

## Proteomics 기술의 개발 및 응용

<sup>1</sup>이 지원 · <sup>2</sup>이 은 규

<sup>1</sup>생명공학연구소 미생물공정연구소, <sup>2</sup>한양대학교 화학공학과 생물공정연구소  
(접수 : 2001. 1. 12., 게재승인 : 2001. 4. 25.)

## Development and Applications of Proteomics Technology

Ji Won Lee<sup>1</sup> and Eun Kyu Lee<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Microbial & Bioprocess Engineering Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,  
P.O. Box 115, Taejeon, Korea.

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, Bioprocessing Research Laboratory, Hanyang University,  
Ansan 425-791 Korea

(Received : 2001. 1. 12., Accepted : 2001. 4. 25.)

Proteomics research includes identification and quantitation of single protein and/or protein complex, profiling of protein expression changes in response to biological perturbations, characterization of protein functions and interactions, and elucidation the linkage between proteins and diseases. In this review paper, recent developments in the basic technologies involved in the proteomics research such as 2-dimensional PAGE and mass spectrometry are discussed. Also, the application areas of proteomics technology such as protein expression mapping and cell map proteomics are introduced with the focus on new drug development.

**Key Words** : proteomics, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry, expression mapping

### 서 론

Proteome이란 말은 하나의 유전체(genome)로부터 발현된 단백질들의 총집합체(Proteins expressed by a genome)를 의미하며, 그 개념은 1994년 이태리 Siena에서 열린 2D-PAGE 학회에서 Wilkins 등(1,2)에 의해 처음으로 소개되었다. 이후 세계적으로 활발한 proteome 연구(proteomics)가 진행되어 많은 유용한 결과들이 보고되고 있으며(3-10), 연구 결과들은 주로 단일 단백질 또는 단백질 복합체의 동정(identification) 및 정량분석(quantitation), 생물학적 perturbation에 의한 단백질의 발현양상(expression profiling) 변화, 단백질 기능 및 상호작용 특성 규명(characterization), 그리고 단백질과 질병 간의 연결고리 규명 등에 관한 내용을 포함한다.

1953년 Francis Crick의 DNA 이중나선 구조의 발견이 생물학 및 의학분야 발전에 결정적인 계기가 되었다는 것은 주지의 사실이다. 70년대 유전학자들은 유전체의 전체 염기서열 해독이 모든 병의 근원을 설명해 주리라 확신하였고 그 이후 serial

analysis of gene expression(SAGE)(11), differential display(12), oligonucleotide array technology(13), cDNA microarray(14) 등과 같은 genome 연구(genomics)를 위한 다양한 기술들이 최근까지 개발되어 왔다. 그러나 90년대에 들어 유전체의 염기서열 해독만으로는 복잡한 생체 반응 및 질병 기작을 이해하는데 충분치 않고 gene product, 즉 mRNA와 단백질들의 기능 분석이 함께 병행되어야 할 필요가 있다는 사실이 점점 더 많은 이들의 공감을 얻게 되었다. Anderson과 Seilharmer(15)에 의해 처음 제기된 후, 세포 내의 mRNA 양과 단백질의 발현 수준 사이에는 밀접한 연관성이 거의 없는 것으로 알려지고 있으며, 따라서 분자 수준에서의 생체 반응 및 질병 기작을 이해하기 위해서는 관련 단백질 자체의 발현 양상을 정밀하게 분석해야 할 필요를 느끼게 되었다. 유전자 발현과 단백질 합성간의 상호 관련성 결여는 유전자 발현과 단백질 합성간의 시공간적 차이, 단백질과 mRNA의 안정성 및 turnover 효율의 차이, 다양한 단백질 합성을 야기하는 mRNA의 post-transcriptional splicing 등에서 그 원인을 찾아 볼 수 있다.

mRNA가 아닌 단백질 자체를 연구해야 하는 또 다른 이유는 post-translational modification의 다양성 및 복잡성에 있다. 실제 post-translational modification에 의해 DNA 또는 mRNA 분석을 통해 예상되는 것 보다 훨씬 더 많은 수의 다양한 기능을 갖는 단백질들이 만들어지게 되며, 따라서 복잡한 생명 현상을 이해하기 위해서는 세포 내 수천 개 단백질들에 대한 정량분석은 물론

\*Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
Bioprocessing Research Laboratory, Hanyang University, Ansan  
425-791 Korea

Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779

E-mail : eklee@hanyang.ac.kr

론 다양한 기능 변화에 대한 분석이 또한 요구된다. 생명 현상들은 복잡하면서도 서로 정교하게 연결되어 있는 생화학적 대사경로에 의해 조절되므로, 유전자 발현이나 단백질 합성 및 기능 측면에서의 미세한 변화가 정교한 대사기작의 이상변화를 촉발하여 질병을 유발할 수 있다. 따라서 이미 산업화된 고효율의 DNA 분석기술들과 병행 적용됨으로써 상호보완적인 관계를 유지할 단백질 분석 관련 고생산성 산업기술이 개발되어야 한다는 것은 거부할 수 없는 시대의 흐름이며(16), 이러한 관점에서 proteomics가 생명공학 연구분야의 새로운 패러다임 변화를 주도할 것으로 보인다.

## Proteomics 핵심 기술

### 2-D PAGE

현재 2-D PAGE 방법은 1st dimension을 위한 pre-cast IPG (immobilized pH gradient) gel strip과 2nd dimension을 위한 pre-cast SDS-PAGE gel을 함께 사용하는 것이다. 최근의 IPG gel로 pH 3에서 pH 12까지의 범위에서 재현성 있게 IEF (isoelectric focusing)에 의한 1차 단백질 분리가 가능하다(17-21). 2-D PAGE에 있어 가장 큰 문제는 하나의 gel 위에서 sample 내의 모든 단백질들을 감지할 수 없다는 점인데, 2-D PAGE 기술을 이용할 때 갖게 될 문제점들과 이의 해결방법에 대해 간단히 설명하면 다음과 같다. 첫째, 미량 존재하는 단백질들(세포 당 10-1,000 copy 정도)을 탐지하기 위해 sample의 loading 양을 증가시키면 다량 존재하는 단백질들(세포 당 1,000 copy 이상)이 필요 이상으로 gel 상에 과잉 존재하게 되어 단백질 분리 자체가 제대로 이루어지지 않게 된다. 즉 단순한 단백질 loading 양의 증가는 분석 가능한 단백질 수를 늘리는데 매우 제한적인 효과만을 미칠 뿐이다. Molloy 등(22)은 sequential extraction 방법을 이용하여 미량 존재하는 소수성 단백질을 성공적으로 fractionation하였다. 좁은 pH 범위 (pH 범위 2 이하)의 IPG gel을 이용, 선행 단백질 분리를 통한 prefractionation도 소량으로 존재하는 단백질을 분석하는데 효과적인 전략이 될 수 있다. 최근 Sanchez 등(23)은 in-gel rehydration방법을 사용하여 15 mg에 달하는 단백질 sample을 narrow range IPG gel에서 분리하는데 성공한 바 있다.

둘째로, 단백질의 다양한 구조와 화학적 상이성 때문에 단백질 용해를 위한 하나의 최적 protocol을 모든 sample에 일률적으로 적용하기가 힘들다는 것이다. 비용해성(일반적으로 강소수성) 단백질들은 sample 처리 과정, IPG gel로의 loading 과정, 또는 IEF 과정 중 등전점에 도달 할 때 용해도의 감소로 불용화되어 소실될 가능성이 크다. 최근, 예전 보다 더욱 강력한 chaotropic agent 및 계면활성제의 동시 사용(24, 25) 그리고 더욱 효과적인 환원제의 사용(26) 등을 통해 단백질 용해과정에 있어 많은 개선이 이루어 졌다. 이처럼 개선된 용해액을 사용하는 protocol을 이용하여 대장균(22, 27)과 식물의 cytoplasmic membrane(28)에 존재하는 소수성 단백질의 분리와 검출이 가능하게 되었다. 또한 목적 단백질의 용해도 특성에 맞게 앞서 설명한 prefractionation 과정을 적절히 최적화해야 할 필요가 있다(29-31).

셋째로, pI 10 이상의 염기성 단백질 또는 분자량이 너무 작거나 큰 단백질들은 2-D gel 상에서 분석이 어려운 단백질로 남아 있다. 이 같은 염기성 단백질들을 2-D gel로 효과적으로 분

리하려면 현재 상업화된 pH 10까지의 IPG gel 보다 더욱 pH 범위가 확장된 특수 gel (narrow-range alkaline IPG gel)을 이용, IEF 단계를 진행시켜야 한다. 그러나 narrow-range alkaline IPG gel을 이용하려면 특별한 rehydration 용액을 사용해야 하며 또한 reverse electro-osmotic flow와 같은 문제점들을 극복해야 한다. Gorg 등은(32) 확장된 pH 범위, 즉 pH 3-12 또는 pH 4-12의 IPG gel을 제조하는데 성공하였는데, 이러한 IPG gel을 이용하면 narrow-range alkaline IPG gel 사용 시 필요한 특수 rehydration 용액의 추가 사용 없이 IEF 단계를 단순화시킬 수 있다.

일반적으로 분자량이 8 kD 보다 작거나 200 kD 이상인 단백질은 2-D gel 상에 잘 나타나지 않는다. 흔히 사용하는 Tris-glycine buffer system에서 작은 단백질들에 대해 해상도가 떨어지는 것은 전기영동이 진행됨에 따라 sample과 buffer로부터 free dodecyl sulfate 이온이 계속 축적됨으로써 발생한다. 이와 같은 dodecyl sulfate 이온 덩어리는 작은 단백질들과의 convective mixing을 초래하여 불명확한 band를 만들어내며 해상도를 저하시킨다. 게다가 gel의 하층부에 있는 다량의 dodecyl sulfate 이온은 단백질의 고정화와 염색을 방해하기도 한다. Schagger와 von Jagow(33)는 작은 단백질들이 이러한 이온 덩어리로부터 헤리되어 적절한 band를 형성하도록 glycine 이온을 tricine으로 교체하였는데 이 같은 tricine gel은 현재 다양한 2-D PAGE 용 precast mini-gel로 상업화되었다. 고분자량 단백질의 경우는 문제가 더욱 심각해진다. 일례로, *S. cerevisiae*의 경우에 있어 100 kD 이상인 단백질은 단지 11%에 불과하므로 이론상 거대 단백질 1.0 mg 정도를 loading하기 위해 기타 단백질을 엄청나게 과잉으로 (9 mg 정도) gel에 loading하게 된다. 또한 거대 단백질 복합체(protein complexes)의 경우는 2-D PAGE에서 사용되는 denaturation 조건에서 단백질 복합체가 각각의 polypeptide로 분해가 되기 때문에 buffer 조건을 바꾸고 전기영동 과정을 최적화해야 한다. 더욱이 거대 단백질들은 그 크기 때문에 IPG gel 속으로 쉽게 진입되지 못하는데, 이들의 진입을 촉진하기 위해서는 낮은 전압 하에서 in-gel rehydration을 하거나 cup loading을 하는 것이 필수적인 것으로 보고된 바 있다(32).

2-D PAGE 후에는 densitometer와 소프트웨어를 이용, image analysis 작업이 수행되는데 현재 상용 소프트웨어가 하루동안 분석할 수 있는 gel의 개수는 매우 제한적이며 gel 당 1-8 시간 가량의 추가적인 수작업 시간이 필요하다. 따라서, 주당 200-400 개 정도의 high-throughput gel 분석을 가능케 하고 한번의 통합된 작업으로 gel의 영상화, spot excision, 기능분석 등을 수행할 수 있도록 일련의 robotics 장치에 연결 사용이 가능한 자동화 기기의 개발이 필요한 실정이다.

### Mass Spectrometry

위의 2-D PAGE 기술에 의해 분리된 단백질들은 mass spectrometer에 의해 빠르고 정확하게 동정될 수 있다(34). Nano-ESI (electrospray ionization) 질량분석기는(35-41) sample들을 액상에서 micro-LC, HPLC 또는 capillary electrophoresis 등의 prefractionation 과정을 거쳐 정제된 후 이온화시켜 (다중 전하 등) 분석하는 방법이다. MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) 질량분석기는(42-53) 대상 polypeptide를 trypsin으로 분해한 후 고형의 tar gel 상에서 laser에 의해 이온화된 peptide들의

비행시간을 측정, 각각의 mass를 분석하는 TOF(time of flight) 형이 많이 이용된다. MALDI-TOF 방법에 의한 peptide mass fingerprinting(PMF)은 proteolytic digestion 이후 분석된 각 peptide들의 질량을 대상 단백질에 대해 동일 효소를 사용하여 얻을 수 있는 simulated protein database와 비교, 검색하는 방법이다. 예상되는 open reading frame으로부터 모든 tryptic peptide의 질량이 간단히 계산될 수 있기 때문에 현재의 분석 정확도로는 이러한 기술만으로도 효모처럼 염기서열이 완전히 밝혀진 genome 유래 단백질들을 동정하는데 충분하다. MALDI-TOF에 의한 정확하고도 간결한 PMF 분석은 genome database 내 단백질들에 대한 정확한 동정을 가능케 할 것으로 보인다. Tag sequencing이라 불리는 부분적인 amino acid sequencing은 database 검색을 더욱 효과적으로 만드는데 (52, 55-57), 오늘날 가장 효과적인 검색 방법은 mass spectrometer로부터 얻은 peptide mass 또는 partial sequence data를 활용하여 EST (expressed sequence tag) database 검색을 수행하는 것이다 (58, 59). Triple quadrupole & ion trap 장치는 단일 이온 species(즉, 전하를 띤 polypeptides 또는 그것들의 단편들)를 분리하여 고감도의 단백질 동정 및 post-translational modification 특성 규명을 가능케 하며(37), quadrupole과 TOF를 조합한 Q-TOF 장치도 매우 정확한 질량측정기로서 현재 그 앞날이 매우 밝다고 한다(54). MALDI-TOF는 필요한 자동화 시스템만 구축된다면, 1주 당 gel로부터 얻어낸 수 천 개의 단백질 분석을 진행할 수 있으므로 많은 연구진들이 이러한 목적에 부합되는 기기를 만들고자 노력하여 왔고 그 결과 많은 발전이 있었다. ESI는 상대적으로 낮은 sample 처리용량에도 불구하고 peptide mass는 물론 partial sequence에 대한 정보제공도 가능하여 post-translational modification 분석에 특별히 유용하므로, 단계적으로 두 방식을 함께 사용하는 것이 가장 효율적일 것이라 생각된다.

### 분석기술의 자동화

단백질 동정의 자동화는 여러 단순 수작업 절차를 생략하며 많은 양의 sample 분석을 재현성 있게 신속히 수행할 수 있다는 측면에서 proteomics 분야에 있어 중요시 되어왔다. MALDI나 ESI mass spectrometer를 이용, PMF에 의해 단백질 동정을 하기 위해서는 일반적으로 다음의 3가지 단계가 요구된다: (1) Gel 또는 membrane image 분석 이후의 spot excision 또는 microtitre plate로의 transfer, (2) protease를 사용한 단백질의 digestion (여기에는 여러 가지 액체시약 처리과정이 포함됨), (3) 분해된 단백질 산물을 MALDI target으로 deposition하거나 electrospray 속으로 도입하는 것이다. 각 단계를 구분하여 처리할 수 있는 일부 modular robot들이 개발되어 있긴 하지만, 각 단계들을 통합하여 전 작업을 자동화할 수 있는 기기는 현재 개발되고 있지 못한 실정이다. 많은 연구기관에서 (사설기관: Oxford GlycoSciences, Proteome Systems, Ltd, Large Scale Biology, Proteome Inc. 등, 공공기관: Australian and Danish national proteome facilities 등) 다수의 2-D PAGE를 수행하고 있음에도, Quadron과 James(60)는 최근 현재의 array 기술 (2-D gel) 수준은 자동화에는 아직 비현실적이라 말하고 있다. 대부분의 연구자들은 large-format 2-D gel을 사용하는데, gel의 깨지기 쉬운 특성과 large format을 다루는데 있어 전체적인 footprint 문제는 자동화에 커다란 장애가 되고 있다. 이 같은 gel의 깨지기 쉬운 특성은 Duracryl 같은

acrylamide 유도물질의 사용과 플라스틱이나 유리에 붙는 gel의 점착성에 의해 다소 보완될 수 있지만 Proteome Systems사와 같은 회사들은 자동화에 더 적합한 mini-gel의 사용에 더 초점을 맞추어 왔다. 2-D 분리기술이 자동화된다면 대규모 screening project를 수행하는데 있어 많은 이득을 얻게 될 것임은 자명한 사실이다. 현재까지 proteomics 자동화의 성과로 미국의 Large Scale Biology사에서 Iso-Dalt format으로 주 당 100장의 gel을 분석할 수 있는 기기를 만들어 보고한 바 있다. 또한 비록 일련의 데이터 분석과정에서 몇몇 단계들은 (예: spectra calibration 또는 monoisotopic peak의 검출) 아직도 사용자의 수작업을 일부 요구하고 있지만 MALDI를 이용한 sample 분석의 자동화는 그동안 상당한 진전을 이루어 왔다.

가까운 장래에는 좀 더 세련된 기능의 분석장비들이 상업화될 것으로 기대된다. 가령 2-D gel의 electroblotting(61)과 같이 압전 장치의 사용에 기초하여 고정화된 단백질 시료 위로 시약들을 *in situ* printing하기 위한 장비가 개발되거나, 전체 2-D gel 상의 단백질 시료들이 electroblotting 과정 중에 자동 절단되어 peptide 상태로 membrane 위에 옮겨지게 될 수도 있을 것이다(62,63). 두 경우 모두에서 sample들은 MALDI-TOF에 의해 분석 가능할 것이며, 이러한 분석공정의 자동화는 종래의 기술을 이용할 때 요구되는 sample excision 및 이후 처리과정에 필요한 수작업의 양을 실질적으로 감소시켜 나갈 것이다. Proteomics를 위한 단백질 array 기술 및 분석을 위해 매우 높은 수준의 용량을 갖춘 자동화 기기가 조만간 이용 가능해질 전망이다, 이것은 gene cloning, DNA sequencing에 견줄 수 있는 정도의 고생산성 시료 분석을 가능케 할 것이다.

## Proteomics 응용분야

### Protein Expression Mapping

Protein expression mapping은 2-D PAGE와 image analysis를 사용하여, 조직, 세포, 또는 체액 내 단백질 발현에서의 양적인 변화를 연구하는 것으로 정의 될 수 있는데, 필요시 mass spectrometer가 추가로 이용될 수도 있다. 이 방법은 전기영동 중에 단백질의 mobility 변화를 일으킬 수 있는 glycosylation 또는 phosphorylation과 같은 post-translational modification을 탐지하고 단백질의 양을 직접 결정할 수 있는 장점을 지닌다. 다량으로 존재하는 단백질은 쉽게 2-D gel 상에 나타나며, 일반적인 염색기법과 imaging 기술이 양적인 정보를 산출하기 위해 적용된다. 대조적으로, 미량으로 존재하는 단백질은 분석에 앞서 sample의 prefractionation을 필요로 하는데, 이 과정에서 단백질이 일부 소실될 가능성이 있다. 즉, 단백질의 정량을 위해서는 경우에 따라 한가지 이상의 단백질 분리공정이 적용될 필요가 있고 섬세한 염색과정을 거치기 때문에 분석의 정확도에 영향을 미칠 수 있는 많은 인자들이 존재한다.

Gygi 등(64)은 조직마다 다르게 발현하는 단백질들을 정량하기 위하여 훌륭한 방법을 고안했다. ICAT(isotope-coded affinity tagging)라 불리는 이 기술은 isotopic reagent로 cysteine 잔기의 side chain을 radioactive labeling 한 후 endoproteolytic cleavage 시킨 후, avidin-biotin binding chromatography에 의해서 방사능 표지된 cysteine을 함유한 peptide를 분리시키는 것이다. 각 sample에 대한 결과로 얻은 peptide는 mass spectrometer와 pep-

tide intensity differences에 의해서 분석됨으로써 다른 sample들 간의 상대적인 단백질 발현 정도가 측정된다. 이 방법은 비록 단백질이 다수의 cysteine 잔기를 가져야 한다는 것을 전제로 하지만 널리 이용되고 있다. 단백질 정량에 있어 또 하나의 발전은 새로운 형광 염료인 Sypro Ruby(Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.)의 개발이다. 이 염색방법은 silver staining 방법과 유사한 detection limit을 가지면서 정량분석 시 silver staining에 비해 거의 10배 이상의 linear dynamic range를 가진다고 주장되고 있다. 그러나 검출시스템을 개선하고 labelling 과정을 좀더 최적화시킬 필요가 있다.

하나의 유전자로부터 발현된 단백질 isoform의 수는 prokaryote의 경우 2개 (예: *E. coli* enolase의 2개 isoform), eukaryote의 경우는 적어도 22개까지 (예: 인간 혈청 내 22개  $\alpha_1$ -antitrypsin isoform) 존재한다. 따라서 전체 genome에 대한 지식조차도 단백질이 발현된 이후의 변형에 대해서는 충분한 정보를 제공하지는 못한다. 단백질 isoform들의 주요한 형태는 다음과 같다: (1) 동일 mRNA로부터 다양하게 splicing된 형태, 2) N- 그리고 C-terminal truncation, 3) co- 또는 post-translational modification (phosphorylation, deamidation, glycosylation, 그리고 N-terminal acetylation과 같이 단백질의 전기부하에 영향을 미칠 수 있는 modification), 4) endogenous protein degradation, 그리고 5) oligomerization이다(65). 단백질의 isoform 탐지를 위한 2-D gel 사용에 있어 한가지 전제조건은 모든 단백질들의 modification은 2-D gel 상에서 저마다 독특한 이동 위치를 가질 것이란 점이다. 대부분의 2-D gel로 단백질 isoform들을 탐지할 수 있으며, 특히 narrow-range gel을 사용하면 그 가능성은 더욱 증가한다. 실재, narrow-range IPG에서는 단일 잔기의 치환으로 단지 미세한 pI 차이를 보이는 두 isoform들을 분리해 낼 수 있다(66).  $\alpha_1$ -Anti-trypsin의 경우, N-linked glycosylation 변이와 N-말단 5개 아미노산의 truncation이 적절히 조합되는 것만으로도 5개 isoform들이 생겨나는데(65), 이 역시 2-D gel array에 의해 확연히 분리되었으며 PMF에 의해 정확하게 동정되었다. 때때로 단백질의 isoform들이 위치 상 매우 밀접한 여러 spot들의 열(spot train)로 나타나기도 한다 (예: serum glycoprotein)(67). 그러나 단백질 변형에 의한 여러 isoform들의 정확한 기능규명에 이용될 만한 분석기술은 정확도, 자동화 정도, 또는 bioinformatics 구축 측면에서 볼 때 아직 만족스럽지 못한 수준이다.

현재 post-translational modification에 있어 관심의 주요 대상은 단백질의 인산화(phosphorylation)이다. 이것은 2가지 이유에서 기인한다. 즉, mass spectrometry 분석기술의 발달로 phosphopeptide를 정확하게 분석하는 것이 점차 가능해 지고 있다는 것과 (68-70) 무엇보다도 단백질의 인산화가 세포 내에서 기능상 중요한 역할을 담당하고 있다는 사실 때문이다. 이런 형태의 modification은 pI 변화에 의해 gel 상에서 탐지될 수 있다. Glycosylation의 탐지는 당쇄의 구조가 매우 다양하면서도 기능 변화에 미치는 영향은 적은 반면 기능 변화가 상당히 특이적으로 나타나기 때문에 alcoholism, glycoprotein-deficient syndrome, rheumatoid arthritis와 같은 질병 진단에 이용될 수 있다(71). Expression mapping은 질병 marker의 발견에 있어 귀중한 수단이 되며 약물의 활성이나 독성에 관한 정보를 얻기 위해서도 유용하게 이용될 수 있다. 이러한 접근 방법이 cellular pathways를 규명하는데 있어서 얼마나 성공적으로 이용될 수 있으며 단백질 발현수준에

대한 분석결과가 얼마나 신뢰성을 주느냐 하는 것에 대해서는 아직 명확한 결론을 내리기 힘들다. 비록 현재까지의 적용사례는 그리 많지 않다 하더라도 expression proteomics는 drug target discovery나 세포에게 주어지는 다양한 생물학적인 자극에 대한 영향을 연구하는데 있어서 유용하게 이용될 전망이다. 이에 대해서는 다른 section에서 좀더 상세히 설명하도록 하겠다.

### Cell Map Proteomics

세포 내의 복잡한 여러 대사반응의 조절기작과 관련하여 'protein machine'(72)이라 불리는 단백질 복합체의 개념이 최근 대두되고 있다. Cell map proteomics는 세포 내 존재하는 단백질 복합체들을 확인하고 구성 단백질간의 상호작용 (protein-protein interaction) 및 그 기능을 밝혀냄으로써 세포의 종합적인 기능지도(function map)를 구축하는 일이다. 단백질 복합체의 대용량 분석기술의 개발은 세포지도(cell map)를 만드는데 있어 핵심조건이 되며, cell map proteomics를 통해 질병이나 drug response의 결과로서 단백질 상호작용 계의 disruption이 다른 대사경로에 미치는 영향을 정밀 분석함으로써 세포 기능을 파악하게 된다. 인간의 genome을 구성하는 약 100,000개의 유전자 속에는 주요 몇 개의 질병에 대해서만도 수천의 drug target이 있으므로, cell map을 구축하여 'validated' target을 찾아내는 것은 상당히 의미 있는 일이라 할 수 있다.

단백질 복합체를 직접 정제하여 mass spectrometry를 이용, 각 단백질의 기능 및 상호작용을 직접 분석하는 방법으로 최근 FLICE(73)와 IKK(74)와 같은 새로운 신호 단백질이 발견된 바 있다. Yeast two-hybrid system(75)은 개체 내 모든 단백질들을 대상으로 각 단백질과 기타 단백질과의 상호작용에 대한 분석을 목적으로 개발됐다. 이 방법에 의하면 기지의 단백질(known protein)이 GAL4 binding domain(GBD)에 coupling된 형태의 hybrid 단백질과 yeast cDNA library로부터 발현된 미지의 단백질(unknown protein)이 GAL4 activating domain(GAD)에 융합된 형태의 두 번째 hybrid 단백질사이의 상호작용을 galactose selection에 의해 검출함으로써 단백질 간 상호작용 여부를 분석할 수 있다. 일반적으로, 하나의 GBD hybrid는 GAD에 연결된 수천의, 전체 genome에서 유래한 protein clones에 대해서 screening 된다. 그러나 이러한 연구는 단백질간의 비생물학적 상호작용(예를 들어 세포 내 다른 구획(compartment)에 존재하는 단백질들 또는 판이하게 다른 발생 시점에서 발견되는 단백질들 사이의 상호작용)을 screening하는 능력은 갖고 있지 못하며, false positive 검출 가능성이 높고, 다양한 특성의 protein-protein interaction으로 구성된 단백질 복합체 규명에 적절치 못하다는 한계를 가지고 있다.

Rigaut 등(76)은 *in-vivo* 단백질 복합체를 정제할 목적으로 tandem affinity purification(TAP) 방법을 개발했다. 복합체의 알려진 단백질 성분을 tagging하고 이 융합단백질을 숙주세포에서 발현시키면 tagging된 단백질은 기타 세포 내 단백질들과의 상호작용에 의해 *in-vivo* 복합체를 형성하게 되고, 그 복합체는 affinity column에 의해 회수된다. 구성 단백질 성분은 mass spectrometry 분석과 database 검색에 의해서 동정된다. 복합 단백질 성분들은 필요 시 MS 분석에 앞서 1-D 또는 2-D gel로 분리될 수도 있다. TAP 기술은 복합체 내에서 직접 간접적으로 작용하는 다양한 단백질들의 특성 규명이 가능하다는 점에서

yeast two-hybrid system보다는 장점을 지닌다. 이 방법의 적용 범위가 아직 충분히 검증되지는 않았지만, 효모 snRNP 복합체의 모든 subunit들을 동정하고 효모의 새로운 3-protein complex의 완전한 특성 규명에 이용된 바 있어(76) 그 유용성은 이미 검증되었다 할 수 있다.

Lamond와 Mann(77)의 제안에 따르면, affinity purification을 가능케 하는 peptide sequence를 가지고 gene tagging을 체계적으로 이용하고, subcellular fractionation 및 mass spectrometry를 효과적으로 활용하면 많은 단백질 복합체 지도(map)와 cellular location에 대한 정보를 이끌어 낼 수 있다. 이것은 실제적으로 세포의 physical map이 될 것이며, 다른 조건 하에 있는 다른 종류의 세포 분석에도 활용될 수 있을 것이다. 개념상으로 유사한 실험이 two-hybrid system을 이용하여 yeast proteome의 6200개 단백질들에 대하여 이미 수행되고 있다(78). 물론 이 방법은 전체 단백질 복합체의 기능 연구보다는 두 단백질의 일대일 상호작용의 특성 파악에 제한되며 대상 단백질의 세포 내 folding 효율에 의해 그 성패가 좌우되지만 mass spectrometry와의 상호보완적인 관계를 유지하며 유용 정보를 산출해 낼 것임에는 틀림없다.

단백질 간 상호작용을 연구하는데 있어서 cross-linking, co-immunoprecipitation, 크로마토그래피에 의한 co-fractionation과 같은 기존의 일반적인 생화학적 분석기법이 mass spectrometry와 병행된다면 단백질 기능 및 단백질 복합체 연구를 위한 효과적인 수단이 될 수 있다. 많은 양의 sample 처리가 가능한 단백질 기능 연구를 위해서는 다양한 기존 기술들의 체계적인 통합과 표준화를 필요로 하는데, 이 문제는 proteomics의 실용적 적용이 가능한 신약개발과 같은 분야에서 그 응용범위를 제한하는 가장 심각한 bottleneck이 되고 있다. 또한, genome sequencing에서 요구되었던 핵심 기술들의 체계적인 자동화가 proteomics 분야의 효율적인 연구수행을 위해서도 필수적이며, 유전체 연구 과정에서 이미 개발됐던 많은 기술들이 응용되어 유용하게 적용될 수 있을 것으로 생각된다. 최근에 NIH에서 개발되어 상용화된 infra-red laser capture dissection (LCM) 기술은 매우 선택적으로 신속하게 조직의 특정지역을 미세 절단해 낼 수 있다. 이렇게 되면 특정 세포와 특정 지역에 대한 cell map을 작성할 수 있고, map의 변형유무를 감지하면서 질환의 관련 여부를 규명할 수 있을 것으로 기대된다.

## Proteomics 기술과 신약개발

### 질병 표지인자(marker)의 동정 및 Drug Target의 도출

신약개발을 위해 proteomics가 일반적으로 적용될 수 있는 분야는 특정 단백질 발현의 양적인 변화를 감지하여 질병 진단을 위한 marker를 확인하고 치료제 개발을 위한 기초적인 단서를 찾아내는 일이라 할 수 있다. 즉, proteomics가 건강한 상태와 병든 상태의 세포나 조직의 단백질 발현 양상의 차이를 신뢰성 있게 제공할 수 있다면 drug target을 찾아 치료제 개발을 효과적으로 수행할 수 있다. 정상 조직과 병든 조직에서 differential proteome profiling에 의해 암과 같은 질병상태를 인지할 수 있는 진단표지(diagnostic marker)의 확인은 치료제 개발의 주요 단계이며 표지 동정(marker identification)을 위한 이 기술의 성공적인 적용사례가 덴마크 인간게놈연구센터(Aarhus, Denmark)의

Celis의 연구(79)에 잘 나타나 있다. 그의 연구실에서는 소변 sample을 이용하여 요로(urine tract)에 발생하는 squamous cell carcinoma(SCC)를 감지할 수 있는 psoriasin이라고 하는 biomarker를 처음으로 동정하였는데, 후후에 면역화학반응에 의해 그 실효성이 검증된 바 있다.

### Target의 검증 및 독성 연구

Proteomics는 신약 후보물질의 약효 검증을 위한 수단으로서도 활용이 가능하다. 이것은 치료제 투여 전후의 reference protein profile의 비교분석을 통해서 이루어 질 수 있으며, 여러 치료제 유도물질들을 대상으로 단백질 구조와 생물학적 활성도 사이의 상관관계를 도출해 낼 수도 있다. 이러한 응용성은 신약 후보물질들을 확인하고 최적화하는데 소요되는 시간을 크게 절약해 주는데, 일례로 Large Scale Biology사(Rockville, MD, USA)는 하나의 치료물질이 세포 내 단백질 발현에 미치는 영향을 분석할 수 있는 효과적인 연구개발 프로그램을 운영하여 지질 저하제인 lovastatin의 작용기작과 단백질 발현 특성과의 상관관계를 보여주는 2-D gel data를 발표한 바 있다. 즉, lovastatin이 인체 내 콜레스테롤 대사작용에 관련된 단백질 발현에 미치는 영향을 분석하였던 것이다(80).

Target validation의 한 단계로서 약물의 독성시험을 위해 proteomics를 활용할 수도 있는데, 정상 조직과 독성물질로 처리된 조직의 단백질 발현 양상을 비교하여 독성여부를 분석할 수 있다는 것이다. Novartis사(Basel, Switzerland)의 Steiner는 cyclosporin A(CsA) 투여 전후에 rat 신장세포에서의 단백질 발현 특성을 2-D gel로 비교 분석하여 CsA 투여 시 down-regulation된 단백질 spot 중의 하나가 calbindin임을 확인하였다(81). 이 단백질은 calcium의 binding과 transport에 관여하며 신장의 미세관(tubules)에서 발견되는 단백질인데, 현재 CsA의 독성효과인 intratubular calcification이 calbindin의 감소와 관련이 있다는 과학적인 증거들이 속속 보고되고 있다. 따라서, 신장 조직세포의 2-D gel 분석이 CsA 부작용 원인 규명에 결정적인 단서를 제공했다는 좋은 예가 된다. 새로운 약물의 부작용을 조사할 때 다양한 독성물질들이 비교 목적의 표준 reference 물질로 이용될 수 있을 것이다.

제약산업계에서 처음으로 proteomics가 응용된 사례들 중의 하나가 Large Scale Biology사가 약물의 독성을 검출하는 detector로서 rat liver를 사용했던 것이다(82-84). 또한, 1990년 이후 미국의 국립 암연구소에서는 drug action 및 drug toxicity 작용기작에 대한 정보를 얻어내기 위해 여러 cancer cell line들을 대상으로 새로운 치료물질 탐색작업을 해오고 있었는데(85), 최근에는 다양한 치료 후보물질들의 약효실험을 위해 미국 FDA와 공동으로 Tissue Proteomics Initiatives라는 program을 지원하고 있다(86). 최근에는 Hoffman-La Roche, Glaxo Wellcome, Millenium, Pfizer 등과 같은 대형 제약기업들이 질병 표지인자(disease marker)와 drug target의 신속한 확인을 목적으로 대대적으로 proteome 연구를 지원하고 있다. Proteomics에 의해 제공되는 단백질 발현 특성에 대한 종합적인 분석은 의학자들로 하여금 질병을 일으키는 다중 요인에 대한 검색을 가능케 하였다. 유전자의 단일 부위 결손에만 기인한 질병은 극소수에 불과하다는 것이 일반적인 사실이며, cystic fibrosis와 같은 질병의 경우, 유전자의 돌연변이 부위에 따라 질병의 증세 정도가 결정되기도 한

다. 이같이 질병의 유전적 원인 분석을 포함하여 질병을 정확하게 확인하는 것은 더 효과적인 drug target을 찾는 데 도움이 된다. 더욱이 drug discovery와 molecular pharmacology 분야에서 proteomics를 활용하면 각 개인의 phenotype에 따라 적절한 치료 방법을 선택할 수도 있다는 전망을 가능케 한다.

### 치료방법의 방향 제시

Proteome 연구 결과로 질병의 원인, drug target, 생체 내에서의 단백질 간 상호작용 특성이 밝혀지면 유전자 치료, 형질전환, 재조합 단백질 의약품 개발 등 적절한 치료 방법의 선택이 좀더 명확해 질 수 있다. 예를 들어 proteomics 결과 cystic fibrosis의 발병 원인으로 이온 pump의 유전적 결함을 확인하고 치료방법의 하나로서 이온 pump를 다시 구축하기 위한 유전자 치료방법이 이용된 것과 관련이 있다(87). 또한, 단백질 간 상호작용을 연구하여 세포 내의 유사 항원들에 대해 높은 affinity를 갖는 intrabodies, intracellular single-chain antibodies 등을 가능성 있는 치료제로 생산하기 위해 세포 형질전환기술이 이용될 수도 있을 것이다(88). 그러나, 거의 모든 세포들이 targeting되어야 하는 Duchenne muscular dystrophy와 같은 질병의 경우는 형질전환 접근 방법보다는 재조합 단백질 의약품을 개발하는 것이 훨씬 유리할 것이다(89). 지난 몇 년에 걸친 연구결과, 단백질에 양전하를 띤 tag(즉 다수의 lysine이나 arginine 잔기를 포함)를 융합시키면 세포 막 투과효율이 증가한다는 사실이 보고된 바 있다. 즉, HIV-1의 Tat 단백질은 세포 내로 유입된 후 다른 숙주 단백질들과 화학적으로 cross-linking되는데(90), 이는 11개의 아미노산 서열 (YGRKKRRQRRR)의 존재에 기인하는 것으로 밝혀졌다. 이 아미노산 서열을 융합시킨 결과 *in vitro* 및 *in vivo* 모두에서 120 kD에 달하는 거대 단백질까지 효율적으로 세포 내 유입이 이루어진 것으로 보고된 바 있다(91). 단백질 전이 효율이 peptide sequence에 의해 좌우되기도 하고, 단백질 세포 targeting이 어느 정도 세포 특이적 (tissue-specific)이라는 연구결과들은 적극적인 재조합 단백질 치료제 개발의 필요성을 암시해 준다.

### Proteomics 기술의 향후 전망

해외의 대형 제약회사들이 proteomics 분야의 연구비 지원을 대폭 늘리고 있으며, hardware와 software 개발 관련 벤처기업들이 수없이 새로 세워지고 있는 현재 추세로 보아 proteomics 분야는 빠르게 그리고 당분간 지속적으로 성장할 것으로 보인다. 이러한 성장과정 중에서 대용량 분석기술, 기기의 소형화 및 자동화 기술, 새로운 질량분석기법, 고효율 bioinformatics 등이 개발될 것이며 상업화될 것이다. 구체적으로, sample solubilization, subcellular fractionation, protein detection 기술 등이 더욱 개선될 것이며, 좀더 좁은 pH 범위의 IPG gel이 다양하게 상업화되면 2-D PAGE를 이용한 단백질 분리 및 분석의 감도/해상도 등을 대폭 향상시킬 것임에 틀림없다. Mass spectrometry 기술은 사용의 편의성과 분석의 정밀도에 있어 지속적으로 개선되어 왔으며 앞으로는 정밀도에 있어 많은 발전이 있을 것으로 기대된다. Gel이나 membrane blot 상에서의 *in-situ* 단백질 digestion 이후 곧바로 MALDI 분석을 시도함으로써 2-D PAGE와 mass spectrometry 단계를 직접 통합시키기 위한 기술개발 시도들이 있었으며(92, 93), 그 결과 gel과 mass spectrometer사이의 직접적인

interface를 갖고 gel processing 단계를 최소화함으로써 2-D PAGE를 통한 대량의 단백질 분석 및 자동화 기술이 개발될 수 있는 가능성을 크게 증가시키게 되었다. 이 같은 신기술 개발 노력과 더불어, 세계 도처의 여러 실험실에서는 2-D gel의 image analysis를 통합적으로 운영할 수 있는 고생산성의 2-D PAGE analysis platform을 구축해 왔다. 이와 더불어 모든 2-D gel image, mass spectra, sequence data는 호환성을 갖춘 database 화되어야 할 필요가 있으며, 궁극적으로 genomic data와 통합된 후 database 검색 소프트웨어에 의해 world wide web 상에서 사용자재로 활용 가능한 정보 source가 될 수 있도록 생물정보학 분야에서도 많은 발전이 있어야 할 것이다.

Proteomics가 functional genomics program을 완수하기 위해 필수적인 핵심분야라는 평가는 이미 진부해진 결론이며 생물공학 내지는 생물공정 엔지니어의 입장에서 이를 어떻게 적절히 활용할 것인가라는 질문에 대한 올바른 해답을 구해야 할 시점으로 생각된다. 특히 미생물을 다루는 공정 엔지니어의 입장에서 proteomics는 매우 유용한 수단이 될 수도 있다. 목적산물의 생산성에 직결되는 미생물의 생리, 대사현상의 미세 변화를 종합적으로 감지하면서 좀더 완벽한 대사공학적 접근을 시도해 볼 수 있을 것이며, *in-vivo* 또는 *in-vitro* protein-protein interaction을 정밀 분석하여 재조합 발현시스템 개발 또는 정밀 분리기술 개발에 활용할 수도 있을 것이다. 또는 미생물의 biofilm 형성 관련 기작을 규명하여 새로운 치료물질 개발이나 고생산성의 bioconsortia 시스템 개발에 응용할 수도 있는 등 분야별 활용 가능성은 무궁무진하다 할 것이다. 그러나 불행히도 이와 같은 proteomics의 유용한 활용성은 현재 게놈해독이 완료되었거나 상당부분 진행된 일부 미생물에만 제한되어 질 수밖에 없는 실정이며 (현재 미생물을 포함 18종 생물체의 게놈구조가 완전히 해독되었음), 따라서 다양한 유용 미생물들에 대한 게놈 연구가 앞으로 활발히 진행되어야 할 필요가 있다.

미국에서는 현재 몇 개의 기업들이 제약산업계를 대상으로 expression proteomics와 cell map proteomics를 활용한 공동의 계약연구개발 서비스를 제공하려고 준비하고 있는데, 극소량 존재하는 단백질의 정량 문제는 최적의 prefractionation, 고감도의 형광 labelling, gel의 loading 용량 증대, 그리고 mass spectrometry를 조합한다면 극복할 수 있을 것으로 보고 있다. Gel의 생산이 자동화되고 있으며 spot excision, proteolysis, mass spectrometry를 위한 robot 또한 개발 중에 있다. Proteomics의 nanotechnology 도입은 매우 중요한 분야인데 2-D PAGE를 대체할 수 있는 capillary-zone electrophoresis(CZE)(94)를 소수성 단백질 분리법과 융합시키는 것이다. 또한, 각종 진단용 항원이나 ligand들을 chip에 coating하는 단백질 chip 기술은 지금 매우 많은 진전을 보이고 있다. Proteomics 분야는 인체게놈 연구에 참여하지 못했던 우리나라의 입지를 조금이나마 회복시켜 줄 수 있는 좋은 기회가 될 수도 있을 것이다.

### REFERENCES

1. Wilkins, M. R., J. C. Sanchez, A. A. Gooley, R. D. Appel, I. Humphery-Smith, and D. F. Hochstrasser (1995), *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 1, 19-50.
2. Wilkins, M. R., C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz,

- and J. C. Sanchez (1996), *Biotechnology*, **14**, 61-65.
3. Kahn P. (1995), *Science*, **270**, 369-370.
  4. Swinbanks, D. (1995), *Nature*, **378**(6558), 653.
  5. James, P. (1997), *Biochem Biophys Res Commun*, **231**(1), 1-6.
  6. Humphery-Smith, I. and W. Blacstock (1997), *J. Protein Chem.*, **16**, 537-544.
  7. Packer, N. H., A. Pawlak, W. C. Kett, A. A. Gooley, J. W. Remons, and K. L. Williams (1997), *Electrophoresis*, **18**(3-4), 452-460.
  8. Haynes, P. A., S. P. Gygi, D. Figeys, and R. Aebersold (1998), *Electrophoresis*, **19**(11), 1862-1871.
  9. Yates, J. R. (1998), *J. Mass Spectrom.*, **33**(1), 1-19.
  10. Williams, K. L., D. F. Hochstrasser (1997), Berlin-Heidelberg-New York, Springer, 1-12.
  11. Velculescu, V. E. (1995), *Science*, **270**, 484-487.
  12. Liang, P. and A. B. Pardee (1992), *Science*, **257**, 967-971.
  13. Lockhart, D. J. (1996), *Nat. Biotech.*, **14**, 1675-1680.
  14. Schena, M. (1995), *Science*, **270**, 467-470.
  15. Anderson, L. and J. Seilhammer (1997), *Electrophoresis*, **18**(3-4), 533-537.
  16. Strohmman, R. C. (1997), *Nat. Biotech.*, **15**(3), 194-200.
  17. Gorgy, A, W. Postel, S. Gunther, J. Weser, J. R. Strahler, and S. M. Hanash (1988), *Electrophoresis*, **9**(1), 37-46.
  19. Corbett, J. M., M. J. Dunn, A. Posch, and A. Gorg (1994), *Electrophoresis*, **15**(8-9), 1205-1211.
  20. Bjellquist, B, B. Basse, E. Olsen, and J. E. Celis (1994), *Electrophoresis*, **15**(3-4), 529-539.
  21. Gorg, A, C. Obermaier, G. Boguth, A. Csordas, J. J. Diaz, and J. J. Madjar (1997), *Electrophoresis*, **18**(3-4), 328-337.
  22. Molloy, M. P., B. R. Herbert, B. J. Walsh, M. I. Tyler, M. Traini, J.-C. Sanchez, D. F. Hochstrasser, K. L. Williams, and A. A. Gooley (1998), *Electrophoresis*, **19**, 837-844.
  23. Sanchez, J.-C., V. Rouge, M. Pisteur, F. Ravier, L. Tonella, M. Moonsmayer, M. R. Wilkins, and D. F. Hochstrasser (1997), *Electrophoresis*, **18**, 324-327.
  24. Rabilloud, T, C. Adessi, A. Giraudel, and J. Lunardi (1997), *Electrophoresis*, **18**, 307-316.
  25. Chevallet, M., V. Santoni, A. Poinas, D. Rouquie, A. Fuchs, S. Kieffer, M. Rossignol, J. Lunardi, J. Garin, and T. Rabilloud (1998), *Electrophoresis*, **19**, 1901-1909.
  26. Herbert, B. R., M. P. Molloy, B. J. Walsh, A. A. Gooley, W. G. Bryson, and K. L. Williams (1998), *Electrophoresis*, **19**, 845-851.
  27. Molloy, M. P., B. R. Herbert, K. L. Williams, A. A. Gooley (1999), *Electrophoresis*, **20**, 701-704.
  28. Santoni, V., T. Rabilloud, P. Dumas, D. Rouquie, M. Mansion, S. Kieffer, J. Garin, and M. Rossignol (1999), *Electrophoresis*, **20**, 705-711.
  29. Urquhart, B. L., T. E. Atsalos, D. Roach, D. J. Basseal, B. Bjellqvist, W. L. Britton, and I. Humphery-Smith (1997), *Electrophoresis*, **18**, 1384-1392.
  30. Washinger, V. C., B. Bjellqvist, and I. Humphery-Smith (1997), *Electrophoresis*, **18**, 1384-1383.
  31. Gorg, A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Csordas, J. J. Diaz, and J. J. Madjar (1997), *Electrophoresis*, **18**, 328-337.
  32. Gorg, A., C. Obermaier, G. Boguth, and W. Weiss (1999), *Electrophoresis*, **20**, 712-717.
  33. Schagger, H. and G. von Jagow (1987), *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379.
  34. Aebersold, R. (1993), *Curr. Opin. Biotechnol.*, **4**(4), 412-419.
  35. Wilm, M., A. Shevchenko, T. Houthaeve, S. Breit, L. Schwirgerer, and T. Fotsis (1996), *Nature*, **379**(6564), 466-469.
  36. Dongre, A. R., J. K. Eng, and J. R. Yates (1997), *Trends Biotechnol.*, **15**(10), 418-425.
  37. Figeys, D. and R. Aebersold (1997), *Electrophoresis*, **18**(3-4), 360-368.
  38. Mann, M. and M. Wilm (1995), *Trend Biochem. Sci.*, **20**(6), 219-224.
  39. McCormark, A. L., D. M. Schieltz, B. Goode, S. Yang, G. Barnes, and D. Durbine (1997), *Anal. Chem.*, **69**(4), 767-776.
  40. Wilm, M., G. Neubauer, and M. Mann (1996), *Anal. Chem.*, **68**(3), 537-543.
  41. Yates, J. R., S. Speicher, P. R. Griffin, and T. Hunkapiller, *Anal. Biochem.*, **214**(2), 397-408.
  42. Nordhoff, E., A. Ingendoh, R. Cramer, A. Overberg, B. Stahl, and M. Karas (1992), *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6**(12), 771-776.
  43. Loo, R. R., C. Mitchell, T. I. Stenson, S. A. Martin, W. M. Hines, and P. Juhasz (1997), *Electrophoresis*, **18**(3-4), 382-390.
  44. Cohen, S. L. and B. T. Chait (1997), *Anal. Biotech.*, **247**(2), 257-267.
  45. Courchesene, P. L., R. Luethy, and S. D. Patterson (1997), *Electrophoresis*, **18**(3-4), 369-381.
  46. Eckerorn, C., K. Strupat, D. Schleuder, D. Hochstrasser, J. C. Sanchez, and F. Lottspeich (1997), *Anal. Biochem.*, **69**(15), 2888-2892.
  47. Eckerskorn, C., K. Strupat, J. Kellermann, F. Lottspeich, and F. Hillenkamp (1997), *J. Protein Chem.*, **16**(5), 349-362.
  48. Li, G., M. Waltham, N. L. Anderson, E. Unsworth, A. Treston, and J. N. Weinstein (1997), *Electrophoresis*, **18**(3-4), 391-402.
  49. Mortz, E., O. Vorm, M. Mann, and P. Roepstorff (1994), *Biol. Mass Spectrom.*, **23**(5), 249-261.
  50. Nawrocki, A., M. R. Larsen, A. V. Podtelejnikov, O. N. Jensen, M. Mann, and P. Roepstorff (1998), *Electrophoresis*, **19**(4), 1024-1035.
  51. Patterson, S. D. (1995), *Electrophoresis*, **16**(7), 1104-1114.
  52. Patterson, S. D., D. Thomas, and R. A. Bradshaw (1996), *Electrophoresis*, **17**(5), 877-891.
  53. Ogorzalek Loo, R. R., C. Mitchell, T. I. Stevenson, S. A. Martin, W. M. Hines, and P. Juhasz (1997), *Electrophoresis*, **18**(3-4), 382-390.
  54. Shevchenko, A., I. Chernushevich, W. Ens, K. G. Standing, B. Thomson, and M. Wilm (1997), *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**(9), 1015-1024.
  55. Cordwell, S. J. and I. Humphery-Smith (1997), *Electrophoresis*, **18**(8), 1410-1417.
  56. Mortz, E., P. B. O'Connor, P. Roepstorff, N. L. Kelleher, T. D. Wood, and F. W. McLafferty (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**(16), 8264-8267.
  57. Mann, M. and M. Wilm (1994), *Anal. Chem.*, **66**(24), 4390-4399.
  58. Leffers, H., K. Dejgaard, B. Honore, P. Madsen, M. S. Nielsen, and J. E. Celis (1996), *Electrophoresis*, **17**(11), 1713-1719.
  59. Neubauer, G., A. King, J. Rappsilber, C. Calvio, M. Watson, and P. Ajuh (1998), *Nat. Genet.*, **20**(1), 46-50.
  60. Quadroni, M. and P. James (1999), *Electrophoresis*, **20**, 664-677.
  61. Gooley, A., K. Williams, and N. Packer (1998), Analysis of Molecules, International application published under the patent cooperation treaty WO9847006.
  62. Bienvenut, W. V., J.-C. Sanchez, A. Karmime, V. Rouge, K.

- Rose, P. A. Binz., and D. F. Hochstrasser (1999), *Anal. Chem.*, **71**, 4800-4807.
63. Binz, P. A., M. Muller, D. Walther, V. V. Bienvenut, R. Gras, C. Hoogland, G. Bouchet, E. Gasteiger, R. Fabbretti, S. Gay, P. Palagi, M. R. Wilkins, V. Rouge, L. Tonella, S. Paesano, G. Rossellat, A. Karmime, A. Bairoch, J.-C. Sanchez, R. D. Appel, and D. F. Hochstrasser (1999), *Anal. Chem.*, **71**, 49810-49818.
64. Gygi, S. P., B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. Gelb, and R. Aebersold (1999), *Nat. Biotech.*, **17**, 994-999.
65. Gooley, A. A. and N. H. Packer, in "Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics," (Wilkins, M.R., K. L. Williams, R. D. Appel, and D. F. Hochstrasser, eds) (1997), Springer, Berlin, pp. 65-86.
66. Cossu, G. and P. G. Righetti (1987) *J. Chromatogr.*, **398**, 211-216.
67. Ducret, A., C. F. Bruun, E. J. Bures, G. Marhaug, G. Husby, and R. Aebersold (1996), *Electrophoresis*, **17**, 866-876.
68. Cao, P. and J. T. Stults (1999), *J. Chromatogr.*, **853**, 225-235.
69. Figeys, D., G. L. Corthals, B. Gallis, D. R. Goodlett, A. Ducret, M. A. Corson, and R. Aebersold (1999), *Anal. Chem.*, **71**, 2279-2287.
70. Muller, D. R., P. Schindler, M. Coulot, H. Voshol, and J. van Oostrum (1999), *J. Mass Spectrom.*, **34**, 336-345.
71. Brockhausen, I. and W. Kuhns (1997), in: Landes, R. G. (Eds.), New York.
72. Albert, B. (1998), *Cell*, **92**, 291-297.
73. Muzio, M. (1996), *Science*, 817-827.
74. Mercurio, F. (1997), *Science*, **278**, 860-866.
75. Chien, C. T., P. L. Bartel, R. Sternglanz, and S. Fields (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9578-9582.
76. Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, and B. Seraphin (1999), *Nat. Biotech.*, **17**, 994-999.
77. Lamond, A. I. and M. Mann (1997), *Trends Cell Biol.*, **7**, 139-142.
78. Fromont-Racine, M., J.-C. Rain, and P. Legrain (1997), *Nat. Genet.*, **16**, 277-282.
79. Celis, J. E. (1996), *J. Urol.*, **155**, 2105-2112.
80. Anderson, N. L. (1991), *Electrophoresis*, **12**, 907-930.
81. Steiner, S. (1996), *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 253-258.
82. Anderson, N. L., R. Esquer-Blasco, J. P. Hofmann, and N. G. Anderson (1991), *Electrophoresis*, **12**, 907-930.
83. Anderson, N. L., R. Esquer-Blasco, J. P. Hofmann, L. Meheus, J. Raymackers, S. Steiner, F. Witzmann F, and N. G. Anderson (1995), *Electrophoresis*, **16**, 1977-1981.
84. Anderson, N. L., J. Taylor, J. P. Hofmann, R. Esquer-Blasco, S. Swift, and N. G. Anderson (1996), *Toxicol. Pathol.*, **24**, 72-76.
85. Weinstein, J. N., T. G. Myers, P. M. O'connor, S. H. Friend, A. J. Fornace, Jr., K. W. Kohn, T. Fojo, S. E. Baates, L. V. Rubinstein, N. L. Anderson, J. K. Buolamwini, W. W. van Osdo, A. P. Monks, D. A. Scudiero, E. A. Sausville, D. W. Zaharevitz, B. Bunow, V. N. Viswanadhan, G. S. Johnson, R. E. Wittes, and K. D. Paull (1997), *Science*, **275**, 343-349.
86. Abbott, A. (1999), *Nature*, **402**, 715-720.
87. Crystal, R. G., N. G. McElvaney, M. A. Rosenfeld, C. S. Chu, A. Mastrangeli, J. G. Hany, S. L. Brody, H. A. Jaffe, N. T. Eissa, and C. Danel (1994), *Nature Genet.*, **8**, 42-51.
88. Rondon, I. J. and W. A. Marasco (1997), *Annu. Rev. Microbiol.*, **51**, 257-283.
89. Hoffman, E. P. (1999), *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **123**, 1050-1052.
90. Fawell, S., J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. L. Chen, B. Pepinsky, and J. Barsoum (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 664-668.
91. Schwarze, J., M. Makela, G. Cielewicz, A. Dakhama, M. Lahn, T. Ikemura, A. Joetham, and E. W. Gelfand (1999), *J. Immunol.*, **163**, 5729-5734.
92. Ogorzalek Loo, R. R. (1997), *Electrophoresis*, **18**, 382-390.
93. Eckerskom, C. (1997), *Anal. Chem.*, **69**, 2888-2892.
94. Despeyroux, D., N. Walker, M. Pearce, M. Fisher, M. McDonnell, S. C. Bailey, G. D. Griffiths, and P. Watts (2000), *Anal. Chem.*, **72**, 23-26.