat liver by means of immune free-flow electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 1140–1144.
- [2] **Zischka, H., et al. (2003):** Improved proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria by Free-Flow Electrophoresis. *Proteomics* 3: 906–916.

Korrepondenzadresse:

Dr. Christoph Eckerskorn
BD Diagnostics
Am Klopferspitz 19
D-82152 Martinsried
christoph_eckerskorn@europe.bd.com
www.bd.com/proteomics