



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Identifizierung neuer Tumormarker mittels massenspektrometrie-basierter Proteomik Profiling Methoden

Autor: Teresa Peccerella
Institut / Klinik: Institut für Klinische Chemie
Doktorvater: Prof. Dr. M. Neumaier

Derzeit bekannte prognostische Tumormarker für das maligne Melanom sind kaum bei Patienten im Frühstadium einsetzbar. Daher ging es in der Frühphase des Projektes darum, mittels massenspektrometrie-basierten Proteomik-Profilings neue prognostische Marker für das Melanom zu identifizieren und so gefundene Kandidaten zu validieren.

Zwei verschiedene Sets an Serumproben von insgesamt 596 Melanompatienten wurden untersucht. Das erste Set (197 Patienten aus Stadium I und IV) wurde mit MALDI TOF MS vermessen. Dies führte zur Identifikation eines neuen Markerkandidaten, Serum Amyloid A. Die Validierung erfolgte an einem zweiten, unabhängigen Set (379 Patienten aus den Stadien I-IV). Außerdem wurden in diesem Set auch die Konzentrationen bereits bekannter Marker (S100B, Laktatdehydrogenase und C-reaktives Protein) über Immunoassays bestimmt. Die Analyse der bereits bekannten Marker diente zur Kontrolle der Validität des Ansatzes.

Hohe Signalintensitäten für den SAA-Peak korrelierten mit schlechten Überlebensprognosen. Des Weiteren zeigte sich SAA als guter prognostischer Marker für die Stadien I-III. Die Kombination von SAA und CRP verbesserte die prognostische Bedeutung der einzelnen Marker für Patienten im Frühstadium und war damit wirkungsvoller als S100B in Bezug auf die Vorhersage der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass Serum eine schwierige Matrix für die Identifikation neuer Tumormarker ist - gerade über massenspektrometrische Methoden, denn SAA ist ein Akut-Phase Protein und keinesfalls ein tumorspezifischer Marker. Neben der komplexen Präanalytik werden mögliche Markerkandidaten durch andere, im Serum vorhandenen, hochabundante Proteine überdeckt. Daher wurden in einem neuen Ansatz exogene Reporter-Peptide eingesetzt, um als Substrate für krankheitsassoziierte Proteasen zu dienen. Hierdurch sollte die Klassifikationsgenauigkeit erhöht und gleichzeitig eine Möglichkeit geschaffen werden, präanalytisch bedingte Variabilität zu verringern. Ein rekombinantes Fragment des APC-Proteins wurde tryptisch verdaut, um einen Peptidmix für das Reporter-Peptid-Spiking zu erzeugen. Um die Auswirkungen auf die Klassifikationsgenauigkeit zu demonstrieren, wurden Serumproben von Tumorpatienten und gesunden Kontrollen mit besagten Reporter-Peptiden inkubiert. Die Klassifikationsgenauigkeit ließ sich dadurch um 11 % steigern.

Im nächsten Schritt wurde dieser Erfolg versprechende Ansatz weiterentwickelt, mit dem Fokus auf ein Profiling endoproteolytischer Aktivität. Synthetische Reporter-Peptide wurden systematisch durch den Einsatz von Affinitätstags, Linkern und stabilisierenden Elementen optimiert. Die durch Endoproteasen gespaltenen Peptidfragmente wurden mithilfe affinitätschromatografischer Methoden extrahiert und im Anschluss massenspektrometrisch analysiert. In einer Pilotstudie wurde ein solches optimiertes Reporterpeptid erfolgreich verwendet, um Serumproben von Kolorektumkarzinompatienten und gesunden Kontrollen zu klassifizieren. Die sequenzielle affinitätschromatografische Reinigung über Biotin- sowie 6xHis-Tags zeigte sich der Reinigung über das 6xHis-Tag alleine in Bezug auf die Sensitivität überlegen. Die Methode weist eine gute Reproduzierbarkeit auf und die Unterschiede in proteolytischer Aktivität zwischen den untersuchten Kollektiven waren signifikant. Auch die Machbarkeit einer Erweiterung auf andere Tumorentitäten sowie die Verwendung mehrerer Sonden für ein sogenanntes Multiplexing konnten gezeigt werden.

Die hier entwickelte Methode könnte in naher Zukunft zu einem funktionellen massenspektrometrie-basierten Protease-Profilings und damit zu einer verbesserten Klassifizierung von Tumorerkrankungen führen.