

# Moderne Proteomik komplementiert die Molekulare Diagnostik

Die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, eines Zellkompartiments, Organs oder Organismus wird unter dem Begriff Proteom zusammengefasst.

Prof. Dr. Oliver Schilling, Maren Stillger und Dr. Matthias Fahrner, Institut für Klinische Pathologie, Universitätsklinikum Freiburg und Eva Brombacher und Dr. Clemens Kreutz, Institut für Medizinische Biometrie und Statistik, Universitätsklinikum Freiburg



Prof. Dr. Oliver Schilling Foto: privat



Maren Stillger Foto: privat



Dr. Matthias Fahrner Foto: privat



Eva Brombacher Foto: privat

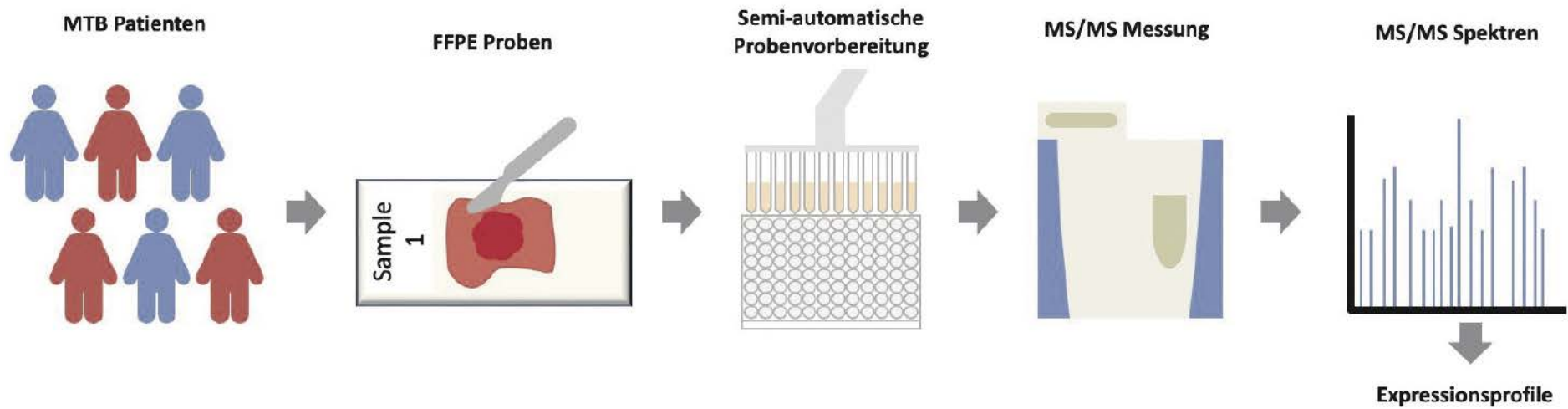


Dr. Clemens Kreutz Foto: CIBSS

Die Proteomik bezeichnet die Erforschung des Proteoms zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen. Im Vergleich zum eher statischen Genom, gelten das Transkriptom und Proteom als dynamisch. Sie können sich in Antwort auf variierende Bedingungen (beispielsweise Temperatur, Umweltfaktoren) qualitativ und quantitativ verändern. Zwei veranschaulichende Beispiele sind die Entwicklung einer Kaulquappe zum Frosch und einer Raupe zum Schmetterling: sowohl im Larvenstadium als auch als Adulte tragen die Tiere das gleiche Genom, wohingegen sich ihr äußerliches Erscheinungsbild unterscheidet. Das gleiche Prinzip gilt natürlich auch für die Organentwicklung. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Genexpression und der Proteomzusammensetzung für die Ausbildung von Phänotypen.

## Anwendungen der massenspektrometrischen Proteomik

Die massenspektrometrische Proteomik erlaubt die Erforschung komplexer, medizinisch auffälliger Zustände und biologischer Grundlagen. Folgende Fragen können beantwortet werden: Welche Proteine werden exprimiert? Welche biologischen Prozesse und Signalwege sind aktiv? Welche Proteine interagieren miteinander? Wie sind Proteine verändert? Somit ermöglicht die massenspektrometrische Proteomik, Proteomveränderungen zwischen pathologischem und gesundem Gewebe aufzudecken und damit die Charakterisierung diverser Krankheitsbilder, wie Krebs, Amyloidosen oder chronischer Entzündungskrankheiten. Anhand der Proteinprofile können unterschiedliche Subtypen charakterisiert oder in Pan-Entitäten Muster erkannt werden. Hierfür kann natives Gewebe, Formalin-fixiertes und in Paraffin-eingebettetes Gewebe und Körperflüssigkeiten (z.B. Blut, Urin, Liquor) untersucht werden. Die Untersuchung von Signalwegen, beispielsweise durch Phosphoproteomik, ermöglicht Krankheitsmechanismen aufzudecken und Anhaltspunkte für Therapien abzuleiten.



Übersicht über die einzelnen Schritte einer typischen proteomischen Probenbehandlung im MTB. Proben von Patienten werden gesammelt (z. B. Resektate, Biopsien), FFPE fixiert und dissektiert. Mithilfe eines Pipettierroboters werden die Proben standardisiert für die MS/MS Messung vorbereitet. Nach der MS/MS Messung werden die Spektren mit einer Datenbank abgeglichen und das MTB erhält eine Auflistung der Proteinidentifizierungen und -quantifizierungen (Expressionsprofile).

Protein ID	Intensity Sample 1	Intensity Sample 2	Intensity Sample 3
BRCA	23590	21357	23197
KRAS	18623	19265	18438
PIK3CA	19487	19528	19146
PD-L1	22514	21985	22731

## Funktioneller Ablauf der MS-Proteomik

Für die massenspektrometrische Proteomik werden Proteine in kürzere Peptide geschnitten, meist mit der Protease Trypsin. Das Peptidgemisch wird chromatographisch aufgetrennt und üblicherweise direkt in ein Massenspektrometer injiziert. Hier erfolgt eine Fragmentierung der Peptide welche (zusammen mit der Masse des intakten Peptids), Auskunft über die Sequenz und Menge eines Peptids gibt. Die erhaltenen Massenspektren werden mittels bioinformatischer Algorithmen analysiert und hierbei mit einer Sequenz-Datenbank abgeglichen. Solche Peptid-Spektrum-Matches werden im Anschluss statistisch validiert. Die identifizierten Peptide werden den zugehörigen Proteinen zugeordnet. Auf diese Weise können mit hoher Geschwindigkeit und Sensitivität mehrere Tausend Proteine einer komplexen Probe analysiert werden.

## Proteomik komplementiert genomische Analysen

Nach der Genomik und Transkriptomik findet nun auch die Proteomik ihren Weg in die molekulare Diagnostik. Bisher beschränkte sich die Proteinanalyse in der Diagnostik hauptsächlich auf die Immunohistochemie. Die Proteomik wird ergänzend zur Genomik und Transkriptomik genutzt, da sie eine direktere Charakterisierung des bestehenden Phänotyps liefert. Eine Vielzahl an Krebsstudien hat gezeigt, dass die Korrelation zwischen der mRNA-Expression und der Proteinexpression häufig sehr limitiert ist und kein linearer Zusammenhang dieser beiden biologischen Ebenen besteht. Ein weiterer Vorteil der Proteomik liegt in der Analyse von Post-Translationalen Modifikationen (PTMs). Phosphorylierungen und Glykolisierungen, welche für die Proteinfaltung und -funktion, die subzelluläre Lokalisation und den Protein-Abbau verantwortlich sind, können mittels MS an

Proteinen nachgewiesen werden. Auf diese Weise kann z.B. die Aktivität von Kinasen untersucht werden, die sich oftmals als therapeutische Ziele eignen.

## Tiefgreifende molekulare Diagnostik möglich

Seit 2022 wird am Institut für Klinische Pathologie des Universitätsklinikums Freiburg (UKF) neben der Histopathologie, Genomik, und Transkriptomik auch die MS-Proteomik in das Molekulare Tumorbord (MTB) integriert. Dabei fokussiert sich das MTB zunächst auf Patienten mit seltenen Tumorentitäten, für die kein klarer therapeutischer Leitfaden definiert ist, und Patienten, bei denen der klinische Leitfaden erschöpft bzw. ausgereizt ist. In der detaillierten molekularen Diagnostik liefert die Genomik Aufschluss über die Tumormutationslast und onkogene Mutationen. Die Transkriptomik zeigt Genfunktionen und Expressionsprofile auf Transkriptebene. Abschließend werden mittels Proteomik dann vor allem die Expressionsprofile auf Proteinebene komplementiert. Da die Proteomik in der Diagnostik selbst noch ein junges Feld ist, besteht der aktuelle Fokus drauf Biomarker und Auffälligkeiten aus der Genomik/Transkriptomik zu untersuchen und somit die bestmögliche Therapieentscheidung weiter zu unterstützen. Durch Einsatz der Phosphoproteomik, die das Katalogisieren von Proteinen mit Phosphatgruppen als PTM ermöglicht, kann außerdem gezielt die Aktivität von Signalwegen untersucht werden. Am UKF wird zudem angestrebt, die MS-Proteomik bald auch zur Klassifizierung der Amyloidose-Subtypen zu nutzen. A. Dogan vom Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York beschreibt in seinem Artikel (Annual Review of Pathology: Mechanisms of Diseases, 2017) zum Einsatz von Proteomik in der Diagnose von Amyloidosen den Fortschritt, der durch die Proteomik erzielt wurde. Mittels Proteomik wurden neue Mischformen entdeckt und Subtypen unterschieden, was eine zielgerichtete Behandlung erlaubt. Diese Beispiele zeigen, wie durch

die Integration der Proteomik bestehende Diagnoseverfahren komplementiert und sogar verbessert werden.

## Navigation in der Flut statistischer Auswertungen

Der technologische Fortschritt bei der Etablierung verschiedener MS Verfahren ist gefolgt von der Entwicklung von neuen computergestützten Methoden zur Analyse und Interpretation der resultierenden Spektren. Für diese Analyse werden sowohl bioinformatische Verfahren zur Identifizierung von Peptiden und Proteinen, als auch statistische Verfahren zur unverzerrten Quantifizierung einzelner Proteine und zur Bestimmung komplexer Signaturen benötigt. In den letzten Jahren wurde eine Flut von bioinformatischen und statistischen Verfahren zu diesem Zweck entwickelt. Wie bei anderen Omics-Techniken zur Hochdurchsatz-Quantifizierung molekularer Komponenten ist jedoch auch im Feld der Proteomik die Leistungsfähigkeit von Analysemethoden von spezifischen Eigenschaften der untersuchten Proben und der verwendeten Messtechnik abhängig. Somit ist es eine große Herausforderung, die einzelnen Analyseschritte zu generisch einsetzbaren, optimierten Analyseworkflows zu kombinieren. Mittels Benchmark-Daten, die sich z.B. durch Mischung zweier Proben in bekanntem Verhältnis generieren lassen, kann die Leistungsfähigkeit von einzelnen Analyseschritten und von umfassenden Analyse-Workflows bewertet werden.

## Was steht einem vermehrten Einsatz der Proteomik im Weg?

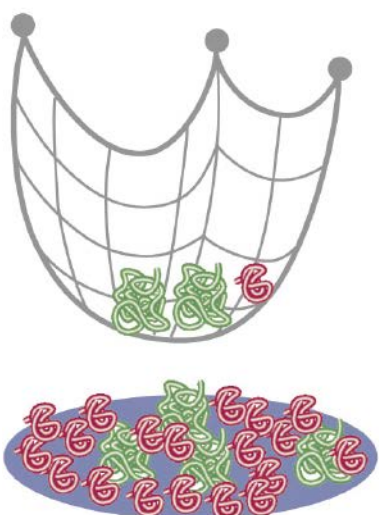
Trotz des großen Potentials und Fortschritts der MS ist die Verwendung der Proteomik in der Praxis noch eher begrenzt. Zur Etablierung fehlen Benchmarking-Studien, die Leistungsfähigkeit von Analyse-Routinen bewerten und deren Robustheit nachweisen. In einer Kooperation des Kreutz Labors und des Schilling Labors in Freiburg, wurde dieser Aspekt adressiert. Es wurden 1.428 unterschied-

liche Analyse-Workflows verglichen, die sowohl die bioinformatische als auch die statistische Auswertung umfassten (Nature Communications, 2022). Es wurde gezeigt, dass die neuartige daten-unabhängige Messmethode (engl. Data-independent acquisition) geeignet ist, differentiell regulierte Proteine in Anwesenheit von interindividueller Heterogenität zu identifizieren. Neben der reproduzierbaren Identifizierung differentiell exprimierter Proteine zeigte die Studie jedoch auch große Unterschiede zwischen den Resultaten einzelner Workflows. Sie unterschieden sich in der Gesamtzahl der identifizierten Proteine und in der Quantifizierung differentiell regulierter Proteine. Großangelegte Benchmarking-Studien sind ein erster Schritt, um die Herausforderungen, vor denen die Proteomik noch steht, zu überwinden. Im MTB in Freiburg wird dies durch robustere und reproduzierbarere Workflows für die Probenvorbereitung, für die MS-Messung, für die bioinformatische und statistische Analyse sowie durch den Einsatz von Parametern zur Qualitätskontrolle angegangen.

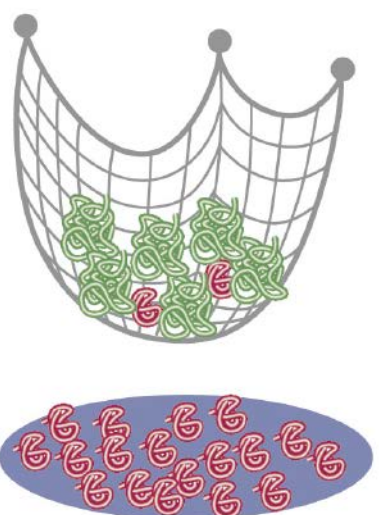
Zusammenfassend sehen wir die Proteomik auf einem guten Weg, das Portfolio der Omics-Analysen zu ergänzen und die molekulare Diagnostik zu stärken. Fortschritte in der Datenanalyse und Softwareentwicklung, aber auch die Etablierung robuster Probenvorbereitungsworkflows zeigen, dass die Herausforderungen überwunden werden können. So sehen wir die Proteomik als genauso robust einsetzbar wie die seit längerem etablierten genomischen Analysen. Die Kombination aus Histologie, Genomik, Transkriptomik und Proteomik zeigt einen wertvollen Ansatz, um Krankheitsbilder differenziert zu charakterisieren, Pan-Entitäten Muster zu erkennen und dem Patienten eine individuelle und bestmögliche Therapie anzubieten.

www.cibss.uni-freiburg.de | www.uniklinik-freiburg.de

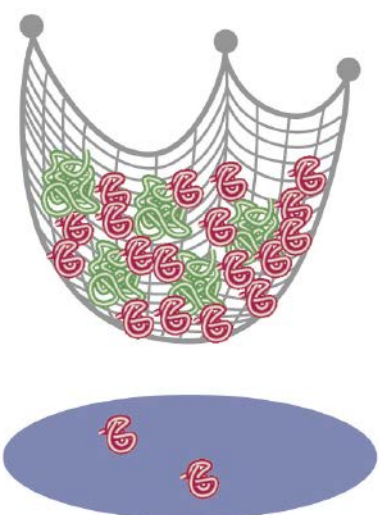
## Proteomanalyse A



## Proteomanalyse B



## Proteomanalyse C



= Potentieller Biomarker  
 = Anderes Protein

Mit den richtigen Auswertungsverfahren können krankheitsrelevante Biomarker, mit sehr hoher Präzision gefunden werden. Foto: Universitätsklinikum Freiburg