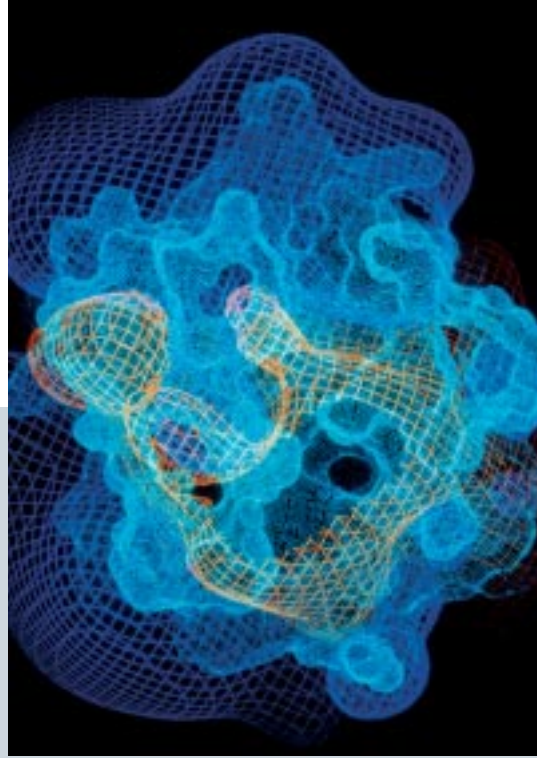


# Proteomik: Durchblick im Dickicht

**Mindestens 100 000 verschiedene Proteine enthält jede Zelle unseres Körpers, und in jedem Zelltyp unseres Körpers sind es andere. Proteine bilden ein riesiges, hoch komplexes Netzwerk: Sie bauen Moleküle auf und ab, sie transportieren, speichern, mobilisieren, sie lassen Zellen kommunizieren, erteilen und empfangen Befehle, sie erhalten die Zellen am Leben oder können sie in den Freitod stürzen. Genau in dieses Netzwerk greifen Medikamente ein – und nur langsam verstehen wir, wie, wo, wann und warum das geschieht. Die Proteomik kann nun helfen, Licht in dieses Dickicht zu bringen.**



Als zwei australische Proteinforscher 1994 auf einer Konferenz im italienischen Siena den Begriff «Proteom» prägten, hofften sie wohl auf etwas mehr Beachtung für ihre Disziplin. Denn sie lehnten das Wort an den Ausdruck «Genom» an, der in den 1990er Jahren die biologische Forschung bestimmte. Damals wurde mit einem bislang unbekanntem finanziellen, technischen und organisatorischen Aufwand die Erbgut-Entschlüsselung vorangetrieben. Hefe, Fadenwurm und schließlich sogar der

Mensch gaben ihre Baupläne preis. Die wesentlichen Produkte all dieser Baupläne, die Proteine, waren dagegen in dieser Zeit nur Nebensache; etwas für die Grundlagenforschung, für die, die es immer ganz genau wissen wollen. Das hat sich gründlich geändert.

### Begriffe

**Genom** die (weitgehend unveränderliche) Gesamtheit aller Gene eines Organismus

**Proteom** die (sich meist ständig ändernde) Gesamtheit aller Proteine eines Organismus

**Genomik** die Wissenschaft von Form, Funktion und Interaktion der Gene eines Organismus

**Proteomik** die Wissenschaft von Form, Funktion und Interaktion der Proteine eines Organismus

Längst wollen nicht mehr nur Grundlagenforscher genau wissen, was die Zelle aus ihrem Genom macht. Denn die Proteine sorgen für den eigentlichen Lebensablauf in einem Organismus, und sie sind daher der wichtigste Angriffspunkt, um – etwa durch Medikamente – in dieses Geschehen einzugreifen. Während eine Zelle allerdings immer nur ein Genom haben kann, ist ihr Proteom, also die Gesamtheit ihrer Proteine, höchst flexibel. Theoretisch ist es für jede Zelle zu jedem Zeitpunkt und sogar an jedem Ort in ihrem Innern verschieden: Im Gegensatz zum Erbgut werden Proteine ständig auf- und abgebaut, verändert, verlagert, verbunden oder getrennt. In dieses Dickicht Licht zu bringen, ist eine noch größere wissenschaftliche Herausforderung als die Entschlüsselung des menschlichen Genoms – und wird doch auch die Gen- und Genomforschung weiter voranbringen.

### Vielfältige Strukturen und Aufgaben

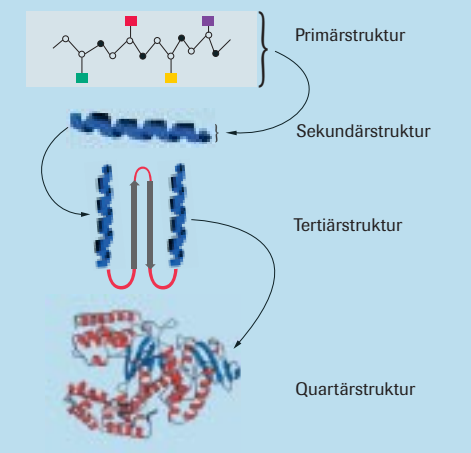
Die Bedeutung der Proteine liegt in der Vielfalt ihrer Aufgaben. Bei nahezu allen Prozessen, die das Leben eines Organismus oder – einfacher betrachtet – einer Zelle ausmachen, spielen sie eine zentrale Rolle:

- Strukturproteine sorgen für die Form und Gestalt der Zellen. Sie bilden das Zellskelett und einen großen Teil der äußeren Hülle. Im Körper bestehen zum Beispiel auch Sehnen und

Haare daraus. Strukturproteine stellen den größten Anteil an Proteinen in unserem Körper dar.

- Stoffwechselproteine oder Enzyme erledigen den ständigen Auf-, Um- und Abbau aller in einem Organismus benötigten oder anfallenden Stoffe und stellen die dazu erforderliche Energie bereit. Schon kleine Störungen in ihrem komplizierten Zusammenspiel können zu schwerwiegenden Krankheiten führen.
- Signalproteine sind die Träger der Kommunikation innerhalb (und zum Teil auch außerhalb) eines Organismus. Darunter fallen zum Beispiel Hormone, aber auch innerzelluläre Botenstoffe. Viele Arzneien greifen in die Signalwege des Körpers ein.
- Regulatorische Proteine regeln die verschiedenen Abläufe in einem Organismus. Dazu gehört auch das korrekte Ablesen der DNS, des Erbguts.

Daneben erfüllen Proteine noch eine Reihe weiterer Aufgaben, etwa als Antikörper im Immunsystem, als Sauerstofftransporter im Blut oder als Motorproteine im Muskel. Das komplizierte Netzwerk, das sich aus dem Zusammenwirken aller Proteine in einem Organismus ergibt, ist ebenso faszinierend wie unüberschaubar. Schätzungen gehen von etwa 100 000 verschiedenen Proteinen in jedem Zelltyp unseres Körpers aus – im Gegensatz zu nur etwa 30 000 bis 40 000 Genen in unserem Erbgut, das zudem in allen Zellen gleich ist. Aufgrund dieser Fülle an Daten, Wissen und Fragen in der Welt der Proteine sind Eingriffe darin,



Das Diagramm zeigt die hierarchische Organisation der Proteinstruktur in vier Stufen:

- Primärstruktur:** Eine lineare Kette von Aminosäuren, wobei verschiedene Aminosäuren durch farbige Quadrate (rot, grün, gelb, lila) markiert sind.
- Sekundärstruktur:** Lokale Faltungen der Kette, wie die typische Schraubform einer Alpha-Helix.
- Tertiärstruktur:** Die globale dreidimensionale Form des Proteins, die durch die Anordnung der Sekundärstrukturelemente entsteht.
- Quartärstruktur:** Die Anordnung mehrerer einzelner Proteineinheiten zueinander, um einen Proteinkomplex zu bilden.

**Vielfältig und wechselhaft: Der Aufbau der Proteine**

Eine Kette aus bis zu zwanzig verschiedenen Aminosäuren (Primärstruktur – die variablen Bereiche sind angedeutet durch die verschieden farbigen Quadrate) ordnet sich zu dreidimensionalen Strukturen an. Schraubige und flächige Bereiche sind dabei besonders häufig. Die Lage dieser so genannten Sekundärstrukturen zueinander bestimmt die Form eines Proteins, die so genannte Tertiärstruktur. Häufig arbeiten mehrere Proteine in Proteinkomplexen zusammen und bilden Quartärstrukturen; nur in dieser Anordnung erfüllen sie dann ihre vorgesehenen Aufgaben. Solche Proteinkomplexe bei der Reinigung in ihrer ursprünglichen Form zu erhalten, ist besonders schwierig.

etwa durch Medikamente, bislang weitgehend dem Prinzip von Versuch und Irrtum unterworfen. Die Proteomforschung soll das nun ändern.

### **Proteinkataloge für Ordnung und Überblick**

In einem ersten Schritt arbeitet eine Vielzahl von Laboratorien weltweit an einer möglichst kompletten Liste aller im menschlichen Körper vorkommenden Proteine. Diese Liste ist vergleichbar mit der Sequenz des menschlichen Genoms: Eine in sich aussageleere Sammlung, aber zugleich eine ungeheuer wichtige Grundlage für die weitere Forschung. Ebenso wie Genforscher die DNS-Sequenz nach Genen und regulatorischen Elementen durchforsten, könnten Proteinforscher bei ihren Experimenten auf diesen Proteinkatalog zurückgreifen. Weiterhin erleichtert der Vergleich von Genom und Proteom die Suche nach neuen Genen und bietet damit auch den Genomforschern ein zusätzliches Hilfsmittel zur Interpretation ihrer Ergebnisse.

In einem nächsten Schritt wird dann das Proteom in Abhängigkeit von Zeit, Ort und vor allem von äußeren Einflüssen betrachtet. Zwar untersucht man das Erscheinen oder Verschwinden von Proteinen bei einer Krankheit oder bei Zugabe eines Wirkstoffs schon seit Jahrzehnten. Jedoch wird die Suche nach solchen Änderungen mithilfe der Proteomik viel systematischer. So zeigt eine «differenzielle Proteinexpressionsanalyse», also der Vergleich des Proteoms zum Beispiel eines Gesunden mit dem eines Kranken unter gleichen Bedingungen, theoretisch alle Unterschiede im Proteom exakt und auf einen Blick auf. Kurz: Die Ergebnisse der Proteomforschung sollen helfen, Ursachen und Wirkungen von Krankheit und Therapie schneller, einfacher und besser zu ermitteln.

### **Bindeglied Proteomforschung**

In der Medizin stellt die Proteomforschung daher ein wichtiges Verbindungsglied zwischen verschiedenen Bereichen und Disziplinen dar.

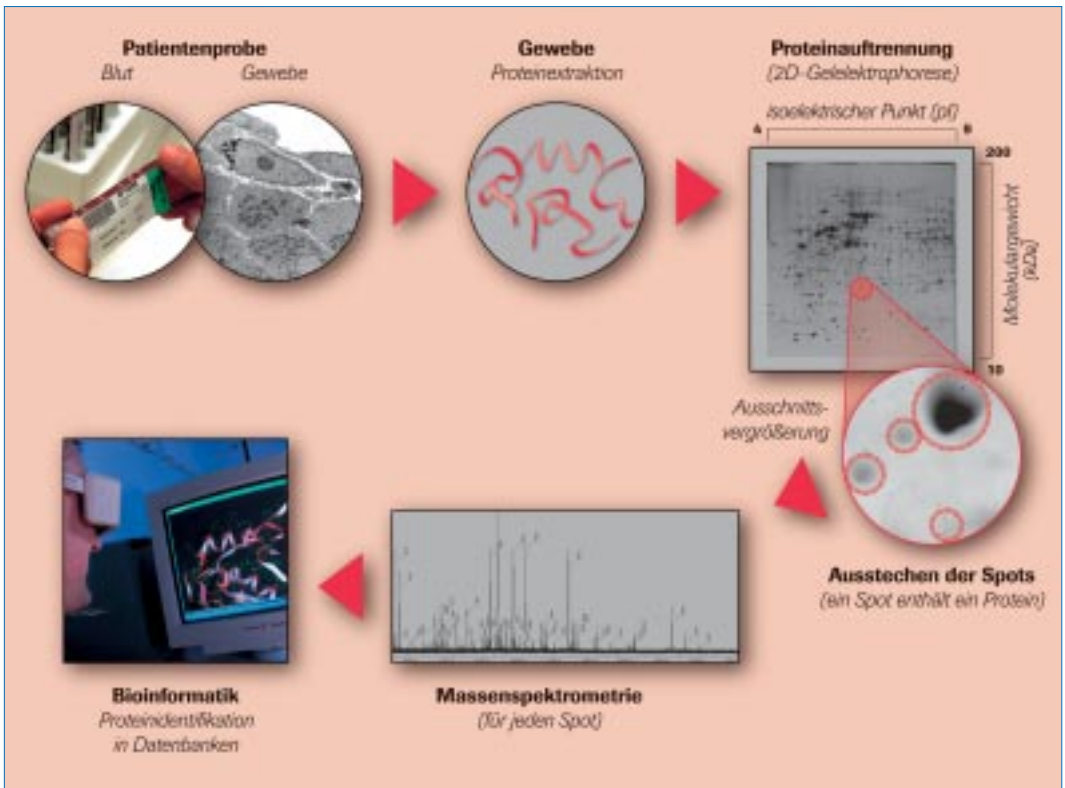
- **Diagnose.** Erst auf der Ebene der Proteine zeigen sich die Auswirkungen genetischer Veränderungen. Ob eine bekannte Mutation tatsächlich zur Krankheit führt oder aber durch andere Faktoren ausgeglichen wird, lässt sich häufig erst durch einen Proteintest erkennen. Proteine können daher – eher als Gene – als Marker für die Diagnose komplexer Krankheiten dienen.

- **Therapie.** Medikamente verändern in aller Regel nicht das Erbgut. Selbst wenn sie dessen Verwendung beeinflussen, entfalten sie doch ihre Wirkung erst durch Veränderungen des Proteoms. Darin spiegelt sich wider, ob und wie stark ein eingesetzter Stoff wirkt. Eine Proteom-Momentaufnahme kann also zum Beispiel dem Arzt helfen, eine Therapie richtig auf die individuellen Bedürfnisse des Patienten abzustimmen.
- **Forschung.** Ein Ziel der Proteomik ist es, neue Stoffwechsel- und Signalwege zu finden, die zur Entstehung von Krankheiten beitragen. Jedes neu entdeckte Protein in einem solchen Weg ist zugleich ein möglicher Angriffspunkt für neue Wirkstoffe, ein Target. Die *Drug Discovery*, also die Wirkstoffsuche, soll durch die Proteomik einen wesentlichen Schub bekommen.
- **Entwicklung.** Je mehr über ein Zielmolekül bekannt ist, um so einfacher, schneller und sicherer lässt sich ein Wirkstoff entwickeln. Zudem kann das Proteom Hinweise auf Probleme und Nebenwirkungen liefern, bevor diese in klinischen Tests auftreten. So geben zum Beispiel bestimmte Markerproteine Hinweise darauf, dass eine Zelle mit einem für sie giftigen Stoff konfrontiert worden ist. Toxische Wirkungen neuer Medikamente können somit unter Umständen schon früh in deren Entwicklung vorausgesagt werden.

**Strategie: Standardisierung und Automatisierung**

Aufgrund ihrer großen Bedeutung hat die Proteinforschung schon immer eine zentrale Stellung bei der Suche nach neuen Diagnostika, Therapien und Verfahren eingenommen. Die meisten der heute eingesetzten Methoden waren lange vor der Sienauer Wortschöpfung bekannt. Die Proteomik ergänzt diesen Zweig der Biologie jetzt um die Möglichkeit, in extrem kurzer Zeit riesige Mengen an Daten zu sammeln und auszuwerten – ganz so, wie es in der Genomforschung der Fall ist. Und das erschließt der Proteomik neue Einsatzgebiete.

In einem klassischen Experiment wird jeweils ein einzelnes Protein isoliert, dann seine Identität, Form und Funktion ermittelt, gegebenenfalls das zugehörige Gen bestimmt und schließlich der Platz des Proteins im Netzwerk der Zelle gesucht. In der Proteomik geschieht im Grunde genau das Gleiche – nur dass Tausende von Proteinen gleichzeitig analysiert, identifiziert und quantifiziert, also ihre Mengen im Innern der Zelle festgestellt



Arbeitsabläufe einer Proteomanalyse unter Verwendung von 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF Massenspektrometrie. Die Proteine werden aus dem Probenmaterial, wie beispielsweise Blut oder Gewebe,

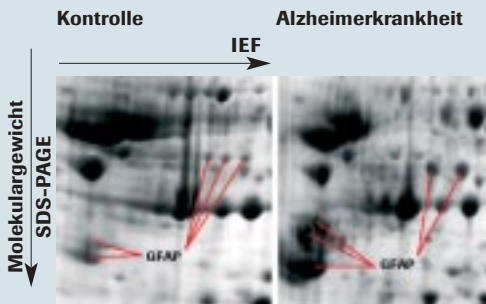
extrahiert und im 2D-Gel aufgetrennt. Dann werden die Proteinspots ausgestochen und die entsprechenden Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert.

werden. Dafür werden die verschiedenen Arbeitsschritte weitgehend automatisch und parallel durchgeführt und anschließend mithilfe leistungsfähiger Rechner und spezieller Programme ausgewertet.

### Trennung nach Ladung und Größe

Der erste Schritt ist dabei immer die Auftrennung des Proteingemischs in einer Probe. Die wichtigste Methode dafür ist – im klassischen wie im Proteomik-Experiment – die zweidimensionale («2D-») Gelelektrophorese. Diese Methode ist seit den 1980er Jahren Routine; auch die Konferenz in Siena, auf welcher der Begriff «Proteom» geboren wurde, befasste sich mit diesem Thema. Bei der 2D-Gelelektrophorese werden die Proteine aus einer Probe auf ein viereckiges Kunststoff-Gel aufgetragen. In diesem

## Wichtige Trennmethode: Die 2D-Gelelektrophorese



### Das Glia fibrilläre Protein (GFAP) wird vermehrt bei der Alzheimerkrankheit hergestellt.

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrer Ladung und ihrer Größe getrennt. Der erste Schritt ist dabei die Trennung nach der spezifischen Ladung durch eine isoelektrische Fokussierung (IEF). Das verwendete Polyacrylamid-Gel besitzt zu diesem Zweck einen pH-Gradienten. Legt man an das Gel eine Spannung an, wandern die Proteine entlang dieses Gradienten,

solange sie eine Ladung haben. Ist der isoelektrische Punkt eines Proteins erreicht, seine Nettoladung also gleich null, bleibt es stehen.

Im nächsten Schritt werden die bereits getrennten Proteine zusätzlich nach ihrer Größe sortiert. Das geschieht im rechten Winkel zur ersten Trennrichtung – der zweiten Dimension. Dafür gibt man das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zu. Dessen Moleküle lagern sich an die Proteine abhängig von deren Größe an. Wieder wird eine Spannung angelegt, allerdings bestimmt diesmal die Ladung des SDS, also letztlich die Größe der Proteine, die Wanderungsgeschwindigkeit. Diese Art der Trennung heißt SDS-PAGE oder Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Sehr ähnliche Proteine (zum Beispiel modifizierte Formen eines Moleküls) sind in herkömmlichen Gelen oft kaum zu trennen. In diesem Fall greift man auf Narrow-Range-Gele zurück, die in dem gesuchten pH-Bereich einen extrem flachen Gradienten besitzen. Auf diese Weise lassen sich selbst minimale Ladungsunterschiede nachweisen.

Gel werden sie zunächst nach ihrer Ladung und dann – im rechten Winkel zur vorherigen Trennrichtung – nach ihrer Größe getrennt. Wenn man die Proteine anschließend sichtbar macht, erhält man ein kompliziertes Fleckenmuster, bei dem jeder Fleck ein bestimmtes Protein darstellt. Je stärker dabei der Fleck ist, desto mehr von dem jeweiligen Protein war in der Probe vorhanden – wie auf einer Landkarte, in der große Städte durch große Punkte dargestellt sind. Tatsächlich spricht man von einer Proteomkarte, die sowohl die Art als auch die Menge der vorhandenen Proteine wiedergibt. Unter gleichen Bedingungen findet man ein bestimmtes Protein immer am gleichen Platz; so kann man unmittelbar erkennen, ob und in welcher Menge es in der untersuchten Probe vorliegt.

Ist das gesuchte Protein gefunden, wird der entsprechende Fleck aus dem Gel ausgeschnitten. Im klassischen Experiment geschieht das per Hand, in der Proteomik übernehmen Roboter diese Aufgabe. Für einen umfassenden Proteomvergleich und für besonders präzise Untersuchungen müssen allerdings möglichst alle Proteine einer Probe erfasst werden. Manche dieser Moleküle sind dabei in so geringen Mengen vorhanden, dass sie im Gel mit den herkömmlichen Färbemethoden nicht sichtbar

gemacht werden können; oft sind aber gerade solche seltenen Proteine als Angriffspunkte für Wirkstoffe interessant. Auch existieren von vielen Proteinen so genannte Isoformen, das sind leicht veränderte Varianten, die im 2D-Gel äußerst eng zusammenliegen. Um auch diese seltenen und variablen Moleküle zu erfassen, wird die 2D-Gelelektrophorese meistens durch eine Reihe von Trennverfahren verfeinert.

### **Vorsortierung erhöht die Auflösung**

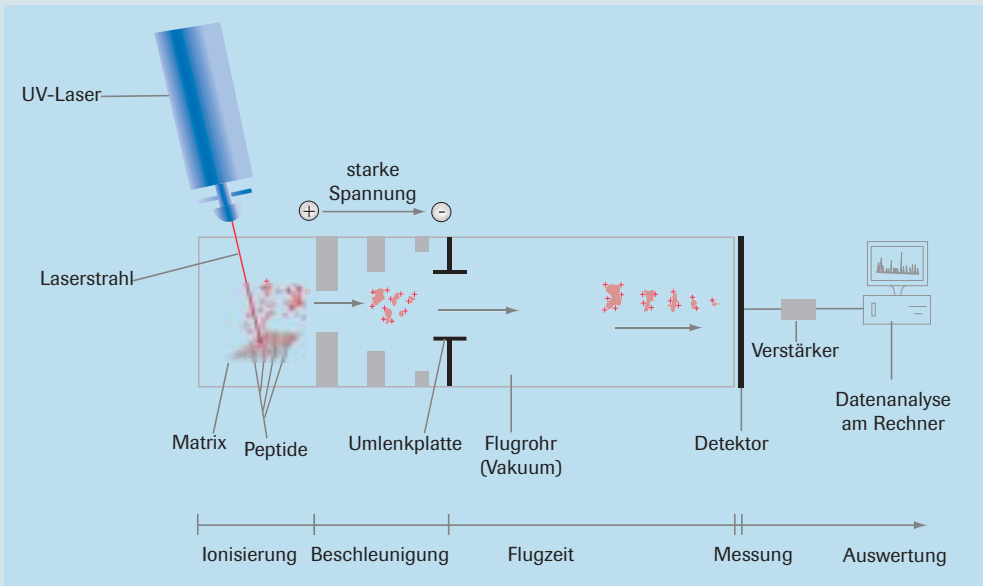
Bestandteile der zu untersuchenden Probe können so schon im Vorfeld durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt werden. Zudem stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, in denen die Proteine nach bestimmten Eigenschaften vorsortiert werden – zum Beispiel nach Ladung, Größe, Form oder Bindungsverhalten. Und auch das 2D-Gel selbst spielt eine Rolle: Beide Trennfaktoren, Ladung und Größe, können auf einen bestimmten Bereich eingegrenzt werden, in dem dann die Auflösung besonders groß ist. Für das Ausschneiden der Flecken schließlich haben Forscher von Roche ein gitterförmiges Werkzeug entwickelt, welches das Gel in 6000 winzige Stücke zerschneidet. Jedes dieser Stücke kann automatisch weiter untersucht werden.

Um die gesammelten Proteine zu identifizieren, werden sie in einem nächsten Schritt zerschnitten. Ähnlich wie Genomforscher die DNS mithilfe molekularer Scheren, den Nukleasen, in leichter zu sequenzierende Stücke zerlegen, nutzt man auch in der Proteinforschung Proteasen, also Enzyme, die Aminosäureketten an genau definierten Stellen durchtrennen. Es entsteht eine Mischung aus unterschiedlich großen Proteinbruchstücken, Peptiden genannt. Weil die Proteasen höchst spezifisch arbeiten – das Enzym Trypsin zum Beispiel schneidet immer nach den Aminosäuren Arginin oder Lysin –, ist die erhaltene Peptidmischung für jedes Protein/Protease-Paar typisch.

### **Jedem Protein seinen Fingerabdruck**

Um das zerschnittene Protein zu identifizieren, gibt man nun die Peptidmischung in ein Massenspektrometer. Wie der Name sagt, kann man mit diesem Gerät die Masse (also das Gewicht) von Molekülen erfassen. Für die Analyse der Peptidmischung wird diese auf ein Trägermaterial – eine Matrix – aufgetragen und mit einem Laser beschossen. Die Matrix nimmt die Energie des Lasers auf und überträgt sie auf die Peptide, welche dadurch ionisiert, also

## Der kleine Unterschied: Peptid-Fingerprinting



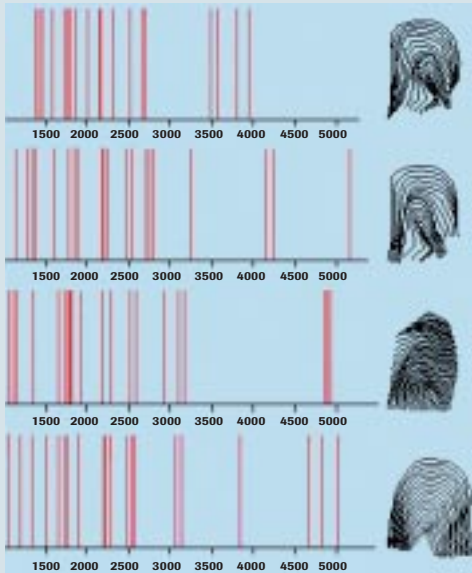
Bei der MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) wird die zu untersuchende Proteinprobe mit einer spezifischen Protease verdaut und das entstehende Peptidgemisch im Massenspektrometer auf eine Matrix aufgetragen. Die Energie eines darauf gerichteten Laserstrahls überträgt die Matrix auf die Peptide, welche dadurch ionisiert und verdampft

werden. Die geladenen Peptide gelangen in ein Flugrohr, an dem eine starke Spannung in Längsrichtung anliegt. Die Peptide folgen der Spannung und treffen am Ende des Rohres auf eine Messplatte – die leichten Moleküle zuerst, die schweren zuletzt. Gemessen wird die Zeit, welche die Peptide für ihren Weg durch das Flugrohr benötigen haben.

mit Ladungen versehen, und verdampft werden. Die geladenen Peptide fliegen nun entlang einer starken Spannung durch ein Flugrohr; am Ende dieses Rohres kommen die kleinen Peptide zuerst, die großen zuletzt an. Die Zeit, die sie bis dorthin benötigen, wird gemessen und gibt somit die Größe der Proteinstücke wider. Beschrieben wird diese Technik mit dem Wortungetüm MALDI-TOF MS, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry*.

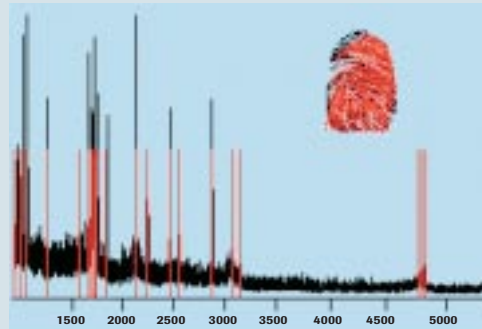
Das Ergebnis der Messung ist so etwas wie ein Fingerabdruck des untersuchten Proteins: ein unverwechselbares Spektrum, anhand dessen man das Molekül zweifelsfrei identifizieren kann. In der Tat nennen Proteinforscher ihr Vorgehen auch «Fingerprinting» und vergleichen ihre Arbeit mit der Kriminalistik, in der mithilfe von Fingerabdrücken nach Verbrechern ge-

## MALDI-TOF-Spektren in Proteinen



Durch MALDI-TOF MS erhält man ein Spektrum, das jeweils typisch für den gewählten Verdau und das in der Probe befindliche Protein ist – einen Fingerprint. Jeder Strich entspricht einem Signal von bestimmter Stärke und bestimmter Zeit. Der Fingerprint ist beliebig reproduzierbar und kann virtuell aus Datenbank-Proteinen errechnet werden. Das erhaltene Spektrum dient also der direkten Identifikation des Ausgangsproteins.

## Auffächerung des Signals durch Kohlenstoff-Isotop $^{13}\text{C}$



Eine Besonderheit des Massenspektrums ist die Auffächerung des Signals durch die natürliche Verteilung des schweren Kohlenstoff-Isotops  $^{13}\text{C}$  von etwa 1%. Bei größeren Peptiden ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass eines oder mehrere C-Atome in dem Molekül diese erhöhte Masse zeigen. Ihre statistische Verteilung führt zu einer Verbreiterung des Signals, sodass ein starkes, breites Signal ein schwaches darunter verbergen kann. Mit mathematischen Methoden und vor allem mit extrem empfindlichen Spektrometern lässt sich jedoch die Auflösung der Methode deutlich vergrößern. Zur Zeit liegt die Genauigkeit eines modernen MALDI-TOF MS bei etwa 10 ppm (parts per million).

sucht wird. Und genauso wie die Polizei einen Fingerabdruck vom Tatort mit jenen aus ihrem Archiv vergleicht, suchen die Forscher in ihren Datenbanken nach dem Protein, das zu ihrem Spektrum passt. Dafür ist es nicht einmal nötig, dass dasselbe Experiment schon einmal durchgeführt wurde: Heute lassen sich alle Proteine aus einer Datenbank «in silico», also virtuell, im Rechner mit der verwendeten Protease behandeln und massenspektrometrisch untersuchen. Um im Bild der Kriminalistik zu bleiben, würde dies bedeuten, den Fingerabdruck eines Verdächtigen aus dessen Foto errechnen zu können – eine Möglichkeit, um die vermutlich jede Polizei der Welt die Proteinforschung beneiden würde.

## **Form und Funktion gehören zusammen**

Bloße Datenbankvergleiche machen allerdings nur einen kleinen Teil der Proteinforschung aus.

Findet sich das untersuchte Protein nicht in einer der vielen Datenbanken, ist es also möglicherweise noch unbekannt, beginnt der eigentlich spannende Teil der Arbeit erst richtig: die Suche nach Form und Funktion des neuen Moleküls – und die Hoffnung auf einen möglichen Nutzen für die Medizin. Denn jedes neu entdeckte Protein kann zugleich einen neuen Eingriffspunkt in das molekulare Netzwerk in unserem Körper darstellen.

Die Suche nach der Form, also der Aminosäuresequenz und der äußeren Gestalt des Proteins, ist dabei noch die einfacher zu automatisierende Aufgabe. Die Abfolge der Proteinbausteine kann wieder in einem Massenspektrometer bestimmt werden; in diesem Fall werden die Peptide vom Ende her abgebaut und die einzelnen Bausteine der Reihe nach bestimmt. Ist die Aminosäuresequenz des Proteins bekannt, kann bereits daraus auf die Form des Gesamtmoleküls geschlossen werden – allerdings nur sehr bedingt. Denn auch wenn sich eine Aminosäurekette grundsätzlich von selbst anordnet, verläuft die Formbildung der Proteine in der Zelle doch oft auf hoch komplexen Wegen. Vielfach setzt der Körper beim Zusammenbau der Proteine Hilfsenzyme ein, die einen Teil der Kette festhalten, während der Rest noch gebildet wird. Ohne diese «Chaperons» (Anstandsdamen) genannten Helfer richten sich die Bausteine falsch aus. Dieser Vorgang, die «Proteinfaltung», ist ein wichtiges Forschungsfeld, auch in der Medizin: So führen etwa bei der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit falsch gefaltete Proteine zu den gefürchteten Hirnschäden. Dabei kommt es offenbar zu einer Kettenreaktion, in der falsch gefaltete Proteine die richtige Struktur anderer ebenfalls krankhaft verändern können.

## **Automatisierte Strukturanalyse**

Zu ermitteln, wie ein richtig gefaltetes Protein räumlich aussieht, war bis vor wenigen Jahren noch eine Doktorarbeit wert. Inzwischen aller-

dings hat die Proteomforschung auch diesen Aspekt der Wissenschaft weitgehend automatisiert und damit auch eine umfassende Strukturanalyse unseres Proteoms möglich gemacht. Das gilt besonders für die Röntgenstrukturanalyse, die wichtigste Methode bei der Formuntersuchung kleiner und mittlerer Proteine. Bei dieser Technik werden die Proteine in Wirtsorganismen, meistens Bakterien oder Hefen, massenhaft gezüchtet

## Function Follows Form: Rätsel Proteinstruktur



Die Struktur eines Proteins legt dessen Funktion fest. So sind Muskelproteine faserig, Membrankanäle röhrenförmig und Enzyme meist rundlich mit einer oder mehreren Vertiefungen, in die das Substrat passt. Links ist der Wirkstoff Herceptin gezeigt, ein Antikörper, der mit den gelb hervorgehobenen Bereichen an ein Brustkrebs verursachendes Protein binden kann. Für die Entwicklung von Medikamenten ist die Struktur des Zielproteins wichtig: Mit seiner Hilfe kann man Wirkstoffe „maßschneidern“ und somit viel Versuch und Irrtum vermeiden. Obwohl die Form eines Proteins letztlich durch seine Aminosäuresequenz festgelegt wird, ist eine Strukturvorhersage bislang praktisch unmöglich.

und dann kristallisiert. Früher galt die Kristallzucht fast als Kunst, die einige wenige Spezialisten mit «goldenen Händen» beherrschten; heute läuft sie automatisch ab und die Forscher müssen nur noch aus der Masse an Kristallen die geeigneten herausuchen. Die winzigen Kristalle – wenigstens ein zwanzigstel Millimeter Kantenlänge ist Pflicht – beschießt man dann mit Röntgenstrahlen. Auf dem Weg durch den Kristall werden die Strahlen von den Proteinmolekülen abgelenkt, und aus dem Muster dieser Abweichung können die Wissenschaftler schließlich die dreidimensionale Gestalt des Moleküls berechnen.

## Fischen nach dem richtigen Partner

Der weitaus schwierigere Teil der Analyse eines neuen Proteins ist allerdings die Suche nach seiner Funktion – das heißt nach seinem Platz im molekularen Netzwerk des Körpers. Auch in diesem Bereich hilft die Technik mit immer neuen Möglichkeiten; zum Beispiel mit Protein-Chips, millimetergroßen Silikonflächen, auf denen Tausende verschiedener Proteine angebracht sind. Bindet das neue Protein an eines der Moleküle auf dem Chip, ist davon auszugehen, dass es sich auch in der Zelle mit diesem Partner verbindet. Nur sind Proteine notorische Fremdgänger: Sie binden sich meist weder ausschließlich noch dauerhaft; zu einer ande-

ren Zeit, an einem anderen Ort, unter anderen Bedingungen machen sie gern etwas ganz anderes – mit anderen Proteinen, mit anderen Molekülen oder auch mit der DNS. Es ergibt sich also für jede einzelne Zelle in unserem Körper ein komplexes Netzwerk an Wechselwirkungen und Bedingungen, das zu überschauen ein Menschenhirn zu klein ist. Zum Glück gibt es dafür Computer.

Bioinformatik nennt sich die Zunft, die Ordnung in dieses Chaos zu bringen versucht. Und nicht nur das: Die Bioinformatiker stellen auch eine wichtige Verbindung her zwischen Genetik, Genomik und Proteomik. Denn sie bringen die Daten aus allen drei Disziplinen zusammen. Welches Gen gehört zu welchem Protein? Wann wird dieses Protein gebildet und warum? Und welche Signale im Erbgut geben dazu den Auftrag? Welche Proteine sind wiederum an der Kontrolle dieses Auftrages beteiligt? Und wo liegen deren Gene? Gene und ihre Produkte, die Proteine, sind nicht zu trennen. Das hat die Wissenschaft längst erkannt, und insofern ist die Proteomik eine notwendige Ergänzung der Genomforschung.

### **HUPO – die Human-Proteom-Organisation**

Entsprechend eng verläuft die Zusammenarbeit zwischen den Disziplinen. Die Proteomik schließt sich meist nahtlos an genetische und genomische Experimente an, deren Aussagen sie überprüft und erweitert. Und auch die transkriptomische Forschung, die sich den Arbeitskopien unseres Erbguts, der mRNA, widmet, wird oft mit Untersuchungen auf Proteinebene verknüpft. Damit diese Zusammenarbeit funktioniert und um vor allem die Kräfte der Proteomforschung weltweit zu bündeln, haben Proteomforscher inzwischen einen weltweiten Zusammenschluss nach dem Vorbild der Genomforschung gebildet: die Human-Proteom-Organisation, kurz HUPO. Diese Organisation soll eine Reihe von Aufgaben erfüllen:

- **Aufmerksamkeit.** Noch immer ist die Proteomforschung im Vergleich zur Genomforschung in der Öffentlichkeit recht unbekannt. Ihre Aufgaben und Ziele, vor allem aber auch ihre Bedeutung sollen daher herausgestellt werden. Letztlich will die HUPO deutlich machen, dass das menschliche Proteom mindestens ebenso viel Förderung und Forschungseinsatz verdient wie das Human-Genom-Projekt.
- **Koordination.** Bei der Entschlüsselung des menschlichen Genoms ist es am Ende zu einem viel beachteten Wettlauf zwi-

schen dem öffentlich finanzierten Human-Genom-Projekt und der privaten Firma Celera Genomics gekommen. Diese unerwartete Konkurrenz hat zwar sicherlich geholfen, das Ziel des Projektes schneller als gedacht zu erreichen. Allerdings ist viel Arbeit gleichzeitig zwei Mal gemacht worden – eine ungeheure Verschwendung von Forschungskapazität, die sich nach dem Willen der HUPO nicht wiederholen soll.

- **Proteinkatalog.** Entsprechend der Sequenz des menschlichen Genoms will die HUPO einen umfassenden menschlichen Proteinkatalog vorlegen, mit dessen Hilfe zum Beispiel potentielle Gene aus dem Human-Genom-Projekt überprüft werden können.

## **Mammutaufgabe Proteomik**

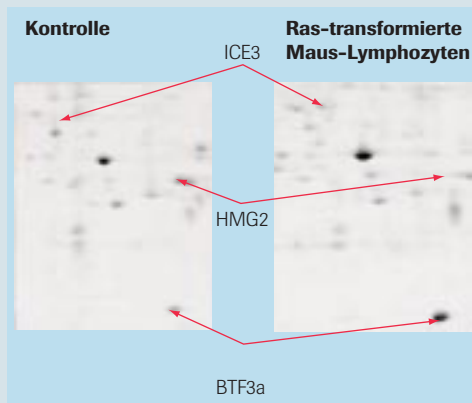
Bei ihren Bemühungen stößt die Proteomik jedoch auch auf Probleme. Eines der wichtigsten ist zugleich die zentrale Eigenschaft des Proteoms: seine Komplexität. Inzwischen steht fest, dass die Gesamtzahl der unterschiedlichen Proteine in unserem Körper diejenige der Gene um ein Vielfaches übertrifft. Schätzungen gehen von etwa 100 000 verschiedenen Proteinen pro Zelltyp unseres Körpers aus; manche davon werden fast überall, manche nur in einigen wenigen Zellen zu finden sein. Zurzeit umfasst zum Beispiel die Roche-Datenbank über 150 000 Massenspektren, entsprechend etwa 4500 Proteinen – es gibt also noch viel Arbeit zu tun. Zudem ist zu erwarten, dass manche Proteine und insbesondere manche Modifikationen, also nachträgliche Veränderungen, extrem selten sind. Im Gegensatz zu unserem Erbgut ist es demnach schwierig, den menschlichen Proteinkatalog irgendwann vollständig zu nennen, vermutlich sogar unmöglich: Die bloße Tatsache, dass schon lange kein neues Protein mehr gefunden wurde, wird nicht bedeuten, dass es keines mehr zu entdecken gibt (tatsächlich werden zum Beispiel in unserem Körper ständig neue Antikörper als Antwort auf Fremdstoffe gebildet). Das Gleiche gilt in noch größerem Maße für die Wechselwirkungen der Proteine untereinander und mit anderen Bestandteilen unseres Körpers – etwa den Genen. Hier sind nur die starken Wechselwirkungen leicht zu finden.

Ein weiteres Problem der Proteomforschung ist schon von ihrem «großen Bruder», der Genomforschung, bekannt: die Patente. Auch in diesem Bereich ist zu erwarten, dass vielfach erst die Gerichte klären werden, was wie geschützt werden kann. So-

lange hier jedoch Unsicherheit herrscht, ist jede Veröffentlichung für ein forschendes Unternehmen ein Risiko. Immerhin wird es sich als hilfreich erweisen, dass diese Problematik schon aus der Genomforschung hinlänglich bekannt ist.

### Erste Erfolge: neue Signalwege bei Krebs

Dutzende von Signalwegen sind an der Entstehung der verschiedenen Krebsarten beteiligt. Jeder neu entdeckte Weg bietet auch neue Angriffsmöglichkeiten für die Medizin. Die Proteomik kann helfen, solche Signalwege aufzuklären.



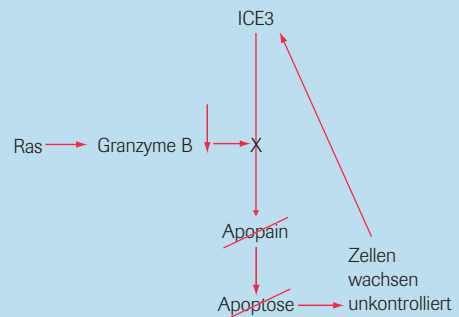
Das linke 2D-Gel zeigt einen Ausschnitt der Proteinausstattung einer normalen Zelle, das rechte den gleichen Ausschnitt bei einer Krebszelle. Deutlich sind Unterschiede zu erkennen:

- Ein Protein namens ICE3 erscheint in der Krebszelle vermehrt
- Die Menge des **High Mobility Group**-Proteins HMG2 ist dort reduziert
- Der Transkriptionsfaktor BTF3a wird vermehrt gebildet.

ICE3 spielt eine wichtige Rolle für den programmierten Zelltod. Dieser auch Apoptose genannte Selbstmord von Körperzellen geschieht, wenn das Erbgut einer Zelle zu stark geschädigt ist – und verhindert damit deren Umwandlung zur Krebszelle. Um diese Kontrollfunktion ausüben zu können,

wird ICE3 in gesunden Zellen von einem Enzym namens Granzyme B zu Apopain gespalten. Das 2D-Gel der Krebszellen deutet jedoch auf eine große Menge an ungespaltenem, also nicht aktivem, ICE3 hin. Aus einem anderen Experiment mit Genchips weiß man zudem, dass in den Krebszellen die Bauanleitung für Granzyme B fehlt. Aus der Kombination der Ergebnisse lässt sich schließlich der entsprechende Signalweg rekonstruieren:

### Signalweg-Schema



Auch die anderen beiden Proteine, deren Mengen in den Krebszellen verändert sind, stehen im Zusammenhang mit Krebs. HMG2 bindet an deformierte DNS – in den Krebszellen scheint das Protein zum großen Teil aus dem Zellplasma verschwunden zu sein, was auf Erbgutschäden der Zellen hinweist.

BTF3a ist ebenfalls ein DNS-bindendes Protein, jedoch ist es als Transkriptionsfaktor für das korrekte Ablesen von Genen zuständig. BTF3a wurde bisher nur in Darmkrebszellen vermehrt nachgewiesen – das Protein könnte sich daher als neuer Krebs-Marker erweisen.

## **Quellen**

- Langen H: Proteomics as a new field in biology: applications and potentials. Vortrag beim Roche Roundtable: Genetik und Genomik, Basel, Mai 2000
- Screening – Trends in Drug Discovery: Future Trends in Proteomics. Interview mit Hanno Langen in: Screening, 2/2001
- Brauckmann B: Proteinanalyse als Hilfsmittel bei der Erforschung molekularer Krankheitsursachen. Roche Facetten Nr. 14, 2000
- Human Proteome Organisation – Website: <http://www.hupo.org/>