

# Vloga proteomike v bolniku prilagojeni laboratorijski medicini

## *The role of proteomics in personalized laboratory medicine*

### **Borut Božič**

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo  
Univerzitetni klinični center, SPS Interna klinika, Klinični oddelek za revmatologijo

Avtor za korespondenco:

**Prof. dr. Borut Božič, mag. farm., EuSpLM**

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana,  
e-pošta: borut.bozic@ffa.uni-lj.si

### **POVZETEK**

Proteomika je v zadnjih letih zaradi uporabe masne spektrometrije izjemno napredovala. Sklopljenost z zmogljivimi afinitetno osnovanimi tehnologijami omogoča izboljšanje klinične uporabe proteinskih bioloških označevalcev. Toda standardizacija proteomskih pristopov je zahtevna in zato izraba proteomike v translacijskih raziskavah in personalizirani medicini še ni polno izkoriščena. Dejstvo, da je proteomika vmesni člen med genotipom in fenotipom, pa odpira nekatere specifične etične zadrege in izzive v laboratorijski medicini.

**Ključne besede:** proteomika, proteini, biooznačevalci, omike, laboratorijska medicina, etika

### **ABSTRACT**

Over the past years, the technology of mass spectrometry-based proteomics has dramatically improved. Coupling with high-throughput affinity-based technologies will improve clinical utility of protein biomarkers. However, it is difficult to standardize proteomic approaches and potential of proteomics in translational research and precision medicine is yet to be fully exploited. The fact that proteomics represents a level between the genotype and the phenotype opens some specific ethical dilemmas and challenges for laboratory medicine.

**Key words:** proteomics, proteins, biomarkers, omics, laboratory medicine, ethics

## UVOD – PROTEINSKA ANALITIKA IN PROTEOMIKA

Skupni namen raziskav molekularne biologije je določitev funkcije genov in proteinov ter jih povezati v poti in mreže, ki naj bi dokončno podale poglobljeno razumevanje delovanja biološkega sistema. Proteomika je veda, ki jo razumemo v dveh dimenzijah: v ožjem pomenu besede je veda, ki se ukvarja z analizo vseh proteinov, torej proteoma, posamezne biološke enote – celice, tkiva, organizma. Ker ne poznamo vseh proteinov, dobimo uporabne informacije s primerjavo rezultatov analiz v dveh stanjih, npr. celice pred aktivacijo in po aktivaciji; ali tumorsko in okoliško zdravo tkivo. V širšem pomenu pomeni proteomika analizo kompleksnih proteinskih vzorcev. Vidika si nista toliko različna, kot je videti na prvi pogled, saj tudi v klasičnem pomenu iz razlik v analizi celotnega proteoma v dveh stanjih nadaljujemo z analizo razlik v manj kompleksnih vzorcih do identifikacije in proučevanja posameznega proteina in njegove vloge (Slika 1).

S tega zornega kota proteomika za klinično biokemijo ni nova. Opisani pristop je bil uporabljan mnogo prej, kot pa se je pojavil pojem proteomika. Ločevanja vseh proteinov v serumu, torej proteoma frakcije krvi kot tekočega tkiva, se je lotil že Tiselius v začetku prejšnjega stoletja. Za razvoj elektroforeze serumskih proteinov je prejel leta 1948 Nobelovo nagrado za kemijo (1).

Proteom je kompleksen in dinamičen pojem, ki ga lahko opredelimo z vidika različnih značilnosti proteinov: njihovega zaporedja, strukture, lokalizacije, modifikacij, interakcij in biokemijskih funkcij. Pri tem dobimo bogat in raznolik nabor podatkov. Analize, ki se tičejo teh različnih lastnosti proteoma, zahtevajo enako raznolik obseg tehnologij. Pri tem ne gre toliko za drugačne analize načine od že poznanih v klasični analitiki proteinov. Še vedno je potovanje nabitih delcev v električnem ali magnetnem polju ključni fizikalni princip proteomike (2, 3). Pomembni pa so pristopi, ki omogočajo obsežne analize v kratkem času in hkrati omogočajo zanesljivost obdelave obilice podatkov. Ne razpolagamo s posamično tehnologijo, s katero bi naenkrat obvladovali pripravo velikega števila vzorcev in njihovo prepustnost skozi procese, poglobljene analize, kratek časovni obrat, bioinformacijska orodja za obdelavo podatkov in identifikacijo posttranslacijskih variant proteinov (4). V ospredju sta dve skupini analiznih metod, ki ju uporabljamo ločeno ali pa povezano: afinitetno osnovane metode in masna spektrometrija.

**Imunokemijske metode afinitetne vezave** so v analitiki proteinov prisotne že dolgo. Teoretične osnove vezave liganda segajo v sredino 20. stoletja (pregled v 5), vendar so šele visoko zmogljive tehnike hkratnega določanja večjega števila merjencev omogočile učinkovito proteomsko analizo. V uporabi sta dva pristopa, oba na voljo tudi v komercialnih izvedbah. Proteinske mikromreže predstavljajo miniaturizacijo principa encimsko imunske metode na trdnem nosilcu, vendar s povečanim številom hkrati določenih reakcij. Izvedbeno so proteinske mikromreže lahko protitelesne (na plošči so protitelesa kot lovilne molekule), funkcijske (na plošči so prečiščeni proteini ali druge molekule za iskanje interakcij) ali reverznoafazne (na plošči so vsi proteini tkiva ali celice). Nizkogostotne mikromreže zajemajo od nekaj do nekaj sto proteinov in so zaradi večje ponovljivosti rezultatov uporabljane v kliničnem okolju. Visokogostotne mikromreže zajemajo tudi preko tisoč molekul in so pretežno uporabljene v raziskavah (6). Čeprav so tudi mikromreže v osnovi metode multipleks (večkranost, pri čemer je mišljeno hkratno analiziranje večjega števila vzorcev), se slednji izraz pogosteje uporablja za tehnologijo vezave lovilnih molekul (npr. protiteles) na zrnih v suspenziji (4). Posebno pozornost vzbuja metoda bližnjega podaljševanja ali ligacije (PEA, proximity extension/ligation assay) z enoverižno DNA označenimi protitelesi, ki se hibridizirajo po vezavi protiteles na tarčne proteine. Odkrivanje poteka s pomočjo verižne reakcije s polimerazo ali s sekvenciranjem nove generacije (7, 8).

**Masna spektrometrija (MS)** je v zadnjih desetletjih postala izjemno uporabna tudi na področju proteomike, še posebej za peptidno/proteinsko identifikacijo. Osnovni princip obsega tri korake: Najprej iskane molekule (v proteomiki so to zaporedno specifično cepljeni peptidi) ioniziramo s pomočjo električnega polja, toplote ali z obstreljevanjem z elektroni, fotoni, ioni. Zaradi občutljivosti peptidov je v pomoč lahko tudi matriks, v katerega vnesemo vzorec (matriksno podprta laserska desorpcija/ionizacija). Naslednji korak je ločitev ionov na osnovi razmerij med njihovo maso in nabojem. Končni korak je kvalitativna ali kvantitativna določitev ionov, pri čemer si pomagamo z bioinformacijskimi orodji in bazami podatkov. Je pa za uporabne rezultate potrebna kompleksna predanalizna priprava vzorcev. Tudi zato je masna spektrometrija najpogosteje končni del sklopljenih laboratorijskih orodij, na primer s tekočinsko kromatografijo (9).

Tako pri vseobsežnih afinitetnih analizah kot pri masni spektrometriji pa se bolj kot v klasičnih analizah biološkega materiala soočamo s teoretičnimi vprašanji, kaj pomeni signal (10) – prisotnost molekule, ki jo iščemo, pri-

sotnost podobne molekule, šum v detekcijskem sistemu ali kaj četrtega? V izhodišču sicer teoretična vprašanja postanejo zelo stvarna ob prenosu raziskovalnih odkritij v klinično uporabo (11).

## PROTEOMIKA V LABORATORIJSKI MEDICINI

Proteomika je v vzponu preboja v široko uporabo v laboratorijski medicini. Zato prepoznavamo dva tipa študij, ki se razlikujeta tako v pristopu kot v neposredni prenosljivosti v klinično laboratorijsko prakso: z rezultati vodene raziskave (angl. discovery science/research) (12) in hipotezno vodene raziskave (angl. targeted science/research) (13, 14).

Pogosto je v proteomiki najprej uporabljen z rezultati vodene raziskovalni pristop ali pristop hipotezno nevezanih odkritij (angl. hypothesis-free). S takimi študijami pridobivamo nova znanja in vedenja o delovanju živega sveta. Klasična oblika tega pristopa je analiza celotnega proteoma celice ali tkiva v dveh stanjih: bolna/zdrava, stimulirana/nestimulirana. Proteine z zaporedno specifičnimi encimi razgradimo v peptide, jih ločimo z reverznofazno tekočinsko kromatografijo, frakcije ioniziramo in usmerimo v masni spektrometer. Peptidne mase in obilje peptidov merimo z masnim spektrometrom v celem spektru in se osredotočimo na razlike. Nadaljnja fragmentacija omogoča masne spektre za peptidno identifikacijo, ki poteka s pomočjo informacijskih orodij iskanja po bazah podatkov (primerjalni pregled v 13).

Drug pristop je hipotezno vodena študija, ki je lahko samostojna, lahko pa nadaljevanje z rezultati vodene študije, saj nas zanimajo razlike v dveh stanjih celice ali tkiva. Imenovana je tudi tarčna proteomika. Razmeroma majhno število proteinov, ki so pokazali razlike v pojavljanju v dveh stanjih, testiramo v večji neodvisni skupini. Ker za neznane proteine niso na voljo sicer pogosto uporabljene imunokemijske afinitetne metode za identifikacijo (monoklonska protitelesa), uporabljamo metode tarčne masne spektrometrije.

V laboratorijski medicini je preiskava krvi zagotovo najpogostejši laboratorijski diagnostični postopek, pri čemer so biološki označevalci krvi in krvnih derivatov glavna podpora opredelitvi pacienta, diagnostiki in terapiji. Proteine, ki sestavljajo proteom plazme ali seruma, lahko razvrstimo v tri velike skupine. V prvi skupini so obilno zastopa-

ni proteini (v koncentracijskem razponu  $10E4$  do  $10E11$  ng/L), ki so funkcijsko prisotni v plazmi: albumin, apolipoproteini, proteini akutne faze, koagulacijski faktorji. V drugi skupini so iz celic sproščeni proteini ( $10E2$  do  $10E5$  ng/L): aminotransferaze, tkivno-specifične izooblike proteinov. V tretji skupini so signalni peptidi in proteini, ki so v stabilnih stanjih v koncentracijah pod  $10E3$  ng/L: inzulin, interleukini, rastni faktorji (14). Ker je krvna plazma v neposrednem ali posrednem stiku z vsemi organi v telesu, je s svojo sestavo neizmeren vir informacij. Da te informacije, torej merjence, lahko uporabimo za vrednotenje zdravstvenega stanja posameznika in posledično zdravstveno obravnavo, moramo informacije ovrednotiti – postaviti v okvir zdravja in bolezni, osebne in časovne variabilnosti. To velja tudi za proteine v plazmi. Seveda pa moramo najprej vedeti, kateri proteini so prisotni in v kakšnih oblikah. Prav to je bil namen projekta humani proteom plazme, ki ga je sprožila Organizacija človeškega proteoma (HUPO Human Proteom Organization) leta 2002 in je do leta 2021 v obliko peptidnega atlasa vnesel preko 5800 proteinov (4). Projekt je še v teku, je pa HUPO leta 2010 razširila delovanje v okviru globalnega projekta človeškega proteoma (Human Proteom Project) z dvema namenoma: a/ sestaviti zanesljiv seznam delov človeškega proteoma v vsej njegovi zapletenosti, vključno s posttranslacijskimi spremembami, izrezovalnimi variantami in funkcijami, in b/ umestiti proteomiko kot integralni del "multiomskih" študij za izboljšanje znanj o živem svetu, biomedicine in na bolnika osredotočene medicine (15). Za doseg ambicioznega načrta so delo organizirali v 4 stebre: za tehnološke pristope MS, za protitelesa, za patološke vidike in za podatkovne baze.

Osnovna težava masovne in veliko-obsežne proteinske analitike je izjemen razpon med številom molekul različnih proteinov v vzorcu, ki ga analiziramo. Posebnost takih meritev je pogojenost z verjetnostmi in posledično statističnim pristopom vrednotenja – tudi opredelitev meje zanesljivih signalov. V plazmi, na primer, pride na vsako molekulo interleukina 6 deset milijard molekul albumina. »

Če nam orodje omogoča 1% selektivnost ali razlikovanje med šumom in signalom v razmerju 1:100, pomeni, da ob določanju proteinov iz druge skupine ne prepoznamo nobenega iz tretje. Pri tem ni zanemarljivo, kateri pristop je uporabljen v primarni meritvi – pristop merilnega odstopanja od resnične vrednosti ali pristop merilne negotovosti (10). To je pomembno iz vsaj dveh razlogov. Prvič, podobno kot v industriji tudi v laboratorijski medicini vedno več analiz sloni na enkratni meritvi in ne na računanju srednje vrednosti z odstopanjem množice meritev. Drugič, kot pri vseh masovnih meritvah je tudi v proteomiki pomembna opredelitev verjetnostne meje deleža lažno zaznanih signalov, v tem primeru peptidov.

Ob možnostih, ki nam jih ponuja proteomika na polju novih molekularnih bioznačevalcev in modifikacijskih profilov, je potrebno vzporedno razvijati in uveljavljati tudi ustrezno validacijo teh označevalcev. To vključuje več ravni, ki so zajete v študiji učinkovitosti *in vitro* medicinskega pripomočka (16). Zajemajo preverjanje značilnosti analiznega postopka ter klinične značilnosti rezultatov (Preglednica 1). Zaradi kompleksnosti analiznega postopka lahko pričakujemo, da bodo nekatera vrednotenja rezultatov vezana na izvedbo sklopljenih metod, s katero bodo pridobljeni – podobno kot pri klasičnih imunokemijskih metodah ob uporabi protiteles. Poleg teh dveh standardnih vrednotenj v laboratorijski medicini moramo že ob oblikovanju študije odkrivanja in potrjevanja molekularnih bioloških označevalcev razmišljati o predanaliznih vplivih.

## Tehnično logistični izzivi na področju previda proteomike v laboratorijsko prakso

Uvajanje proteomike v klinično prakso poteka pogosto neposredno iz raziskav, zato se je nujno soočiti z nekaterimi posebnostmi že v zgodnjih fazah. V kliničnih študijah je osnovno vprašanje vezano na zdravstveno stanje pacienta, v globalnih nehipoteznih raziskavah pa sledimo znanstvenemu vprašanju (Preglednica 1). Zato pristopi v reševanju zapletov ali preseganju težav niso in ne morejo biti enaki. Izzivi se pojavljajo v vseh klasičnih fazah laboratorijskega dela: predanalizni, analizni in poanalizni.

V **predanalizni fazi** je pomembna priprava vzorcev. V laboratorijski diagnostiki pričakujemo, da je analizirani vzorec odraz stanja pacienta, zato nekatere rešitve, ki jih uporabljamo v raziskovalne namene, ne pridejo v poštev. Tu je mišljeno predvsem združevanje vzorcev za dosega-

nje zadostne količine pičlo zastopanih proteinov.

Način shranjevanja vzorcev pred obdelavo in analizo je v proteomiki izjemno pomemben, kar še posebno velja, če uporabljamo v nadaljevanju afinitetne imunokemijske metode. Za proteinske analize po nekajmesečnem shranjevanju so potrebne temperature shranjevanja pod  $-80^{\circ}$  Celzija (17). Vprašanje velikega koncentracijskega razpona proteinov v vzorcu (še posebej v plazmi) rešujemo z različnimi pristopi (pregled v 14). Najpogostejša je deplecija 6-20 najbolj zastopanih proteinov (18), kar nam omogoči prepoznavanje 500-800 plazemskih proteinov z MS, skloppljeno s tekočinsko kromatografijo. Obilno prisotne proteine učinkovito odstranimo v afinitetnih kolonah s specifičnimi protitelesi. Obstaja seveda nevarnost, da izgubimo tudi del manj zastopanih proteinov s podobnimi strukturnimi elementi, vendar je o tem vprašanju na voljo malo kredibilnih podatkov (4).

Obsežna frakcionacija vzorca, združena s skenirajočo MS omogoči detekcijo bistveno večjega števila proteinov, vendar je povezana z višjimi stroški in večjo porabo časa, hkrati pa tudi z manjšim volumnom posamične frakcije analiziranega vzorca. Zaradi več ločenih faz, oziroma ločene obravnave posamezne frakcije, se poveča nezanesljivost in poslabša ponovljivost. So pa na tržišču že integrirani mikrotekočinski pripomočki za avtomatično obdelavo plazme, kar vključuje odstranitev obilnih proteinov, cepitev proteinov in razsoljevanje (98). Vzorec je možno tudi dvojno obdelati, torej odstraniti obilne proteine in ga frakcionirati (4).

V **analizni fazi** se soočamo s pomembnim vprašanjem zagotavljanja kakovosti in zanesljivosti na več ravneh. Miniaturizacija, ki je nujna ob majhnih volumnih vzorcev, predstavlja sama zase izziv od vpliva površinske napetosti, kapilarnega vleka, elektroosmoze, kinetike do vprašanja specifičnosti signala ob verjetni prisotnosti posamične molekule ali le nekaj molekul iskanega merjenca v majhnem volumnu frakcije. Če to povežemo s potrebo po določanju velikega števila proteinov hkrati, se hitro znajdemo v situaciji zmanjšane zanesljivosti rezultatov zaradi navzkrižnih vezav uporabljenih protiteles. Slednje so afinitetno pogojene, vendar zaradi velikega števila tudi nizko afinitetne vezave vplivajo na rezultat (teoretična osnova v 20). V tem pogledu predstavljajo pomemben korak naprej metode bližnjega podaljševanja (PEA), saj močno zmanjša vpliv nizkoafinitetnih navzkrižnih vezav protiteles ob velikem številu reakcij. Ni pa (še) sistematičnih študij natančnosti in točnosti različnih izvedb (4).

»

Masovne in veliko-obsežne proteinske analitike so pogojene z verjetnostmi in opredelitvijo meje zanesljivih signalov. Standard z uporabo masne spektrometrije je 1% lažno določenih molekul (14).

**Poanalizna faza** proteomike je, podobno kot druge “omike”, povezana najprej z obdelavo masovnih podatkov in šele nato z interpretacijo rezultatov in izvid. Čeprav je članek namenjen predvsem laboratorijski medicini, se bomo zaradi lažjega razumevanja dotaknili obeh glavnih vidikov proteomike (13,21,22).

V tarčni proteomiki, ki jo uporabljamo tudi v diagnostiki, analiziramo samo izbrani nabor proteinov, najsi bo to s spremljanjem vzporedno potekajočih reakcij (PRM parallel reaction monitoring) ali s spremljanjem izbranih reakcij (SRM, selected reaction monitoring). V z rezultati vodeni raziskovalni proteomiki želimo pridobiti čim večje število masnih spektrov. Najpogostejši pristop je podatkovno odvisna pridobitev (DDA, data dependent acquisition), pri kateri v prvi fazi (ali masni spekter 1) zaporedoma pridobimo spektre izpranih peptidov, čemur sledi druga faza (ali masni spekter 2) pridobitve fragmentnega spektra avtomatsko izbranih prekursorjskih ionov. Drugi pristop je podatkovno neodvisen (DIA data independent acquisition), ki ne sloni na prekursorjskih ionih v celem masnem obsegu, temveč na sistematično izbranih ožjih oknih prekursorjskih ionov. Znotraj takih oken imamo fragmente vseh peptidnih ionov, kar povzroči večjo ponovljivost DIA v pri-

merjavi z DDA še posebno za pičlo prisotne peptide (13).

**Zagotavljanje kakovosti** predstavlja poseben izziv na področju proteomike. Ker je v analizo praviloma vključenih večje število sklopljenih metod, ki so vsaka zase kompleksne, je nujen sistematičen in poglobljen pristop zagotavljanja kakovosti. Kot v celotni laboratorijski medicini tudi tu slednje ni vezano samo na analizno fazo (pregled v 21). Priprava vzorca se lahko zelo razlikuje glede na uporabljeno skupino metod (afinitetne ali MS), pa tudi znotraj tega. Zato je smiselno preveriti skozi procesogram, kaj vse lahko vpliva v posameznem koraku na variabilnost končne rezultata. V analizni fazi uporabimo kontrolne vzorce, ki so lahko enostavne ali kompleksnejše sestave – ponovno v odvisnosti od uporabljenih analiznih pristopov. Za neodvisno obravnavo posamičnih dejavnikov variabilnosti lahko učinkovito uporabimo Paretove grafe (23), s katerimi si pomagamo podobno kot z Westgardovimi pravili v klasičnih analizah. Projekt človeškega proteoma (15) je že v začetnih fazah pokazal, da je v poanalizni fazi analiz obilice podatkov, kot je na primer MS, bistveno večje število vzrokov neponovljivosti kakor v klasičnih analizah (24). Številna iskalna orodja uporabljajo različne metodologije z vgrajenimi predpostavkami in so praviloma na voljo brez temeljitih primerjalnih študij. Za laboratorijsko medicino je še posebej pomembno dolgoročno spremljanje meritev, pri čemer kaže obetavne rezultate njihova obdelava z multivariantnimi pristopi (21).

## PRIMERI PROTEOMIKE PRI POSAMEZNIH BOLEZENSKIH STANJIH

Prisotnost ali odsotnost posamičnega proteina je le delček sprememb proteoma. Bolezensko stanje lahko vpliva na proteinsko procesiranje, na posttranslacijske modifikacije, na interakcije s proteini in drugimi molekulami ter na lokacijo proteina v biološkem sistemu. In čeprav v laboratorijski medicini proteinske biooznačevalce uporabljamo že stoletje (1), se za proteomski pristop era šele začena. Mnogi raziskav le počasi prodira z validiranimi rezultati v klinično prakso. Poglejmo si stanje na nekaterih področjih.

### Okužbe

Na področju okužb se je proteomika že dobro usidrala v obliki molekularno diagnostičnih mikrobioloških preiskav. To je pogojeno z večjo opredeljenostjo iskanih proteinov, saj ne iščemo posamičnih sprememb v proteomu pacienta, ampak prisotnost mikrobnih proteinov. Matriksno podprta laserska ionizacija/desorpcija s časom preleta ionov (MALDI-TOF) in kvadrupolno masno spektrometrijo je že rutinsko uporabljana v svetu in pri nas (25). »



## Srčno-žilne bolezni

V večini proteomskih študij na tem področju so v zadnjem desetletju uporabljali masno spektrometrijo na tkivih in celicah modelnih sistemov (26). Seveda pa je študijske rezultate treba ustrezno prevesti za klinično rabo, kar je poseben izziv (27). V zadnjem času so obsežno uporabljana afinitetna orodja, npr. aptamerne mikromreže in multipleksni imunokemijski sistemi, kar se že kaže v objavah proteomskih profilov, vezanih na stanja srca in ožilja (28). Primeri proteinskih bioznačevalcev na področju srčno-žilnih bolezni so srčni troponini, strukturni proteini, ki se izražajo v srčnih miocitih, zato imajo v laboratorijski medicini visoko klinično specifičnost za poškodbe srca.

## Nevrodegenerativne bolezni

Nevroproteomski pristopi so se do sedaj odlikovali v raziskavah, ki so prepoznale precej potencialnih diagnostičnih, prognostičnih ali poškodbenih označevalcev, povezanih z nevrodegenerativnimi motnjami. Žal večina študij zaradi omejenosti dostopa in količine cerebrospinalne tekočine sloni na združevanju vzorcev (29), kar je uporabno za

pridobivanje novih spoznanj (z rezultati vodena proteomika), popolnoma neuporabno pa v diagnostiki (tarčna proteomika). Nekaj obetavnih bioznačevalcev Alzheimerjeve bolezni je uporabnih za opredelitev stopnje bolezni, ne pa za njeno odkrivanje. Po drugi strani pa odpirajo integrirani pristopi genomike, transkriptomike, proteomike in lipidomike obetavne možnosti za preverjanje in validacijo potencialnih bioznačevalcev Alzheimerjeve bolezni na večjih skupinah pacientov (30).

## Rakave bolezni

V onkologiji je bil zagotovo na področju proteomskih pristopov narejen največji preboj. Posledice so vidne tako v zgodnji diagnostiki kot v prognozi mnogih rakavih bolezni (31). Zaradi izražanja proteinov iz različnih tkiv organizma v rakavem tkivu je pomembno celovito poznavanje celičnih proteomov, k čemur lahko pripomore tudi nastajajoča proteomska enciklopedija rakavih celičnih linij (32). Tak atlas je temelj za prenos raziskovalnih znanj v diagnostiko. Še vedno pa obstaja odprto pomembno in zahtevno torišče, to je ustrezna standardizacija, kar pa je splošen izziv proteomike.

# ETIČNI VIDIKI UVAJANJA PROTEOMIKE V KLINIČNO PRAKSO

Pridobivanje velikih količin podatkov, ki so nujni v sodobnih pristopih sistemske biologije za personalizirano medicino, odpira tudi vrsto etičnih vprašanj. Slednja so bila za področje genomike in genetskih raziskav že obsežno obravnavana (pregled v 33). Vprašanje je, koliko se sprejeti pristopi v genomiki nanašajo tudi na proteomiko, predvsem z vidika zasebnosti posameznika, predaje iskanih ali neiskanih rezultatov in anonimizacije pri delitvi podatkov v raziskovalni skupnosti. Tudi pri proteomiki moramo ločevati dvojnost pristopov (Preglednica 2). V raziskovalnih študijah je v ospredju raziskovalno vprašanje in odgovornost raziskovalca do udeleženca raziskave, pri čemer se neiskani rezultati praviloma ne izročajo. V laboratorijski medicini pa je v ospredju pacient, odgovornost medicinskega osebja do pacienta. Neiskani podatki se izročajo skladno z medicinsko doktrino "ne škoditi", pri čemer ima pacient tako pravico vedeti, kot tudi pravico ne vede-

ti. Bolj nedorečeno je vprašanje delitve rezultatov znotraj raziskovalne skupnosti. Izmenjava informacij predstavlja ključno osnovo za preglednost delovanja. Je pa tudi nujna za pridobivanje znanj o delovanju bioloških sistemov na splošno, kar je razvidno iz projektov oblikovanja različnih atlasov ali proteinskih/proteomskih seznamov. Plazemski proteom, celotni človeški proteom, proteomi rakavih celic (4, 14, 15, 32) in podobno so osnova za prenos splošnih znanj v laboratorijsko medicino.

Proteomski podatki niso isto kot genomski, saj je variabilnost bistveno večja in prepoznavanje posameznika težje. Tradicionalno gledano proteomski podatki zato ne veljajo za osebno občutljive, kar pa je v zadnjem obdobju deležno razprav. Proteomika daje namreč dvojno občutljive informacije – omogoča prepoznavanje osebe in daje izhodišča o zdravstvenem stanju. Proteomske strategije, ki upora- »

bljajo posamične aminokislinske polimorfizme (SAPs, single amino acid polymorphisms) odpirajo vprašanje, koliko je proteomske podatke sploh mogoče anonimizirati. Glede občutljivosti podatkov daje pristop SRM najmanj osebno občutljive informacije, sledijo mu PRM, DDA in DIA (izčrpen pregled v 34).

Podatki o proteinih, najsi bodo pridobljeni v raziskavah pod pojmom proteomika, transkriptomika, peptidomika,

ali kakšna druga “omika”, dajejo pomembne informacije o fenotipu posameznika, zato se je treba navedenih vprašanj lotevati z veliko mero občutka v smislu “ne škoditi”. V tem kontekstu je pojasnjeni pristanek ključnega pomena tako v laboratorijski medicini kot v raziskovalnem delu, kar izhaja iz etičnega odnosa do vseh udeležencev in iz formalne legislativne (35).

## PERSPEKTIVE PROTEOMIKE V LABORATORIJSKI MEDICINI

Večina današnjih proteinskih biooznačevalcev sodi v skupino obilno zastopanih proteinov plazme ali pa zanje poznamo jasne patofiziološke povezave. Med 300 najobilnejše zastopanimi proteini jih je 23 % že prepoznanih kot biooznačevalci. Če to ekstrapoliramo na celotno skupino obilno zastopanih proteinov v plazmi, lahko samo v tej skupini pričakujemo še preko 200 novih biooznačevalcev. In kaj šele v preostalih dveh skupinah plazemskih proteinov! In upoštevati moramo, da se proteomika razvija na celotnem spektru bioloških vzorcev, vključno z znotrajceličnimi organelami in drugimi tkivi (21).

Ob kakih 20.000 kodiranih proteinih v človeškem genomu in 14.500 klasificiranih boleznih v mednarodni statistični klasifikaciji bolezni in bolezenskih stanj je hitro jasno, da ne moremo pričakovati za vsako bolezensko stanje “svoje-ga” označevalca. Že zdaj je vidno, da posamični bioozna-

čevalci niso (in ne bodo) nujno neposredno vpleteni v patogenezo. Prihodnost ni toliko v posameznem proteinu kot označevalcu posamezne bolezni, temveč bolj v povezavah označevalcev ali profilih, kot jih že poznamo: npr. deRitisov količnik pri jetrnih obolenjih ali Framinganov rizični indeks za koronarno srčno bolezen, ki vsebuje poleg molekularskih tudi druge označevalce. Ker bolezni vplivajo tudi na posttranslacijske spremembe, so na obzorju povezovalne platforme podatkov različnih “omik”, na primer integrirano “omsko” profiliranje (iPOP, integrated personalized omics profiling) (36) ali vzročno usmerjeno raziskovanje “multiomskega” prostora (COSMOS, causal oriented search of multi-omics space) (37).

Očitno bo vloga proteomike v laboratorijski medicini tako kompleksna, kot je kompleksna vloga proteinov v zdravju in boleznih posameznega osebkca.

## LITERATURA

1. Willis MS, Arne Tiselius: *Clinical Chemistry. Laboratory Medicine*, 2009; 40:627–628, <https://doi.org/10.1309/LMKTBKG7YGLD4U0V>.
2. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics*, 2010;73 (11):2064-77. [doi:10.1016/j.jprot.2010.05.016](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.05.016). [ffhal-00509715f](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2009715f/)
3. Omersel J, Gobec M, Božič B. Chromatography / Electrophoresis: Affinity separation techniques. In Worsford P, Poole C, Townshend A, Miro M (Eds.) *Encyclopedia of Analytical Science*, (3rd ed.), Elsevier 2019;2:62-70.
4. Deutsch EW, Omenn GS, Sun Z, Maes M, Pernemalm M, Palaniappan KK et al. Advances and utility of the human plasma proteome. *J Proteom Res* 2021;20:5241-5263; [doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00657](https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00657).
5. Di Cera E. Mechanisms of ligand binding. *Biophysics Rev* 2020; 1, 011303; [doi.org/10.1063/5.0020997](https://doi.org/10.1063/5.0020997).
6. Neagu M, Bostan M, Constantin C. Protein microarray technology: Assisting personalized medicine in oncology (Review). *World Academy of Sciences Journal* 2019;1: 113-124. DOI: 10.3892/wasj.2019.15.
7. Assarson E, Lunberg M, Holmquist G, Bjoerkesten J, Bucht Thorsen S, Ekman D et al. Homogenous 96-Plex PEA Immunoassay Exhibiting High Sensitivity, Specificity, and Excellent Scalability. *PLoS ONE* 2014; 9(4): e95192. [doi:10.1371/journal.pone.0095192](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095192).
8. Zhong W, Edfors F, Gummeson A, Bergstroem G, Fagerberg L, Uhlen M et al. Next generation plasma proteome profiling to monitor health and disease. *Nat Commun* 2021;12(1): 2493. [doi.org/10.1038/s41467-021-22767-z](https://doi.org/10.1038/s41467-021-22767-z).
9. Rozanova S, Barkovits K, Nikolov M, Schmidt C, Urlaub H, Marcus K. Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview. In: Marcus K., Eisenacher M., Sitek B. (eds) *Quantitative Methods in Proteomics. Methods in Molecular Biology*, vol 2228. Humana, New York 2021. ogleđano 25.maja 2022 na naslovu [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1024-4\\_8](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1024-4_8).

10. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 2012. ogledano 25. maja 2022 na naslovu [https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM\\_200\\_2012.pdf/f0e1ad45-d337-bbeb-53a6-15fe649d0ff1](https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM_200_2012.pdf/f0e1ad45-d337-bbeb-53a6-15fe649d0ff1).
11. Božič B (urednik), Obreza A (urednik), Marc J (urednik), Lukač-Bajalo J (urednik). Merjenje imunosti - od molekule do bolnika; enodnevno podiplomsko izobraževanje iz laboratorijske biomedicine, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2007.
12. Aebersold R, Hood RE, Watts JD. Equipping scientists for the new biology. *Nature Biotechnology* 2000; 18:359.
13. Gotti C, Roux-Dalva F, Joly-Beuparlant C, Mangnier L, Leclercq M, Droit A. Extensive and Accurate Benchmarking of DIA Acquisition Methods and Software Tools Using a Complex Proteomic Standard. *J. Proteome Res* 2021; 20: 4801–4814. doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00490.
14. Geyer PE, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Molecular Systems Biology* 2017;13:942-956. doi:10.15252/msb.20156297.
15. Adhikari S, Nice EC, Deutsch EW, Lane L, Omenn GS, Pennington SR et al. A high-stringency blueprint of the human proteome. *Nat Commun* 2020;11(1):5310. doi:10.1038/s41467-020-19045-9.
16. Uredba (EU) 2017/746 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 5. aprila 2017 o in vitro diagnostičnih medicinskih pripomočkih ter razveljavitvi Direktive 98/79/ES in Sklepa Komisije 2010/227/EU, ogledano 25. maja 2022 na naslovu <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=CELEX%3A32017R0746>
17. Zander J, Bruegel M, Kleinhempel A, Becker S, Petros S, Kortz L et al. Effect of biobanking conditions on short-term stability of biomarkers in human serum and plasma. *Clin Chem Lab Med* 2014;52: 629-639. doi.org/10.1515/cclm-2013-0705.
18. Keshishian H, Burgess MW, Specht H, Wallace L, Clauser KR, Gillette MA, Carr SA. Quantitative, multiplexed workflow for deep analysis of human blood plasma and biomarker discovery by mass spectrometry. *Nat Protoc* 2017;12(8):1683-1701. doi: 10.1038/nprot.2017.054.
19. Gilquin B, Cubizolles M, Den Dulk R, Revol-Cavalier F, Alessio M, Goujon C-E et al. PepS: An innovative microfluidic device for bedside whole blood processing before plasma proteomics analyses. *Anal Chem* 2021;93(2): 683-690. doi: 10.1021/acs.analchem.0c02270.
20. Božič B, Čučnik S, Kveder T, Rozman B. Affinity and avidity of autoantibodies, In: Shoenfeld Y, Meroni PL, Gershwin ME (Eds). *Autoantibodies*. 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, 2014, doi.org/10.1016/B978-0-444-56378-1.00005-8.
21. Bittremieux W, Tabb DL, Impens F, Staes An, Timmerman E, Martens L, Laukens K. Quality control in mass spectrometry-based proteomics. *Mass Spec Rev* 2018;37: 697-711. doi:10.1002/mas.21544.
22. Uozie AC, Aebersold R. Advancing translational research and precision medicine with targeted proteomics. *Journal of Proteomics* 2018; 189: 1-10. doi: 10.1016/j.jpro.2018.02.021.
23. Bereman MS, Johnson R, Bollinger JG, Boss Y. Implementation of Statistical Process Control for Proteomic Experiments Via LC MS/MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2014; 25(4). doi:10.1007/s13361-013-0824-5.
24. Bell AW, Deutsch EW, CEA, A HUPO test sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics. *Nat Methods* 2009; 6:423-430. doi.org/10.1038/nmeth.1333.
25. Richert J. Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. *J Infectiology*. 2019; 2(4): 1-5. doi:10.29245/2689-9981/2019/4.1142.
26. Smith JG, Gerszten RE. Emerging affinity-based proteomic technologies for large scale plasma profiling in cardiovascular disease. *Circulation* 2017;135(17): 1651-1664. doi:10.1161/circulationaha.116.025s446.
27. Gerszten RE, Accurso F, Bernard GR, Caprioli RM, Klee EW, Klee GG et al. Challenges in translating plasma proteomics from bench to bedside: update from NHLBI Clinical proteomics programs. *Am Journal of Physiology* 2008;295:L16-22. doi:10.1152/ajplung.00044.2008.
28. Robbins JM, Peterson B, Schraner D, Tahir UA, Rienmüller T, Deng S et al. Human plasma proteomic profiles indicative of cardiorespiratory fitness. *Nat Metab*. 2021;3(6):786-797. doi: 10.1038/s42255-021-00400-z.
29. Alaaeddine R, fayad M, Nehme E, Bahmad FH, Kobeissy F. The emerging role of proteomics in precision medicine: applications in neurodegenerative diseases and neurotrauma. In: El-Khamisy (ed). *Personalised Medicine, Advances in experimental medicine and biology 1007*, ASPS 2017. doi:10.1007/978-3-3-319-60733-7\_4.
30. Cohn W, Melnik M, Huang C, Teter B, Chandra S, Zhu C et al. Multi-Omics Analysis of Microglial Extracellular Vesicles From Human Alzheimer's Disease Brain Tissue Reveals Disease-Associated Signatures. *Frontiers in Pharmacology* 2021;12: 766082 doi: 10.3389/fphar.2021.766082.
31. Huang Z, Ma L, Huang C, Li Q, Nice EC. Proteomic profiling of human plasma for cancer biomarker discovery. *Proteomics* 2017; 17(6): 1-13. doi 10.1002/pmic.201600240.
32. Nusinow DP, Szpyt J, Ghandi M, Rose CM, E. McDonald R III, Kalocsay M. Quantitative Proteomics of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Cell*. 2020; 180(2): 387–402.e16. doi:10.1016/j.cell.2019.12.023.
33. Božič B. Ali smo pripravljeni za vpogled v lastne gene? Moralne in etične dileme. V: Raspor, P (ur.). *[Znanost za mir in razvoj]: Znanje za varovanje zdravja*. Ljubljana: Mednarodni inštitut ECPD za trajnostni razvoj, prostorsko načrtovanje in okoljske študije, 2018. Str. 15-32. ISBN 978-961-288-868-8.
34. Boonen K, Hens K, Menschaert G, baggerman G, Valkenburg D, Ertaylan G. Beyond genes: Re-identifiability of proteomic data and its implication for personalized medicine. *Genes* 2019;10:682. doi:10.3390/genes10090682.
35. Regulation (EU) 2016/679 of the European Parliament and of the Council of 27 April 2016 on the protection of natural persons with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data, and repealing Directive 95/46/EC (General Data Protection Regulation) (Text with EEA relevance) Consolidated text. Ogledano 25. maja 2022 na naslovu: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02016R0679-20160504>.
36. Li-Pook-Than J, Snyder M. iPOP goes the world: integrated personalized omics profiling and the road towards improved health care. *Chem Biol* 2013;20/5: 660-666. doi:10.1016/j.chembiol.2013.05.001.
37. Dugourd A, Kuppe C, Sciacovelli M, Gjerga E, Gabor A, Emdal KB et al. Causal integration of multi-omics data with prior knowledge to generate mechanistic hypotheses. *Molecular systemic biology* 2021;17:e9730. doi 10.15252/msb.20209730.