

Megha Bhardwaj

Dr. sc. hum.

Blood-based protein markers for early detection of colorectal cancer

Fach/Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Hermann Brenner

Mit 1,85 Millionen Neuerkrankungen und fast 900.000 Todesfällen pro Jahr ist Darmkrebs die dritthäufigste Krebsart und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit. Screening trägt dazu bei, die Inzidenz und Mortalität zu senken, allerdings ist die Beteiligung an Screeningprogrammen häufig niedrig. Blutbasierte Proteinbiomarker könnten eine effiziente Alternative oder Ergänzung für das populationsbasierte Darmkrebscreening sein. Ziel dieser Dissertation war, Signaturen von blutbasierten Proteinbiomarkern für die Früherkennung von Darmkrebs zu identifizieren und - wo immer dies relevant ist - zu validieren.

Um einen Überblick über die blutbasierte Proteinbiomarker-Forschung zu erhalten und potentielle Biomarker-Kandidaten zu identifizieren, wurden systematische Literaturrecherchen durchgeführt. Eine erste systematische Literaturrecherche wurde durchgeführt, um blutbasierte Proteinsignaturen zum Nachweis von Darmkrebs zu identifizieren. Die Ergebnisse dieser systematischen Reviews zeigten große Unterschiede zwischen den Studien hinsichtlich der Anzahl der eingeschlossenen Krebsfälle (23 bis 512), des Studiendesigns sowie der Anzahl an Proteinen, die in Signaturen inbegriffen wurden (3 bis 13). Insgesamt berichteten 36 Studien den *Youden Index* und/oder die *Area under the Curve (AUC)*, diese lagen zwischen 0,19 und 0,95 bzw. zwischen 0,62 und 0,996. Die meisten Studien, die eine bessere diagnostische Güte berichteten, wurden jedoch im klinischen Umfeld durchgeführt, und vielen Studien fehlte eine interne oder externe Validierung der identifizierten Algorithmen im Screening-Umfeld. Nur wenige Studien berichteten die Studien-spezifische diagnostische Güte der Signaturen.

Ein weiterer systematischer Review wurde durchgeführt, um die diagnostische Wertigkeit der im Blut validierten Zelllinien-Sekretom- und Tumorgewebe-Proteom-Marker zum Nachweis von Darmkrebs zusammenzufassen. Die systematische Suche identifizierte 83 verschiedene

Proteinmarker aus 47 verschiedenen Studien. Die diagnostische Güte für Marker-Kombinationen über alle Stadien hinweg lag bei AUC-Werten von 0,64 bis 0,99. Obwohl die Bewertung von Marker-Kombinationen in Blutproben von Darmkrebsfällen scheinbar eine sehr vielversprechende diagnostische Güte zeigte, sind die Ergebnisse angesichts oft unzureichender Kontrolle für Überoptimismus und fehlender Validierung in Screening Settings mit großer Vorsicht zu bewerten. Wie in anderen systematischen Übersichtsarbeiten konnte nur eine kleine Anzahl an Studien identifiziert werden, die die diagnostische Güte spezifisch für frühe Darmkrebsstadien untersuchten.

Da die meisten existierenden Studien nicht ausreichend validiert waren, bestand der nächste Schritt darin, verschiedene Multiplex-Protein-Assays in einem *Discovery Set* einzusetzen und die dabei ermittelten Signaturen in unabhängigen Stichproben von Teilnehmern der Screening-Koloskopie zu validieren. In dieser Dissertation wurden drei verschiedene Verfahren zum Nachweis von Proteinen verwendet, und es wurden zum ersten Mal spezifische Algorithmen für die Detektion von Frühstadien identifiziert, die in Screening-Setting-Proben weiter validiert wurden.

Im ersten Schritt wurde ein *Proximity Extension Assay* durchgeführt, um 276 Plasmaproteine in einem zweistufigen Design sowohl in einem *Discovery Set* als auch in einem *Validation Set* zu messen. Im *Discovery Set* wurde eine Signatur, bestehend aus 12 Markern identifiziert (Amphiregulin, Carcinoembryonic antigen, granzyme B, Integrin alpha V, Keratin type I cytoskeletal 19, Mannan-binding lectin serine protease 1, Monocyte chemotactic protein 1, Serum Paraoxonase Lactonase 3, Retinoic acid receptor responder protein 2, Protein S100-A4, Transferrin receptor protein 1 und Tartrate-resistant acid phosphatase type 5), die eine *.632+ bootstrap adjusted AUC* (AUC^{BS}) von 0,91 für die Darmkrebsfrüherkennung aufwies. Die externe Validierung bei Teilnehmern der Screening-Koloskopie ergab eine AUC mit *95% Confidence intervals* (95% CI) von 0,75 (95% CI, 0,62-0,87) und Sensitivitäten von 61% und 35% bei einer Spezifität von 80% und 90% für die Darmkrebsfrüherkennung. Der 12-Marker-Algorithmus erreichte im *Validation Set* eine AUC von 0,58 (95% CI, 0,47-0,68) für die Erkennung fortgeschrittener Adenome.

Im zweiten Schritt wurde in einem zweistufigen Design die *Liquid chromatography-multiple reaction monitoring/mass spectrometry* verwendet, um 270 Proteine im Plasma zu quantifizieren. Im *Discovery Set* erreichte eine Drei-Marker-Signatur (Haptoglobin, Leucine

Rich Alpha 2 Glycoprotein und Serum Paraoxonase Lactonase 3) eine AUC^{BS} von 0,84 für die Erkennung von Darmkrebs im Frühstadium. Die externe Validierung dieser Drei-Marker-Signatur in einer repräsentativen Screening-Population ergab eine AUC von 0,79 (95% CI, 0,66-0,89) und Sensitivitäten von 57% und 48% bei einer Spezifität von 80% und 90% für die Früherkennung von Darmkrebs. Für fortgeschrittene Adenome ergab sich im *Validation Set* für diesen Drei-Marker-Frühstadium-Algorithmus eine AUC von 0,65 (95% CI, 0,56-0,73).

Als letztes wurde ein Multiplex-Antikörper-Microarray mit 900 Zielproteinen verwendet, um Proteinbiomarker für die Darmkrebsfrüherkennung zu identifizieren. Obwohl die Plattform hochgradig multiplex war, konnte kein Marker für die Darmkrebsfrüherkennung identifiziert werden.

Basierend auf der Bewertung von Proteinen, die von zwei verschiedenen oben genannten Plattformen gemessen wurden, wurde eine Fünf-Marker-Signatur bestehend aus Mannan bindende Lectin Serine Protease 1, Osteopontin, Serum Paraoxonase Lactonase 3, Transferrin Rezeptor Protein 1 und Amphiregulin identifiziert. Diese Signatur zeigte bei externer Validierung eine AUC von 0,86 (95% CI, 0,77-0,92) und Sensitivitäten von 83% und 43% bei CutOffs, die Spezifitäten von 80% und 90% ergaben. Für Teilnehmer mit fortgeschrittenen Adenomen ergab sich eine AUC von 0,60 (95% CI, 0,51-0,69).

Zusammenfassend wurden in dieser Dissertation drei verschiedene Protein-Biomarker-Signaturen mit hohem Potenzial zur Früherkennung sowohl von Darmkrebs als auch von fortgeschrittenen Adenomen identifiziert. Die gefundenen Protein-Biomarker-Signaturen erreichen noch nicht ganz die diagnostische Wertigkeit der besten Stuhl-basierten Tests für die Darmkrebsfrüherkennung. Vorerst könnten diese Proteinbiomarker daher als ergänzende nicht-invasive Tests dienen und langfristig zur Entwicklung eines zukünftigen leistungsfähigen blutbasierten Tests für das Darmkrebsscreening beitragen.