

Bakterielle Proteinsekretion

Absolute Proteinquantifizierung erlaubt Einblicke in den Proteintransport

SANDRA MAAB

INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE, ABTEILUNG MIKROBIELLE PROTEOMICS,
UNIVERSITÄT GREIFSWALD

With the help of methodological adaptations and suitable protein standards, mass spectrometry can determine the number of protein molecules per cell. This article describes recent developments in absolute protein quantification extending the method to analytically challenging proteins from the cell membrane or the extracellular medium. Finally, the integration of such data leads to information on the speed of protein transport and thus provides new insights into bacterial cell physiology.

DOI: 10.1007/s12268-024-2344-1
© The Author(s) 2024

Die umfassende Untersuchung von Proteinen mittels Massenspektrometrie (MS) liefert schon lange wertvolle Erkenntnisse über biologische Prozesse in verschiedenen Organismen. Während die Proteomik zu Beginn ihrer Entwicklung vor allem qualitative Informationen zur Expression einzelner Proteinspezies lieferte, rückte in den letzten Jahren der quantitative Vergleich von Proteinabundanzen in den Fokus der methodischen Entwicklungen. Inzwischen ist der

relative Vergleich von Proteinmengen in proteomischen Studien Routine in vielen Laboren. Dennoch lassen sich die absoluten Konzentrationen verschiedener Proteine innerhalb der gleichen Probe oder von gleichen Proteinen in unterschiedlich aufbereiteten Proben über MS nicht ohne Weiteres bestimmen. Genau dies ist aber Voraussetzung für die globale Beschreibung von Stöchiometrie innerhalb von Proteinkomplexen und -netzwerken, für den Vergleich verschie-

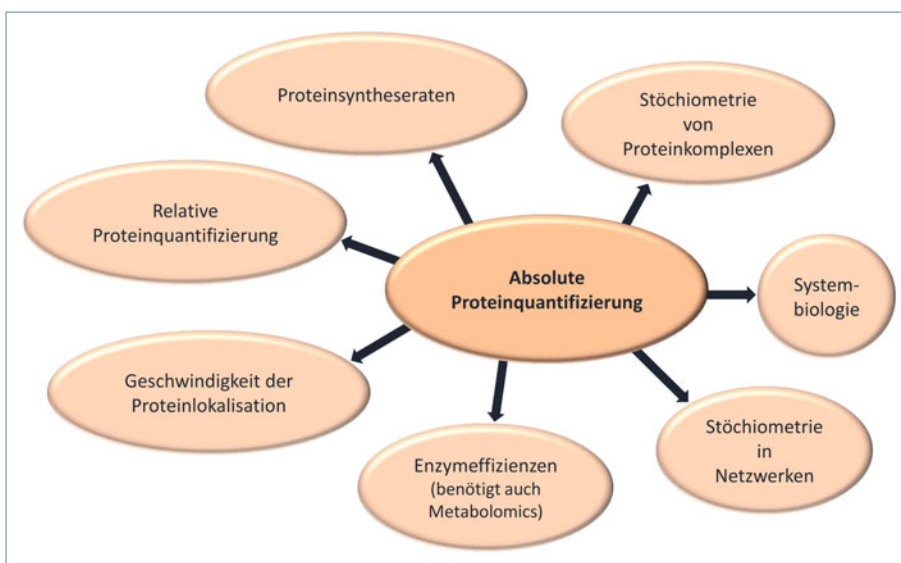
dener Proteinisoformentypen (z. B. modifizierte und unmodifizierte Varianten), für die quantitative Beschreibung der Proteinlokalisierung und, nicht zuletzt, für die systembiologische Beschreibung molekularer Zusammenhänge (Abb. 1).

Herausforderungen bei der absolute Proteinquantifizierung

Um mittels MS absolute Proteinmengen zu bestimmen, die der tatsächlichen Anzahl an Molekülen pro Zellen entsprechen, müssen verschiedene experimentelle Arbeitsabläufe angepasst werden (Abb. 2, [1–3]). Dazu gehört beispielsweise die genaue Bestimmung der Zellzahl und ggf. Zellgröße in einer Probe sowie die hochgenaue Protokollierung aller Probenvolumina, mit denen gearbeitet wird. Probenverluste sollten möglichst vermieden werden, was in den meisten Fällen Vorabexperimente zur Optimierung des Zellaufschlusses, der Löslichkeit verschiedener Proteine und optimalen Verdaubedingungen erfordert. Für die Übertragbarkeit der MS-basierten Abundanzinformation in absolute Proteinmengen ist es notwendig, geeignete Standards abzuleiten, die eventuelle Anreicherungs- und Konzentrierungsschritte während der Probenaufarbeitung quantifizierbar machen. Solche Anreicherungs- und Konzentrierungsschritte sind z. B. bei der Gewinnung von Membranproteinen oder der Extraktion von Proteinen aus dem Kulturüberstand notwendig. Die Zugabe von geeigneten Proteinstandards in bekannten Konzentrationen erlaubt es, final die Spektrenintensität der detektierten Peptide in absolute Proteinmengen zu übertragen.

Absolute Quantifizierung bakterieller Proteine unterschiedlicher Lokalisation

Um quantitative Aussagen über die Lokalisation bakterieller Proteine treffen zu können, muss eine absolute Quantifizierung der Konzentration dieser Moleküle in allen zu untersuchenden zellulären und extrazellulären Fraktionen stattfinden, also im Zytosol, der Membran und dem Kulturüberstand.



▲ Abb. 1: Mögliche Anwendungen der absoluten Proteinquantifizierung.

Während die absolute Quantifizierung zytosolischer Proteine abgesehen von der vorangehenden Methodenoptimierung relativ einfach erscheint, ist die Bestimmung genauer Proteinkonzentrationen für Membranproteine oder in den Kulturüberstand freigesetzte Proteine komplizierter (**Abb. 2**).

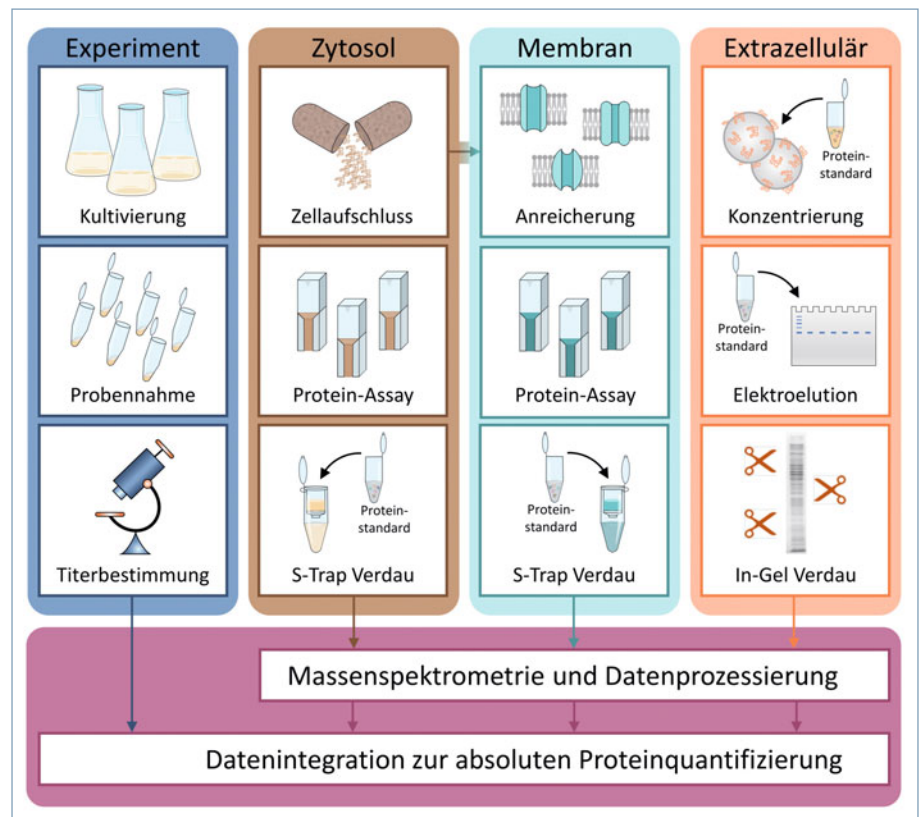
Unabhängig von der zu betrachtenden Fraktion müssen die experimentellen Parameter, wie die Zellzahl und das gewonnene Probenvolumen, bestimmt werden. Für die Gewinnung und absolute Quantifizierung zytosolischer Proteine werden diese nach dem optimierten Zellaufschluss und der Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration zu Peptiden verdaut [1, 4]. Der Quantifizierungsstandard wird, je nachdem, ob es sich um Protein- oder Peptidstandards handelt, vor oder nach dem Verdau zur Probe gegeben.

Da bakterielle Membranproteine aufgrund ihrer geringeren Abundanz und spezifischen physikochemischen Eigenschaften vor der Analyse üblicherweise angereichert werden, muss der entsprechende Anreicherungsfaktor quantitativ erfasst werden (**Abb. 2**, [2]). Dies kann z. B. durch den Vergleich der Konzentration spezifischer Membranproteine im angereicherten und nicht angereicherten Proteinextrakt erfolgen. Darüber hinaus wird der Proteinverdau und die Zugabe der Quantifizierungsstandards analog zu den Protokollen für zytosolische Proteine durchgeführt.

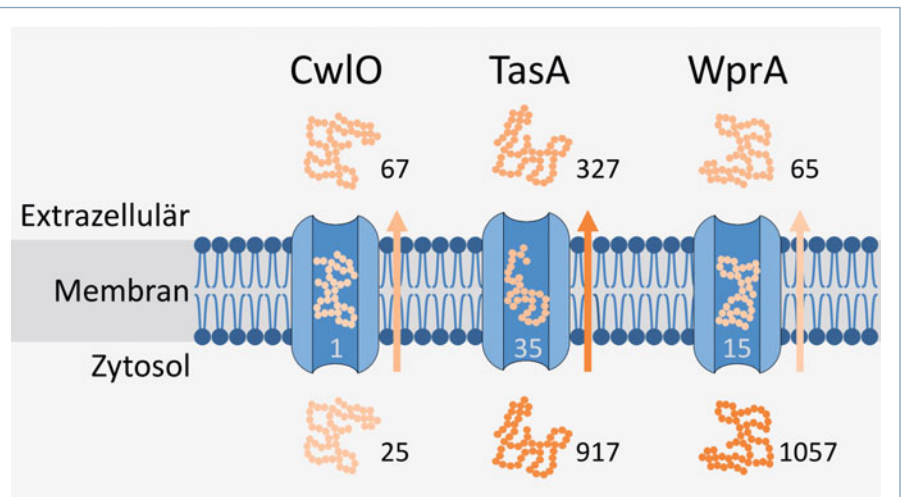
Die absolute Quantifizierung extrazellulärer Proteine ist vor allem wegen ihrer hohen Verdünnung im Kulturüberstand herausfordernd. Die Gewinnung dieser Proteine erfordert folglich einen Konzentrierungsschritt, der ebenfalls quantitativ erfasst werden muss (**Abb. 2**). Dazu können Standardproteine in bekannter Konzentration in den Kulturüberstand gegeben werden, die anschließend gemeinsam mit den nativen extrazellulären Proteinen präpariert werden [3]. Die Standards zur Bestimmung der absoluten Proteinkonzentration über die MS-Spektren werden dann, genau wie in den Protokollen der beiden zellulären Fraktionen, vor oder nach dem Proteinverdau zur Probe gegeben.

Quantifizierung der bakteriellen Proteinsekretion

Die Bestimmbarkeit absoluter Proteinmengen aus verschiedenen bakteriellen Fraktionen ermöglicht nicht nur Aussagen zu Protein-Protein-Stöchiometrien innerhalb des jeweiligen Proteoms, sondern lässt auch Rückschlüsse auf den Proteintransport über



▲ **Abb. 2:** Arbeitsabläufe für die absolute Proteinquantifizierung von mikrobiellen Proteinen mit unterschiedlicher Lokalisation. Angepasste Arbeitsschritte für zytosolische, membranassoziierte und extrazelluläre Proteine und die Bestimmung experimenteller Parameter (z. B. Titer, Probenvolumen etc.) erlauben die absolute Proteinquantifizierung mithilfe massenspektrometrischer Analysen.



▲ **Abb. 3:** Bestimmung der absoluten Proteinhäufigkeiten und der Sekretionsrate in subzellulärer Auflösung für drei extrazelluläre *Bacillus subtilis*-Proteine. Die Zahlen geben die Menge der Proteinkopien in der jeweiligen Fraktion einer bakteriellen Zelle an.

die Zelloberfläche hin zu [3]. Wie am Beispiel in **Abbildung 3** gezeigt, können die genauen Proteinkonzentrationen für die Proteine in den verschiedenen Probenfraktionen (Zytosol, Membran, extrazellulär) bestimmt werden. Dabei sind die Proteinkonzentration in

der Abbildung als Zahlen in der Einheit Moleküle pro Zelle und über die Farbintensität dargestellt (je dunkler, desto höher die Anzahl der Kopien). Im Beispiel handelt es sich um Proteine des Bakteriums *Bacillus subtilis* mit vorhergesagter extrazellulärer

Lokalisation. Das Wissen über deren Konzentration in den einzelnen Probefraktionen als Molekül pro Zelle und der Vergleich von zeitlich auseinanderliegenden Probenahmen lässt nun auch die Berechnung von Proteinsekretionsraten mit der Einheit Molekül pro Zeit zu [3]. Mithilfe dieser Berechnung wird ersichtlich, dass die beiden sekretierten Proteine TasA und WprA trotz vergleichbarer intrazellulärer Konzentration mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten sekretiert werden (TasA: 3,3 Moleküle pro Minute; WprA: 0,3 Moleküle pro Minute), was zu unterschiedlichen Konzentrationen in der extrazellulären Umgebung führt (**Abb. 3**). Dass die Sekretionsrate, in **Abbildung 3** dargestellt durch die Farbe der Pfeile, nicht ausschließlich von der intrazellulären Konzentration der zu translokalisierenden Proteine abhängt, zeigt der Vergleich von WprA und Cw10. Obwohl Cw10 im Zytoplasma deutlich weniger abundant ist als WprA, wird es mit höherer Effizienz sekretiert (0,6 Moleküle pro Minute), was zu vergleichbaren extrazellulären Konzentrationen führt.

Zusammenfassung und Ausblick

Die inzwischen verfügbaren Methoden zur absoluten Quantifizierung von bakteriellen Proteinen verschiedener Lokalisationen eröffnen neue Möglichkeiten für quantitative Proteomstudien. Diese können mit bisher unerreichter Detailtiefe dazu beitragen, bakterielle Stressanpassungen zu verstehen [2, 5]. Vor allem die Integration der Abun-

danzinformation zytosolischer, membrangebundener und extrazellulärer Proteine erlaubt einen neuen Blick auf Prozesse, die über die Zellhülle hinweg stattfinden [3, 6]. Neben der zellulären Signalübertragung und Zell-Zell-Interaktion lassen sich so auch umfangreiche Erkenntnisse über die Sekretion von Proteinen sammeln. Umfangreiche absolute Proteinquantifizierungsdaten sind folglich nicht nur für die mathematische Modellierung dieser Prozesse wertvoll, sondern lassen sich z. B. auch für die biotechnologische Optimierung bakterieller Produktionsstämme nutzen.

Literatur

- [1] Maaß S, Becher D (2016) Methods and applications of absolute protein quantification in microbial systems. *J Proteomics* 136: 222–233
- [2] Antelo-Varela M, Bartel J, Quesada-Ganuza A et al. (2019) Ariadne's thread in the analytical labyrinth of membrane proteins: integration of targeted and shotgun proteomics for global absolute quantification of membrane proteins. *Anal Chem* 91: 11972–11980
- [3] Ferrero-Bordera B, Bartel J, van Dijk JM et al. (2024) From the outer space to the inner cell: deconvoluting the complexity of *Bacillus subtilis* disulfide stress responses by redox state and absolute abundance quantification of extracellular, membrane, and cytosolic proteins. *Microbiol Spectr* 12: e0261623

- [4] Muntel J, Fromion V, Goelzer A et al. (2014) Comprehensive absolute quantification of the cytosolic proteome of *Bacillus subtilis* by data independent, parallel fragmentation in liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MSE). *Mol Cell Proteomics* 13: 1008–1019
- [5] Maaß S, Wachlin G, Bernhardt J et al. (2014) Highly precise quantification of protein molecules per cell during stress and starvation responses in *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics* 13: 2260–2276
- [6] Antelo-Varela M, Aguilar Suárez R, Bartel J et al. (2020) Membrane modulation of super-secreting “mid*Bacillus*” expressing the major *Staphylococcus aureus* antigen – a mass-spectrometry-based absolute quantification approach. *Front Bioeng Biotechnol* 8: 143

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Sandra Maaß
 Abteilung Mikrobielle Proteomics
 Institut für Mikrobiologie
 Universität Greifswald
 Felix-Hausdorff-Straße 8
 D-17489 Greifswald
sandra.maass@uni-greifswald.de

AUTORIN



Sandra Maaß

Jahrgang 1983. 2002–2007 Biologiestudium an der Universität Greifswald. Dort bis 2014 Promotion im Bereich Mikrobiologie in den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. M. Hecker und Prof. Dr. D. Becher. Seit 2014 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie, Universität Greifswald.