

H. Alexander Ehardt, Ruedi Aebersold¹

Targeted Proteomik

Antikörperfreie Bestimmung und Quantifizierung von Proteinen

Zu klinischen Patientenuntersuchungen gehören, unter anderem, non-invasive Tests wie Blutdruckmessungen, minimal-invasive Tests wie Blutabnahme und invasive Tests wie Nadelbiopsien. Viele Parameter können bestimmt werden, z.B. Körpertemperatur, Anzahl von Leukozyten oder Eisen-gehalt im Blut. Das Vorhandensein oder die Menge von Proteinen sind auch wichtige Indikatoren in klinischen Tests, da Proteine wichtige Funktionen in der Zelle übernehmen, wie das Katalysieren von chemischen Reaktionen oder die Steuerung biologischer Prozesse. Mit einer neu entwickelten Methode wird die gezielte Analyse von Proteinen ermöglicht. Dank dem Vermessen aller ionisierten Peptiden und deren Fragmentationen, welche der Identifizierung und Quantifizierung dienen, werden eine grosse Anzahl von Proteinen konsistent über viele Proben hinweg quantifiziert.

Proteine werden meist mittels protein-spezifischer Antikörper unter Benutzung von automatisierten ELISA-Tests oder Westerblots nachgewiesen. Auch in der Immunohistochemie finden Antikörper Anwendung, um die Verteilung von Proteinen in Gewebeschnitten darzustellen. Allerdings kann man mittels Antikörper nur eine bestimmte Anzahl an Proteinen in einer bestimmten Probe bestimmen und für viele Proteine sind validierte Antikörper nicht erhältlich. Pro Antikörper sollte nur ein Antigen nachgewiesen werden, d.h. für die Bestimmung einer Proteinsignatur von acht Proteinen sind acht Antikörper notwendig. In der Immunohistochemie kann der gleiche Gewebeschnitt auch nicht beliebig oft mit unterschiedlichen Antikörpern eingefärbt werden. Mit Antikörpern verbunden ist auch immer eine Arbeitshypothese, und das unvoreingenommene Identifizieren oder Quantifizieren von Proteinen ist nicht möglich. Aus diesen Gründen wurden Wege gesucht, um eine antikörperfreie Bestimmung und Quantifizierung von Proteinen durchzuführen.

Etabliert hat sich eine Methode, die gewöhnlich als «Bottom-up»-Proteomik bezeichnet wird. Die Methode besteht aus mehreren Schritten. Proteine werden von der biologischen oder klinischen Probe isoliert, mittels sequenzspezifischen Proteasen verdaut, gereinigte Peptide mittels Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und direkt in ein hochauflösendes Massenspektrometer eingespritzt. Die Peptide werden im Einspritzprozess mittels eines elektrischen Potentials in geladene Ionen (oder «Precursor Ionen»)

verwandelt, die dann im Massenspektrometer verwendet werden, um die genaue Masse des Peptids und seine Aminosäuresequenz zu bestimmen. Verschiedenen Typen von Massenspektrometern werden eingesetzt, um den beschriebenen Prozess durchzuführen. Meist verbreitet sind sogenannte Shotgun-Instrumente, die anhand der vorhandenen Peptide diejenigen mit dem intensivsten Signal auswählen, um die Aminosäuresequenz und damit die Identität der Peptide zu bestimmen. Shotgun-Proteomics ist ideal, um eine grosse Zahl Peptide/Proteine zu identifizieren, das heisst ein Proteininventar einer Probe zu erstellen.

Alle Proteine werden zugänglich

Die Shotgun-Methode ist weniger gut geeignet, die Mengen bestimmter Proteine in einer Anzahl Proben präzise und reproduzierbar zu bestimmen. Aus diesem Grunde werden spezielle Massenspektrometer eingesetzt, die gezielt circa 100 Proteine mit extrem grosser Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Systemdynamik quantifizieren können. Diese Methode wird generell als «Targeted Proteomik», das heisst die gezielte Analyse von Proteinen, bezeichnet und die Technik Multiple – oder Selected Reaction Monitoring mass spectrometry M-/SRM-MS – ist eine bevorzugte Implementierung des Konzepts. M/SRM ist derzeit der Referenzstandard für die quantitative Analyse von Proteinen. Im Gegensatz zur Proteinmessung, die auf Antikörpern beruht, sind prinzipiell alle Proteine der Methode zugänglich, weil keine speziellen Regenzen vorgängig erzeugt werden müssen. Allerdings ist SRM-MS begrenzt auf die parallele Messung von circa 100 Proteinen pro Probe.

Neues Verfahren entwickelt

Im Aebersold Labor wurde ein Verfahren entwickelt, das die Vorzüge beider Methoden verbindet: das Vermessen aller ionisierten Peptide und deren Fragmentationen zusammen mit Quantifizierungsgenauigkeit von SRM-MS. Diese Methode wird als SWATH-MS (sequential acquisition of all theoretical masses mass spectrometry) bezeichnet und basiert auf dem Prinzip, dass alle Precursor-Ionen innerhalb einer bestimmten m/z fragmentiert, die m/z aller Fragmentationen digital aufgezeichnet werden und dann ein neuer Bereich von Precursors isoliert und fragmentiert wird. Wie Abbildung 1 zeigt, fängt die Precursorselektion im unteren Bereich des Massenspektrums an, wird systematisch verschoben, bis der Maximalbereich des Massenspektrometers erreicht ist, und dieser Zyklus wird anschliessend wiederholt. Ein Zyklus ist zirka 3 s lang, kann in 32 gleich grosse m/z Bereiche für die Precursorselektion aufgeteilt werden und wird wiederholt, bis der gesamte Flüssigkeitsgradient beendet ist. Die daraus entstehende digitale drei-dimensionale Karte (m/z und

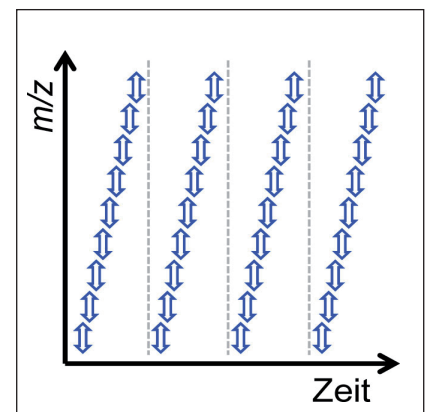


Abb. 1: Die Precursorselektion fängt im unteren Bereich des Massenspektrums an und wird systematisch verschoben.

¹ Dr. H. Alexander Ehardt und Prof. Dr. Ruedi Aebersold, Inst. für Molekulare Systembiologie, ETH Zürich

Intensität als eine Funktion der Zeit) beinhaltet Fragment-Ionen-Signale aller in der Probe vorhandenen Peptide und kann mittels spezieller Computerprogramme gezielt untersucht werden, um spezifische Proteine zu identifizieren und präzise zu quantifizieren. Dafür benötigen die Computerprogramme eine Bibliothek von annotierten Peptidspektren, die kontinuierlich erweitert wird. Für das Humane Proteom wurde eine mehr als 10000 Proteine umfassende Bibliothek vom Aebersold Labor veröffentlicht, um eine einheitliche Analyse von SWATH-MS-Daten in verschiedenen Studien und Laboratorien zu ermöglichen. Von einer einzigen SWATH-MS-Karte, die mittels 10000 humanen Zellen, die in der Zellkultur gezüchtet wurden, können derzeit circa 3000 Proteine quantifiziert werden. Im Aebersold Labor wurden auch Fortschritte in der Extraktion und Analyse via SWATH-MS von löslichen Proteinen aus Nadelbiopsien erzielt. Zum Beispiel können pro Prostatanadelbiopsie in einer einzigen Analyse innerhalb von 2 Stunden Messzeit circa 2000 Proteine pro SWATH-MS-Karte präzise quantifiziert werden, was der parallelen Ausführung von ca. 2000-ELISA Tests oder Westenblots pro Probe entspricht.

Proteinsignaturen von Krankheiten im Blut

Blutproben sind eine weitere Quelle, um den Gesundheitszustand eines Patienten zu beurteilen. Proteine,

isoliert von Blutproben, können als Indikatoren von Krankheiten verwendet werden. Vor allem Proteine, die N-glykosyliert sind, können erfolgreich angereichert und quantifiziert werden. So hat zum Beispiel die Analyse von N-glykosylierten Proteinen im Blutserum von vielen Prostatapatienten eine Proteinsignatur ergeben, die zwischen Gleason Score von weniger oder mehr als 7 unterscheiden kann, ohne invasive Biopsie. Für diese N-glykosylierten Proteine hat das Aebersold Labor ebenfalls eine Bibliothek veröffentlicht, die es Wissenschaftlern ermöglicht, N-glykosylierte Peptidsignaturen aus SWATH-MS-Karten zu extrahieren.

Liu und Kollegen isolierten 345 Serumproteine von gesunden ein- und zweieiigen Zwillingen und quantifizierten die Proteine mittels SWATH-MS. Vergleiche der 345 Serumproteine zeigten, dass die relativen Proteingehalte sich als eine Funktion von genetischem Hintergrund und Alter verändern. Diese Information ist extrem relevant für Studien, die Proteinsignaturen von Krankheiten im Blut etablieren.

Fazit

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Fortschritte in Proteinextraktionsprotokollen und der Genauigkeit von Massenspektrometern es ermöglichen, mittels SWATH-MS digitale Karten von Proteinabundanz zu

Protéomique ciblée – quantification et détermination sans anticorps de protéines

Les examens cliniques de patients comprennent, notamment, des tests non invasifs comme la mesure de la pression artérielle, des tests mini-invasifs comme la prise de sang et des tests invasifs comme la biopsie à l'aiguille. De nombreux paramètres tels la température corporelle, la numération leucocytaire ou le taux de fer dans le sang peuvent être mesurés. La présence ou la quantité de protéines constitue également un indicateur pertinent dans les tests cliniques étant donné que les protéines remplissent des fonctions importantes dans la cellule, telles la catalyse de réactions chimiques ou la régulation de processus biologiques. Une méthode récemment mise au point permet une analyse ciblée des protéines. Grâce à la mesure de tous les peptides ionisés et à leurs fragmentations, qui servent à les identifier et à les quantifier, un grand nombre de protéines est quantifié de manière homogène au cours de l'analyse de nombreux échantillons.

erstellen um eine grosse Anzahl von Proteinen konsistent über viele Proben hinweg zu quantifizieren.

Korrespondenz:
ebhardt@imsb.biol.ethz.ch

Weiterführende Links:
www.imsb.ethz.ch/research/aebersold
www.biognosys.ch
www.proteomedix.ch

Publikationen

Sie finden die Publikationsliste online unter:
www.sulm.ch/d/pipette → Aktuelle Ausgabe (Nr. 3-2015).

Christian Steuer¹

LC-MS/MS in der klinischen (Peptid)-Analytik – Mehr als nur Buchstabensuppe

Die Massenspektrometer gekoppelte Flüssigkeits-/Gaschromatographie (LC/GC-MS) entwickelt sich immer mehr zum Arbeitstier der klinischen Analytik und verdrängt vielerorts etablierte Immunoassays. Mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) lassen sich kleine Moleküle als auch Peptide in diversen Matrices selektiv nachweisen.

LC-MS/MS, MRM, APCI und ESI sind ein paar Abkürzungen, die bei der täglichen Arbeit mit der Massenspektrometrie von Bedeutung sind. Die Trennung der Analyten erfolgt haupt-

sächlich mit bekannten chromatographischen Methoden wie LC oder GC. Durch *multiple reaction monitoring* (MRM) können gezielt Moleküle isoliert (Q1), fragmentiert (Q2) und die Fragmente erneut selektioniert werden (Q3, Abb. 1). Dieser Vorgang erzielt eine hohe Sensitivität und kann

sogar für mehrere Analyten parallel erfolgen. Kreuzreaktivitäten spielen keine Rolle mehr. Dies ist hilfreich, wenn sich die Analyten in ihrer chemischen Struktur ähnlich sind und chromatographisch in einer für den Klinikbetrieb akzeptablen Laufzeit nicht zu trennen sind. Die chemische

¹ Dr. Christian Steuer, Abteilungsleiter Spezialchemie, Institut für Labormedizin, Kantonsspital Aarau AG