**Proteomik: Von der Grundlagentechnologie zum universellen Diagnose-Tool**

Matthias Mann, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Proteine sind die vielfältigsten und schönsten molekularen Gebilde in der Biologie. Sie erfüllen die Funktionen des Körpers elegant und wirtschaftlich. Proteine verleihen dem Organismus Struktur, von den Haaren bis zu den Sehnen, und orchestrieren ein riesiges Netzwerk biochemischer Funktionen in jeder einzelnen Zelle. Als Hormone dienen sie der Signalübertragung von einem Körperteil zum anderen, und die zelluläre Informationsverarbeitung erfolgt hauptsächlich über Proteinnetzwerke. Kommt es nur bei einem Proteintyp zu einer Funktionsstörung, kann dies eine Krankheit auslösen – man denke nur an Diabetes, bei dem das Fehlen des kleinen Proteins Insulin dazu führt, dass Leber- und Muskelgewebe nicht wissen, dass sie nach dem Essen Blutzucker aufnehmen sollen. Krebs ist im Wesentlichen eine Fehlfunktion von Proteinnetzwerken, bei denen überaktive Regulatorproteine den Zellen unaufhörlich den Befehl geben zu wachsen und sich zu teilen – für gewöhnlich aufgrund einer Mutation in den Genen, welche die Blaupause für diese Proteine tragen.

Die Wissenschaft der Genetik hat dieses Konzept ins öffentliche Bewusstsein gerückt, hauptsächlich mittels raffinierter Genanalysen und leistungsstarker Technologien wie Gensequenzierung und Genmanipulation. Der Erfolg der Genetik war so überwältigend, dass der Eindruck entstand, Gene und die diesbezüglichen Unterschiede zwischen Menschen seien allesentscheidend. Diese Sichtweise trifft vom wissenschaftlichen Standpunkt aus nicht zu und führt immer wieder zu fehlgeleiteten politischen Entscheidungen.

Analog zum Genom wird die Gesamtheit aller Proteine in einem biologischen Gebilde als ‘Proteom’ bezeichnet. Der Zusammenhang zwischen Proteom und Genom besteht darin, dass jedes Gen die genaue Anleitung für die Herstellung eines oder mehrerer Proteine in exakt der Reihenfolge der Aminosäuren, wie sie im genetischen Code festgelegt ist, beinhaltet. Die Analyse des Proteoms ist viel schwieriger als die der Gene und der von ihnen hergestellten RNA-Botenmoleküle. Demzufolge hinkte die Proteomik der Genomik bislang hinterher. Dies ändert sich jedoch gerade, und technologische Fortschritte bei der Proteinanalyse kommen nun in vielen Bereichen der Biologie zum Tragen.

Mein eigener Einstieg in dieses Gebiet erfolgte als Doktorand im Rahmen meiner Zusammenarbeit mit dem verstorbenen John B. Fenn an der Universität Yale. Er hatte eine Technik namens ‘Elektrosprühen’ entwickelt, bei der Proteine in einer Flüssigkeit gelöst werden, die anschließend angeregt wird, in winzige geladene Tröpfchen zu dispergieren, die rasch verdunsten. Zurück bleiben geladene Proteine in der Gasphase, die nun leicht einer Massenspektrometrie (MS) unterzogen werden können – ‘Elefanten das Fliegen beibringen’, wie John es nannte. Bei der MS handelt es sich um eine unglaublich leistungsstarke Technologie, welche die Molekülmasse mit einer Genauigkeit von Teilen pro Million (ppm) misst, die Molekülhäufigkeit angibt und – nach In-Stücke-brechen der Moleküle im Massenspektrometer in einem Verfahren, das als MS/MS bezeichnet wird, da es zwei MS-Stufen umfasst – sogar ihre chemische Struktur aufzeigen kann. Das Elektrosprühen bei Proteinen ist ein Beispiel für eine Technologie, die aus einer völlig unerwarteten Richtung in die Grundlagenforschung kam und ein zentrales Problem der Biologie, Biotechnologie und Biomedizin löste. John Fenn erhielt für seine Entwicklung, die heute die Basis einer milliardenschweren Industrie ist, im Jahr 2002 gemeinsam mit anderen den Nobelpreis für Chemie.

TECHNOLOGISCHE ENTWICKLUNG IN DER PROTEOMIK

Seit mehr als 20 Jahren nutzen meine und andere Arbeitsgruppen das Elektrosprühen als eine der zentralen Technologien, um den Traum der Proteomik wahr werden zu lassen – Proteine, Proteinkomplexe und Proteome nahezu vollständig zu charakterisieren. Im Gegensatz zum humanen Genom, das größtenteils vor der Geburt feststeht, ist das Proteom hochdynamisch, und jedes Gen kann viele verschiedene Proteinformen hervorbringen. Zudem können Proteine zwecks Aktivierung modifiziert werden und interagieren miteinander und mit anderen Molekülen in der Zelle. Daher ist die Proteomik – die Wissenschaft von der Erforschung der Proteine im großen Maßstab – eine fortlaufende Suche, die niemals ‘beendet’ sein wird. Vor noch nicht allzu langer Zeit hielten viele es für unmöglich, selbst die grundlegende Herausforderung zu meistern, nämlich mindestens einen Vertreter aller Proteine in einem Organismus zu erforschen.

Ein wichtiger Meilenstein wurde kurz nach meinem Wechsel ins Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried erreicht, als wir Entwicklungen bei der Herstellung von Proteomproben, MS-Technologien und die Bioinformatik-Analyse der riesigen Datenmengen aus der Massenspektrometrie kombinierten und das erste vollständige Proteom erhielten – das der Hefemodellspezies. Dieser Durchbruch, den wir nach mehr als einem halben Jahr Arbeit 2008 stolz in *Nature* präsentierten, wurde durch das außerordentliche wissenschaftliche und soziale Umfeld im Max-Planck-Institut und die großzügige und langfristige Unterstützung durch die Max-Planck-Gesellschaft möglich. Seit dieser Zeit hat der technologische Fortschritt auf dem Gebiet der Proteomik exponentiell zugenommen, so dass wir heute dieselbe Analyse in wenigen Stunden durchführen können – selbst beim komplexeren Proteom der menschlichen Zelle. Auf der Grundlage des Elektrosprühens und der Massenspektrometrie erfolgten bereits zahlreiche wichtige biologische Entdeckungen – einige von ihnen leisteten ihren Beitrag zu Nobelpreisen auf anderen Gebieten. Dennoch erweist sich die MS-basierte Proteomik erst jetzt in Bezug auf Einsatzmöglichkeiten, Empfindlichkeit und Anwenderfreundlichkeit als wirklich ausreichend, um ganze Proteome routinemäßig genau charakterisieren zu können. Vom Standpunkt der Anwendbarkeit aus ist dies also eher der Beginn als das Ende dieses Forschungsgebietes. Der Einfluss der MS-gestützten Proteomik ist enorm. Sie wirft ein neues Licht auf verschiedene Bereiche wie die Krebsbiologie, die Architektur von Proteinnetzwerken, die Regulierung der zirkadianen Uhr und die Diagnose des Gesundheitszustands mittels MS-Analyse eines einzelnen Bluttropfens.

Die MS-basierte Proteomik wird hauptsächlich durch die zugrundeliegende Technologie vorangetrieben. Das Max-Planck-Institut für Biochemie ist stolz darauf, seit vielen Jahren an vorderster Front dieser Entwicklungen zu stehen. Dazu gehören effiziente und automatisierbare Methoden zur Probenherstellung, das bestmögliche Auseinanderdividieren der enormen Anzahl von Peptiden, die bei jedem Experiment entstehen (oftmals hunderttausende), die Massenspektrometrie selbst und nicht zuletzt die für die optimale Interpretation der Daten genutzte Informatik und Bioinformatik. Über mehr als zwei Jahrzehnte war der technologische Fortschritt zumindest in einigen Aspekten exponentiell, und es gibt auch jetzt kein Anzeichen für eine Verlangsamung. Abgesehen vom direkten Einfluss auf die Grundlagenforschung, die wir und andere auf dem Gebiet der Proteomik betreiben, ist die Entwicklung im Bereich der Technologie auch für die Unternehmen, mit denen wir zusammenarbeiten, unter anderem eine Ausgründung unseres Instituts, von unmittelbarem Nutzen.

KREBSPROTEOMIK

In den letzten zehn Jahren wurde zunehmend deutlich, dass es sich bei Krebs um eine auf jeder Ebene äußerst heterogene Krankheit handelt. Beispielsweise sind Tumorzellen genetisch unterschiedlich und weisen verschiedene Mutationen auf, die zur Malignität beitragen. Dennoch durchlaufen viele Krebsarten eine festgelegte Entwicklung vom gutartigen Wachstum über aggressive Stadien hin zur Metastasierung. In den verschiedenen Stadien durchgeführte Biopsien werden von Pathologen interpretiert, welche die Tumoren in verschiedene Grade mit jeweils einer anderen Prognose einstufen. Unsere Arbeitsgruppe arbeitet bei dieser Klassifizierung mit Onkologen zusammen. Wir haben beispielsweise das Proteom eines Blutkrebses, des sogenannten großzelligen B-Zell-Lymphoms, das mikroskopisch schwer einzustufen ist, untersucht und gezeigt, dass hier eine eindeutige Kategorisierung mittels MS möglich ist. Bei Darmkrebs haben wir mehr als 10.000 verschiedene Proteine während der Entwicklung vom Adenom über das Karzinom bis hin zur Metastasierung quantitativ erfasst. Beim ersten Blick auf das sich entfaltende Proteom bei Darmkrebs zeigte sich, dass die Tumoren im Wesentlichen dieselben Proteine nutzen und der Grund für den Unterschied in den späteren Stadien in erster Linie die Menge der exprimierten Proteine ist.

Vor kurzem stellten wir uns gemeinsam mit Kooperationspartnern an der Universität Chicago die Frage, ob sich ein Unterschied zwischen Frauen mit Eierstockkrebs, die auf eine Chemotherapie ansprechen, und solchen, die nicht darauf ansprechen, feststellen lässt. Tatsächlich fanden wir ein Protein, dass in den Tumoren von Frauen, die gut auf die Chemotherapie ansprachen, stärker exprimiert wurde. Anhand der ‘Interaktionsproteomik’ (siehe unten) schlossen wir auf eine Funktion dieses Proteins bei der Reparatur von DNA-Schäden und fanden zudem heraus, dass das Immunsystem dazu veranlasst werden kann, auf Zellen, die dieses Protein exprimieren, zu reagieren. Eine Strategie besteht nun in dem Versuch, die Expression des Proteins bei den Frauen, die ursprünglich nicht auf die Chemotherapie ansprachen, anzuregen, was, wie von uns gezeigt, prinzipiell bei Zellen in der Petri-Schale bereits funktioniert.

ARCHITEKTUR DER PROTEINNETZWERKE

Die Proteine in der Zelle üben ihre Funktionen nicht isoliert aus, sondern ‘sprechen miteinander’, indem sie ständig mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten – zuweilen in großen Strukturen, sogenannten Proteinkomplexen oder Proteinmaschinen. Ein Beispiel für solche Maschinen sind die Ribosomen; sie sind die eigentlichen Fabriken der Zelle, welche die einzelnen Aminosäuren zu Proteinen zusammenbauen und selbst aus Dutzenden von spezialisierten Proteinen bestehen. Die Aufgabe einer als Proteasom bezeichneten Protein-‘Maschinerie’ wiederum ist die Entsorgung von Proteinen durch Zerkleinerung.

Die Untersuchung dieses zellulären Interaktionsnetzwerks ist sehr wichtig und ergiebig, da wir viel über die Funktion eines Proteins erfahren können, wenn wir wissen, mit welchen anderen Proteinen es zusammenarbeitet. Hier kommt die Proteomik ins Spiel, da sie uns die Isolierung eines Proteins von Interesse gemeinsam mit den Proteinen, die eine Affinität zu ihm haben – seinen Interaktionspartnern – ermöglicht. Wird dieses Affinitätsexperiment nacheinander bei sämtlichen unterschiedlichen Proteinen der Zelle durchgeführt, bildet sich ein Interaktionsnetzwerk heraus, das zeigt, wer mit wem in Wechselwirkung treten kann. Unsere Arbeitsgruppe hat verschiedene solche Experimente durchgeführt, so dass wir neue Einblicke in die Netzwerkstruktur des Proteoms gewinnen konnten. Es stellte sich heraus, dass relativ wenige Proteine Teil von Proteinmaschinen wie dem oben beschriebenen Ribosom oder Proteasom sind. Stattdessen sind die Wechselwirkungen untereinander bei den meisten Proteinen relativ schwach ausgeprägt und vorübergehender Natur, und dieses Strukturmerkmal ist für die Stabilisierung des zellulären Netzwerks entscheidend.

Proteine binden sich zudem an andere große oder kleine Moleküle in der Zelle. Als Transkriptionsfaktoren bezeichnete Proteine treten zum Beispiel mit der DNA in Wechselwirkung und bestimmen auf diese Weise, welche Gene in einer bestimmten Situation an- oder abgeschaltet werden – dies veranschaulicht unmittelbar, wie das Proteom mit dem Genom zusammenwirkt. Solche Transkriptionsfaktor-Komplexe können heute mittels MS-basierter Proteomik effizient sequenziert werden. Hierdurch lassen sich Einblicke in den Entwicklungsprozess von der embryonalen Stammzelle bis zur spezialisierten bzw. differenzierten Zelle gewinnen. Wir haben auch neue Proteine entdeckt, die an der Reparatur der DNA beteiligt sind, nachdem diese durch Strahlung oder chemische Substanzen geschädigt worden ist.

RegulIERUNG DER ZIRKADIANEN UHR UND DER neurodegeneration

Fast jede Spezies verfügt über komplizierte Mechanismen zur Regulierung ihrer zirkadianen Uhr. Wir alle kennen einige der negativen Auswirkungen einer aus dem Takt geratenen inneren Uhr, zum Beispiel Jetlag oder Schlaflosigkeit. Sie geht aber auch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Stoffwechselerkrankungen, Adipositas und Depression einher. Bei der Erforschung der Proteinkomplexe, aus denen die molekulare Maschinerie der zirkadianen Uhr besteht, wurden große Fortschritte erzielt. Darüber, wie genau diese molekulare Uhr Einfluss auf das größere Netzwerk der Zellproteine nimmt, war jedoch nur relativ wenig bekannt. Es wurden zahlreiche Studien zur Messung rhythmischer Genexpression und sogar rhythmischer Proteinexpression durchgeführt, doch die Effekte waren relativ gering. Die Funktionen von Proteinen werden jedoch nicht nur durch ihre Menge, sondern auch durch ihren Aktivitätsstatus reguliert. Binden sich spezialisierte Proteine, sogenannte Kinasen, an kleine Moleküle wie z. B. Phosphogruppen, wirken sich diese sogenannten posttranslationalen Modifikationen auf das Verhalten der Proteine in vielfacher Weise aus. Da sie die Masse der Proteine und Peptide verändern, lassen sich posttranslationale Modifikationen mittels Massenspektrometrie leicht und sehr spezifisch nachweisen. Als wir diese Unterart der Proteomik, die sogenannte ‘Phospho-Proteomik’ anwandten, stellten wir fest, dass die Aktivitätsmuster der vielen tausend Proteine zirkadian eng koordiniert sind. Die Stoffwechselmaschinerie des Körpers wird insbesondere durch umfangreiche Veränderungen der Phosphorylierung justiert. Dies ergibt einen Sinn, da sich der Organismus an die Verfügbarkeit von Nahrung tagsüber und nachts anpassen muss. Wir gehen davon aus, dass uns diese globalen Erkenntnisse in Bezug auf den Proteinaktivierungsstatus bei der zirkadianen Rhythmik viel über die Proteinfunktion im Allgemeinen lehren können und auch für die Anwendung in der Medizin hilfreich sind.

Wir haben unsere Phospho-Proteomik-Technologie mittlerweile in vielen verschiedenen Bereichen erfolgreich angewandt, unter anderem bei der Erforschung der Neurodegeneration. Bei der erblichen Form der Parkinson-Erkrankung ist eine Proteinkinase namens LRRK2 mutiert und überaktiv. Es existieren zwar bereits chemische Inhibitoren für LRRK2, es war aber nicht bekannt, welche Proteine LRRK2 zwecks Phosphorylierung ansteuert – eine wichtige Information, wenn man Inhibitoren als Medikamente bei Patienten einsetzen möchte. Bei Anwendung von Mausmodellen und chemischen Tools, die uns von einer Forschergemeinschaft zur Verfügung gestellt wurden, stellten wir fest, dass das relevante Substrat einer bestimmten Proteinklasse, den sogenannten Rab-Proteinen angehört. Rab-Proteine werden derzeit in der Arbeitsgruppe von Marino Zerial am Max-Planck-Institut in Dresden intensiv erforscht. Wir können nun grundlegende Erkenntnisse hinsichtlich der Zellbiologie von Rab-Proteinen für potentielle therapeutische Ansätze bei Morbus Parkinson beisteuern.

PlasmaProteom-Profiling

Der Mensch verfügt über etwa sechs Liter Blut, das aus Blutkörperchen und zahlreichen Proteinen besteht, die entweder vorliegen, weil sie eine spezielle Funktion innerhalb des Blutkreislaufs haben, oder weil die Organe, die von dieser Körperflüssigkeit durchströmt werden, sie freisetzen. Bei einer regulären ärztlichen Kontrolluntersuchung oder zur Diagnose einer Krankheit wird häufig die Konzentration eines oder mehrerer Proteine im Blut gemessen. Eine Funktionsstörung der Leber wird beispielsweise routinemäßig anhand der Leberenzymspiegel im Blut diagnostiziert. Es existieren Dutzende dieser ‘Proteinbiomarker’, die Hinweise auf bestimmte Erkrankungen und Behandlungsmöglichkeiten liefern. Die meisten wurden jedoch bereits vor Jahrzehnten entdeckt, und trotz des lebhaften Interesses von Ärzten und pharmazeutischen Unternehmen werden aktuell nur sehr wenige neue Biomarker entwickelt. Darüber hinaus lässt sich mit den heutzutage klinisch angewendeten Methoden im Allgemeinen nur jeweils ein Proteintyp nachweisen.

Viele unterschiedliche Proteine im Blut mittels Proteomik zu messen und so Krankheiten zu diagnostizieren, ist seit Jahren verlockend. Die technologischen Hürden einer Plasmaanalyse sind jedoch enorm. Die wichtigste Hürde ist der große Unterschied der Proteinkonzentration zwischen den am häufigsten und den am seltensten auftretenden Proteinen – das Problem des ‘dynamischen Bereichs’. Etwa die Hälfte der Proteinmasse im Plasma – dem flüssigen Anteil des Blutes – besteht aus einem einzigen Protein, dem sogenannten Albumin, und mehr als 99 % entfallen auf einige wenige, sehr häufig vorkommende Plasmaproteine. Im Gegensatz dazu liegen in sehr kleinen Mengen freigesetzte Hormone wie zum Beispiel Botenproteine des Immunsystems zuweilen in Konzentrationen vor, die um zehn Größenordnungen kleiner sind. Vor ein paar Jahren, als wir uns die neusten Fortschritte der MS-basierten Proteomik zunutze machen konnten, entschieden wird, uns noch einmal der Analyse des Plasmaproteoms zuzuwenden. Wir wollten dies auf direktem Wege und in kurzer Zeit tun, um eine Analyse der Plasmaproteome bei vielen verschiedenen Krankheiten zu ermöglichen.

Ausgehend von nur einem einzigen Tropfen Blut, der sich problemlos aus einem Fingerstich gewinnen lässt, und durch Einsatz kürzlich von uns entwickelter neuer MS-Scan-Modi können wir heute etwa 1.000 verschiedene Proteine in sehr kurzer Zeit analysieren. Aktuell bauen wir diese Technologie, die bereits in verschiedenen klinischen Studien zum Thema Gewichtsverlust zum Einsatz kam, weiter aus. Die Proteinmuster können dann mit bestehenden Patientendaten sowie den von Ärzten routinemäßig bestimmten klinischen Daten korreliert werden. Das Plasmaproteom enthält nachweislich eine Fülle von Informationen, anhand derer sich Patienten klassifizieren lassen. In Zukunft, wenn sich immer mehr Korrelationen zwischen Proteinmustern und Krankheitsbildern etabliert haben, wird das ‘Plasmaproteomprofil’ vielleicht ein sehr grober Indikator für den Gesundheitszustand eines Patienten werden. Darüber hinaus arbeiten wir daran, die Technologie möglichst robust und kostengünstig zu machen, damit sie breitgefächert zur Diagnose von Krankheiten im Frühstadium eingesetzt werden kann und – genauso wichtig – dazu beiträgt, dass Krankheiten gar nicht erst entstehen.

FAZIT

Hauptsächlich aufgrund der technologischen und konzeptionellen Fortschritte bei der MS-basierten Proteomik ist es heute möglich, ein umfassendes und unverfälschtes Bild des Proteoms biologischer Systeme zu gewinnen. In ihren unterschiedlichen Ausformungen ist diese Technologie ein leistungsstarkes Instrument zur Aufklärung biologischer Funktionen. Dies ist nicht nur per se interessant, sondern trägt auch zur Wiederherstellung des Gleichgewichts zwischen Genomik – wie durch das seit der Geburt im Wesentlichen unveränderte Genom definiert – und dem dynamischen Zustand des Organismus zu einem beliebigen Zeitpunkt, seinem Phänotyp, wie er durch das Proteom widergespiegelt wird, bei. Darüber hinaus zeigen die obigen Beispiele deutlich, dass die Zeit nun reif dafür ist, dass die Proteomik bei der Übersetzung von Grundlagenforschung in medizinische Anwendungsmöglichkeiten einen wichtigen Platz einnimmt. Tatsächlich kann die MS-basierte Proteomik, wenn sich die aktuellen Erfolge bei der Analyse von Körperflüssigkeiten wie Blut fortsetzen, die medizinische Praxis mittels ausgefeilterer Diagnosemöglichkeiten grundlegend verbessern.