

M. Karoliina Hirvonen, Niina Lietzén, Santosh D. Bhosale ja Riitta Lahesmaa

Kohti yksilöllistä hoitoa – proteomiikan näkymät diagnostiikassa

Sairaudet aiheuttavat muutoksia proteiinien ilmentymisessä, ja monet diagnostiset testit perustuvat proteiinien mittaamiseen näytteestä. Valtaosalla testeistä mitataan yksittäisiä proteiineja, vaikka sairauksien aiheuttamat muutokset elimistössä ovat usein moninaisia ja vaikuttavat useiden proteiinien ilmentymiseen. Proteomiikan hyödyntäminen diagnostiikassa mahdollistaisi lukuisien eri proteiinien, esimerkiksi tiettyyn signaalintireittiin kuuluvien proteiinien, samanaikaisen mittaamisen näytteestä. Kattavammat testit voisivat tarjota tarkemman diagnoosin sekä yksilöllistä tietoa esimerkiksi sairauden vaiheesta ja mahdollisista liitännäissairauksista. Proteomiikassa käytetään nykyään yleisimmin massaspektrometriaan perustuvia menetelmiä, jotka mahdollistavat tuhansien proteiinien samanaikaisen mittaamisen näytteestä. Menetelmiä on käytetty menestyksekkäästi erilaisissa biomarkeritutkimuksissa, ja ensimmäiset massaspektrometriaan perustuvat kliiniset proteomiikkatestit on otettu käyttöön. Proteomiikan menetelmät tarjoavat lukuisia ratkaisuja ja mahdollisuuksia käytännön lääketieteeseen.

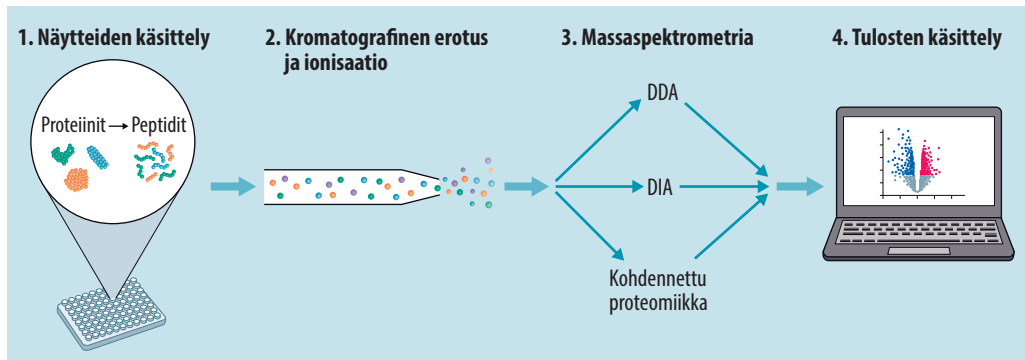
Sairaudet kehittyvät usein asteittain ja vaikuttavat samalla proteiinien ilmentymiseen. Merkittävä osa diagnostisista testeistä perustuu proteiinien mittaamiseen näytteestä (1). Sairauden aiheuttamat muutokset elimistössä vaihtelevat yksilöiden välillä, ja toisaalta samankaltaiset muutokset voivat liittyä moneen eri sairauteen. Siksi usean proteiinin mittaaminen näytteestä samanaikaisesti voi tuoda diagnostiikkaan merkittävää lisäarvoa parantamalla testien kattavuutta ja tarjoamalla tarkempaa tietoa esimerkiksi sairauden vaiheesta tai fenotyypistä (2).

Termiä proteomiikka on ensimmäisen kerran käytetty vuonna 1994, ja sillä tarkoitetaan proteiinien laajamittaista tutkimista (3). Proteomiikassa tavoitteena on tarkastella valitun kohteen, kuten elimistön, kudoksen tai solun kaikkia proteiineja eli sen proteomia tietyllä ajanhetkellä ja saada siten mahdollisimman kattava kuva kohteen tilasta (4). Tutkittavana voivat olla esimerkiksi proteiinien esiintyvyys ja määrä näytteessä, proteiinien muokkaus (esimerkiksi fosforylaatio) ja sijainti tai proteiinien väliset vuorovaikutukset. Proteomit ovat hyvin

dynaamisia ja vallitseviin olosuhteisiin mukautuvia. Tutkittavan kohteen proteomi heijastaa sen tilaa näytteenottohetkellä ja voi paljastaa esimerkiksi sairauden etenemisen kannalta tärkeitä piirteitä (5).

Proteomiikan menetelmät ovat kehittyneet merkittävästi viime vuosina. Pääosa proteomiikkatutkimuksista perustuu massaspektrometriin menetelmiin, joilla saadaan kerättyä huomattavan paljon kvantitatiivista tietoa monimutkaisista biologisista näytteistä (6). Massaspektrometria on lisäksi tehokas menetelmä muokattujen proteiinien ja proteiinikompleksien koostumuksen tutkimiseen (7). Proteiinien massaspektrometriaa käytetään myös kudosten kuvantamiseen ja yksittäisten solujen proteomien karakterisointiin (8,9).

Massaspektrometrian lisäksi useat muut proteomiikan tekniikat ovat kehittyneet viime vuosina. Näitä ovat esimerkiksi aptameereihin perustuvat tekniikat, joissa kohdemolekyylit tunnistetaan niihin sitoutuvien oligonukleotidien tai peptidien avulla, sekä vasta-ainepohjaiset menetelmät (10).



KUVA 1. Massaspektrometriaan perustuvan proteomiikan työvaiheet. Näytteet esikäsitellään halutulla tavalla: usein proteiinit pilkotaan entsyymaattisesti peptideiksi. Näytteestä voidaan myös esimerkiksi rikastaa tietyllä tavalla muokatut peptidit tai proteiinit. Tämän jälkeen näytteen proteiinit tai niistä pilkotut peptidit erotellaan kromatografisesti ja ionisoidaan. Massaspektrometrissa proteiinit ja peptidit analysoidaan ja saadun massaspektrin avulla niiden määrät ja ominaisuudet määritetään. Lopuksi tulokset analysoidaan laskennallisien menetelmin. DDA = data-dependent acquisition, DIA = data-independent acquisition

Massaspektrometriset menetelmät

Massaspektrometriaan perustuvan proteomiikan työvaiheet voidaan karkeasti jakaa neljään: näytteiden esikäsitelyyn, kromatografiseen erotukseen, massaspektrometriseen analyysiin ja tulosten käsittelyyn (**KUVA 1**). Menetelmillä mitataan joko kokonaisia proteiineja (top-down-proteomiikka) tai proteiineista pilkottuja peptideja (bottom-up-proteomiikka).

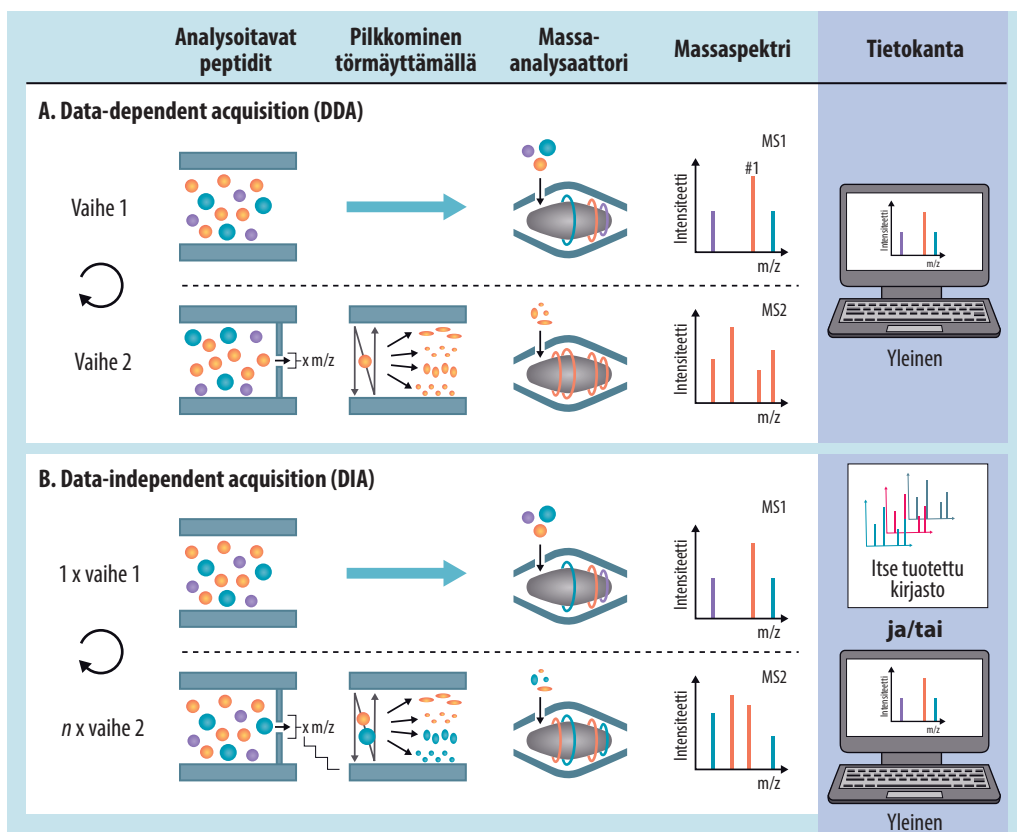
Top-down-proteomiikalla saadaan tietoa näytteen proteiinien eri ilmentymismuodoista (proteoformit), kuten isoformeista, proteiinien modifikaatioista eli muokkauksesta ja niiden yhdistelmistä sekä mahdollisista mutaatioista. Nämä ominaisuudet voivat vaikuttaa olennaisesti proteiinin toimintaan elimistössä. Ihmisen noin 20 000 proteiinia koodaavan geenin arvioidaan ilmentyvän yli 100 000 eri proteoformina. Top-down-proteomiikan laajempi yleistyminen edellyttää teknisten ongelmakohtien, kuten hyvin erikokoisten ja -tyyppisten proteiinien erotelun ja mittaamisen, ratkaisemista (11).

Bottom-up-proteomiikassa proteiinit pilkotaan esimerkiksi trypsiinillä entsyymaattisesti peptideiksi ennen analyysiä. Kromatografisesti erotellut peptidit ohjataan massaspektrometriin, jossa peptidi-ionien massavaraussuhde määritetään. Osa peptideista ohjataan myös pilkottavaksi, jolloin saadaan tietoa peptidien aminohapposekvensseistä ja mahdollisista muokkauksista.

Koska proteiineja ei mitata kokonaisina vaan peptideiksi pilkottuina, bottom-up-proteomiikan avulla on mahdotonta määrittää, mitkä peptidit ovat peräisin samasta proteiinimolekyylistä ja siten esimerkiksi, mitkä muokkauksista esiintyvät samassa proteiinimolekyylistä ja mitkä ovat peräisin eri proteoformeista. Lyhyet peptidit ovat fysikaalis-kemiallisilta ominaisuuksiltaan lähempänä toisiaan, ja peptiditason analyysit ovatkin teknisesti sekä tulosten prosessoinnin osalta helpompia kuin top-down-proteomiikan analyysit. Bottom-up-proteomiikan menetelmät ovatkin toistaiseksi käytetympiä kuin top-down-proteomiikan menetelmät (7).

Uusista mekanismeista tunnetun varmistamisen. Kun tiettyä proteomia tutkitaan ilman hypoteesia ja tavoitteena on tunnistaa mahdollisimman paljon eri proteiineja, proteiinien tunnistukseen käytetään yleisesti joko data-dependent acquisition (DDA)- tai data-independent acquisition (DIA) -menetelmää (**KUVA 2**). Kun taas tiedetään etukäteen, mitkä proteiinit näytteestä halutaan mitata, käytetään kohdennettua proteomiikkaa.

DDA-menetelmissä massaspektrometrilla havaitut ja sillä hetkellä vahvimman signaalin antavat peptidit valitaan pilkottaviksi yksi kerrallaan (7). Vaikka modernit massaspektrometrit ovat erittäin herkkiä ja nopeita ja DDA-menetelmissä on pystytty tunnistamaan yli 10 000 proteiinia ihmisen solunäytteestä, kaikki näytteestä löytyvät peptidit eivät valikoidu pilkotta-



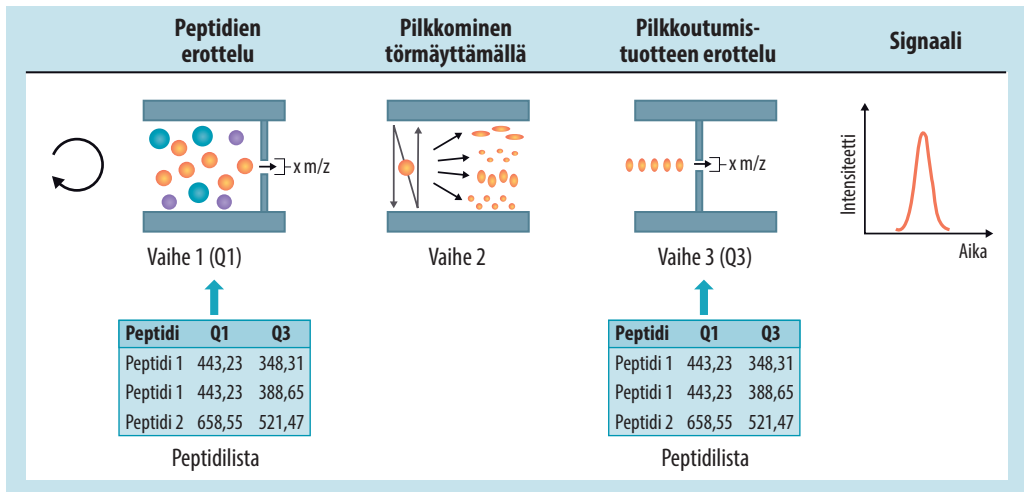
KUVA 2. Proteomiikkaprofiloinnin menetelmät. **A.** Vaiheessa 1 DDA-menetelmällä mitattavaksi valikoituvat ensin kaikki tietyllä hetkellä massaspektrometriin tulevat peptidit. Massa-analysaattorissa peptidien massavarausuhde (m/z) määritetään ja yhdessä havaittujen mittausten perusteella muodostetaan massaspekttri (MS1). Vahvimman signaalin antavat peptidit valikoituvat vaiheeseen 2, jossa ne erotellaan muista peptideista massavarausuhden perusteella ja ohjataan pilkottaviksi törmäyttämällä. Peptidien pilkotut versiot ohjataan massa-analysaattorille analysoitavaksi (MS2). Analysin jälkeen peptidit tunnistetaan tietokantahakujen avulla. **B.** DIA-menetelmällä vaiheessa 1 tuotetaan DDA-menetelmän tapaan ensin MS1-spektri kaikista analyysivuorossa olevista peptideista, ja sen jälkeen siirrytään vaiheeseen 2, jossa tuotetaan sarja MS2-spektrejä. Vaiheessa 2 analysoitavaksi valikoituvat kerrallaan kaikki tietyllä m/z -alueella olevat peptidit. Samankokoisia, hieman limittäisiä m/z -ikkunoita käyttämällä käydään porrastetusti läpi koko m/z -alue niin, että se kattaa kaikki mitattavissa olevat peptidit. Analysoitavaksi valikoituneet peptidit pilkootaan törmäyttämällä ja ohjataan massa-analysaattorille. Lopuksi niistä tuotetaan MS2-spektri. Peptidien tunnistukseen käytetään itse tuotettua spektrikirjastoa, tietokantahakua tai näiden yhdistelmää, johon saatuja MS1- ja MS2-spektrejä verrataan.

viksi (12). Tämä lisää vaativuutta erityisesti niiden näytteiden osalta, joissa eri proteiinien väliset pitoisuuserot ovat suuret, kuten plasmassa. Jotta pieninä pitoisuuksina esiintyvät proteiinit valikoituisivat pilkottaviksi, näytteestä voidaan poistaa siinä runsaasti esiintyviä proteiineja (depleetio) tai rikastaa pieninä pitoisuuksina esiintyviä proteiineja (2).

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää DIA-menetelmää, jossa kaikki massaspektrometrin havaitsemat peptidit pilkootaan pieni massa-alue kerrallaan, jolloin kattavuus lisääntyy ja puut-

tuvien mittausten määrä datassa vähenee (7). Pilkottavaksi päätyy kuitenkin samanaikaisesti useita eri peptideja, ja mitattu massaspekttri on yhdistelmä kaikista näistä peptideista keräytyistä signaaleista. Peptidien luotettava tunnistaminen on yksi DIA-menetelmien suurimmista haasteista siitä huolimatta, että massaspektrometrioiden tarkkuus ja spektrien tulkinnessa käytettävät algoritmit ovat kehittyneet viime vuosina (13).

Kohdennetussa proteomiikassa ennalta valitut peptidit erotellaan tarkasti muista pep-



KUVA 3. Kohdennetun proteomiikan periaate. Kohdennetussa proteomiikassa analysoitavaksi otetaan ennalta määritellyt peptidit, joiden massavaraussuhde ja pilkkoutumistapa tunnetaan. Ensimmäisessä vaiheessa (vaihe 1) vuorossa oleva kohdepeptidi erotellaan muista peptideistä tunnetun massavaraussuhteen perusteella. Seuraavassa vaiheessa (vaihe 2) eroteltu peptidi pilkkotaan törmäyttämällä. Kolmannessa vaiheessa (vaihe 3) ennalta määritely pilkkoutumistuote erotellaan ilmaisimelle, joka toimii mittauslaitteena. Lopputuloksena saadaan signaali, joka ilmaisee pilkkoutumistuotteen intensiteetin ajan suhteen.

tideistä, pilkkotaan ja mitataan massaspektrometrillä (KUVA 3) (7). Menetelmät ovat usein herkempiä kuin DDA- ja DIA-menetelmät, ja proteiinien kvantitointi näytteestä on tarkempaa ja toistettavampaa. Siksi menetelmiä hyödynnetään esimerkiksi profiloitimenetelmillä saatujen tulosten varmistuksessa (14). Kohdennetun proteomiikan menetelmillä mitataan kerrallaan enimmillään kymmenistä noin sataan eri proteiinia. Menetelmät soveltuvat hyvin myös vaativien näytteiden kuten plasman analysointiin. Lisäksi menetelmät mahdollistavat proteiinien absoluuttisen kvantitoinnin näytteistä (15).

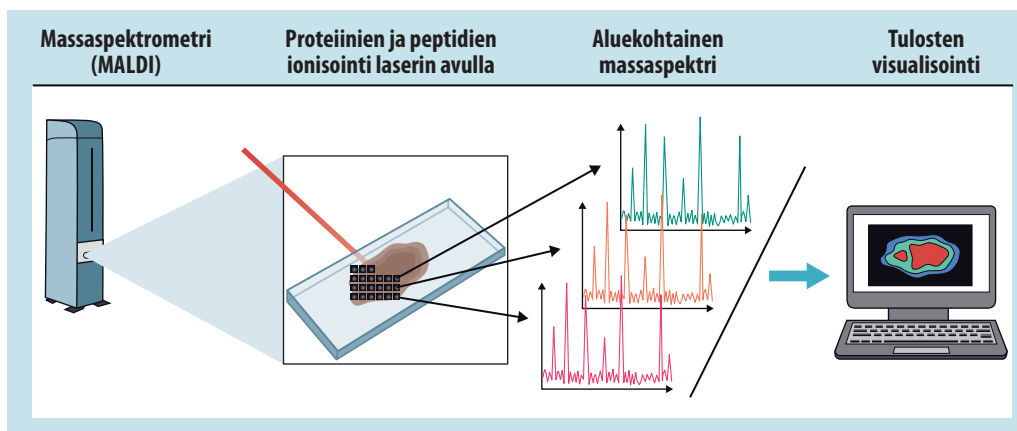
Massaspektrometrillä kuvantamistekniikoilla voidaan tunnistaa, paikantaa ja kvantitoida kudosleikkeestä satoja proteiineja ja peptidejä. Molekyylit ionisoidaan kudoksesta kaasufaasiin usein laserin avulla (esimerkiksi MALDI eli matriisiavusteinen laserdesorptio-ionisaatio) ja mitataan massaspektrometrillä (KUVA 4). Kvantaminen voidaan tehdä ilman leimausta, jolloin mitattavia proteiineja ei tarvitse ennalta määrittää (16). Toisaalta voidaan hyödyntää vasta-ainepohjaisia menetelmiä, kuten imaging mass cytometry (IMC) tai multiplexed ion beam imaging (MIBI), jolloin ku-

dosnäyte käsitellään metallileimatuilla vasta-aineilla ennen analyysiiä.

Mittaukset perustuvat proteiinien sijaan vasta-aineisiin liitettyjen metallileimojen havaitsemiseen massaspektrometrillä. Eri metallileimoja hyödyntämällä voidaan tarkastella samanaikaisesti muutamia kymmeniä eri proteiineja. Vasta-ainepohjaisia kuvantamismenetelmiä on käytetty esimerkiksi eri immuunisolupopulaatioiden tutkimiseen kudoksenäytteissä. Vaikka ilman leimausta tehtävällä kuvantamisella katetaan suurempi joukko proteiineja, metallileimojen massaspektrometrinen analyysi on huomattavasti kokonaisten proteiinien analyysiiä helpompaa. Leimausta hyödyntävillä menetelmillä voidaankin parantaa proteiinien havaitsemista sekä lisätä kuvantamisen herkkyyttä (17).

Vasta-ainepohjaiset menetelmät

Vasta-ainepohjaisia menetelmiä on vuosikymmeniä käytetty proteiinien mittaamiseen biologisista näytteistä. Tavanomaisten, enimmäkseen yhden proteiinin mittaamiseen kehitettyjen ELISA-menetelmien rinnalle on noussut lukuisia teknologioita, kuten Luminex- ja



KUVA 4. Matriisiavusteisen laserdesorptioionisaatio (MALDI) -kuvantamisen periaate. Matriisilla (absorboi laserin energiaa ja mahdollistaa proteiinien ja peptidien ionisoitumisen näytteestä) päällystetty kudoksenäyte asetetaan masspektrometriin, jossa kudoksen pintaan kohdistetaan laser pieni alue kerrallaan (esimerkiksi 1 µm). Laserin ja matriisin yhteisvaikutuksesta kudoksessa olevat proteiinit tai peptidit vapautuvat ja ionisoituvat. Jokaisen alueen ionisoituneet proteiinit tai peptidit analysoidaan, ja niistä tuotetaan oma masspektrometri. Näin jatketaan, kunnes koko kudoksenäyte on mitattu. Kerätty data visualisoidaan tulostenkäsittelyohjelmien. Saaduista kuvista voidaan paikantaa haluttuja proteiineja ja peptidejä sekä tarkastella niiden suhteellisia määriä.

Quanterix-tekniikat, joilla on mahdollista saavuttaa erittäin hyvä herkkyys sekä mitata näytteistä muutamia tai jopa useita kymmeniä proteiineja samanaikaisesti.

Yksi mielenkiintoisimmista vasta-ainepohjaisista proteomiikan teknologioista on Olink Proteomics. Menetelmä hyödyntää proximity extension assay (PEA) -teknologiaa, jossa kohdeproteiini tunnistetaan kahden eri vasta-aineen avulla (18). Olink-proteomiikkasovellukset kattavat useita tutkimuskäyttöön soveltuvia laajoja biomarkeripaneeleja, jotka on kohdennettu eri tautiryhmiin, kuten syöpään ja neurologisiin sairauksiin. Olink Proteomics -tuotteita on hyödynnetty myös COVID-19-tutkimuksissa (19).

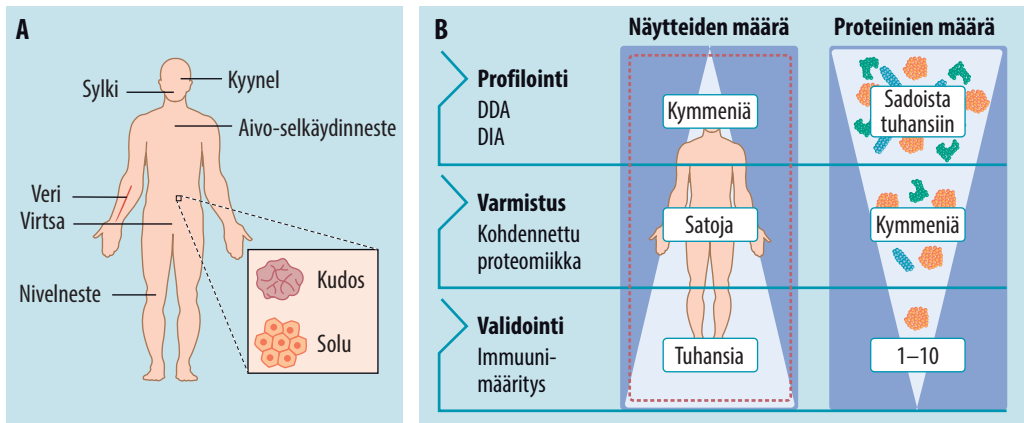
Proteomiikan käyttö diagnostiikassa

Useita eri proteiineja mittaavien diagnostisten testien tulo markkinoille on ollut hidasta (20). Useimmat käytössä olevat testit perustuvat kliinisen kemian menetelmiin tai vasta-ainepohjaisiin määrittelyihin, jotka mittaavat yksittäisiä proteiineja (1). Koska sairauden aiheuttamat muutokset elimistössä rajoittuvat harvoin yhteen proteiiniin, on perusteltua tarkastella laajempia proteiiniverkostoja, kuten solujen sig-

nalointireittejä. Yhdistämällä tietoa useiden eri proteiinien ilmentymisestä voidaan parantaa diagnostisten testien tarkkuutta ja herkkyyttä, saada tietoa taudin alatyypeistä ja mahdollisista liitännäissairauksista sekä tukea näin paremmin kliinistä päätöksentekoa.

Markkinoilla on muutamia usean proteiinin mittaamiseen perustuvia vasta-ainepohjaisia testejä, kuten VectraDA ja OVA1 (21,22). VectraDA arvioi nivelreuman aktiivisuutta mittaamalla seeruminäytteistä kahtatoista proteiinia. Munasarjasyövän riskiä mittaavassa OVA1-testissä hyödynnetään tunnetun syöpämerkkiaineen CA12-5:n lisäksi neljän muun proteiinin määrää seeruminäytteissä. Näin voidaan luokitella potilaat pienen tai suuren riskin ryhmään. Testi on Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkeviraston (FDA) hyväksymä. Vaikka testissä mitataan useita proteiineja, jokaisen proteiinin mittaamiseen käytetään erillistä vasta-ainemäärittystä.

Usean proteiinin samanaikaiseen mittaamiseen perustuvien vasta-ainepohjaisten testien diagnostista käyttöä ovat hidastaneet niiden toteutukseen liittyvät haasteet, kuten sopivien vasta-aineiden saatavuus, ristireaktiivisuus sekä niin sanottu hook-vaikutus, joka johtaa vääriin negatiiviseen tulokseen, kun mitattavan molekyylin pitoisuus on liian suuri (23,24). Vasta-



KUVA 5. Proteomiikan käyttö uusien biomarkkereiden löytämiseksi. **A.** Massaspektrometriaan perustuvassa proteomiikassa näytemateriaalina voidaan käyttää erilaisia kudoksia, soluja, nesteitä ja eritteitä tai niistä eristettyjä fraktioita. **B.** Plasman biomarkeritutkimuksissa sovelletaan kolmiportaista tutkimusmallia. Ensimmäisessä vaiheessa biomarkerikandidaatteja kartoitetaan ilman hypoteesia, tavoitteena on mitata mahdollisimman paljon ja kattavasti eri proteiineja. Tässä vaiheessa näytteiden määrät ovat maltillisia, yleensä kymmeniä, mutta niistä mitataan satoja tai jopa tuhansia proteiineja. Seuraavaan varmistusvaiheeseen valitaan tulosten perusteella lupaavimmat biomarkerikandidaatit. Kohdennetun proteomiikan käyttö mahdollistaa näytteiden määrän suurentamisen kymmenistä satoihin mutta rajoittaa analyysiin otettavien proteiinien määrää. Varmistetuiksi tulleet proteiinit valikoituvat viimeiseen validointivaiheeseen. Validoinnissa käytetään yleisesti vasta-aineisiin perustuvia immuunimäärityksiä, jolloin näytteiden määrä voidaan laajentaa tuhansiin. Massaspektrometriassa käytettävien laitteiden ja menetelmien jatkuva kehitys sekä automatisoitu näytteenkäsittely mahdollistavat tulevaisuudessa jo profilointivaiheessa näytteiden määrän suurentamisen satoihin ja jopa tuhansiin (oranssi katkoviiva). DDA = data-dependent acquisition, DIA = data-independent acquisition.

ainepohjaisten menetelmien haasteet ovatkin vauhdittaneet massaspektrometrinen menetelmien kehittämistä ja hyödyntämistä.

Massaspektrometrinen menetelmä voidaan yhden analyysin aikana mitata lukuisia eri proteiineja samasta näytteestä, ja mittauksen aikana kerätty yksityiskohtainen tieto mitattavista yhdisteistä lisää varmuutta signaalin tarkkuudesta (7,24). Massaspektrometriaan perustuvia kliinisiä proteiinitestejä on jo markkinoilla. Esimerkiksi PromarkerD on tyypin 2 diabetekseen liittyvän munuaissairauden riskiä arvioiva testi, joka mittaa kolmen proteiinin pitoisuutta plasmassa (25). Lisäksi testialgoritmi huomioi kolme kliinistä tekijää ja luokittelee potilaan pienen, keskisuuren tai suuren riskin ryhmään.

Tuotteesta on markkinoilla kohdennettuun proteomiikkaan perustuva testi sekä immuunimäärityksiin perustuvia testejä. PreTRM ja Nodify XL2 ovat verinäytettä analysoivia kohdennettuun proteomiikkaan perustuvia testejä (26,27). PreTRM-testillä arvioidaan raskauden keskivaiheilla oireettomien naisten ennenaikai-

sen synnytyksen riskiä laskemalla kahden proteiinin seerumipitoisuuden suhde.

Nodify XL2 -testi arvioi keuhkojen radiologisissa tutkimuksissa havaittujen muutosten syöpäriskiä. Testi mittaa kahden proteiinin määrää plasmassa ja yhdessä viiden kliinisen riskitekijän kanssa arvioi muutoksen hyvälaatuisuutta. Massaspektrometriaa on hyödynnetty menestyksekkäästi myös infektiodiagnostiikassa taudinaiheuttajabakteerien ja -sienten tunnistuksessa (28).

Vaikka ensimmäiset massaspektrometriaan perustuvat proteomiikkatestit ovat kliinisessä käytössä, tekniikan yleistymisen laajempaan käyttöön on vielä maltillista. Massaspektrometrit ovat hintavia, ja niiden käyttö vaatii koulutettua henkilökuntaa sekä erikoislaboratoriota laitteiden käyttöön vaadittavine perusedellytyksineen. Lisähaasteita massaspektrometriaan perustuviin proteomiikkamittauksiin tuovat esikäsittelyn monivaiheisuus ja hitaus sekä josain tapauksissa tuloksen tulkinta.

Massaspektrometrian todelliset hyödyt diag-

nostiiikassa nousevat esiin, kun tarkastellaan laajoja kokonaisuuksia, kuten kokonaisia signaalointireittejä, tarkemman diagnoosin saamiseksi. Myös säännölliset profiloointianalyysit, esimerkiksi plasmanäytteestä, mahdollistaisivat tiettyyn riskiryhmään kuuluvien yksilöiden tai hoidon tehon seurannan.

Biomarkkeritutkimukset

Lääketieteellisessä tutkimuksessa proteomiikkaa hyödynnetään laajasti biomarkkereiden etsimisessä. Biomarkkerilla tarkoitetaan tarkasti ja toistettavasti mitattua ominaisuutta, joka osoittaa biologisen systeemin normaalityytilää, patogeenistä tilaa tai joka ilmenee jonkin altistuksen, hoidon tai toimenpiteen vaikutuksesta (29). Diagnostisten biomarkkereiden lisäksi tavoitteena voi olla sairauden puhkeamista ennustavien, sen etenemistä seuraavien tai lääkkeiden ja hoitotoimenpiteiden vaikutusta mittaavien biomarkkereiden tunnistaminen.

Yksilöllisten hoitotoimenpiteiden suunnitelmiseksi tarvitaan biomarkkereita, jotka luokittelevat potilaat alaryhmiin. Lisääntyvä tieto tautien syntymekanismeista ja niitä mittaavista biomarkkereista auttaa löytämään tietystä hoidosta hyötyvät potilasryhmät. Biomarkkereita mitataan elimistön kudoksista, soluista ja nesteistä tai niistä eristetyistä osista, esimerkiksi solunulkoisista vesikkeleistä (KUVA 5 A). Seerumi- ja plasmanäytteitä hyödynnetään usein biomarkkerianalytiikassa, sillä verinäyte on helposti kerättävissä ja sen ajatellaan heijastavan hyvin yksilön yleistilaa (30).

Vuonna 2002 käynnistyi kansainvälisessä yhteistyössä toteutettu Human Plasma Proteome -projekti, jonka tavoitteena on kartoittaa kattavasti terveiden ja sairaiden ihmisten plasman proteomeja sekä edistää näin plasmaproteomiikan hyödyntämistä lääketieteen ja terveystieteiden tutkimuksessa (31). Ikä, sukupuoli ja elimistön rasvamäärä vaikuttavat lukuisien plasman proteiinien pitoisuuksiin (32). Yksilön plasman proteomi pysyy pitkälläkin aikavälillä melko samankaltaisena, kun taas yksilöiden väliset erot ovat huomattavasti suurempia (33). Poikkeuksena ovat esimerkiksi lapset, joilla

Ydinasiat

- ▶ Proteomiikalla tarkoitetaan proteiinien laajamittaista tutkimista, jossa näyttees-tä mitataan kattavasti ja samanaikaisesti lukuisia proteiineja.
- ▶ Massaspektrometriaa hyödynnetään laajasti moderneissa proteomiikkatutkimuksissa, mutta muutkin proteomiikkamenetelmät ovat viime vuosina kehittyneet huomattavasti.
- ▶ Useita eri proteiineja tarkastelemalla voidaan parantaa diagnostisten testien kattavuutta ja saada tarkempaa tietoa esimerkiksi taudin vaiheesta tai fenotypistä.
- ▶ Proteomiikkaan perustuvia kliinisiä testejä on käytössä jonkin verran, ja ne perustuvat muutamien proteiinien samanaikaiseen mittaamiseen.
- ▶ Proteomiikan hyödyt korostuvat tarkasteltaessa laajoja yhteyksiä tarkemman diagnoosin saamiseksi, seurattaessa riskiryhmään kuuluvia yksilöitä tai tarkasteltaessa hoidon tehoa.

huomattavia ikään liittyviä muutoksia havaitaan useiden proteiinien osalta (34).

Koska erot yksilöiden välillä ovat suuria, sairauden kehittymiseen tai hoitovasteeseen liittyviä muutoksia on usein helpompaa havaita pitkittäistutkimuksissa (30). Näin voidaan pyrkiä paljastamaan aikaisia merkkejä sairaudesta, mikä mahdollistaa sairauden puhkeamisajankohdan ennustamisen ja hoidon aloittamisen varhain. Proteomiikan menetelmin on tunnistettu esimerkiksi tyyppin 1 diabetesta ennustavia biomarkkerikandidaatteja analysoimalla lasten seurantanäytteitä suomalaisesta DIPP (Type 1 Diabetes Prediction and Prevention) -tutkimuksesta (35).

Massaspektrometrian avulla biomarkkereiden etsiminen näytteistä voidaan aloittaa ilman hypoteesia. Esimerkiksi plasman proteomiikkatutkimukset aloitetaan usein muuttaman kymmenen yksilön näytteiden kattaval-

la profiloinnilla. Laskennallisin menetelmin valitut biomarkkeriehdokkaat varmennetaan käyttämällä kohdennettua proteomiikkaa uudessa tutkimusjoukossa, jossa yksilöiden määrä suurennetaan satoihin. Lopullisessa validoinnissa hyödynnetään vasta-aineisiin perustuvia immuunimäärityksiä, jolloin testattavien määrä voidaan laajentaa tuhansiin (**KUVA 5 B**).

Massaspektrometriassa käytettävien laitteiden ja menetelmien kehittyminen sekä tehostunut näytteenkäsittely mahdollistavat tulevaisuudessa alkuperäisen tutkimusjoukon suurentamisen satoihin ja jopa tuhansiin yksilöihin. Tutkimusmenetelmien standardoiminen mahdollistaisi tulosten vertaamisen rinnakkaisten tutkimusryhmien välillä. Analyysien tilastollista voimaa lisäämällä voitaisiinkin löytää proteiineja tai proteiiniprofileja, joita ei aikaisemmin ole havaittu (30).

Lopuksi

Proteomiikkaa hyödynnetään laajasti tutkimuksessa. Silti erityisesti massaspektrometriaan perustuvia tutkimusmenetelmiä on niukasti kliinisessä käytössä, mikä on johtunut tekniikan rajoituksista sekä käytännön haasteista. Viimeaikaiset harppaukset erityisesti resoluution, käytettävyyden, toistettavuuden, nopeuden ja automatisoidun näytteenkäsittelyn osalta sekä analyysien yhdenmukaistaminen mahdollistavat tekniikan hyödyntämisen yhä enemmän myös kliinisessä käytössä (7,30). Yhdessä muiden omiikoiden kuten genomiikan ja metabolomiikan sekä kliinisen informaation kanssa proteomiikasta tulee merkittävä tekijä esimerkiksi yksilöllisten hoitojen kohdentamisessa ja hoitovasteen seuraamisessa (36). ■

Artikkelin kuvat on osin tehty BioRender.com-ohjelmalla.

M. KAROLIINA HIRVONEN, FM, tohtorikoulutettava
NIINA LIETZÉN, FT, tutkijatohtori

RIITTA LAHESMAA, LT, professori, johtaja
Twitter: @LahesmaaGroup
Turun Biotiedekeskus
Turun yliopisto ja Åbo Akademi

SANTOSH D. BHOSALE, FT, tutkijatohtori
Department of Biochemistry and Molecular Biology,
University of Southern Denmark, Odense, Tanska

VASTUUTOIMITTAJA
Tuomas Mirtti

SIDONNAISUUDET
M. Karoliina Hirvonen: Apuraha (Orionin Tutkimussäätiö)
Niina Lietzén: Ei sidonnaisuuksia
Santosh D. Bhosale: Ei sidonnaisuuksia
Riitta Lahesmaa: Luentopalkkio/asiantuntijapalkkio (Novartis)

KIRJALLISUUTTA

- Anderson NL. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum. *Clin Chem* 2010;56:177–85.
- Boschetti E, D'Amato A, Candiano G, ym. Protein biomarkers for early detection of diseases: the decisive contribution of combinatorial peptide ligand libraries. *J Proteomics* 2018;188:1–14.
- Wilkins MR, Appel RD, Williams KL, ym toim. *Proteome research: concepts, technology and application*. Berlin Heidelberg: Springer 2007.
- Cox J, Mann M. Is proteomics the new genomics? *Cell* 2007;130:395–8.
- Graves PR, Haystead TAJ. *Molecular biologist's guide to proteomics*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66:39–63.
- Cravatt BF, Simon GM, Yates JR. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature* 2007;450:991–1000.
- Aebbersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 2016;537:347–55.
- Porta Siegel T, Hamm G, Bunch J, ym. Mass spectrometry imaging and integration with other imaging modalities for greater molecular understanding of biological tissues. *Mol Imaging Biol* 2018;20:888–901.
- Slavov N. Unpicking the proteome in single cells. *Science* 2020;367:512–3.
- Gold L, Ayers D, Bertino J, ym. Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One*, julkaistu verkossa 7.12.2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0015004
- Chen B, Brown KA, Lin Z, ym. Top-down proteomics: ready for prime time? *Anal Chem* 2018;90:110–27.
- Beck M, Schmidt A, Malmstroem J, ym. The quantitative proteome of a human cell line. *Mol Syst Biol* 2011;7:549.
- Ludwig C, Gillet L, Rosenberger G, ym. Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol*, julkaistu verkossa 13.8.2018. DOI: 10.15252/msb.20178126.
- Cifani P, Kentsis A. Towards comprehensive and quantitative proteomics for diagnosis and therapy of human disease. *Proteomics*, julkaistu verkossa 21.12.2016. DOI: 10.1002/pmic.201600079.
- Ludwig C, Claassen M, Schmidt A, ym. Estimation of absolute protein quantities of unlabeled samples by selected reaction monitoring mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, julkaistu verkossa 20.11.2011. DOI: 10.1074/mcp.M111.013987.
- Chughtai K, Heeren RMA. Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis. *Chem Rev* 2010;110:3237–77.
- Baharlou H, Canete NP, Cunningham AL, ym. Mass cytometry imaging for the study of human diseases-applications and data analysis strategies. *Front Immunol* 2019;10:2657.
- Lundberg M, Eriksson A, Tran B, ym. Homogeneous antibody-based proximity extension assays provide sensitive and specific detection of low-abundant proteins in human blood. *Nucleic Acids Res*, julkaistu verkossa 6.6.2011. DOI:10.1093/nar/gkr424.
- Consiglio CR, Cotugno N, Sardh F, ym. The immunology of multisystem inflammatory syndrome in children with COVID-19. *Cell*, julkaistu verkossa 6.9.2020. DOI:10.101/2020.07.08.20148353.
- Anderson NL, Ptolemy AS, Rifai N. The rid-

- dle of protein diagnostics: future bleak or bright? *Clin Chem* 2013;59:194–7.
21. Segurado OG, Sasso EH, Vectra DA for the objective measurement of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2014;32:29–34.
 22. Bristow RE, Smith A, Zhang Z, ym. Ovarian malignancy risk stratification of the adnexal mass using a multivariate index assay. *Gynecol Oncol* 2013;128:252–9.
 23. Hoofnagle AN, Wener MH. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *J Immunol Methods* 2009;347:3–11.
 24. Kearney P, Boniface JJ, Price ND, ym. The building blocks of successful translation of proteomics to the clinic. *Curr Opin Biotechnol* 2018;51:123–9.
 25. Peters KE, Davis WA, Ito J, ym. Validation of a protein biomarker test for predicting renal decline in type 2 diabetes: the Fremantle diabetes study phase II. *J Diabetes Complicat* 2019;33:107406.
 26. Saade GR, Boggess KA, Sullivan SA, ym. Development and validation of a spontaneous preterm delivery predictor in asymptomatic women. *Am J Obstet Gynecol*, julkaistu verkossa 11.2.2016. DOI: 10.1016/j.ajog.2016.02.001.
 27. Silvestri GA, Tanner NT, Kearney P, ym. Assessment of Plasma proteomics biomarker's ability to distinguish benign from malignant lung nodules. *Chest* 2018;154:491–500.
 28. Harju I, Grönroos JO. MALDI-TOF-massaspektrometria kliinisessä mikrobiologiassa. *Duodecim* 2020;136:1660–7.
 29. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) resource. FDA-NIH Biomarker Working Group. Bethesda (MD): National Institutes of Health 2016.
 30. Geyer PE, Holdt LM, Teupser D, ym. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Mol Syst Biol* 2017;13:942.
 31. Schwenk JM, Omenn GS, Sun Z, ym. The human plasma proteome draft of 2017: building on the human plasma peptideatlas from mass spectrometry and complementary assays. *J Proteome Res* 2017;16:4299–310.
 32. Curran AM, Fogarty Draper C, Scott-Boyer M, ym. Sexual dimorphism, age, and fat mass are key phenotypic drivers of proteomic signatures. *J Proteome Res* 2017;16:4122–33.
 33. Liu Y, Buil A, Collins BC, ym. Quantitative variability of 342 plasma proteins in a human twin population. *Mol Syst Biol* 2015;11:786.
 34. Lietzén N, Cheng L, Moulder R, ym. Characterization and non-parametric modeling of the developing serum proteome during infancy and early childhood. *Sci Rep* 2018;8:5883.
 35. Moulder R, Bhosale SD, Erkkilä T, ym. Serum proteomes distinguish children developing type 1 diabetes in a cohort with HLA-conferred susceptibility. *Diabetes* 2015;64:2265–78.
 36. Doll S, Gnad F, Mann M. The case for proteomics and phospho-proteomics in personalized cancer medicine. *Proteomics Clin Appl* 2019. DOI: 10.1002/prca.201800113.