

Datenunabhängige Akquise - neuer Goldstandard?

Das Proteom umfasst die Gesamtheit aller Proteine in einer Probe. In den letzten 15 Jahren wurde die Proteomforschung auf Basis der Flüssigchromatographie-gekoppelten Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) von der datenabhängigen Akquisitionsstrategie (DDA), kurzum „shotgun proteomics“, dominiert. Der Begriff shotgun proteomics wurde im Jahr 1998 in Analogie zur genomischen Schrotschusssequenzierung geprägt und beschreibt die Analyse von Peptiden, die aus dem Verdau einer komplexen Proteinmischung gewonnen wurden. Dabei werden Peptide chromatographisch aufgetrennt, durch ein elektrisches Feld ionisiert in das Massenspektrometer überführt (Abb.) und ihre Abundanzen sowie ihre Masse-zu-Ladung-Verhältnisse bestimmt. Im nächsten Schritt werden dann automatisch die intensivsten dieser Vorläuferionen ausgewählt und mittels eines Kollisionsgases fragmentiert. Die unmittelbare Kopplung der Vorläuferionenmessung an die nachgeschaltete Fragmentation messung verkörpert hierbei das Prinzip der DDA. Die Fragmentationen liefern Aufschluss über die Aminosäuresequenz und ermöglichen zusammen mit der Information zur

gemessenen intakten Peptidmasse einen Rückschluss auf das Herkunftsprotein. DDA zeichnet sich durch Robustheit, ein breites Detektionsspektrum, einfache Handhabung sowie etablierte Post-Analyseprozesse aus. Diese Schlüsselfaktoren haben mehr als ein Jahrzehnt dazu beigetragen, dass DDA sich als Goldstandard in der Proteomforschung etabliert hat. Nichtsdestotrotz weist die Methode elementare Schwachpunkte auf, allen voran das allgegenwärtige Problem der „fehlenden Daten“. Bei DDA werden nur manche Peptidionen oberhalb eines vordefinierten Schwellenwertes ausgewählt, was die Reproduzierbarkeit verringert und die Messung von niedrig abundanten Peptiden verhindert. Das ultimative Ziel der Proteomik besteht jedoch darin, jedes Protein in einer biologischen Probe reproduzierbar zu identifizieren und zu quantifizieren.

Diesem ambitionierten Ziel kommt die Proteomforschung durch die jüngsten Fortschritte in Technologie und Softwareentwicklung, sowie der Wiederentdeckung der datenunabhängigen Akquisitionsstrategie (DIA – data-independent acquisition) ein Stück weit näher. DIA be-



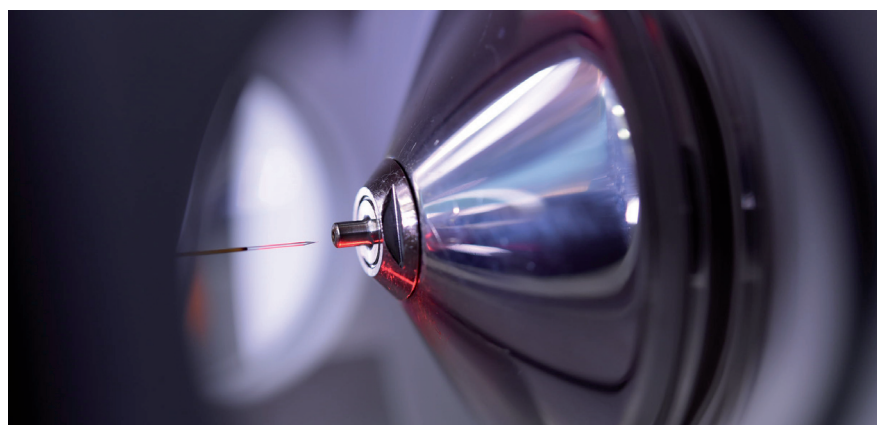
Deutsche Gesellschaft für
Proteomforschung e.V.

Termine

8. Mai 2018, Göttingen
DGPF-Minisympodium
„Proteomics“

sitzt das Potential, die Grenzen der DDA auf Basis einer kontinuierlichen Akquisition von Peptidfragmentspektren zu überwinden. Dabei wird eine Fragmentierung aller Vorläuferionen im Massenspektrometer unabhängig von ihrer Signalstärke erzielt. Hierfür wird der gesamte Massebereich in m/z-Fenster aufgeteilt, die Peptidionen werden schrittweise isoliert und pro m/z-Fenster gemeinsam fragmentiert. Das Resultat der DIA-Strategie sind hochkomplexe MS2-Spektren, die theoretisch die Identifikation aller Peptidionen aus einer Probe ermöglichen. Die größte Herausforderung der DIA-Strategie liegt in der bioinformatischen Post-Analyse, denn nur wenn die entsprechenden Spektren korrekt interpretiert werden können, kann eine zutreffende Peptid- und somit Proteinzuzuordnung erfolgen.

Anders als beim Shotgun-Ansatz findet bei DIA die Zuordnung der Spektren über empirisch erstellte Spektralbibliotheken statt, die charakteristische Fragmentierungsmuster der Peptide enthalten und zum Vergleich herangezogen werden. Derzeit verfügbare Software-Lösungen sind beispielsweise Open-SWATH, SWATH2.0, Skyline und Spectronaut. Der klare Vorteil der DIA-Methode gegenüber dem Shotgun-Ansatz liegt in der erhöhten Reproduzierbarkeit, der verbesserten Empfindlichkeit, akkuraterer Quantifizierung und damit größerer Proteomabdeckung. Die Zukunft wird zeigen, ob sich DIA im Feld langfristig durchsetzen wird.



Quelle eines Massenspektrometers: die aufgetrennten Peptide gelangen durch eine dünne Nadel (links im Bild) unter Einwirkung eines starkes Spannungsfeldes in die kleine Öffnung (rechts im Bild) des Massenspektrometers. Dabei werden sie durch Zufuhr von Energie ionisiert und in die Gasphase überführt.

Dr. Stefanie Hauck,
Helmholtz Zentrum München

Abb.: Helmholtz Zentrum München