

Dominic Schmid  
Dr. med.

## **Diagnostic Biomarkers from Proteomic Characterization of Cerebrospinal Fluid in Patients with Brain Malignancies**

Fach/Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Wolfgang Wick

Gliome sind primäre Hirntumore und entstehen aus Gliazellen. Adulte diffuse Gliome werden in *Isoziträt Dehydrogenase* mutierte Astrozytome und Oligodendrogliome und in hoch aggressive Glioblastome eingeteilt. Gliome werden chirurgisch reseziert und mit Radiotherapie und dem Chemotherapeutikum Temozolomid behandelt. Vor allem Glioblastome haben nach wie vor eine sehr schlechte Prognose da sie über mannigfaltige Therapieresistenzmechanismen verfügen, wie zum Beispiel die Reparatur von Desoxyribonukleinsäure Läsionen oder ruhende Glioblastom Stammzellen. Es besteht die Hoffnung, dass die molekulare Charakterisierung von Gliomen, die schon viel zur Aufklärung der Tumorheterogenität vor Therapiebeginn beigetragen hat, künftig zur evidenzbasierten Auswahl von zielgerichteten Therapien über die gesamte Krankheitsdauer beitragen kann. Liquor cerebrospinalis ist ein ideales Kompartiment, um solche Strategien für Gliome zu entwickeln, da er im direkten Kontakt mit dem zentralen Nervensystem steht und leicht verfügbar ist, auch in Intervallen ohne offenkundige Tumormasse. In dieser Machbarkeitsstudie wurde das Liquor cerebrospinalis Proteom von Patienten mit Gliomen und anderen Hirntumoren sowie von gesunden Kontrollen mittels Massenspektrometrie vermessen, um Proteinbiomarker für Gliome zu identifizieren.

Liquor cerebrospinalis Proben und klinische Daten von geeigneten Patienten wurden gesammelt. Proteine wurden direkt reduziert, alkyliert und mit Trypsin verdaut zur Aufnahme auf einem Massenspektrometer mittels Daten-gesteuerter Akquisition. Zudem wurde mittels leicht angepasster Probenverarbeitung das Proteom von Glioblastomgewebe und von Glioblastomzellen vermessen. Es wurden im Durchschnitt 511 Proteine pro Probe identifiziert; dies ist vergleichbar zu den Resultaten von anderen Liquorproteom Studien. Dimensionalitätsreduktion, hierarchisches Clustering und Analyse von differentiell abundanten Proteinen erlaubten es nicht, diagnostische Entitäten anhand ihrer Proteom Daten zu unterscheiden. Allerdings konnte ein grosser Einfluss auf das Liquorproteom durch Störungen der Bluthirnschranke und daher rührendem Übertritt von Serumproteinen in den Liquor festgestellt werden. Der präzise Mechanismus dieses Übertritts von Serumproteinen bedarf weiterer Untersuchungen.

Proben von Gliom Patienten wurden anhand ihres Albumin Konzentrationsverhältnis aufgeteilt und zu Kontrollen verglichen, was zur Identifikation von konsistent erhöhten und auch in Glioblastomgewebe und -zellen exprimierten Proteinen führte. Chitinase-3-ähnliches Protein 1, ein Protein, das mit besonders aggressiven Gliomen in Verbindung gebracht wird und ein mesenchymales Transkriptom begünstigt, ist erhöht in Glioblastom Liquor. Dieses Resultat wurde in einem Immunoblot bestätigt. Die Konzentration des Proteins korrelierte auch mit dem aus Magnetresonanztomographie errechnetem Tumolvolumen. Saures Gliafaserprotein hingegen war in Liquor Proben von einzelnen Glioblastom Patienten stark erhöht, was sich auch in einem Immunoblot zeigte. Beide Proteine wurden schon als potenzielle Serummarker für Glioblastome untersucht, aber ihr Nachweis aus Liquor cerebrospinalis war bisher nur spärlich gesichert.

Als nächstes wurde das Liquorproteom von Gliompatienten aus einer retrospektiven Studienkohorte und einer prospektiven Bestätigungskohorte anhand von hierarchischem Clustering in zwei Untergruppen eingeteilt. Die Übereinstimmung der Einteilung zwischen den

Kohorten wurde mittels eines Random Forest Machine Learning Algorithmus bestätigt. Die Patienten der beiden Untergruppen zeigten Unterschiede im Gesamtüberleben, in Standardparametern der Liquoranalyse und in ihren Tumorzellvolumina. Proteine der Gerinnungskaskade waren in den Liquoren der aggressiveren Gliomgruppe übervertreten.

In einem letzten Teil wurde das Proteom von seriellen Liquorproben von Patienten mit Leptomeningeosis carcinomatosa ermittelt, die mit intrathekalen Therapien behandelt wurden. Proteomische Veränderungen über die Zeit waren kleiner als diejenigen zwischen den einzelnen Patienten. Allerdings teilten sich bei einem Patienten frühere und spätere Liquorproben auf, und die beobachteten Proteomveränderungen ließen sich gut mit Resistenzmechanismen zu den dem Patienten verabreichten Therapien vereinbaren.

Ein limitierender Faktor für die Aussagekraft der hier präsentierten Ergebnisse ist der Einschluss von Liquorproben, die in verschiedenen Stadien der untersuchten Erkrankungen gewonnen wurden, was zu einer zusätzlichen Heterogenität geführt haben könnte. Auch fehlen serielle Liquorproben und gepaarte Serumproben, um diejenigen Proteine zu identifizieren, die spezifisch von Tumorzellen sezerniert werden. Dennoch beweist diese Studie, dass technisch anspruchsvolle Liquorproteombestimmungen bei Hirntumorpatienten möglich sind. Klinisch wertvolle Proteinbiomarker zur Evaluierung von Therapieansprechen bei Gliompatienten könnten bei Anwendung von Liquorproteombestimmungen in künftigen klinischen Studien gefunden werden.