

# IDENTIFIKATION KRANKHEITSRELEVANTER BIOMARKER UND IHRE MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DURCH KOMPLEXE MULTIPARAMETRISCHE PROTEIN ANALYTIK (PROTEOMICS)

## ALLGEMEINER HINTERGRUND

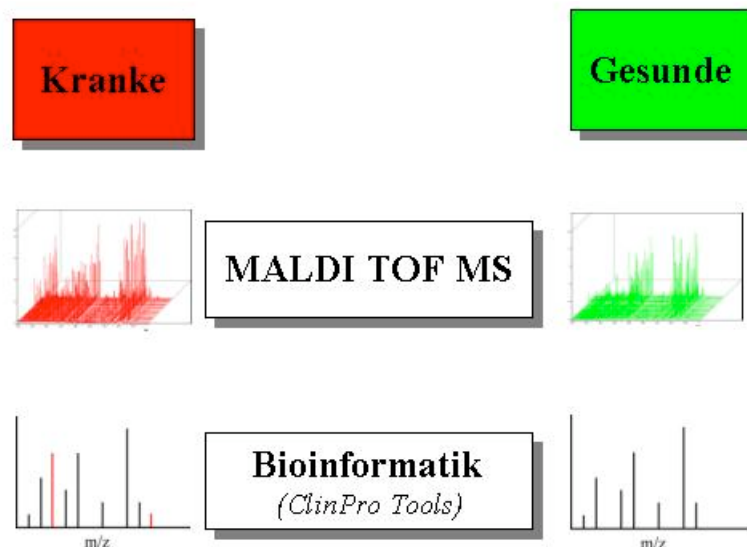
Das Synonym „Proteomics“ beschreibt in Analogie zum Genomics-Projekt (Entschlüsselung des menschlichen Genoms) das Ziel, sämtliche Proteine eines Organismus zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Hierzu werden eine Reihe verschiedene Verfahren zur Auftrennung und Detektion von Proteinen aus komplexen Gemischen verwendet um eine systematischen Analyse des vollständigen Proteoms einer Zelle, eines Gewebes oder einer Körperflüssigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt zu ermöglichen. Im Gegensatz zur Analysen auf Genom- (DNA) oder Transkriptom- (mRNA) Ebene beschreibt das Proteom durch Erfassung der biologisch relevanten Effektoren den tatsächlichen Phänotyp und ist daher am geeignetsten, relevante Auskünfte über Veränderung von Stoffwechselwegen und Krankheiten zu geben. Auch die Diversität von Proteine durch posttranslationelle Modifikationen, die z.B. entscheidend für den Funktionszustand eines Proteins sein können, wird erfasst.

So können beispielsweise durch vergleichende Untersuchungen mit geeigneten Kollektiven (Kranke versus Gesunde) an einer Reihe von klinischen Materialien (z.B. Serum, Gewebe, Urin, Liquor) krankheitsassoziierte Veränderungen identifiziert und näher charakterisiert werden, die für das Grundlagenverständnis über die Erkrankung, oder als „Biomarker“ von diagnostischem Interesse sein können. Auch bei der Erforschung über die Wirkungen von Arzneimitteln haben Proteomics Projekte mittlerweile große Bedeutung.

## ASPEKTE DES PROTEOMPROFILINGS

Klinische Proben von gut definierten Patientenkollektiven werden im Hochdurchsatz auf charakteristische Proteomprofilveränderungen untersucht.

Neben der massenspektrometrischen Messung ist eine bioinformatische Auswertung der Spektren essentiell, dabei sollen krankheitsassoziierte Veränderungen gegenüber interindividuellen Unterschieden (Alter, Geschlecht, Lebensgewohnheiten u.v.m.) erkennbar werden. Eine standardisierte (Prä-) Analytik ist essentiell und erleichtert die Auswertung.

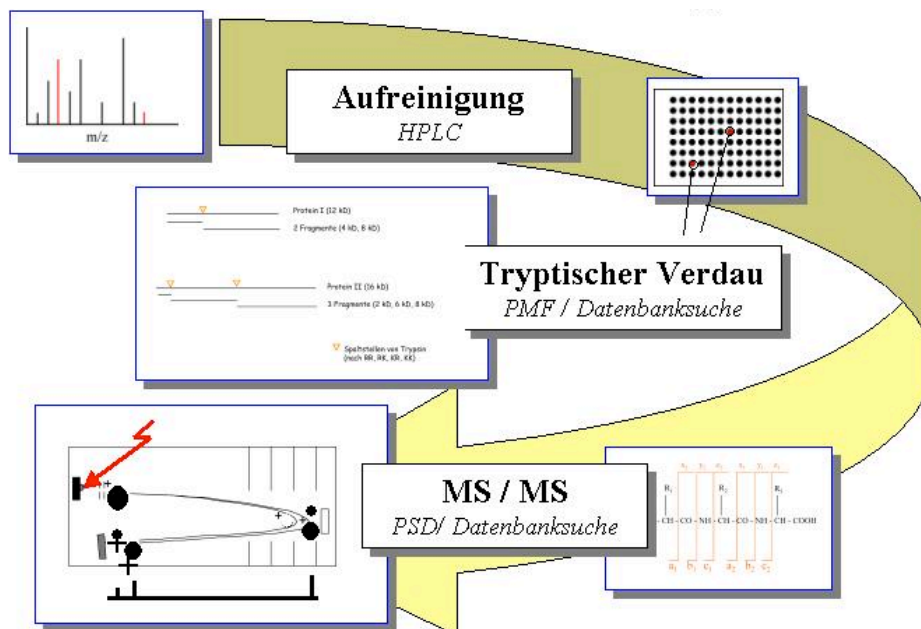


**Abbildung 1:** Schematischer Ablauf des Proteom-Profiling

## ASPEKTE DER PEPTIDENTIFIKATION

Die durch das Proteom-profiling validierten Biomarker werden im weiteren identifiziert. Hierzu ist zunächst eine Fraktionierung des komplexen Proteingemisches durch multidimensionale Chromatographie notwendig, um die interessierenden Proteine aufzureinigen bzw. anzureichern. Das zu analysierende Protein wird dann einer spezifischen Proteolyse unterworfen. Der Verdau eines zu analysierenden Proteins ergibt durch die Sequenzspezifität der verwendeten Endoprotease ein Massenspektrum, das gleich einem Fingerabdruck (**PMF, Peptide Mass Fingerprint**) spezifisch für das analysierte Protein ist. Häufig verwendet man das Enzym Trypsin, welches an der C-terminalen Seite von Arginin (R) und Lysin (K) spaltet. Die Peptide können dann mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Mit dem erhaltenen Spektrum kann dann eine computergestützte Abfrage von Proteinsequenzdatenbanken gestartet werden. Zumeist wird die PMF-Proteinidentifizierung nur bei reinen Proteinen verwendet.

Bei ungenügender Qualität der Aufreinigung kann in einem speziellen Messmodus des Massenspektrometers eine **Post source decay (PSD)** Analyse erfolgen. Ähnlich wie bei der Tandem-Massenspektrometrie ist es möglich, ausgewählte Ionen gezielt zu fragmentieren. Das jeweilige Fragmentspektrum wird in eine Datenbank eingelesen und mit den Daten der dort gespeicherten Proteine verglichen, so kann eine direkte Strukturinformationen (Aminosäuresequenz) des Peptides generiert werden.



**Abbildung 2:** Schematischer Ablauf der Proteinidentifikation

Der aktuelle „Proteomics boom“ liegt nicht zuletzt in den sich ständig verbessernden proteinchemischen Analysemethoden begründet, insbesondere die Fortschritte bei der Anwendung der Massenspektrometrie haben zur Durchführbarkeit komplexer Analysen einen erheblichen Beitrag geleistet.

## TECHNISCHER HINTERGRUND VON PROTEOMANALYSEN

Der schematische Ablauf einer Proteomanalyse ist im folgenden kurz beschrieben:

### 1. Definition der Fragestellung- was soll untersucht werden und unter welchen Bedingungen

- Bestimmung des gesamten Proteoms
- Vergleich von unterschiedlichen Zuständen: Entwicklungsstadien, Gesundheitszuständen, Therapieeinflüsse

## 2. Probenentnahme

- Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einer Biopsie erschwert durch uneinheitliche Zusammensetzung innerhalb eines Gewebes
- Umgehung durch Mikrosektion per Laserklebtechnik – es werden qualitativ und quantitativ einheitliche Proteinmuster erhalten ( Nachteil: Zeitfaktor)

## 3. Probenvorbereitung

- zu analysierende Proteine müssen in Lösung gebracht werden, feste Bestandteile werden abgetrennt, da sie sonst die anschließende Elektrophorese stören würden
- je nach Lokalisation und Löslichkeit der Proteine sind unterschiedliche Reinigungsschritte notwendig
  - extrazelluläre lösliche Proteine und intrazelluläre Proteine
    - Abtrennen unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation oder Filtration
    - Lösen von intrazellulären Proteinen durch z.B. hohen pH- Wert oder EDTA (periphere Proteine) und unter Verwendung von Detergenzien wie Triton X, CHAPS)
  - d.h. um alle Proteine einer Probe in Lösung zu bringen, muß der Probenpuffer bestimmte Ansprüche erfüllen: pH- Wert, Proteaseinhibitoren u.a.

## 4. Proteintrennung

- multidimensionale Elektrophorese (z.B. 2D-Gele) ist in der Lage große Anzahl von Proteinen quantitativ zu trennen
  - Dimension: Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt, Proteine wandern im elektrischen Feld in einem pH- Gradienten in eine Zone, in der sie ihre Nettoladung und damit ihre Mobilität verlieren
  - Dimension: alle Proteinmoleküle werden mit SDS beladen und wandern als negativgeladene SDS-Protein- Komplexe zur Anode und werden in einer Polyacrylamidmatrix nach ihrer Größe getrennt

## 5. Proteinidentifizierung

- mittels geeigneter Verfahren der Massenspektrometrie wie MALDI-TOF, ESI- MS, MS/MS werden die Peptidmassen bestimmt
- Abgleich der Daten gegen Protein- und Gendatenbanken

## 6. Bioinformatik

- Integration von externen Daten aus der Literatur oder unabhängigen Experimenten mit der konkreten quantitativen Proteinexpression

## AUFLISTUNG DER ZUR ZEIT IN BEARBEITUNG BEFINDLICHEN

### WISSENSCHAFTLICHE PROJEKTE

Am Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Mannheim ist eine Proteom-Einheit (<http://pandora/inst/ikc/proteomics/neueseite.html>) installiert, die alle technischen Voraussetzungen zum Proteom-profiling, der Protein-Aufreinigung sowie -Identifizierung und Charakterisierung bietet. Im einzelnen besitzt das neu ausgestattete Proteomicslabor neben einem high-end Massenspektrometer für Clinical Proteomics auch Möglichkeiten der multidimensionalen HPLC-Chromatographie sowie auch eine solution-phase Protein Microarray Ausstattung. Diese Plattform komplettiert die Ausstattung des IKC über die vorhandenen Möglichkeiten der genetischen Analytik hinaus bzw. ergänzt die an der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim vorhandene Instrumentierung für Functional Genomics. Damit sind Untersuchungen komplexer biologischer Fragestellungen aus klinischem Probenmaterial auch auf biochemischer und metabolischer Ebene möglich.

Das IKC ist interdisziplinär in einer Reihe von klinischen Kooperationen vorwiegend mit onkologischem oder vaskulärem Fragenschwerpunkt eingebunden, darüber hinaus werden eigene Proteom-Projekte bearbeitet.

Dies wird in internen und externen Kooperationen zum Proteinprofiling sowie für eigene Forschungsprojekte genutzt (siehe unten seit 2004 aktive Projekte).

## **PROJEKTE ZUM PROTEOMPROFILING**

Der Aufgabenbereich umfasst insbesondere die Durchführung massenspektrometrischer Experimente (Proteom-Profiling, Markeridentifizierung) und schließt alle supplementären, proteinchemischen Arbeiten (z.B. Chromatographie, Blotting Verfahren, Immunpräzipitation) mit ein. Desweiteren erfolgt eine Datenauswertung mit Hilfe von speziellen Statistik-Softwareprogrammen (ClinproTools™, BioTools™). Eine Proben-Dokumentation mit Erfassung klinisch relevanter Daten ermöglicht die Identifizierung von prognostisch relevanten Peakmustern bzw. Biomarkern.

- Massenspektrometrische Mutationsdetektion von APC zum patientenindividuellen Monitoring von kolorektalen Tumorpatienten (IKC)
- Phosphoproteomanalyse zur Charakterisierung des Toll Like Receptor –signaling pathways (IKC)
- Proteomprofiling zur Identifizierung von Biomarkern mit diagnostischer und prognostischer Relevanz bei Melanompatienten (Dermatologie / IKC)
- Proteomprofiling zur funktionellen Charakterisierung des Stabilin1 Rezeptors am knockout Tiermodell (Dermatologie / IKC)
- Identifikation therapieassoziierter Proteomprofilveränderungen bei Pankreasarzinompatienten (Gastroenterologie / IKC)
- Massenspektrometrischer Nachweis xenogener Proteine zur Frühdiagnostik und Verlaufskontrolle von systemischen Aspergillus-Infektionen bei neutropenischen Patienten mit akuter Leukämie (Hämatonkologie / IKC)
- Proteomanalyse zur Charakterisierung von MDR-assozierten Veränderungen am in vitro Modell (Radioonkologie / IKC)

## **SPEZIELLE ANWENDUNGEN DER MASSENSPEKTROMETRIE AUSSERHALB DES PROTEOMPROFILINGS**

***Massenspektrometrische Analyse von trunziertem APC-Protein zur Identifizierung von Genmutationen und patientenindividuellem Krankheitsmonitoring einer minimalen residualen Resterkrankung bei kolorektalen Tumorpatienten.***

Ein wichtiges Ziel der Diagnostik solider maligner Tumoren ist die Identifizierung von Patienten mit minimaler Resterkrankung (MRD). Der Nachweis einzelner Tumorzellen ist derzeit nur mit PCR-gestützter Amplifikation tumorassoziierter Transkripte möglich. Diese Technik weist bei guter analytischer Sensitivität allerdings eine nur unzureichende diagnostische Spezifität auf, da bisher keine tumorspezifischen Transkripte identifiziert werden konnten.

Im Gegensatz hierzu sind genetische Veränderungen tumorspezifisch (z.B. kras, p53, APC, hMLH1, BRCA's etc.). Sie lassen sich mit ausreichender Sensitivität in Flüssigkeiten wie Pankreassekret, Stuhl und sogar im Serum nachweisen, wenn die Position der Mutation bekannt ist (z.B. kras-Mutation). Probleme bei der diagnostischen Anwendung entstehen durch das z.T heterogene Mutationsmuster, so weist nicht einmal die Hälfte aller kolorektalen Tumoren eine kras Mutation auf, der Test müsste daher mit anderen Markern kombiniert werden.

Das APC-Tumorsuppressorgen ist demgegenüber hochfrequent mutiert, weist aber ein großes, heterogenes Mutationsspektrum auf (online Datenbank: <http://perso.curie.fr/Thierry.Soussi/APC.html>), weshalb eine Mutationsdetektion durch systematische Sequenzanalyse wegen der erheblichen Größe des Genes daher sehr aufwendig ist und deshalb der Diagnostik hereditärer Tumorerkrankungen (familiäre adenomatöse Polyposis, FAP) vorbehalten bleibt.

Bei der weitaus größeren Anzahl sporadischer Kolorektal-Tumoren ist aber ohne Kenntnis einer patientenindividuellen APC-Mutation ein allelspezifischer Ansatz zur Detektion disseminierter

Tumorzellen in klinischen Proben (z.B. Blut und Knochenmark) durch das Vorliegen hoher Konzentrationen an normaler DNA nicht möglich.

Ziel des Projektes ist es, durch massenspektrometrisches Mutationsscreening den Sequenzierungsaufwand soweit zu reduzieren, dass es möglich sein wird, APC Mutationen in sporadische Kolontumoren zu detektieren. Die Kenntnis der patientenindividuellen APC-Mutation ist Grundlage für die Etablierung spezifischer individuell diagnostischer Assays (z.B. mutant enrichment PCR), mit dem zirkulierende Tumorzellen des jeweiligen Patienten sensitiv detektiert werden können, um so frühzeitig einen Relaps zu diagnostizieren.

*(zu einzelnen Aspekten werden definierte experimentelle Doktorarbeiten vergeben)*

## **MITGLIEDER DER ARBEITSGRUPPE**

Dr. med. Peter Findeisen  
Dula Sismanidis (MTLA)  
Victor Costina (Dipl.-Ing., MTLA)  
N.N.

## **KONTAKTADRESSE**

Dr. Peter Findeisen  
Institut für Klinische Chemie (H22, E4, Zi 314)  
Universitätsklinikum Mannheim  
Theodor Kutzer Ufer 1-3  
68167 Mannheim  
Tel: (+49)(0) 621 383 3483  
Fax: (+49)(0) 621 383 3819  
E-mail: peter.findeisen@ikc.ma.uni-heidelberg.de

## **EIGENE PUBLIKATIONENZUM THEMA**

Katoh M, Neumaier M, Nezam R, Izbicki JR, Schumacher U. Correlation of circulating tumor cells with tumor size and metastatic load in a spontaneous lung metastasis model. *Anticancer Res.* 2004 May-Jun;24(3a):1421-5.

Wentzensen N, Wilz B, Findeisen P, et al. Identification of differentially expressed genes in colorectal adenoma compared to normal tissue by suppression subtractive hybridization. *Int J Oncol* 2004;24:987-94.

Koesters R, Linnebacher M, Coy JF, et al. WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells. *Int J Cancer* 2004;109:385-92.

Jung R, Soondrum K, Kruger W, Neumaier M. Detection of micrometastasis through tissue-specific gene expression: its promise and problems. *Recent Results Cancer Res.* 2001;158:32-9. Review.

Kruger W, Jung R, Kroger N, Gutensohn K, Fiedler W, Neumaier M, Janicke F, Wagener C, Zander AR. Sensitivity of assays designed for the detection of disseminated epithelial tumor cells is influenced by cell separation methods. *Clin Chem.* 2000 Mar;46(3):435-6.

Jung R, Petersen K, Kruger W, Wolf M, Wagener C, Zander A, Neumaier M. Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. *Br J Cancer.* 1999 Nov;81(5):870-3.

Jung R, Kruger W, Hosch S, Holweg M, Kroger N, Gutensohn K, Wagener C, Neumaier M, Zander AR. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *Br J Cancer.* 1998 Nov;78(9):1194-8.

Tschentscher P, Wagener C, Neumaier M. Sensitive and specific cytokeratin 18 reverse transcription-polymerase chain reaction that excludes amplification of processed pseudogenes from contaminating genomic DNA. *Clin Chem*. 1997 Dec;43(12):2244-50.

Neumaier M, Gerhard M, Wagener C. Diagnosis of micrometastases by the amplification of tissue-specific genes. *Gene*. 1995 Jun 14;159(1):43-7.

Nollau P, Jung R, Neumaier M, Wagener C. Tumour diagnosis by PCR-based detection of tumour cells. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1995;221:116-21. Review.

Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol*. 1994 Apr;12(4):725-9.