

## Literatuur

1. Bartels PCM, Goldschmidt HMJ. Mens, robot en zorg om de patiënt. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2000; 25: 185-187.

2. Hoffmann JJML, Hoedemakers RMJ. Verslag van het 2<sup>e</sup> STZ symposium klinische chemie. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2002; 27: 147-153.

*Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2004; 29: 48

## Proteomics in de Klinische Chemie

J.M.G. BONFRÈR en M.P. van DIEIJEN-VISSER\*

Op 22 mei 2003 werd door de werkgroep proteomics een symposium georganiseerd over proteomics in de klinische chemie. Identificatie en karakterisering van eiwitten en met name het ontdekken van nieuwe markers voor ziekten zijn belangrijke uitdagingen van het proteomicsonderzoek. Proteomics omvat het karakteriseren van eiwitten en hun posttranslationele modificaties. Belangrijke analysetechnieken zijn tweedimensionale elektroforese of andere eiwitscheidings- of zuiveringsmethodieken, gevolgd door massaspectrometrische identificatie van de eiwitten. Recente ontwikkelingen gaan steeds meer in de richting van zeer gevoelige 'high throughput'-opstellingen. Proteomics zal in de toekomst niet alleen binnen het wetenschappelijk onderzoek een belangrijke rol spelen, maar ook binnen de patientenzorg. Vanuit de diagnos-

tiel is er een groeiende belangstelling voor proteomics, getuige enkele recente artikelen, waarin de massaspectrometrische analyse van serumeiwitprofielen veelbelovend lijkt.

De snelle ontwikkelingen binnen dit vakgebied en het te verwachten grote aantal toepassingen binnen de patiëntenzorg, onderstrepen het belang van vroegtijdige participatie van de klinische laboratoria bij de verdere implementatie van proteomics. Tijdens het symposium werd ingegaan op de methodiek van massaspectrometrische identificatie van eiwitten of eiwitprofielen. Vervolgens werden vanuit verschillende invalshoeken toepassingen besproken. Hieronder treft u de samenvattingen van de bijdragen aan. Vanwege de snelle ontwikkelingen op dit terrein heeft de werkgroep besloten jaarlijks een symposium te organiseren. Het volgende symposium zal plaatsvinden op 18 november 2004.

\*Namens de werkgroep Proteomics

*Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2004; 29: 48-49

## Proteomics en het in kaart brengen van alle humane eiwitten

C.G. de KOSTER

Het genoom van de mens is grotendeels opgehelderd. Ongeveer 30.000 humane genen zijn geïdentificeerd. Een grotere uitdaging wordt het in kaart brengen van alle humane eiwitten die tot expressie worden gebracht (1).

Proteomics beoogt de structuur, de functie en de hoeveelheid van alle eiwitten die aanwezig zijn in een cellulaire subfractie, organel, cel, weefsel, orgaan of zelfs het gehele organisme in kaart te brengen. De

complexiteit van het humane proteoom wordt geschat op 80.000-100.000 eiwitten, maar dit aantal zal ongetwijfeld groter zijn. Het aantal humane eiwitten is groter dan het aantal genen, veroorzaakt door 'processing' van mRNA's en posttranslationele modificaties van eiwitten. Een humaan gen is opgebouwd uit exonen die coderen voor een deel van de aminozuurvolgorde van een eiwit en intronen die niet coderen. Tijdens transcriptie worden alle exonen en intronen van een gen vertaald naar één precursor-mRNA-molecuul. Door 'splicing' worden alle intronen verwijderd en vormen de overblijvende exonen een mRNA dat tot eiwit wordt vertaald. Bij alternatieve splicing wordt ook een deel van de exonen verwijderd en kan

*Swammerdam Institute for Life Sciences - Mass Spectrometry Group, University of Amsterdam, Amsterdam*

E-mail: dekoester@science.uva.nl

dus uit hetzelfde gen een hele reeks (kortere) eiwitten ontstaan. De voorspelling is dat alternatieve splicing voorkomt bij expressie van 30-40% van de humane genen. Na translatie van de mRNA's tot eiwitten kunnen diverse modificaties, zoals proteolytische 'cleavage', glycosylering en fosforylering plaatsvinden. Alternatieve splicing en posttranslationele modificaties dragen dus bij tot een grote diversiteit van eiwitten en het zal duidelijk zijn dat het aantal humane eiwitten het aantal genen ruimschoots zal overschrijden. Het humane proteoom wordt niet in iedere cel in volle omvang tot expressie gebracht. Naast enkele duizenden genen die in iedere cel de 'huishoudeiwitten' coderen, komt per cel- of weefseltype nog een specifieke set genen tot expressie voor de eiwitten die bijvoorbeeld alleen in de lever of de long voorkomen. In tegenstelling tot het genoom waarvan in iedere cel een kopie aanwezig is, is het proteoom afhankelijk van plaats en tijd. Het aantal kopieën van een eiwit in een cel kan variëren in de tijd van nul tot tienduizenden exemplaren.

Klinische proteomicsstudies worden meestal vergeleend uitgevoerd om eiwitten te identificeren die discrimineren tussen twee toestanden. De eiwitten in een plasmamonster van een gezonde toestand worden vergeleken met een pathologische toestand om een biomarker op te sporen. Een veelgebruikte techniek is 2D-gelelektroforese. In de eerste dimensie worden eiwitten gescheiden als functie van het isoelectrisch punt, in de tweede dimensie als functie van de molecuulmassa. Het resultaat is een tweedimensionale kaart van alle eiwitten die in het onderzochte monster tot expressie zijn gekomen. Identificatie van eiwitten wordt uitgevoerd door trypsine-digestie van eiwitten in de gel, massaspectrometrie om de massa's van de peptiden na digestie te bepalen en het vergelijken hiervan met massa's van peptiden die worden verkregen door alle eiwitten in databases theoretisch met trypsine te digesteren. Met de huidige 2D-gelelektroforesetechniek kunnen 2000 tot 3000 eiwitten worden gescheiden. Dit volstaat voor de karakterisering van het uit 486 eiwitten bestaande proteoom van de prokaryoot *Mycoplasma genitalium*, maar is ontoereikend voor het veel complexere humane proteoom. Zelfs een deelverzameling, zoals het humane plasma-proteoom, is door het grote aantal eiwitten en het uiteenlopen van eiwitconcentraties te complex om door middel van 2D-gelelektroforese te karakteriseren. Het aantal bloedplasma-eiwitten wordt geschat op 500. Van ieder van deze eiwitten kunnen 20 glycovormen voorkomen met gemiddeld vijf varianten. Deze variatie leidt al tot 50.000 verschillende plasma-eiwitstructuurvarianten. Als wij kijken naar het variabele deel van de immunoglobulines kunnen wij plusminus 10.000.000 sequenties onderscheiden. Daarnaast kunnen wij in het plasma ingelekte weefsel-eiwitten verwachten (een diagnostische marker bij bijv. hartinfarct). In bloedplasma lopen de concentraties van al deze eiwitten twaalf orden van decaden uiteen. Bovendien vertegenwoordigt slechts een klein aantal eiwitten (albumine, immunoglobulines, transferine, etc.) meer dan 90% van het totale eiwit in plasma. Dat bemoeilijkt de analyse van non-abun-

dante eiwitten in 2D-gels. Toepasbaarheid van 2D-gelelektroforesebenadering voor humane proteomics vereist vergaande reductie van proteoomcomplexiteit door uitgebreide monstervoorbewerking zoals fractionering door precipitatie van abundante eiwitten. Bruikbare 2D-gelelektroforeseresultaten voor analyse van humane eiwitten worden verkregen door fractionering tot op subcellulair of organelniveau. Zo konden, met behulp van 2D-gelelektroforese van caveolae-eiwitten geïsoleerd uit endotheelcellen, middels massaspectrometrie eiwitten worden geïdentificeerd, die tot expressie komen na blootstelling van de cellen aan atherogene stimuli (2). Een recent alternatief voor de 2D-gelmethode is trypsinedigestie van het totale eiwitmengsel, peptidescheiding met behulp van HPLC, met online-electrospray-massaspectrometrie waarbij direct de sequenties van de peptiden worden verkregen (LC-MS/MS). Uit zo'n 'peptide sequence tag' van één peptide is het oorspronkelijke eiwit ook in de database te achterhalen. Om het uiterst complexe peptidenmengsel te vereenvoudigen kunnen, met een speciale techniek, bijv. alleen die peptiden worden geëxtraheerd die het zeldzame aminozuur cystine bevatten.

Een recente veelbelovende ontwikkeling om biomarkers te identificeren en gericht te zoeken naar target-eiwitten in het humane proteoom is 'surface enhanced laser desorption ionization time of flight'-massaspectrometrie (SELDI-TOF-MS). Aan een deel van het oppervlak van een chip wordt een organisch molecuul, zoals een hydrofobe C<sub>18</sub>-alkylketen of een antilichaam, bevestigd. Door incubatie met bijv. een serummonster wordt een klasse van eiwitten, of zelfs een eiwit, specifiek gebonden. Na een wasprocedure om specifiek gebonden eiwit te verwijderen wordt de chip uitgelezen met SELDI-TOF-MS. Dat wil zeggen, van de aan de stationaire fase gebonden eiwitten wordt nauwkeurig de molecuulmassa bepaald. Het resultaat is een vingerafdruk van een deelverzameling van het proteoom. Met behulp van multivariate statistiek wordt de dataset geanalyseerd om eiwitten te identificeren die discrimineren tussen een gezonde en pathologische toestand. Voor identificatie is het vervolgens nodig de discriminerende eiwitten te 'sequencen'. Hiervoor kunnen meerdere wegen worden bewandeld, zoals digestie op de chip gevolgd door massaspectrometrie en database 'searching' of tandem-massaspectrometrie (MS/MS), waarmee in dezelfde analysegang sequentie-informatie van eiwitten wordt verkregen. SELDI-technieken worden momenteel gebruikt in het AMC om biomarkers voor lysosomale stapelingsziekten, zoals de ziekte van Gaucher en Fabry, te identificeren.

#### Literatuur

1. Reitsma PH, Koster CG de. Proteomics: het in kaart brengen van alle humane eiwitten. Ned Tijdschr Geneesk 2003; 147: 99-104.
2. Sprenger RR, Speijer D, Back JW, Koster CG de, Pannekoek H, Horrevoets AJG. Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Electrophoresis 2003, accepted for publication.