

Lysosomale Proteine in der Biomarkerforschung

Systematische Analyse klinischer Relevanz und proteomischer Nachweisstrategien

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Yannic Hackenberg

aus Wermelskirchen

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Becker
2. Gutachterin: Prof. Dr. Stefanie Kürten

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2025

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	13
1.3	Ergebnisse	16
1.4	Diskussion	20
1.5	Zusammenfassung	24
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	25
2.	Veröffentlichung	29
3.	Erklärung zum Eigenanteil	30
4.	Danksagung	31

Abkürzungsverzeichnis

AMA	Aptamer-basierte Mikroarrays
ANXA1	Annexin A1
CD	Cluster of Differentiation
CSF	Liquor
CTSD	Katepsin D
CTSL	Katepsin L
DBS	Dried Blood Spots
DDA	Data-Dependent Acquisition
DEPTOR	DEP Domain-Containing MTOR-Interacting Protein
DIA	Data-Independent Acquisition
GAA	Alpha-Glukosidase
GBA	Glukozerebrosidase
GLB	Beta-Galaktosidase
IDUA	Alpha-L-Iduronidase
IFITM	Interferon-Induced Transmembrane Protein
IMA	Immunoaffinitäts-basierte Mikroarrays
LAMP	Lysosome-Associated Membrane Protein
LAPTM	Lysosomal Protein Transmembrane
LC	Flüssigkeitschromatografie
LE	Late Endosome
LIPA	Lipase A

LSDs	Lysosomale Speicherkrankheiten
MPS	Mukopolysaccharidose
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
ND	Neurodegenerative Erkrankungen
PRM	Parallel Reaction Monitoring
PASEF	Parallel Accumulation-Serial Fragmentation
QTOF	Quadrupole Time-of-Flight
SLC2A	Solute Carrier Family 2 Member
SRM	Selected Reaction Monitoring
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
timsTOF	Trapped Ion Mobility Spectrometry – Time-of-Flight
TPP	Tripeptidyl Peptidase
vATPase	vacuolar-type ATPase-Komplex

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Lysosomen sind als zentrale Kompartimente für den intrazellulären Abbau und das Recycling von Makromolekülen bekannt, werden aber zunehmend als übergeordnete Regulatoren des zellulären Stoffwechsels verstanden (Ballabio und Bonifacino, 2020). Aktuell sind 341 Proteine beschrieben, die an Biogenese, Funktion oder Regulation lysosomaler Prozesse beteiligt sind (Muthukottiappan und Winter, 2021). Diese lassen sich anhand ihrer Lokalisation in drei Hauptgruppen einteilen. Zum einen 78 luminal Proteine, die überwiegend als Hydrolasen den Abbau eingelagerter Substrate übernehmen. Des Weiteren 110 membranständige Proteine, die für die strukturelle Integrität, den Transport kleiner Moleküle oder Adapterfunktionen zuständig sind, sowie eine Gruppe von 153 assoziierten Proteinen, die an metabolischer Regulation, intrazellulärer Signalübertragung und der Koordination von Organelleninteraktionen beteiligt sind (vgl. Abb. 1).

Strukturelle oder funktionelle Störungen dieser Proteine stehen mit zahlreichen Erkrankungen in Verbindung. Insbesondere bei lysosomalen Speicherkrankheiten (LSDs), bei denen genetische Varianten zu einem Funktionsverlust oder zur fehlerhaften Lokalisierung lysosomaler Proteine führen und häufig in einer Akkumulation von Substraten resultieren, was ein zentrales Merkmal der rund 70 bekannten LSDs darstellt. Trotz ihrer individuellen Seltenheit weisen LSDs zusammengerechnet eine Inzidenz von etwa 1 zu 5.000 Lebendgeburten auf (Meikle et al., 1999; Platt et al., 2018).

Darüber hinaus bestehen Zusammenhänge zwischen lysosomalen Proteinen und einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer, dem Morbus Parkinson oder der amyotrophen Lateralsklerose (Chang et al., 2017; Fassio et al., 2020; Nixon, 2020). Besonders hervorzuheben ist dabei die Rolle der Glukozerebrosidase (GBA), die den derzeit bekanntlich stärksten genetischen Risikofaktor für den Morbus Parkinson darstellt. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des Transkriptionsfaktors EB (TFEB), der als zentraler Regulator der Lysosomenbiogenese

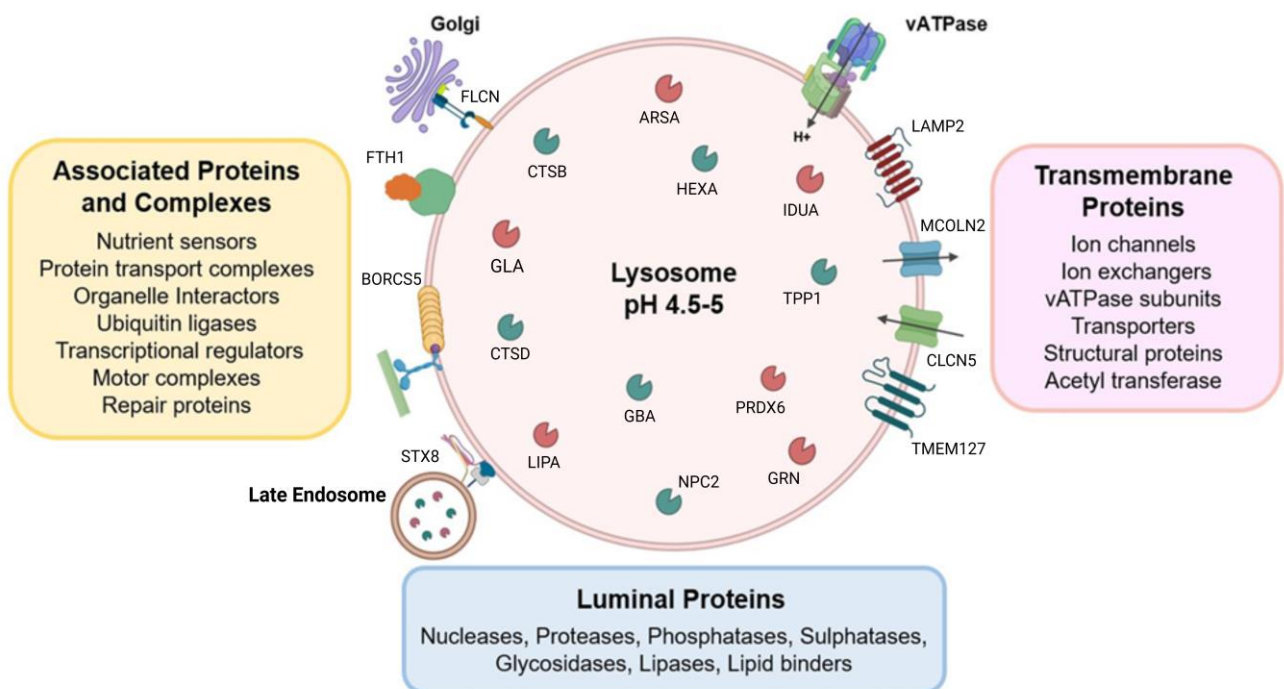


Abb. 1: Einteilung des lysosomalen Proteoms. Lysosomale Proteine lassen sich basierend auf ihrer subzellulären Lokalisation in drei Gruppen untergliedern: Luminale Proteine befinden sich im Inneren des Lysosoms, Transmembranproteine durchspannen die Membran mit einer oder mehreren Domänen, und assoziierte Proteine liegen im Zytoplasma vor und sind über Protein- oder Lipid-Interaktionen an der Lysosomenmembran gebunden (Golgi: Golgi-Apparat; vATPase: vacuolar-type ATPase-Komplex). Dargestellt sind beispielhafte, lysosomale Proteinennamen der zugehörigen Gruppen; Illustration erstellt mit Biorender.com. (modifiziert nach Arora et al., 2023)

fungiert, in Modellen von LSDs und neurodegenerativen Erkrankungen die Beseitigung von pathologischen Proteinablagerungen erleichtern kann (Ballabio, 2016).

Im onkologischen Kontext beruht der pathologische Effekt, im Gegensatz zu neurodegenerativen oder lysosomalen Speichererkrankungen, nicht auf einem Funktionsverlust, sondern auf einer gesteigerten Aktivität lysosomaler Prozesse. (Machado et al., 2021). Eine gesteigerte lysosomale Exozytose führt zur vermehrten Freisetzung proteolytischer Enzyme, die den Abbau der extrazellulären Matrix und somit die Invasion und Metastasierung begünstigen (Piao und Amaravadi, 2016). Autophagie kann dabei tumorsuppressive Eigenschaften aufweisen indem sie beschädigte Zellbestandteile abbaut (Yue et al., 2003) oder tumorfördernde Eigenschaften durch die Ausbildung von Stress- und Therapieresistenzen (Singh et al., 2018). Lysosomale

Hydrolasen tragen zudem zum Abbau der extrazellulären Matrix bei und unterstützen so die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen (Tu et al., 2008).

Trotz dieser bekannten Zusammenhänge fehlte bislang ein systematischer Überblick darüber, in welchem Umfang lysosomale Proteine in Studien detektiert und als potenzielle Biomarker identifiziert wurden. Ein direkter Nachweis erfolgt überwiegend massenspektrometrisch, während genomische Verfahren und transkriptionelle Ansätze keinen Aufschluss über Proteinmengen, Isoformen oder posttranslationale Modifikationen geben. LSDs werden aktuell häufig durch den Nachweis charakteristischer Metabolite in Dried Blood Spots (DBS) mittels fluorimetrischer oder massenspektrometrischer Verfahren diagnostiziert (Darie-Ion und Petre, 2024).

Für die Analyse von Proteinen steht eine Vielzahl massenspektrometrischer Verfahren zur Verfügung. Bei der Massenspektrometrie werden durch enzymatische Verdauung die Proteine zunächst in Peptide zerlegt und in elektrisch geladene Ionen überführt. Zunächst werden die Peptidgemische mittels Flüssigkeitschromatografie (LC) vor der Massenspektrometrie anhand ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften unter Verwendung eines Gradienten getrennt. (vgl. Abb. 2)

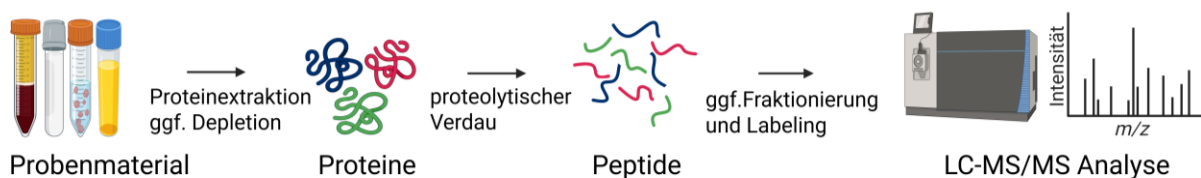


Abb. 2: Vereinfachte Übersicht zur massenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen in klinischem Probenmaterial (abgebildet sind Blut-; Liquor-; Gewebe- und Urinproben). 1) allgemeiner Workflow zur massenspektrometrischen Analyse beginnend mit der Probenaufarbeitung (Proteinextraktion, ggf. Depletion), dem proteolytischen Verdau sowie optionaler Fraktionierungs- und/oder Labellingmethoden.: MS = Massenspektrometrie; LC-MS/MS = Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie; m/z = Masse-zu-Ladung-Verhältnis. Erstellt mit Biorender.com.

Im Massenspektrometer werden die Ionen im sogenannten MS1-Scan nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) getrennt und gezielt detektiert. Es ergibt sich daraus ein Massenspektrum, das die relativen Intensitäten der verschiedenen Peptid-Ionen dargestellt. Um Informationen zur Aminosäuresequenz eines detektierten Peptids zu

erhalten, wird ein ausgewähltes Peptid-Ion, der sogenannte Precursor, gezielt durch Kollision mit neutralem Gas zur Fragmentierung gebracht. Dabei zerfällt das Peptid in Fragment-Ionen, die in einem zweiten Schritt, dem MS2-Scan, erfasst werden. Durch die Informationen von Precursor- und Fragment-Ionen kann die Peptidsequenz bioinformatisch rekonstruiert und das Protein identifiziert werden. Gleichzeitig erlauben die Signalintensitäten je nach Analysemethode eine relative oder absolute Quantifizierung.

Die Massenspektrometrie unterscheidet grundlegend zwischen ungezielten und gezielten Ansätzen. Zu den ungezielten Ansätzen zählen Data-Dependent Acquisition (DDA) oder Data-Independent Acquisition (DIA) Verfahren. Bei DDA wählt das Massenspektrometer nach jedem MS1-Scan je nach Einstellung die intensivsten Precursor-Ionen aus und fragmentiert sie einzeln in aufeinanderfolgenden MS2-Scans. Diese Vorgehensweise ist stark signalabhängig, da hochabundante Peptide bevorzugt analysiert werden, während weniger konzentrierte Peptide häufig übersehen werden. Die Auswahl der Precursor variiert zudem von Messung zu Messung, was zu einer eingeschränkten Reproduzierbarkeit führt. Beim DIA-Verfahren wird der gesamte m/z -Bereich in breite, überlappende Segmente aufgeteilt. Innerhalb eines jeden Segmentes werden alle Ionen gleichzeitig fragmentiert. (vgl. Abb. 3) Die MS2-Spektren enthalten allerdings Mischsignale vieler Peptide. Deswegen erfordert ihre Zuordnung eine vorher erstellte

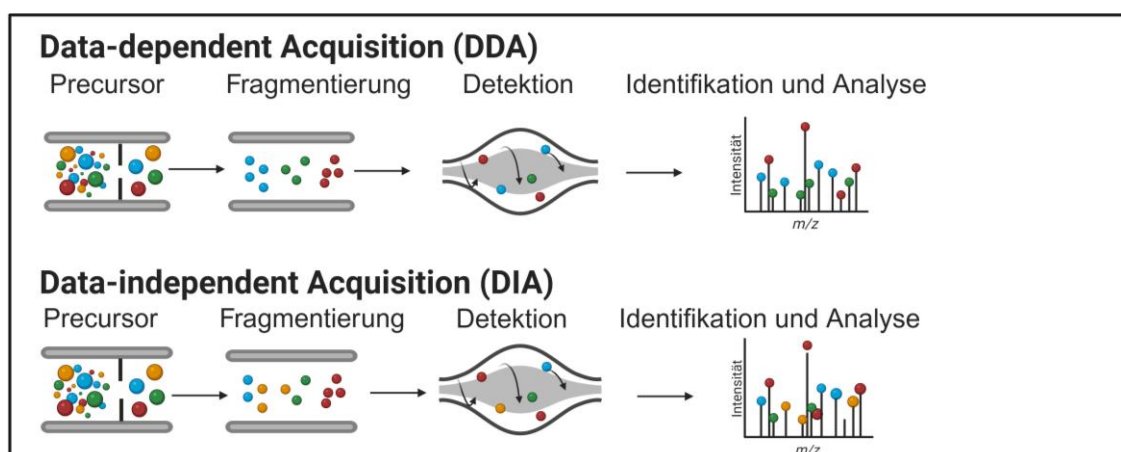


Abb. 3: Schematische Darstellung ungezielter massenspektrometrischer Verfahren. DDA: Data-Dependent Acquisition; DIA: Data-Independent Acquisition; m/z = Masse-zu-Ladung-Verhältnis. Erstellt mit Biorender.com

Referenzbibliothek. In komplexen Proben kann das gleichzeitige Erfassen vieler Signale zudem zu Signalverzerrungen („Ratio-Compression“) führen.

Insgesamt stoßen ungezielte massenspektrometrische Verfahren bei der Analyse niedrig-abundanter Proteine an Grenzen, da ihre geringe Konzentration und die hohe Komplexität biologischer Proben eine zuverlässige und reproduzierbare Detektion erschweren. Depletions-, Fraktionierungs- oder gezielte Anreicherungsverfahren können diese Problematik adressieren, indem sie die Probenkomplexität gezielt vermindern und dadurch die Nachweisempfindlichkeit erhöhen. Alle genannten Ansätze sind aufwendig in Bezug auf Material, Zeit und technische Umsetzung. Depletionsverfahren entfernen, meist durch Antikörper-basierte Bindung, hochabundante Proteine wie Albumin oder Immunglobuline gezielt aus einer Probe (Whiteaker und Paulovich, 2011). Fraktionierungsmethoden zielen darauf ab, komplexe Proben in weniger vielfältige Fraktionen zu unterteilen. Dies kann durch Trennung nach Größe, Ladung oder hydrophoben Eigenschaften mittels Gel-Elektrophorese oder Flüssigkeitschromatografie passieren. Die Markierung von Peptiden aus verschiedenen Proben mittels isotopebasierter oder chemischer Labelling-Methoden, in Kombination mit einer vorgelagerten Fraktionierung, ermöglicht eine simultane Analyse mehrerer Proben innerhalb eines einzelnen Massenspektrometrielaufs. Sie erlauben damit einen quantitativen Vergleich, während die technische Variabilität zwischen den Einzelmessungen minimiert werden kann. Anreicherungsverfahren durch subzelluläre Fraktionierung, bei der Organellen zunächst isoliert und anschließend lysiert werden, erhöhen die Nachweiswahrscheinlichkeit niedrig-abundanter Zielproteine ebenfalls, indem sie die Konzentration dieser Proteine relativ zur Gesamtproteinmenge erhöhen. Sie eignen sich jedoch nur bedingt für eine zuverlässige Quantifizierung, da sie häufig zu variabler Ausbeute und verzerrten Konzentrationsverhältnissen führen (Jiang et al., 2024). Zudem sind sie meist nur mit frischem Probenmaterial durchführbar. Für viele gängige Probentypen wie Körperflüssigkeiten oder formalinfixiertes Gewebe sind sie daher nur bedingt geeignet (Fernández-Costa et al., 2020).

Gezielte massenspektrometrische Techniken wie Selected Reaction Monitoring (SRM), Multiple Reaction Monitoring (MRM) oder Parallel Reaction Monitoring (PRM) ermöglichen die Analyse definierter Peptide mit erhöhter Nachweisempfindlichkeit und

guter Reproduzierbarkeit auch in komplexen Probenmaterialien. Bei SRM wird gezielt ein definierter Übergang von einem Precursor-Ion zu einem spezifischen Fragment-Ion detektiert, um ein bestimmtes Peptid mit hoher Spezifität zu identifizieren und zu quantifizieren. MRM erweitert dieses Prinzip, indem in einem Messdurchlauf mehrere solcher Übergänge simultan überwacht werden, was die parallele Quantifizierung einer Vielzahl definierter Zielpeptide ermöglicht. PRM basiert auf einem ähnlichen Ansatz, nutzt jedoch hochauflösende Massenspektrometer, die nach Selektion eines Zielpeptids alle zugehörigen Fragment-Ionen gleichzeitig und mit hoher Massenauflösung erfassen. (vgl. Abb. 4) Das steigert die Selektivität, Genauigkeit und Flexibilität in der Auswertung, während die Anzahl gleichzeitig quantifizierbarer Peptide im Vergleich zu klassischen MRM-Analysen meist etwas geringer ist (Lange et al., 2008; Burgess et al., 2014; Domon und Gallien, 2015).

Neben MS-basierten Verfahren kommen häufig Immunoaffinitäts-basierte Mikroarrays (IMA) und Aptamer-basierte Mikroarrays (AMA) zum Screening auf potenzielle Biomarker und in der Klinik zum Einsatz. (Dammer et al., 2022) Immunoaffinitäts-basierte Methoden beruhen auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an Zielproteine. Diese Bindung wird anschließend über gekoppelte Detektionssysteme quantifiziert. Aptamer-basierte Verfahren nutzen synthetische Einzelstrang-DNA- oder RNA-Moleküle (Aptamere), die

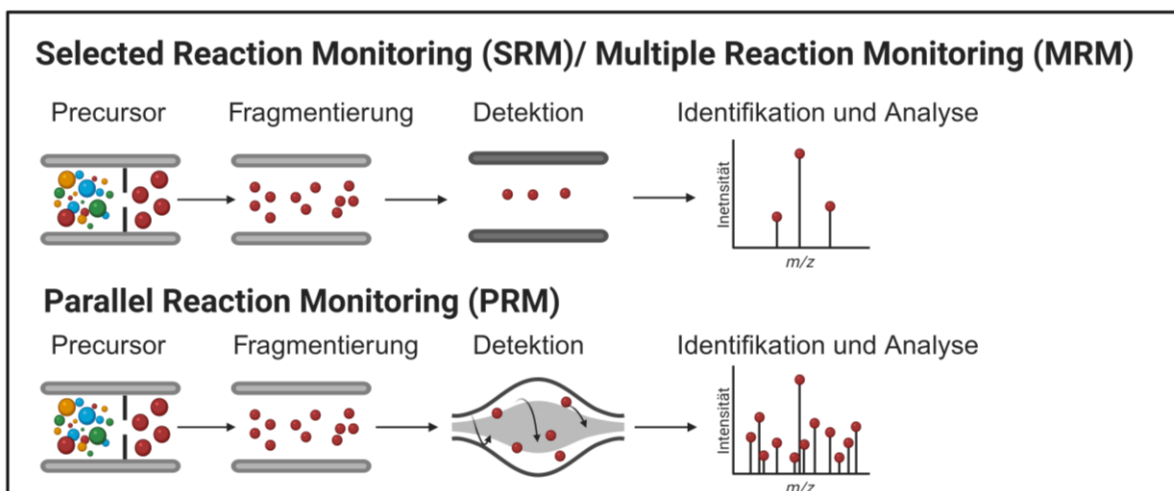


Abb. 4: Schematische Darstellung gezielter massenspektrometrischer Methoden zur Quantifizierung von Proteinen. SRM/MRM: Selected/Multiple Reaction Monitoring; PRM: Parallel Reaction Monitoring; m/z = Masse-zu-Ladung-Verhältnis. Erstellt mit Biorender.com.

eine spezifische, dreidimensionale Struktur ausbilden und so mit hoher Affinität an ihre Zielproteine binden können. (vgl. Abb. 5)

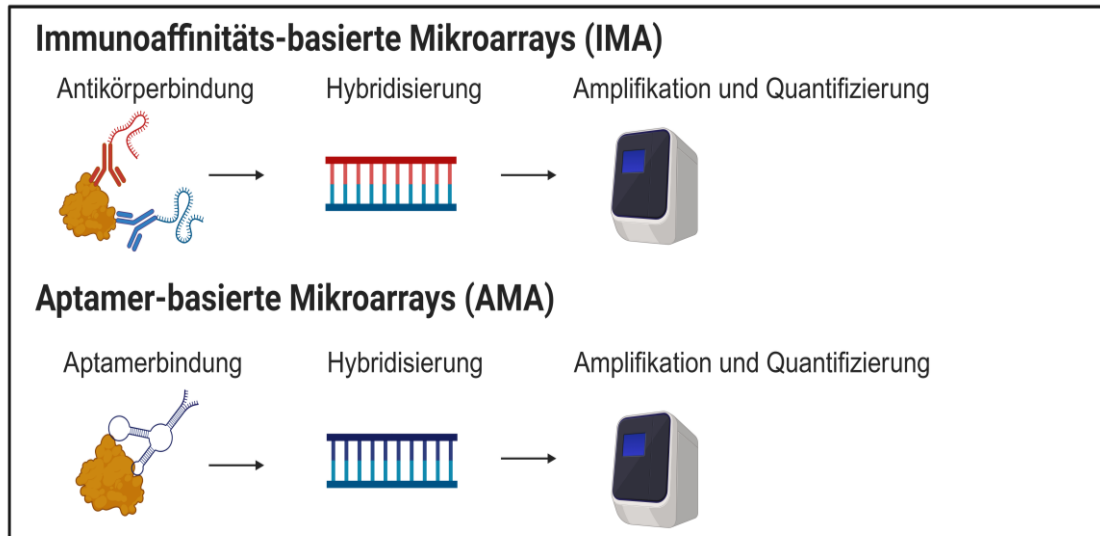


Abb. 5: alternative, nicht-massenspektrometrische Verfahren zur Proteinquantifizierung, die auf Mikroarrays basieren. Bei Immunoaffinitäts-basierten Verfahren kommt es nach Bindung zweier antikörpergebundener Oligonukleotide zur Hybridisierung der DNA, die amplifiziert und quantifiziert wird. Bei Aptamer-basierten Verfahren werden einzelsträngige und speziell gefaltete DNA- oder RNA Moleküle nach Bindung am Zielprotein ebenfalls hybridisiert und anschließend amplifiziert und quantifiziert. IMA: Immunoaffinitäts-basierte Arrays; AMA: Aptamer-basierte Arrays. Erstellt mit Biorender.com.

Die Originalpublikation hatte zum Ziel, systematisch zu erfassen, welche lysosomalen Proteine bislang im Kontext krankheitsbedingter Veränderungen in humanen Geweben und Körperflüssigkeiten beschrieben wurden. Dabei wird insbesondere analysiert, welchen Einfluss die Wahl der analytischen Methodik auf die Nachweisbarkeit dieser Proteine hat. Die Arbeit bietet damit einen umfassenden Überblick über krankheitsassoziierte Veränderungen des lysosomalen Proteoms, deren methodische Erfassbarkeit sowie deren Potenzial für eine zukünftige translationale Nutzung als Biomarker in der klinischen Diagnostik.

1.2 Material und Methoden

Die Grundlage dieser Arbeit umfasste eine systematische Literaturrecherche, die nach den Kriterien der PRISMA-Guidelines geplant und umgesetzt wurde. Alle Recherchen erfolgten im Februar 2023 unter Verwendung des R-Pakets easyPubMed (Version 2.13, R 4.2.2) in Kombination mit der PubMed-Datenbank. Die Liste der verwendeten 341 lysosomalen Proteine basierte auf der Publikation von Muthukottiappan und Winter (2021). Für jedes Protein wurden drei spezifische Suchanfragen erstellt, um Studien mit proteomischem, transkriptomischem oder genomischem Schwerpunkt zu identifizieren. Dabei wurde nach den Begriffen: „proteome“, „proteomics“, „Olink“ und „Somascan“ für proteomische Studien, „transcriptome“, „transcriptomics“, „microarray“ und „RNA-seq“ für transkriptionelle Studien, sowie „whole genome sequencing“, „comparative genomic hybridization“, „next generation sequencing“, „genome wide association“ und „gene expression profiling“ für genomische Studien im Titel und im Abstract gesucht, stets in Kombination mit dem jeweiligen lysosomalen Gen und dem Suchbegriff „biomarker“. Die Übernahme von Übersichtsarbeiten wurde systematisch ausgeschlossen.

Die initial identifizierten 10683 Datensätze aus 6187 individuellen Studien wurden anschließend manuell überprüft. Ausgeschlossen wurden alle Studien, die an nicht-menschlichen Proben durchgeführt wurden ($n = 1951$). Ebenfalls wurden Studien zu Proteinen mit Bezug zum Lipoproteinmetabolismus (BRD4, MITF, MYC, TFE3, TFEB, TFEC, ZKSCAN3, MTOR, SRC, APOB, APOE und LDLR) ausgeschlossen, da diese überwiegend an allgemeinen zellulären Steuerungsmechanismen oder am Lipidstoffwechsel außerhalb des Lysosoms beteiligt sind ($n = 1.290$). In der Auswertung wären diese Proteine überrepräsentiert gewesen, obwohl sie nur einen indirekten Bezug zum Lysosom haben. Ebenso entfernt wurden Tissue-Microarray-Studien mit immunhistochemischem Schwerpunkt ($n = 594$) sowie Arbeiten, in denen CD63 oder CD68 ausschließlich als allgemeine Zellmarker betrachtet wurden ($n = 483$). Darüber hinaus wurden 243 Studien ausgeschlossen, in denen lysosomale Proteinennamen irrtümlich als Bestandteil anderer Begriffe oder als Akronyme ohne funktionellen Bezug zum Lysosom identifiziert wurden. Fünf weitere Studien wurden entfernt, da trotz Nennung eines lysosomalen Proteins im Titel oder Abstract keine krankheitsrelevante Alteration berichtet wurde. Zwei Studien wurden zudem als Übersichtsarbeiten identifiziert und

ebenfalls aus der Analyse ausgeschlossen (vgl. Abb. 6). Die finale Auswertung basierte auf 2246 separaten Proteinbefunden aus 1619 individuellen Studien, in denen lysosomale Proteine im Zusammenhang mit Krankheitsprozessen identifiziert wurden. Die Zuordnung der Krankheitsklassen und deren Subklassen sowie die Einteilung in genomische, transkriptionelle oder proteomische Studien erfolgte auf Basis der im Titel und Abstract gemachten Angaben. Als Multiomiks-Analysen wurden Studien klassifiziert, in denen mindestens zwei in beliebiger Kombination oder alle drei Methodiken aus Genomik, Transkriptomik oder Proteomik eingesetzt wurden.

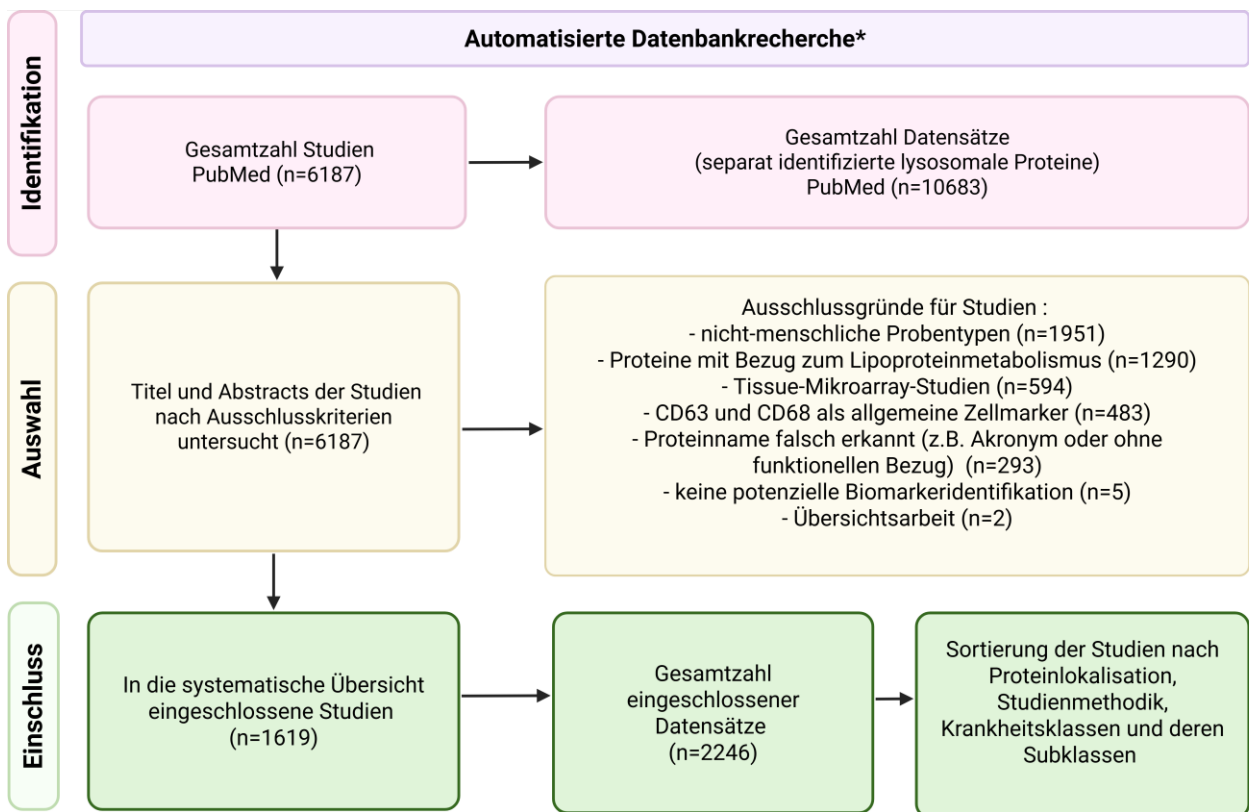


Abb. 6: Flussdiagramm nach der PRISMA Richtlinie über die Schritte der Identifikation, der Auswahl und des Einschlusses der Studien und Datensätze zur Analyse lysosomaler Proteine für die Übersichtsarbeit. Die Datensätze beschreiben die über alle Studien identifizierte Gesamtzahl potenzieller lysosomaler Proteine als Biomarker. *Alle Suchanfragen wurden mithilfe des easyPubMed 2.13-Packages in R-Version 4.2.2 in Kombination mit PubMed im Februar 2023 durchgeführt; n= Stichprobenumfang. Erstellt mit Biorender.com.

Für die proteomischen Studien wurde die Abdeckung lysosomaler Proteine in ungezielten massenspektrometrischen Analysen untersucht. Im Fokus stand der Vergleich der Detektionsraten in konventionellen Studien und sogenannten „Ultra-Deep-Coverage“-Ansätzen, die eine Kombination aus Depletions- und Fraktionierungsmethoden zur Probenvorbereitung einsetzten. Die Auswertung erfolgte auf Basis der in den Datenanhängen der Originalpublikationen gelisteten Proteinidentifikationen, wobei auch das jeweils verwendete Probenmaterial berücksichtigt wurde (vgl. Abb. 8). Zu diesem Zweck wurden aus den identifizierten proteomischen Studien jeweils bis zu fünf Arbeiten ausgewählt, die die höchste Abdeckung lysosomaler Proteine pro Ansatz und Probentyp aufwiesen, und exemplarisch dargestellt. Studien, die keine detaillierten Angaben machten, konnten nicht in die Folgeanalysen einbezogen werden.

Ergänzend wurden gezielte massenspektrometrische Verfahren im Hinblick auf ihre untersuchten lysosomalen Proteine ausgewertet. In die Analyse eingeschlossen wurden dabei nicht nur Studien, in denen lysosomale Proteine als potenzielle Biomarker untersucht wurden, sondern auch solche, in denen dieser Nachweis nicht gelang. Insgesamt wurden zwölf Studien ausgewertet, die gezielte massenspektrometrische Verfahren einsetzten. In sechs dieser Studien konnten lysosomale Proteine als potenzielle Biomarker identifiziert werden, während die übrigen sechs zwar gezielte Methoden verwendeten, jedoch in ihnen keine krankheitsassoziierten Proteinalterationen nachgewiesen wurden.

Durch die umfassende Gegenüberstellung wurde eine orientierende Bestandsaufnahme methodischer Ansätze zur Analyse lysosomaler Proteine in klinischen Proben ermöglicht, um die aktuellen Limitationen der Verfahren zu identifizieren und Potenziale für zukünftige Studien aufzuzeigen.

1.3 Ergebnisse

Nach Anwendung der oben beschriebenen Ausschlusskriterien wurden insgesamt 1.619 Studien in die finale Auswertung einbezogen, die mindestens eine Veränderung in Sequenz, Expression oder Menge von lysosomalen Genen, Transkripten oder Proteinen in Verbindung mit insgesamt 245 unterschiedlichen Krankheitsbildern aufwiesen. Insgesamt wurden 250 verschiedene lysosomale Proteine als potenzielle Biomarker identifiziert (vgl. Abb. 7).

Den größten Anteil machten onkologische Studien aus. 1009 Analysen deckten mindestens eine von insgesamt 52 Tumorentitäten ab und berichteten über Veränderungen bei 205 verschiedenen lysosomalen Proteinen. 127 Studien zu neurodegenerativen Erkrankungen berichteten über Veränderungen in mindestens einem von 58 verschiedenen lysosomalen Proteinen. In jeweils 68 Studien zu kardiovaskulären bzw. Autoimmunerkrankungen wurde mindestens eines von insgesamt 58 bzw. 31 lysosomalen Proteinen als potenzieller Biomarker beschrieben. Für metabolische Erkrankungen wurden in 54 Studien signifikante Veränderungen in mindestens einem von 40 unterschiedlichen lysosomalen Proteinen berichtet. Die Verteilung innerhalb der Proteinklassen (luminal, membranständig, assoziiert) zeigt eine deutliche Dominanz luminaler Proteine. Von den 78 bekannten luminalen Proteinen wurden 93 % in mindestens einer der analysierten Studien als potenzielle Biomarker beschrieben. Im Vergleich dazu wurden 70 % der membranständigen und 64 % der in die Auswertung einbezogenen, assoziierten Proteine in diesem Kontext genannt. Die am häufigsten identifizierten Vertreter ihrer jeweiligen Klasse waren CTSD (luminal, 64 Studien), SLC2A1 (membranständig, 80 Studien) und ANXA1 (assoziiert, 92 Studien).

Die methodische Aufschlüsselung zeigt, dass genomische (849 Studien) und transkriptomische (822 Studien) Ansätze nahezu doppelt so häufig zu Nachweisen führten wie proteomische Strategien (575 Studien). Diese Erkenntnis zeigt sich zudem unabhängig des analysierten Krankheitskontextes. Innerhalb der ungezielten massenspektrometrischen Arbeiten wurden insgesamt 137 lysosomale Proteine als potenzielle Biomarker identifiziert, 86 davon jedoch nur in ein oder zwei Studien. Vor allem

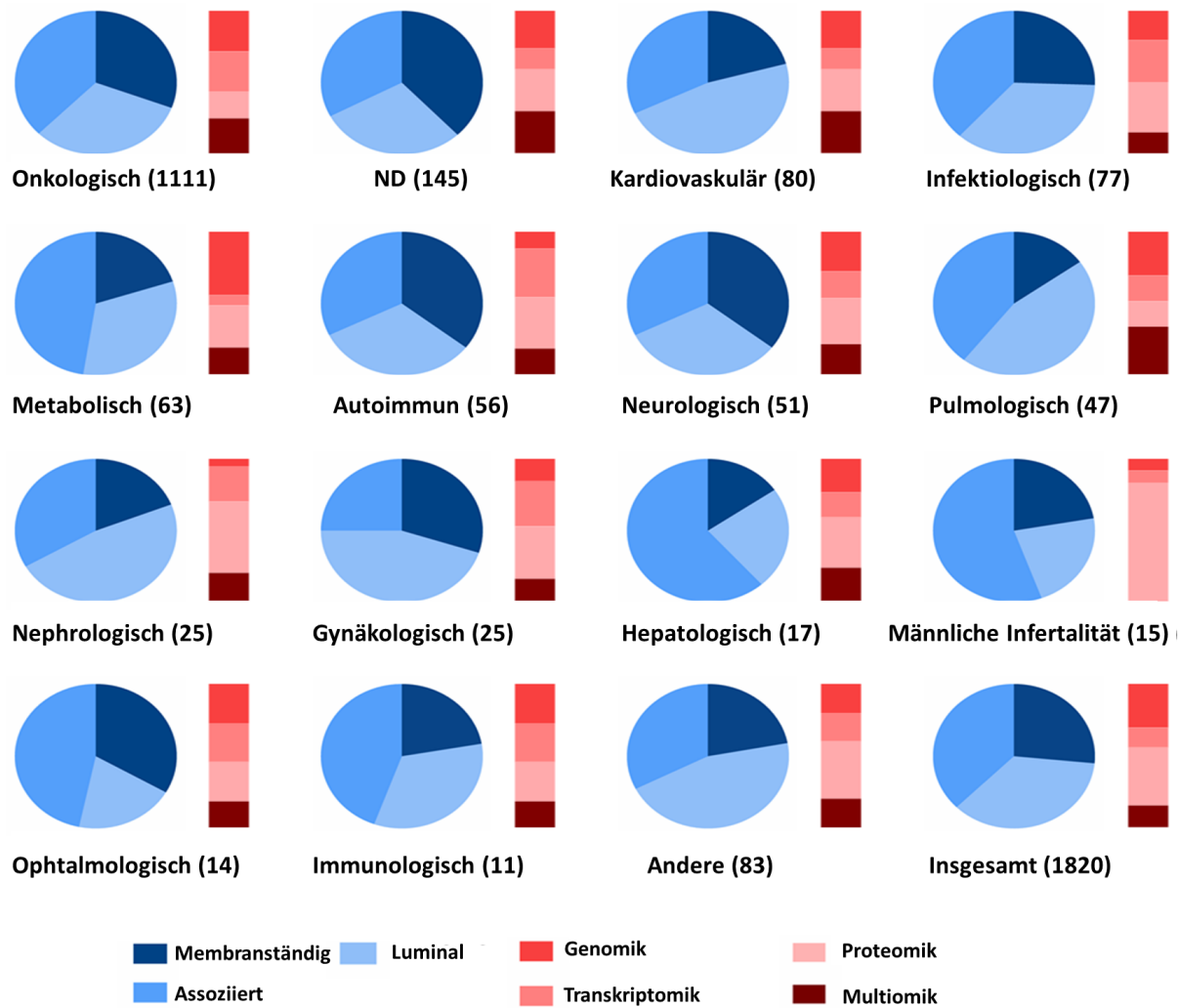


Abb. 7: Übersicht über die Identifikationen lysosomaler Proteine als potenzielle Biomarker, sortiert nach Krankheitsgruppen. Eingeschlossen wurden Publikationen, in denen mindestens ein lysosomales Protein als potenzieller Biomarker identifiziert wurde. Für die vollständige Liste siehe Tabelle S1 der Originalpublikation. Die Zuordnung erfolgte sowohl nach subzellulärer Lokalisation der Proteine (Luminal, Membranständig, Assoziiert; prozentuale Verteilung dargestellt im Kuchendiagramm) als auch nach dem eingesetzten Analyseverfahren (Genomik, Transkriptomik, Proteomik, Multiomik; prozentuale Verteilung dargestellt im Säulendiagramm). Angegeben ist jeweils die Anzahl der Studien pro Krankheitsgruppe (in Klammern). Es werden nur Krankheitskategorien mit mindestens zehn Studien dargestellt. ND = neurodegenerative Erkrankungen. (modifiziert nach Arora et al., 2023)

bei kardiovaskulären Erkrankungen sowie Lungen- und Nierenerkrankungen zeigte sich eine prozentuale Überrepräsentation von luminalen Proteinen, die als Biomarker identifiziert wurden. Assoziierte lysosomale Proteine wurden insbesondere im Kontext von

Lebererkrankungen als potenzielle Biomarker identifiziert. Für membranständige lysosomale Proteine zeigte sich eine Überrepräsentation in metabolischen Erkrankungen (vgl. Abb. 7). Die Proteine LAMP1 und LAMP2 zeigten mit jeweils dreizehn Identifikationen unter den Transmembranproteinen den höchsten Wert bei den proteomischen Studien an. Am Beispiel des transmembranösen Proteins SLC2A1 erkennt man, dass unter den 80 Studien, die SLC2A1 als Biomarker identifiziert haben, lediglich acht Studien einen proteomischen Ansatz hatten, während genomische und transkriptionelle Studien (31, respektive 41) den überproportionalen Hauptteil darstellen. Den gleichen Effekt kann man bei LIPA, NEDD4, DEPTOR, LAPTM5, IFITM1 oder IFITM3 beobachten. (vgl. Tabelle S1 der Originalpublikation)

Die Detektionsrate lysosomaler Proteine hing maßgeblich von der eingesetzten analytischen Tiefe ab. Ultra-Deep Studien kombinierten häufig Depletionstechniken zur Entfernung hochabundanter Proteine mit Fraktionierungsmethoden. Dabei kamen oft isotopebasierte Labelling-Strategien zum Einsatz, um fraktionierte Proben innerhalb eines Messdurchgangs vergleichbar zu machen. Solche Protokolle ermöglichten eine deutlich umfassendere Detektion luminaler, lysosomaler Proteine in allen untersuchten Probentypen. Dagegen erreichten konventionelle, nicht-fraktionierte Standardverfahren nur etwa die Hälfte der Nachweise. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei membranständigen und assoziierten Proteinen, die in Ultra-Deep-Studien in Gewebeproben eine Detektion von bis zu 80–90 % dieser Proteine ermöglichten, die Nachweisrate in Körperflüssigkeiten wie Liquor, Plasma und Urin selbst bei hoher analytischer Tiefe meist aber unter 50 % der identifizierbaren Proteine lag (vgl. Abb. 8). Die Studie mit der höchsten Identifikationsrate lysosomaler Proteine in Gewebeproben konnte insgesamt 75% (256 individuelle lysosomale Proteine) des gesamten lysosomalen Proteoms bei 109 Patienten mit Adenokarzinom der Lunge im Lungengewebe erfassen (Xu et al., 2020).

Während die Erfassung lysosomaler Proteine mittels ungezielter Verfahren demnach stark von der analytischen Tiefe abhängt und insbesondere bei niedrig-abundanten Proteinen an ihre Grenzen stößt, können sie durch gezielte massenspektrometrische Ansätze (SRM, MRM oder PRM) spezifisch adressiert werden. Durch die Fokussierung auf definierte Zielpeptide ermöglichen sie eine robuste Quantifizierung, auch in komplexen Proben und unabhängig von deren Gesamttiefe.

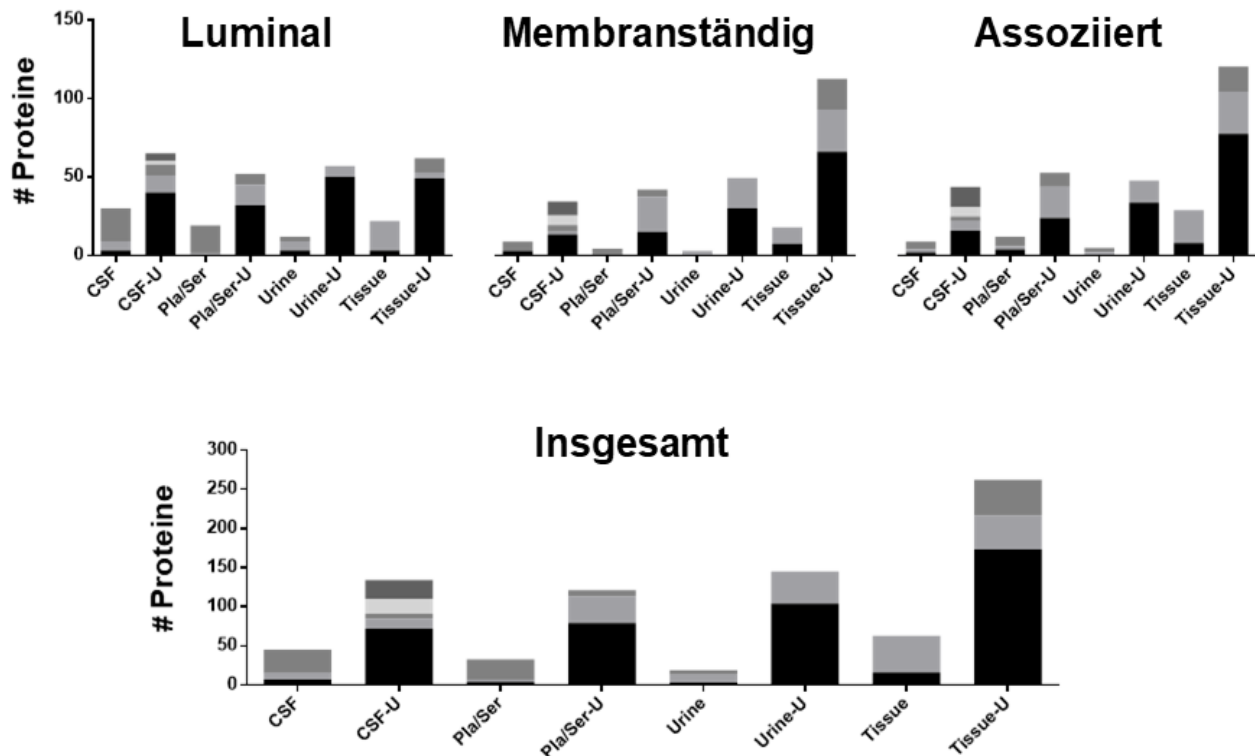


Abb. 8: Grafische Darstellung (Säulendiagramme) der Identifikationsraten lysosomaler Proteine in verschiedenen Studien und Probenotypen mittels ungezielter massenspektrometrischer Verfahren. Dargestellt sind absolute Proteinzahlen pro Studie insgesamt und unterteilt nach ihrer lysosomalen Lokalisation (Luminal, Membranständig und Assoziiert). Die zugrunde liegenden Studien sind mit unterschiedlichen Grautönen zur besseren Unterscheidung voneinander getrennt. Die Balken zeigen überlagert die Nachweiszahlen für die untersuchten Probenarten: CSF= cerebrospinal fluid (Liquor), Pla= Plasma, Ser= Serum, Tissue (Gewebe) und Urin; U= Ultra-Deep-Coverage. (modifiziert nach Arora et al., 2023)

Für humane Proben wurden bislang in zwölf Studien insgesamt 29 individuelle lysosomale Proteine in mindestens einer Studie gezielt analysiert (achtzehn luminal, fünf membranständig, sechs assoziiert). Das zum Zeitpunkt der Auswertung größte Assay umfasste dreizehn lysosomale Proteine, die im Liquor von Alzheimer- und Parkinson-Patienten mittels PRM quantifiziert wurden, mit signifikanten Veränderungen bei sieben untersuchten lysosomalen Proteinen (Sjodin et al., 2019). Für Pankreaskarzinome wurde TPP1 als potenzieller Früherkennungsmarker identifiziert (Ivry et al., 2019). Ergänzend wurden in Prostata- (Gabriele et al. 2019) und Brustkrebsstudien (Sjöström et al., 2015) glykosylierte Peptide aus Serum und Tumorgewebe zunächst mittels ungezielter MS und anschließend per gezieltem SRM quantifiziert. Dabei zeigten sich signifikante

Unterschiede bei CTSL, LAMP2 und CTSD. Für lysosomale Speicherkrankheiten wurden Immunpräzipitationen aus DBS und Wangenabstrichen in Kombination mit SRM für GAA und IDUA etabliert (Zhang et al., 2022), während GLB1 im Urin als potenzieller Biomarker bei MPS I–VI vorgeschlagen wurde (Heywood et al., 2015).

Ein technischer Engpass bei PRM ist die Retentionszeitverschiebung, die durch Internal Standard Triggered PRM (IS-PRM) umgangen werden kann, bei der stabile, isopenmarkierte Referenzpeptide zu den Proben hinzugefügt werden. Nur wenn das Standardpeptid detektiert wird, erfolgt die Fragmentierung des entsprechenden Zielpeptids (Gallien et al., 2015). Die Skalierbarkeit solcher Ansätze zeigt eine Studie mit 1.314 Proteinen, darunter 35 lysosomale Proteine, im Plasma von Brustkrebspatientinnen (Kennedy et al., 2022).

Neben MS-basierten Verfahren werden IMA und AMA verwendet, die zum Zeitpunkt der Publikation 87 bzw. 173 lysosomale Proteine abdeckten. Eine Multi-Plattform-Studie bei Alzheimer-Patienten deckte die Quantifizierung von 44 lysosomalen Proteinen per IMA, 104 per AMA und 126 mittels Ultra-Deep-MS für Liquor ab. Für Plasma lagen die Werte bei 47 (IMA), 147 (AMA) und 57 (MS) lysosomalen Proteinen (Dammer et al., 2022).

1.4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass lysosomale Proteine ein erhebliches Potenzial als krankheitsspezifische Biomarker besitzen, ihre zuverlässige Detektion jedoch spezifisch an die jeweiligen Probenarten und analytischen Herausforderungen angepasst werden muss. Bisher wird nur ein Bruchteil des bekannten lysosomalen Proteoms in klinischen Studien zuverlässig erfasst. Dieser Umstand liegt weniger an der biologischen Abwesenheit, sondern vor allem an methodischen Grenzen ungezielter proteomischer Verfahren. Während Ultra-Deep-Strategien mit aufwändiger Fraktionierung die Detektionsraten lysosomaler Proteine erhöhen können, sind sie aufgrund des hohen Materialbedarfs, Zeitaufwands und der limitierten Probenverfügbarkeit für größere klinische Kohorten nur eingeschränkt einsetzbar. Ergänzend ist anzumerken, dass lysosomale Proteine auch in AMA- und IMA-Plattformen bislang nur partiell abgedeckt sind.

Gezielte massenspektrometrische Verfahren umgehen diese Limitierungen, indem sie spezifische Zielpeptide mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit detektieren. Dadurch ermöglichen sie eine reproduzierbare Quantifizierung auch von niedrig-abundanten Proteinen in komplexen Proben. Am Mausmodell wurde bereits demonstriert, dass 278 bis 308 lysosomale Proteine in einem einzigen PRM-Assay erfasst werden können, während eine vergleichbare DIA-basierte Analyse im Lebergewebe lediglich 223 bis 243 Proteine identifizieren konnte (Mosen et al., 2021). Für humane Proben sind bisher noch keine Assays mit vergleichbarer Breite publiziert worden. Moderne Quadrupole Time-of-Flight (QTOF)-Geräte und insbesondere trapped ion mobility spectrometry – time-of-flight (timsTOF)-Instrumente mit Parallel Accumulation- Serial Fragmentation (PASEF)-Technologie ermöglichen eine erweiterte Abdeckung komplexer Proteome. Dabei werden die Ionen zunächst nach ihrer Mobilität getrennt, parallel angereichert und anschließend schrittweise fragmentiert. Diese Kombination resultiert in einer erhöhten Sensitivität, Massengenauigkeit und Scangeschwindigkeit, wodurch auch niedrig-abundante Proteine in komplexen Proben besser detektiert werden können (Brzhozovskiy et al., 2022). Eine zusätzliche Möglichkeit, Retentionszeitverschiebungen zu kompensieren, bieten IS-PRM-Verfahren, die größere Peptidpanels in einer einzigen Messung robust quantifizierbar machen könnten (Gallien et al., 2015).

Neben MS-basierten Verfahren gewinnen auch IMA und AMA-basierte Plattformen zunehmend an Bedeutung. Diese Technologien erreichen zum Zeitpunkt der zugrundeliegenden Publikation eine Abdeckung von etwa 26 % für IMA-Plattformen, respektive 51 % für AMA-Plattformen des lysosomalen Proteoms. Der Umfang analysierbarer Zielproteine hängt maßgeblich von der Verfügbarkeit hochaffiner und spezifischer Bindungspartner ab, die bislang nur eingeschränkt verfügbar sind. Zudem fehlt bei AMA- und IMA-basierten Plattformen bislang eine systematische Validierung hinsichtlich der Detektionsfähigkeit von Proteinisoformen und posttranslationalen Modifikationen. Auch die quantitative Leistungsfähigkeit dieser Verfahren ist bislang nur unzureichend charakterisiert. Mittelfristig könnten diese technologischen Fortschritte zu einer konkurrenzfähigen Alternative beitragen. Derzeit stellt die MS-basierte Analyse jedoch eine breitere Abdeckung dar, um lysosomale Proteine sensitiv und in modifizierten Formen zuverlässig zu erfassen (Dammer et al., 2022).

In proteomischen Studien werden luminale und assoziierte lysosomale Proteine deutlich häufiger als potenzielle Biomarker identifiziert als membranständige lysosomale Proteine. Das liegt zum einen an methodischen Herausforderungen bei der Analyse komplexer humaner Proben wie Liquor, Plasma oder Urin, insbesondere bei Proteinen mit sehr niedriger Konzentration. Zum anderen erschwert die eingeschränkte Löslichkeit membranständiger Proteine, bedingt durch ihre Einlagerung in Lipidmembranen, deren zuverlässige Extraktion und Analyse. Dennoch wird ihre potenzielle klinische Relevanz auf genomischer und transkriptioneller Ebene in vergleichbarem Maße erkannt, da diese Ansätze auf DNA- oder RNA-Ebene arbeiten und somit unabhängig von der subzellulären Lokalisation oder Löslichkeit des jeweiligen Proteins sind.

Diese Ergebnisse belegen, dass lysosomale Proteine trotz methodischer Herausforderungen ein hohes Potenzial als diagnostische oder prognostische Biomarker besitzen. Sie spiegeln pathophysiologische Prozesse wider, die sowohl bei seltenen LSDs als auch bei häufigen Krankheitsbildern wie Tumoren und neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielen. Für die Zukunft ist es daher wesentlich, technische Fortschritte zu nutzen, um eine umfassendere Abdeckung des lysosomalen Proteoms, beispielsweise durch schnellere Scangeschwindigkeiten, PASEF-basierte Verfahren oder die Etablierung umfassender, gezielter MS-Assays zu gewährleisten. Darüber hinaus sollten Muster lysosomaler Proteine verstärkt daraufhin untersucht werden, inwieweit sie genutzt werden können, um krankheitsspezifische Signaturen zu definieren und so die Diagnostik zu verbessern.

Die Ergebnisse der Übersichtsarbeit liefern wichtige Hinweise, die jedoch im Rahmen einiger analytischer und konzeptueller Bedingungen zu betrachten sind. Die Auswertung stützt sich ausschließlich auf veröffentlichte Daten und ist somit von der Qualität und Vollständigkeit der Primärpublikationen abhängig. Eine unabhängige Analyse der Rohdaten fand nicht statt. Potenzielle Inkonsistenzen in Studiendesign, Probenbearbeitung oder Dateninterpretation konnten daher nicht überprüft werden. Zudem wurde keine Gewichtung der Studien nach Kohortengröße, methodischer Qualität oder technischer Ausstattung vorgenommen. Die Leistungsfähigkeit verschiedener Analyseverfahren wurde aus Studien verglichen, die sich in Probenotyp, Fraktionierungstiefe und Detektionsmethoden unterscheiden. Für IMA- und AMA-

Plattformen fehlten zum Zeitpunkt der Erstellung belastbare Direktvergleiche mit Ultra-Deep-MS-Strategien, insbesondere im Hinblick auf Isoformen und posttranslationale Modifikationen (Dayon et al., 2022).

Trotz dieser Einschränkungen stellt die zugrundeliegende Arbeit zum Zeitpunkt der Fertigstellung (Juli 2025) einen in Tiefe und Systematik einzigartigen Überblick dar. Neuere Studien aus dem Zeitraum März 2023 bis Juli 2025 ergänzen den vorhandenen Datensatz nur in begrenztem Umfang, während die Diskussion um lysosomale Proteine als Biomarker weiterhin aktuell bleibt. Darüber hinaus bleibt die methodische Bewertung gängiger Proteomikverfahren relevant, da die differenzierte Einordnung massenspektrometrischer Analysestrategien und der Einfluss von Depletions- und Fraktionierungsverfahren nach wie vor entscheidend für die Konzeption neuer Studien ist. Schließlich behält auch der technologische Ausblick seine Gültigkeit, da die in der Arbeit beschriebenen methodischen Limitationen und die Perspektiven für weiterentwickelte Verfahren weiterhin bestehen. Die Kombination etablierter Techniken mit neuen Ansätzen wie PRM-PASEF spiegeln den aktuellen Stand der Forschung wider. Mit der Astral-Technologie (Thermo Fisher Scientific) steht allerdings ein neues Hochleistungs-MS-System zur Verfügung, das eine nahezu verlustfreie Ionenübertragung ermöglicht und zu einer erhöhten Sensitivität, Scangeschwindigkeit und Massengenauigkeit führt. So können mit DIA beispielsweise bis zu fünfmal mehr Peptide pro Zeiteinheit detektiert werden als mit klassischen Orbitrap-Instrumenten (Heil et al., 2023; Hendricks et al., 2024; Serrano et al., 2024).

Insgesamt liefert die Arbeit damit eine belastbare Grundlage, um lysosomale Proteine hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz und ihren diagnostischen Herausforderungen systematisch zu bewerten und methodisch geeignete Strategien für ihre translationale und klinische Nutzung zu entwickeln.

1.5 Zusammenfassung

Lysosomen erfüllen essenzielle Aufgaben im zellulären Abbau, Recycling und in der Signalweiterleitung. Funktionelle Störungen dieses Organells stehen in Verbindung mit einer Vielzahl pathologischer Zustände, darunter Speichererkrankungen, neurodegenerative Prozesse und Tumorerkrankungen. Vor diesem Hintergrund rücken lysosomale Proteine zunehmend als potenzielle Biomarker in den Fokus. Ihre diagnostische Nutzbarkeit wird jedoch durch analytische Herausforderungen bei ihrer zuverlässigen Erfassung in biologischen Proben begrenzt.

Die literaturweite, systematische Recherche hatte zum Ziel, lysosomale Proteine als potenzielle Biomarker zu evaluieren und methodische Ansätze zu deren Detektion in klinischen Proben vergleichend darzustellen. Die Analyse umfasste insgesamt 1619 Studien, die verschiedenste klinische Probenmaterialien mittels genomischer, transkriptomischer oder proteomischer Verfahren untersuchten. In diesen Datensätzen konnten insgesamt 250 verschiedene lysosomale Gene, Transkripte oder Proteine in 245 Krankheitsentitäten als potenzielle Biomarker identifiziert werden.

Die Analyse zeigt, dass luminale und assoziierte lysosomale Proteine am häufigsten als potenzielle Biomarker beschrieben wurden, während membranständige lysosomale Proteine seltener als verändert detektiert werden konnten. Methodisch konnten ungezielte proteomische Ansätze eine breite Übersicht über das gesamte Proteom der untersuchten humanen Proben liefern, wiesen jedoch eine unzureichende Abdeckung lysosomaler Proteine auf. Dies konnte insbesondere auf Unter-Sampling-Effekte und die typischerweise niedrige Abundanz lysosomaler Proteine zurückgeführt werden. Ultra-Deep-Proteomics konnte eine verbesserte Detektion erreichen, ist jedoch im klinischen Routinelabor schwer umsetzbar. Es konnte gezeigt werden, dass lysosomale Proteine grundsätzlich in sämtlichen untersuchten, humanen Probenmaterialien detektierbar sind. Ihre Detektion und ihr damit verbundenes Potential als Biomarker zu fungieren, ist jedoch stark von der analytischen Tiefe abhängig ist. Gezielte massenspektrometrische Verfahren (PRM, SRM, MRM) ermöglichten hingegen eine sensitive und reproduzierbare Quantifizierung lysosomaler Proteine auch in komplexen klinischen Proben und stellen damit eine praktikable Strategie zur Etablierung lysosomaler Proteine als Biomarker dar.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Arora D, Hackenberg Y, Li J, Winter D. Updates on the study of lysosomal protein dynamics: possibilities for the clinic. *Expert Rev Proteomics* 2023; 20: 47–55

Ballabio A. The awesome lysosome. *EMBO Mol Med* 2016; 8: 73–76

Ballabio A, Bonifacino JS. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21: 101–118

Brzhozovskiy A, Kononikhin A, Bugrova AE, Kovalev GI, Schmit PO, Kruppa G. The Parallel Reaction Monitoring-Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (prm-PASEF) Approach for Multiplexed Absolute Quantitation of Proteins in Human Plasma. *Anal Chem* 2022; 94: 2016–2022

Burgess MW, Keshishian H, Mani DR, Gillette MA, Carr SA. Simplified and efficient quantification of low-abundance proteins at very high multiplex via targeted mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics MCP* 2014; 13: 1137–1149

Chang D, Nalls MA, Hallgrímsdóttir IB, Hunkapiller J, van der Brug M, Cai F. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. *Nat Genet* 2017; 49: 1511–1516

Dammer EB, Ping L, Duong DM, Modeste ES, Seyfried NT, Lah JJ. Multi-platform proteomic analysis of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid and plasma reveals network biomarkers associated with proteostasis and the matrisome. *Alzheimers Res Ther* 2022; 14: 174

Darie-Ion L, Petre BA. An update on multiplexed mass spectrometry-based lysosomal storage disease diagnosis. *Mass Spectrom Rev* 2024; 43: 1135–1149

Dayon L, Cominetti O, Affolter M. Proteomics of human biological fluids for biomarker discoveries: technical advances and recent applications. *Expert Rev Proteomics* 2022; 19: 131–151

Domon B, Gallien S. Recent advances in targeted proteomics for clinical applications. *Proteomics Clin Appl* 2015; 9: 423–431

Fassio A, Falace A, Esposito A, Aprile D, Guerrini R, Benfenati F. Emerging Role of the Autophagy/Lysosomal Degradative Pathway in Neurodevelopmental Disorders With Epilepsy. *Front Cell Neurosci* 2020; 14: 39

Fernández-Costa C, Martínez-Bartolomé S, McClatchy DB, Saviola AJ, Yu NK, Yates JR. Impact of the Identification Strategy on the Reproducibility of the DDA and DIA Results. *J Proteome Res* 2020; 19: 3153–3161

Gabriele C, Cantiello F, Nicastri A, Crocerossa F, Russo GI, Cicione A. High-throughput detection of low abundance sialylated glycoproteins in human serum by TiO₂ enrichment and targeted LC-MS/MS analysis: application to a prostate cancer sample set. *Anal Bioanal Chem* 2019; 411: 755–763

Gallien S, Kim SY, Domon B. Large-Scale Targeted Proteomics Using Internal Standard Triggered-Parallel Reaction Monitoring (IS-PRM). *Mol Cell Proteomics MCP* 2015; 14: 1630–1644

Heil LR, Damoc E, Arrey TN, Pashkova A, Denisov E, Petzoldt J. Evaluating the Performance of the Astral Mass Analyzer for Quantitative Proteomics Using Data-Independent Acquisition. *J Proteome Res* 2023; 22: 3290–3300

Hendricks NG, Bhosale SD, Keoseyan AJ, Ortiz J, Stotland A, Seyedmohammad S. An Inflection Point in High-Throughput Proteomics with Orbitrap Astral: Analysis of Biofluids, Cells, and Tissues. *J Proteome Res* 2024; 23: 4163–4269

Heywood WE, Camuzeaux S, Doykov I, Patel N, Preece RL, Footitt E. Proteomic Discovery and Development of a Multiplexed Targeted MRM-LC-MS/MS Assay for Urine Biomarkers of Extracellular Matrix Disruption in Mucopolysaccharidoses I, II, and VI. *Anal Chem* 2015; 87: 12238–12244

Ivry SL, Knudsen GM, Caiazza F, Sharib JM, Jaradeh K, Ravalin M. The lysosomal aminopeptidase tripeptidyl peptidase 1 displays increased activity in malignant pancreatic cysts. *Biol Chem* 2019; 400: 1629–1638

Jiang Y, Rex D, ArokiaBalaya, Schuster D, Neely BA, Rosano GL, Volkmar N. Comprehensive Overview of Bottom-Up Proteomics Using Mass Spectrometry. *ACS Meas Sci Au* 2024; 4: 338–417

Kennedy JJ, Whiteaker JR, Ivey RG, Burian A, Chowdhury S, Tsai CF. Internal Standard Triggered-Parallel Reaction Monitoring Mass Spectrometry Enables Multiplexed Quantification of Candidate Biomarkers in Plasma. *Anal Chem* 2022; 94: 9540–9547

Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 2008; 4: 222

Machado ER, Annunziata I, van de Vlekkert D, Grosveld GC, d'Azzo A. Lysosomes and Cancer Progression: A Malignant Liaison. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 642494

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 1999; 281: 249–254

Mosen P, Sanner A, Singh J, Winter D. Targeted Quantification of the Lysosomal Proteome in Complex Samples. *Proteomes* 2021; 9: 4

Muthukottiappan P, Winter D. A proteomic view on lysosomes. *Mol Omics* 2021; 17: 842–859

Nixon RA. The aging lysosome: An essential catalyst for late-onset neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics* 2020; 1868: 140443

Piao S, Amaravadi RK. Targeting the lysosome in cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2016; 1371: 45–54

Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF, Tifft CJ. Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primer* 2018; 4: 27

Serrano LR, Peters-Clarke TM, Arrey TN, Damoc E, Robinson ML, Lancaster NM. The One Hour Human Proteome. *Mol Cell Proteomics MCP* 2024; 23: 100760

Singh SS, Vats S, Chia AYQ, Tan TZ, Deng S, Ong MS. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* 2018; 37: 1142–1158

Sjödin S, Brinkmalm G, Öhrfelt A, Parnetti L, Paciotti S, Hansson O. Endo-lysosomal proteins and ubiquitin CSF concentrations in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Alzheimers Res Ther* 2019; 11: 82

Sjöström M, Ossola R, Breslin T, Rinner O, Malmström L, Schmidt A. A Combined Shotgun and Targeted Mass Spectrometry Strategy for Breast Cancer Biomarker Discovery. *J Proteome Res.* 2015; 14: 2807–2818

Tu C, Ortega-Cava CF, Chen G, Fernandes ND, Cavallo-Medved D, Sloane BF. Lysosomal cathepsin B participates in the podosome-mediated extracellular matrix degradation and invasion via secreted lysosomes in v-Src fibroblasts. *Cancer Res.* 15. November 2008; 68: 9147–9156

Whiteaker JR, Paulovich AG. Peptide immunoaffinity enrichment coupled with mass spectrometry for peptide and protein quantification. *Clin Lab Med* 2011; 31: 385–396

Xu JY, Zhang C, Wang X, Zhai L, Ma Y, Mao Y, Qian K, Sun C, Liu Z, Jiang S, Wang M, Tan M. Integrative Proteomic Characterization of Human Lung Adenocarcinoma. *Cell* 2020; 182: 245-261

Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 15077–15082

Zhang T, Duong P, Dayuha R, Collins CJ, Beckman E, Thies J, . A rapid and non-invasive proteomic analysis using DBS and buccal swab for multiplexed second-tier screening of Pompe disease and Mucopolysaccharidosis type I. *Mol Genet Metab* 2022; 136: 296–305

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Arora, D*, Hackenberg, Y*, Li, J, Winter, D. Updates on the study of lysosomal protein dynamics: possibilities for the clinic. Expert Review of Proteomics 2023 20, 47–55

*geteilte Erstautorenschaft

<https://doi.org/10.1080/14789450.2023.2190515>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Medizinische Fakultät der Universität Bonn, unter der Betreuung von Prof. Dr. Dominic Winter durchgeführt.

Die Konzeptualisierung der wissenschaftlichen Arbeit erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Dominic Winter und Frau Dhriti Arora. Die systematische Literatursuche sowie die Auswahl der einzuschließenden Studien wurden von mir eigenständig erarbeitet und umgesetzt. Bei der Erstellung des R-Skripts wurde ich von Dr. Robert Hardt unterstützt. Die Auswertungen der Ergebnisse, einschließlich der Kategorisierung nach Erkrankungsgruppen, der Analyse der verwendeten OMICS-Methoden und der Erfassung der identifizierten lysosomalen Proteine, wurden ebenfalls eigenständig von mir durchgeführt. Der methodische Vergleich der unterschiedlichen proteomischen Ansätze zur Detektion lysosomaler Proteine in klinischen Proben stellt einen wesentlichen Eigenanteil dieser Arbeit dar. An der Erstellung der Einleitung, der Diskussion und der Gestaltung der Grafiken habe ich gemeinsam mit Frau Dhriti Arora gearbeitet.

Zur Verbesserung der Lesbarkeit und sprachlichen Qualität dieser Dissertationsschrift habe ich Chat-GPT (Modell GPT-4o) verwendet. Nach der Verwendung des Tools wurden alle Passagen von mir überprüft, angepasst und ich übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt dieser Arbeit.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen und mich während ihrer Entstehung in vielfältiger Weise unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dominic Winter, der mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses Forschungsthema im Rahmen meiner Dissertation zu bearbeiten und weiterzuentwickeln. Für seine fachliche Begleitung, seine konstruktiven Anregungen sowie seine stets offene und unterstützende Haltung während des gesamten Projekts bin ich ihm sehr dankbar. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Becker, dem Leiter des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie, für seine übergeordnete Unterstützung und die Bereitstellung der notwendigen wissenschaftlichen Infrastruktur.

Meinen aufrichtigen Dank möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe Winter, insbesondere Frau Dhriti Arora, für die engagierte Mitarbeit im Rahmen der zugrunde liegenden Originalpublikation aussprechen. Die stets hilfsbereite, freundschaftliche Atmosphäre sowie die fachliche Unterstützung innerhalb der Gruppe haben maßgeblich zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank geht an meine Partnerin Annika Liebetrau, die mich über die gesamte Promotionszeit hinweg mit großem Verständnis, beständigem Rückhalt und durch sorgfältiges Korrekturlesen begleitet und unterstützt hat.

Abschließend danke ich meinen Eltern und Brüdern für ihre fortwährende Unterstützung, ihren Zuspruch und ihr Vertrauen. Sie waren nicht nur während dieser Arbeit, sondern über all die Jahre hinweg ein echter Rückhalt und haben mein Studium und diese Dissertation erst ermöglicht.