

Michael Ehmann  
Dr. med.

## **Über vergleichendes Serum-Protein-Profilings zur Detektion und Charakterisierung von neuen Biomarkern zur Diagnose des Pankreaskarzinoms**

Geboren am 19.10.1978 in Sinsheim  
Staats-Examen am 14.12.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie  
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. H. Friess

Durch die Früherkennung des Pankreaskarzinoms (PaCa) wird sowohl die Heilungschance als auch die Lebensqualität der Patienten verbessert. Da das PaCa meist im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, ist die Früherkennung ein wesentlicher Schlüssel zur Verbesserung der schlechten Prognose.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, nach vorausgehender Etablierung der SELDI-TOF-MS Methode, die Identifizierung krankheitspezifischer Serumproteinprofile und Biomarker für das Pankreaskarzinom in Abgrenzung zu einem gesunden Kontrollkollektiv und zu chronischer Pankreatitis (CP) für eine verbesserte Frühdiagnostik und Differentialdiagnose. Nach Durchführung der Vorversuche zur Validierung der idealen Serum-Gewinnungs- und Aufarbeitungsprotokolle, und Eruiieren der idealen Parameter zur Vermessung der einzelnen Proben, wurden Serumproteinprofile mit Hilfe der SELDI-TOF-MS erstellt und untersucht, um Seren von an einem Pankreaskarzinom erkrankten Patienten in Gegenüberstellung zu Seren eines gesunden Kontrollkollektivs unterscheiden zu können. Bereits in PaCa-Frühsstadien, die mit bildgebenden Verfahren ohne sicheren Befund bleiben, könnten charakteristische Marker zu finden sein, die mit Hilfe des vergleichenden Serumprofilings detektierbar sein könnten. Dies bedingt die Annahme, dass durch das vorhandene Tumorgewebe das Serum-Proteom, im Gegensatz zum Gesunden, Änderungen, wie zum Beispiel beschleunigten Abbau von Proteinen, durch vom Tumor abgesonderte Proteasen oder Bildung von Proteinen durch den Tumor, aufweist.

Mittels SELDI-TOF-MS, die eine Kombination aus Chromatographie und Massenspektrometrie darstellt und als Erweiterung der „matrix-assisted laser desorption/ionization“ (MALDI-TOF-MS) aufgefasst werden kann, wurden Serumproben von PaCa-Patienten mit Kontrollseren von gesunden freiwilligen Probanden auf die Proteinzusammensetzung hin untersucht und nach Serum Markern gesucht, die diese beiden Gruppen voneinander eindeutig trennen. Nach Fraktionierung mit Hilfe der

Anionenaustauscherchromatographie und anschließender Vermessung auf zwei verschiedenen chemischen Chipoberflächen mit SELDI-TOF-MS ergaben sich insgesamt über 1200 Massenspektren. Die daraus resultierenden Daten wurden biostatistisch ausgewertet, wobei sich 24 Peaks mit hochsignifikanten p-Werten herauskristallisierten. Ein Markerprotein mit 17,27 kDa, dessen durchschnittliche Peakintensität verglichen mit den gesunden Kontrollproben mehr als 2-fach erniedrigt war, wies einen besonders niedrigen p-Wert, sowohl auf den verschiedenen Chips, als auch in den verschiedenen Fraktionen auf. Dieser Protein-Peak war der beste Einzelmarker, um die PaCa-Gruppe von der gesunden Kontrollgruppe zu unterscheiden und wies eine Sensitivität von 89% und Spezifität von 92% auf. Durch Kombination von drei potentiellen Markern in einer Multivariatanalyse konnte sogar eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 98% im Trainingsset erreicht werden. Diese Marker wurden mit Hilfe von Membranfiltern einer Anreicherung unterzogen und mit SDS-PAGE aufgetrennt, bevor sie den weiteren massenspektrometrischen Analysen zu Identifizierung unterzogen werden konnten. Unter Anwendung von MALDI-TOF-MS und Proteindatenbanksuche konnten schließlich die drei Proteine Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein A-II und Transthyretin erstmalig als PaCa-Serumbiomarker identifiziert werden. Darüber hinaus wurde in ersten Versuchen auch die Abgrenzung zur chronischen Pankreatitis untersucht und gezeigt, dass auch hier eine korrekte Klassifizierung mit hoher Spezifität und Sensitivität erreicht werden kann. Auch die Resultate des Vergleichs von PaCa-Seren von Patienten vor und nach Operation korrelierten sehr gut mit den gewonnenen Ergebnissen und zeigen, dass die SELDI-TOF-MS Methode als Kontrollmethode geeignet ist beziehungsweise damit identifizierte Biomarker die Sensitivität und Spezifität von Markern in der Verlaufskontrolle weiter verbessern können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist mit Hilfe SELDI-TOF-MS Serumbiomarker zu identifizieren, mit Hilfe dieser an Pankreaskarzinom erkrankte Patienten und gesunde Probanden richtig und zuverlässig zu klassifizieren und gegenüber anderen Pankreaserkrankungen abzugrenzen. Darüber hinaus zeigt die Arbeit, dass durch die Anwesenheit von Tumorgewebe einige Proteine im Serum erhöht sind, wohingegen andere Proteine in der Konzentration im Vergleich abfallen. Durch Entwicklung peptidspezifischer Antisera oder ELISAs könnten zukünftig Biomarker zur nicht-invasiven und kostengünstigen Früherkennung, Diagnose und Verlaufskontrolle von Patienten mit Pankreaskarzinomen dienen.