

Systembiologie

Proteomanalyse und Systembiologie

ALEXANDER SCHMIDT^{1, 2}, PAOLA PICOTTI¹ UND RUEDI AEBERSOLD^{1, 2, 3}

¹INSTITUT FÜR MOLEKULARE SYSTEMBIOLOGIE, ETH ZÜRICH, ²COMPETENCE CENTER FOR SYSTEMS PHYSIOLOGY AND METABOLIC DISEASES, ETH ZÜRICH, ³INSTITUTE FOR SYSTEMS BIOLOGY, SEATTLE, WA, USA

Neue gezielte massenspektrometrische Techniken für die Proteomanalyse zeichnen sich durch eine erweiterte analytische Tiefe aus, einen hohen Probendurchsatz und die Möglichkeit, reproduzierbare, quantitative Datensätze zu erarbeiten. Daher sind sie für zukünftige Studien in der Biomarkersuche und der systembiologischen Forschung bestens geeignet.

Targeted mass spectrometry has the potential to generate the complete, quantitative proteomic datasets required for systems biology.

Massenspektrometrie in der Proteinanalytik

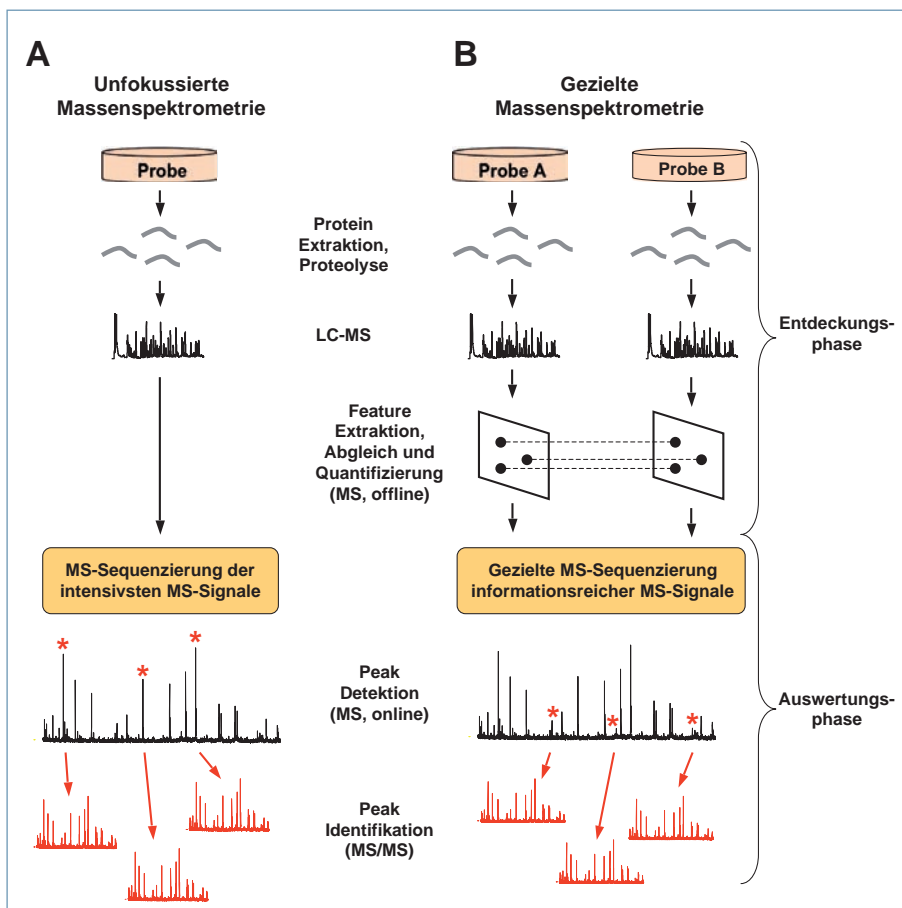
■ Massenspektrometrie (MS) in Kombination mit Flüssigkeitschromatographie (LC) hat sich als die Methode der Wahl zur Charakterisierung komplexer Proteingemische in

der Systembiologie etabliert. **Abbildung 1A** gibt einen Überblick über die wichtigsten Schritte der am häufigsten verwendeten Methode, die auch als Shotgun-Analyse bezeichnet wird. Bei dieser Methode werden die zu analysierenden Proteingemische

zunächst enzymatisch in kürzere und leichter zu handhabende Peptide gespalten. Anschließend werden diese, meist chromatographisch, über eine oder mehrere Dimensionen getrennt und schließlich massenspektrometrisch charakterisiert. Dabei werden in jedem MS-Zyklus immer die intensivsten MS-Signale mittels Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) analysiert. Die aufgenommenen MS/MS-Spektren sind für jedes Peptid charakteristisch und können mithilfe von Proteindatenbanken und Suchalgorithmen automatisch den betreffenden Peptidsequenzen zugeordnet werden^[1]. Kürzlich entwickelte Isotopenmarkierungsmethoden ermöglichen zusätzlich einen genauen quantitativen Vergleich von Proteinen zwischen mehreren komplexen Proben^[2, 3]. Aufgrund vieler technischer und konzeptioneller Verbesserungen, die die Reproduzierbarkeit der chromatographischen Peptidtrennung, die Sensitivität, Geschwindigkeit und Genauigkeit der Massenspektrometrie und die Analyse der generierten Daten in den letzten Jahren gesteigert haben, ist es mittlerweile möglich, mehrere tausend Proteine in einem einzelnen Experiment zu identifizieren und zu quantifizieren^[4].

Analytische Herausforderungen bei der Untersuchung komplexer Proteingemische

Trotz dieser beeindruckenden Fortschritte ist die Shotgun-Methode bis jetzt noch nicht in der Lage, ganze Proteome vollständig zu bestimmen und zeigt deutliche Schwächen, insbesondere bei der Bestimmung gering konzentrierter Proteinspezies. Dies lässt sich pri-



◀ **Abb. 1:** Prinzip der unfokussierten (Shotgun) und gezielten Proteomanalyse. Nach dem Verdau der Proteine werden die entstandenen Peptidgemische chromatographisch aufgetrennt und mittels MS analysiert. **A**, Bei der Shotgun-Methode werden immer die intensivsten Peptidsignale eines MS-Spektrums für die Identifikation mittels MS/MS herangezogen. **B**, Dagegen werden bei der gezielten Methode in der ersten Phase die Anzahl der zu untersuchenden Peptide auf informationsreiche beschränkt, die dann in der zweiten Phase gezielt analysiert werden, unabhängig von deren Signalstärke.

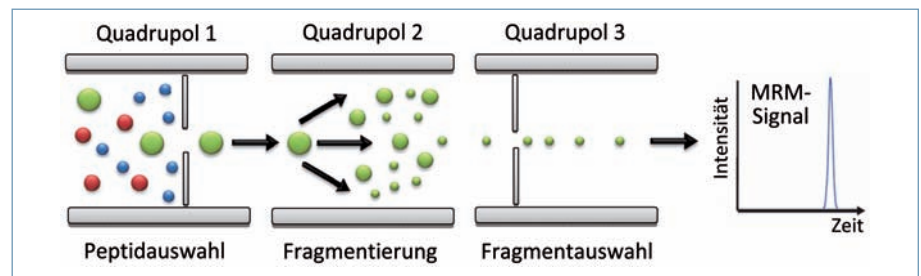
mär auf eine begrenzte Messgeschwindigkeit aktueller Massenspektrometer zurückführen, die nicht in der Lage sind, alle ko-eluierenden und detektierten Peptidsignale tandemmassenspektrometrisch zu charakterisieren. Aus diesem Grund werden in komplexen Peptidgemischen primär intensive Peptidsignale charakterisiert, wohingegen die Analyse von gering konzentrierten Peptidspezies nur unvollständig ist, selbst wenn die gleiche Probe wiederholt analysiert wird^[5]. Der geringe Anteil an niedrig konzentrierten Polypeptiden in den gewonnenen Datensätzen wird durch die Entstehung unspezifischer Proteolyseprodukte von hoch konzentrierten Proteinen zusätzlich eingeschränkt^[6]. Zudem unterbindet diese Limitation die Erstellung reproduzierbarer Datensätze wie sie für systembiologische Studien unerlässlich sind^[7].

Gezielte Massenspektrometrie – eine Alternative?

Neu entwickelte gezielte MS-Methoden versprechen diese Einschränkungen, zumindest teilweise, zu überwinden. Im Gegensatz zur Shotgun-Strategie ist die Wahl der zu charakterisierenden Peptide nicht zufällig, sondern die Messung wird auf informationsreiche Peptidsignale fokussiert, die in Zusammenhang mit einer bestimmten Fragestellung von Interesse sind. Dies erleichtert die Analyse gering konzentrierter Proteine und erlaubt die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen über einen größeren dynamischen Bereich^[8, 9]. Gleichzeitig wird die Menge der anfallenden Daten und die Zeit für deren Auswertung, gerade bei großen Probenmengen, wesentlich reduziert. Es ist wichtig zu bemerken, dass dies auch mit zusätzlichen Trenndimensionen bei der Shotgun-Analytik erreicht werden kann, allerdings verringert der erhöhte Analysenaufwand den Probendurchsatz beträchtlich. Mit der Möglichkeit, identische Proteinsets mit einem hohen Probendurchsatz zu detektieren und zu quantifizieren, sind fokussierte Methoden besonders für die Biomarkersuche und die Systembiologie interessant.

Fokussierte Massenspektrometrie für die quantitative Analyse spezifischer Peptidsignale

Bei den gezielten Methoden unterscheidet man die gezielte Analyse bekannter Peptidsequenzen und die fokussierte Analyse interessanter Peptidsignale, der Features. Diese werden in einer ersten Phase aus den generierten LC-MS-Karten einer Probe extrahiert



▲ **Abb. 2:** Schematische Darstellung eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers betrieben im MRM-Modus. Ein Peptid-Ion wird im Quadrupol (Q) 1 ausgewählt und in Q2 mittels kollisionsinduzierter Fragmentierung (CID) in charakteristische Bruchstücke gespalten. Nur eines dieser Fragmente erreicht nach der letzten Filterung (Q3) den Detektor und erzeugt ein MRM-Signal.

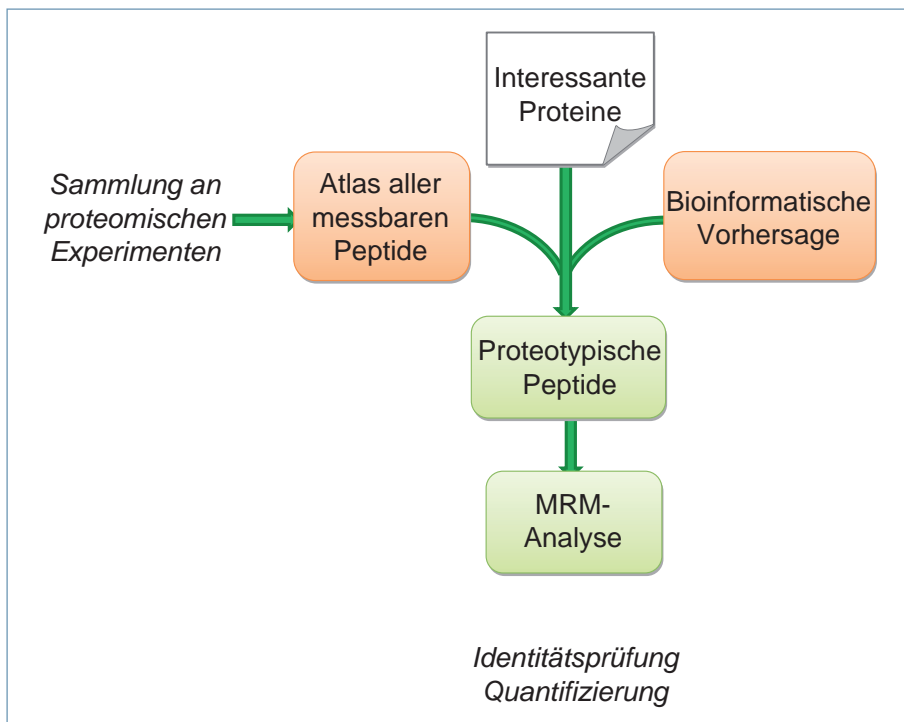
und anschließend zwischen den einzelnen Proben quantitativ verglichen (**Abb. 1B**). In der zweiten Phase wird eine Liste mit allen interessanten Features erstellt und abschließend gezielt analysiert. Dies beinhaltet Features, die wenig intensiv sind oder sich zwischen den Proben quantitativ verändern. Durch das Entkoppeln der Detektion von Peptidsignalen und deren MS/MS-Analyse ist es, im Gegensatz zur Shotgun-Methode, prinzipiell möglich, alle erscheinenden Peptidsignale einer Probe zu identifizieren. Selbstverständlich sind hierfür eine hohe Reproduzierbarkeit bei der LC-Trennung und eine hohe Massengenauigkeit bei der MS-Analyse Voraussetzungen, wobei letzteres nur mithilfe moderner hochauflösender Massenspektrometer erzielt werden kann. Ein entscheidender Vorteil dieser Analysetechnik ist die Möglichkeit, alle schwer zu identifizierenden Features nochmals mit optimierten Analyseparametern zu analysieren. Dieser Zyklus kann so oft wiederholt werden, bis alle Features einer Liste identifiziert sind. Erste Studien zeigen, dass mit dieser Methode mehrere tausend Features in einem LC-MS-Lauf gezielt untersucht werden können^[8].

Eine neue Analysetechnik für die hypothesengelenkte Proteomik: multiple reaction monitoring

Mit der raschen Entwicklung und Verbreitung von Hochdurchsatzverfahren in der Proteomik wurde in den letzten Jahren ein Fülle von Daten generiert, die gesammelt bereits bei einigen Organismen einen Großteil des Proteoms abdecken. Mithilfe dieser Daten können Bibliotheken des exprimierten und detektierbaren Proteoms erstellt werden und daraus für jedes Protein die entsprechenden, am einfachsten zu detektierenden Peptide extrahiert werden, zusammen mit den dazugehörigen MS/MS-Spektren und LC-Retentionszeiten^[4, 10]. Diese überaus wertvolle

Informationsquelle erlaubt nun einen Wechsel in der Proteomanalytik von der bisherigen entdeckungs- zu einer hypothesengelenkten Vorgehensweise, bei der spezifische Proteinassays entwickelt werden, um bestimmte Proteingruppen, die für eine bestimmte Fragestellung von Interesse sind, über eine große Anzahl an unterschiedlichen Proben mit hoher Sensitivität quantitativ zu erfassen^[9]. Herzstück der Strategie ist die *multiple reaction monitoring* (MRM)-Methode, die auf Triple-Quadrupol-Massenspektrometern durchgeführt wird. Bei dieser Analysetechnik werden mit beiden Massenanalytoren zuerst ein Peptid-Ion und anschließend ein oder mehrere Fragment-Ion(en) eines Peptids isoliert und detektiert (**Abb. 2**). Die verwendete zweistufige Massenfilterung steigert sowohl die Selektivität als auch die Sensitivität der Peptidanalyse, im Vergleich zur Shotgun-Methode, erheblich^[9, 11].

Ein typisches hypothesengelenktes Experiment beginnt mit einer Liste der zu untersuchenden Proteine, für deren eindeutigen Nachweis und Quantifizierung anschließend eine möglichst kleine Anzahl an proteotypischen Peptiden (PTP) ausgewählt wird (**Abb. 3**). Dies sind Peptide, deren Sequenz nur mit dem gesuchten Protein übereinstimmt und die mit einer möglichst hohen Empfindlichkeit massenspektrometrisch detektiert werden können^[10]. PTPs werden vorzugsweise durch die Analyse proteomischer MS-Datenbanken ausgewählt (z. B. www.PeptideAtlas.org), können aber auch mithilfe von Computeralgorithmen berechnet werden^[12]. Mit dieser Information können nun Proben mittels MRM gezielt und mit hoher Sensitivität nach interessanten Peptiden – und somit den entsprechenden Proteinen – untersucht werden. Zusätzlich kann die aus der Datenbank verfügbare Information der Elutionszeit während der chromatographischen Trennung herangezogen werden, um jedes Peptid nur in



▲ **Abb. 3:** Übersicht der hypothesengelenkten Proteomik basierend auf MRM. Nachdem eine Liste interessanter Proteine zusammengestellt wurde, werden für jedes Protein spezifische, proteotypische Peptide ausgewählt. Diese werden mittels MRM gezielt in den Proben analysiert und können nach erfolgreicher Identitätsprüfung zur Proteinquantifizierung herangezogen werden.

seinem Elutionsintervall zu analysieren. Dies steigert sowohl die Spezifität als auch die Anzahl der pro LC-MS-Analyse messbaren Peptide deutlich. Dadurch ist es möglich, mehrere hundert Proteine bis zu einer Konzentration von wenigen hundert Kopien pro Zelle in einem einzelnen LC-MS-Lauf zu detektieren und zu quantifizieren^[11].

Danksagung

Wir danken Vinzenz Lange und Bruno Domon für wertvolle Diskussionen und Roche, der ETH Zürich und dem Schweizerischen Natio-

nalfonds für die finanzielle Unterstützung unserer Forschung. ■

Literatur

- [1] Aebersold, R., Mann, M. (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422: 198–207.
- [2] Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., Aebersold, R. (1999): Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 17: 994–999.
- [3] Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlett-Jones, M., He, F., Jacobson, A., Pappin, D. J. (2004): Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell Proteomics* 3: 1154–1169.

- [4] Brunner, E., Ahrens, C. H., Mohanty, S., Baetschmann, H., Loevenich, S., Potthast, F., Deutsch, E. W., Panse, C., de Lichtenberg, U., Rinner, O., Lee, H., Pedrioli, P. G., Malmstrom, J., Koehler, K., Schrimpf, S., Krijgsveld, J., Kregenow, F., Heck, A. J., Hafen, E., Schlapbach, R., Aebersold, R. (2007): A high-quality catalog of the *Drosophila melanogaster* proteome. *Nat. Biotechnol.* 25: 576–583.
- [5] Kuster, B., Schirle, M., Mallick, P., Aebersold, R. (2005): Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 577–583.
- [6] Picotti, P., Aebersold, R., Domon, B. (2007): The implications of proteolytic background for shotgun proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 6: 1589–1598.
- [7] Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J. A., Christman, R., Buhler, J., Eng, J. K., Bumgarner, R., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Hood, L. (2001): Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 292: 929–934.
- [8] Schmidt, A., Gehlenborg, N., Bodenmiller, B., Mueller, L. N., Campbell, D., Mueller, M., Aebersold, R., Domon, B.: An integrated, directed mass spectrometric approach for in-depth characterization of complex peptide mixtures. *Mol. Cell Proteomics* (Submitted).
- [9] Stahl-Zeng, J., Lange, V., Ossola, R., Eckhardt, K., Krek, W., Aebersold, R., Domon, B. (2007): High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites. *Mol. Cell Proteomics* 6: 1809–1817.
- [10] Desiere, F., Deutsch, E. W., King, N. L., Nesvizhskii, A. I., Mallick, P., Eng, J., Chen, S., Eddes, J., Loevenich, S. N., Aebersold, R. (2006): The PeptideAtlas project. *Nucleic Acids Res.* 34: D655–658.
- [11] Picotti, P., King, N., Domon, B., Aebersold, R. (2007): Hypothesis-Driven MRM applied to whole range yeast proteome analysis. Abstract. 55th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Indianapolis, Indiana, USA, June 3-7. *Commun. MPZB*.
- [12] Mallick, P., Schirle, M., Chen, S. S., Flory, M. R., Lee, H., Martin, D., Ranish, J., Raught, B., Schmitt, R., Werner, T., Kuster, B., Aebersold, R. (2007): Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat. Biotechnol.* 25: 125–131.

Korrespondenzadresse:

Dr. Alexander Schmidt
 Institut für Molekulare Systembiologie
 ETH Zürich
 CH-8093 Zürich
 Tel.: +41-(0)44-633 2105
 Fax: +41-(0)44-633 1051
 schmidt@imsb.biol.ethz.ch

AUTOREN



Alexander Schmidt
 Jahrgang 1975, 1995–2000 Lebensmittelchemiestudium an der Universität Erlangen, 2001 Abschluss zum staatlich geprüften Lebensmittelchemiker, 2001–2006 Promotion am Max-Planck Institut für Biochemie (Martinsried bei München) unter Anleitung von Dr. Lottspeich, seit 2006 Postdoc an der ETH Zürich in der Arbeitsgruppe von Prof. Aebersold.



Paola Picotti
 Jahrgang 1977, 1996–2001 Studium der pharmazeutischen Chemie und Technologie an der Universität von Padova (Italien), 2001–2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am CRIBI Biotechnologiezentrum der Universität Padova, 2003–2006 Promotion am CRIBI Biotechnologiezentrum unter Anleitung von Prof. Fontana, 2006–2007 Postdoc am MATI Exzellenzentrum der Universität Udine (Italien), seit 2007 Postdoc an der ETH Zürich in der Arbeitsgruppe von Prof. Aebersold.



Ruedi Aebersold
 Jahrgang 1954, 1983 Promotion am Biozentrum, Universität Basel (Schweiz), 1984–1988 Postdoc am California Institute for Technology, (Pasadena, CA, USA), 1988–1993 Assistant Professor, University of British Columbia, (Vancouver, B.C., Kanada), 1993–2000 Associate Professor und Professor, Department of Molecular Biotechnology, University of Washington (Seattle, WA, USA), 2000–2004 Mitbegründer und Professor, Institute for Systems Biology (Seattle, WA, USA), seit 2004 Professor für Molekulare Systembiologie, ETH Zürich.