

Daniel Hartmann
Dr. med.

Identifizierung und Charakterisierung von Serum-Proteinbiomarkern für die Diagnose und Prognose von Erkrankungen des Pankreas

Geboren am 13. August 1980 in Frankfurt am Main
Staatsexamen am 20. Juni 2008 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Helmut Friess

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung neuer Biomarker zur Frühdiagnostik und zuverlässigen Abgrenzung von Erkrankungen des Pankreas durch Analyse krankheitsbedingter Proteinveränderungen im Serum. Das Hauptaugenmerk lag hierbei zum einen auf der Identifizierung neuer Biomarker für die chronische Pankreatitis (CP) und zum anderen auf der Validierung und Charakterisierung der durch einen anderen Doktoranden der Arbeitsgruppe, namentlich Michael Ehmann, identifizierten Pankreaskarzinom-Biomarker Transthyretin (TTR), Apolipoprotein A-I (Apo A-I) und Apolipoprotein A-II (Apo A-II).

Ausgehend von der Annahme, dass ein perfundiertes erkranktes Organ durch Freisetzung von abnormalen Protein-Spaltprodukten und modifizierten Proteinen im Vergleich zum gesundem Organperfusat ein verändertes Serum-Proteinprofil aufweist, führten wir Studien zum Protein-Expressionsprofiling an Serumproben von Patienten mit chronischer Pankreatitis (CP) und duktalem Pankreasadenokarzinom (PDAC) durch.

Mittels Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Massenspektrometrie (SELDI-TOF-MS) wurden Serumproben von 58 CP- und 96 PDAC-Patienten sowie 92 Kontrollseren auf differentiell exprimierte Proteine hin untersucht. Hierzu wurden die Seren zunächst durch Anionenaustauscherchromatographie fraktioniert und die entsprechenden Serumfraktionen auf zwei unterschiedlichen chromatographischen Oberflächenkombinationen (IMAC-30 Cu²⁺ und CM10-ProteinChips[®]) analysiert. Insgesamt wurden somit über 2.000 Massenspektren mit ca. 200.000 Peaks generiert. Die biostatistische Auswertung der Proteinprofile ergab über 900 unterschiedlich exprimierte Proteinpeaks im m/z-Bereich zwischen 3,3 und 33 kD, darunter 98 zwischen den Untersuchungsgruppen hochsignifikant

differenziell exprimierte Einzelmarker. Durch die Kombination zweier Biomarker in Form eines Klassifikationsalgorithmus konnten 96% der Kontroll- und 84% der CP-Proben korrekt zugeordnet werden.

Nach der biostatistischen Auswertung wurden die sich als signifikant erweisenden Proteine der gepoolten Serumproben über Membranfilter angereichert, durch Immundepletionsassays bzw. SDS-PAGE aufgetrennt und tryptisch verdaut. Die Analyse der resultierenden proteolytischen Fragmente erfolgte mittels MALDI-TOF MS durch Fragmentionen- bzw. Post source decay-Analysen und Suche der Peptidmassen in Protein-, EST- und genomischen Datenbanken mithilfe des Mascot-Suchalgorithmus. Zur Validierung ausgewählter Einzelmarker wurde eine abschließende ELISA-Analyse durchgeführt.

Die ermittelten Peptid-Fragmentierungsdaten ermöglichten die Bestätigung der bereits zuvor durch Herrn Ehmann identifizierten Proteine Transthyretin (TTR), Apolipoprotein A-I und A-II als auch die in unserer Arbeitsgruppe erstmalige Identifizierung der Proteine Osteopontin (OPN), Retinol Binding Protein 4 (RBP4), Serum Amyloid A (SAA), Apolipoproteine C-I, C-II und C-III als potentielle Serumbiomarker für Erkrankungen des Pankreas.

Im Vergleich zu den Proben gesunder Probanden waren alle fünf Apolipoproteine und TTR sowohl in der PDAC-, als auch in der CP-Gruppe durch einen signifikanten Konzentrationsabfall gekennzeichnet. Darüber hinaus wurden unterschiedlich prozessierte Formen der Proteine Apo C-II und TTR beobachtet. Beim Vergleich der PDAC- mit Kontrollproben zeigten sich die Proteine OPN, RBP4 und SAA nicht differentiell exprimiert, wiesen jedoch in der Gruppe der CP-Patienten signifikant verringerte Werte auf, so dass sie als potentielle CP-Serummarker in Betracht gezogen werden können. In einer Kooperationsarbeit mit dem Universitätsklinikum Jena konnte zudem der potentielle PDAC-Biomarker Hitzeschockprotein 27 (HSP27) identifiziert werden. Die nachfolgende ELISA-Analyse verifizierte die 3,8fache Serumkonzentrationserhöhung von HSP27 bei PDAC-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe. Die Validierung der Kandidatenbiomarker Apo A-I- und TTR mittels ELISA zeigte eine zunehmende Serumkonzentrationsabnahme von gesunden Probanden über CP- zu PDAC-Patienten und bestätigte die zuvor gemachten Beobachtungen.

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass Serum von CP- und PDAC-Patienten durch einen signifikanten Konzentrationsabfall von Akute-Phase-Proteinen und deren postrationalen Modifikationen gekennzeichnet ist. Die mittels ELISA-Analysen bestätigte graduell verminderte Apo A-I- und TTR-Serumkonzentration von gesunden Probanden über CP- zu PDAC-Patienten weist darauf hin, dass der krebsassoziierte Konzentrationsabfall einen stärkeren Einfluss als die durch chronische Entzündung bedingte Störung des Akute-

Phase-Proteingleichgewichts haben könnte. Zur Beurteilung der klinischen Relevanz der in dieser Arbeit identifizierten bzw. bestätigten potentiellen CP- und PDAC-Serumbiomarker sind jedoch weitere Studien erforderlich. Insbesondere im Hinblick auf ihre diagnostische Wertigkeit sollten die Proteinbiomarker bei anderen Tumorentitäten und benignen Erkrankungen anhand eines größeren Probenkollektiv näher evaluiert werden.