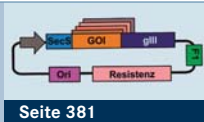


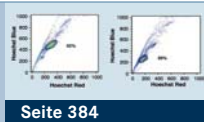
Seite 378

SILAC



Seite 381

Protein-Selektion



Seite 384

Gametogenese/  
Aneuploidien



Seite 387

Datenbanken

Seite 390: Biophysik · Seite 392: Tierversuch ade? · Seite 394: Stromausschlussverfahren · Seite 396: Epigenetik · Seite 398: ELISA-Validierung

## SILAC

# Präzise Methode zur MS-basierten quantitativen Proteomanalyse

MARCUS KRÜGER UND MATTHIAS MANN  
MAX PLANCK INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, MARTINSRIED

Das Proteom ist im Gegensatz zum statischen Genom dynamisch und kann sich in seiner qualitativen und quantitativen Zusammensetzung z. B. aufgrund veränderter Genexpression oder Wirkstoffgabe ändern. Diese Veränderungen können zum Teil sehr schnell erfolgen wie beispielsweise bei Phosphorylierungen von Proteinen, die im Rahmen der Signaltransduktion eine sehr wichtige Rolle spielen.

Ein wesentlicher Fortschritt bei der Analyse komplexer Proteingemische wurde durch die Kopplung von automatisierter nano-HPLC und hochauflösenden Massenspektrometern erreicht. Massenspektrometrie basierte Proteomics ist jedoch per se keine quantitative

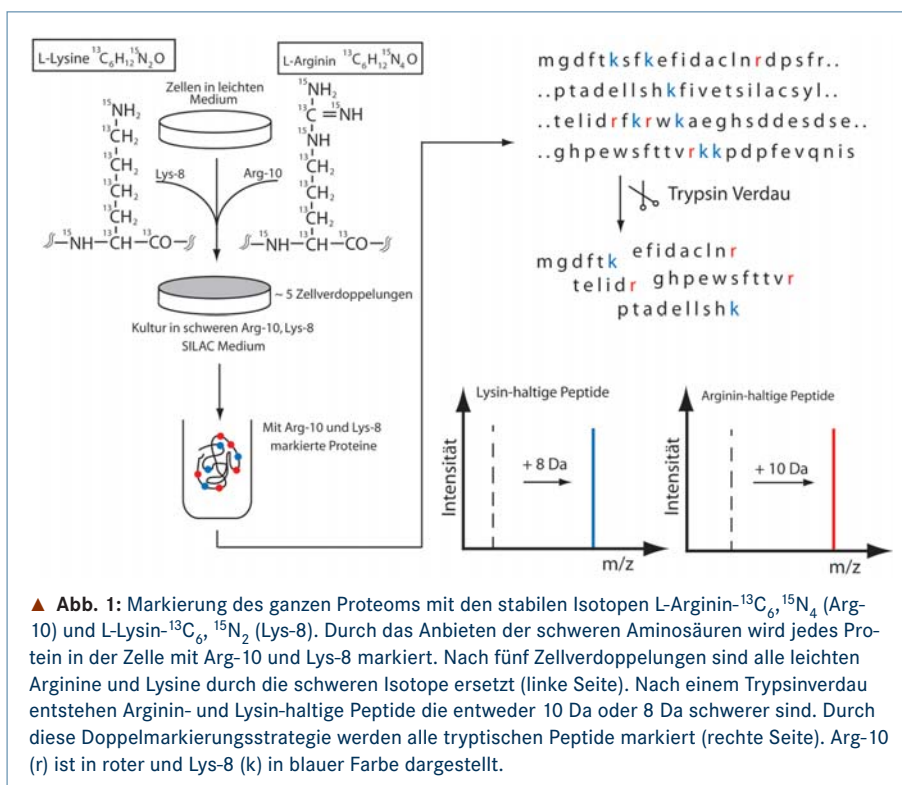
Methode und eine vergleichende Analyse auf Proteinebene war daher lange Zeit sehr schwierig.

Eines der ersten Techniken die eine Quantifizierung erlaubte war die Proteinauftrennung durch zwei-dimensionale Gelelektrophorese (2D-Phorese). Diese Methode ist jedoch experimentell sehr aufwändig und die Reproduzierbarkeit ist in vielen Fällen nicht sehr hoch. Ein weiteres Problem besteht in der geringen Sensitivität dieser Methode. Proteine mit geringer Häufigkeit lassen sich in den meisten Fällen gar nicht erst detektieren.

Erst der Einsatz stabiler Isotope wie  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  und  $^{18}\text{O}$  in der Massenspektrometrie hat zu einer robusten und akkuraten Quantifizierung von Proteinen geführt<sup>[1]</sup>. Der Einbau schwerer Isotope führt zu einer Erhöhung des Molekulargewichts der markierten Peptide und einer entsprechenden Verschiebung des Signals im Massenspektrum. Ein Vergleich der Peakintensitäten von ansonsten identischen Peptiden erlaubt daher die relative Quantifizierung zweier Zustände. Die ICAT-Technologie ist Prototyp der chemischen Modifizierung von Proteinen. Bei dieser Methode werden die Proteine von zwei Zuständen jeweils mit einem leichten und schweren Tag gekoppelt (z. B. an die Aminosäure Cystein)<sup>[2]</sup>. Solche Tags enthalten neben den Isotopen meist auch eine Biotin-Domäne die eine einfache Anreicherung der modifizierten Proteine erlaubt.

### Metabolische Markierung

Eine grundsätzlich andere Möglichkeit Proteine zu markieren bietet die Methode des metabolischen Einbaus von „schweren“ Isotopen. In der Vergangenheit wurden solche Markierungen vor allem bei Pulse-chase



Experimenten eingesetzt, bei denen Zellen *in vitro* für eine kurze Zeit mit radioaktiven Aminosäuren inkubiert werden.

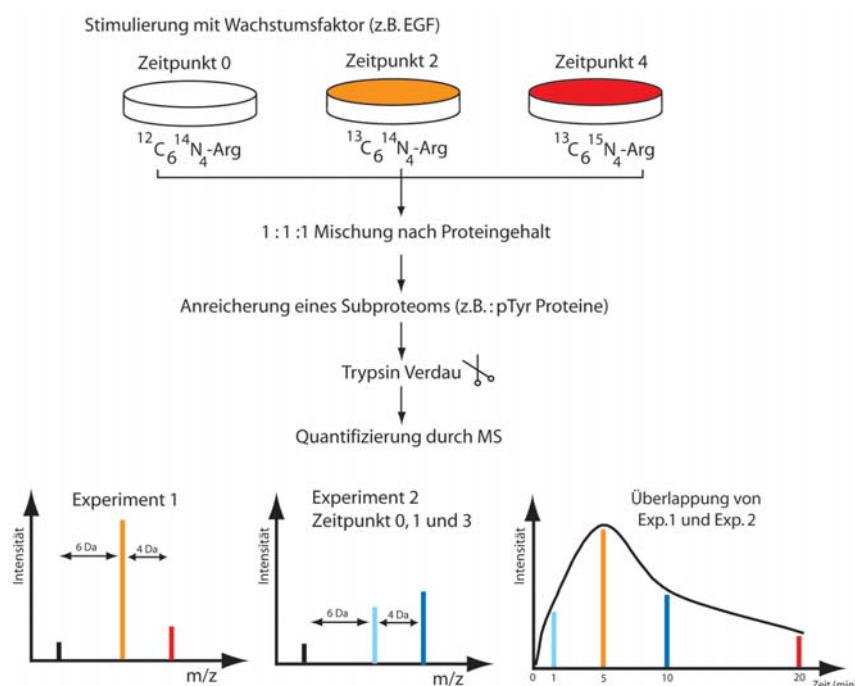
Im Gegensatz dazu nutzt die SILAC-Methode (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) den kompletten metabolischen Einbau von „schweren“ nicht-radioaktiven Isotopen wie etwa  $^{13}\text{C}_6$  L-Arginin<sup>[3]</sup>. Das Markieren des Proteoms erfolgt dabei einfach durch den natürlichen Umsatz der Zelle. Diese Methode ist daher frei von chemischen Synthese- und Aufreinigungsschritten.

Bei einem SILAC-Experiment werden zwei Zellpopulationen parallel entweder in Anwesenheit von natürlichen Isotopen oder der entsprechend gewählten schweren SILAC Aminosäure kultiviert. Nach mehreren Zellteilungen ist jedes Protein der Zelle mit der angebotenen Aminosäure markiert. Auch Proteine, die keinen oder nur einen geringen „Turnover“ zeigen sind nach ca. fünf Zellteilungen zu 97% markiert.

Tauscht man beispielsweise die sechs  $^{12}\text{C}$ -Atome des Arginins durch sechs  $^{13}\text{C}$ -Atome aus, so ist jedes markierte Arginin-haltige Peptid 6 Da schwerer. Eine weitere Massendifferenz lässt sich durch den zusätzlichen Austausch von vier  $^{14}\text{N}$ -Atomen durch vier  $^{15}\text{N}$ -Atome erreichen. Insgesamt verschiebt sich die Masse des schweren Arginin-haltigen Peptids zum unmarkierten Peptid dann um 10 Da (**Abb. 1**).

Bisher wurde eine Vielzahl von essenziellen Aminosäuren für die Markierung verwendet. Mit deuteriertem Leucin lassen sich 70% der tryptischen Peptide markieren. Zwar sind deuterierte Aminosäuren wie Leucin-D3 oder Lysin-D4 kostengünstige Alternativen, jedoch zeigen deuterierte Peptide gegenüber nicht markierten Peptiden eine kleine jedoch unerwünschte Verschiebung des Elutionsprofils nach Umkehrphasenchromatographie. Eine Kombination aus Doppelmarkierung mit Arginin/Lysin und Trypsin Verdau führt, bis auf die Carboxy-terminalen Peptide, zu einer Markierung aller tryptischen Peptide. In **Tabelle 1** sind einige Kombinationen üblicher Markierungsstrategien aufgelistet.

Aufgrund des metabolischen Einbaus und der kompletten (100%) Markierung kommt die SILAC-Methode ohne zusätzliche chemische Synthese- und Aufreinigungsschritte aus. Dieser Vorteil wirkt sich vor allem in der einfachen Handhabung und einer geringen Standardabweichung von bis zu  $\pm 10\%$  bei der Quantifizierung aus<sup>[4]</sup>.

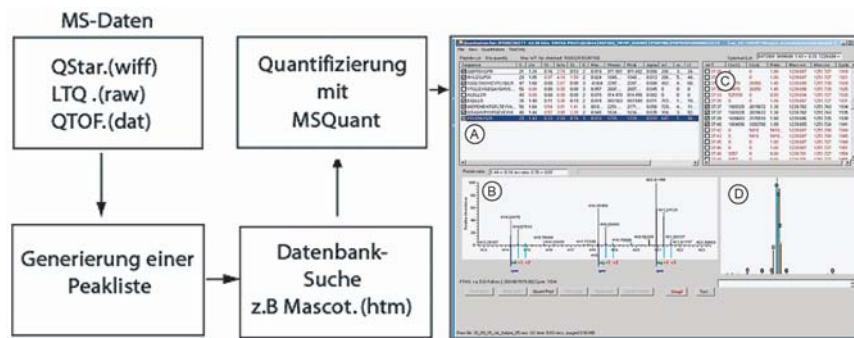


▲ **Abb. 2:** SILAC-Multiplex Experiment zur Analyse des Phosphoproteoms nach Stimulierung mit einem Wachstumsfaktor. Drei Zellpopulationen werden parallel mit den schweren Isotopen des Arginins (Arg-6 oder Arg-10) markiert. Die so markierten Zellen werden für unterschiedliche Zeitpunkte (hier 0 min, 5 min und 20 min) mit einem Wachstumsfaktor stimuliert (z. B. EGF). Die Zellslysate werden 1:1:1 gemischt und anschließend werden phosphorylierte Proteine durch Immunopräzipitation mittels Phospho-Tyrosin Antikörper angereichert. Es folgt ein Trypsinverdau und Auftrennung über LC-MS/MS. Arginin-haltige Peptide erscheinen als Tripletts mit einer Massendifferenz von 6 Da und 10 Da. Angereicherte Peptide von stärker phosphorylierten Proteinen zeigen im Massenspektrum eine höhere Intensität. Ein zweites Experiment mit den Zeitpunkten 0, 1 und 3 (hier 0 min, 1 min und 10 min) wird mit dem 1. Experiment über einen gemeinsamen Zeitpunkt (hier 0 min) abgeglichen. Die resultierende Kurve gibt eine detaillierte Kinetik aktivierter Effekte. Die Beispielkurve zeigt ein schnelles Ansteigen der Phosphorylierung eines bestimmten Proteins innerhalb der ersten 5 min. Nach dem Erreichen des Maximums fällt die Kurve deutlich ab und erreicht nach 20 min annähernd den Nullpunkt.

Zustand		Formel	Massendiff. in Da	Markierung tryptischer Peptide in %
A	B C			
<i>Einfach Markierung</i>				
Leu-0	Leu-D3	Leu-5,5,5-D <sub>3</sub>	3	70
Lys-H4	Lys-D4	Lys-4,5,5-D <sub>4</sub>	4	50 } 100 mit LysC
Lys-0	Lys-6	Lys- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>14</sup> N <sub>4</sub>	6	
Arg-0	Arg-10	Arg- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , N <sub>4</sub>	10	50*
Arg-0	Arg-6 Arg-10	Arg- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>14</sup> N <sub>4</sub> Arg- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub>	6 und 10	50*
<i>Doppelmarkierung</i>				
Arg-0	Arg-10	Arg- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>4</sub>	Arg-Peptide 10	100
Lys-0	Lys-8	Lys- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	Lys-Peptide 8	
Arg-0	Arg-6 Arg-10		Arg-Peptide 6, 10	100
Lys-0	Lys-D4 Lys-8		Lys-Peptide 4, 8	

**Tab. 1:** Übersicht verschiedener SILAC Aminosäuren. Die aufgelisteten Aminosäuren stellen nur einen kleinen Teil der möglichen Kombinationen dar. Bei der Planung eines Experiments sollte immer darauf geachtet werden, dass die Massendifferenz der resultierenden Peptide ausreichend für eine klare Zuordnung in den leichten und schweren Zustand ist. Die Protease LysC schneidet nur nach Lysin, d. h. es entstehen nur Lysin-haltige Peptide, die entsprechend markiert sind. Die „Einfachmarkierung“ steht für die Verwendung von nur einer SILAC Aminosäure. Eine „Doppelmarkierung“ bedeutet das gleichzeitige Anbieten von zwei SILAC Aminosäuren.

\*Durch einen zusätzlichen Essigsäureanhydridschritt während des „In-Gel“-Verdau werden die Lysinreste acetyliert und sind daher nicht mehr zugänglich für einen Trypsinverdau<sup>[9]</sup>. Durch diesen Schritt kann die Ausbeute an quantifizierbaren Peptiden deutlich gesteigert werden.



▲ **Abb. 3:** Schematische Darstellung der MS-Daten Aufarbeitung. Die aus dem Massenspektrometer gewonnenen Rohdaten werden zunächst in eine Peakliste formatiert. Anschließend wird mit einem Suchalgorithmus (hier Mascot) ein Hypertext-File (.htm) von identifizierten Proteinen generiert. Danach kann Software wie MSQuant benutzt werden, um die Hits zu validieren und zu quantifizieren. Die rechte Seite zeigt die MSQuant Oberfläche. **A**, Peptideauswahl für die Quantifizierung. Weiterhin finden sich hier die Verhältnisse der Triplets. **B**, zeigt die entsprechenden Spektren der ausgewählten Peptide. **C**, Detaillierte zeitliche Auflistung des Elutionsprofils einzelner Peptide, die im Massenspektrometer detektiert wurden. **D**, Dieser Abschnitt zeigt eine graphische Darstellung des Elutionsprofils der Peptide. Nach der Quantifizierung können die von MSQuant generierten Daten in Excel und Datenbanken exportiert werden.

Um die umfangreichen MS-Datensätze auf quantitativer Ebene analysieren zu können, entwickelte unsere Arbeitsgruppe das MS-basierte Quantifizierungsprogramm MSQuant. Die Open Source Software kann unter (<http://msquant.sourceforge.net/>) heruntergeladen werden. Mit diesem Programm können komplexe MS-Datensätze von verschiedenen SILAC-Experimenten schnell und einfach quantifiziert werden (**Abb. 3**).

Kritisch für die metabolische Markierung der Proteine ist der Gebrauch von dialysiertem Serum (FBS, fötales Kälberserum), welches frei von nicht-markierten Aminosäuren ist. Einige Zelllinien benötigen jedoch normales Serum, da bei der Dialyse beispielsweise auch Wachstumsfaktoren entfernt werden. Die Zugabe einer kleinen Menge von normalem Serum erhöht zwar den Fehler bei der Quantifizierung, hilft jedoch bei der Kultivierung solcher Zellen.

Ein weiterer kritischer Punkt ist die metabolische Konvertierung von Arginin zu Prolin. In Standard DMEM-Medien beträgt die Arginin Konzentration 84 mg/l. Diese Konzentration führt bei vielen Zelllinien zu einer deutlichen Konvertierung von Arginin zu Prolin. Um den Effekt der Umlagerung zu minimieren, wurde beispielsweise bei Kultivierung der humanen Zelllinie HeLa die Argininkonzentration auf 21 mg/l reduziert. Wir empfehlen daher die optimale Argininkonzentration bei jeder Zelllinie zunächst auszutitrieren. Dadurch wird eine Prolinmarkierung vermieden und die Kosten des Experiments gesenkt. Informationen über Protokolle und genaue Konzentrationsangaben der jeweiligen SILAC Aminosäuren sind unter ([www.biochem.mpg.de/mann](http://www.biochem.mpg.de/mann)) und in<sup>[5]</sup> zu finden.

### Temporale Proteomics mittels SILAC

In vielen Fällen reicht eine Zweipunkt-Analyse nicht aus, um biologische Prozesse eingehend zu untersuchen. Um eine zeitliche Dimension einzuführen, kombinierten wir in einer systemweiten Phosphorylierungsstudie zwei Dreizeitpunkt-SILAC-Experimente<sup>[6]</sup>. Drei Zellpopulationen wurden parallel mit Arg-0, Arg-6 und Arg-10 markiert und für 0, 5 und 20 Minuten mit dem Wachstumsfaktor EGF stimuliert. Ein zweiter Satz von entsprechend markierten Zellen wurde parallel für 0, 1 und 10 Minuten stimuliert. Ein gemeinsamer Zeitpunkt diente als Abgleich für die Kombination der beiden Experimente. Anschließend folgte die Anreicherung Tyrosin-phosphorylierter Proteine durch Immunopräzipitation. Die Quantifizierung der so angereicherten Proteine ergab ein detailliertes zeitliches Profil von Effektoren die durch EGF stimuliert wurden (**Abb. 2**).

Ein anderes Beispiel für eine quantitative Subproteomanalyse ist die Untersuchung des Nukleolus. Der Nukleolus ist ein Zellkompartiment innerhalb des Zellkerns und ist u.a. wichtig für die Synthese von ribosomaler RNA und den Zusammenbau von Ribosomen. Wir konnten durch eine Kombination von SILAC und metabolischen Inhibitoren die Dynamik des Proteoms im Nukleolus nachweisen<sup>[7]</sup>.

Eine gänzliche andere Art SILAC zu benutzen, ist die Bestimmung der Rate neusynthetisierter Proteine. Verfolgt man den Einbau der schweren SILAC Aminosäuren über die Zeit, lassen sich neu-synthetisierte Proteine leicht identifizieren und quantifizieren<sup>[8]</sup>. Der Vorteil dieser Methode gegenüber RNA-Array-Systemen, ist die Bestimmung von neu-synthetisierten Proteinen innerhalb zel-

lulärer Substrukturen wie den Mitochondrien oder der Plasmamembran.

Zur Zeit sind Massenspektrometer noch nicht in der Lage, ganze Zellsysteme komplett zu analysieren. Dies liegt vor allem an dem noch zu geringen dynamischen Bereich mit dem ein Massenspektrometer komplexe Proben analysieren kann. Eine hohe Dynamik („Dynamic Range“) bei der MS-basierten Proteinanalytik bedeutet die gleichzeitige Detektierung von abundanten und seltenen Proteinen in einer Probe.

In den letzten Jahren hat sich die Proteomforschung jedoch rasant weiter entwickelt. Der Einsatz neuartiger Instrumente wie den „Orbitraps“ (Thermo Electron) und die Entwicklung von leistungsfähigeren Algorithmen wird die Sensitivität und die Dynamik von Proteomanalysen in näherer Zukunft auf die Ebene von RNA-Array Systemen heben. ■

### Literatur

- [1] Ong, S. E., and Mann, M. (2005): Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.* 1(5): 252–262.
- [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(10): 994–999.
- [3] Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. (2002): Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 1(5): 376–386.
- [4] Ong, S. E., Kratchmarova, I., Mann, M. (2003): Properties of <sup>13</sup>C-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *J. Proteome Res.* 2(2): 173–181.
- [5] Ong, S. E., et al., Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) for quantitative proteomics. *Handbook of Cell Biology 3<sup>rd</sup> edn. Vol. IV* (ed. Celis, J) (Academic Press, San Diego)
- [6] Blagoev, B., Ong, S. E., Kratchmarova, I., Mann, M. (2004): Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nat. Biotechnol.* 22(9): 1139–1145.
- [7] Andersen, J. S., Lam, Y. W., Leung, A. K., Ong, S. E., Lyon, C. E., Lamond, A. I., Mann, M. (2005): Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433(7021): 77–83.
- [8] Pratt, J. M., Petty, J., Riba-Garcia, I., Robertson, D. H., Gaskell, S. J., Oliver, S. G., Beynon, R. J. (2002): Dynamics of protein turnover, a missing dimension in proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1(8): 579–591.
- [9] Thevis, M., Thevis, M., Ogorzalek Loo, R. R., Loo, J. A. (2003): In-Gel derivatization of proteins for cysteine-specific cleavages and their analysis by mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2: 163–172.



#### Korrespondenzadresse:

Dr. Marcus Krüger  
Prof. Dr. Matthias Mann  
Max Planck Institut für Biochemie  
Abt. für Proteomics und  
Signal Transduktion  
Am Klopferspitz 18  
D-82152 Martinsried  
Tel.: 089-85782402  
Fax: 089-85783209  
mkrueger@biochem.mpg.de

