



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

**Identifizierung von Lipid-Biomarkern mittels MALDI-TOF
Massenspektrometrie: Anwendung auf Polyzystische
Nierenerkrankungen**

Autor: Hermelindis Ruh
Institut / Klinik: Institut für Medizintechnologie
Doktorvater: Prof. Dr. C. Hopf

Polyzystische Nierenerkrankungen (engl. *polycystic kidney disease*; PKD) sind die häufigsten genetisch bedingten lebensbedrohlichen Erkrankungen beim Menschen. Das klinische Spektrum der Symptome ist bezüglich Ausmaß und Fortschreiten der Krankheit heterogen, mit einer großen Variationsbreite zwischen renaler und hepatischer Beteiligung. Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine einfachen und eindeutigen diagnostischen Verfahren für zystische Erkrankungen verfügbar sind, wäre ein biologischer Marker zur Unterscheidung spezifischer Erkrankungen dieses Formenkreises wünschenswert. Es wird zunehmend erkannt, dass zahlreiche Erkrankungen mit Lipidveränderungen in den betroffenen Geweben verbunden sind. Die Entwicklung und Etablierung von geeigneten massenspektrometrischen Methoden zur Lipidanalytik und zur Identifizierung von geeigneten Markerkandidaten gewinnt daher immer mehr an Bedeutung. Dieses Dissertationsprojekt verfolgte daher folgende Ziele:

Entwicklung neuer Methoden zur Glycosphingolipid (GSL)-Analytik mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS);
Entwicklung eines neuen Workflows zur unvoreingenommenen Suche nach und Identifizierung von Lipid-Biomarkern aus MALDI-Imaging Daten;
Anwendung dieser Methoden und Workflows aus 1. und 2. für die Aufklärung von Lipid-Veränderungen bei zystischen Erkrankungen anhand experimenteller Rattenmodelle;
Bewertung der möglichen Eignung veränderter Lipide als Biomarker für polyzystische Erkrankungen und ggf. Entwicklung von Urintests;
Korrelation quantitativer und qualitativer Daten zu Lipidveränderungen in zystischen Organen mit Daten aus Genexpressionsanalysen.

Dazu wurden Nieren und Lebern verschiedener Rattenmodelle für die autosomal-dominante (AD) PKD und autosomal-rezessive (AR) PKD auf krankheitsbedingte Lipid-Veränderungen durch HPTLC und MALDI-TOF MS von Gewebeextrakten und durch MALDI-Imaging MS von Gewebeschnitten untersucht.

Zur relativen Quantifizierung der GSL-Klasse der Gb4Ceramide (Gb4Cer) aus Nierenextrakt wurde eine indirekte HPTLC-MALDI-TOF MS Methode mit einem neuen Kristallisationsverfahren, *PrimaDrop*, für die automatisierte MALDI-TOF MS Analyse von Lipiden entwickelt.

Die Anwendung dieser Methode auf die Untersuchung von Gb4Cer in Nieren eines ADPKD Rattenmodells ergab erhöhte Isoformen-spezifische Werte in zystischen Nieren. Zusammen mit reduzierten Werten für die sauren GSL SM4s und SM2 in zystischen PKD-Nieren sowie stark reduzierten Gangliosid-Werten in ARPKD-Lebern weisen diese Ergebnisse auf einen möglichen Einfluss verschiedener GSL auf die Pathogenese von zystischen Erkrankungen hin.

Ausgehend von MALDI-Imaging MS Daten wurde mit Hilfe der Fisher Diskriminanten Analyse ein Workflow zur unvoreingenommenen Suche nach und Identifizierung von Lipid-Biomarkern etabliert.

In Nieren des ARPKD-Rattenmodells konnten krankheitsrelevante Metaboliten erfolgreich identifiziert und deren Struktur durch hochauflösende FTICR-MS als Taurocholsäuren (TCA) aufgeklärt werden. Nach Validierung der Markerkandidaten durch MALDI-TOF MS von Gewebeextrakten wurde ein Urintest zum nicht-invasiven Nachweis von TCA entwickelt. Aufgrund stark erhöhter TCA-Werte in Niere und Urin von erkrankten Tieren konnte schließlich ARPKD von verwandten hepatorenalen fibrozystischen Erkrankungen in den Nagetieren unterschieden werden.

Schließlich ergaben genomweite Genexpressionsanalysen etliche fehlregulierte Signalwege sowohl in zystischen ARPKD-Lebern als auch in Nieren von ADPKD- und ARPKD-Ratten. Die quantitativen GSL-Veränderungen in zystischen Nieren des ADPKD-Rattenmodelles lassen zusammen mit Expressionsanalysen eine zentrale Rolle des maßgeblichen GSL-Biosynthese-Genes *ugcg* vermuten.

Zusammengenommen konnte durch indirekte HPTLC-MALDI-TOF MS die bisher noch nicht untersuchte GSL-Klasse der Gb4Ceramide im Zusammenhang mit ADPKD untersucht werden. Erhöhte Isoformen-spezifische Gb4-Werte zusammen mit reduzierten SM4s- und SM2-Werten in den erkrankten Organen weisen auf einen möglichen Einfluss dieser Lipidklassen auf die Pathogenese von zystischen Erkrankungen hin. Eine Eignung dieser Glycosphingolipide als Biomarker für zystische Erkrankungen der Niere ist jedoch noch unklar. Die Intensitätsunterschiede zwischen kranken und gesunden Organen sind zu klein, um eindeutige Aussagen hinsichtlich einer Diagnose treffen zu können. Anders dazu die markant erhöhten Gangliosid-Werte in zystischen Organen der ARPKD-Ratte, welche eine weitergehende Validierung dieser Lipidklasse als diagnostische Marker empfehlen. Der spezifische Anstieg von TCA im ARPKD-Rattenmodell demonstriert zudem beispielhaft die hervorragende Eignung der MALDI-Imaging-Methode in Kombination mit alternativen statistischen Auswerteverfahren und hochauflösender Massenspektrometrie zur Lipid-Biomarker-Entdeckung.