

OncoProteomics: ontdekken en valideren van nieuwe eiwitbiomarkers en drug targets in kanker

C.R. Jimenez

INLEIDING

Door grootschalig de precieze eiwitsamenstelling van cellen en weefsels te analyseren (een discipline aangeduid met de term proteomics), kunnen we veranderingen in ziektes zoals kanker beter gaan begrijpen. Eiwitten zijn de functioneel belangrijkste bouwstenen van de cel en veranderingen in hun functioneren liggen ten grondslag aan velerlei ziektes. Daarom probeert men tegenwoordig aan de hand van die veranderde eiwitten (biomarkers) ziekteprocessen op te sporen en (hun behandeling) te volgen.

In 2000 is, omgeven met veel publiciteit, het kraken van de DNA-code van het menselijk genoom (ons erfelijk materiaal) gerapporteerd. De huidige schatting is dat menselijk DNA ongeveer 20.000-25.000 genen bevat, waarvan de informatie via twee vertaalslagen omgezet wordt in eiwitten, de functioneel belangrijkste bouwstenen van cellen. Analyse op eiwitniveau is complexer dan DNA-analyse omdat er, ofwel tijdens bovengenoemde vertaalslagen ofwel daarna, nog allerlei veranderingen kunnen optreden in de precieze opbouw en/of samenstelling van de eiwitten. Hierdoor is de uiteindelijke vorm van een eiwit niet goed te voorspellen aan de hand van de DNA-code, en overstijgt het aantal verschillende eiwitten die kunnen worden aange troffen in cellen en weefsels vele malen het aantal genen in het genoom. Verder is het proteoom dyna-

misch: niet alleen kunnen er afhankelijk van het celtype en de omstandigheden in de cel bepaalde genen in meerdere of mindere mate tot expressie komen ('aan' staan), leidend tot de vorming van meer of minder eiwit, er kunnen ook allerlei chemische groepen aan eiwitten gekoppeld worden, die de interacties en functie beïnvloeden.

Het centrale gereedschap dat we gebruiken bij het grootschalig karakteriseren van de eiwitsamenstelling van biologische materialen is de massaspectrometer, een soort moleculaire weegschaal waarmee heel nauwkeurig massa's gemeten kunnen worden. Na data-analyse met specifieke software kan dan de structuur en de hoeveelheid van alle verschillende eiwitten worden bepaald. Met de nieuwste massaspectrometers kan al een proteoomanalyse uitgevoerd worden met zeer kleine hoeveelheden eiwit (minder dan een microgram, uit 500 cellen).¹

Kankercellen scheiden eiwitten uit die niet of in mindere mate worden afgegeven door gewone cellen, en die uiteindelijk terecht kunnen komen in de bloedbaan, resulterend in een veranderde bloedsamenstelling. Omdat bloed relatief gemakkelijk te verkrijgen is, en routinematig en veelvuldig kan worden afgenomen, is het de meest geschikte lichaamsvloeistof voor (poli)klinische bepaling van biomarkers.

Vanwege de complexiteit van de interacties tussen kankercellen en hun micro-omgeving en de veranderingen daarin tijdens verschillende stadia van ontwikkeling van de ziekte, wordt het steeds duidelijker dat het meten van een enkele parameter niet voldoende informatie kan geven. Binnen de kankerdiagnostiek vindt derhalve momenteel een verschuiving plaats naar het gebruik van panels van biomarkers. Massaspectrometrische metingen, waarmee de identiteit en hoeveelheid van honderden tot duizenden eiwitten kan worden bepaald, geven een veelomvattender afspiegeling

van de biologische (en pathologische) processen in het hele organisme dan technieken die zich richten op één enkele component. Bovendien heeft proteomics, vanwege het open screeningskarakter, een groot potentieel voor het vinden van nieuwe (panels van) biomarkers.² Een in dit opzicht veelbelovend terrein van proteomicsonderzoek is het in kaart brengen van (veranderde) kwantitatieve eiwitexpressieprofielen, niet alleen op het niveau van lichaamsvloeistoffen, kankercellen en tumorweefsels, maar ook in subcellulaire structuren (zoals de celkern waar veel van de afwijkende DNA-gerelateerde processen optreden die zo vaak kanker tot gevolg hebben of het celoppervlak dat direct benaderbaar is voor therapeutische middelen). Deze analyses kunnen leiden tot de identificatie van nieuwe aangrijpingspunten ('targets') voor behandeling en de ontwikkeling van nieuwe biomarkers. Dergelijke (verschillende) biomarkers kunnen worden ingezet voor de vroege detectie en/of diagnose van kanker, voor het indelen van patiënten in risicogroepen of behandelgroepen, en voor het volgen van het effect van de behandeling. Cel- en weefselmonsters zijn vooralsnog te complex voor een directe massaspectrometrische analyse waarbij honderden tot duizenden eiwitten geïdentificeerd worden. In de afgelopen jaren is veel vooruitgang geboekt in het ontwikkelen van robuuste (eiwit)scheidingsstrategieën gecombineerd met sterk verbeterde massaspectrometrieplatforms. Dankzij deze ontwikkelingen is de gevoeligheid en het dynamisch bereik van de analyse (kleinste meetbare hoeveelheid versus maximaal meetbare hoeveelheid eiwit) drastisch verbeterd, en heeft de laatste jaren een verschuiving plaatsgevonden van technologie- en methode-ontwikkeling naar het daadwerkelijk toepassen van proteomics om biomedische vragen op te lossen. Naast preklinische modellen wordt proteomics ook steeds meer op patiëntenmateriaal toegepast. Inmiddels zijn in veel studies niet alleen bekende markers 'herontdekt', maar ook veel nieuwe interessante kandidaat-biomarkers geïdentificeerd.² De grote uitdaging nu is om de lange lijsten van kandidaat-biomarkers te vertalen in gevalideerde subsets van biomarkers die in bloed (plasma) met een routinematige bepaling gemeten kunnen worden.³ Een nieuwe proteomicsmethode gebaseerd op 'multiple reaction monitoring' (MRM) massaspectrometrie, waarbij heel snel en heel specifiek ('targeted') uitsluitend naar geselecteerde kandidaat-biomarkers wordt gekeken, heeft de potentie om als platform te dienen voor de snelle validering van deze biomarkers in grote reeksen plasmamonsters. In deze review zal ik de vooruitgang beschrijven in massaspectrometrische proteomicsbenaderingen en hun toepassingen in het opsporen en valideren van biomarkers.

PROTEOMICSSTRATEGIËN VOOR HET ONTDEKKEN VAN BIOMARKERS

Eiwit- en peptidenscheiding: verhogen van het dynamisch bereik

Zelfs met de meest recent ontwikkelde massaspectrometers die extreem snel en gevoelig zijn (10-20 identificatiespectra per seconde, met een detectielimiet op attomolniveau), is het ontdekken van biomarkers in een biologisch monster nog steeds geen sinecure. Dit komt niet alleen door het grote aantal eiwitten en de chemische diversiteit in hun precieze structuur, maar ook door de grote verschillen in hoeveelheid waarin de verschillende eiwitten (kunnen) voorkomen. Abundante eiwitten kunnen de detectie van eiwitten die in (veel) kleinere hoeveelheden voorkomen hinderen doordat ze laatstgenoemde eiwitten als het ware maskeren. In bloed is bijvoorbeeld serum albumine in zeer grote hoeveelheden aanwezig (~50 mg/ml), terwijl bekende biomarkers zoals PSA en CEA slechts in minieme hoeveelheden aanwezig zijn (enkele ng/ml). Inmiddels zijn er op moleculaire affiniteit gebaseerde depletie methodes voorhanden om de meest overvloedige bloedeiwitten te verwijderen en een veelomvattende proteomicsanalyse te bevorderen.⁴

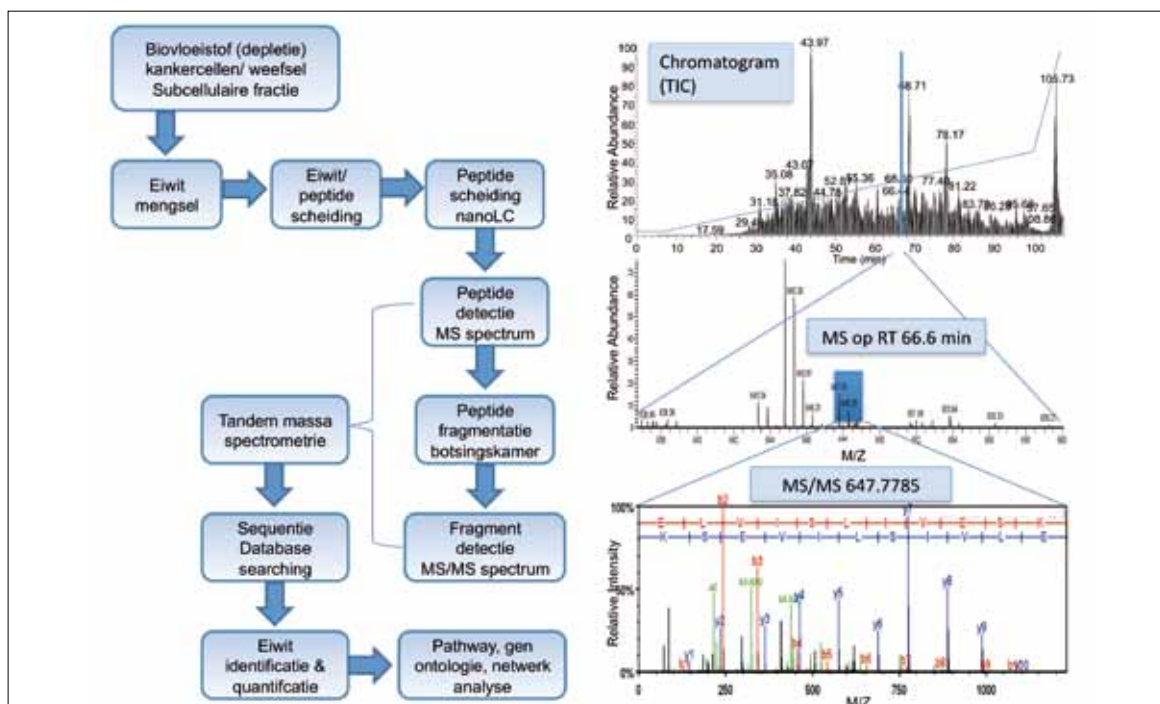
Om het dynamisch bereik van de analyse verder te vergroten is het belangrijk om de eiwitten in biologische preparaten te scheiden op eiwit- en/of peptideniveau voordat ze geïntroduceerd worden in de massaspectrometer. Een populaire combinatie van scheidingstechnieken is eendimensionale gelelektroforese gevolgd door nano-vloeistofchromatografie (nano-LC). In de eerste stap worden eiwitten gescheiden op een polyacrylamide-gel waarna ze, in de gel, in discrete peptiden worden geknipt met een specifiek enzym. De uit de gel geëxtraheerde peptiden worden dan in de tweede stap op een nano-LC-kolom gescheiden. Deze kolom is online gekoppeld met de massaspectrometer (figuur 1). Het voordeel van eiwitdigestie is dat peptiden in de massaspectrometer efficiënt kunnen worden gedetecteerd en gefragmenteerd (dit laatste is van belang voor hun ondubbelzinnige identificatie). Een andere populaire combinatie maakt uitsluitend gebruik van fractionering op peptidenniveau door middel van twee verschillende vloeistofchromatografiestappen. Het resultaat van deze vormen van 'multidimensionale scheiding' is dat de massaspectrometer per tijdseenheid een veel minder complexe subset van het monster krijgt te verwerken en meer tijd heeft om zoveel mogelijk peptidecomponenten daarin te meten en te fragmenteren. Uiteindelijk kunnen hierdoor meer eiwitten worden geïdentificeerd en gekwantificeerd dan zonder monsterscheiding. De identificatie van eiwitten vindt plaats via geavanceerde software die de aminozuurvolgorde van gemeten peptiden

en hun fragmenten matcht aan de aminozuurvolgorde van eiwitten die worden gecodeerd door de DNA-sequentie van het genoom (figuur 1). De tijd die nodig is voor de analyse van een kankerlijn of een tumorweefselbiopt is (uitgaande van de analyse van enkele duizenden eiwitten) ongeveer twaalf uur, terwijl de analyse van bloed veel meer meettijd in beslag neemt in verband met de meer omslachtige monstervoorbereiding. Hoe langer de meting duurt, des te minder monsters er geanalyseerd kunnen worden. Hierdoor worden biomarkerstudies vaak met gepooled materiaal of met een relatief klein aantal individuele patiëntenmonsters gedaan (doorgaans 10-20). In gepooled materiaal kunnen individuele verschillen worden uitgemiddeld, terwijl in een kleine set individuele monsters variaties moeilijker met statistische betrouwbaarheid kunnen worden aangewezen. Het is dus belangrijk om zorgvuldig verzameld en goed gekarakteriseerd (pathologisch en klinisch) materiaal te gebruiken om de kans op het vinden van betrouwbare kandidaat-biomarkers zo groot mogelijk te maken. Hiertoe is een goede samenwerking met pathologen en klinici essentieel.

Biomarker-rijk startmateriaal voor het ontdekken

van nieuwe biomarkers

Naast de keuze voor de 'proteomics workflow', is de keuze voor het startmateriaal belangrijk voor het vinden van nieuwe biomarkers: bloed is makkelijk verkrijgbaar, maar de biomarkerconcentraties zijn hierin het laagst en schaarse eiwitten worden hierin gemaskeerd door enkele abundante huishoudeiwitten van het bloedproteoom; het gebruik van tumorweefsel is misschien de meest directe manier, maar in dat geval is niet direct gegarandeerd dat de marker ook non-invasief gemeten kan worden. Afhankelijk van de toepassing kan de analyse van proximale lichaamsvloeistoffen of subcellulaire compartimenten van kankercellen en -weefsels een gerichte oplossing bieden voor het type biomarker dat gevonden dient te worden. Hieronder ga ik dieper in op de diverse opties die er bestaan voor de selectie van startmateriaal voor klinisch relevante proteomics. Proximale vloeistoffen vormen een interessante bron aangezien deze relatief hoge concentraties bevatten van eiwitten die afgegeven zijn door de omliggende weefsels en die als interstitiële vloeistof uiteindelijk het bloed zullen bereiken. Voorbeelden van lichaamsvloeistoffen die met proteomics geanalyseerd zijn teneinde biomarkers te



Figuur 1. Eiwitidentificatiestrategie middels massaspectrometrie en database-analyse. Een eiwit in een stukje gel of in oplossing wordt geknipt met een specifiek enzym hetgeen leidt tot de vorming van discrete peptiden. Die peptiden worden gescheiden door middel van nanovloeistofchromatografie (nano-LC) en vervolgens gemeten in de massaspectrometer. Per seconde worden de top 5-20 peptiden die van de nano-LC-kolom af komen gefragmenteerd. De molekulgewichten (massa's) van de peptiden en hun fragmenten worden gebruikt om sequentiedatabases te doorzoeken. Wanneer de spectra voor minimaal twee peptiden een betrouwbare match met hetzelfde eiwit in de database geven, wordt het eiwit als geïdentificeerd beschouwd. Er zijn verschillende opties om de massaspectrometrische gegevens te gebruiken om ook tot een absolute of relatieve kwantitatieve bepaling van de hoeveelheid eiwit in het monster te komen.

vinden, zijn urine, cerebrospinale vloeistof, ascites (buikvocht), tepelvloeistof, speeksel, sputum, faeces, alsook gastrointestinale, peritoneale, vaginale en intra-amniotische vloeistoffen.⁵

Een aantrekkelijk *in vitro* (*ex vivo*) alternatief voor het oppikken van potentiële serumbiomarkers is de proteomicsanalyse van afgegeven eiwitten ('secretoom') in incubatiemedia van kankercellen en tumorweefsel. Vanwege de verminderde complexiteit van het biologische monster en de relatief hoge concentratie van afgegeven (tumor) eiwitten is het tumorsecretoom een rijke bron van biomarkers die uiteindelijk in bloed terecht kunnen komen. Deze strategie is zeer vruchtbaar gebleken in het werk van anderen en dat van ons.⁶ Zo hebben we recentelijk in een genetisch muizenmodel voor darmkanker, middels vergelijking van tumorsecretomen met normale darmsecretomen, nieuwe kandidaat-biomarkers voor de vroege detectie van darmkanker geïdentificeerd.⁷ Secretoomproteomics passen we inmiddels ook succesvol toe op humaan materiaal. Analyse van eiwitten op het celoppervlak van kankercellen is een veelbelovende strategie voor het ontdekken van biomarkers die gebruikt kunnen worden voor moleculaire beeldvorming of als targets om geneesmiddelen de cel in te brengen. Oppervlakte-eiwitten op kankercellijnen kunnen in een chemische reactie gemodificeerd worden met een klein molecuul (biotine) en vervolgens kunnen biotinebevattende eiwitten geïsoleerd worden via affiniteitszuivering op een biotinebindende streptavidinekolom. Recentelijk hebben we de analyse van oppervlakte-eiwitten van een panel van darmkankercellijnen geïntegreerd met data over eiwit-coderend mRNA (verkregen via 'transcriptomics') uit darmadenomen en -carcinomen, en eiwitten gevonden die mogelijk gebruikt kunnen worden voor het zichtbaar maken van respectievelijk hoogrisicolesies en darmkanker.⁸

Proteomics is ook gebruikt om de biologie van kankerstemcellen te bestuderen.⁹ Middels nieuwe weefselkweekmethodes kunnen tumorafgeleide sferoïden verkregen worden (celklonen die groeien in drie in plaats van in twee dimensies) die verrijkt zijn in kankerstemcellen, zeer tumorigeen zijn, en een goed model vormen voor de oorspronkelijke tumor. Recente proteomicsanalyse van sferoïden die zijn afgeleid van levermetastases van darmtumoren heeft bevestigd dat de sferoïden verrijkt zijn voor bekende kankerstemcellenmarkers zoals een lid van de aldehyde-dehydrogenase-1-familie (Aldh1a1), in vergelijking met adherent gekweekte cellen afkomstig van dezelfde patiënt.¹⁰ Daarnaast heeft deze analyse een aantal andere veelbelovende kandidaten opgeleverd waaronder het anti-apoptotische (chemoresistentiebevorderende) eiwit Birc6, dat hoog tot expressie komt in de

fractie van darmtumoren met een hoge aldehyde-dehydrogenase activiteit.¹⁰ Vervolgonderzoek zal moeten aantonen welke van deze eiwitten relevant is of zijn voor het kankerstemcelfenotype, en wat de waarde zal zijn in het voorspellen van overleving en respons op therapie.

Reversibele fosforylering door eiwitkinases is een sterk gereguleerd cellulair proces waarmee eiwitten geactiveerd of gedeactiveerd kunnen worden en dat een uitermate belangrijke rol speelt in intracellulaire signaaltransductie cascades zoals gebruikt door groeifactoren. Het fosfoproteoom (de set van gefosforyleerde eiwitten) van een kanker cel kan dus informatie geven over de activiteit van signaaltransductieroutes en over eiwitkinases die mogelijk als doelwit voor geneesmiddelen kunnen dienen. Een scala aan analytische strategieën is voorhanden om fosfopeptiden te isoleren middels affiniteitszuivering. Een strategie die ook toegepast is in tumorweefsel maakt gebruik van een specifiek antilichaam dat fosfotyrosineresiduen herkent. Met dit antilichaam heeft de groep van Combs het fosfoproteoom van een groot aantal met niet-kleincellige longkanker geassocieerde cellijnen (41) en tumoren (150) in kaart gebracht.¹¹ In deze studie werden bekende oncogene 'driver' kinases gevonden, zoals EGFR en c-Met alsmede nieuwe Alk- en Ros-fusie-eiwitten. Andere geactiveerde tyrosinekinases geïdentificeerd in deze studie waren PDGFRa en DDR1, welke nog nooit in verband waren gebracht met niet-kleincellige longkanker. De focus op geactiveerde signaaltransductienetwerken geeft dus inzichten in de (patho)biologie van kanker die niet verkregen kunnen worden op het chromosomale (DNA) of transcript (mRNA) niveau. Een aantal van de gevonden 'driver' kinases is nu als doelwitonderwerp van klinische trials met nieuwe kinaseremmers die kunnen leiden tot nieuwe geneesmiddelen.

Met het beschikbaar komen van steeds gevoeligere en snellere massaspectrometers is steeds minder materiaal nodig voor proteomicsanalyses. In recente studies is proteomics ook succesvol toegepast op cellen geïsoleerd met microdissectie of via celsortering in een FACS-apparaat.¹² Ook zijn er protocollen ontwikkeld waarmee proteomics toegepast kan worden op gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel.¹³ Dit zijn veelbelovende ontwikkelingen waarvan in de toekomst nog veel verwacht kan worden.

TARGETED MASSASPECTROMETRIE VOOR BIOMARKERVALIDERING

Terwijl in zogenaamde discovery proteomics de massaspectrometer het hele massagebied scant om zoveel mogelijk (van eiwitten afkomstige) peptiden te meten, is bij biomarkervalidering juist het doel om gericht alléén peptiden van

Tabel 1. Proces voor het ontdekken en valideren van nieuwe kandidaat biomarkers						
Phase	Doel	Materiaal	Methode	Experiment grootte	Tijd-schaal	Uitkomst
Phase I: Discovery	Identificeer kandidaat biomarker	Cells, tissue, proximal fluid, serum/plasma model systems and human	Low-throughput. Bv., abundante eiwit depletie, isolatie biomarker-rijk subproteoom uit weefsel/cellen, GeLC-MS/MS, 2DLC-MS/MS	1000s eiwitten in 10s monsters	6-12 maanden	Geprioritiseerde lijst kandidaat biomarkers
Phase II: Verificatie	Bevestig differentiele abundantie in humaan materiaal voor klinische toepassing Proof-of-concept	Humaan plasma, lichaamsvloeistof, biopt	Ontwikkel label-vrije gerichte massa spectrometrie assays (SRM/ MRM); retrospectieve monsters	20-100 kandidaat biomarkers in 20-100 monsters	6-12 maanden	Detecteerbaarheid kandidaat biomarkers in humane monsters voor klinische toepassing
Phase III: Validatie	Ontwikkelen van een eiwit signatuur voor het doel van de studie	Humaan plasma, lichaamsvloeistof, biopt	Implementeer stabiele isotoop gelabelde massaspectrometrie assays (SID-SRM/ MRM); immunoaffiniteit-gebaseerde peptide verrijking; retrospectieve monsters	20-50 kandidaat biomarkers in 100s monsters	12-24 maanden	Onderscheidend vermogen biomarker panel bepaalt criteria voor klinische evaluatie
Phase IV: Klinische evaluatie, deel 1	Klinische assay ontwikkeling. Bepaal nauwkeurigheid test	Humaan plasma, lichaamsvloeistof, biopt	SID-SRM; Multiplex antilichaam-gebaseerde assays; Prospectieve collectie in doel populatie	<20 kandidaat biomarkers in 100s-1000 samples	jaren	Sensitiviteit en specificiteit van de diagnostische test
Phase V: Klinische evaluatie, deel 2	Bepaal de toegevoegde waarde van de test	Humaan plasma, lichaamsvloeistof, biopt	SID-SRM? Multiplex antilichaam-gebaseerde assays; random selectie uit target populatie	<10 kandidaat biomarkers in 1000s samples	jaren	Effect op management ziekte

Figuur 2. Proces voor ontwikkeling van nieuwe biomarkers. Iedere fase in het ontwikkelingsproces heeft zijn eigen specifieke doelen en benodigheden. Grootte van het experiment refereert aan het aantal verwachte eiwitten dat als kandidaatbiomarker geëvalueerd zal worden in relatie tot het aantal patiënten-monsters in iedere fase van ontwikkeling. Deze pijplijn is een aangepaste versie van de varianten gepubliceerd door Rafai et al, 2006 en Surinova et al, 2011.

kandidaat-biomarkers te meten in een proces dat multiple/selected reaction monitoring (MRM/SRM) genoemd wordt. Het voordeel van deze manier van meten is het grote dynamische bereik (10^5), een grote gevoeligheid (ng/ml in bloed) en nauwkeurige kwantificatie. Een ander groot voordeel is dat voor deze valideringsstrategie geen antilichamen nodig zijn. MRM/SRM is een snel opkomend toepassingsgebied van massaspectrometrie,¹⁴ waarvan verwacht wordt dat het biomarkervalidering en vertaling naar diagnostische bepalingen in de kliniek zal bespoedigen. Figuur 2 laat de pijplijn zien voor biomarkerontwikkeling en de stappen die genomen moeten worden in de verschillende fases van het proces.

TOEKOMSTIGE UITDAGINGEN

De waarde van proteomics voor een verbeterd moleculair inzicht in pathologische processen en afwijkende signaaltransductie in kankercellen is de afgelopen jaren duidelijk geworden. Proteomicsonderzoek leidt vaak tot een flink aantal kandidaatbiomarkers. Slechts een klein aantal hiervan zal een klinisch bruikbare marker opleveren. Met de recent ontwikkelde massaspectrometrische strategieën kan nu het initiële ontdekkingsproces systematisch worden uitgevoerd samen met de validatie. Een systematisch klinisch vervolg van de proteomicsontdekkingsreis is cruciaal voor translatie naar gebruik in de kliniek. Voor het verkrijgen van een totaal begrip van kanker als ziekte is multidisciplinair onderzoek

en samenwerking belangrijk, en zijn er nieuwe ontwikkelingen in infrastructuur voor opslag en uitwisseling van elektronische data nodig. Dit zal een meer 'systeem-biologische' benadering faciliteren, waarin ook een geïndividualiseerde diagnose en behandeling mogelijk wordt.



LITERATUUR

1. Cox J, Mann M. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 273-299 (2011).
2. Rajcevic U, Niclou SP, Jimenez CR. Proteomics strategies for target identification and biomarker discovery in cancer. *Front Biosci.* 14, 3292-3303 (2009).
3. Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* 24, 971-983 (2006).
4. Zhang Q, Faca V, Hanash S. Mining the plasma proteome for disease applications across seven logs of protein abundance. *J. Proteome. Res.* 10, 46-50 (2011).
5. Teng PN, Bateman NW, Hood BL, Conrads TP. Advances in proximal fluid proteomics for disease biomarker discovery. *J. Proteome. Res.* 9, 6091-6100 (2010).
6. Piersma SR, Fiedler U, Span S et al. Workflow comparison for label-free, quantitative secretome proteomics for cancer biomarker discovery: method evaluation, differential analysis, and verification in serum. *J. Proteome. Res.* 9, 1913-1922 (2010).
7. Fijneman RJA, Wit M de, Pourghasian M, Piersma SR, Pham TV, Warmoes M et al. Proteome profiling of mouse colon tumor proximal fluids reveals candidate biomarkers for colorectal cancer screening. *Clin. Cancer Res. Accepted publication.*
8. Wit M de, Jimenez CR, Carvalho B et al. Cell surface proteomics identifies glucose transporter type 1 and prion protein as candidate biomarkers for colorectal adenoma-to-carcinoma progression. *Gut. Accepted publication.*
9. Kranenburg O, Emmink BL, Knol JC, Borel Rinkes IHM, Jimenez CR. Proteomics in Studying Cancer Stem Cell Biology. *Expert Rev. Prot. Submitted manuscript.*
10. Houdt WJ van, Emmink BL, Pham TV et al. Comparative proteomics of colon cancer stem cells and differentiated tumor cells identifies BIRC6 as a potential therapeutic target. *Mol. Cell Proteomics* 10, M111.011353 (2011).
11. Rikova K, Guo A, Zeng Q et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131, 1190-1203 (2007).
12. Xu BJ. Combining laser capture microdissection and proteomics: methodologies and clinical applications. *Proteomics. Clin. Appl.* 4, 116-123 (2010).
13. Tanca A, Pagnozzi D, Addis MF. Setting proteins free: Progresses and achievements in proteomics of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Proteomics. Clin. Appl.* (27-12-2011).
14. Surinova S, Schiess R, Huttenhain R, Cerciello F, Wollscheid B, Aebersold R. On the development of plasma protein biomarkers. *J. Proteome. Res.* 10, 5-16 (2011).

CORRESPONDENTIE

Dr. Connie R. Jimenez, Associate Professor
Head OncoProteomics Laboratory
Dept. of Medical Oncology
VU University Medical Center
De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam
c.jimenez@vumc.nl
www.oncoproteomics.nl

SAMENVATTING

Proteomics is het onderzoeksveld dat zich richt op grootschalige analyse van eiwitexpressie, posttranslationele modificaties en eiwit-eiwit-interacties. OncoProteomics geeft inzicht in veranderde cellulaire processen in kankercellen, zoals afwijkende signaaltransductie, en kan leiden tot de identificatie van 'drugable targets' en de ontwikkeling van nieuwe biomarkers. Dankzij razendsnelle ontwikkelingen in de afgelopen jaren op het gebied van massaspectrometrie (MS) en bioinformatica is het identificeren en kwantitatief in kaart brengen van duizenden eiwitten in complexe biologische preparaten, zoals lichaamsvloeistoffen en tumorweefsels, meer en meer routine geworden. Echter, het valideren van kandidaat-biomarkers in grote klinische cohorten, is momenteel een uitdaging. In dit artikel worden nieuwe ontwikkelingen en strategieën in massaspectrometrische proteomics voor biomarker discovery en validering samengevat.