

**Optimierung der Identifizierungsstrategie von Proteinsignaturen
aus Gewebe und Plasma: Proteomanalyse von Conn-Tumoren
und Rektumkarzinom**



Dissertation

der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Müzeyyen Sevim

aus

Mannheim

München 2014

erstellt am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Proteinanalytik

Martinsried bei München

Erstgutachterin:	Prof. Dr. Elisabeth Weiss
Zweitgutachterin:	PD Dr. Anna Friedl
Betreuer der Arbeit:	PD Dr. Friedrich Lottspeich
Dissertation eingereicht:	18. September 2014
Tag der mündlichen Prüfung:	01. April 2015

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei PD Dr. Friedrich Lottspeich für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese in seiner Abteilung am Max-Planck-Institut für Biochemie anfertigen zu können. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Josef Kellermann bedanken, der stets gesprächsbereit war und sich für fachliche Fragen immer Zeit genommen hat.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiss und Frau PD Dr. Anna Friedl für die Begutachtung meiner Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität und für die freundliche Unterstützung.

Zudem danke ich den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission Prof. Dr. Gisela Grupe, PD Dr. Josef Mautner, Prof. Dr. Michael Schleicher und Prof. Dr. Jürgen Soll für die Bereitschaft, diese Aufgabe übernommen zu haben.

Prof. Dr. med. Roland S. Croner, Geschäftsführender Oberarzt der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Erlangen, danke ich für die Bereitstellung von Patientenmaterial, die Nutzung der Laborräumlichkeiten zur Bearbeitung der Proben, die Bereitstellung der Ergebnisse aus der IHC und die Möglichkeit, unsere Daten im Rahmen eines Kongresses in Form eines Posters präsentieren zu dürfen.

Für die Bereitstellung von Patientenmaterial und für die Nutzung der Laborräumlichkeiten zur Bearbeitung der Proben bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Felix Beuschlein von der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV, Innenstadt in München.

Der Core Facility am Max-Planck-Institut für Biochemie und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Albert Sickmann, Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften-ISAS-e.V., Dortmund, danke ich für die Möglichkeit, meine Proben mittels Massenspektrometrie vermessen zu können.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Proteinanalytik danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Freunden danke ich für die sportlichen, geselligen und kulturellen Ablenkungen, die wir in meiner Freizeit unternommen haben.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich während meiner Doktorarbeit stets unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	8
1.1 Das Proteom	8
1.2 Die Proteomanalyse	9
1.2.1 Die gelbasierte Proteomanalyse	10
1.2.1.1 Die zweidimensionale Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE).....	12
1.2.2 Massenspektrometrie in der Proteomanalyse	14
1.2.2.1 Ionenquellen.....	15
1.2.2.2 Massenanalytoren	17
1.2.2.3 Detektor.....	19
1.2.2.4 Datenanalyse	19
1.2.3 Die relativ quantitative massenspektrometriebasierte Proteomanalyse	21
1.2.3.1 Markierung mit stabilen Isotopen	22
1.2.3.2 Chemische Markierung von Proteinen mit Isotope-Coded Protein Label (ICPL)	25
1.3 Modellsysteme: Conn-Syndrom und Rektumkarzinom	27
1.3.1 Conn-Syndrom	27
1.3.1.1 Nebennieren: Struktur und Funktion.....	28
1.3.1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	29
1.3.1.3 Subtypen Evaluierung	30
1.3.1.4 Nebennierenvenen-Katheterisierung.....	30
1.3.1.5 Proteomanalyse von Proben aus Patienten mit Diagnose Conn-Syndrom .	31
1.3.2 Rektumkarzinom	32
1.3.2.1 Diagnostik und Tumorgradeinteilungen	34
1.3.2.2 Radiochemotherapie bei Patienten mit Rektumkarzinom.....	35
1.3.2.3 Proteomanalyse von Gewebematerial aus Patienten mit Rektumkarzinom: Vergleich von Respondern und Non-Respondern auf Radiochemotherapie	36
1.4 Ziel der Arbeit	37
2 Material und Methoden.....	38

2.1	Materialien.....	38
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	38
2.1.2	Geräte und Materialien.....	39
2.1.3	Software.....	43
2.1.4	Antikörper.....	43
2.1.4.1	Primäre Antikörper.....	44
2.1.4.2	Sekundäre Antikörper.....	45
2.1.5	Patientenmaterial.....	45
2.2	Probenaufarbeitung.....	46
2.2.1	Affinitätschromatographie (AC) von Plasma.....	46
2.2.1.1	Depletion mit der Seppro IgY14-Säule und der SuperMix-Säule.....	46
2.2.2	Mikrodissektion von Gewebe.....	47
2.2.2.1	Herstellung von Gewebeschnitten.....	47
2.2.2.2	Färbung von Gewebeschnitten zur Zellcharakterisierung.....	48
2.2.2.3	Laser Capture Mikrodissektion (LCM).....	49
2.2.2.4	Solubilisierung von mikrodissektierten Zellen.....	49
2.2.3	Aceton-Fällung.....	49
2.2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	50
2.3	Trennmethoden.....	51
2.3.1	Elektrophorese.....	51
2.3.1.1	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
2.3.1.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	53
2.3.1.3	Isoelektrische Fokussierung (IEF) mit der OFFGEL-Fraktionierung.....	55
2.3.1.4	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE).....	56
2.3.1.5	Zweidimensionale Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE).....	59
2.3.1.5.1	Präparative 2D-DIGE-Gele.....	60
2.3.1.5.2	Visualisierung der Proteinverteilung nach 2D-DIGE.....	60
2.3.1.5.3	Auswertung der analytischen 2D-DIGE-Gele.....	61
2.3.1.6	Proteinfärbung in Gelen.....	62
2.3.1.6.1	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung.....	62
2.3.1.6.2	Silberfärbungen.....	62

2.4	Isotope-Coded Protein Label (ICPL).....	64
2.4.1	Auswertung der massenspektrometrisch generierten Daten von ICPL-markierten Proteinen mit der Software ICPL-ESI <i>Quant</i>	66
2.5	Analysemethoden	68
2.5.1	Western-Blot	68
2.5.2	Immunhistochemie (IHC)	70
2.5.3	Massenspektrometrie.....	71
2.5.2.1	Enzymatische Spaltung von Proteinen	71
2.5.2.1.1	Entnahme der Proteinspots oder Proteinbanden aus einem Gel	72
2.5.2.1.2	Proteinspaltung im Gel	73
2.5.2.1.3	Proteinspaltung in Lösung	74
2.5.2.2	MALDI-TOF/TOF-MS-Analyse	76
2.5.2.3	Analyse mit dem ESI-MS/MS	77
3	Ergebnisse	79
3.1	Modellsystem I: Das Conn-Syndrom	80
3.1.1	Proteomanalyse aus mikrodissektiertem Gewebe mittels ICPL	80
3.1.1.1	Quantifizierung und Identifizierung der ICPL-markierten Proteine.....	81
3.1.2	Proteomanalyse von Nebennierenvenenplasma	83
3.1.2.1	2D-DIGE-Analyse von nicht depletiertem Nebennierenvenenplasma	83
3.1.2.1.1	Detektion und Identifizierung von Proteinen aus nicht depletiertem Plasma	84
3.1.2.2	ICPL-Analyse von depletiertem Nebennierenvenenplasma	86
3.1.2.2.1	Quantifizierung und Identifizierung der ICPL-markierten Plasmaproteine	87
3.1.2.3	2D-DIGE-Analyse von depletiertem Nebennierenvenenplasma	88
3.1.2.3.1	Detektion und Identifizierung unterschiedlich exprimierter Plasmaproteine.....	89
3.2	Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Depletion.....	91
3.2.1	2D-DIGE-Analyse von depletierten Plasmaproteinen	92
3.3	Modellsystem II: Rektumkarzinom	97
3.3.1	Proteomanalyse von Tumorgewebe aus Patienten mit Rektumkarzinom mittels ICPL	97

3.3.1.1	Quantifizierung und Identifizierung potenzieller Proteinsignaturen, aus OFFGEL-Fractionen und Gesamtproben, von RCT I und RCT II	100
3.3.1.2	Validierung potenzieller Biomarker	104
3.3.1.2.1	Test der Antikörper an einem Lysat von SW480-Zellen	105
3.3.1.2.2	Nachweis ausgewählter Proteine in mikrodisektiertem Patientengewebe	108
3.3.1.3	Immunhistochemische Validierung potenzieller Markerproteine.....	113
4	Diskussion.....	115
4.1	Modellsystem I: Proteomanalyse von Nebennierengewebe und Nebennierenvenenplasma zur Stratifizierung von Patienten mit Conn-Syndrom.....	116
4.1.1	Proteomanalyse von Nebennierenrindengewebe mittels ICPL-Technik.....	117
4.1.2	Proteomanalyse von Nebennierenvenenplasma	120
4.1.2.1	ICPL-Analyse von depletiertem Nebennierenvenenplasma	121
4.1.2.2	DIGE-Analyse von depletiertem Nebennierenvenenplasma	122
4.2	Modellsystem II: Proteomanalyse von Rektalkarzinomgewebe zur Stratifizierung von Patienten mit Rektumkarzinom	124
4.2.1	ICPL-Technik als eine geeignete Methode zur Proteomanalyse von Gewebeprobe	124
4.2.2	Validierung potenzieller Stratifizierungsmarker für Radiochemotherapie beim Rektumkarzinom mithilfe der Western-Blot-Methode und IHC	126
4.2.2.1	Transketolase (TKT).....	128
4.2.2.2	Caldesmon 1 (CALD1)	129
4.2.2.3	HADHA	130
5	Zusammenfassung.....	133
6	Summary	136
7	Literaturverzeichnis	139
	Anhang	I
	Eidesstattliche Erklärung.....	II

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
2D-GE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
2D-DIGE	Zweidimensionale Differenz-Gelelektrophorese
APA	aldosteronproduzierendes Adenom
AVS	“Adrenal vein sampling“
CC	“Collision cell“
CCD	“Charge-coupled Device“
CHCA	α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
CID	“Collision-induced Dissociation“
CRC	“Colorectal cancer“
Da	Dalton
DAVID	“Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery“
DNA	“Deoxyribonucleic acid“
ECL	“Enhanced chemiluminescence“
EDTA	“Ethylenediaminetetraacetic acid“
ESI	“Electrospray Ionization“
FA	“Folnic acid“
fmol	Femtomol
5-FU	5-Fluorouracil
GIST	“Global internal standard technologie“
HGP	“Human Genome Project“
HPE	“High Performance Electrophoresis“
HPLC	“High-pressure Liquid-chromatography“
HRP	“Horseradish Peroxidase“
HSA	Humanserumalbumin
ICAT	“Isotope-Coded Affinity Tag“
ICPL	“Isotope-Coded Protein Label“

Abkürzungsverzeichnis

IEC	“Ion-exchange chromatography“
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IHA	Idiopathische bilaterale Hyperplasie
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPI	“International Protein Index“
iTRAQ	“isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation“
kDa	Kilodalton
LC	“Liquid-chromatography“
LCM	“Laser Capture Microdissection“
MALDI	“Matrix-assisted laser Desorption/Ionization“
MGF	“Mascot generic format“
MS	Massenspektrometrie
MS 1; MS ¹	Massenspektrum des 1. Analysators
MS 2; MS ²	Massenspektrum des 2. Analysators
MS/MS oder MS ² oder MS ⁿ	Tandem-Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NCBI	“National Center for Biotechnology Information“
NF	“Non-fluorescent“
Nic-NHS	N-nicotinoyloxy-succinimid-ester
NL	“Nonlinear“
nmol	Nanomol
NNM	Nebennierenmark
NNR	Nebennierenrinde
PEN	Polyethylenaphthalat
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
PHA	Primärer Hyperaldosteronismus
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	“Peptide mass fingerprint“
pmol	Pikomol
PMT	“Photomultiplier tube“

Abkürzungsverzeichnis

ppm	“parts per million”
PTM	Posttranslationale Modifikationen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Quadrupol
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RCT	Radiochemotherapie
RP	“Reversed-Phase“
rpm	“revolutions per minute“
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEC	“Size-exclusion chromatography”
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SH-	Sulfhydryl-
SILAC	“Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture“
TOF	“Time-of-Flight“
TPP	“Trans-Proteomic Pipeline“

1 Einleitung

1.1 Das Proteom

Das Proteom (Wilkins et al., 1996; Wasinger et al., 1995) ist definiert als das gesamte Proteinexpressionsmuster einer Zelle, eines Organismus oder einer Körperflüssigkeit unter streng definierten Bedingungen (Kellermann and Lottspeich, 2012). Die Proteinzusammensetzung ändert sich aber zu verschiedenen Zeitpunkten eines Zelllebens oder unter veränderten Umweltbedingungen. So werden z.B. bei der Entstehung einer Krankheit bestimmte Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedlich exprimiert. Dies bietet die Chance, über eine differenzielle Analyse der Proteome unterschiedlich exprimierte Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten der Krankheit zu erkennen und diese mit dem Krankheitsbild zu korrelieren.

Damit kann die Analyse eines Proteoms komplementäre Aussagen zur Genomanalyse und Molekularbiologie liefern (Lackner et al., 2012; Geiger et al., 2010). Durch Genomanalysen können Fragestellungen, wie z. B. Lokalisation von bestimmten Genen, Informationen über Polymorphismen, Mutationen, die einer Krankheit zu Grunde liegen können, geklärt werden (Perotti et al., 2012; Hanada et al., 2012; Walsh et al., 2012). Durch die Proteomanalyse können die nach Transkription, Translation und posttranslationalen Modifikationen (PTM) *in vivo* vorliegenden Proteine qualitativ und quantitativ analysiert werden. Die verschiedenen Prozessierungen auf der Gen- und Proteinebene verursachen eine sehr hohe Anzahl von Proteinisoformen mit unterschiedlichen biologischen Eigenschaften. Daraus ergibt sich eine hohe Komplexität in der Proteinzusammensetzung. Diese Komplexität stellt für die Proteomanalyse eine enorme Herausforderung dar.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist der weite Konzentrationsbereich, in dem die Proteine in einem Proteom vorliegen (Anderson and Anderson, 2002). In einem Organismus, einer Zelle oder einer Körperflüssigkeit können Proteine in wenigen Kopien bis vielen Millionen Kopien vorkommen. Die Detektion von gering konzentrierten Proteinen neben Proteinen mit hoher Konzentration benötigt Analysenmethoden mit einem Messbereich, der diese Konzentrationsunterschiede abdecken kann. Methoden, die einen solchen

Konzentrationsbereich von bis zu 12 Größenordnungen abbilden können, existieren jedoch zurzeit nicht.

Auch die zur Verfügung stehende Proteinmenge in einer Zelle ist zum Teil ein limitierender Faktor für die Analyse eines Proteoms. Die zurzeit verwendeten analytischen Methoden haben einen Detektionslimit im fmol Bereich. Das bedeutet, dass für die Analytik mindestens 10^9 Moleküle eines Proteins notwendig sind. Um ein Protein mit einer Kopienzahl von 100 in einer Zelle erfolgreich analysieren zu können, werden daher mindestens 10^7 Zellen benötigt.

Nur wenn alle oben genannten Problematiken berücksichtigt werden, kann eine Proteomanalyse erfolgreich durchgeführt werden.

1.2 Die Proteomanalyse

Ziel einer Proteomanalyse ist die qualitative und quantitative Erfassung jedes Proteins eines Proteoms. Durch den Vergleich mehrerer Zustände eines Proteoms entlang einer Zeitachse oder unter veränderten Bedingungen werden Auf- und Abregulationen quantitativ erfasst. Die regulierten Proteine werden identifiziert und bilden die Grundlage für eine funktionelle Interpretation der Analyse.

Einige der oben diskutierten analytischen Herausforderungen, wie die Komplexität und der weite Konzentrationsbereich der Proteine eines Proteoms, erfordern unabdinglich die Reduktion der Komplexität des Proteoms. Die Reduktion der Komplexität kann schon auf der Ebene der Probennahme beginnen, indem man nicht den kompletten Organismus für die Proteomanalyse einsetzt, sondern Subproteome wie Organe, bestimmtes Gewebe, Zelltypen oder Zellkompartimente als Ausgangsmaterial für die Analyse verwendet. Aber auch diese Proteomproben sind für eine direkte Analyse noch zu komplex, daher muss die Komplexität des Proteoms auf der Proteinebene weiter reduziert werden. Da der Trennbereich einer einzelnen Trenntechnik dafür nicht ausreichend ist, müssen mehrere Trenntechniken zu multidimensionalen Trennverfahren kombiniert werden, die meist aus elektrophoretischen und chromatographischen Teilschritten bestehen (Coombs, 2011; Ly and Wasinger, 2011).

1.2.1 Die gelbasierte Proteomanalyse

Bei der gelbasierten Proteomanalyse erfolgt eine Trennung der Proteine durch elektrophoretische Wanderung in einer Polyacrylamid-Gelmatrix. Mit der eindimensionalen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach der Molekülgröße aufgetrennt. Diese Trennung vereinfacht aber das komplexe Proteom nicht ausreichend, weswegen meist mehrdimensionale Methoden, wie die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE) für die quantitative Analyse verwendet werden. Die zweidimensionale Gelelektrophorese (Klose, 1975; O'Farrell, 1975) kombiniert dabei zwei verschiedene Trennverfahren miteinander. In der ersten Dimension werden die Proteine eines Proteoms nach dem isoelektrischen Punkt (pI) mittels einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) und in der zweiten Dimension nach der Molekülgröße über eine SDS-PAGE separiert. Durch diese beiden Trennschritte erfolgt eine zweidimensionale Verteilung der Proteinspots über das gesamte Gel. Damit kann eine sehr hohe Auftrennung des Proteoms in mehrere tausend Proteinspots erreicht werden (Görg and Weiss, 2009; Görg et al., 2004). Um die Proteine sichtbar zu machen und eine Quantifizierung zu ermöglichen, können verschiedene Techniken, wie Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau, Silber oder mit Fluoreszenzfarbstoffen, eingesetzt werden. Die verschiedenen Färbetechniken unterscheiden sich in ihrer Sensitivität [Coomassie-Brilliant-Blau (Typ R und G: 8–20 ng), Silbernitrat: 1–6 ng, Fluoreszenzfarbstoffe. < 1 ng] und dem dynamischen Proteinmengenbereich den sie abdecken können (Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau ca. 10^2 , Silbernitrat ca. 10^{2-3} , Fluoreszenzfarbstoffen ca. 10^4) (Miller et al., 2006; Gauci et al., 2011; Sasse and Gallagher, 2003). Welche Färbetechnik eingesetzt wird, richtet sich nach der vorhandenen Proteinmenge und hat gravierenden Einfluss auf die erreichbare Anzahl sichtbarer Proteine und die Analysentiefe (Gauci et al., 2011). Die angefärbten Proteine werden densitometrisch erfasst und mithilfe geeigneter Software quantitativ ausgewertet. Dies ist die Voraussetzung dafür, dass beim Vergleich mehrerer Gele Proteine erkannt werden, die sich in verschiedenen Proteomzuständen unterscheiden und eine biologische Relevanz aufweisen können. Diese Proteine werden aus dem Gel einzeln manuell oder robotergestützt ausgestanzt und nach enzymatischer Spaltung in Peptide mit massenspektrometrischen Methoden identifiziert (siehe Abschnitt 1.2.2).

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-GE) können Proteine mit sehr hohem (größer 150 kDa) bzw. sehr niedrigem Molekulargewicht (kleiner 10 kDa) und extrem basische und sehr hydrophobe Proteine (z.B. Membranproteine) nur in unzureichender

Qualität getrennt werden. Diese Proteine können entweder nicht in die Polyacrylamid-Gelmatrix einwandern bzw. werden nicht in der Gelmatrix retardiert und gehen für die Quantifizierung verloren. Leider ist die zweidimensionale Gelelektrophorese aufgrund von Gel-zu-Gel-Variationen in der Routine nur schlecht reproduzierbar durchzuführen (Van den Bergh and Arckens, 2004). Auch der Probenauftrag und die Einwanderung der Proteine ins Gel sind kritisch. Bei einer Proteomanalyse müssen verschiedene Proteomzustände quantitativ miteinander verglichen werden, um Veränderungen zu erkennen. Wegen der schlechten technischen Reproduzierbarkeit der einzelnen Gele, die jeweils unabhängig für jeden Proteomzustand angefertigt werden müssen, ist es aber schwierig, zwischen echten, biologisch bedingten Veränderungen im Proteinmuster und experimentell verursachten Variationen zu unterscheiden. Daher sind unabhängige Einzelgelanalysen für eine quantitative Proteomanalyse nur bedingt geeignet.

Eine Möglichkeit, schlechte Reproduzierbarkeit von Einzelanalysen zu vermeiden; ist es, mehrere Proteomzustände in einer einzigen Analyse und damit unter exakt identischen Bedingungen zu untersuchen. Dazu werden die zu untersuchenden Proteome gemischt („Multiplexing“) und gemeinsam weiter analysiert. Nach der Analyse müssen die verschiedenen Proteomzustände jedoch immer noch unterschieden und den einzelnen Proteomzuständen zugeordnet werden können. Dies gelingt nur, wenn die unterschiedlichen Proteomzustände vor dem „Multiplexing“ eindeutig markiert worden sind. Moleküle, die für die Markierung eingesetzt werden, dürfen dabei die Eigenschaften eines Proteins (Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt und Hydrophobizität) zwar verändern, dies muss jedoch in jedem Zustand auf die gleiche Weise erfolgen. Da alle Zustände sich nun elektrophoretisch und chromatographisch gleich verhalten, bedeutet das, dass nach dem „Multiplexing“ das Verhältnis der Proteinmengen der einzelnen Zustände zueinander fixiert ist, auch wenn während der Analyse Proteinverlust (Adsorption, Aggregation, Präzipitation) nicht zu vermeiden ist.

Für die Markierung der Proteine können Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen spektralen, aber nahezu identischen physikalischen und chemischen Eigenschaften verwendet werden. 2D-DIGE und Refraction-2DTM sind Technologien für die Multiplex-Fluoreszenz-Gelelektrophorese. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 2D-DIGE-Technologie für die Proteomanalyse verwendet.

Neben diesem bildgebenden Verfahren können auch massenspektrometrische Verfahren verwendet werden (siehe Abschnitt 1.2.3). Dabei werden Proteine mit Molekülen markiert,

die chemisch gleiche Eigenschaften besitzen, sich jedoch in ihrer Isotopenzusammensetzung unterscheiden, wobei z.B. C^{12} gegen C^{13} bzw. Wasserstoff gegen Deuterium ausgetauscht wird, um unterschiedliche Molekulargewichte zu erhalten.

1.2.1.1 Die zweidimensionale Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE)

Bei der zweidimensionalen Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE) (Ünlü et al., 1997) erfolgt die Markierung von Proteinen unterschiedlicher Proteome mit kovalent bindenden Fluoreszenzfarbstoffen. Es können zwei verschiedene Strategien zur Markierung eingesetzt werden.

Bei der sogenannten minimalen Markierung („Minimal Labeling“) erfolgt eine kovalente Bindung der Fluoreszenzfarbstoffe (Cy2TM, Cy3 und Cy5) über die reaktiven N-Hydroxysuccinimidyl-Estergruppen an die ϵ -Aminogruppen von Lysinen und den N-Terminus der Proteine. Um die Ladung und damit die Wanderungseigenschaft der Proteine nicht zu verändern, sind die Fluoreszenzfarbstoffe positiv geladen. Die Massen der Fluoreszenzfarbstoffe (Addition von Cy2TM 714 Da, Cy3 767 Da, Cy5 792 Da) unterscheiden sich nur wenig voneinander, sodass identische Proteine mit unterschiedlichem Fluoreszenzlabel und das ungelabelte Protein in der zweiten Dimension nahezu komigrieren. Um dies zu erreichen, werden die Bedingungen der Markierung so gewählt, dass nur ca. 2–5% der Lysine mit den Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden (Lilley and Friedman, 2004), was statistisch einer Markierung pro Protein entspricht. Da die Fluoreszenzfarbstoffe hydrophobe Eigenschaften besitzen, wird die minimale Markierung auch angewandt, um die Hydrophobizität der Proteine so wenig wie möglich zu verändern und eventuelle Präzipitation zu vermeiden.

Der experimentelle Ablauf einer 2D-DIGE-Analyse ist in Abbildung 1 dargestellt. Nach der Markierung der einzelnen Proteome mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3 bzw. Cy5) werden diese gemischt („Multiplexing“) und mittels 2D-GE aufgetrennt. Um einen Vergleich mehrerer Gele zu ermöglichen, wird aus Aliquots aller verwendeten Proben ein interner Standard erstellt, der mit Cy2TM markiert und allen zu analysierenden Proben zugesetzt wird (Tannu and Hemby, 2006). Um zu vermeiden, dass farbstoffspezifische Fehler (Regulationsunterschiede) eingeführt werden, werden in technischen Replikaten die Fluoreszenzmarker (Cy3 und Cy5) abwechselnd den beiden Proteomzuständen zugeordnet („Dye-Swap“).

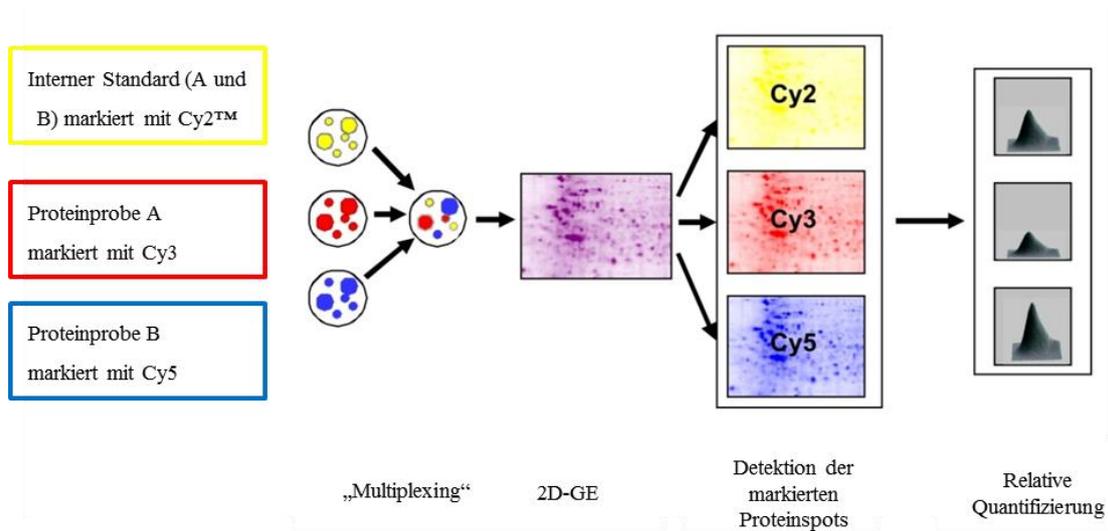


Abbildung 1 Schematische Darstellung der minimalen 2D-DIGE-Markierung. Alle eingesetzten Proteinproben (A+B) werden zu gleichen Teilen zu einem „Pool“ vereinigt und als interner Standard mit Cy2™ markiert, während Cy3 und Cy5 jeweils für die Markierung der einzelnen Proteinproben (A oder B) eingesetzt wird. Proben und Standard werden vereinigt und durch 2D-GE getrennt. Nach der Visualisierung der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt die Bildanalyse mit geeigneter Software [Abbildung verändert nach: (Link et al., 2006)].

Die Detektion der markierten Proteine erfolgt getrennt für die 3 Fluoreszenzfarbstoffe mittels Fluoreszenzscanner oder CCD-Kamera bei ihren entsprechenden Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen. Die erhaltenen 2D-Gel-Bilder zeigen Proteinspots, deren Menge proportional zu deren Graustufenintensität wiedergegeben wird.

Die relative Quantifizierung sich entsprechender Proteinspots der drei Scans wird mit einer geeigneten Auswertesoftware durchgeführt, wobei entsprechende Spots einander zugeordnet und relativ zueinander quantifiziert werden. Da alle Gele eines Experiments einen Cy2™ Standard (Probenpool aus den verwendeten Proteomen) besitzen, sind in diesem Pool alle möglichen Proteine des Experiments vertreten. Dies ermöglicht ein exaktes Proteinspot-Matching in den Scans, selbst wenn in einer Probe ein Protein nicht vorhanden ist („In-Gel-Spot-Matching“). Da ein biologisches Experiment meist nicht aus einer Einzelgelanalyse besteht, erfolgt die Detektion der entsprechenden Proteinspots über alle Gele, die für ein Experiment verwendet wurden („Inter-Gel-Spot-Matching“). Um eine hohe statistische Genauigkeit zu erreichen, ist es unbedingt notwendig, neben biologischen Replikaten auch technische Wiederholungen der Experimente durchzuführen (Tonge et al., 2001).

Die zweite Markierungs-Technik, für die allerdings nur zwei kommerziell erhältliche Label zur Verfügung stehen, ist das sogenannte „Saturation Labeling“. Dabei werden alle Cysteine durch die Fluoreszenzfarbstoffe vollständig markiert (Lilley and Friedman, 2004). Die Reaktion mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 erfolgt über deren reaktive Thiol-

Maleimid-Gruppen mit den Sulfhydrylgruppen aller Cysteine der Proteine. Einer der beiden Fluoreszenzfarbstoffe kann analog zum „Minimal Labeling“ zur Markierung eines internen Standards verwendet werden. Auch bei dieser Methode müssen technische Replikate mit „Dye-Swap“ durchgeführt werden. Ein Nachteil des „Saturation Labelings“ ist, dass Proteine, die kein Cystein enthalten [Cysteinanteil bei Proteinen durchschnittlich kleiner 2% (Eitner et al., 2010)], in der Analyse nicht erfasst werden und Proteine mit vielen Cysteinen mehrfach gelabelt werden und damit einen Molekulargewichtsunterschied zum ungelabelten Protein aufweisen. Dies muss bei der Zuordnung der Proteinspots im präparativen Gel berücksichtigt werden.

Beide 2D-DIGE-Markierungsmethoden („Minimal Labeling“ und „Saturation Labeling“) sind mit der massenspektrometrischen Analytik kompatibel. Die dabei verwendete Proteinmenge ist jedoch meistens für nachfolgende Analytik zu gering. Daher werden präparative Gele angefertigt, die ca. die fünffache Proteinmenge enthalten, wobei die Visualisierung mit Coomassie-Brilliant-Blau erreicht wird. Um die Spots den vorher durchgeführten Experimenten zuordnen zu können, wird ebenfalls ein Aliquot des internen Standards zugesetzt. Zur Identifizierung relevanter Proteinspots werden die entsprechenden Gelareale ausgestochen, die Proteine enzymatisch verdaut, die Peptide eluiert und massenspektrometrisch analysiert und identifiziert.

1.2.2 Massenspektrometrie in der Proteomanalyse

Die Massenspektrometrie (MS) konnte mit der Einführung von sanften Ionisierungsmethoden, wie der „Electrospray Ionization“ (ESI) (Fenn et al., 1989) oder der „Matrix-assisted laser Desorption/Ionization“ (MALDI) (Karas and Hillenkamp, 1988), für die Analytik von Biomolekülen eingesetzt werden. Mit diesen Techniken können Biomoleküle, wie große Proteine oder kleine Peptide, in die Gasphase des Massenspektrometers überführt werden, ohne sie zu fragmentieren. Die hohe Empfindlichkeit und Geschwindigkeit machte die MS-Analyse für die Proteinidentifizierung und letztendlich der Proteinquantifizierung in der Proteomanalyse einsetzbar.

Im Allgemeinen können mit der Massenspektrometrie die Molekülmassen von Ionen im Hochvakuum bestimmt werden. Ein Massenspektrometer ist aus den drei Komponenten

Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor aufgebaut. In der Ionenquelle werden Moleküle ionisiert. Diese Ionen werden im Massenanalysator beschleunigt, nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) aufgetrennt und im Detektor nachgewiesen.

1.2.2.1 Ionenquellen

Die Ionisierung von Probenmolekülen kann auf verschiedene Arten erfolgen. Eine Möglichkeit ist die Ionisierung der Probe durch die Aufnahme oder den Verlust eines Elektrons. In der Protein- und Peptidanalytik werden die Proben, die normalerweise polar und nicht flüchtig sind, im Wesentlichen mit zwei Verfahren ionisiert. Aus der flüssigen Phase erfolgt die Ionisierung durch Elektrospray [„Electrospray Ionization“ (ESI)] oder aus einer festen Phase durch „Matrix-assisted laser Desorption/Ionization“ (MALDI).

Bei der MALDI-MS-(„Matrix-assisted laser Desorption/Ionization“-Massenspektrometrie-) Analyse wird die zu identifizierende Probe mit einer Matrix [meist einer organischen Säure, wie α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (CHCA)] gemischt und auf einem Probenhalter („Target“) platziert. Die Matrix liegt dabei in einem 1000- bis 10.000-fachen molaren Überschuss im Matrix-Analyt-Gemisch vor. Damit können, nach dem Verdunsten des Lösungsmittels, die Moleküle der Probe in das Kristallgitter der Matrix eingebaut werden (Ko-Kristallisation). Die Probe wird dann mit mehreren intensiven Impulsen kurzwelliger Laserstrahlen beschossen. Die Wellenlänge des Lasers (UV-MALDI, z.B. $\lambda=337$ nm) wird so gewählt, dass die Laserenergie von der Matrix absorbiert wird. Dies führt zu einer Art Explosion der Festkörperoberfläche, wodurch Matrixmoleküle und Probenmoleküle in die Gasphase freigesetzt und dabei ionisiert werden. Dieses Verfahren der Ionisierung ist sehr schonend, sodass Makromoleküle, wie Proteine, bei diesem Prozess intakt bleiben. Mithilfe eines elektrischen Feldes zwischen „Target“ und einer gegenüberliegenden Elektrode werden die vorwiegend einfach geladenen Ionen in Richtung Massenanalysator und schließlich zum Detektor beschleunigt (Abbildung 2).

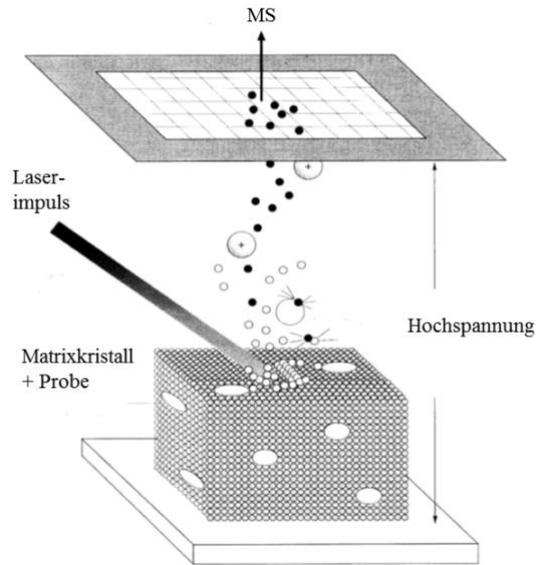


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Ionenerzeugung durch MALDI. Die Matrix, mit kokristallisiertem Analyt, wird durch Laserbeschuss desorbiert und durch das elektrische Feld zwischen MALDI-Probenhalter und einer gegenüberliegenden Elektrode in den Massenanalysator beschleunigt (Abbildung: Nordhoff et al., 2012).

Ein anderes Ionisierungsverfahren ist die „Elektrospray Ionization“ (ESI). Die flüssige Probe wird über eine Kapillare, unter Anlegung eines elektrischen Feldes zwischen Kapillarspitze und ESI-MS, kontinuierlich in das direkt (online) angekoppelte Elektrospray-Massenspektrometer unter Gasunterstützung als feiner Nebel gesprüht. Die nun geladenen Tröpfchen in diesem Nebel verdampfen, wobei an der immer kleiner werdenden Oberfläche der Tröpfchen eine hohe Ladungsdichte entsteht, die zu einer Instabilität und einem spontanem Zerfall der Tröpfchen führt („Coulomb Explosionen“). Während dieses Prozesses entstehen mehrfach geladene Teilchen desselben Moleküls, die nun zum Massenanalysator beschleunigt werden (Abbildung 3). Die ESI-Ionisierung eignet sich besonders für eine online-Kopplung mit einem chromatographischen Trennverfahren.

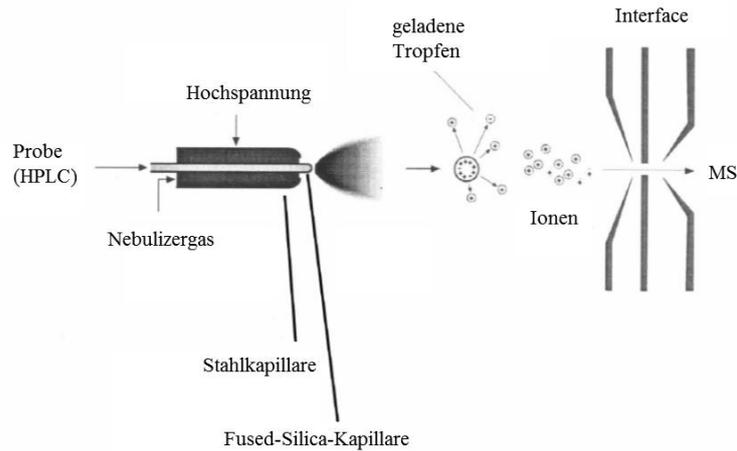


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Ionisierung mit „Electrospray Ionization“ (ESI). Die Probe, meist durch HPLC getrennt, wird durch eine „Fused-Silica“-Kapillare unter Hochspannung in den Massenspektrometer-Eingang (MS) gesprüht. Während dieses Sprühvorgangs entstehen hoch geladene Tröpfchen, die bei ihrem Flug in Richtung Massenspektrometer Lösungsmittel verlieren, wodurch die Tröpfchen immer kleiner werden und eine höhere Ladungsdichte bekommen. Aus diesem Grund zerfallen die Tröpfchen spontan („Coulomb Explosion“) und es entstehen desolvatisierte, mehrfach geladene Ionen (Abbildung: Nordhoff et al., 2012).

1.2.2.2 Massenanalytoren

In der Proteomanalytik werden drei Massenanalytoren verschiedener Bauweise und Funktion verwendet. Es handelt sich dabei um „Time-of-flight“ (TOF)-, Quadrupol (Q)- und Ionenfallen („Ion trap“)-Massenanalytoren.

Mit dem „Time-of-flight“-Massenanalysator werden die Massen geladener Moleküle über die Flugzeit, die sie für eine definierte Strecke benötigen, bestimmt. Dabei ist die Flugzeit der Ionen direkt proportional zu ihrer Ionenmasse. Somit benötigen schwere Ionen für den Flug in der feldfreien Driftstrecke länger als leichte Ionen. Der Vorteil von TOF-Analysatoren ist der weite Massenbereich und die prinzipiell hohe Empfindlichkeit, den sie abdecken können.

Der Quadrupol-Massenanalysator ist aus vier parallelen stabförmigen Elektroden aufgebaut. Ein Quadrupol ist ein Massenfilter, der durch die Kombination von Wechsel- und Gleichspannungsfeldern nur Ionen mit bestimmten m/z -Werten auf einer stabilen oszillierenden Bahn behält. Nur diese Ionen werden zum Detektor durchgelassen. Durch die kontinuierliche Veränderung der Spannungsfelder („Scan“) gibt es für jedes Ion in der Probe genau einen Zeitpunkt, an dem es zum Detektor durchgelassen und dort als Signal erfasst wird.

Die Vorteile von Quadrupolen als Massenfilter sind die hohe Massengenauigkeit und die gute Auflösung von Signalen der Spektren. Sie besitzen jedoch durch den Scan-Modus eine geringere Sensitivität, da zu jedem Zeitpunkt, an dem ein Ion einer bestimmten Masse den Detektor erreicht, der Quadrupol als Massenfilter fungiert und alle Ionen anderer Masse für die Messung verloren gehen.

Ein weiterer Massenanalysator ist die Ionenfalle („Ion trap“). Sie besteht aus einer Ringelektrode, an die ein elektrisches Feld (Wechselspannung) angelegt ist, und zwei Endkappen, die für den Einlass und den Auswurf von Elektronen dienen. In der Ionenfalle werden Ionen durch Anlegen eines elektrischen Feldes eingefangen. Diese Ionen können in unterschiedlicher zeitlicher Dauer (Millisekunden bis Sekunden) auf stabilen Bahnen oszillierend gehalten werden. Durch Veränderung der anliegenden Spannung können bestimmte Ionen aus der Falle geleitet und im Detektor gemessen werden. Die Ionenfalle hat den Vorteil einer sehr hohen Auflösung und einer hohen Massengenauigkeit, verbunden mit einer hohen Empfindlichkeit.

Experimente, die mit einfachen Massenspektrometern mit nur einem Massenanalysator (MS-Experiment) durchgeführt werden, werden nur zur Massenbestimmung der Moleküle eingesetzt. Um auch Informationen über die Struktur der Moleküle zu erhalten, müssen mehrere Massenanalysatoren in einem Massenspektrometer kombiniert werden. Dadurch wird das Gerät zu einem Hybridmassenspektrometer. Bei diesen Geräten erfolgt die Analyse in zwei Stufen. Im ersten Massenanalysator werden die Geräteparameter so festgelegt, dass Moleküle bestimmter m/z -Werte aus einer Probe selektiert werden. Diese werden in eine darauf folgende Kollisionszelle geleitet und treffen dort auf die Atome eines Kollisionsgases (Helium, Stickstoff, Argon) und werden damit fragmentiert. Anschließend werden nun diese Fragment-Ionen in einen weiteren Massenanalysator geleitet und dort wird deren m/z -Verhältnis gemessen. Den gesamten Vorgang bezeichnet man als MS/MS- oder MS^2 -Experiment. In der Ionenfalle erfolgt die Selektion, Fragmentierung und Detektion in einem einzigen Analysator.

Im Review von Aebersold und Mann (Aebersold and Mann, 2003) sind die verschiedenen Typen von gängigen Massenspektrometern, die für die Proteomanalyse verwendet werden, zusammengefasst. Die Entscheidung für ein bestimmtes Massenspektrometer richtet sich dabei nach der Messgenauigkeit und Sensitivität, die für das Experiment notwendig sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ein MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer und ein LTQ-Ionenfallen-Massenspektrometer für die Proteomanalyse eingesetzt.

1.2.2.3 Detektor

Mit einem Detektor erfolgt die Zählung der im Massenanalysator aufgetrennten Ionen und deren Umwandlung in elektrische Signale. In der Regel werden dafür Sekundärelektronen-Vervielfacher (SEV) verwendet (Nordhoff et al., 2012).

1.2.2.4 Datenanalyse

Ziel der massenspektrometrischen Analyse ist es Proteine zu identifizieren und zu quantifizieren. Dazu werden die Proteine in der Regel enzymatisch in Peptide gespalten, sodass die Analytik anhand der Peptide durchgeführt wird. Hierzu werden Proteasen verwendet, die spezifisch nach bestimmten Aminosäuren spalten und so ein für jedes Protein definiertes und charakteristisches Peptid- und damit Massenmuster ergeben [PMF, „Peptide mass fingerprint“ (Pappin, 1997)]. Liegen Proteingemische aus nur wenigen Proteinen vor, kann dieses Massenmuster zur Identifizierung eines Proteins in einer Datenbank verwendet werden. Dazu wird die Datenbank, die z.B. die Sequenzen aller Proteine einer Zelle enthält, virtuell mit dem gleichen Enzym gespalten, das auch im Experiment verwendet wurde. Dann wird die aus dem Massenspektrum extrahierte Liste der Peptidmassen mit den virtuellen Peptidmassen der Datenbank verglichen. Im Idealfall sollten bei der Analyse eines reinen Proteins alle erhaltenen Peptidmassen den Massen eines Proteins in der Datenbank zuzuordnen sein (Abbildung 4).

Ist eine Identifizierung über PMF nicht eindeutig oder ist die Ausgangsprobe zu komplex, so werden einzelne Peptidionen aus dem Massenspektrum des 1. Analysators (MS^1) selektiert, in der Kollisionszelle (CC, „Collision cell“) fragmentiert und die Fragmentmassen im 2. Massenanalysator (MS^2) vermessen (Steen and Mann, 2004). Aus den Massenunterschieden, die den Massen einzelner Aminosäuren entsprechen, lässt sich die Sequenz oder zumindest eine Teilsequenz der fragmentierten Peptide ermitteln und dem entsprechenden Protein in der Datenbank zuordnen (Abbildung 4).

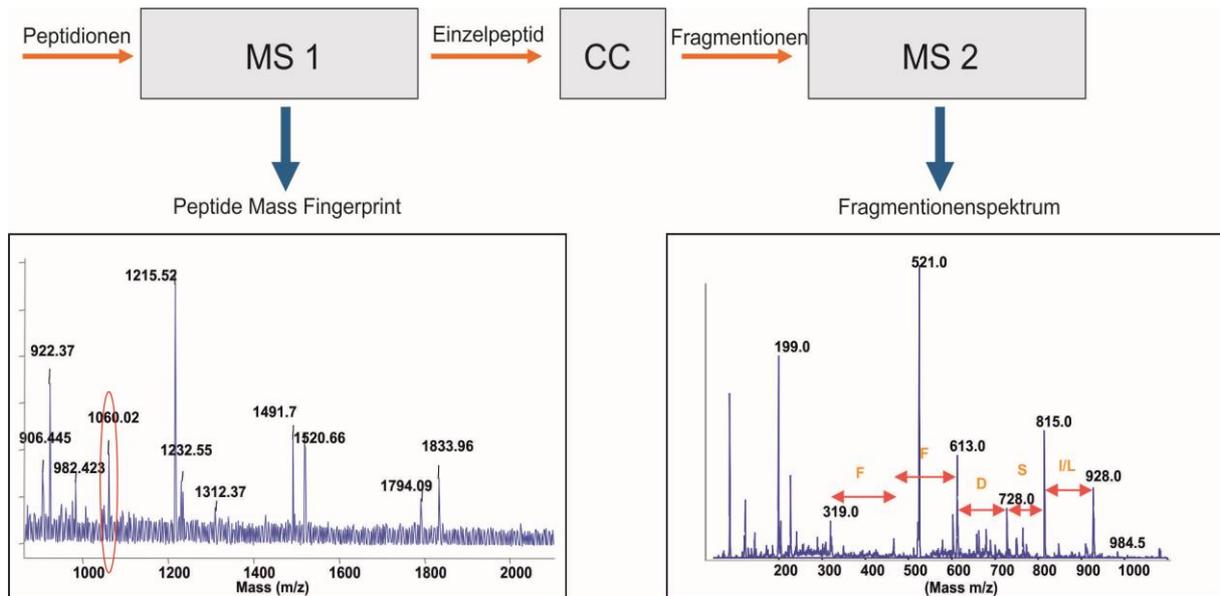


Abbildung 4: Datenanalyse aus MS-1-Spektren oder MS-2-Spektren. Die Peptidionen aus dem 1. Massenanalysator (MS 1; MS^1) können über charakteristische Peptid- und damit Massmuster (PMF) dem Protein in der Datenbank zugeordnet werden. Bei zu komplexer Ausgangsprobe werden einzelne Peptidionen (rot umkreist) selektiert, in der Kollisionszelle (CC) fragmentiert und die Fragmentionen im 2. Massenanalysator (MS 2; MS^2) vermessen. Anhand des Fragmentationenspektrums kann über die Massenunterschiede der Aminosäuren die Sequenz der Peptide und dadurch das entsprechende Protein in der Datenbank ermittelt werden.

Die Signalintensität eines Massenspektrums reflektiert nicht die absolute Menge eines Peptids, da Peptide, entsprechend ihrer Aminosäurezusammensetzung, unterschiedlich ionisieren. Auch die Ionisierungsausbeute des gleichen Moleküls in zwei stark unterschiedlichen Proben kann durch unterschiedliche Suppression ebenfalls unterschiedliche Signale ergeben. Die Massenspektrometrie ist deshalb keine quantitative Methode. Durch das Einführen von stabilen leichten, bzw. schweren Isotopen ($^{12}C/^{13}C$, $^{14}N/^{15}N$, $^{16}O/^{18}O$, $^1H/^2H$) kann jedoch zumindest ein relativer Vergleich mehrerer Proben erreicht werden, da davon ausgegangen werden kann, dass sich Moleküle, die sich nur in ihren stabilen Isotopen unterscheiden, physikochemisch gleich verhalten. Das heißt, Proteine oder Proteingemische (Proteome), die verglichen werden sollen, werden getrennt voneinander mit schweren bzw. leichten Isotopen des gleichen Moleküls markiert, dann vereinigt und gemeinsam vermessen. Peptide mit gleicher Sequenz (Abbildung 5) aus den zu vergleichenden Proben unterscheiden sich dann in ihren Massen, entsprechend den Massen der eingeführten Isotope.

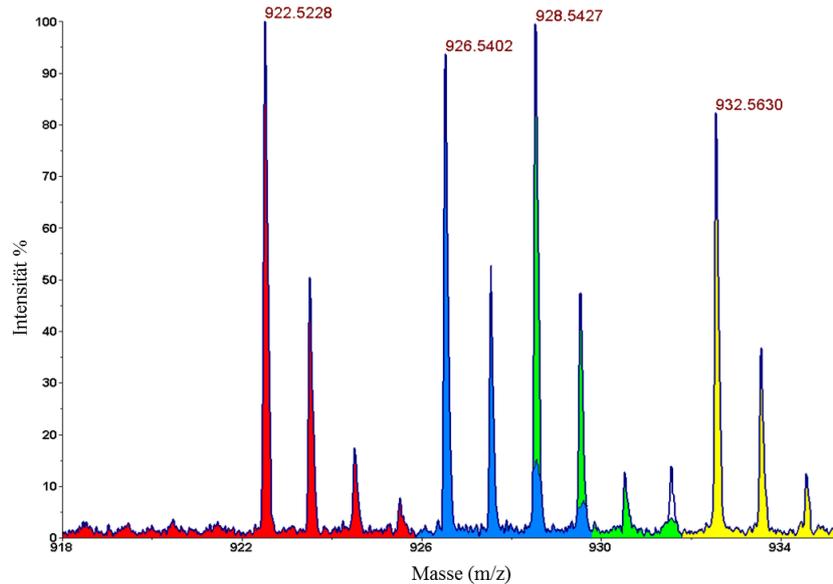


Abbildung 5: Quantifizierung eines Peptids mit stabilen Isotopen (4 unterschiedliche Label). Die Peptide mit gleicher Sequenz, jedoch unterschiedlicher Isotopenmarkierung, aus vier Proteomproben werden als Quadruplex-Peaks detektiert. Sie können über die entsprechenden Massen der eingeführten verschiedenen schweren Isotope unterschieden werden (rot, blau, grün und gelb).

1.2.3 Die relativ quantitative massenspektrometrie-basierte Proteomanalyse

Eine relative Quantifizierung betrachtet das Mengenverhältnis eines Proteins in zwei oder mehr Proben. Damit wird aber keine Aussage über die absolute Menge eines Proteins getroffen.

Die labelfreie Quantifizierung stellt eine naheliegende Form der relativen Quantifizierung mit der Massenspektrometrie dar. Anhand der Signalintensitäten aus den MS- oder MS/MS-Spektren (exakt: die Fläche unter der Kurve; „Intensity based quantification“) oder durch „Spectral-Counting“ (Anzahl der MS/MS-Spektren eines identifizierten Peptids) erfolgt die Quantifizierung der Peptide (Chelius and Bondarenko, 2002). Die Voraussetzung für diese Analysen sind sehr gut reproduzierbare Trennverfahren und massenspektrometrische Messungen. Da dies bei der Kopplung mehrerer Trennverfahren nur schwer gewährleistet werden kann, ist eine Markierung der Proteome mit stabilen Isotopen der labelfreien Proteomanalyse vorzuziehen.

1.2.3.1 Markierung mit stabilen Isotopen

Zur Isotopenmarkierung können verschiedene Strategien angewandt werden. Sie unterscheiden sich im Zeitpunkt der Einführung der Markierung während der Probenaufarbeitung. Dabei kann die Markierung metabolisch (*in vivo*) oder chemisch (*in vitro*) auf der Ebene von Proteinen oder Peptiden erfolgen (Abbildung 6). Die verschiedenen Isotopenmarkierungs-Techniken, die in der heutigen Proteomanalyse verwendet werden, sind in den Reviews von Elliott und Bantscheff zusammengefasst (Elliott et al., 2009; Bantscheff et al., 2007).

Bei der metabolischen Markierung werden isotopenmarkierte Aminosäuren (z.B. Lysin oder Arginin) *in vivo* bereits der Zellkultur zugesetzt. Der Vorteil dieser Markierung ist der sehr frühe Einbau der entsprechenden Isotope während des Wachstums einer Zelle. Die zu vergleichenden Proben können für die nachfolgende Aufarbeitung direkt nach der Zellernte vereinigt werden. Die frühe Probenvereinigung hat den Vorteil, dass alle folgenden Aufbereitungsschritte der gepoolten Proben in einem Ansatz durchgeführt werden. Die relativen Mengenverhältnisse der Proteine werden so zu einem sehr frühen Zeitpunkt fixiert.

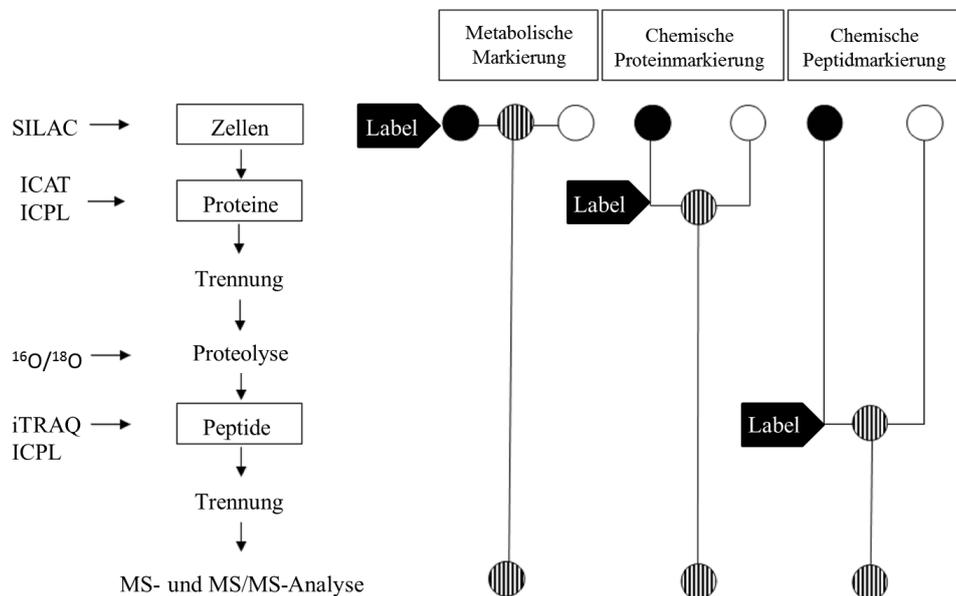


Abbildung 6: Verschiedene Strategien der Isotopenmarkierung. Die Strategien unterscheiden sich im Zeitpunkt, zu dem das Isotop der Probe zugeführt wird. Die entsprechenden Proben (schwarzer und weißer Kreis) werden separat markiert, vereinigt (schraffierter Kreis), aufgearbeitet und schließlich mittels MS- und MS/MS-Techniken analysiert (Abbildung verändert nach: Kellermann, 2008).

Für die Quantifizierung bedeutet dies, dass Proteinverluste während der weiteren Aufarbeitung keine Rolle mehr spielen, da die relativen Verhältnisse für jedes Protein in den zu vergleichenden Proben konstant bleiben.

Die metabolische Markierung wurde von Ong 2002 das erste Mal als „Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture“ (SILAC) (Ong et al., 2002; Ong et al., 2003) beschrieben. Hierfür wachsen zwei oder mehr Zellpopulationen in Nährmedien, denen unterschiedliche isotopenmarkierte Aminosäuren zugesetzt werden. Nach mehreren Zellteilungen sind die Proteine der entsprechenden Zellpopulation fast vollständig mit den leichten oder schweren SILAC-Isotopen markiert. Neben Zellkulturen gelang es auch, z.B. Mäuse durch eine entsprechende Aminosäurediät mit der SILAC-Methode vollständig zu markieren (Krüger et al., 2008), eine allerdings aufwendige und kostenintensive Technik. In der Regel ist jedoch für die Proteomanalyse von Organen oder Körperflüssigkeiten höherer Organismen ausschließlich die chemische Markierung der Proteine geeignet.

Hierbei kommt es darauf an, zu welchem Zeitpunkt der Probenaufarbeitung durchgeführt und welche Aminosäure für die Markierung verwendet wird. Dabei gilt, je früher im Analysenprozess eine Markierung erfolgt, desto weniger fehleranfällig ist die Analyse, da die Verhältnisse der Proben nach deren Markierung und Vereinigung fixiert werden. Gygi beschrieb 1999 das erste Mal eine Methode, wobei Cystein mit einem SH-reaktiven Reagenz (Abbildung 7) umgesetzt wurde. Bei dieser „Isotope-Coded Affinity Tag“-Methode (ICAT) (Gygi et al., 1999) erfolgt die Quantifizierung und Identifizierung allein mit den cysteininhaltigen Peptiden. Für die Markierung werden zwei ICAT-Reagenzien, deren Molekulargewicht sich um 8 kDa unterscheidet, verwendet. Die markierten cysteininhaltigen Proteine werden in Peptide gespalten. Diese Peptide werden durch den Biotin-Affinitäts-Tag, der an den ICAT-Reagenzien gebunden ist, angereichert und damit die Komplexität der Probe verringert.

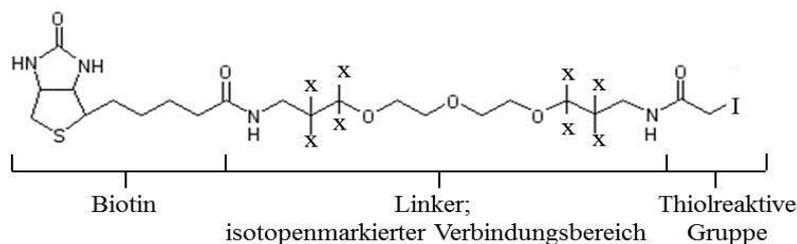


Abbildung 7: ICAT-Reagenz. Mithilfe der thiolreaktiven Gruppe erfolgt die Addierung des Tags an den Cysteinen der Proteine. Die Unterscheidung von leichtem (X = Wasserstoff) und schwerem (X = Deuterium) ICAT-Reagenz ist im Linkerbereich verankert. Durch sie werden die verschiedenen Massendifferenzen der Peptide, die verglichen werden sollen, erzeugt. Die Biotingruppe ermöglicht es, die markierten Peptide selektiv anzureichern (Abbildung: Warscheid und Lottspeich, 2012).

Da Cystein eine seltene Aminosäure ist und da ausschließlich mit ICAT-Reagenz markierte Peptide analysiert werden, geht ein großer Teil an Information verloren, weil nur ein geringer Teil der Aminosäuresequenz in die Analytik mit einbezogen wird (Sequenzabdeckung).

Regnier löste 2002 dieses Problem mit der „Global internal standard technologie“ (GIST), indem er bei der enzymatischen Spaltung eine Isotopenmarkierung der endständigen Aminosäure erreichte (Chakraborty and Regnier, 2002). Bei dieser enzymkatalysierten Markierung wird die Proteolyse der Proteine in Anwesenheit von leichtem (H_2^{16}O) bzw. schwerem (H_2^{18}O) Wasser durchgeführt. Dabei werden allein die beiden leichten Sauerstoffatome der Carboxylgruppe am C-Terminus durch schwere Sauerstoffatome ausgetauscht, was einen Massenshift von 4 Da im MS-Spektrum zur Folge hat. Der Vorteil dieser Technologie ist, dass durch die Markierung aller Peptide eine hohe Sequenzabdeckung der Proteine erreicht wird, da alle Peptide in die Analyse mit einbezogen werden. Da jedes Peptid jetzt in zwei Isotopenformen vorliegt, verdoppelt sich die Anzahl der Peptide, was eine chromatographisch kaum zu bewältigende Komplexität zur Folge hat. Dadurch wird auch die Quantifizierung der Peptide anhand der MS-Spektren kritisch, da sich viele MS-Signale überlagern.

Aebersold löste 2003 dieses Problem indem er isobare Isotopenlabel („Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation“, iTRAQ) zur Markierung der Aminogruppen von Peptiden einführte, die sich in ihren Molekulargewichten nicht unterscheiden (Ross et al., 2004). Die zu vergleichenden Proteome werden enzymatisch gespalten und die Peptide mit den isobaren Reagenzien umgesetzt (Abbildung 8). Entsprechende Peptide aus den unterschiedlichen Proteomzuständen weisen im MS-Spektrum die gleiche Masse auf. Erst nach der Fragmentierung werden Reporterionen freigesetzt, die für jeden Proteomzustand charakteristisch sind und eine Quantifizierung auf der Ebene der MS/MS-Signale ermöglichen. Der Nachteil dieser Methode ist, dass eine Quantifizierung erst auf der Ebene der MS^2 -Spektren möglich ist, was den analytischen Aufwand enorm erhöht. Da eine Markierung auf Peptidebene erfolgt, ist auch bei dieser Technologie die Reduktion der Komplexität nur auf Ebene der Peptide möglich. Ein entscheidender Nachteil aller peptidbasierten Proteomanalysen ist, dass Proteinisofomen (Splicingvarianten, Prozessierungen, PTM) nicht unterschieden werden können. Dies kann nur erreicht werden, wenn eine Isotopenmarkierung der Proteine durchgeführt wird und jede Proteinisofom bis zur Quantifizierung im Massenspektrometer als eigene Proteinspezies behandelt wird.

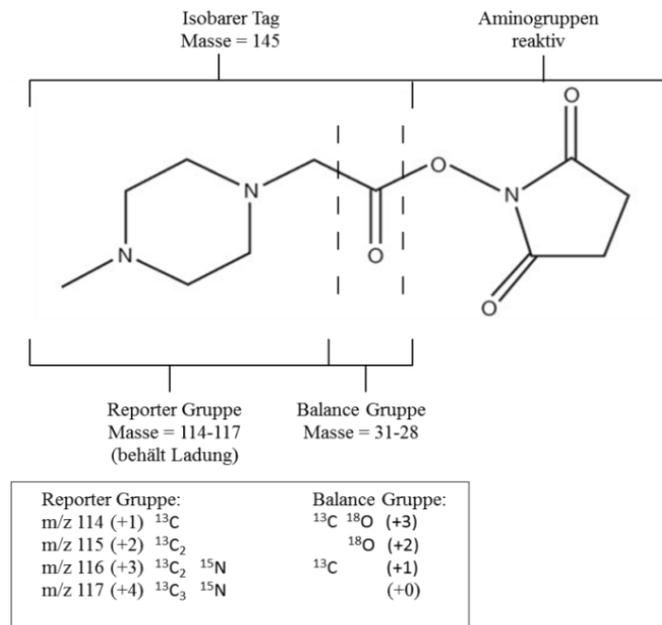


Abbildung 8: iTRAQ-Reagenz. Jedes isobare iTRAQ-Reagenz besteht aus einer N-Hydroxysuccinimidyl-Gruppe, einer Balance-Gruppe und einer Reporter-Gruppe. Die Balance-Gruppe ist mit Isotopen angereichert und gleicht die Massenunterschiede der Reporter-Gruppen aus. Damit wird mit der Reporter-Gruppe durch die Kombination von ¹³C-, ¹⁵N- und ¹⁸O-Atomen vier isobare Tags gebildet. Diese isobaren Tags bestehen aus gleichen Massen (isobar), wodurch die Massen der verschiedenen markierten Peptide im MS-Spektrum zusammenfallen und aufaddiert werden. Im MS²-Spektrum erfolgt eine Spaltung zwischen der Balance-Gruppe und der Reporter-Gruppe. Erst jetzt können die verschiedenen Reporter-Gruppen durch ihre Massen (114 Da, 115 Da, 116 Da und 117 Da) auseinandergehalten werden. Die Quantifizierung der Peptide erfolgt daher bei iTRAQ-Experimenten ausschließlich im MS²-Spektrum [Abbildung verändert nach (Ross et al., 2004)].

1.2.3.2 Chemische Markierung von Proteinen mit Isotope-Coded Protein Label (ICPL)

Diese Anforderungen können von der „Isotope-Coded Protein Label“ (ICPL)-Technik (Schmidt et al., 2005) erfüllt werden. Bei dieser Methode werden die Aminogruppen aller Proteine mit einem hochreaktiven, kleinen Molekül, dem N-nicotinoyloxy-succinimid-ester (Nic-NHS) umgesetzt. Vier verschieden schwere ICPL-Reagenzien [ICPL₀, ICPL₄, ICPL₆ und ICPL₁₀ (Abbildung 9)] können zur Markierung von vier unterschiedlichen Proteomzuständen eingesetzt werden (Abbildung 10). Die unterschiedlich markierten Proteingemische werden vereinigt, womit die relativen Mengenverhältnisse der Proteine der verschiedenen Proteomzustände fixiert werden. Die Komplexität des Proteingemisches kann nun durch eine Kombination von elektrophoretischen (SDS-PAGE, 2D-GE, OFFGEL usw.) und chromatographischen (SEC, RP, IEC) Methoden reduziert werden. Danach werden die fraktionierten Proteine enzymatisch gespalten und die Peptide massenspektrometrisch quantifiziert. Eine MS²-Analyse und damit eine Identifizierung ist nur für die Peptide bzw.

Proteine notwendig, die in den zu vergleichenden Proteomzuständen unterschiedlich exprimiert werden.

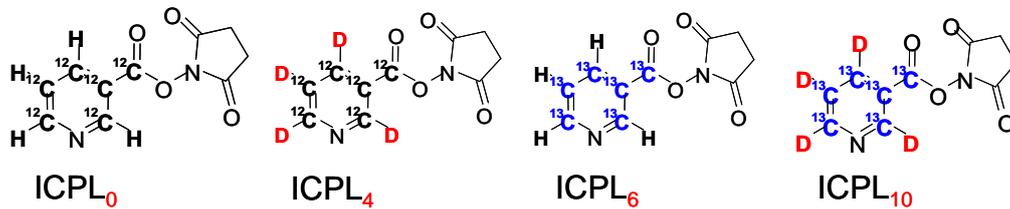


Abbildung 9: ICPL-Reagenzien. N-nicotinoyloxy-succinimid-ester (Nic-NHS) ist der Grundbaustein der ICPL-Moleküle. ICPL₀ ist das einzige nicht mit Isotopen markierte Reagenz, das sich zu ICPL₄ durch den Austausch von vier Wasserstoffatomen zu Deuteriumatomen unterscheidet. Der Massenunterschied in MS¹-Spektrum beträgt dadurch 4 Da. Bei Ersatz von sechs ¹²C-Kohlenstoffatomen im Pyridin-Ring von Nic-NHS zu sechs ¹³C-Kohlenstoffatomen wird das ICPL₆-Reagenz erzeugt, das sich zu ICPL₀ in 6 Da und ICPL₄ in 2 Da unterscheidet. In ICPL₁₀ sind sowohl die H/D-Atome als auch ¹²C/¹³C-Atome ausgetauscht. Der Massenunterschied beträgt dabei zu ICPL₀ 10 Da, ICPL₄ 6 Da und ICPL₆ 4 Da (Abbildung verändert nach Warscheid und Lottspeich, 2012).

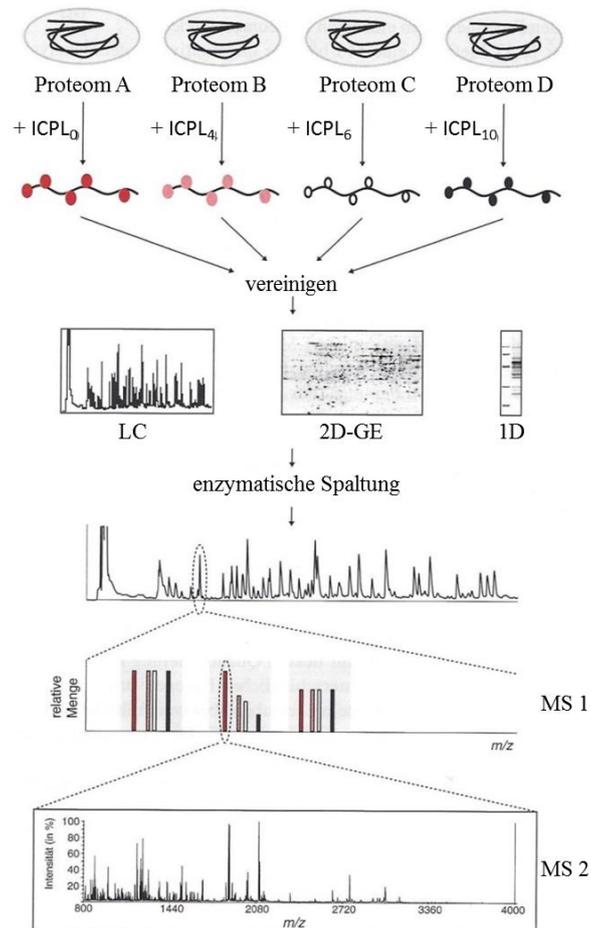


Abbildung 10: Der ICPL-Workflow. Mit der ICPL-Technik werden alle Aminogruppen von Proteinen aus einem Proteom mit einem der ICPL-Reagenzien markiert. Bei vier verfügbaren Reagenzien (ICPL₀, ICPL₄, ICPL₆ und ICPL₁₀) können vier verschiedene Proteome separat markiert werden. Danach werden alle markierten Proteome vereinigt und auf der Proteinebene fraktioniert (LC, 2D-GE, 1D bzw. SDS-PAGE oder OFFGEL, nicht abgebildet). Nach der Fraktionierung der Proteine erfolgt die enzymatische Spaltung der Proteine in Peptide und deren massenspektrometrische Analyse. Die Quantifizierung erfolgt mittels MS und die Identifizierung durch MS/MS.

Eine speziell für die ICPL-Strategie entwickelte Software (ICPL-ESI*Quant*), erkennt das Massenpattern und damit die Isotopologie der einzelnen Peptide und berechnet die Verhältnisse der Signalintensitäten.

Trotz großer Weiterentwicklungen der oben beschriebenen gel- und massenspektrometrie-basierten Methoden (2D-DIGE und ICPL-LC-MS/MS) bedarf es einer weiteren Optimierung der Analysenstrategie gerade für anspruchsvolle Patientenproben.

Aufgrund der enormen Komplexität und des weiten Konzentrationsbereichs der verschiedenen Proteinspezies (bis zu 12 Größenordnungen) gehört Plasma zu den schwierigsten Ausgangsmaterialien für eine Proteomanalyse. Auch Tumorgewebe stellt aufgrund der großen Heterogenität der einzelnen Zelltypen große Anforderungen an die analytischen Techniken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb zur Ausarbeitung und Optimierung der Identifizierungsstrategie von Biomarkern zwei Modellsysteme gewählt, für die zum einen Plasma, aber auch Tumorgewebe von Patienten als Ausgangsmaterial zur Verfügung gestellt werden konnten. Ziel der Analysen war es, Markerproteine zu identifizieren, die eine Stratifizierung der Patienten ermöglichen.

1.3 Modellsysteme: Conn-Syndrom und Rektumkarzinom

1.3.1 Conn-Syndrom

Das Conn-Syndrom, eine Erkrankung der Nebennierenrinde (NNR), wurde erstmals im Jahr 1955 von dem Mediziner Jerome W. Conn beschrieben (Conn, 1955). Man versteht darunter die erhöhte Aldosteronsekretion (primärer Hyperaldosteronismus, PHA), die partiell oder vollständig unabhängig vom Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist. Dies führt zu einer erhöhten Natriumrückresorption über den epithelialen Natriumkanal (ENaC) und die Na-K-ATPase im distalen Tubulus und den Sammelrohren der Niere. Daraus resultiert eine vermehrte Kaliumausscheidung in den Urin und vermehrte Wasseraufnahme aus dem Urin in das Blut. Dies führt zu einem Anstieg des Extrazellular- und Plasmavolumens und damit zu einer Erhöhung des Blutdrucks (Born-Frontsberg and Quinkler, 2009).

1.3.1.1 Nebennieren: Struktur und Funktion

Die Nebennieren (lat. Glandula suprarenalis) sind endokrine Organe und befinden sich auf den Nieren (Abbildung 11). Die Nebennierenrinde (NNR) bildet Steroidhormone wie Kortisol, Androgene und Aldosteron. Die Aufgabe dieser Hormone ist z.B. über ihre Wirkung auf die Leber die Produktion von Zucker (Kortisol) oder der Gewebeaufbau (Androgene). Da das Aldosteron ein Bestandteil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ist, wird damit auch der Salz- und Wasserhaushalt reguliert und der Blutdruck aufrechterhalten.

Das Nebennierenmark (NNM) bildet Hormone wie Adrenalin und Noradrenalin, die auf das Herz, die Gefäße und das Gehirn wirken. Diese Hormone stimulieren den Kreislauf, die Gehirnaktivität und indirekt auch die Nebennierenrinde durch spezielle Hormonregelkreise (RAAS-Regelkreis). Damit wird wiederum die Bildung der Steroidhormone in der Nebennierenrinde stimuliert (Marischler, 2007).

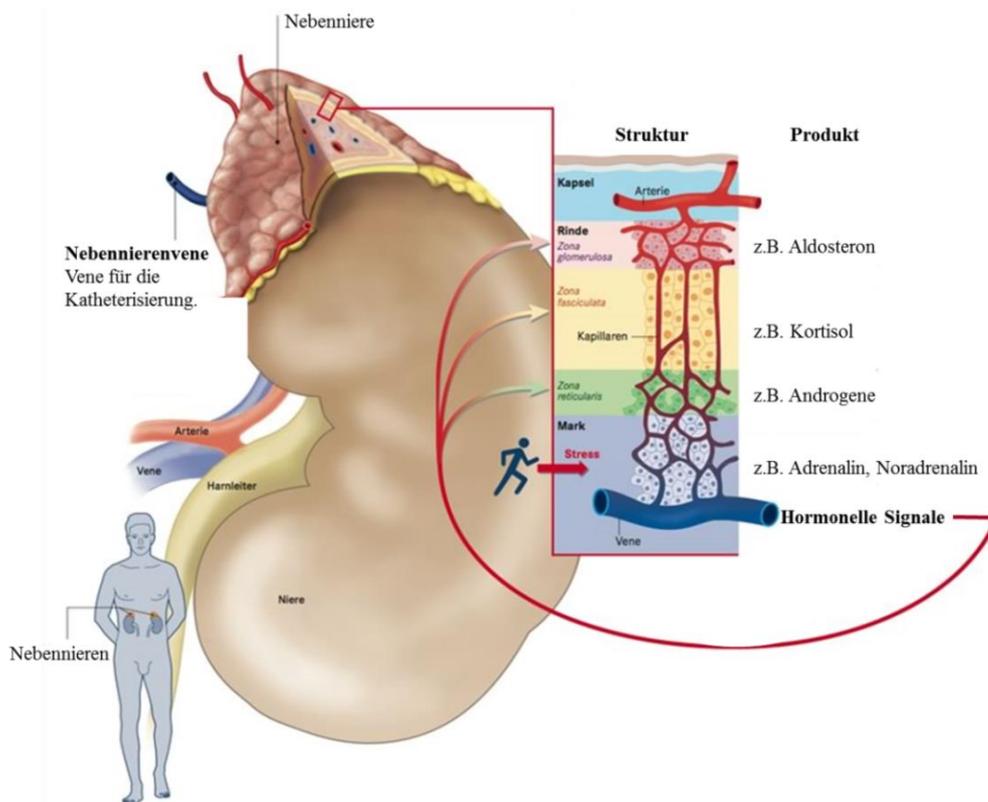


Abbildung 11: Lage, Struktur, Produkte und Funktionen der Nebennieren. Die Nebennieren befinden sich auf den Nieren und bestehen aus der Nebennierenrinde (NNR) und dem Nebennierenmark (NNM). Die Nebennierenrinde besteht aus der Zona glomerulosa, fasciculata und reticularis. Jede dieser Strukturen ist für die Produktion verschiedener Steroidhormone zuständig (Abbildung verändert nach: W&B/Ulrike Möhle, www.diabetes-ratgeber.net).

1.3.1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Die Ausschüttung von Aldosteron aus der NNR erfolgt über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS, Abbildung 12) und wird von Angiotensin-II gesteuert. Bei abfallendem Blutdruck oder geringem Blutvolumen wird aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere Renin freigesetzt. Daraufhin wird Angiotensin-I von Angiotensinogen abgespalten, welches in der Leber synthetisiert wird. Durch das „Angiotensin-Converting-Enzyme“ (ACE) wird Angiotensin-I in Angiotensin-II prozessiert. Durch Angiotensin-II wird neben der Blutdrucksteigerung auch die Produktion von Aldosteron stimuliert. Aldosteron wiederum bewirkt die Zurückhaltung von Natrium und Wasser und die Ausscheidung von Kalium- und Wasserstoff-Ionen in der Niere, was zusätzlich zum Anstieg des Blutdruckes führt. Dies wiederum bewirkt durch negative Rückkopplung eine Reduktion der Reninausschüttung (Marischler, 2007).

Da bei Patienten mit PHA die Aldosteron-Ausschüttung partiell oder vollständig vom RAAS-Regelkreis abgekoppelt ist, bewirkt dies eine durch Rückkopplung verringerte Renin-Freisetzung aus der Niere und keine Beendigung der Aldosteronsekretion. Folglich bleibt die Konzentration von Aldosteron sehr hoch oder nimmt sogar weiter zu. Das führt zu dem Hauptsymptom des Conn-Syndroms, dem hohen Blutdruck (Marischler, 2007).

Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

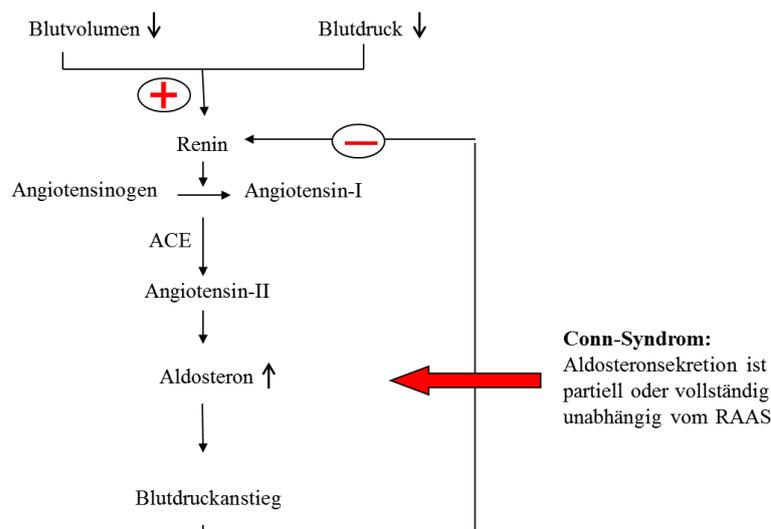


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) mit den Auswirkungen beim Conn-Syndrom. Durch das Conn-Syndrom erfolgt die Produktion von Aldosteron ohne die Kontrolle von RAAS. Dadurch steigt die Aldosteron-Konzentration und somit auch der Blutdruck bei verringerter Renin-Konzentration.

1.3.1.3 Subtypen Evaluierung

Der primäre Hyperaldosteronismus (PHA) ist eine der häufigsten Ursachen für Hypertonie (erhöhter Druck in den Blutgefäßen). Statistisch gesehen ist jeder 10. Patient mit Bluthochdruck zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr betroffen (Born-Frontsberg and Quinkler, 2009). Heute erfolgt die zielgerichtete Behandlung des Conn-Syndroms über eine Bestimmung der Subtypen.

Es sind sechs Subtypen von PHA bekannt, wobei zwei Varianten (APA und IHA) am häufigsten vertreten sind (Young, 2007). Die Subtypen werden nach dem Vorkommen der Adenome in einer oder in beiden Nebennieren unterteilt. Die Unterteilung ist entscheidend für die Behandlung, da eine spezifische Therapie notwendig ist, um die Prognose zu verbessern. Ist eine Nebenniere von einem Adenom betroffen, so wird dies als aldosteronproduzierendes Adenom (APA) bezeichnet. Dies betrifft 35% der PHA-Fälle (Young, 2007). Bei 60% der Patienten liegt eine idiopathische bilaterale Hyperplasie (IHA) vor, wobei beide Nebennieren aldosteronproduzierende Adenome aufweisen (Young, 2007).

Bei den meisten Patienten mit APA wird eine einseitige chirurgische Entfernung der adenomatösen Nebenniere durchgeführt. Dies führt häufig zur Normalisierung der geringen Kaliummenge im Blut und dadurch zu einer Verbesserung des Salz- und Wasserhaushaltes. Damit kann eine Verbesserung des Blutdrucks bei ca. 30 bis 60% der APA-Patienten erreicht werden (Young, 2009).

Bei Patienten mit IHA führt die operative Entfernung einer oder beider Nebennieren selten zu einer Symptomverbesserung. Daher ist eine lebenslange Behandlung dieser Patienten mit Mineralokortikoid-Antagonisten die bevorzugte Art der Therapie (Young, 2009).

1.3.1.4 Nebennierenvenen-Katheterisierung

Die Klassifizierung der Subtypen von PHA erfolgt über eine aufwendige Differenzialdiagnostik, die für die Patienten äußerst unangenehm ist. Im Artikel von Born-Frontsberg and Quinkler (Born-Frontsberg and Quinkler, 2009), sind die Methoden der Differenzialdiagnostik ausführlich beschrieben. Teil dieser Diagnostik ist eine Katheterisierung der Nebennierenvenen („Adrenal vein sampling“, AVS) zur Gewinnung von Blut (Born-Frontsberg and Quinkler, 2009). Mit der Katheterisierung erfolgt die selektive und seitengetrennte Blutentnahme aus beiden Nebennierenvenen und der Hohlvene („V. cava

superior, inferior“). Aus dem entnommenem Blut von beiden Nebennierenvenen wird getrennt die Aldosteronmenge bestimmt. Ein Vergleich der beiden Werte unter Einbeziehung der Normwerte gibt einen Hinweis, welche Art von Hyperaldosteronismus vorliegen könnte (Webb et al., 2012).

Die Durchführung der Katheterisierung der Nebennierenvene, insbesondere der rechten, die direkt in die Hohlvene einmündet und einen geringeren Durchmesser besitzt, ist häufig schwierig (Young, 2009). Die Erfolgsrate der Katheterisierung liegt dabei zwischen 63 und 97% (Born-Frontsberg and Quinkler, 2009). Bei Scheitern der Katheterisierung können die Adenome nicht eindeutig diagnostiziert werden, was eine subtypenspezifische Therapie ausschließt (Zelinka et al., 2012).

Es wäre deshalb von großem Interesse, Verfahren zu entwickeln, die eine einfachere Charakterisierung der Subtypen erlauben würde. Die Identifizierung von Proteinen im Blut, die charakteristisch für den jeweiligen Subtypus sind, würde eine einfache, schnelle und für die Patienten wenig belastende Diagnostik bedeuten.

1.3.1.5 Proteomanalyse von Proben aus Patienten mit Diagnose Conn-Syndrom

Das Besondere dieser Proben ist, dass bei Patienten mit Conn-Syndrom aufgrund der Katheterisierung, die direkt am betroffenen, bzw. gesunden Organ vorgenommen werden kann, sowohl normales als auch adenomatöses Blut aus dem gleichen Patienten gewonnen werden kann. Dies vereinfacht die Identifizierung von potenziellen Biomarkern, da keine genetische Heterogenität vorliegt, die beim Vergleich von Blut mehrerer Probanden zu berücksichtigen wäre. Es ist auch zu erwarten, dass Peptide oder Proteine, die krankheitsbedingt vom Organ ins Blut abgegeben werden, in erhöhter Konzentration entnommen werden können, bevor eine Verdünnung im peripheren Blut erfolgt.

Neben Plasma wurden mittels Mikrodissektion („Laser Capture Microdissection“; LCM) operativ entfernter Nebennieren auch adenomatöse und normale Zellen aus der kranken Nebennierenrinde eines Patienten entnommen und vergleichend analysiert.

1.3.2 Rektumkarzinom

Das kolorektale Karzinom („Colorectal cancer“; CRC) ist weltweit die dritthäufigste Krebsart bei Männern und die zweithäufigste Krebsart bei Frauen (Ferlay et al., 2007). Männer sind dabei häufiger betroffen als Frauen. Beide Geschlechter sind durchschnittlich ab dem 50. Lebensjahr besonders gefährdet. Die Inzidenz liegt bei 40 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Erkrankungsrate ist in den Industrieländern deutlich höher als in den Entwicklungsländern (Kleihues and Sobin, 2000).

Beim kolorektalen Karzinom handelt es sich um bösartige Tumore des Dickdarms (Kolon) oder des Mastdarms (Rektum) (Abbildung 13). Die einzelnen Darmabschnitte sind dabei unterschiedlich häufig betroffen. Ungefähr zwei Drittel der Karzinome befinden sich im Kolon und ungefähr ein Drittel sind im Rektum lokalisiert (Zoccali et al., 2011).

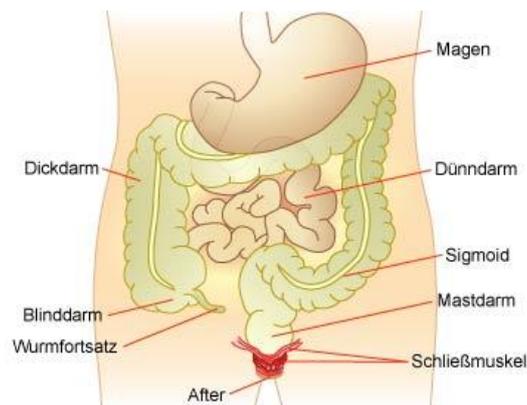


Abbildung 13: Der menschliche Darm. Der Mageninhalt gelangt in den Dünndarm, der ihn in den Dickdarm transportiert. Der Dickdarm (Kolon; etwa 1,50 m lang) und der Mastdarm (Rektum; etwa 16 cm lang) bilden zusammen einen langen muskulären Schlauch. Der Mastdarm endet am After (Anus). Dort wird mithilfe des Schließmuskels das Ende des Mastdarms verschlossen bzw. zur Darmentleerung geöffnet. (Abbildung: Siebeck; Klinikum der Universität München).

Risikofaktoren beim kolorektalen Karzinom sind sowohl Ernährung als auch genetische Disposition. Ballaststoffarme sowie fett-, fleisch- und kalorienreiche Ernährung stellen dabei ein besonderes Risiko dar. Zu den genetischen Faktoren zählen familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) und eine positive Familienanamnese für kolorektale Karzinome (Lynch et al., 2004). Ebenfalls dazu gehören die Vorstufen von kolorektalen Adenomen, aus denen zu 90% kolorektale Karzinome entstehen. Dazu zählen die Adenomatosis coli und chronische entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Zu den weiteren Risikofaktoren gehören Rauchen, Alkoholkonsum und fortgeschrittenes Lebensalter.

Die meisten kolorektalen Karzinome entstehen durch genetische Veränderungen aus gutartigen Tumoren der Dickdarmschleimhaut. Die genetischen Veränderungen erfolgen in mehrstufigen Prozessen und sind als die Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben (Fearon and Vogelstein, 1990).

Durch Aktivierung von Onkogenen (K-RAS-Gen) und Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen [p53 oder „Deleted in colon carcinoma“ (DCC)] entsteht aus einem Adenom ein Karzinom. Die Reihenfolge ist dabei nicht wichtig, vielmehr die Häufung von mehreren genetischen Veränderungen. Eingeleitet wird die Veränderung von normalem Kolonepithelium zum hyperproliferativen Epithel zu 70–80% durch die Inaktivierung (Mutation) des „Adenomatous Polyposis Coli“-Gens (APC-Gens). Das Produkt des APC-Gens ist wahrscheinlich an der Zelladhäsion und Stabilisierung des Zytoskeletts beteiligt. Somit wird das vermehrte Wachstum des Kolonepithels gefördert.

In 50% aller kolorektalen Karzinome liegt dabei eine Mutation des RAS-Gens vor. Durch die Mutation werden Wachstumssignale an die Zellen gesendet, wodurch die Tumorzellen unkontrolliert wachsen. In der weiteren Tumorprogression kommt es zum Verlust von Tumorsuppressorgenen, wie DCC und p53. Durch DCC-Mutationen geht dabei der Zellzusammenhalt verloren. Dies ist bei 70% der CRC-Fälle nachweisbar. Mutationen im p53-Gen zählen zu den häufigsten genetischen Veränderungen. Im Normalfall wird durch p53 die Replikation geschädigter DNA verhindert und überflüssige oder genetisch abnormale Zellen werden zur Apoptose angeregt. Durch die Inaktivierung von p53 wird der programmierte Zelltod verhindert und die Tumorzelle kann ungehindert wachsen (Abbildung 14).



Abbildung 14: Schematische Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz auf Gewebeebene. Aus gutartigen Veränderungen (Flacher Polyp) der Schleimhautzellen des Dickdarms entstehen komplexe gutartige Adenome. Diese können sich durch verschiedene Entwicklungsstufen zum bösartigen Darmkrebs entwickeln und im weiteren Verlauf Tochtertumoren (Metastasen) bilden (Abbildung verändert nach: Universitätsklinikum Münster).

Unbehandelt können im Verlauf von 10–35 Jahren aus den gutartigen Adenomen bösartige Adenokarzinome entstehen, die zu einem massiven Gewebewachstum mit fortschreitender Metastasierung führen (Morson, 1974).

Die Metastasierung erfolgt, je nach dem befallenen Ort des Rektums, unterschiedlich. Bei einem Tumor im oberen und mittleren Rektumdrittel erfolgt die Metastasierung in der Leber, wohingegen bei einer Erkrankung im unteren Rektumdrittel die Metastasierung über die Lymphwege in die Leistenlymphknoten und über die Blutbahn in die Lunge erfolgt. Die Symptome sind durch Veränderungen des Stuhlgangs, wie Schleim- und Blutabgang, gekennzeichnet und deuten schon meist hier auf ein fortgeschrittenes Stadium hin.

1.3.2.1 Diagnostik und Tumorgradeinteilungen

Die Diagnostik von CRC kann mit verschiedenen Methoden erfolgen. Die Ermittlung des tumorunspezifischen Laborparameters CEA (Carcinoembryonales Antigen) wird lediglich zur Tumorverlaufskontrolle eingesetzt (Kim et al., 2008). Durch die Koloskopie erfolgt die Begutachtung der Darmschleimhaut, wobei verdächtige Schleimhautveränderungen (z.B. Polypen) durch eine Biopsie entnommen und histologisch untersucht werden (Benson 3rd. et al., 2011). Der Einsatz von Ultraschall kann Veränderungen in den Gewebeschichten und eventuelle Geschwüre in den benachbarten Organen (Blase, Prostata, Scheide) aufzeigen (Benson 3rd. et al., 2011). Mittels Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgt schließlich die Erfassung von eventuellen Metastasierungen (Benson 3rd. et al., 2011).

Für die geeignete Therapie wird zu Beginn der Behandlung der Tumor nach Tumorgröße (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasen (M) beurteilt (Zoccali et al., 2011). Die genaue Klassifikation („Grading“; G) erfolgt durch die mikroskopische Untersuchung von operativ entferntem Tumorgewebe. Mit der R-Klassifizierung („Residual“ oder Resttumor nach Operation) wird die operative Tumorentfernung beurteilt. Zuletzt findet die stadiengerechte Therapie durch die UICC- („Union Internationale Contre le Cancer“-) Klassifikation von 2002 statt. Dabei werden die Stadien, ansteigend nach Tumorgrad und unter Einbeziehung der TNM-Klassifikation, in 0, I, IIA, IIB, IIC, IIIA, IIIB, IIIC und IV eingeteilt. In den Arbeiten von Jessup bzw. Liersch (Jessup et al., 2011; Liersch et al., 2010) sind die unterschiedlichen Behandlungsmöglichkeiten der einzelnen UICC-Stadien detailliert beschrieben.

1.3.2.2 Radiochemotherapie bei Patienten mit Rektumkarzinom

Die Art der Therapie bei Patienten mit Rektumkarzinom ist abhängig vom Tumorstadium und der Entstehung von Fernmetastasen und Lokalrezidiven nach chirurgischer Therapie. Beim Rektumkarzinom werden sowohl Radio- als auch Chemotherapie eingesetzt. Diese Radiochemotherapie (RCT) erfolgt vor einer operativen Therapie (Ceelen et al., 2009). Damit können primär inoperable Tumore in operable Stadien überführt werden („Downstaging“). Die Chemotherapie wird eingesetzt, um die Bildung von Fernmetastasen zu vermeiden.

Patienten mit Rektumkarzinom (UICC-Stadien I) besitzen nach chirurgischer Therapie gute Heilungschancen und werden daher meist nicht mit Radiochemotherapie behandelt. Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom (UICC-Stadien II–III) werden, nach den Empfehlungen der Deutschen Krebsgesellschaft mit einer präoperativen (neoadjuvanten) Radiochemotherapie behandelt (Liersch et al., 2010; Sauer et al., 2012). Hierbei zeigten eine Basisbehandlung der Patienten mit 50,4 Gy (Gesamtstrahlendosis) und 5-Fluorouracil (5-FU; Zytostatikum der Chemotherapie) als Langzeit-Radiochemotherapie und vorheriger chirurgischen Entfernung des Tumors eine Reduktion der Lokalrezidivrate (Liersch et al., 2010).

5-Fluorouracil, ein Fluoropyrimidin, ist ein Inhibitor der Thymidilatsynthetase und der DNA-Replikation. Der Einsatz von 5-FU führt zu DNA-Strangbrüchen. Diese Hemmeffekte betreffen vor allem Zellen mit hohen Zellteilungsraten, wie Tumorzellen, da sie in hoher Menge 5-FU aufnehmen können. Diese Therapieform hatte eine Erfolgsrate von ca. 10% (Pestalozzi et al., 2007).

Bei Kombination von 5-FU mit Folinsäure (FA) konnte die Ansprechrate auf 20% verdoppelt werden (Pestalozzi et al., 2007). Die Kombination von Folinsäure und 5-FU führt zur Bildung eines stabilen Komplexes, der zu einer anhaltenden Blockade der Thymidilatsynthetase mit verstärkter Hemmung der DNA-Synthese führt. Die Wechselwirkung von FA und 5-FU verstärkt zwar die Wirkung der Therapie, ist jedoch von erheblichen toxischen Nebeneffekten begleitet. Die mittlere Überlebenschance wurde von 6 auf 11 Monate erhöht (Pestalozzi et al., 2007).

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gewebeprobe wurde eine neue Art der Therapie angewandt. Präoperativ wurde zu 50,4 Gy (Gesamtstrahlendosis) und 5-FU/FA zusätzlich Oxaliplatin oder Irinotecan eingesetzt, um eine Metastasenbildung zu verhindern (Liersch et al., 2010).

Irinotecan ist ein spezifischer Inhibitor der Topoisomerase-1. Es bindet an die DNA und an die Topoisomerase-1 und verursacht dort Einzelstrang-DNA-Läsionen, die die Replikationsgabel der DNA blockieren und für die Zytotoxizität verantwortlich sind. Die Kombination von Irinotecan mit 5-FU/FA zeigt eine deutliche Verbesserung des Ansprechens und eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens (Pestalozzi et al., 2007). Oxaliplatin ist ein Platinderivat, dessen Wirkungsmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Es wird angenommen, dass die Zytotoxizität durch eine DNA-Interaktion von Oxaliplatin-Derivaten mit Intra- und Interstrang-Quervernetzungen einen Abbruch der DNA-Synthese bewirkt. Mit dieser Radiochemotherapie konnten höhere Ansprechraten und ein Trend zu einem verlängerten Gesamtüberleben beobachtet werden (Pestalozzi et al., 2007). Diese Form der Therapie könnte in Zukunft zur Standardbehandlung von Patienten mit Rektumkarzinom im Stadium UICC II–III werden (Sauer et al., 2012).

Trotz der vielfachen Erfolge der beschriebenen Therapien sprechen nicht alle Patienten gleichermaßen auf die Behandlung an (Sauer et al., 2012). Für eine gezielte Therapie ist es daher essenziell, dass die Patienten im Vorfeld nach gutem Ansprechen (Responder) und schlechtem/mittelmäßigem Ansprechen (Non-Responder) in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Dies soll eine lange, unangenehme und erfolglose Therapie vermeiden, sodass auch für Non-Responder dieser Radiochemotherapie frühzeitig eine andere geeignete Therapie zur Anwendung kommen kann.

1.3.2.3 Proteomanalyse von Gewebematerial aus Patienten mit Rektumkarzinom: Vergleich von Respondern und Non-Respondern auf Radiochemotherapie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tumorzellen aus biopsiertem Rektumkarzinomgewebe mittels Mikrodissektion (LCM) isoliert und für die Proteomanalyse mit der ICPL-Strategie verwendet. Die Patienten waren einer Behandlung mit 50,4 Gy (Gesamtstrahlendosis) und 5-FU/FA Irinotecan unterzogen worden (RCT I). Verglichen wurden Patienten, die auf die Behandlung angesprochen haben, mit Patienten mit schlechtem/mittelmäßigem Behandlungserfolg (Responder gegen Non-Responder). Ein weiterer Patientenpool war einer Behandlung mit 50,4 Gy (Gesamtstrahlendosis) und 5-FU/FA Oxaliplatin unterzogen worden (RCT II) und wurde analog analysiert.

1.4 Ziel der Arbeit

In Gewebe und Zellen unterschiedlicher Erkrankungsstadien verändert sich auch das Proteinexpressionsmuster dieser Zellen. Umgekehrt gibt es auch bei unterschiedlichen Patienten eine genetische Prädisposition, die unterschiedliches Ansprechen auf verabreichte Therapien zur Folge hat. Damit verbundene Veränderungen von Proteinsignaturen können durch die vergleichende Analyse von Patientenproben untersucht werden und so die Basis für eine Stratifizierung der Patienten darstellen.

Eine Möglichkeit, diese Proteinsignaturen oder Biomarker zu detektieren ist die Proteomanalyse.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Strategie zur Durchführung einer personalisierten/individualisierten Proteomanalyse von Patientenproben zu untersuchen und unter besonderer Berücksichtigung der Stratifizierung von Patienten zu optimieren. Als Probenmaterial dienten Plasma und Tumorgewebe zweier biologischer Modellsysteme.

Als erstes Modellsystem wurde Nebennierengewebe von Patienten mit Conn-Syndrom verwendet. Aus der Nebenniere wurden normales und tumoröses Gewebe entnommen. Da die Proben aus einem Patienten stammen, konnte jegliche genetische Variabilität vermieden werden, was eine Interpretation der Daten vereinfacht. Zusätzlich zu den Gewebeproben wurde Plasma der gleichen Patienten analysiert. Das Blut wurde direkt an der linken (z.B. krank) und rechten (z.B. normal) Nebennierenvene entnommen. Die klinische Diagnostik der Erkrankung kann durch den Nachweis eines Biomarkers im Blut erleichtert werden.

Da von den Nebennieren nur geringe Gewebemengen zur Verfügung stehen wurde als zweites Modellsystem Gewebe vom Rektumkarzinom verwendet. Verglichen wurde Gewebe von Patienten, die auf eine Radiochemotherapie gut angesprochen haben (Responder) mit Gewebe von Patienten die schlecht/mittelmäßig auf diese Therapie angesprochen haben (Non-Responder). Auf diese Weise wurde die Wirkung von zwei verschiedenen Radiochemotherapien (RCT I und RCT II) auf Patienten verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt:

Trifluoressigsäure (TFA).

BioRad Laboratories GmbH, München:

Bradford-Reagenz, Coomassie-Brilliant-Blau, „Molecular Weight Standards“; „Low Range/Broad Range“ für SDS-Gele (SDS-PAGE, 2D-PAGE, 2D-DIGE).

Bruker Daltonics (LifeSciences & Chemical Analysis), Bremen:

α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA).

GE Healthcare, München:

„Cooling medium“ für HPE-Gelsystem; N,N,N',N'-Tetramethyl-1-2-diaminomethan (TEMED).

Merck GmbH, Darmstadt:

Agarose, Ameisensäure, Ammoniumhydrogenphosphat, β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Butanol, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol (DTT), Ethanol, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Salzsäure (HCl), Natriumacetat, Natriumborat, Natriumcarbonat, Natriumhydroxid (NaOH), Natriumthiosulfat, Titriplex III, Tris(2-chlorethyl)phosphat (TCEP), Tris, Xylol, Zitronensäure.

Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe:

Sodiumdodecylsulfat (SDS).

Serva Electrophoresis, Heidelberg:

Acrylamid-Bis-Lösung, Coomassie R-250, Endoproteinase Glu-C (V8), Glutaraldehyd, Glycerin, Serva ICPL™ Quadruplex Kit, „Silicone DC 200 Fluid“, Trypsin NB „Sequencing Grade modified“.

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen:

Aceton, Ammoniumbicarbonat (ABC), Ammoniumpersulfat (APS), Bovine Serum Albumin (BSA), 3-[(3-Chloramidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS), „Dilution“,

„Stripping“ und „Neutralization“ Puffer für die Depletion, Dimethylformamid (DMF), Eosin, Essigsäure, Ethanol, Guanidin-HCl, Glycin, Hämatoxylin, Harnstoff, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES), Hydroxylamin-HCl, Formaldehyd, Formalin, Silbernitrat, Iodacetamid (IAA), Kresylviolet-Acetat, L-Lysin Monohydrochlorid, Methanol, N-Acetyl-Cystein, Thioharnstoff, Wasserstoffperoxid (H₂O₂).

Thermo Fisher Scientific, Schwerte:

Pierce® Fast Western-Blot Kit („Enhanced chemiluminescence“ ECL) Substrate.

VWR, Karlsruhe:

Acetonitril.

Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Protein LoBind Reaktionsgefäße, Reaktionsgefäße und Zentrifugenröhrchen wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg) und Beckton Dickinson (Heidelberg) verwendet.

2.1.2 Geräte und Materialien

Elektrophorese Zubehör (SDS-PAGE, 2D-PAGE, 2D-DIGE):

- Agilent 3100 „OFFGEL Fractionator“ (Agilent Technologies, Oberhaching)
- CyDye™ DIGE „Fluor minimal Dye“ (GE Healthcare GmbH, Freiburg)
- Elektrodenpapier „Paper Wicks“ (GE Healthcare GmbH, Freiburg)
- „High Performance Elektrophoresis“ (HPE) System (Serva Elektrophoresis, Heidelberg)
- HPE™ 2D Large Gel NF 12,5% Kit (GE Healthcare GmbH, Freiburg)
- „Immobiline DryStrip“ pH 3–10 NL 24 cm (GE Healthcare GmbH, Freiburg)
- „Immobiline DryStrip“ pH 3–6 24 cm (Serva Elektrophoresis, Heidelberg)
- „Immobiline DryStrip-Kit“ (GE Healthcare GmbH, Freiburg)
- „Immobiline DryStrip“ Equilibrierer (GE Healthcare GmbH, Freiburg)
- „IPG Blue Strips“ pH 3,5–4,5 24 cm (Serva Elektrophoresis, Heidelberg)
- Macrodrive 5000 V „Power Supply“ (GE Healthcare GmbH, Freiburg)
- Macrodrive 3500 V EPS 3501 XL „Power Supply“ (GE Healthcare GmbH, Freiburg)
- Midi Gieß- und Laufapparatur (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Minigel Gieß- und Laufapparatur (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Multitemp II Kryostat (GE Healthcare GmbH, Freiburg)
- „Multiphore II Electrophoresis“ System (GE Healthcare GmbH, Freiburg)

- Serva Gel™ TG 8–16% (Serva Elektrophoresis, Heidelberg)
- SERVA Gel™ TG 12 Vertikal Tris-Glycin Gel 12% 1,0 mm Geldicke, 12 Taschen (Serva Elektrophoresis, Heidelberg)
- SERVALYT™ „Carrier Ampholyt“ 4–7 und 3–5 (Serva Elektrophoresis, Heidelberg)
- Silikon Deckelaufsatz (Agilent Technologies, Oberhaching)
- Pharmalyte pH 3–10 (Serva Elektrophoresis, Heidelberg)
- Vertikal Tris-Glycin Gel 8–16% 1,0 mm Gel Dicke, 12 Taschen (Serva Elektrophoresis, Heidelberg)

Filter:

- „Hydrosart spin concentrator“ (Sartorius AG, Göttingen)
- ZEBA „Spin Desalting Columns“ 0,5 ml (Proxeon Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Schwerte)
- „StageTips“ 200 µl C18 Material (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

Heizblock:

- Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg)

RP-, AC-HPLC und Zubehör:

- Agilent 1100 Series HPLC-System (Agilent Technologies, Böblingen)
- „Acclaim Pepmap100 reversed-phase C18 column, 15 cm length 75 µm inner Diameter 100 Å“ (Thermo Scientific, Dreieich)
- Seppro IgY14-Säule (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- SuperMix-Säule (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
- „Spin“ Filter 0,45 µm (Beckman Coulter, Krefeld)
- „Vivaspin 15R 5 kDa MWCO Hydrosart spin concentrator“ (Sartorius AG, Göttingen)

Küvette:

- Küvetten Einweg (Greiner bio-one, Frickenhausen)

LCM, Mikroskop und Zubehör:

- „Adhesive Cap“ für LCM (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)
- Deckglas (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)
- Kryo-Einbettmedium (Richard-Allen-Scientific, Kalamazoo, USA)
- Kryotom Hyrax C50 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)
- Kryostat Jung CM 3000 (Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar)
- NEG-50 „frozen section medium“ (Richard-Allen-Scientific, Kalamazoo, USA)
- Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran („Immobiline P“ Transfer Membran; Millipore GmbH, Schwalbach)

-PALM MicroBeam MB IV (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)

-Objektträger PEN 1,0 mm (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)

Magnet-/Heizrührer:

-Ikamag RCT (IKA® Werke, Staufen)

Massenspektrometer; MALDI und Zubehör:

-MALDI-TOF/TOF-MS 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystem, USA)

-Standardpeptiden (Applied Biosystem, USA)

-192-well „Steel Target“ (Applied Biosystem, USA)

-Zip-Tip C18-Material (Millipore GmbH, Schwalbach)

Massenspektrometer; ESI und Zubehör:

-LTQ-Hybridmassenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

-LTQ-Velos Hybridmassenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen)

-nanoHPLC-Anlage Agilent 1200 (Agilent, Böblingen)

-15 cm-fused-silica Säulen mit 75 µm ID gefüllt mit ReproSil-Pur C18-AQ 3 µm Kunstharz (Dr. Maisch GmbH, Ammer Bruch-Entringen)

-„Reversed-Phase“-Säule (Acclaim PepMap, 75 µl X 2 cm C18, 100 Å, Dionex; Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

-„Reversed-Phase“-Säule (Acclaim PepMap RSLC 75 µm X 15 cm, 100 Å, Dionex; Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

-„Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid-chromatography“ (RSLC) (Dionex, Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

Mikrotips:

-Stage Tip (Proxeon Biosystems, Thermo Scientific, Schwerte)

Parafilm:

-Parafilm (Josef Peske GmbH und Co.KG, Aindling-Arnhofen)

Pipetten:

-Pipetman® P (Gilson, Middletown, USA)

-Research® (Eppendorf AG, Hamburg)

-Gilson (Abimed, Langenfeld)

pH-Meter:

-pH Meter (WTW, Weilheim)

Photometer:

-Beckman DU-640 Photometer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)

-Ultraspec 3100 pro (GE Healthcare GmbH, Freiburg)

Scanner:

- „Ettan DIGE Imager“ (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)
- Typhoon 9410 (GE Healthcare GmbH, Freiburg)
- Typhoon FLA 9000 (GE Healthcare GmbH, Freiburg)

Schüttler:

- „SM30 Control“ (Edmund Bühler GmbH, Hechingen)

Ultraschall:

- Ultraschallbad (Bandelin Socorex digitec, Papenburg)
- Ultraschallstab Sonifier 450 (Branson, Dietzenbach)

Vakuumpumpe:

- „Savant Speed Vac®“ Anlage (Thermo Scientific, Dreieich)

Spot Picker und Zubehör:

- „Deepwell“ Platte 96-well/500 µl Protein LoBind (Eppendorf AG, Hamburg)
- EXQuest (Bio-Rad Laboratories, München)
- „Purification Plates with laser-cut holes“ 96-well (ABgene, Thermo Scientific, Dreieich)
- UV-Leuchttisch 60-ECX-26M (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Trockenschrank:

- Trockenschrank (Mettler, Schwabach)

Waagen:

- Feinwaage (Sartorius AG, Göttingen)
- Mettler PE 3600 Delta Range® (Gemini BV, Apeldoorn, Niederlande)
- Waage (Sartorius AG, Göttingen)

Western-Blot und Zubehör:

- Blot-Filterpapier „Turboblotter“ (Schleicher und Schüll GmbH, Dassel)
- Blotkammer (Schleicher und Schüll GmbH, Dassel)
- LAS 3000 „Imager“ (FujiFilm, Massachusetts, USA)

Vortexer:

- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA)

Zentrifugen:

- Minifuge (Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe)
- Ultrazentrifuge „Optima max E“ mit TLA55 Rotor (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
- Zentrifuge Groß 5810R (Eppendorf AG, Hamburg)

Geräte und Materialien, die nur in einzelnen Methoden verwendet wurden, sind in den verwendeten Abschnitten in Klammern beigelegt.

2.1.3 Software

Elektrophorese Software:

-Progenesis SameSpots, Version 4.1.3884.12788 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK)

-PDQuest „Spot cutting control“, (Version 8.0.2 (BETA) builds 057 (Oct 13 2006) Change list: 16659), BioRad Laboratories GmbH, München)

ICPL Software:

-ICPL-ESI*Quant*, Version 2.0 (Achim Brunner, Arbeitsgruppe Lottspeich, Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried)

-Trans-Proteomic Pipeline (TPP), Version 4.3 (Seattle Proteom Center, USA)

-Xcalibur, Version 2.0.7 (Thermo Scientific, Dreieich)

LCM Software:

-Palm@Robo, Version 3.2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)

Massenspektrometrie Software:

-MASCOT, Version 2.2 (Matrixscience, London, UK)

-Mascot Distiller, Version 2.4.2.0 (Matrixscience, London, UK)

-Mascot Daemon, Version 2.2.0 (Matrixscience, London, UK)

Scanner Software:

-DeCyder, Version 6.5 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)

-Image Quant Tool, Version 5.2 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)

-Typhoon Scanner Control, Version 5.0 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)

2.1.4 Antikörper

Die verwendeten Antikörper dienen dem immunologischen Nachweis der differenziell exprimierten Proteine, die durch die ICPL-Technik im Modellsystem II (Rektumkarzinom) detektiert worden waren.

2.1.4.1 Primäre Antikörper

RCT Typ	Antikörper Name	Antigen	Größe	Spender	Isotyp	Hersteller
II	ALDH1B1_ Aldehyde Dehydrogenase X, Mitochondrium	Aminosäuren 1–43	57 kDa	Kaninchen	Polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, sc-135333
I	CALD1_ Caldesom 1	Synthetisches Peptid aus der Nähe des N-Terminus	75–80 kDa	Kaninchen	Polyklonal, IgG	OriGene, Rockville, MD, Cat No.: TA303412
II	HADHA_3 Ketoacyl Coenzym A (CoA) Thiolase alpha subunit	Aminosäuren am C-terminus (750)	83 kDa	Kaninchen	Polyklonal, IgA	Abcam, Cambridge, UK, ab54477
I	Lumican	Aminosäuren 19–108	46 kDa	Maus	Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, sc-166871
II	MFAP4_ Microfibril-associated glycoprotein 4	Aminosäuren 225–255	29 kDa	Kaninchen	Polyklonal, IgA	Abcam, Cambridge, UK, ab103925
II	S100A4	Rekombinantes Protein gegen die gesamte Länge von S100A4	12 kDa	Maus	Monoklonal	Abnova GmbH, Heidelberg, H00006275-M01
I und II	TPM1_ Tropomyosin 1 alpha chain	Human Tropomyosin alpha chain, skeletal muscle.	33 kDa	Kaninchen	Polyklonal, IgG	Antibodies-online Atlanta, USA, Cat No. ABIN604885
I und II	Transgelin	Aminosäuren 16–90	22 kDa	Kaninchen	Polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, sc-50446
I und II	Transketolase	Rekombinantes Protein	68 kDa	Maus	Monoklonal	Abcam, Cambridge, UK, ab112997
I	TUBA4A_ Tubulin alpha 4A chain	Rekombinantes Protein	50 kDa	Maus	Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, sc-134241
II	VDAC2_ Voltage-dependent anion selective channel protein 2	Rekombinantes Protein gegen die gesamte Länge von VDAC2	59 kDa	Maus	Monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, SAB1402389
I	WDR1_ WD repeat-containing protein 1	Aminosäuren 30–40	66 kDa	Kaninchen	Polyklonal, IgG	Abcam, Cambridge, UK, ab64324
I und II	Der Antikörper für die Kontrolle: VCP_ Valosin containing protein	Aminosäuren 687–806	97 kDa	Maus	Monoklonal	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, sc-133125

Tabelle 2-1: Spezifikation der Erst-Antikörper für die Western-Blot-Analyse.

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Der Nachweis von Maus- und Kaninchen-Antikörpern erfolgte mit dem „ready-to-use“ Pierce® Fast Western-Blot Kit ECL Substrate. Der Kit beinhaltet HRP („Horseradish peroxidase“) gekoppelte Sekundärantikörper gegen Maus und Kaninchen, die durch das ECL-Substrat („Enhanced chemiluminescence“) detektiert werden.

2.1.5 Patientenmaterial

A) Modellsystem I:

Gewebe- und Plasmaproben von Patienten mit Conn-Syndrom wurden von Prof. Dr. med. Felix Beuschlein von der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV, Innenstadt in München zur Verfügung gestellt:

- Nebennierengewebebiopsien (Größe ca. 2 X 1 cm, Gewicht ca. 100 g) zur Gewinnung von normalen und adenomatösen Gewebeareale aus einer Nebenniere von insgesamt vier Patienten.
- EDTA-Plasma, gewonnen aus der linken (z.B. adenomatöse Nebenniere) und der rechten (z.B. normale Nebenniere) Nebennierenvene von zwei Patienten.

B) Modellsystem II:

Gewebebiopsien (Größe ca. 1 X 1 cm, Gewicht ca. 100 g) von insgesamt 20 Patienten mit Rektumkarzinom im Stadium UICC II/III wurden von Prof. Dr. med. Roland S. Croner, Geschäftsführender Oberarzt, Chirurgische Klinik, Universitätsklinikum Erlangen zur Verfügung gestellt.

C) Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Depletion:

Für den Nachweis der Reproduzierbarkeit der Depletion, mittels Seppro IgY14- und SuperMix-Säulen, wurde EDTA-Plasma eines gesunden Probanden verwendet.

2.2 Probenaufarbeitung

2.2.1 Affinitätschromatographie (AC) von Plasma

Die Affinitätschromatographie (AC) diente zur Abreicherung von bestimmten hoch- und median-abundanten Proteinen aus humanem EDTA-Plasma. Die Depletion wurde mit dem Zweisäulensystem, Seppro IgY14-Säule und SuperMix-Säule, durchgeführt. Mit der Seppro IgY14-Säule werden 14 hoch-abundante Proteine und mit der SuperMix-Säule werden bis zu 85 median-abundante Proteine aus Plasma abgereichert (Dong et al., 2008). Für die Affinitätschromatographie wurde sowohl das EDTA-Plasma der drei Patienten aus dem Modellsystem I (Conn-Syndrom) als auch das zu EDTA-Plasma aufgearbeitete Blut des gesunden Probanden (Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Depletion) verwendet.

2.2.1.1 Depletion mit der Seppro IgY14-Säule und der SuperMix-Säule

Das Blut, das zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Depletion (siehe Abschnitt 2.1.5) von einem gesunden Probanden entnommen wurde, wurde mit einem „BD Vacutainer PPT EDTA“ (REF 362788, Becton Dickinson, Heidelberg) gesammelt und sofort auf Eis gekühlt. Die Aufarbeitung zu EDTA-Plasma erfolgte, nach Herstellerangaben, durch Zentrifugation des Blutes bei 4 °C für 30 min bei 3000 X g (Ultrazentrifuge). Danach wurde daraus vorsichtig das Plasma entnommen. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Assay (Abschnitt 2.2.4) ermittelt und betrug 70 mg/ml. Danach wurde das EDTA-Plasma in 200 µl Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C bis zur Depletion gelagert.

Das Patientenplasma (Modellsystem I; Conn-Syndrom) (siehe Abschnitt 2.1.5) wurde als EDTA-Plasma zur Verfügung gestellt und konnte nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (Abschnitt 2.2.4) sogleich zur Depletion eingesetzt werden.

Die Depletion (Dong et al., 2008) erfolgte jeweils mit 200 µl Plasma, das mit 800 µl „Dilution“-Puffer verdünnt wurde und mit einem „Spin Filter“ (0,45 µm Porengröße) gereinigt wurde. Danach wurde das nun auf 1 ml verdünnte EDTA-Plasma in das Agilent 1100 Series HPLC-System injiziert. Beide Säulen sind nacheinander am HPLC-System angeschlossen. Die Depletion erfolgte zuerst mit der Seppro IgY14-Säule und danach mit der

SuperMix-Säule. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min mit „Dilution“-Puffer wurde von der 10. Minute bis zur 45. Minute der Durchlauf (17,5 ml) gesammelt. Danach wurde der Durchlauf (depletiertes Plasma) mit einer „Vivaspin 15R 5 kDa MWCO Hydrosart spin concentrator“ auf 100 µl Probenvolumen ankonzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die an die Säulen gebundenen hoch- und median-abundanten Proteine wurden separat bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 ml/min mit „Stripping“-Puffer von den Säulen eluiert, gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Danach wurden beide Säulen mit Neutralisationspuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 ml/min neutralisiert und bis zur nächsten Depletion bei 4 °C gelagert.

2.2.2 Mikrodissektion von Gewebe

Die Mikrodissektion wurde zur Isolierung von spezifischen Zelltypen aus Gewebe eingesetzt. Hierdurch können homogene Zellpopulationen gewonnen werden ohne eine Kontamination durch angrenzende andersartige Zellen des Gewebes. Dafür wurde die „Laser Capture Microdissection“ (LCM) Technik verwendet. Für die Mikrodissektion wurde gefrorenes biopsiertes Patientengewebe beider Modellsysteme (siehe Abschnitt 2.1.5) verwendet.

2.2.2.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Zur Durchführung einer LCM werden zuerst Gefrierschnitte (Potter and Brunskill, 2012) von Patientengeweben in einem gekühlten Kryotom angefertigt.

Das gefrorene biopsierte Gewebe wurde dabei vollständig in Kryo-Einbettmedium eingetaucht, das wiederum auf einen Kryo-Stempel getropft wurde. Danach wurde der Kryo-Stempel in das auf -25 °C vorgekühlte Kryotom gelegt, um ein Gefrieren des Kryo-Einbettmediums zu ermöglichen. Dadurch bleibt das Gewebe während des Schneidens fixiert und kalt, wodurch ideale Schnittergebnisse erzielt werden können. Danach wurde der Kryo-Stempel an der Kryo-Stempel-Haltevorrichtung angebracht. Durch vorsichtige Rotation der Haltevorrichtung wurden 8–10 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf einen Objektträger transferiert, der mit einer 1,0 mm dicken PEN überschichteten Membran versehen war. Bis zur Zellstrukturfärbung wurden die Gewebeschnitte bei -20 °C gelagert. Die PEN-Membran auf dem Objektträger ermöglicht es dem Laser des LCM-Gerätes, das Gewebe leicht und fokussiert zu schneiden. Zusätzlich dient es als Stabilisator während des

Katapultierens der geschnittenen Zellen in das spezielle, über dem Gewebe platzierte „Adhesive Cap“.

2.2.2.2 Färbung von Gewebeschnitten zur Zellcharakterisierung

Die Gewebeschnitte wurden zur Zellcharakterisierung für die Mikrodissektion gefärbt. Hierfür wurde die Kresylviolet-Färbung (Protokoll nach Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) eingesetzt. Kresylviolet-Acetat ist ein Zellkernfarbstoff, der die Kerne violett und das Zytoplasma schwach violett anfärbt.

Zur sicheren Unterscheidung der Zelltypen wurde als Referenz-Färbung die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H/E) (Fischer et al., 2008) eingesetzt. Hierfür wurde je ein Gewebeschnitt von jedem Patienten angefärbt. Der blaue Farbstoff Hämatoxylin färbt saure bzw. basophile Zellstrukturen und somit DNA oder Zellkerne blau. Der rote Farbstoff Eosin färbt basische bzw. acidophile Zellstrukturen und somit die Proteine des Zytoplasmas rot.

Für die Färbung mit Kresylviolet-Acetat wurden die Gewebeschnitte in eiskaltem 70%igem Ethanol für 2 min dehydriert. Danach wurde das Gewebe für 30 sec in 1% Kresylviolet-Acetat-Lösung zur Färbung eingetaucht. Durch kurzes Eintauchen in 70% Ethanol und anschließend in 100% Ethanol wurde die überschüssige Farbe entfernt. Danach wurden die Gewebeschnitte für 2 min an Luft getrocknet und innerhalb einer Stunde mikrodissektiert.

- Kresylviolet-Acetat-Lösung:
1% (w/v) Kresylviolet-Acetat, 50% Ethanol, bei RT über Nacht rühren, danach die Lösung filtern, um ungelöste Partikel zu entfernen.

Für die Referenz-Färbung mit Hämatoxylin und Eosin wurden die Gewebeschnitte (ein zusätzlicher Gewebeschnitt pro Patientenprobe) für 1 min in „ready-to-use“ Hämatoxylin gefärbt. Danach wurde kurz in MQ-Wasser gespült und für 10 sec in „ready-to-use“ Eosin gefärbt. Nach erneutem kurzen Spülen in MQ-Wasser erfolgte die Fixierung des Gewebes. Hierfür wurde der Gewebeschnitt in aufsteigender Ethanol-Reihe (2 X 70% Ethanol, 1 X 90% Ethanol, 1 X 100% Ethanol) gedippt. Danach wurde das Gewebe mit Xylol überschichtet, mit einem Deckglas luftblasenfrei versiegelt und die Zelltypen mithilfe eines LCM-Mikroskops charakterisiert (Abschnitt 2.2.2.3).

2.2.2.3 Laser Capture Mikrodissektion (LCM)

Für die LCM wurde das PALM MicroBeam MB IV (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) verwendet (Espina et al., 2006). Der Objektträger mit den gefärbten Gewebeschnitten und das „Adhesive Cap“ wurden nach Herstellerangaben am Gerät angebracht. Mithilfe eines Pathologen wurden die zu dissektierenden Zellstrukturen bei einer 5- bis 10-fachen Vergrößerung charakterisiert. Die Charakterisierung der Zellstrukturen erfolgte mit den H/E gefärbten Gewebeschnitten. Die Mikrodissektion erfolgte mit den Kresylviolet angefärbten Gewebeschnitten. Für die Mikrodissektion wurden die Zellen bei einer 5- bis 10-fachen Vergrößerung manuell auf dem „live video image“-Bildschirm des Gerätes markiert und mit einer Laserenergie von 60 bis 80 mW ausgeschnitten. Hierbei muss der Fokus des Lasers auf das Gewebe gerichtet sein, um mit optimalem Laserstrahl die Zellen zu schneiden, ohne sie zu zerstören. Nach dem Schneiden erfolgte sogleich das automatische Katapultieren der Zellen in das über dem Gewebeareal angebrachten „Adhesive Cap“. Die Prozedur wurde so oft wiederholt, bis eine Fläche von ca. 100 mm² gesammelt worden war, was mindestens einer Proteinmenge von 20 µg entsprach. Bis zur anschließenden Solubilisierung der gewonnenen Proben wurden diese bei -20 °C gelagert.

2.2.2.4 Solubilisierung von mikrodissektierten Zellen

Zur Solubilisierung der Proteine aus den mikrodissektierten Zellen wurden die LCM-Schnitte für 30 min mit 30 µl Guanidin/HEPES pH 8,5 (ICPL-Puffer; siehe Abschnitt 2.4) inkubiert. Danach wurde für 15 min bei 10.000 X g und 4 °C zentrifugiert. Die darauffolgende Behandlung mit dem Ultraschallstab zum Zellaufschluss erfolgte in 5-fachen Zyklen mit jeweils 10 sec Ultraschall-Impulsen. Danach wurden die Probe 15 min auf Eis inkubiert, 15 min bei 10.000 X g und 4 °C zentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Aceton-Fällung

Die Konzentrierung der Proteine der mikrodissektierten Gewebezellen und der EDTA-Plasmaproben erfolgte durch Aceton-Fällung.

Für die Aceton-Fällung der Proteine wurde die Probenlösung 1:1 mit MQ-Wasser versetzt und das 5-fache Probenvolumen an eiskaltem 100%igem Aceton hinzugegeben. Diese Probe-Aceton-Lösung wurde über Nacht bei -20 °C gefällt. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Zentrifugation der präzipitierten Proteine bei 4 °C und 20.000 X g für 30 min mit der Zentrifuge Groß 5810R. Danach wurde der Überstand vorsichtig entnommen und verworfen. Das verbleibende Pellet wurde 2 X mit 200 µl eiskalter 80%iger Aceton-Lösung gewaschen und dazwischen bei 4 °C und 20.000 X g für 5 min zentrifugiert. Danach wurde erneut der Überstand vorsichtig abgenommen und das restliche Aceton für 15 min unter einem Abzug abgedampft. Das Pellet wurde zur Weiterverarbeitung in dem entsprechendem Puffer (siehe Abschnitt 2.3, 2.4 oder 2.5) gelöst.

2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Gewebeproben und EDTA-Plasmaproben erfolgte mit dem Bradford-Assay [BioRad Quick Start™ Bradford Protein Assay, 2000, abgewandelt nach (Bradford, 1976)]. Beim Bradford-Assay wird der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blue G 250 verwendet. Er bindet an kationische und unpolare Seitenketten von Proteinen und bildet somit eine Protein-Farbstoff-Verbindung mit einem Absorptionsmaximum bei 595 nm. Um die Proteinkonzentration quantitativ zu ermitteln ist die Kalibrierung mit einem Standardprotein („Bovine plasma gamma globulin“) notwendig.

Für den Bradford-Assay wurde das Bradford-Reagenz der Firma BioRad verwendet. Zur Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration des „Bovine plasma gamma globulin“ (Standard I) angefertigt. Für jeden Ansatz wurde 1 ml des 1:5 verdünnten Bradford-Reagenz in Einwegküvetten vorgelegt. Das Standardprotein wurde in einer Konzentration von 1, 2, 5, 10, 15, 20 und 25 µg/ml in die Küvetten pipettiert. Die Doppelbestimmung der Proteinkonzentration der Probe erfolgte je nach verwendeter Probe mit 1 µl bis maximal 20 µl Probenvolumen. Danach wurde die Küvette mit Parafilm verschlossen und intensiv gemischt. Die Absorptionmessung am Beckman DU-640 Photometer erfolgte zuerst mit den Standardproben der Verdünnungsreihe und danach mit den Proben.

2.3 Trennmethode

2.3.1 Elektrophorese

Durch die Elektrophorese können geladene Teilchen (z.B. Proteine oder Peptide) in einem elektrischen Feld wandern. Da die Teilchen unterschiedliche Ladungen und Größen besitzen, haben sie eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit. Diese elektrophoretische Beweglichkeit ist eine substanzspezifische Größe. Sie bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld und ist dadurch für die Trennung entscheidend.

2.3.1.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wird das anionische Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat) im Überschuss zu den Proteinen gegeben. Dadurch werden die Proteine von SDS umschlossen und die Eigenladung der Proteine wird aufgehoben. Alle Proteine liegen in Micellen-Form (SDS-Protein-Micelle) mit einer negativen Ladung vor und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Zusätzlich werden die Sekundärstrukturen der Proteine aufgelöst. Die Trennung im Polyacrylamid-Gel mit bestimmtem Vernetzungsgrad der Gelmatrix erfolgt nach der Molekülgröße der Proteine und ihrer unterschiedlichen Mobilität. Hierbei gilt, dass kleinere Proteine schneller wandern als größere Proteine, da sie „mobiler“ sind und dadurch schneller durch die Vernetzungen der Matrix kommen.

Die SDS-PAGE wurde mit selbsthergestellten Mini-Gelen und Midi-Gelen durchgeführt.

Für die SDS-PAGE von käuflich erworbenen Mini-Gelen wurden 8–16% Gradienten-Polyacrylamid-Mini-Gele (10 X 10 X 0,1 cm) mit 12 Tascheneinheiten von Serva verwendet. Diese Variante wurde für Proben, die zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Depletion verwendet wurden, eingesetzt (Abschnitt 2.1.5).

Für die SDS-PAGE mit selbsthergestellten Mini-Gelen (9 X 7 cm X 0,1 m) und Midi-Gelen (16 X 16 X 0,1 cm) wurden 12%ige Trenngel-Lösungen und 5,45%ige Sammelgel-Lösungen verwendet. In Tabelle 2-2 ist die Zusammensetzung der Trenngel-Lösung (30 ml Volumen) und der Sammelgel-Lösung (13,2 ml Volumen) für Mini-Gele und Midi-Gele angegeben.

Diese Variante wurde für Patientenproben aus Modellsystem II zur Western-Blot-Analyse eingesetzt (Abschnitt 2.1.5).

Trenngel-Lösung	Mini-Gele/Midi-Gele	Sammelgel-Lösung	Mini-Gele/Midi-Gele
Sol 1	12 ml	Sol 1	2,4 ml
Sol 2	7,5 ml	Sol 3	4 ml
MQ-Wasser	10,5 ml	MQ-Wasser	6,8 ml
TEMED	20 µl	TEMED	10 µl
10% APS	200 µl	10% APS	100 µl

Tabelle 2-2: Trenngel-Lösung und Sammelgel-Lösung für selbsthergestellte Mini-Gele und Midi-Gele.

Zur Trenngel-Lösung (Sol 1, Sol 2 und MQ-Wasser) wurden 200 µl 10%iger APS-Lösung und 20 µl TEMED gegeben und sofort in den 1 mm breiten Glasplattenzwischenraum (Glasplatten aus hauseigener Werkstatt) gegossen. Durch APS und TEMED wurde der Polymerisierungsvorgang eingeleitet. Danach wurde auf die Trenngel-Lösung 1 ml mit Wasser gesättigte Butanol-Lösung pipettiert, um einen glatten Gelrand zu erzielen und das Austrocknen der Geloberfläche zu verhindern. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Butanol entfernt. Die Sammelgel-Lösung (Sol 1, Sol 3 und MQ-Wasser) wurde mit 100 µl 10%iger APS-Lösung und 10 µl TEMED versetzt und sofort ebenfalls in den 1 mm breiten Glasplattenzwischenraum gegossen. In die Glasplattenzwischenräume wurde sofort und luftblasenfrei ein Kamm mit 12 Tascheneinheiten geschoben. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden die Gele in feuchte Tücher und Klarsichtfolie gewickelt und über Nacht bei 4 °C gelagert.

- Sol 1:
0,8% Bisacrylamid, 30% Acrylamid
- Sol 2:
8 mM EDTA (Titriplex III), 0,4% SDS, 1,5 M Tris, pH 8,8 mit HCl eingestellt
- Sol 3:
8 mM EDTA (Titriplex III), 0,4% SDS, 0,5 M Tris, pH 6,8 mit HCl eingestellt
- 10% APS:
0,1 g APS/10 ml MQ-Wasser

Das folgende Trennprotokoll gilt für käuflich erworbenen und selbsthergestellte Mini-Gel- und Midi-Gel-Systeme.

Für die Trennung im SDS-PAGE wurde als Molekulargewichtsmarker der „SDS Molecular Weight Marker Broad Range™“ von BioRad verwendet. Der Marker wurde 1:200 in 1 X reduzierendem Auftragsprobenpuffer verdünnt und davon 7 µl eingesetzt. Die Proben (maximal 30 µl Probenvolumen) wurden 1:1 mit reduzierendem Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurde die Gelkammer (10 cm X 10 cm; hergestellt in hauseigener Institutswerkstatt) mit 1 X SDS-Laufpuffer gefüllt. Die elektrophoretische Trennung der Proteine mithilfe der Mini-Gele erfolgte zuerst bei 10 mA für 60 min gefolgt von weiteren 20 mA für 60 min. Für Midi-Gele wurden 50 V über Nacht für die elektrophoretische Trennung verwendet.

- Auftragsprobenpuffer (1X):
5% SDS, 150 mM Tris-HCl pH 6,8, 15% Glycerin, 0,0035% Bromphenolblau, 2% β-Mercaptoethanol
- SDS-Laufpuffer (1x):
0,1% SDS, 24 mM Tris, 192 mM Glycin pH 8,3

2.3.1.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der IEF wandern Proteine/Peptide im elektrischen Feld durch einen bestimmten pH-Gradient ihrem isoelektrischen Punkt (pI) entsprechend. Beim Erreichen des isoelektrischen Punktes wird die Nettoladung null, wodurch keine weitere Wanderung im elektrischen Feld erfolgt. Falls ein Protein aufgrund von Diffusion seinen pH-Bereich verlässt, erhält es wieder eine Ladung und wandert zu seinem pH-Bereich, der seinem pI entspricht, zurück. Dadurch können Proteine zu scharfen und hochkonzentrierten Proteinbanden/Spots aufgetrennt werden. Der isoelektrische Punkt ist substanzspezifisch und hängt von der Zahl an basischen und sauren Aminosäuren des Proteins ab.

Für die IEF wurden ausschließlich 24 cm lange „Immobiline Dry Strips“ mit nicht linear (NL) immobilisiertem pH-Gradienten (IPG) von 3–10 der Firma GE-Healthcare verwendet. Sie wurden für Plasmaproben des Modellsystem I und für die Plasmaproben zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Depletion verwendet (Abschnitt 2.1.5). Die dehydrierten Strips wurden über Nacht in einem Tray (hergestellt in hauseigener Institutswerkstatt) rehydriert bzw. aufgequollen. Hierfür wurde der Strip im Tray mit der Gelseite noch unten platziert und in die Probe (72 µl Probenvolumen, Abschnitt 2.3.1.5), die mit Rehydrier-Lösung (390 µl)

versetzt wurde (insgesamt 450 µl Volumen), gelegt. Um das Austrocknen des Strips zu verhindern wurde mit 2 ml Siliconöl überschichtet.

- Rehydrier-Lösung:
8 M Urea, 2 M Thioharnstoff, 1% CHAPS, 20 mM DTT, 0,5% Pharmalyte (pH 3–10)

Zwei verschiedene Apparaturen standen für die IEF zur Verfügung: das „Multiphore II Electrophoresis“-System (GE Healthcare GmbH, Freiburg) und der „3100 OFFGEL Fractionator“ (Agilent Technologies, Oberhaching).

Die Vorbereitungen für die IEF erfolgten bei beiden Apparaturen nach gleichem Protokoll: Nach der Rehydrierung wurden die „Immobiline Dry Strips“ aus dem Tray entnommen und nach Abspülen mit MQ-Wasser in das Fokussier Tray mit der Gelseite nach oben transferiert. Nach der richtigen Positionierung wurden die Elektrodenpapiere angebracht, die jeweils mit MQ-Wasser befeuchtet wurden. Danach wurde der Strip mit Siliconöl bedeckt (1,5 ml für den Agilent „3100 OFFGEL Fractionator“ und 100 ml für das „Multiphore II Electrophoresis“-System) und die Elektroden am Plus- und Minus-Ende angebracht. Die Fokussier-Trays beider Systeme wurden in ihren Apparaturen richtig positioniert. Das Fokussier-Programm der IEF erfolgte bei 20 °C und 50 µA pro „Immobiline Dry Strip“ und umfasste 70.000 Vhs, die zur erfolgreichen Fokussierung erreicht werden sollten. Die detaillierten Fokussier-Programme beider Apparaturen sind in Tabelle 2-3 zusammengefasst.

„Multiphore II“	Spannung (V)	Dauer	„OFFGEL Fractionator“	Spannung (V)	Dauer
S1	300	30 min	S1	600	30 min
S2	600	15 min	S2	900	45 min
S3	900	15 min	S3	1200	60 min
S4	1200	15 min	S4	1500	75 min
S5	1500	15 min	S5	2000	90 min
S6	2000	30 min	S6	2500	120 min
S7	2500	30 min	S7	3000	150 min
S8	3000	30 min	S8	3500	180 min
S9	3500	30 min	S9	8000	210 min
S10	5000	20 h	S10	8000	16 h

Tabelle 2-3: Fokussier-Programme für das „Multiphore II Electrophoresis“-System und das Agilent „3100 OFFGEL Fractionator“-System.

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die „Immobiline Dry Strips“ bei -20 °C gelagert. Da die IEF ausschließlich für 2D-DIGE Analysen (Abschnitt 2.3.1.5) verwendet

wurde, wurde die gesamte IEF-Prozedur im Dunkeln durchgeführt. Dies galt für analytische und auch für präparative Gele.

2.3.1.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF) mit der OFFGEL-Fraktionierung

Die isoelektrische Fokussierung in der OFFGEL-Apparatur (Agilent „3100 OFFGEL Fractionator“, Agilent Technologies, Böblingen) kann auch zur präparativen Trennung von Proteinen in Lösung verwendet werden (Ernault and Guette, 2011). Hierfür werden auf dem „Immobiline DryStrip“ Tröge platziert. In diese Tröge wird die Proteinlösung pipettiert. Die Proteine wandern an den Gel-zu-Trog-Verbindungen entlang bis zu ihrem isoelektrischen Punkt (pI) an dem das Protein bei Nettoladung Null vorliegt, sodass keine weitere Wanderung im elektrischen Feld erfolgt. Die Proteine diffundieren aus dem Streifen in die überschichtete Lösung und können dort aus den Trögen entnommen werden.

In dieser Arbeit wurden nur ICPL-markierte Proteine (Abschnitt 2.4) mit der OFFGEL-Technik fraktioniert und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Für die isoelektrische Fokussierung mit der OFFGEL-Technik wurde der Agilent „3100 OFFGEL Fractionator“ verwendet. Es wurden 24 cm lange „Immobiline Dry Strips“ mit pH-Gradienten (IPG) von 3–6 und „IPG Blue Strips“ pH 3,5–4,5 der Firma Serva verwendet. Der jeweilige Strip wurde mit der Gelseite nach oben in das OFFGEL-Tray platziert. Auf den Strip wurde eine 24 Trog Einheit (1 X 1 X 1 cm) aufgelegt. In die einzelnen Tröge wurde zur Rehydrierung der Gelmatrix 40 µl 1 X OFFGEL-Rehydrier-Lösung pipettiert und für 15 min inkubiert. Zwei Elektrodenpads wurden ebenfalls mit 20 µl 1 X OFFGEL-Rehydrier-Lösung befeuchtet und an den Gelenen angebracht. Danach wurde in jeden Trog 150 µl Probe pipettiert. Hierfür wurden die Proteinpellets der Proben nach Aceton-Fällung (Abschnitt 2.2.3) in 40 µl ICPL-Lysis-Puffer gelöst (Abschnitt 2.4) und mit OFFGEL-Probenpuffer aufgefüllt. Plasmaproben (100 µl Plasmavolumen) aus Modellsystem I und Proben zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Depletion wurden mit 126 mg Guanidin-HCl und 22 µl HEPES versetzt (Abschnitt 2.4) und mit OFFGEL-Probenpuffer auf 150 µl Probenvolumen aufgefüllt. Nachdem die Tröge mit einem Silikon-Deckelaufsatz verschlossen worden waren, wurde die Anode mit 200 µl und die Kathode mit 400 µl Siliconöl überschichtet. Nach 1 min wurden auf beide Pole weitere 200 µl Siliconöl pipettiert. Danach

wurden die Elektroden angebracht und die Fokussierung bei 50 μ A bis 100 kVh über zwei Tage mit folgendem Programm gestartet:

Schritt	Spannung (V)	Dauer (h)
S1	500	1
S2	1000	1
S3	600	47

- OFFGEL-Stammlösung:
8,4 M Harnstoff, 2,4 M Thioharnstoff, 78 mM DTT, 6% Glycerin, 1,2% Ampholine (pH 3–6)
- OFFGEL-Rehydrier-Lösung:
1 X aus OFFGEL- Stammlösung
- OFFGEL-Probenpuffer:
1 Teil Probe/MQ-Wasser und 4 Teile OFFGEL- Stammlösung

Nach Beendigung der OFFGEL-Fraktionierung wurde aus jedem der 24 Tröge die Probenlösungen entnommen und in 24 LoBind Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Dann wurden die 24 Tröge mit 40 μ l 1 X OFFGEL-Rehydrier-Lösung nochmals für 30 min inkubiert, die Lösung aus den einzelnen Trögen entnommen und in die entsprechenden 24 LoBind Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert. Die gesammelten 24 Fraktionen wurden bis zur massenspektrometrischen Bearbeitung (Abschnitt 2.5.3) bei -20 °C gelagert.

2.3.1.4 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Bei der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) erfolgt die Trennung der Proteine in der ersten Dimension (siehe Abschnitt 2.3.1.2) mittels isoelektrischer Fokussierung. Die darauf folgende zweite Dimension (siehe Abschnitt 2.3.1.1) trennt die Proteine nach ihrer Molekülgröße mithilfe der SDS-PAGE.

Für die 2D-PAGE standen zwei Gelsysteme zur Verfügung: Das „High Performance Elektrophoresis“ (HPE) System von Serva Elektrophoresis, Heidelberg und ein in der Institutswerkstatt hergestelltes System. Diese Methode wurde ausschließlich für Gele von Plasmaproben des Modellsystems I und Plasmaproben zur Überprüfung der reproduzierbaren Depletion (HPE-System, Abschnitt 2.1.5) verwendet.

Für die 2D-PAGE aus institutseigener Werkstatt wurden selbsthergestellte 12%ige vertikale Polyacrylamid-Gele (27,5 X 24 X 1 mm) verwendet. Mithilfe einer Gießvorrichtung (institutseigene Werkstatt) wurde die 12%ige Polyacrylamid-Lösung zwischen zwei Glasplatten (institutseigene Werkstatt) gegossen. Dann wurde auf den Gelrand 5 ml mit Wasser gesättigte Butanol-Lösung pipettiert, um einen glatten Gelrand zu erzielen und das Austrocknen der Geloberfläche zu verhindern. Die Polymerisation erfolgte über Nacht. Die nach ihrem isoelektrischen Punkt fokussierten Proben (24 cm lange „Immobiline Dry Strips“ pH 3–10 NL; siehe Abschnitt 2.3.1.2) wurden für 2 X 10 min nacheinander in Equilibrierungs-Puffer A und danach in Equilibrierungs-Puffer B unter vorsichtigem Schwenken inkubiert. Der Equilibrierungs-Puffer enthält SDS, wodurch die Proben mit SDS gesättigt werden und durch die negative Ladung der Protein-SDS-Micellen nun zur Anode wandern können. Des Weiteren enthält der Equilibrierungs-Puffer A Dithiothreitol (DTT), wodurch Schwefelbrücken von Cysteinen gelöst werden können. Mit dem Iodacetamid (IAA), welches im Equilibrierungs-Puffer B enthalten ist, werden die Cysteine alkyliert, was eine Rückbildung der Schwefelbrücken verhindert. Das Bromphenolblau in beiden Equilibrierungs-Puffern diente der Visualisierung der Proben-Lauffront im Gel. Nach der Equilibrierung wurden die „Immobiline Dry Strips“ vorsichtig zwischen die Glasplattenaussparung geschoben und auf dem Gel abgelegt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „SDS Molecular Weight Marker Low Range™“ von BioRad verwendet. Der Marker wurde 1:20 in 1 X Auftragsprobenpuffer verdünnt. Hiervon wurden 5 µl auf ein kleines Filterpapier pipettiert und ebenfalls zwischen die Glasplattenaussparung geschoben und neben dem „Immobiline Dry Strip“ auf das Gel gelegt. Danach wurde der „Immobiline Dry Strip“ und das Filterpapier mit 60 °C heißer Agarose-Lösung überschichtet, um beide am Polyacrylamid-Gel zu fixieren. Nach Platzierung der Glasplatten in der Gelkammer (institutseigene Werkstatt) wurde die Gelkammer mit 1 X SDS-Laufpuffer gefüllt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 10 °C und 100 Volt für 18 h.

- 12%ige Polyacrylamid-Lösung:
Fertigmischung (0,8% Bis, 30% Acrylamid), 1,5 M Tris pH 8,8, 10% SDS, 10% TEMED, 10% APS
- Equilibrierungs-Puffer A:
2% SDS, 50 mM Tris pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 2% DTT, etwas Bromphenolblau
- Equilibrierungs-Puffer B:
2% SDS, 50 mM Tris pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 4% IAA, etwas Bromphenolblau
- Agarose-Lösung:
0,5% Agarose, 1 X SDS-Laufpuffer

- SDS-Laufpuffer (1X):
0,1% SDS, 24 mM Tris, 192 mM Glycin pH 8,3
- Auftragsprobenpuffer (1X):
5% SDS, 1 M Tris-HCl pH 6,8, 15% Glycerin, 0,0035% Bromphenolblau, 2% β -Mercaptoethanol

Die 2D-PAGE mit dem „High Performance Electrophoresis“ (HPE)-System wurde mit 12,5%igen Tris-Tricine-SDS (pH 6,9) „ready-to-use“ auf Plastikfolie gegossenen HPE-Gelen (26 X 20,5 X 0,05 cm) durchgeführt. Es wurden niedrig-fluoreszierenden HPE-Gele verwendet, da mit diesem System hauptsächlich 2D-DIGE-Analysen (Abschnitt 2.3.1.5) durchgeführt wurden. Bis zu vier HPE-Gele können horizontal auf vier separate Gelschubladen des HPE-Systems platziert und gleichzeitig analysiert werden. Bevor ein HPE-Gel auf die Gelschublade platziert wurde, wurde die jeweilige Gelschublade mit 4,5 ml „Cooling Medium“ überschichtet. Danach wurde das HPE-Gel luftblasenfrei und mit der Gelseite nach oben darauf platziert. Die auf 24 cm langen „Immobiline Dry Strips“ pH 3–10 NL (Abschnitt 2.3.1.2) nach ihrem isoelektrischen Punkt fokussierten Proben wurden für 2 X 15 min nacheinander in Equilibrierungs-Puffer A und B unter vorsichtigem Schwenken inkubiert. Nach der Equilibrierung wurden die Strips mit der Gelseite nach unten vorsichtig und luftblasenfrei in die Aussparung auf dem HPE-Gel gelegt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „SDS Molecular Weight Marker Broad Range™“ von BioRad verwendet. Der Marker wurde 1:100 in 1 X Auftragsprobenpuffer verdünnt. Hiervon wurden 5 μ l in die dafür vorgesehene Aussparung auf dem HPE-Gel pipettiert. Die Trennung nach der Molekulargröße erfolgte nach folgenden Angaben in Tabelle 2-4:

Schritt	Spannung (V)	Strom (mA)	Leistung (W)	Dauer
S1	100	7	1	30 min
S2	200	13	3	30 min
S3	300	20	5	10 min
Streifen entnehmen				
S4	220	8	3	14 h 15 min
S5	1500	40	30	2 h
S6	220	8	3	3 h

Tabelle 2-4: 2D-PAGE Trennbedingungen für das HPE-System (Bedingungen für 1 HPE-Gel).

Nach der 2D-PAGE wurden die Gele zur Visualisierung der Proteinspots gefärbt (Abschnitt 2.3.1.6) oder bei DIGE-markierten Proteinen direkt gescannt (Abschnitt 2.3.1.5.2) und/oder die Proteinspots ausgestochen und massenspektrometrisch analysiert (Abschnitt 2.5.3).

2.3.1.5 Zweidimensionale Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE)

Die Proteinmarkierung („Minimal Labeling“) mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy2TM, Cy3 und Cy5 erfolgte im Dunkeln und auf Eis. Die Fluoreszenzfarbstoffe lagen als Feststoff in einer Menge von jeweils 5 nmol vor. Nach 5 min Auftauen bei RT und kurzem Zentrifugieren wurden zu je 5 nmol Farbstoff 5 μ l Dimethylformamid hinzugegeben, 30 sec geschüttelt und kurz zentrifugiert. Aus dieser CyDye-Stammlösung wurden jeweils 2 μ l entnommen und in einem neuen LoBind Eppendorf Reaktionsgefäß mit 3 μ l Dimethylformamid versetzt. Dadurch wurde die CyDye-Arbeitslösung mit einer Konzentration von 400 pmol/ μ l hergestellt.

- CyDye-Stammlösung:
je 5 nmol von Cy2TM, Cy3 und Cy5 werden jeweils in 5 μ l Dimethylformamid gelöst
Endkonzentration: 1 nmol/ μ l
- CyDye-Arbeitslösung:
je 2 μ l Stammlösung von Cy2TM, Cy3 und Cy5 werden jeweils mit 3 μ l Dimethylformamid verdünnt
Endkonzentration: 400 pmol/ μ l

Je 1 μ l der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe wurde in der Konzentration von 400 pmol/ μ l zu 50 μ g Protein entsprechend dem Markierungsschema hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren wurde das Reaktionsgemisch 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert und anschließend 1 μ l Stopplösung zugegeben. Anschließend wurde die Reaktion gemischt, kurz zentrifugiert und weitere 10 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Die CyDye-Stopplösung dient zum Abfangen ungebundener Fluoreszenzfarbstoffe, die nach 30 min nicht an die Lysine der Proteine gebunden haben.

- CyDye-Stopplösung:
10 mM L-Lysin Monohydrochlorid

Für die IEF, die ebenfalls im Dunkeln erfolgte, wurden jeweils 50 μ g Protein/12 μ l der einzelnen Proben (insgesamt 150 μ g Protein/36 μ l) entsprechend dem jeweiligen Markierungsschema in einem neuen LoBind Eppendorf Reaktionsgefäß vereinigt und mit 36 μ l 2 X Probenpuffer versetzt. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben 15 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert und in 390 μ l Rehydrier-Lösung

aufgenommen. Danach wurde kurz gemischt und zentrifugiert. Die Proben, mit einem Gesamtvolumen von 450 µl, wurden zur Rehydrierung der 24 cm langen „Immobiline Dry Strips“ (pH 3–10 NL) ins Tray pipettiert. Zur Beladung/Rehydrierung wurden die IEF-Gelstreifen mit der Gelseite nach unten im Tray platziert und mit 2 ml Siliconöl bedeckt. Die Beladung/Rehydrierung erfolgte über Nacht.

- 2 X Probenpuffer:
8 M Harnstoff, 2% CHAPS, 130 mM DTT, 2% Pharmalyte (pH 3–10)
- Rehydrier-Lösung:
8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1% CHAPS, 20 mM DTT, 0,5% Pharmalyte (pH 3–10)

Die 2D-PAGE wurde nach der Vorschrift im Abschnitt 2.3.1.4 mit niedrig-fluoreszierenden HPE-Gelen (Serva Elektrophoresis, Heidelberg) oder niedrig-fluoreszierenden Glasplatten (institutseigene Werkstatt) durchgeführt.

2.3.1.5.1 Präparative 2D-DIGE-Gele

Für das präparative 2D-DIGE-Gel wurde insgesamt 500 µg Proteinmenge verwendet. Hiervon wurden 50 µg Protein, bestehend aus Aliquots aller verwendeten Proben, mit 400 pmol Cy2TM markiert. Die restliche Proteinmenge von 450 µg blieb unmarkiert. Für die IEF wurden 24 cm lange „Immobiline Dry Strips“ (pH 3–10 NL) verwendet. Die Prozedur der IEF erfolgte nach Abschnitt 2.3.1.2 auf dem „Multiphore II Electrophoresis“-System. Für die 2D-PAGE wurde das System aus institutseigener Werkstatt mit selbsthergestellten 12%igen vertikalen Polyacrylamid-Gelen verwendet. Die Prozedur erfolgte nach der Vorschrift im Abschnitt 2.3.1.4.

2.3.1.5.2 Visualisierung der Proteinverteilung nach 2D-DIGE

Beim Gel-Multiplexverfahren wurde für jedes einzelne 2D-DIGE-Gel jeweils das Cy2TM-, Cy3- und Cy5-Image mithilfe von drei verschiedenen Lasern bei verschiedenen Wellenlängen aufgenommen.

Für die Visualisierung der Proteine standen zwei Scanner von GE Healthcare zur Verfügung: der Typhoon 9410 Scanner (GE Healthcare user Manual, 2002) und der Ettan DIGE „Imager“ (GE Healthcare user Manual, 2004). Verwendet wurde der Typhoon 9410 Scanner ausschließlich für 2D-DIGE-Gele von Modellsystem I. Der Ettan DIGE „Imager“ wurde nur

für die 2D-DIGE-Gele verwendet, die zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit angefertigt wurden. Die Gele wurden mit den Fluoreszenzscannern unter folgenden Einstellungen gescannt:

CyDye	Typhoon 9410	Ettan DIGE „Imager“
Cy2 TM	$\lambda_{ex}488 \text{ nm}/\lambda_{em}520 \text{ nm}$, BP40 Filter	$\lambda_{ex}480/30 \text{ nm}/\lambda_{em}530/40 \text{ nm}$ (473 nm Laser)
Cy3	$\lambda_{ex}532 \text{ nm}/\lambda_{em}580 \text{ nm}$, BP30 Filter	$\lambda_{ex}540/25 \text{ nm}/\lambda_{em}595/25 \text{ nm}$ (532 nm Laser)
Cy5	$\lambda_{ex}633 \text{ nm}/\lambda_{em}670 \text{ nm}$, BP30 Filter	$\lambda_{ex}635/30 \text{ nm}/\lambda_{em}680/30 \text{ nm}$ (635 nm Laser)

Die Scanner wurden vor der Anwendung mit 10% Wasserstoffperoxid gefolgt von 70% Ethanol und MQ-Wasser gereinigt. Der Scan der Gele wurde in den verwendeten niedrig-fluoreszierenden Glasplatten oder niedrig-fluoreszierenden HPE-Gelen durchgeführt. Bei einer Auflösung von 16 Bits/Pixel wurde eine Pixelgröße von 100 μm verwendet. Die „Photomultiplier tube“- (PMT-) Eingabe der verschiedenen Wellenlängen wurde individuell gewählt, sodass der jeweils gleich stark abundante Proteinspot des Experiments im Gel zur Sättigung gebracht wurde. Zur Visualisierung der Typhoon-Scans dienten die Software Typhoon Scanner Control, Version 5.0 und Image Quant Tool, Version 5.2. Zur Visualisierung der Ettan-DIGE-Aufnahmen diente die Software DeCyder, Version 6.5 und die Software Image Quant Tool, Version 5.2.

2.3.1.5.3 Auswertung der analytischen 2D-DIGE-Gele

Die Auswertung der analytischen 2D-DIGE-Gele erfolgte mit der Software Progenesis SameSpots, Version 4.1.3884.12788., von Nonlinear Dynamics (Newcastle upon Tyne, UK). Es wurden die Standard-Parameter der Software verwendet. Die Software beinhaltet ein voll automatisches Bildanalyse-System zur Detektion, Quantifizierung, Vergleich und Analyse von 2D-DIGE-Gelen. Der Kodetektionsalgorithmus der Software überlagert Bildpaare und produziert identische Spot-Grenzen von jedem Spot-Paar. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich der Spot-Volumina. Zusätzlich kann der Vergleich von jedem Proteinspot mit dem internen Standard Cy2TM erfolgen.

2.3.1.6 Proteinfärbung in Gelen

2.3.1.6.1 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (De St.Groth et al., 1963) wurde zur Visualisierung von Proteinen im Gel (Detektionslimit: 30 ng/Spot) verwendet. Dazu wurden die Gele für 30 min in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Das enthaltene Ethanol fixiert die Proteine im Gel und der Coomassie-Farbstoff lagert sich an die basischen und aromatischen Seitenketten der Aminosäuren an. Danach wurde das Gel 5 X für 10 min in 10% Essigsäure bis zur gewünschten Hintergrundfärbung gewaschen.

- Coomassie-Färbelösung:
0,1% Coomassie R-250, 40% Ethanol, 10% Essigsäure

2.3.1.6.2 Silberfärbungen

Als sensitivere Färbemethode wurde die Silberfärbung zur Visualisierung der Proteine verwendet (Detektionslimit: 1–6 ng/Spot). Es standen drei verschiedene Protokolle zur Verfügung. Die Silberfärbung nach Heukeshoven (Heukeshoven and Dernick, 1988), nach Shevchenko (Shevchenko et al., 1996) und die HPE-Färbemethode von Serva (Serva Elektrophoresis, Heidelberg).

Mit der Silberfärbung nach Heukeshoven (Heukeshoven and Dernick, 1988) wurden Proteinspots im Gel angefärbt, die nicht massenspektrometrisch analysiert werden sollten. Die Gele (hauptsächlich SDS-PAGE, Abschnitt 2.3.1.1) wurden für 30 min in Fixierlösung inkubiert. Danach wurden die Gele für 1 h in der Inkubationslösung sensibilisiert. Die Inkubationslösung enthält Glutaraldehyd, welches zu einer irreversiblen Vernetzung der Proteine führt und somit eine massenspektrometrische Analyse ausschließt. Nach 3 X waschen für je 5 min in MQ-Wasser wurden die Gele für 45 min in der Silberlösung entwickelt. Danach wurden die Gele für 30 sec mit MQ-Wasser gewaschen und bis zum gewünschten Färbegrad entwickelt (3–4 min). Bei dieser Reaktion werden Silberionen zu metallischem Silber in alkalischer Lösung reduziert. Nach Erhalt des gewünschten Färbegrades wird die Reaktion mit der Stopplösung gestoppt.

- H-Fixierlösung:
10% Essigsäure, 40% Ethanol
- H-Inkubationslösung:
0,2% Natriumthiosulfat, 0,5 M Natriumacetat, 0,5% Glutaraldehyd, 30% Ethanol
- H-Silberlösung:
0,1% Silbernitrat, 0,02% Formaldehyd
- H-Entwicklerlösung:
2,5% Natriumcarbonat, 0,01% Formaldehyd
- H-Stopplösung:
1,5% EDTA (Titriplex III)

Mit der Silberfärbung nach Shevchenko (Shevchenko et al., 1996) wurden Proteinspots im Gel angefärbt, die massenspektrometrisch identifiziert werden sollten. Bei der Shevchenko Färbung wird kein Glutaraldehyd eingesetzt, wodurch eine MS-Analyse ermöglicht wird. Die Gele (hauptsächlich SDS-PAGE, Abschnitt 2.3.1.1, oder 2D-PAGE, Abschnitt 2.3.1.4) wurden für 20 min in Fixierlösung inkubiert. Danach wurden die Gele für 10 min in 50% Methanol geschüttelt und für 10 min mit MQ-Wasser gewaschen. Die Sensibilisierung erfolgte für 1 min. Die Verwendung von Natriumthiosulfat vor der eigentlichen Färbung, soll überschüssige Silberionen abfangen. Danach wurden die Gele 2 X für 1 min mit MQ-Wasser gewaschen und 20 min bei 4 °C angefärbt. Danach wurde 2 X mit MQ-Wasser für 1 min gewaschen. Durch Senkung des pH-Wertes wurde die Farbreaktion mit der Stopplösung beendet.

- S-Fixierlösung:
50% Methanol, 5% Essigsäure
- S-Inkubationslösung:
0,02% Natriumthiosulfat
- S-Silberlösung:
0,1% Silbernitrat
- S-Entwicklerlösung:
2% Natriumcarbonat, 0,04% Formalin
- S-Stopplösung:
5% Essigsäure

Mit der HPE-Silberfärbung von Serva Elektrophoresis (Heidelberg) wurden ausschließlich die Proteinspots in HPE-Gelen angefärbt, die aus präparativen Gelen massenspektrometrisch identifiziert werden sollten. Auch hier kommt kein Glutaraldehyd zum Einsatz. Bei der HPE-

Silberfärbung wurden die Gele (hauptsächlich 2D-PAGE, Abschnitt 2.3.1.4) für 1 h in der Fixierlösung inkubiert. Danach wurden die Gele 4 X für 5 min mit MQ-Wasser gewaschen, um danach für 40 min in der Inkubationslösung sensibilisiert zu werden. Nach erneutem 4 X 5 min waschen der Gele mit MQ-Wasser wurden die Gele für 40 min in Silberlösung entwickelt. Anschließend wurde 3 X für 1 min mit MQ-Wasser gewaschen. Zur Entfernung von überschüssigem Silber und zur Erlangung des gewünschten Färbegrades wurde die Entwicklerlösung (2–3 min) eingesetzt. Danach wurde die Reaktion durch die Verringerung des pH-Wertes gestoppt.

- HPE-Fixierlösung:
40% Ethanol, 10% Essigsäure, 1% Zitronensäure
- HPE-Inkubationslösung:
0,025% Natriumthiosulfat, 10 mM Natriumacetat, 30% Ethanol
- HPE-Silberlösung:
0,2% Silbernitrat, 0,03% Formaldehyd
- HPE-Entwicklerlösung:
2,5% Natriumcarbonat, 0,03% Formaldehyd, 0,00075% Natriumthiosulfat
- HPE-Stopplösung:
10% Essigsäure

2.4 Isotope-Coded Protein Label (ICPL)

Die ICPL-Technik (Schmidt et al., 2005) basiert auf der stabilen Isotopenmarkierung aller freien Aminogruppen im Protein. Vier ICPL-Reagenzien können zur Markierung eingesetzt werden. Die vier Reagenzien besitzen die gleiche chemische Struktur und unterscheiden sich nur durch ihre Massen.

Die Proben von Modellsystem I und Modellsystem II wurden zu Beginn der Markierung in ICPL-Lysis-Puffer gelöst. Nur in diesem Schritt wurden die verwendeten Gewebeproben und Plasmaproben unterschiedlich vorbereitet.

- Die Gewebeproben wurden nach der Aceton-Fällung in 40 µl ICPL-Lysis-Puffer aufgenommen:
6 M Guanidin-HCl, 0,1M HEPES, pH auf 8,5 mit NaOH einstellen
- Die depletierten Plasmaproben (100 µl Volumen) wurden mit 126 mg Guanidin-HCl und 22 µl HEPES versetzt:
6 M Guanidin-HCl, 0,1 M HEPES, pH auf 8,5 mit NaOH einstellen

Das folgende Protokoll gilt für eine Probenkonzentration von 5 µg/µl für Gewebeproben und 10 µg/µl für Plasmaproben:

Bei einer Abweichung des pH-Wertes von pH 8,5 ± 0,1 erfolgte eine Korrektur mit NaOH oder HCl. Das dafür verwendete Volumen wurde dokumentiert. Für die Reduzierung der Disulfidbrücken wurde 1 µl Reduktionslösung zu den Proben pipettiert und mit Argon überschichtet. Nach 30 sec Vortexen und 1 min Behandlung mit dem Ultraschallstab wurden die Proben für 30 min bei 60 °C und 300 rpm unter Schütteln auf einem Thermomixer inkubiert. Die Alkylierung der Sulfhydrylgruppen erfolgte nach Abkühlen der Proben bei RT durch die Zugabe von 1 µl Carboxymethylierungs-Reagenzlösung (Iodacetamid, IAA). Danach wurde für 30 min bei 25 °C und 700 rpm unter Schütteln auf dem Thermomixer im Dunkeln inkubiert. Um überschüssiges IAA zu binden und damit die Reaktion abubrechen, wurde 1 µl Abbruchreagenzlösung den Proben zugegeben und für 15 min bei 25 °C bei 700 rpm inkubiert.

- HEPES-Puffer:
0,1 M HEPES
- Reduktionslösung:
2 M TCEP in 0,1 M HEPES, pH 8,5 mit NaOH einstellen
- Carboxymethylierungs-Reagenzlösung:
0,4 M IAA in 0,1 M HEPES, pH 8,5 mit NaOH einstellen
- Abbruchreagenzlösung:
0,5 M N-Acetyl-Cystein-Lösung in 0,1 M HEPES, pH 8,5 mit NaOH einstellen

Für die Isotopenmarkierung der Proben wurden die ICPL-Reagenzien ICPL₀, ICPL₄, ICPL₆ und ICPL₁₀ für sogenannte vierfache (Quadruplex-) Ansätze verwendet. Dies gilt für Gewebeproben und für Plasmaproben.

Für die Nicotinylierung wurden Abweichungen des pH-Wertes von pH 8,3 ± 0,1 mit NaOH oder HCl korrigiert. Danach wurde jeweils 6 µl von ICPL₀-, ICPL₄-, ICPL₆- und ICPL₁₀-Reagenzlösung, entsprechend dem Markierungsschema, in die ausgewählte Probe pipettiert und sofort mit Argon überschichtet. Nach Vortexen für 30 sec und 1 min Behandlung mit dem Ultraschallstab wurde die Markierung für 2 h bei 25 °C und 300 rpm unter Schütteln auf dem Thermomixer inkubiert. Um die Reaktion zu beenden und damit überschüssige ICPL-Reagenzien zu binden, erfolgte die Zugabe von 4 µl Abbruchreagenzlösung. Inkubiert wurde für 20 min, 25 °C und 650 rpm unter Schütteln auf dem Thermomixer. Danach wurden die

vier unterschiedlichen, mit ICPL-Reagenzien markierten Proben, vereint. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 11,9 eingestellt und die Probe für 20 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von NaOH wurden unerwünschte Nebenreaktionen, wie die Bildung von Estern, vermieden. Beendet wurde die ICPL-Markierungsreaktion durch die Erniedrigung des pH-Wertes der Proben auf $\text{pH } 8,3 \pm 0,1$ mit HCl.

- ICPL-Reagenzien:
0,15 M des jeweiligen N-Nicotinoyl-NHS-Esters in DMSO
- Abbruchreagenzlösung:
1,5 M Hydroxylamin, pH 8,3 mit NaOH einstellen

Die ICPL-markierten Proben wurden entweder sofort für die massenspektrometrische Analyse (Abschnitt 2.5.3) vorbereitet oder mit der OFFGEL-Technik fraktioniert (Abschnitt 2.3.1.3) und danach für die massenspektrometrische Analyse (Abschnitt 2.5.3) verwendet.

2.4.1 Auswertung der massenspektrometrisch generierten Daten von ICPL-markierten Proteinen mit der Software ICPL-ESIQuant

Die Auswertung der ICPL-Daten wurde mit der Software ICPL-ESIQuant (Brunner et al., 2010) durchgeführt. ICPL-ESIQuant besteht aus zwei unabhängigen Modulen, welche einerseits die Quantifizierung und andererseits die Identifizierung der Peptide bzw. Proteine ermöglicht. Modul 1 ermöglicht die Detektion und Quantifizierung von ICPL-Multiplets bzw. -Quadruplets. Des Weiteren werden die Massen der Peptide für die MS/MS-Identifizierung zusammengestellt. Modul 2 verknüpft detektierte MS-Signale mit MASCOT-MS/MS-Protein-Identifizierungen. Pro MS-Run wird eine Protein- bzw. Peptidliste generiert, die alle relevanten Informationen (Verhältnisse der Peptide in den einzelnen ICPL-Label-Zuständen und deren relative Standardabweichung zueinander) für die weitere Datenanalyse beinhaltet.

Für die Auswertung mit ICPL-ESIQuant wurden die Rohdaten (raw files) mit der „Trans-Proteomic Pipeline“ Software (TPP) (Keller et al., 2005) in mzXML-Files konvertiert. Danach erfolgte die Quantifizierung mittels ICPL-ESIQuant, Version 2.0. Es wurden folgende Parameter verwendet:

Label settings	Quadruplex	Da
	ICPL ₀ mass	105.021464
	ICPL ₄ mass	109.046571
	ICPL ₆ mass	111.041593
	ICPL ₁₀ mass	115.0667
	Allowed labels	5
	Label delta accuracy	40.0 ppm
Deisotopic settings	S/N	3 (Velos); 2 (Orbitrap)
	Peak intensity TH	10
	Isotopic pattern fit	0.2
	Isotopic pattern accuracy	0.02 Da
	Charge	From 2 to 4
Compound settings	Mass accuracy	60.0 ppm
	Elution profile fit	30
	Gaps per compound	5
	Elution peak width factor	0.01
	Use compound size	≥ 2
Quantification settings	Coelution deviation factor	≤ 100.0
	Coelution count	≥ 2
	ICPL ₆ prepeak correction	0.01
	ICPL ₁₀ prepeak correction	0.1
	Elution peak width difference	≤ 40

Zur Identifizierung (Modul 2), wurden die unten beschriebenen Parameter verwendet. Nach dem richtigen „Parsing Login“ wurden die Beschriftungen der ICPL-Label selektiert (ICPL₀ bzw. ICPL_0 oder ICPL(K) etc.). Die Suche wurde gegen die IPI „International Protein Index“-Datenbank (August 2010) mit dem MASCOT-Suchalgorithmus, Version 2.2, durchgeführt, wobei als Taxonomie *Homo sapiens* gewählt wurde. Die Carbamidomethylierung der Cysteine wurde als „globale Modifikation“ und die Oxidation von Methionin als „variable Modifikation“ in die Suche mit eingeschlossen. Es wurde maximal eine „Fehlsplaltung“ („misscleavage“) erlaubt und eine Abweichung der monoisotopischen Peptidmassen von ± 60 ppm toleriert. Als signifikant wurde ein Score ab 65 angesehen. Ein Peptid mit einem Score ≥ 20 wurde als sicher identifiziert angesehen und einem Protein zugeordnet.

Selection for result files	Mascot peptide score	≥ 20.0
	Merging ppm window	60.0
	Merging scan window	400
	Min \neq of unique peptide / protein	1
Precursor Selection	Multiplet precursor cluster area	≥ 10000.0
	Singlet precursor cluster area	≥ 100000.0
	Mode	Intensity based
	Precursor peaks per MS1 Scan	20

2.5 Analysemethoden

2.5.1 Western-Blot

Durch das Elektroblothing werden Proteinbanden (hauptsächlich von SDS-PAGE, Abschnitt 2.3.1.1, für das Modellsystem II, Abschnitt 2.1.5) aus der Polyacrylamid Matrix, über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld, auf eine Membran transferiert (Towbin et al., 1979). Die Western-Blot-Analyse erfolgte nach dem Semi-dry-Prinzip. Hierfür wurde zuerst die PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran auf die Größe der selbsthergestellten Mini-Gele (10 X 10 cm) zurechtgeschnitten und kurz mit Methanol inkubiert. Dadurch konnte die hydrophobe Membran mit Wasser benetzt werden. Danach wurde auf die anodische Seite der Plattenelektrode der Blotkammer ein in Anodenpuffer getränktes Filterpapier luftblasenfrei aufgelegt. Auf das Filterpapier wurde die PVDF-Membran und darauf das Gel ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt. Auf das selbsthergestellte 12%ige SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.1.1), welches mit 20 μg Protein je Patientenprobe beladen wurde, wurde ein in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier platziert und durch leichtes Abrollen auf dem „Sandwich“ überschüssige Flüssigkeit und mögliche Blasen entfernt. Danach wurde der Kathodendeckel auf die Transfereinheit gelegt und der Transfer gestartet. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte pro Gel für 2–3 h bei 1 mA/cm².

- Anodenpuffer:
50 mM Natriumborat pH 9, 0,20% Methanol
- Kathodenpuffer:
50 mM Natriumborat pH 9, 0,5% Methanol

Für die Immundetektion durch das „Enhanced chemiluminescence“-System (ECL-System) wurde ein „ready-to-use“ Kit von Thermo Fisher Scientific (Schwerte) nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurde die PVDF-Membran für 5 min in 1 X Waschpuffer gewaschen. Danach wurde der primäre Antikörper, welcher in einer geeigneten Verdünnung (Tabelle 2-5) in „Antibody Diluent“ gelöst wurde, mit der Membran bzw. den Proteinbanden für 30 min bei RT auf einem Rotor inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus oder anti-Kaninchen, Verdünnung 1:10000) gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase („Horseradish Peroxidase“; HRP), mit dem „Optimized HRP Reagent“ 1:1 vermischt und ebenfalls für 10 min auf dem Rotor inkubiert. Zur Entfernung von nicht gebundenen Antikörpern wurde die Membran 3 X kurz mit 1 X Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die feuchte Membran blasenfrei auf eine Plastikfolie gelegt. Auf die obere Seite der Membran wurde 1 ml „Detecting Reagent Working Solution“ A und B im Verhältnis 1:1 pipettiert und für 30 sec inkubiert und anschließend sofort mit dem LAS 3000 „Imager“ gemessen. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte für 5 sec, sowie 2, 5, 10 und 20 min bei 440 nm. Danach wurde die Membran 3 X kurz mit MQ-Wasser gewaschen und somit zum „Stripping“ vorbereitet.

RCT Typ	Antikörper Name	Eingesetzte Verdünnung
II	ALDH1B1 _ Aldehyde Dehydrogenase X, Mitochondrium	1:200
I	CALD1 _ Caldesom 1	1:200
II	HADHA _ 3 Ketoacyl Coenzyme A (CoA) Thiolase alpha subunit	1 µg/ml
I	Lumican	1:100
II	MFAP4 _ Microfibril-associated glycoprotein 4	1:200
II	S100A4	1:500
I und II	TPM1 _ Tropomyosin 1 alpha chain	3 µg/ml
I und II	TAGLN _ Transgelin	1:500
I und II	TKT _ Transketolase	1 µg/ml
I	TUBA4A _ Tubulin alpha 4A chain	1:200
II	VDAC2_ Voltage-dependent anion selective channel protein 2	1:1000
I	WDR1 _ WD repeat-containing protein 1	1:500
I und II	Der Antikörper für die Kontrolle: VCP _ Valosin containing protein	1:200

Tabelle 2-5: Verdünnungen der primären Antikörper, die für die jeweiligen RCT getestet wurden.

Zur Entfernung des Antikörpers („Stripping“) wurde die PVDF-Membran für 1 h bei 55 °C in „Stripping“-Puffer inkubiert. Danach wurde die Membran kurz in MQ-Wasser gewaschen.

Die weitere Immundetektion erfolgte mit dem nächsten primären Antikörper, wie oben beschrieben.

- „Stripping“-Puffer:
10 mM NaOH, 2% SDS, 0,5% DTT

Zuletzt wurde die Membran 3 X kurz mit MQ-Wasser gewaschen, in Folie eingeschweißt und bei RT gelagert.

2.5.2 Immunhistochemie (IHC)

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode, die die Detektion von Antigenen in Gewebeschnitten, mit an Antikörper gekoppelten Farbstoffen, ermöglicht.

Die IHC wurde nur zur Validierung von Proteinen aus dem Modellsystem II verwendet. Das dafür verwendete Gewebe, die Gewebeschnitte und die Durchführung der Immunhistochemie erfolgte in der Kooperationseinheit von Prof. Dr. med. Roland S. Croner (Geschäftsführender Oberarzt, Chirurgische Klinik, Universitätsklinikum Erlangen).

Die Immunhistochemie erfolgte nach dem PAP-System, zur Untersuchung der Expression von HADHA (Kaninchen Polyklonal; Abcam (ab 54477), Cambridge, UK) an formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten 5 µm dicken Gewebeschnitten. Es wurden 4 Gewebeschnitte pro Patient von insgesamt 37 Patienten, die mit RCT II behandelt wurden, untersucht. Vor der Färbung wurden die Schnitte 2 X für 15 min mit Xylol behandelt und danach jeweils 2 X für 2 min in einer absteigenden Alkoholreihe (100, 96, 85 und 70%) entparaffiniert und dehydriert.

Die Antigendemaskierung erfolgte für 1 min bei 120 °C im Dampfkochtopf in 1:10 verdünnter TRS-Working-Lösung pH 6 („Target retrieval solution“, Dako Deutschland GmbH, Hamburg), einer Abkühlung bei RT für 20 min und einer 2-maligen Behandlung mit 0,05 M TBS pH 7,6 („Tris Buffered Saline“) für je 5 min. Danach wurden die auf Objektträgern fixierten Gewebeschnitte mit dem wasserabweisenden „Liquid Blocker, Super Pap-Pen-Mini“ (Services GmbH, München) umrandet, um den Gewebebereich zur IHC zu markieren.

Zur Reduzierung von Hintergrundsignalen und um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper abzusättigen wurden die Gewebeschnitte, nach Herstellerangaben des

ZytoChemPlus (AP) Polymer Bulk Kit (Zytomed Systems GmbH, Berlin), für 5 min in „ready-to-use“ Protein-Blocking-Lösung I bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte 2 X für 5 min in TBS gewaschen. Für die Färbung der auf Objektträgern fixierten Gewebeschnitte wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:250 in „ready-to-use; Antibody Diluent“ (Zytomed Systems GmbH, Berlin) bei RT über Nacht und in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Entfernung von nicht gebundenen Antikörpern wurden die Gewebeschnitte 2 X für 5 min mit TBS gewaschen. Zur Verstärkung der Reaktion erfolgte die Inkubation mit der „ready-to-use“ Post-Block-Lösung (Zytomed Systems GmbH, Berlin) für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer. Nach dem Waschen mit TBS, 2 X für 5 min, wurden die Gewebeschnitte für 30 min mit dem „ready-to-use“ AP-Polymer (Zytomed Systems GmbH, Berlin) bei RT und in einer feuchten Kammer inkubiert. Durch erneutes Waschen mit TBS, 2 X für 5 min, wurde ungebundenes AP-Polymer entfernt. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem „ready-to-use; Liquid Permanent Red“ (Zytomed Systems GmbH, Berlin) für 10 min bei RT und in einer feuchten Kammer, wodurch die Färbung eingeleitet wurde. Danach wurden die auf Objektträgern fixierten Gewebeschnitte 2 X für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Hämatoxylin Gill-III (Merck KGaA, Darmstadt) für 1 min gegengefärbt. Der Farbumschlag auf blau resultierte durch Inkubation der auf Objektträgern fixierten Gewebeschnitte unter warmem Leitungswasser für 10 min. Nachdem die Gewebeschnitte auf dem Objektträger für 30 min getrocknet wurden, erfolgte deren Überschichtung mit „Permanent Mounting Medium“ (Vector Laboratories, Peterborough, Großbritannien). Nach 60 min wurden die gefärbten Gewebeschnitte unter dem Mikroskop durch einen Pathologen begutachtet. Bewertet wurden die Schnitte nach dem „Immune Reactive Score“ (IRS). Für die Statistik wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt ($p < 0,05$).

2.5.3 Massenspektrometrie

2.5.2.1 Enzymatische Spaltung von Proteinen

Für die massenspektrometrischen Analysen wurden die Proteine proteolytisch im Gel oder in Lösung in Peptide gespalten.

Für MALDI-MS-Messungen wurden die Proteine mit Trypsin im Gel (In-Gel-Verdau) proteolytisch gespalten (ausschließlich nach 2D-DIGE, Abschnitt 2.3.1.5). Die Endopeptidase Trypsin hydrolysiert die Peptidbindung C-terminal von Lysin und Arginin.

Für ESI-MS/MS-Messungen wurden die Proteine in Lösung (In-Solution-Verdau) mittels Trypsin und Endoproteinase Glu-C in einem Doppelverdau gespalten (ausschließlich nach OFFGEL-Fraktionierung, Abschnitt 2.3.1.3). Endopeptidase Glu-C hydrolysiert die Peptidbindung C-terminal von Glutaminsäure und zu einer geringen Rate C-terminal von Asparaginsäure.

2.5.2.1.1 Entnahme der Proteinspots oder Proteinbanden aus einem Gel

Elektrophoretisch getrennte Proteinspots oder Proteinbanden (Abschnitt 2.3) wurden manuell oder mit einem Roboter „EXQuest Spot Cutter“ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) aus dem Gel gestanzt und danach im Gel proteolytisch in Peptide gespalten (In-Gel-Verdau).

Für das Ausstechen der Proteinspots oder Proteinbanden wurde der Roboter von BioRad mit der „Spot Cutting Control Software PDQuest“, Version 8.0.2, verwendet. Das Ausstechen erfolgte anhand einer Pickliste, die manuell oder in der Progenesis SameSpots Software, Version 4.1.3884.12788 (Abschnitt 2.3.1.5.3), erstellt und in die Software des Roboters eingelesen wurde. Vor dem Ausstechen wurde das Gel für 30 min in MQ-Wasser gewaschen. Entsprechend der Pickliste wurden die Proteinspots einzeln mit einem hohlen Pickstift (1 mm Durchmesser) aus dem Gel ausgestochen und in eine 96-well-Lochplatte mit 50 µl MQ-Wasser überführt. Die 96-well-Platte wurde in eine „Protein LoBind Deepwell“-Platte gelegt. Beide Platten wurden vor der Anwendung mit 100 µl 100% ACN (Acetonitril) gewaschen. Die oberste Platte wurde mit einem selbst klebenden Film bedeckt und bis zur Spaltung der Proteine bei 4 °C aufbewahrt.

Für das manuelle Ausstechen der Proteinspots wurde das Gel für 30 min in MQ-Wasser gewaschen und auf einen UV-Leuchttisch platziert. Danach wurden die Spots mit einer um 1/3 gekürzten Pipettenspitze (200 µl Volumen) ausgestanzt und mit einem Skalpell in ca. 1 X 1 mm große Stücke zerkleinert. Danach wurde der zerkleinerte Spot in eine 96-well-Lochplatte mit 50 µl MQ-Wasser gegeben und wie oben beschrieben prozessiert.

2.5.2.1.2 Proteinspaltung im Gel

Die Proteinspaltung im Gel (In-Gel-Verdau) erfolgt nach der Vorschrift von Shevchenko (Shevchenko et al., 2006). Die Proteine im Gel wurden zuerst reduziert und dann alkyliert. Hierfür wurden die Proteinspots mit 100 µl 100% ACN für 10 min inkubiert. Nach kurzem zentrifugieren wurde der Durchlauf verworfen und es erfolgte die Reduzierung der Disulfidbrücken mit 50 µl DTT-Lösung für 30 min bei 56 °C. Danach wurde kurz zentrifugiert, der Durchlauf entsorgt, und die Probe auf RT abgekühlt. Gewaschen wurde erneut mit 100 µl 100% ACN für 10 min. Nach kurzem Zentrifugieren und Entfernen des Durchlaufs erfolgte die Alkylierung der Sulfhydrylgruppen mit 50 µl IAA-Lösung für 20 min bei RT und im Dunkeln. Danach wurde kurz zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Gewaschen wurde erneut mit 100 µl 100% ACN für 10 min. Danach wurde die Probe zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Zugabe von 100 mM ABC (Ammoniumbicarbonat) und 100% ACN im Wechsel führt dazu, dass die Gelstückchen gewaschen werden. Des Weiteren wird durch ACN die Gelmatrix geschrumpft. Nach erneutem Quellen der Gelmatrix können Reagenzien und Puffer in das Innere der Gelmatrix gelangen und somit mit dem Protein reagieren.

Für die Spaltung mit Trypsin wurde jeder Proteinspot mit 5 µl Trypsin-Lösung (20 ng Enzym/5 µl In-Gel-Trypsin-Lösung) überdeckt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut 1 µl Trypsin-Lösung auf jeden Proteinspot pipettiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Überschichtet wurden die Proteinspots mit 14 µl 100 mM ABC bzw. In-Gel-Puffer. Die Spaltung erfolgte bei 37 °C in einer feuchten Kammer für 4 Stunden oder über Nacht. Gestoppt wurde der Verdau mit 10 µl 0,2% TFA.

Nach der 4-Stunden-Spaltung wurde 5 µl Überstand aus insgesamt 20 µl Trypsin-Peptid-Lösung entnommen und über Zip-Tips aufgearbeitet (Abschnitt 2.5.2.2) und damit für die MALDI-MS-Messung vorbereitet.

- In-Gel-Puffer:
100 mM Ammoniumbicarbonat
- In-Gel-Reduzierlösung:
10 mM DTT in In-Gel-Puffer
- In-Gel-Alkylierungslösung:
55 mM IAA in In-Gel-Puffer
- In-Gel-Trypsin-Lösung:

100 mM In-Gel-Puffer, 10% ACN

Nach der Spaltung über Nacht wurde der komplette Überstand (20 µl Trypsin-Peptid-Lösung) zentrifugiert und separat in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gesammelt. Auf den Proteinspot wurden 20 µl 20%ige Ameisensäure gegeben und für 3 min bei RT inkubiert. Hierdurch sollten Peptide, die durch Adhäsion an die Plattenwand gebunden haben, in Lösung gebracht werden. Danach wurde der Überstand durch Zentrifugation in das gleiche Eppendorf Reaktionsgefäß befördert und in der „SpeedVac“ einrotiert. Für die weitere Probenvorbereitung wurden die Peptide erneut in Lösung gebracht und über Zip-Tips (Abschnitt 2.5.2.2) für die MALDI-MS-Messung oder mit Stage-Tips (Abschnitt 2.5.2.3) für die ESI-MS/MS Messung aufgearbeitet.

2.5.2.1.3 Proteinspaltung in Lösung

Die Proteinspaltung in Lösung (In-Solution-Verdau) wurde für Proben verwendet, die mit der OFFGEL-Methode fraktioniert (Abschnitt 2.3.1.3) worden waren. Zum Umpuffern der Fraktionen wurden die Zeba-Spin-Säulen nach Herstellerangaben in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß platziert und mit 1.500 X g für 1 min zentrifugiert (Zentrifuge Groß 5810R), um den Aufbewahrungspuffer der Zeba-Spin-Säule zu entfernen. Die Equilibrierung der Säule erfolgt durch viermalige Zugabe von 300 µl In-Solution-Puffer und der darauffolgenden Zentrifugation mit 1.500 X g für 1 min (Zentrifuge Groß 5810R). Nach dem die Zeba-Spin-Säule in ein frisches LoBind Eppendorf Reaktionsgefäß überführt worden war, wurde die Probe in einem Volumen von 80 µl aufgetragen. Danach wurde für 2 min bei 1.500 X g zentrifugiert und der Durchfluss in einem LoBind Eppendorf Reaktionsgefäß aufgefangen. Das Nachwaschen der Säule erfolgte mit 40 µl In-Solution-Puffer für 2 min bei 1.500 X g, wobei der Durchfluss im gleichen LoBind Eppendorf Reaktionsgefäß aufgefangen wurde. Vor der proteolytischen Spaltung der Proteine wurde die Probe 1:1 mit 50 mM Tris pH 8,0 auf 1 M Harnstoff verdünnt. Hierdurch wurden die Proben auf die Bedingungen der Enzymreaktion eingestellt.

- In-Solution-Puffer:
2 M Harnstoff, 5 mM Tris HCl pH 8,0

Für den In-Solution-Doppelverdau wurden die Enzyme Glu-C und Trypsin (Biringer et al., 2006) eingesetzt. Zuerst erfolgte die Spaltung mit Glu-C. Hierfür wurde das Enzym mit 50 µl MQ-Wasser gelöst (Enzymkonzentration 1 µg/µl). Die Spaltung erfolgte in einem 1:10 Verhältnis von Enzym zu Protein für 4 Stunden bei 25 °C. Danach erfolgte die Spaltung mit Trypsin. Hierfür wurde Trypsin in 50 µl MQ-Wasser gelöst (Enzymkonzentration 0,25 µg/µl). Die Spaltung erfolgte in einem 1:50 Verhältnis von Enzym zu Protein über Nacht bei 37 °C. Die Reaktion wurde mit 1% TFA (Endkonzentration 0,1% TFA) gestoppt und die Probe in der „SpeedVac“ einrotiert.

Für den In-Solution-Verdau (Einfachverdau) wurde Trypsin in 50 µl MQ-Wasser gelöst (Enzymkonzentration 0,25 µg/µl). Die Spaltung erfolgte in einem 1:50 Verhältnis von Enzym zu Protein über Nacht bei 37 °C. Die Reaktion wurde ebenfalls mit 1% TFA (Endkonzentration 0,1% TFA) gestoppt und die Probe in der „SpeedVac“ einrotiert.

Nach dem Verdau (Doppelverdau oder Einfachverdau) wurden die proteolytisch gespaltenen Peptide auf Stage-Tips (gefüllt mit C18-Material) geladen (Rappsilber et al., 2007) und entsalzt. Dazu wurden die in der „SpeedVac“ einrotierten Peptide in 20 µl 20%iger Ameisensäure aufgenommen und nach 1 min Vortexen mit MQ-Wasser auf eine Konzentration von 2% verdünnt. Hierdurch sollten Peptide, die durch Adhäsion an die Eppendorf Reaktionsgefäßwand gebunden haben, in Lösung gebracht werden. Bevor die Probe auf die Stage-Tips beladen wurde, erfolgt die Equilibrierung des C18-Materials mit 20 µl Initialisierungs-Lösung. Danach wurde das C18-Material mit 200 µl 1%iger Ameisensäure gewaschen. Anschließend wurde das gesamte Probenvolumen (max. 200 µl) auf das Stage-Tip-Material gegeben. Gewaschen wurde mit 100 µl 1%iger Ameisensäure. Die auf dem Stage-Tip-Säulenmaterial gebundenen Peptide können nun auf diese Weise gelagert werden und anschließend, wie in Abschnitt 2.5.2.3 dargestellt, mit ESI-MS/MS analysiert werden.

- Initialisierungs-Lösung:
80% Acetonitril, 1% Ameisensäure

2.5.2.2 MALDI-TOF/TOF-MS-Analyse

Für die MALDI-TOF/TOF-Massenanalyse wurde der „Proteomics Analyzer 4700“ verwendet. Proben, die nach dem In-Gel-Verdau in der „SpeedVac“ (Abschnitt 2.5.2.1.2) einrotiert worden waren, wurden in 20 µl 20%iger Ameisensäure gelöst und mit MQ-Wasser auf eine Endkonzentration von 2% verdünnt. Danach wurde jede Probe über Zip-Tips entsalzt und ankonzentriert. Dazu wurden die Zip-Tips 4 X mit 10 µl 100%igem ACN angefeuchtet. Danach erfolgte die Equilibrierung des C18-Materials für 4 X mit 10 µl 0,2% TFA. Die Bindung der Peptide an das C18-Material erfolgt durch 15 X auf und ab pipettieren der tryptischen Peptidlösung in den Zip-Tips. Dann wurde das Zip-Tip-Säulchen 4 X mit 10 µl 0,2% TFA gespült. Die Probenelution erfolgte mit 1 µl Matrixlösung. Danach wurde die Peptid-Matrix-Mischung auf das „Steel“-Target pipettiert, bei Raumtemperatur getrocknet und sofort massenspektrometrisch analysiert.

- Puffer für α -Cyano-4-hydroxymizsäure:
50% ACN/0,2% TFA
- α -Cyano-4-hydroxymizsäure:
10 mg/ml CHCA gelöst in α -Cyano-4-hydroxymizsäure-Puffer, bei 37 °C unter Schütteln lösen
- Puffer für Ammoniumhydrogenphosphat:
50% ACN/0,1% TFA
- Ammoniumhydrogenphosphat:
10 mg/ml Ammoniumhydrogenphosphat gelöst 1:10 in Ammoniumhydrogenphosphat-Puffer
- Matrixlösung:
1:1 Mischung von 5 mg/ml α -Cyano-4-hydroxymizsäure in Puffer für α -Cyano-4-hydroxymizsäure

Die Messung mittels MALDI-TOF/TOF erfolgte anhand folgender Parameter: Der N2/YAG-Laser wurde auf eine Frequenz von 200 Hz und eine Wellenlänge von 355 nm eingestellt. Die Masseneichung erfolgte extern mithilfe von „Standardpeptiden 4700 Proteomics“ die auf vier definierten Kalibrier-Positionen auf das „Steel“-Target pipettiert worden waren. Zur Aufnahme des MS-Spektrums einer Probe wurden die Spektren von 3000 Laserschüssen aufaddiert. Dabei konnte eine Massengenauigkeit kleiner 100 ppm erreicht werden. Die Aufnahme der MS/MS-Spektren eines Peptids der gleichen Probe wurde ebenfalls mit 3000 Laserschüssen ausgeführt und aufaddiert. Die Laserenergie wurde um 500 Einheiten gegenüber der MS-Messung angehoben. Für die Fragmentierung der Peptide diente Luft als Kollisionsgas.

- Standardpeptide 4700 Proteomics:
904 Da Arg-Bradykinin; 1296 Da Angiotensin I; 1570 Da Glu-Fibrinopeptide B; 2093 Da ACTH (1–17); 2465 Da ACTH (18–39); 3659 Da ACTH (7–38)

Die MALDI-TOF/TOF-generierten MS-Spektren wurden für die “Peptide mass fingerprint” (PMF)-Identifizierung der Proteine herangezogen. Für die optimale Peak-Detektion wurde die Software Mascot Distiller, Version 2.4.2.0, verwendet. Diese Software ermittelt die Peaks, indem sie eine ideal errechnete Isotopenverteilung einer Peptidmasse mit den experimentell ermittelten Daten abgleicht, wobei Massen, Ladungszustand, Auflösung und Intensität variiert werden bis eine maximale Korrelation erreicht wird. Das Massenspektrum des Peptids wird dann dekonvolviert und als monoisotopische Masse zur Peak-Liste hinzugefügt. Durch die zusätzliche Einführung von zwei Grenzwerten, dem Signal/Rausch (S/N)-Verhältnis und einem Korrelationskoeffizienten, erfolgt die optimale Detektion von Peaks auch in einem weniger optimalen Spektrum. Danach werden die Peak-Listen als MGF-Files („Mascot generic format“) abgespeichert und in die Software Mascot Daemon eingeladen. In der Software Mascot Daemon, Version 2.2.0, werden die Peak-Listen im „Batch“-Verfahren für die Datenbanksuche (in diesem Fall: IPI, „International Protein Index“) eingesetzt. Für die Identifizierung der Proteine wird der MASCOT-Suchalgorithmus, Version 2.2, verwendet. Die folgenden MASCOT-Suchkriterien wurden für die Identifizierung verwendet: Die Datenbank IPI_human, eine fixe Modifikation von Carbamidomethyl (C), eine variable Modifikation (Oxidation von Methionin), eine tryptische Fehlsplaltung, eine Abweichung der monoisotopischen Peptidmassen von ± 50 ppm mit einem Ladungszustand von 1+ und einer „Decoy Database“-Suche. Für die Identifizierung wurde ein Score ≥ 60 als signifikant angesehen.

2.5.2.3 Analyse mit dem ESI-MS/MS

Die MS/MS-Analyse mit dem LTQ-Hybridmassenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen), das mit einer nanoHPLC-Anlage Agilent 1200 (Agilent, Böblingen) verbunden ist, wurde von der „Core Facility“ (MPI, Martinsried) nach folgenden Angaben durchgeführt: Nach der In-Solution-Splaltung der Proteine in Peptide wurden die Peptide auf das Stage-Tip C18-Säulenmaterial gebunden (Abschnitt 2.5.2.1.3). Das Peptidgemisch wurde dann mittels einer nanoLC aufgetrennt (15 cm-fused silica Säulen mit 75 μm ID gefüllt mit ReproSil-Pur

C18-AQ 3 μm Kunstharz, Dr. Maisch GmbH, Ammer Bruch-Entringen). Für die Elution wurde eine Fließgeschwindigkeit von 250 nl/ml gewählt. Sie erfolgte in 100 min mit einem Gradienten von 2 bis 40% in 0,5% Essigsäure (Laufmittel B, 0,5% Essigsäure in Acetonitril). Danach wurden mit dem Orbitrap-Massenanalysator (m/z 300–1800, $R = 60.000$, Ionen-Anreicherung bis zu einem Richtwert von 1.000.000) Vorläufer-Ionen-Spektren aufgenommen. Daraus wurden die 10 intensivsten Signale pro Sekunde fragmentiert und die Fragmentspektren in der Ionenfalle analysiert.

Die MS/MS-Analyse mit dem LTQ-Velos-Hybridmassenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen), das mit einer „Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid-chromatography“ (RSLC) Anlage (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verbunden war, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Sickmann (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften-ISAS-e.V., Dortmund) im Rahmen einer Kooperation nach folgenden Angaben durchgeführt: Nach proteolytischer Spaltung der Proteine in Lösung und der Beladung der Peptide auf das Stage-Tip C18-Säulenmaterial (Abschnitt 2.5.2.1.3) wurde das Peptidgemisch mit einer „Reversed-Phase“-Säule (Acclaim PepMap, 75 μl X 2 cm C18, 100 Å, Dionex; Thermo Fisher Scientific, Schwerte) in 0,1% TFA aufkonzentriert. Danach erfolgte die Trennung der Peptide durch einer „Reversed-Phase“-Säule (Acclaim PepMap RSLC 75 μm X 15 cm, 100 Å, Dionex; Thermo Fisher Scientific, Schwerte) mit einem Gradienten (Lösung A: 0,1% TFA, Lösung B: 0,1% TFA, 84% ACN), der von 5 zu 50% Lösung B mit einer Fließgeschwindigkeit von 300 nl/min in 90 min anstieg. Danach wurden mit dem Orbitrap-Massenanalysator ($m/z = 300\text{--}2000$, $R = 60.000$, Polysiloxane m/z 445.120030 als „lock mass“) die Vorläufer-Ionen-Spektren aufgenommen. Daraus wurden die 10 intensivsten Signale pro Sekunde im „Collision-induced Dissociation“ (CID)-Modus in der Ionenfalle mit einem dynamischen Ausschluss von 12 sec fragmentiert und die Fragmentspektren aufgezeichnet. Die CID-Spektren wurden mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 35%, „Default“ Ladungszustand von 2 und einer Aktivierungszeit von 30 ms aufgenommen. „Automatic Gain Control“ (AGC) wurde für die Ionenfalle MS^n auf 10^4 und für die Orbitrap MS auf 10^6 eingestellt.

Da nur ICPL-Proben analysiert wurden, wurden diese generierten MS/MS-Spektren bzw. MS^n -Spektren mit der ICPL-ESI*Quant* Software ausgewertet (Abschnitt 2.4.1).

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit diente der Optimierung der Analysenstrategie zur Identifizierung von Proteinsignaturen aus Gewebe- und Plasmaproben mittels gel- und massenspektrometriebasierten Techniken (2D-DIGE und ICPL). Das Probenmaterial, welches dazu verwendet wurde, stammte von zwei biologischen Modellsystemen (Conn-Syndrom und Rektumkarzinom).

Aus Modellsystem I, dem Conn-Syndrom, wurde je von einem Patienten das Proteom aus mikrodisssektierten normalen und tumorösen Nebennierengewebearealen solubilisiert und mittels ICPL-Technologie analysiert. Da die zu vergleichenden Proben von einem Patienten stammen, konnte die genetische Variabilität, die beim Vergleich von Proben verschiedener Patienten vorhanden ist, vermieden und damit die Detektion von Proteinsignaturen erleichtert werden. Zusätzlich zu den Gewebeproben wurde Plasma derselben Patienten mittels 2D-DIGE analysiert. Hierfür wurde das Blut direkt an der normalen bzw. adenomatösen Nebenniere (linke bzw. rechte) entnommen. Der Vergleich der Proteome der beiden Plasmaproben sollte zur Identifizierung von Proteinen führen, die in beiden Proteomzuständen unterschiedlich exprimiert werden. Diese Proteinsignaturen, die im Blut eines Patienten nachgewiesen werden könnten, würden die klinische Diagnostik der Erkrankung wesentlich erleichtern.

Da aus der Nebenniere nur geringe Mengen an normalen und tumorösen Gewebezellen für die Mikrodisssektion zur Verfügung standen, wurden zusätzliche Analysen an einem zweiten Modellsystem (Rektumkarzinom) durchgeführt. Hierfür wurden von 20 Patienten mit Rektumkarzinom tumoröse Zellen aus biopsiertem Gewebe mikrodisssektiert, daraus das Proteom solubilisiert und dieses mit der ICPL-Technologie analysiert. Um Patienten mit Rektumkarzinom eine zielgerichtete Behandlung zu ermöglichen, wurde das gute Ansprechen bzw. schlechte/mittelmäßige Ansprechen der Patienten auf die Behandlung mit unterschiedlichen Radiochemotherapien (RCT I oder RCT II) verglichen. Proteine, die bei Responder- und Non-Responder-Patientenproben unterschiedlich exprimiert waren, wurden mittels Western-Blot-Analysen validiert. Eine weitere Verifizierung dieser potenziellen Biomarker erfolgte durch immunhistochemische Anfärbung dieser Proteine in Dünnschichtgewebeschnitten mehrerer Patienten mit Rektumkarzinom.

3.1 Modellsystem I: Das Conn-Syndrom

3.1.1 Proteomanalyse aus mikrodissektiertem Gewebe mittels ICPL

Aus operativ entfernten adenomatösen Nebennieren, von vier Patienten (P 117, P 131, P 133 und P 55) mit Aldosteron-produzierenden Adenomen (APA), wurden 8–10 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt (Abschnitt 2.2.2 ff). Die Gewebeschnitte wurden zur Unterscheidung der Zelltypen mit Kresylviolet angefärbt. Schließlich wurden daraus Tumorzellen aus den tumorösen Gewebereichen und gesunde Zellen aus normalen Gewebereichen mittels „Laser Capture Microdissection“ (LCM) isoliert. Die Isolierung der Zellen erfolgte aus der Zona glomerulosa, dem Cortex der Nebennieren. Zur Proteinsolubilisierung wurden die LCM-Gewebeschnitte in ICPL-Puffer aufgearbeitet (Abschnitt 2.4 ff). Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die Proteine der zu vergleichenden Proteome mit den entsprechenden ICPL-Reagenzien markiert. Da von vier Patienten insgesamt acht Proben zur Verfügung standen, wurden zwei ICPL-Ansätze vorbereitet. Je ICPL-Ansatz sollte die Proteinexpression in einem ICPL-Duplex-Vergleich von tumorösem (T) und normalem (N) Gewebe jedes Patienten miteinander verglichen werden (je Patient ICPL_4 zu ICPL_0 oder ICPL_10 zu ICPL_6; siehe Tabelle 3-1). Des Weiteren sollte für die Identifizierung von unterschiedlich exprimierten Proteinen, jede der ICPL-Duplex-Datensätze beider Experimente miteinander verglichen werden (Tabelle 3-1).

	ICPL_0	ICPL_4	ICPL_6	ICPL_10
Ansatz A	P 117 N	P 117 T	P 131 N	P 131 T
Ansatz B	P 55 N	P 55 T	P 133 N	P 133 T

Tabelle 3-1: ICPL-Markierungsschema der Proteine, solubilisiert aus Tumorgewebe (T) und normalem (N) Gewebe von Patienten mit Conn-Syndrom.

Die vier mit den jeweiligen ICPL-Reagenzien markierten Proben des jeweiligen Ansatzes wurden nach der Markierung vereinigt („Pool“) und mit Aceton gefällt. Danach wurden die gepoolten Proben in In-Solution-Verdaupuffer aufgenommen und die Proteine enzymatisch zuerst mit Glu-C und dann mit Trypsin (Doppelverdau) in Peptide gespalten (Abschnitt 2.5.2.1.3).

Da die Zona glomerulosa im Cortex der Nebenniere einen sehr kleinen Bereich ausmacht, konnten nur wenige normale bzw. tumoröse Zellen daraus mittels LCM isoliert werden. Deshalb stand letztendlich keine ausreichende Proteinmenge zur Verfügung, um eine

Reduktion der Komplexität der Proteine (z.B. mittels OFFGEL-Fraktionierung) durchzuführen, bevor sie in Peptide gespalten wurden.

Von dem enzymatischen Verdau der gepoolten Proben wurden je 3 technische Replikate (1, 2 und 3 von Ansatz A bzw. 4, 5 und 6 von Ansatz B) separat mit LC-MS/MS (LTQ-Velos; Thermo Fisher Scientific, Bremen) analysiert (Abschnitt 2.5.2.3). Die Quantifizierung und die darauf folgende Identifizierung der Proteine erfolgte mit der Software ICPL-ESIQuant (Abschnitt 2.4.1).

3.1.1.1 Quantifizierung und Identifizierung der ICPL-markierten Proteine

Unter der Vorgabe, nur Proteine in die Ergebnisse mit einzubeziehen, die mindestens durch zwei Peptide quantifiziert und identifiziert worden waren, konnten in Ansatz A 274 und in Ansatz B 257 Proteine identifiziert werden (Abbildung 15). Dabei wurden in Ansatz A 151 Proteine in allen technischen Replikaten (1, 2 und 3) quantifiziert. In Ansatz B wurden innerhalb der technischen Replikate 4, 5 und 6 155 Proteine überlappend quantifiziert. Dies lässt den Schluss zu, dass die technische Ausführung reproduzierbar durchgeführt werden konnte.

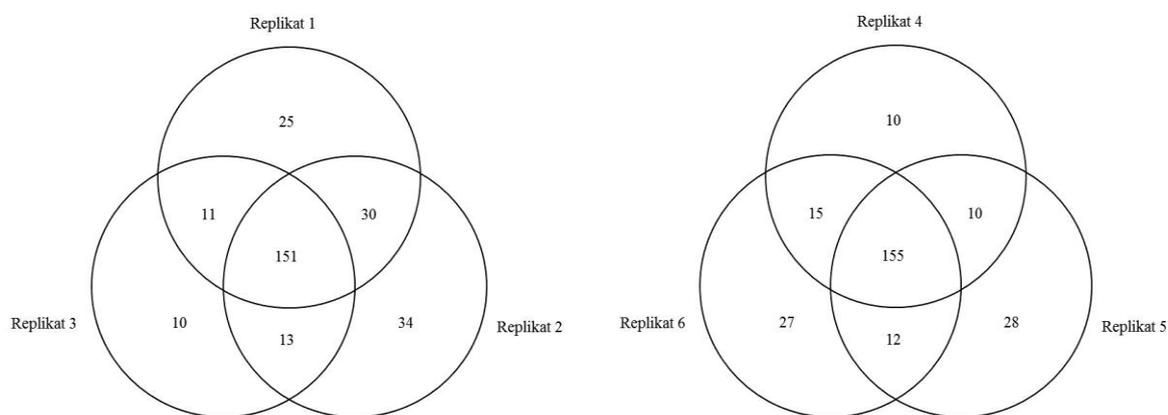


Abbildung 15: VENN-Diagramm. Quantifizierte Proteine ≥ 2 Quadruplets der Replikate 1, 2 und 3 (Ansatz A) und der Replikate 4, 5 und 6 (Ansatz B).

Aus den oben identifizierten Proteinen wurden jene als unterschiedlich exprimiert eingestuft, die einen Regulationswert von $1,5 \geq 1 \geq 0,66$ aufwiesen. Ein weiteres Kriterium war, dass der Regulationsfaktor dieser Proteine eine relative Standardabweichung (CV) von $\leq 30\%$ aufweisen sollte.

In Tabelle 3-2 ist die Anzahl der als reguliert eingestuft Proteine je Ansatz, technischem Replikat und Patient zusammengestellt. Die Anzahl der regulierten Proteine war innerhalb eines Patienten in den 3 Replikaten nahezu identisch, unterschied sich jedoch deutlich im Vergleich der vier untersuchten Patienten.

Ansatz A Replikat	Patient P 117 Regulation: ICPL 4/0			Patient P 131 Regulation: ICPL 10/6		
	Summe	$\geq 1,5$	$\leq 0,66$	Summe	$\geq 1,5$	$\leq 0,66$
1	25	9	16	7	3	4
2	20	4	16	7	3	4
3	21	7	14	6	3	3

Ansatz B Replikat	Patient P 133 Regulation: ICPL 4/0			Patient P 55 Regulation: ICPL 10/6		
	Summe	$\geq 1,5$	$\leq 0,66$	Summe	$\geq 1,5$	$\leq 0,66$
4	66	5	61	39	20	19
5	71	7	64	40	22	18
6	75	8	67	41	21	20

Tabelle 3-2: Anzahl regulierter Proteine in Ansatz A und Ansatz B. Zur Bestimmung der Regulationsfaktoren wurden die ICPL-Verhältnisse 4/0 und 10/6 (jeweils Tumor zu normal) verwendet.

Dabei konnte allein Lumican im Probenmaterial aller vier Patienten mit einer unterschiedlichen Expression im Vergleich von Tumor zu normalem Probenmaterial, identifiziert werden. Lumican war dabei im Proteom von tumorösem Nebennierengewebe (Herunterregulierung $\leq 0,10$) deutlich geringer exprimiert im Vergleich zu normalem Nebennierengewebe (siehe Anhang/CD: Conn-Syndrom_ Gewebe_ ICPL-Markierung).

Im Probenmaterial dreier Patienten wurden die folgenden Proteine identifiziert: Epoxide Hydrolyse 1 und Adrenodoxin Mitochondrial Precursor. Beide Proteine sind in krankem Nebennierengewebe hochreguliert (Regulationsfaktor $\geq 2,0$). Im Probenmaterial von Patient P 55 (Ansatz B; Verhältnis ICPL₄ zu ICPL₀) konnten diese Proteine zwar ebenfalls identifiziert werden, jedoch zeigten sie keine krankheitsbedingte Veränderung der Expressionsrate (Regulationsfaktor 1) (siehe Anhang/CD: Conn-Syndrom_ Gewebe_ ICPL-Markierung).

Des Weiteren wurden nachfolgende Proteine im Probenmaterial von nur einem oder zwei Patienten mit einem Regulationsfaktor von $2,0 \geq 1 \geq 0,5$ identifiziert:

Apolipoprotein A-I, Cathepsin D, Mitochondrien Aldehyde Dehydrogenase, Mitochondrien Stress-70 Protein, Mitochondrien Cytochrome C Oxidase Polypeptide Va, Mitochondrien 10 kDa Heat Shock Protein, Mitochondrien Isoform Heart of ATP Synthase gamma chain, Mitochondrien ATP Synthase Subunit Alpha und Mitochondrien 60 kDa Heat Shock Protein. Außer dem Protein Mitochondrien Malate Dehydrogenase zeigen alle weiteren Proteine eine Herunterregulierung im Probenmaterial aus tumorösem Nebennierengewebe (Verhältnis ICPL_4 zu ICPL_0). Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Proteine, die zur Energiegewinnung bzw. Energiebereitstellung in den Mitochondrien bereitgestellt werden (siehe Anhang/CD: Conn-Syndrom_ Gewebe_ ICPL-Markierung).

3.1.2 Proteomanalyse von Nebennierenvenenplasma

Zusätzlich zu den Gewebeproben (Abschnitt 3.1.1), wurden Plasmaproben von Patienten mit Conn-Syndrom analysiert. Dafür wurde sowohl Gesamtplasma als auch von hoch- und median-abundanten Plasmaproteinen mittels Affinitätschromatographie depletiertes Plasma analysiert. Für die Analytik wurde die ICPL-Technologie und 2D-DIGE-Methode verwendet. Die Proteomanalyse erfolgte mit Nebennierenvenenplasma zweier Patienten mit Conn-Syndrom. Dafür wurde das Blut durch Katheterisierung („Adrenal vein sampling“, AVS) der linken (z.B. adenomatösen) und rechten (z.B. normalen) Nebennierenvene entnommen und zu EDTA-Plasma aufgearbeitet. Verglichen wurde jeweils das Proteom des Plasmas aus linker und rechter Nebennierenvene des gleichen Patienten.

3.1.2.1 2D-DIGE-Analyse von nicht depletiertem Nebennierenvenenplasma

Hierfür wurde undepletiertes EDTA-Plasma zweier Patienten mit Conn-Syndrom verwendet. Das Probenmaterial von Patient P 200903 stammte aus den Nebennierenvenen mit rechtseitigem Nebennierenadenom und linksseitiger normaler Nebenniere. Wohingegen das Probenmaterial des Patienten P 200704 aus den Nebennierenvenen mit linksseitigem Nebennierenadenom und rechtsseitiger normaler Nebenniere stammte. Das EDTA-Plasma wurde für die 2D-DIGE-Analyse 1:10 mit DIGE-Lysis-Puffer verdünnt (Abschnitt 2.3.1.5). Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden je 50 µg der Proteine aus dem Plasma der adenomatösen Nebenniere mit Cy3 markiert und je 50 µg der Proteine aus dem Plasma der gesunden Nebenniere mit Cy5 markiert. Für den internen Standard wurden Aliquots aller

Proben entnommen, vereint und mit Cy2TM markiert. Zusätzlich zu diesem DIGE-Markierungsschema wurden auch DIGE-Swap-Gele angefertigt, um einen technischen Fehler während der Markierung durch unterschiedliche Reaktivität der Farbstoffe auszuschließen (siehe Markierungsschema: Tabelle 3-3).

Rohplasma Probe von	Cy2 TM (interner Standard)	Cy3	Cy5
P 200903	Pool	T_ Rechtseitige AVS	N_ Linkseitige AVS
DIGE-Swap von P 200903	Pool	N_ Linkseitige AVS	T_ Rechtseitige AVS
P 200704	Pool	T_ Linkseitige AVS	N_ Rechtseitige AVS
DIGE-Swap von P 200704	Pool	N_ Rechtseitige AVS	T_ Linkseitige AVS

Tabelle 3-3: DIGE-Markierungsschema von undepletiertem Plasma (Rohplasma), entnommen aus den Nebennierenvenen der adenomatösen (T) bzw. normalen (N) Nebenniere von Patienten mit Conn-Syndrom.

Die Trennung der Proteine erfolgte mithilfe von 24 cm langen „Immobiline Dry Strips“, pH 3–10 NL, auf dem Agilent „3100 OFFGEL Fractionator“ nach ihrem isoelektrischen Punkt. (Abschnitt 2.3.1.5 ff). Die darauf folgende 2D-PAGE erfolgte mit selbst hergestellten 12%igen Polyacrylamid-Gelen. Die Detektion der Cy2TM, Cy3- und Cy5-markierten Proteine erfolgte über den Typhoon 9410 Fluoreszenzscanner. Ausgewertet wurden die drei „Images“ mit der Software Progenesis SameSpots.

Für die Identifizierung von ausgewählten Proteinspots wurden analytische oder/und zusätzlich angefertigte präparative Gele (Probenmenge 500 µg; Abschnitt 2.3.1.5.1) mit der Silberfärbung nach Shevchenko nachgefärbt (Abschnitt 2.3.1.6.2). Danach wurden die entsprechenden Proteinspots manuell oder mithilfe eines Roboters ausgestanzt und jeder Proteinspot separat in In-Gel-Verdaupuffer aufgenommen (Abschnitt 2.5.2.1.2). Dann wurden die Proteine mit Trypsin enzymatisch zu Peptiden gespalten, aus dem Gel extrahiert, mit MALDI-MS (Abschnitt 2.5.2.2) analysiert und mithilfe der Software Mascot Distiller, gefolgt von Mascot Daemon (Abschnitt 2.5.2.2) identifiziert.

3.1.2.1.1 Detektion und Identifizierung von Proteinen aus nicht depletiertem Plasma

Die Analyse der Gelscans (2D-DIGE und 2D-DIGE-Dye-Swap, siehe Markierungsschema Abschnitt 3.1.2.1) erfolgte mit der Software Progenesis SameSpots (Abschnitt 2.3.1.5.3). Hierbei umfasst der erste Analyseschritt die Detektion der Proteinspots, die in allen Gelen als interner Standard (Cy2TM) vertreten sind. Es wurden die Spotintensitäten aller Proteinspots in allen vier Cy2TM-Graustufenbildern (insgesamt wurden vier Gele analysiert) ermittelt, die

Proteinspotintensitäten normalisiert und in Form eines Mastergels zusammengefasst. Die Intensitäten sich entsprechender Spots der Cy3- und Cy5-markierten Proteine aus allen vier Gelen wurden dazu ins Verhältnis gesetzt (insgesamt 8 Dye-Graustufenabbildungen).

Dabei konnten in nicht depletiertem Plasma nur 189 Proteinspots in allen Graustufenbildern detektiert und die Verhältnisse der Spotintensitäten der Cy3- und Cy5-markierten Proteine ermittelt werden (Proteine aus adenomatösem Proteomzustand zu normalem Proteomzustand bei Dye-Swap: Cy5- zu Cy3-Proteine aus normalem Proteomzustand zu adenomatösem Proteomzustand). Signale, die nahe den Hintergrundwerten detektiert wurden, zu klein (Staub oder Flecken) waren, sowie Verschmierungen an den Rändern der Gele wurden manuell entfernt. Betrachtet man Proteine nur dann als unterschiedlich reguliert, wenn die Regulationsfaktoren $2,0 \geq 0 \geq 0,5$ sind und $p \leq 0,05$ ist, so erfüllt keiner der Proteinspots diese Kriterien (Abbildung 16). Auch der Einsatz der doppelten Menge an Probenmaterial zeigte keine unterschiedliche Proteinregulierung zwischen Proteinen aus adenomatösem Zustand und Proteinen aus gesundem Zustand (Daten nicht gezeigt).

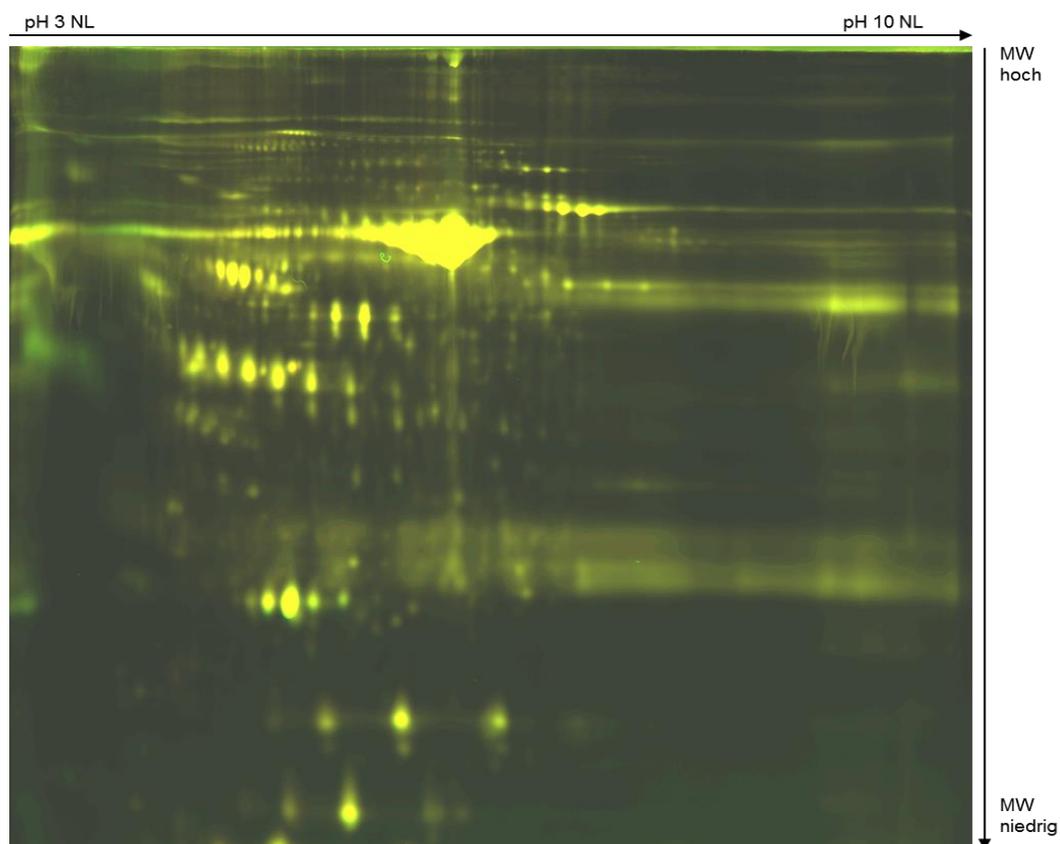


Abbildung 16: DIGE-Gel von undepletierten Plasmaproben (Patient P 200903), entnommen aus adenomatöser (Cy3 rot) und normaler Nebenniere (Cy5 grün). Für den internen Standard wurden aus allen Proben gleiche Mengen verwendet, vereint und mit Cy2TM (gelb) markiert.

3.1.2.2 ICPL-Analyse von depletiertem Nebennierenvenenplasma

Für die Proteomanalyse mittels ICPL wurde jeweils 100 µl adenomatöses und normales EDTA-Plasma zuerst mit der Seppro IgY14-Säule und dann mit der SuperMix-Säule depletiert (Abschnitt 2.2.1). Das Probenmaterial stammte aus den Nebennierenvenen eines Patienten (P 200903) mit rechtseitigem Nebennierenadenom (rechts krank) und linksseitiger normaler Nebenniere (links gesund). Nach der Depletion wurden die depletierten Plasmaproben auf 100 µl Volumen ankonzentriert und ihre Proteinkonzentrationen ermittelt. Für die ICPL-Analyse wurden dann die Proben in ICPL-Probenpuffer aufgearbeitet (Abschnitt 2.4 ff). Das jeweilige depletierte Plasmaproteom wurde mit den entsprechenden ICPL-Reagenzien markiert. Mit der ICPL-Markierung können vier verschiedene proteomische Stadien in einem Experiment miteinander verglichen werden. Da in diesem Fall das Plasmaproteom von einem Patienten analysiert wurde, wurde das ICPL-Experiment in Form eines technischen Replikats aufgebaut. Hierfür wurde adenomatöses Probenmaterial mit ICPL_0 und ICPL_10 markiert und gesundes Probenmaterial mit ICPL_4 und ICPL_6 (Tabelle 3-4). Für die Identifizierung von unterschiedlich exprimierten Proteinen sollten die einzelnen ICPL-Duplex-Daten (ICPL_4 zu ICPL_0 und ICPL_6 zu ICPL_10) miteinander verglichen werden.

Probe	ICPL_0	ICPL_4	ICPL_6	ICPL_10
P 200903	T_ Rechtseitige AVS	N_ Linkseitige AVS	N_ Linkseitige AVS	T_ Rechtseitige AVS

Tabelle 3-4: ICPL-Markierungsschema von depletiertem Nebennierenvenenplasma, entnommen aus den Nebennierenvenen der adenomatösen (T) bzw. normalen (N) Nebenniere eines Patienten (P 200903) mit Conn-Syndrom.

Die vier Proben wurden nach der ICPL-Markierung vereinigt und mit Aceton gefällt. Danach wurde die Probe in 1 X OFFGEL-Rehydrier-Puffer aufgenommen (Abschnitt 2.3.1.3). Um die Komplexität der Probe zu reduzieren, wurde mithilfe der OFFGEL-Methode das depletierte Plasmaproteom entsprechend dem isoelektrischen Punkt der Proteine (Trennbereich pH 3,5–4,5) in 24 Fraktionen getrennt. Danach wurde die Flüssigkeit aus den 24 OFFGEL-Trögen entnommen und in 10 ml Falcon-Röhrchen überführt. Jede Fraktion wurde mit Aceton gefällt und das Pellet in In-Solution-Verdaupuffer aufgenommen (Abschnitt 2.5.2.1.3). Danach wurden die Proteine der jeweiligen Fraktionen enzymatisch zuerst mit Glu-C und dann mit Trypsin (Doppelverdau) in Peptide gespalten. Jede der 24 Proben wurde nun mit LC-MS/MS (LTQ-Orbitrap; Thermo Fisher Scientific, Schwerte) analysiert (Abschnitt 2.5.2.3). Die

Quantifizierung und die darauf folgende Identifizierung der Proteine erfolgte mit der Software ICPL-ESIQuant (Abschnitt 2.4.1).

3.1.2.2.1 Quantifizierung und Identifizierung der ICPL-markierten Plasmaproteine

Als identifiziert und quantifiziert wurden Proteine akzeptiert, wenn ihnen mindestens 2 Quadruplex-Signaturen zugeordnet werden konnten. In der Summe konnten in allen 24 Fraktionen zusammen 1396 Proteinspezies identifiziert werden. Da jedoch viele der Proteine in mehreren Fraktionen gefunden wurden, reduziert sich diese Zahl auf 417. Dabei wurden Proteine, die in nebeneinander liegenden Fraktionen gefunden wurden, als ein Protein gewertet. Wurden Proteine in mehreren Fraktionen gefunden, aber in 2 dazwischen liegenden nicht, galten sie als eigenständige Proteinspezies.

Innerhalb der identifizierten Proteine wurden jene als unterschiedlich exprimiert eingestuft, die einen Regulationswert von $2,0 \geq 1 \geq 0,5$ mit mindestens zwei Quadruplets aufwiesen. Ein weiteres Kriterium war, dass die Proteine eine relative Standardabweichung (CV) von $\leq 30\%$ aufweisen, um eine signifikante Beurteilung zu ermöglichen.

Nach diesen Beurteilungskriterien konnten insgesamt 306 Proteine (nicht redundant) identifiziert und quantifiziert werden und die entsprechenden Protein-IDs aus den IPI-Datenbanken zugeordnet werden. In Tabelle 3-5 ist die Anzahl der identifizierten Proteine jeder einzelnen Fraktion angegeben. Es wurde festgestellt, dass viele der Proteine in mehreren, manche in nahezu allen 24 Fraktionen identifiziert werden konnten (siehe Anhang/CD: Conn-Syndrom_ Plasma_ OFFGEL- (24) Fraktionen_ ICPL-Markierung).

OFFGEL-Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Proteine	113	58	80	95	103	94	99	89	89	83	87	63	63	48	33	28	24	11	9	48	25	30	20	4

Tabelle 3-5: Anzahl von Proteinen, die in jeder der 24 OFFGEL-Fractionen identifiziert wurden.

Wenn man zugrunde legt, dass Proteine dann als unterschiedlich exprimiert gelten im Vergleich von normal zu tumorös, wenn die Regulationsfaktoren, die sich aus den einzelnen Isotopologen ergeben, $2,0 \geq 1 \geq 0,5$ entsprechen, konnten insgesamt 8 Proteine diese Kriterien erfüllen (siehe Anhang/CD: Conn-Syndrome_ Plasma_ ICPL-Markierung). Diese acht Proteine enthielten auch Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein E, Isoform 1 of Fibrinogen alpha

chain, Apolipoprotein B-100 und Fibrinogen beta chain. Diese gehören zu den Proteinen, die während der Affinitätschromatographie (Seppro IgY14- und SuperMix-Säule) von den übrigen Plasmaproteinen abgetrennt werden sollten. Dieser Befund konnte in einer Arbeit von Shi bestätigt werden (Shi et al., 2012). Somit können diese Proteine höchstwahrscheinlich nicht als relevante Proteinsignaturen betrachtet werden. Die verbliebenen drei Proteine (Plasma protease C1 inhibitor, Filamin A alpha isoform 1 und Platelet basic Protein) sind Proteine unterschiedlichster Herkunft. Sie könnten während der Probengewinnung mittels AVS auch durch Verletzung der Nebennierenvenenwand ins Blut gelangt sein.

3.1.2.3 2D-DIGE-Analyse von depletiertem Nebennierenvenenplasma

Hierfür wurde EDTA-Plasma der gleichen Patienten (P 200903 und P 200704; siehe Abschnitt 3.1.2.1) mit Conn-Syndrom verwendet. Mittels Affinitätschromatographie (zuerst mit der Seppro IgY14-Säule und dann mit der SuperMix-Säule) wurden hoch- und median-abundante Proteine des Plasmas der jeweiligen Patientenproben entfernt (Abschnitt 2.2.1 ff). Danach wurden die verbliebenen Proteine auf 100 µl ankonzentriert und mit Aceton gefällt. Für die 2D-DIGE-Analyse wurden die Pellets der entsprechenden Patientenproben in 45 µl DIGE-Lysis-Puffer aufgenommen (Abschnitt 2.3.1.5). Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden je 50 µg Protein aus dem Plasma der adenomatösen Nebenniere mit Cy3 markiert und je 50 µg Protein aus dem Plasma der gesunden Nebenniere mit Cy5 markiert. Für den internen Standard wurde aus allen vier Proben die gleiche Proteinmenge entnommen, vereint und mit Cy2TM markiert. Auch hier wurden neben den DIGE-Gelen auch DIGE-Swap-Gele angefertigt (Tabelle 3-6).

Depletierte Probe von	Cy2 TM (interner Standard)	Cy3	Cy5
P 200903	Pool	T_ Rechtseitige AVS	N_ Linkseitige AVS
DIGE-Swap von P 200903	Pool	N_ Linkseitige AVS	T_ Rechtseitige AVS
P 200704	Pool	T_ Linkseitige AVS	N_ Rechtseitige AVS
DIGE-Swap von P 200704	Pool	N_ Rechtseitige AVS	T_ Linkseitige AVS

Tabelle 3-6: DIGE-Markierungsschema von depletiertem Plasma, entnommen aus den Nebennierenvenen der adenomatösen (T) und der normalen (N) Nebenniere von Patienten mit Conn-Syndrom.

Nach der „minimalen“ 2D-DIGE-Markierung der Lysine wurden die Proben für die 2D-GE vorbereitet (Abschnitt 2.3.1.5 ff). Hierfür wurden die einzelnen Proben (Cy2TM, Cy3 und Cy5) für die entsprechenden Gele vereint und in Rehydrier-Lösung aufgenommen. Die Trennung

der Proteine erfolgte mithilfe von 24 cm langen „Immobiline Dry Strips“, pH 3–10 NL, auf dem Agilent „3100 OFFGEL Fractionator“ nach ihrem isoelektrischen Punkt. Die darauf folgende 2D-PAGE erfolgte mit selbst hergestellten 12%igen Polyacrylamid Gelen. Die Detektion der Cy2TM, Cy3- und Cy5-markierten Proteine erfolgte über den Typhoon 9410 Fluoreszenzscanner. Ausgewertet wurden die drei „Images“ mit der Software Progenesis SameSpots (Abschnitt 2.3.1.5.3).

Für die Identifizierung von ausgewählten Proteinspots wurden analytische oder/und zusätzlich angefertigte präparative Gele (Probenmenge 500 µg; Abschnitt 2.3.1.5.1) mit der Silberfärbung nach Shevchenko nachgefärbt (Abschnitt 2.3.1.6.2). Danach wurden die entsprechenden Proteinspots manuell oder mithilfe eines Roboters ausgestanzt und jeder Proteinspot separat in In-Gel-Verdaupuffer aufgenommen (Abschnitt 2.5.2.1.2). Dann wurden die Proteine mit Trypsin enzymatisch zu Peptiden gespalten, aus dem Gel extrahiert, mit MALDI-MS (Abschnitt 2.5.2.2) analysiert und mithilfe der Software Mascot Distiller, gefolgt von Mascot Daemon (Abschnitt 2.5.2.2) identifiziert.

3.1.2.3.1 Detektion und Identifizierung unterschiedlich exprimierter Plasmaproteine

Die Analyse der Gelscans (2D-DIGE und 2D-DIGE-Dye-Swap, siehe Markierungsschema in Abschnitt 3.1.2.3) erfolgte mit der Software Progenesis SameSpots (Abschnitt 2.3.1.5.3). Hierbei umfasst der erste Analyseschritt die Detektion der Proteinspots, die in allen Gelen als interner Standard (Cy2TM) vertreten sind. Es wurden die Spotintensitäten aller Proteinspots in allen vier Cy2TM-Graustufenbildern (insgesamt wurden vier Gele analysiert) ermittelt, die Proteinspotintensitäten normalisiert und in Form eines Mastergels zusammengefasst. Die Intensitäten sich entsprechender Spots der Cy3- und Cy5-markierten Proteine aus allen vier Gelen wurden dazu ins Verhältnis gesetzt (insgesamt 8 Dye-Graustufenabbildungen).

Es wurden 550 Proteinspots in allen Graustufenbildern detektiert und die Verhältnisse der Spotintensitäten der Cy3- und Cy5-markierten Proteine ermittelt (Proteine aus adenomatösem Proteomzustand zu normalem Proteomzustand bei Dye-Swap: Cy5- zu Cy3-Proteine aus normalem Proteomzustand zu adenomatösem Proteomzustand). Signale, die nahe den Hintergrundwerten detektiert wurden, zu klein (Staub oder Flecken) waren, sowie Verschmierungen an den Rändern der Gele wurden manuell entfernt. Es wurden Proteinspots dann als unterschiedlich exprimiert (Vergleich von normal zu tumorös) gewertet, wenn die Regulationsfaktoren nachfolgende Bedingungen erfüllten: $2,0 \geq 0 \geq 0,5$ und $p \leq 0,05$.

Insgesamt konnten 25 Proteinspots diese Kriterien erfüllen (Abbildung 17). Diese Proteinspots wurden aus den analytischen oder präparativen Gelen ausgestochen, die Proteine in den Gelspots proteolytisch verdaut und deren Peptide schließlich mit MALDI-TOF/TOF mittels PMF analysiert und wie in Abschnitt 2.5.2.2 beschrieben ausgewertet. Proteinspots, die als reguliert identifiziert werden konnten, sind in Abbildung 18 gekennzeichnet. Dabei handelt es sich um die folgenden 9 Proteine: Albumin, Gelsolin, Ceruloplasmin, Prothrombin, Fetuin A, Vitamin D-bindendes Protein, Serum-Amyloid-P Komponente, Transthyretin und Aktin. Abgesehen von Aktin wurden ausschließlich Proteine identifiziert, die während der Affinitätschromatographie (Seppro IgY14- und SuperMix-Säule) von den übrigen Plasmaproteinen hätten abgetrennt werden sollen. Ein Vergleich der Ergebnisse mit dem Datenblatt, in der die angereicherten Proteine der Säulen-Eluate dokumentiert sind, bestätigte diese Problematik (Shi et al., 2012). Es ist anzunehmen, dass es sich bei diesen Proteinen höchstwahrscheinlich um Artefakte handelt, hervorgerufen durch die schlechte Reproduzierbarkeit der Depletion.

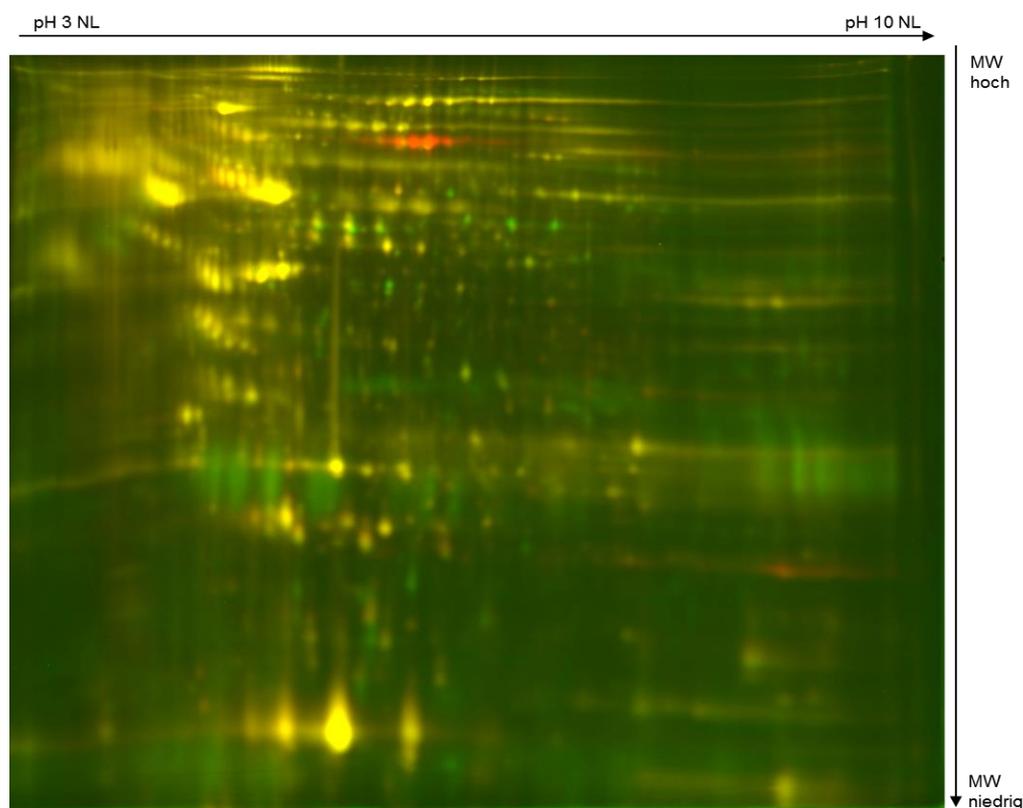


Abbildung 17: DIGE-Gel von depletierten Plasmaproben (Patient P 200903), entnommen aus adenomatöser (Cy3 rot) und normaler Nebenniere (Cy5 grün). Für den internen Standard wurden aus allen Proben gleiche Mengen verwendet, vereint und mit Cy2TM (gelb) markiert.

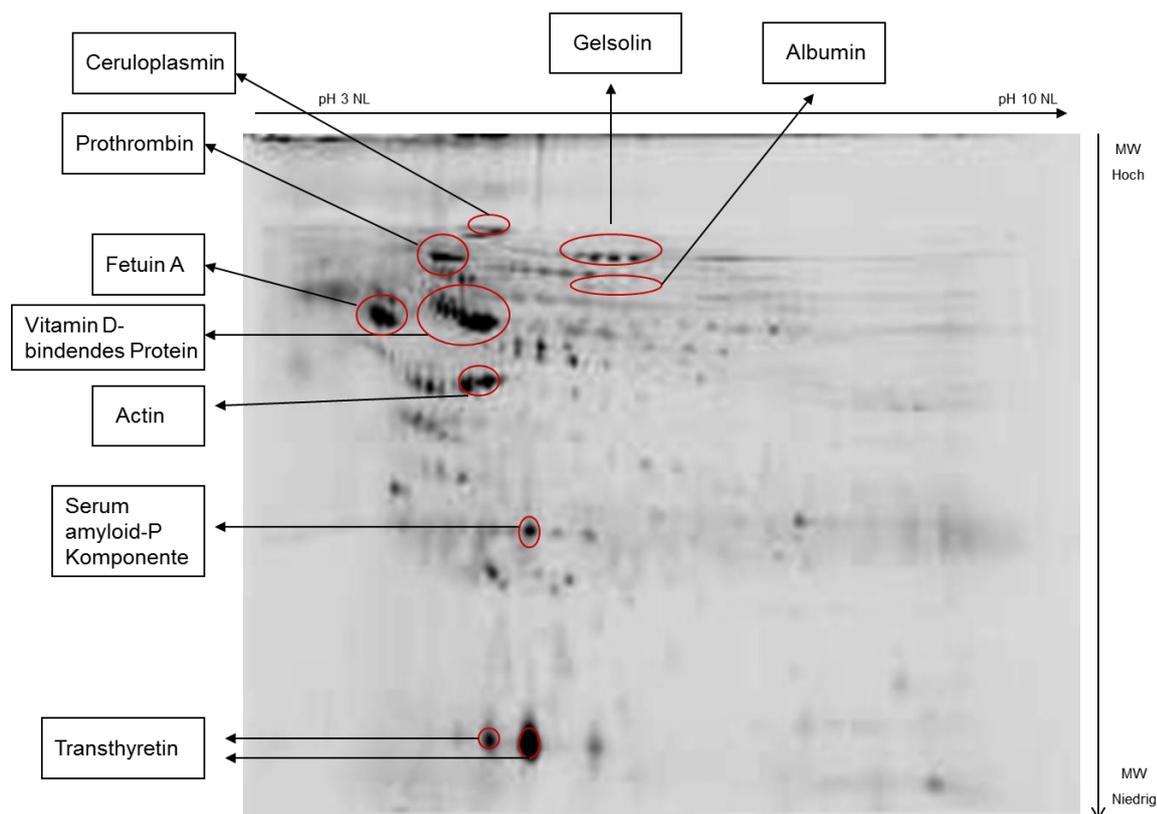


Abbildung 18: Analytisches 2D-PAGE von Nebennierenvenenplasma von Patient P 200903. Rot gekennzeichnet sind die Proteinspots, die mittels MALDI-MS identifiziert wurden.

3.2 Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Depletion

Ein Vergleich der Ergebnisse der Proteomanalysen von depletiertem und nicht depletiertem Plasma legte die Vermutung nahe, dass die Proteinanreicherung durch Immunaффinitätssäulen nur schwer reproduzierbar durchzuführen ist. Es konnten in depletiertem Plasma nur solche Proteine als reguliert identifiziert werden, die durch Immunaффinitätschromatographie angereichert worden waren.

Die Reproduzierbarkeit der Depletion von hoch- und median-abundanten Plasmaproteinen mit der Seppro IgY14- und der SuperMix-Säule sollte deshalb nochmals überprüft werden. Für diesen Test wurde EDTA-Plasma eines gesunden Probanden vorbereitet und zur Analyse verwendet. Das Plasma wurden in n = 12 Aliquots aufgeteilt und nacheinander unter identischen Bedingungen von hoch-abundanten Proteinen depletiert. Für die Proteomanalyse wurde die 2D-DIGE („Minimal Labeling“-)Methode verwendet.

3.2.1 2D-DIGE-Analyse von depletierten Plasmaproteinen

Für den Test wurde Blut eines Probanden mit einem „BD Vacutainer PPT EDTA“ (REF 362788, Becton Dickinson, Heidelberg) gesammelt, aufgearbeitet und daraus das EDTA-Plasma entnommen. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das EDTA-Plasma in 200 μ l-Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Jedes der 12 Replikate wurde nacheinander zuerst über die Seppro IgY14-Säule und dann über die SuperMix-Säule chromatographiert (Abschnitt 2.2.1 ff). Die zwölf Eluate der Seppro IgY14-Säule, der SuperMix-Säule und 5% der Probenmenge des Durchlaufs (depletiertes Plasma) der Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 19). Dafür wurden die Proben auf je 20 μ l (Eluat der SuperMix-Säule), 50 μ l (Eluat der Seppro IgY14-Säule) und 100 μ l (Durchlauf) Probenvolumen ankonzentriert. Nach der Ermittlung der Proteinkonzentrationen wurden die jeweiligen Proben 1:1 mit reduzierendem Auftragspuffer versetzt, erhitzt und die Proteine mit käuflich erworbenen 8–16%igen Gradienten-Polyacrylamid-Mini-Gelen (10 X 10 X 0,01 cm) von Serva Elektrophoresis (Heidelberg) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Abschnitt 2.3.1.1). Visualisiert wurden die Proteine in den SDS-Gelen mittels Silberfärbung nach Heukeshoven (Abschnitt 2.3.1.6.2).

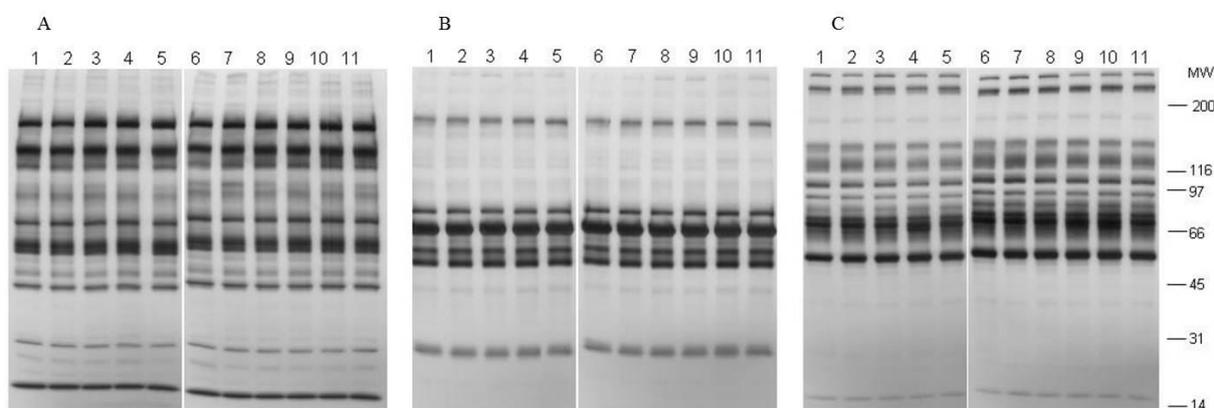


Abbildung 19: SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen von 11 Depletionsreplikaten: A) Durchlauf, B) Eluate aus Seppro IgY14-Säule und C) Eluate aus SuperMix-Säule. Das 12. Depletionsreplikate ist ein Ausreißer und wurde daher aus der Abbildung und später aus der 2D-DIGE-Auswertung entfernt.

Für die 2D-DIGE-Analyse (Abschnitt 2.3.1.5 ff) wurden die Proben, nach der Ankonzentrierung des depletierten Plasmas auf ein Volumen von ca. 100 μ l, mit Aceton gefällt. Die Pellets der depletierten Proben wurden jeweils in 45 μ l DIGE-Lysis-Puffer aufgenommen und erneut die Proteinkonzentrationen ermittelt. Diese Proben wurden anschließend für sechs 2D-DIGE-Gele und sechs 2D-DIGE-Swap-Gele verwendet (insgesamt

zwölf Gele). Das Markierungsschema ist in Tabelle 3-7 dargestellt. Für jedes Gel wurden je 50 µg Protein einer depletierten Probe mit Cy3 markiert und 50 µg Protein der darauf folgenden depletierten Probe mit Cy5 markiert. Dies erfolgte analog für die weiteren elf Gele. Für den internen Standard wurden aus allen Proben die gleiche Proteinmengen entnommen, gepoolt und mit Cy2TM markiert.

Gel	Cy2 TM	Cy3	Cy5
1	Alle Proben	Probe C	Probe D
2 (DIGE-Swap von 1)	Alle Proben	Probe D	Probe C
3	Alle Proben	Probe E	Probe F
4 (DIGE-Swap von 3)	Alle Proben	Probe F	Probe E
5	Alle Proben	Probe G	Probe H
6 (DIGE-Swap von 5)	Alle Proben	Probe H	Probe G
7	Alle Proben	Probe I	Probe J
8 (DIGE-Swap von 7)	Alle Proben	Probe J	Probe I
9	Alle Proben	Probe M	Probe N
10 (DIGE-Swap von 9)	Alle Proben	Probe N	Probe M
11	Alle Proben	Probe O	Probe P
12 (DIGE-Swap von 11)	Alle Proben	Probe P	Probe O

Tabelle 3-7: 2D-DIGE-Markierungsschema der depletierten Plasmaproben.

Für die 2D-Gelelektrophorese der gelabelten Proteine wurden die einzelnen Proben (Cy2TM, Cy3 und Cy5) dem Schema entsprechend vereinigt, in Rehydrier-Lösung aufgenommen und mithilfe von 24 cm langen „Immobiline Dry Strips“ (pH 3–10 NL) auf dem Agilent „3100 OFFGEL Fractionator“ nach dem isoelektrischen Punkt der Proteine fokussiert. Die darauf folgende 2D-PAGE erfolgte mit dem „High Performance Electrophoresis“ (HPE)-System mittels 12,5%igen horizontalen HPE-Polyacrylamid-Gelen. Die fluoreszenzgelabelten Proteine wurden, entsprechend den Wellenlängen bei denen die Farbstoffe angeregt werden (Cy2TM, Cy3 und Cy5), auf einem Ettan DIGE Fluoreszenz-„Imager“ detektiert (Abschnitt 2.3.1.5.2). Die Auswertung der Scans erfolgte mittels der Software Progenesis SameSpots (Abschnitt 2.3.1.5.3).

Aus den Scans der zwölf Cy2TM-gelabelten und mittels 2D-PAGE aufgetrennten Proteine wurde ein Mastergel erstellt. Die Intensitäten aller Spots (Cy3 und Cy5) wurden dann gegen die Intensitäten der entsprechenden Referenz-Spots des internen Standards normalisiert (Abbildung 20).

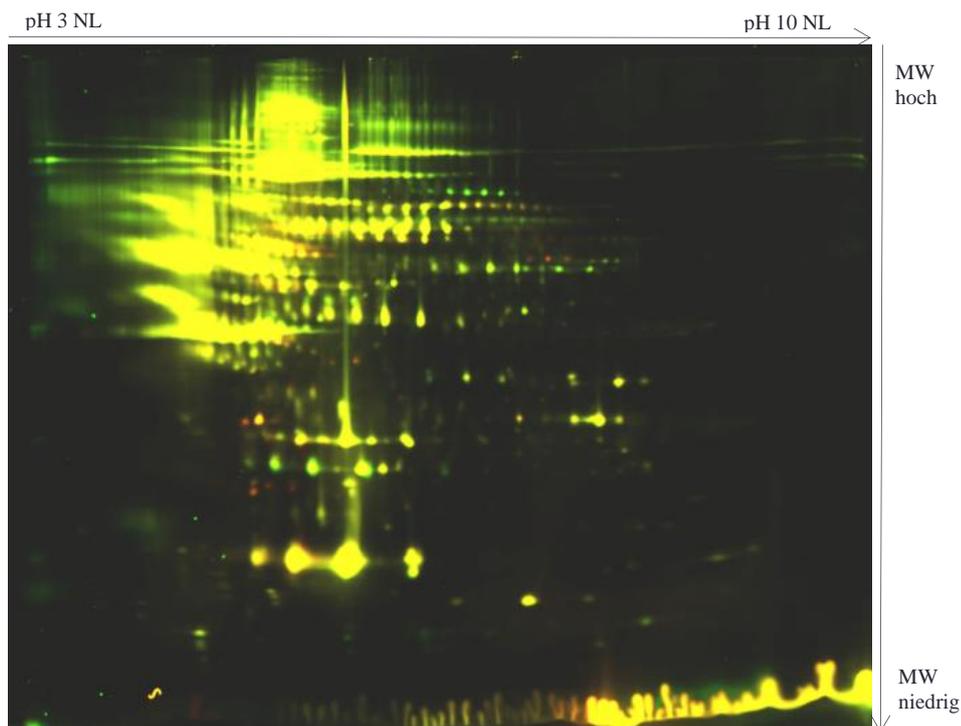


Abbildung 20: Beispiel für ein DIGE-Gel (Nr. 9). Plasmaproteine einer depletierten Probe wurden mit Cy3 (rot) markiert und Plasmaproteine der darauf folgenden depletierten Probe wurden mit Cy5 (grün) markiert. Für den internen Standard wurden aus allen Proben gleiche Mengen verwendet, vereint und mit Cy2TM (gelb) markiert.

Mit der Software Progenesis SameSpots wurden 492 Proteinspots in allen Graustufenbildern detektiert. Signale, die nahe den Hintergrundwerten detektiert wurden, zu klein (Staub oder Flecken) waren, sowie Verschmierungen an den Rändern der Gele wurden manuell entfernt. Nach manueller Korrektur wurden 272 Proteinspots für die statistische Auswertung herangezogen. Die Kriterien wurden so gewählt, dass nur Proteinspots verwendet wurden, die in allen Gelen zugeordnet werden konnten. Davon besaßen 172 Proteinspots einen Regulationsfaktor von $1,5 \geq 0 \geq 0,66$ (nicht reguliert) und 100 Proteinspots einen Regulationsfaktor von $2,0 \geq 0 \geq 0,5$ bei einem p-Wert kleiner 0,05 (reguliert).

Weiterhin wurde die relative Standardabweichung jedes Proteinspots zwischen den Gelreplikaten betrachtet. Die mittlere Standardabweichung der 272 Spots lag bei 14% (Abbildung 21). Des Weiteren war ersichtlich, dass 24 Proteinspots außerhalb des 95% Konfidenzintervalls lagen. Diese Proteine wiesen Regulationsschwankungen bis zu einem Faktor von 20 auf.

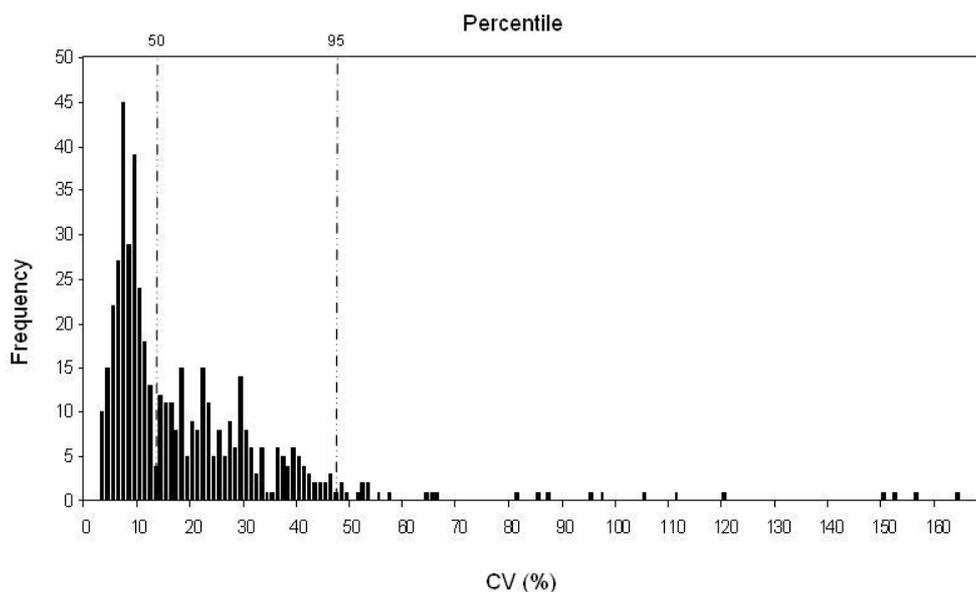


Abbildung 21: Relative Standardabweichung (CV %) jedes Proteinspots innerhalb der Gelreplikate. Im Histogramm ist die Verteilung der relativen Standardabweichung (CV %) von normalisierten Proteinspotvolumina aus 2D-DIGE-Gelen in einem 95% Konfidenzintervall dargestellt.

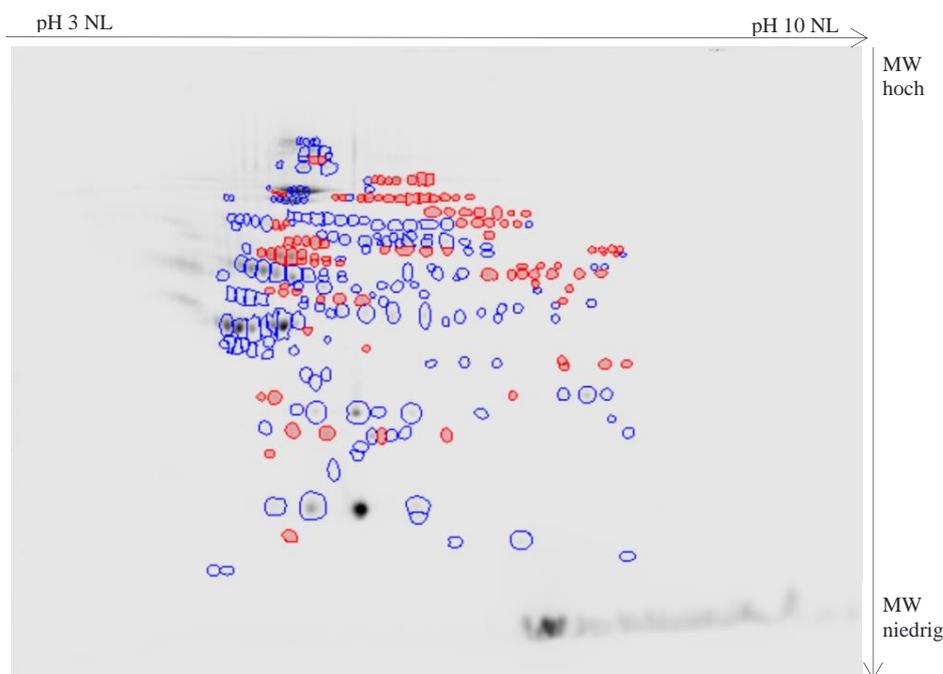


Abbildung 22: Zweidimensionale Auftrennung von 2D-DIGE-markierten Proteinen in einem pH 3–10 NL. Die detektierten 272 Proteinspots sind blau umrandet. Proteinspots mit statistisch signifikanten unterschiedlichen Volumina ($p \leq 0,05$ und einem Regulationsfaktor $2,0 \geq 0 \geq 0,5$) innerhalb der Replikate sind rot umrandet.

Differenziell exprimierte Proteine (Abbildung 22) wurden sowohl aus präparativen Gelen (500 µg Proteinmenge) als auch aus analytischen Gelen ausgestochen, die mit der HPE-Silberfärbung nachgefärbt worden waren (Abschnitt 2.3.1.6.2). Die nach enzymatischer Spaltung aus den Gelspots extrahierten Peptide wurden mittels MALDI-TOF/TOF und ESI-

MS/MS (LTQ-Orbitrap; Thermo Fisher Scientific, Schwerte) identifiziert. (Abschnitte 2.5.2.2 und 2.5.2.3). Meist handelt es sich um Proteine, die in „Perlenketten“ angeordnet sind. Diese Proteine, gleichen Molekulargewichts mit unterschiedlichem pI, liegen in verschiedenen Isoformen vor und weisen auch eine ähnliche Varianz in ihren Regulationsfaktoren auf.

SameSpots Nummer	Proteinname	Median CV
1470	Hepatocyte growth factor-like protein	44
706	Fibrinogen beta chain	32
1295	Zinc-alpha-2-glycoprotein	30
1539	Glutathione peroxidase 3	27
1506	Ceruloplasmin	26
346	Complement C2	24
712	Carboxypeptidase B2 precursor	24
1587	Fibrinogen gamma chain	23
1388	Eosinophil peroxidase	22
790	Fibrinogen alpha chain	21
762	Xaa-Pro dipetidase	21
1537	Alpha-2-macroglobulin	20
591	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	19
958	Serum amyloid P component	18
980	Apolipoprotein A-IV	18
975	Complement factor D	18
877	Clusterin	16
1585	Pigment epithelium derived factor	15
1505	Mannan-binding lectin serine protease	15
885	Complement C1R	14
1242	Insulin-like growth factor binding protein complex acid label chain	14
1103	Gelsolin	11

Tabelle 3-8: Liste von Proteinen, die nach der Depletion stark unterschiedliche Regulationsfaktoren aufwiesen.

Alle identifizierten Proteine (Tabelle 3-8) konnten jener Gruppe zugeordnet werden, die über Immunaффinitätschromatographie abgereichert worden waren.

Einige Proteinspots, die obige Kriterien erfüllen, konnten mittels PMF und ESI-MS/MS nicht identifiziert werden. Diese wurden über SameSpots durch Korrelationsanalyse gemäß dem log der normalisierten Spotvolumina über hierarchisches Clustering zugeordnet (Abbildung 23). Es wurden Korrelationswerte zwischen -1 und 1 für die Kalkulation der Entfernung des Proteinspots im hierarchischen Aufbau mit $D = 1 - C$ (D = Distanz, C = Korrelation zwischen dem hierarchischen Aufbau von Proteinspots) ermittelt. Bei einer Distanz von identifiziertem

und nicht identifiziertem Proteinspot $\leq 0,4$ wurde der nicht identifizierte Proteinspot mit einer Wahrscheinlichkeit von $\geq 80\%$ als zu dem hierarchischen Cluster gehörend eingestuft. Diese Proteinspots wurden im Datensatz entsprechend gekennzeichnet.

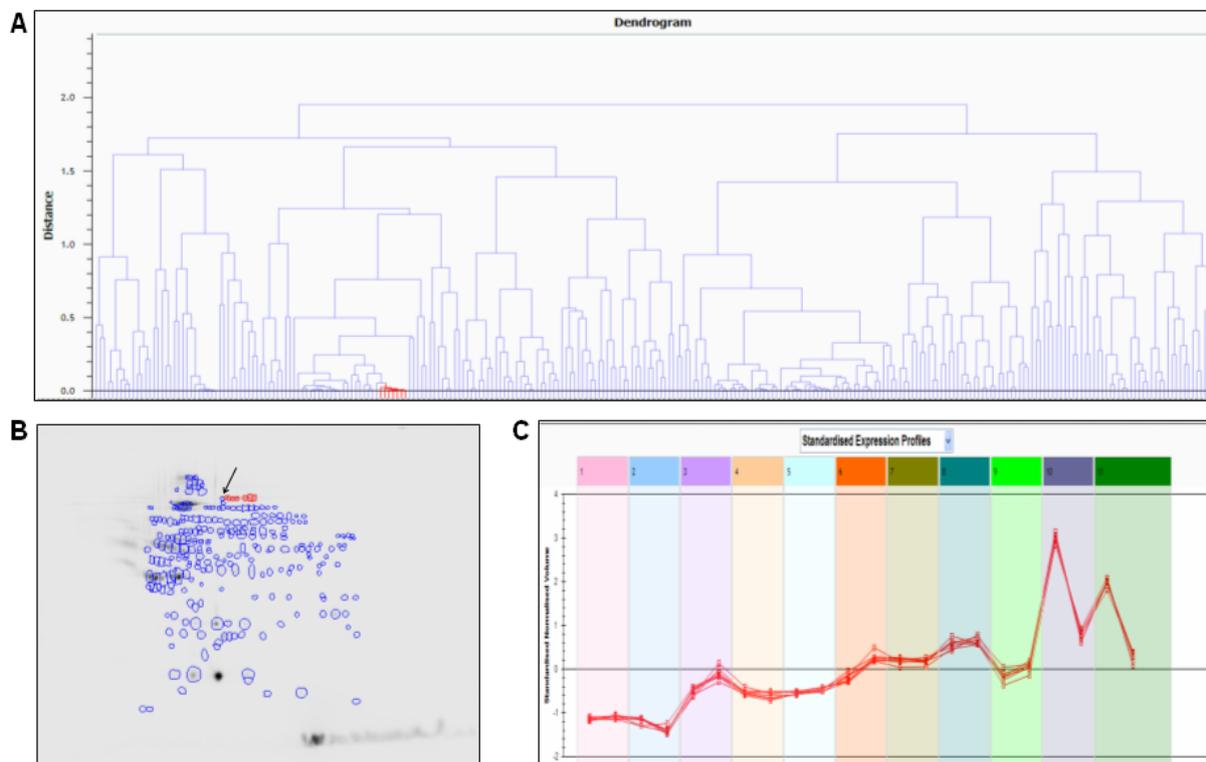


Abbildung 23: Hierarchisches Clustering zur Zuordnung nicht massenspektrometrisch identifizierter Spots: A) Hierarchischer Aufbau von identifizierten Proteinspots. B) 2D-DIGE-Mastergel mit blau umkreisten statistisch signifikanten 272 Proteinspots. In rot wurden die identifizierten Proteinspots einer Isoformenserie markiert. Der nicht identifizierte und wahrscheinlich zu den rot markierten Proteinspots dazugehörige Proteinspot wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet. C) Expressionsprofil der identifizierten (rot) Nachbarspots.

3.3 Modellsystem II: Rektumkarzinom

3.3.1 Proteomanalyse von Tumorgewebe aus Patienten mit Rektumkarzinom mittels ICPL

Von Prof. Dr. med. Roland S. Croner (Geschäftsführender Oberarzt, Chirurgische Klinik, Universitätsklinikum Erlangen) wurde biopsiertes Tumorgewebe von insgesamt 20 Patienten mit Rektumkarzinom (Stadium UICC II/III) zur Verfügung gestellt. Das Gewebe wurde nach der Entnahme in der Klinik in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Danach wurden die Patienten neoadjuvant (vor der Operation) mit

Radiochemotherapie (RCT) I oder II behandelt. 10 Patienten wurden mit RCT I (5-FU Irinotecan und 50,4 Gy) und weitere 10 Patienten mit RCT II (5-FU Oxaliplatin und 50,4 Gy) behandelt. Nach der Entfernung des Tumors wurde der Grad des Tumorrückganges, hervorgerufen durch die Therapie, an histopathologischem Gewebe durch einen Pathologen beurteilt. Die Tumore wurden nach schlechtem/mittelmäßigem Ansprechen auf die RCT I oder II und nach gutem Ansprechen auf die RCT I oder II beurteilt und in Responder (gutes Ansprechen) und Non-Responder (schlechtes/mittelmäßiges Ansprechen) in Gruppen eingeteilt (Tabelle 3-9). Das Probenmaterial der Biopsien beider Patientengruppen wurde mittels Proteomanalyse miteinander verglichen und Proteine identifiziert, die in ihrem Expressionsverhalten mit dem Ansprechen auf die Therapie korrelieren.

	RCT I	RCT II
schlechtes/mittelmäßiges Ansprechen	P 229	ICPL 3
schlechtes/mittelmäßiges Ansprechen	P 315	ICPL 17
schlechtes/mittelmäßiges Ansprechen	P 327	P 214
schlechtes/mittelmäßiges Ansprechen	P 331	P 288
schlechtes/mittelmäßiges Ansprechen	P 333	P 306
gutes Ansprechen	ICPL 5	ICPL 24
gutes Ansprechen	ICPL 16	ICPL 21
gutes Ansprechen	P 301	P 252
gutes Ansprechen	P 317	P 295
gutes Ansprechen	P 318	P 300

Tabelle 3-9: Einteilung der Patienten mit Rektumkarzinom UICC II/III, die auf die Behandlung mit RCT I oder II gut bzw. schlecht/mittelmäßig angesprochen haben.

Für die Proteomanalyse wurden 8–10 µm dicke Gewebeschnitte aus dem biopsierten Tumorgewebe der Patienten angefertigt (Abschnitt 2.2.2 ff). Nach der Zelltypfärbung mit Kresylviolet wurden durch „Laser Capture Microdissection“ (LCM) Tumorzellen aus dem Gewebe isoliert. Zur Solubilisierung der Proteine wurden die mikrodisektierten Zellareale in ICPL-Puffer solubilisiert (Abschnitt 2.4). Nach Bradford-Proteinbestimmung der Solubilisate der einzelnen Patienten wurden Aliquots jedes Patienten einer Gruppe vereinigt („Pool“). Die gepoolten Proben der Responder-Gruppe von RCT I wurden dann mit ICPL_0 und die gepoolten Proben der Non-Responder-Gruppe von RCT I mit ICPL_4 markiert (Tabelle 3-10). Entsprechend wurden die gepoolten Proben der Non-Responder-Gruppe von RCT II mit ICPL_6 und die gepoolten Proben der Responder-Gruppe von RCT II mit ICPL_10

markiert (Tabelle 3-10). Es wurden von jeder Analyse zwei technische Replikate durchgeführt.

ICPL_0	ICPL_4	ICPL_6	ICPL_10
Responder_ RCT I	Non-Responder_ RCT I	Non-Responder_ RCT II	Responder_ RCT II

Tabelle 3-10: ICPL-Markierungsschema der Proben von Patienten mit Rektumkarzinom, die auf RCT I oder II gut angesprochen (Responder) oder schlecht/mittelmäßig angesprochen (Non-Responder) haben.

Diese vier mit den jeweiligen ICPL-Reagenzien markierten Proben wurden nach der Markierung vereinigt. Da ausreichend Probenmaterial für die Proteomanalyse zur Verfügung stand, wurde das Probenmaterial sowohl direkt ohne weitere Vorfraktionierung als auch nach Vorfraktionierung mittels OFFGEL-Methode (Reduzierung der Probenkomplexität auf der Ebene der Proteine) analysiert.

Für die OFFGEL-Fraktionierung (Abschnitt 2.3.1.3) wurde der Hauptanteil des ICPL-Probenpools (95%, 150 µg Protein) mit Aceton gefällt und in 1 X OFFGEL-Rehydrier-Puffer aufgenommen. Um die Komplexität der Probe zu reduzieren, wurde mithilfe der OFFGEL-Methode das gesamte Proteingemisch in 24 Fraktionen, dem isoelektrischen Punkt der Proteine entsprechend, zwischen pH 3,5–4,5 fraktioniert. Danach wurde die Flüssigkeit aus den 24 OFFGEL-Trögen entnommen und separat gesammelt. Jede Fraktion wurde mit Aceton gefällt und in In-Solution-Verdaupuffer aufgenommen (Abschnitt 2.5.2.1.3). Danach wurden die Proteine der jeweiligen Fraktionen enzymatisch zuerst mit Glu-C und dann mit Trypsin (Doppelverdau) in Peptide gespalten. Dann wurde jede der 48 Proben (2 X 24 Fraktionen) mittels LC-MS/MS analysiert. Die ersten 24 LC-MS/MS-Analysen erfolgten mit einer LTQ-Orbitrap wohingegen die Replikate mit einer LTQ-Velos durchgeführt wurden (Abschnitt 2.5.2.3). Die Quantifizierung und Identifizierung der Proteine erfolgte mit der Software ICPL-ESIQuant (Abschnitt 2.4.1).

Für eine zweite Analysenvariante wurde 5% der Menge des ICPL-Probenpools (10 µg Protein) entnommen, mit Aceton gefällt und ebenso in In-Solution-Verdaupuffer aufgenommen. Die Proteine wurden auch hier enzymatisch zuerst mit Glu-C und dann mit Trypsin (Doppelverdau) in Peptide gespalten (Abschnitt 2.5.2.1.3). Es wurden ebenfalls zwei Replikate angefertigt. Danach wurde eines der beiden Peptidgemische mit der LTQ-Orbitrap und das andere Peptidgemisch mit einer LTQ-Velos analysiert (Abschnitt 2.5.2.3). Die Quantifizierung und Identifizierung der Proteine erfolgte ebenfalls mittels ICPL-ESIQuant (Abschnitt 2.4.1).

3.3.1.1 Quantifizierung und Identifizierung potenzieller Proteinsignaturen, aus OFFGEL-Fractionen und Gesamtproben, von RCT I und RCT II

Für die Auswertung der insgesamt 50 Einzelproben (2 X 24 OFFGEL-Fractionen und 2 X Gesamtprobe) wurde die ICPL-ESI*Quant* Software verwendet. Proteine galten dann als quantifiziert und identifiziert, wenn mindestens zwei Multiplets pro Protein und ein unique Peptid pro Protein zur Verfügung standen. Wurde das gleiche Protein in nebeneinander liegenden Fractionen identifiziert, so wurde es als eine einzige Proteinspezies betrachtet. Wurde es in mehreren Fractionen identifiziert, aber in zwei dazwischen liegenden nicht, so galt jedes der identifizierten Proteine als eigenständige Spezies bzw. Isoform. In der Summe konnten in allen 24 Fractionen der ersten OFFGEL-Fractionierung 3222 Proteinspezies detektiert werden (645 unique Proteinspezies). Da jedoch viele der Proteine in mehreren Fractionen gefunden wurden, reduziert sich diese Zahl auf 131. Im zweiten Replikat konnten in allen 24 Fractionen zusammen 3734 Proteinspezies detektiert werden (734 unique Proteinspezies). Auch hier wurden Proteine, die in mehreren Fractionen auftauchten, abgezogen, sodass 146 Proteine übrig bleiben. 82 davon waren in beiden Analysereplikaten identisch (Abbildung 24). In der ersten Analyse der Gesamtprobe wurden aus 291 detektierten Proteinspezies insgesamt 62 unique Proteine identifiziert. Die zweite Analyse der Gesamtprobe konnte nicht in die Auswertung miteinbezogen werden, da die mittels LC-MS/MS generierten Spektren keine verwertbaren Aussagen zuließen. Eine Wiederholung des Experiments konnte aufgrund zu geringer Probenmenge nicht durchgeführt werden. 42 der identifizierten Proteine konnten in allen durchgeführten Analysen wieder gefunden werden (Abbildung 25).

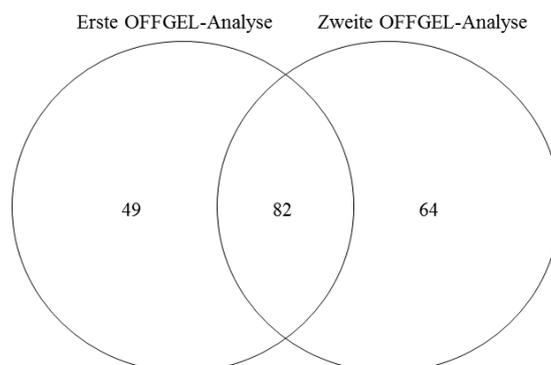


Abbildung 24: VENN-Diagramm der identifizierten Proteine beider OFFGEL-Replikate.

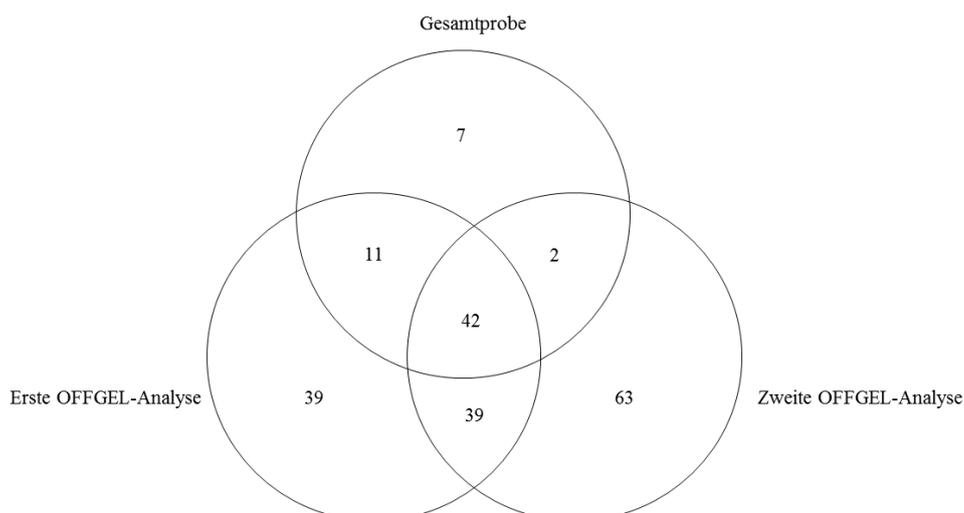


Abbildung 25: VENN-Diagramm der identifizierten Proteine beider OFFGEL-Replikate und der Analyse ohne Vorfraktionierung (Gesamtprobe).

Vergleicht man die identifizierten Proteine jeder einzelnen Fraktion beider OFFGEL-Analysen und die Gesamtprobe, so zeigt sich, dass viele der Proteine in mehreren, manche in nahezu allen 24 Fraktionen der OFFGEL-Analyse identifiziert werden, wobei es sich hierbei meist um hoch-abundante Proteine handelt (siehe Anhang/CD: Rektumkarzinom_ OFFGEL-(24) Fraktionen_ ICPL-Markierung). Einige der Proteine wurden nur in einer der OFFGEL-Fraktionen nachgewiesen. Die Signalintensität zeigte, dass es sich hierbei um Proteine handelte, die vermutlich in geringer Konzentration vorlagen. Die Ergebnisse zeigten auch, dass die Fraktionierung der Proteine mittels OFFGEL gut reproduzierbar war. Es konnten 90% der Proteine, die in der Gesamtprobe identifiziert wurden, auch in den OFFGEL-Fraktionen wieder gefunden werden. Die Reduzierung der Probenkomplexität durch die OFFGEL-Vorfraktionierung führte jedoch zu einer erheblich höheren Anzahl identifizierter Proteine (Tabelle 3-11).

	Total IDs	Unique IDs	Nicht redundante IDs	Reguliert 1,5 ≥ 1 ≥ 0,66	
				RCT I	RCT II
OFFGEL Fraktionierung I	3222	645	131	85	87
OFFGEL Fraktionierung II	3734	734	146	102	68
Gesamtprobe	291	62	62	13	20
Summe der 3 Analysen	7247	1441	201	140	114

Tabelle 3-11: Anzahl identifizierter bzw. als reguliert eingestufte Proteine der ICPL-Analysen aus dem Rektumkarzinom Proteom-Vergleich von Responder/Non-Responder (RCT I und II).

Innerhalb der identifizierten Proteine wurden jene als unterschiedlich exprimiert eingestuft, die einen Regulationswert von $1,5 \geq 1 \geq 0,66$, mit mindestens zwei Quadruplets pro Protein und ein uniques Peptid pro Protein aufwiesen ($CV \leq 30\%$). Die Auswertung der Proben (RCT I bzw. RCT II) erfolgte separat, da es sich um verschiedene Behandlungsstrategien und deshalb unabhängige Analysen handelte (siehe Anhang/CD: Rektumkarzinom_ ICPL-Markierung). Somit konnte im Datensatz von RCT I insgesamt 201 Proteine (nicht redundant) in 2 X 24 OFFGEL-Fraktionen und in der Gesamtprobe identifiziert und die entsprechenden Protein-IDs aus den IPI-Datenbanken zugeordnet werden. Davon entsprachen 140 den ursprünglich festgelegten Regulationskriterien. Von diesen insgesamt 140 regulierten Proteinen sind 79 Proteine im Non-Responder Proteomzustand von RCT I herunterreguliert und 61 Proteine hochreguliert. Von diesen unterschiedlich regulierten Proteinen wurden solche einer näheren Betrachtung unterzogen, die einen höheren Regulationswert ($2,5 \geq 1 \geq 0,4$) bei einem kleinen CV-Wert ($CV \leq 20\%$) besaßen. Diese Kriterien konnten 8 Proteine erfüllen (Tabelle 3-12).

Protein-ID	Proteinname	Regulationsfaktor $2,5 \geq 1 \geq 0,4$
IPI00216138	TAGLN _ Transgelin	4,03
IPI00014516	CALD1 _ Isoform 1 of Caldesmon	3,16
IPI00020986	LUM _ Lumican precursor	2,97
IPI00604537	TPM1 _ tropomyosin 1 alpha chain isoform 3	2,55
IPI00289334	FLNB _ Isoform 1 of Filamin-B	0,36
IPI00007750	TUBA4A _ Tubulin alpha-4A chain	0,38
IPI00643920	TKT _ Transketolase	0,38
IPI00216256	WDR1 _ Isoform 2 of WD repeat-containing protein 1	0,43

Tabelle 3-12: Regulierte Proteine der ICPL-Quadruplex Experimente aus dem Datensatz von RCT I mit einem Regulationsfaktor $\geq 2,5$.

Diese Proteine konnten mithilfe von DAVID „Functional annotation clustering“ nach ihren Funktionen in Gruppen eingeteilt werden. TPM1, CALD1, TAGLN, FLNB und WDR1 gehören in die Gruppe der aktinbindenden Proteine, TUBA4A zu den Zytoskelett-Proteinen, LUM zu den kollagenbindenden Proteinen und TKT zu den Stoffwechselprozess (Glykolyse)-Proteinen.

Im Datensatz von RCT II (ICPL 6/10) konnten insgesamt 201 Proteine (nicht redundant) in 2 X 24 OFFGEL-Fractionen und in der Gesamtprobe identifiziert und die entsprechenden Protein-IDs in den IPI-Datenbanken zugeordnet werden. Davon entsprachen 114 den ursprünglich festgelegten Regulationskriterien. 91 Proteine waren im Non-Responder Proteomzustand von RCT II herunterreguliert und 23 Proteine hochreguliert. Um diese Anzahl überschaubarer zu gestalten, wurden auch hier die Regulationsgrenzen enger gefasst ($2,0 \geq 1 \geq 0,5$, Tabelle 3-13).

Protein-ID	Proteinname	Regulation größer $2,0 \geq 1 \geq 0,5$
IPI 00022792	MFAP4 _ Microfibril-associated glycoprotein 4 precursor	0,09
IPI 00302592	FLNA _ filamin A, alpha isoform 1	0,22
IPI 00103467	ALDH1B1 _ Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial precursor	0,27
IPI 00216138	TAGLN _ Transgelin	0,28
IPI 00032313	S100A4 _ Protein S100-A4	0,29
IPI 00031522	HADHA _ Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor	0,38
IPI 00024145	VDAC2 _ Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	0,46
IPI 00000230	TPM1 _ tropomyosin 1 alpha chain isoform 2	0,47
IPI 00643920	TKT _ Transketolase	0,47
IPI 00020501	MYH11 _ Myosin-11	0,50
IPI 00398002	PLEC1 _ plectin 1 isoform 1	0,52
IPI 00008176	SHROOM4 _ Isoform 1 of Protein Shroom4	0,53

Tabelle 3-13: Regulierte Proteine der ICPL-Quadruplex Experimente aus dem Datensatz von RCT II mit einem Regulationsfaktor $\geq 2,0$.

Die Funktionen der verbleibenden 12 Proteine wurden ebenfalls mittels DAVID „Functional annotation clustering“ verschiedenen funktionellen Proteinklassen zugeordnet. TPM1, TAGLN, PLEC1, MYH11 und FLNA konnten zu den aktinbindenden Proteinen, SHROOM4 zu den Zytoskelett-Proteinen und MFAP4 zu den kollagenbindenden Proteinen zugeordnet werden. ALDH1B1 und TKT sind bei verschiedenen Stoffwechselprozessen (Alkohol-Metabolismus, Glykolyse) beteiligt, während HADHA und VDAC2 im mitochondrialen Metabolismus eine Rolle spielen. S100A4 wurde im Zusammenhang mit diversen Zellzyklusprozessen beschrieben.

3.3.1.2 Validierung potenzieller Biomarker

Für die Validierung wurden Proteine (Tabelle 3-14) ausgewählt, die in der vorangegangenen Proteomanalyse mittels ICPL-Technologie als signifikant reguliert eingestuft worden waren. Ein weiteres Auswahlkriterium war, dass diese Proteine in der Literatur bereits mit Kolorektalkarzinomen in Assoziation gebracht worden waren.

Protein-ID	Proteinname	Regulationsfaktor $2,0 \geq 1 \geq 0,5$	
		RCT I	RCT II
IPI 00022792	MFAP4 _ Microfibril-associated glycoprotein 4	-	0,09
IPI 00103467	ALDH1B1 _ Aldehyde Dehydrogenase X, Mitochondrium	-	0,27
IPI 00216138	TAGLN _ Transgelin	4,03	0,28
IPI 00032313	S100A4	-	0,29
IPI 00031522	HADHA _ 3 Ketoacyl Coenzyme A (CoA) Thiolase alpha subunit	-	0,38
IPI 00007750	TUBA4A Tubulin alpha-4A chain	0,38	-
IPI 00216256	WDR1 _ Isoform 2 of WD repeat-containing protein 1	0,43	-
IPI 00024145	VDAC2_ Voltage-dependent anion selective channel protein 2	-	0,46
IPI 00000230	TPM1 _ Tropomyosin 1 alpha chain	2,55	0,47
IPI 00643920	TKT _ Transketolase	0,38	0,47
IPI 00014516	CALD1 _ Isoform 1 of Caldesmon	3,16	-
IPI 00020986	LUM _ Lumican precursor	2,97	-
IPI 00022774	Der Antikörper für die Kontrolle: VCP _ Valosin containing protein	1,00	1,00

Tabelle 3-14: Zur Validierung ausgewählte Proteine beider RCT. Ausgewählt wurden die Proteine aufgrund ihrer signifikanten Regulierung und einer in der Literatur beschriebenen Assoziation mit Rektalkarzinomen. Das Protein VCP diente dabei als Kontrollprotein in beiden RCT.

Zur Validierung wurde mikrodisektiertes Rektumkarzinomgewebe (Abschnitt 2.1.5) verwendet. Das biopsierte Rektumkarzinomgewebe stammte von Patienten, die auf RCT I oder RCT II gut angesprochen (Responder) bzw. schlecht/mittelmäßig angesprochen haben (Non-Responder). Da die biopsierten Gewebestücke limitiert und von geringer Größe waren, konnten nur wenige tumoröse Zellen mittels LCM isoliert werden. Deshalb stand letztendlich keine ausreichende Proteinmenge für eine umfangreiche Validierung zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde eine kommerziell erhältliche Zelllinie (SW480) eines kolorektalen

Adenokarzinoms für Vorversuche und zur Austestung der zur Validierung ausgewählten Antikörper verwendet.

Zur Bestimmung der Beladungskapazität der Polyacrylamidgele (Abschnitt 2.3.1.1) wurden 12% SDS-PAGE Gele (9 X 7 cm) mit unterschiedlichen Proteinmengen eines Zelllysats (SW480) beladen und mit Coomassie-Brilliant-Blau (Abschnitt 2.3.1.6.1) gefärbt (Abbildung 26). Zur Ausarbeitung der Transferbedingungen für die Western-Blots (Abschnitt 2.5.1 ff), wurden 12% SDS-PAGE Gele (9 X 7 cm) mit unterschiedlichen Mengen Zelllysats beladen, die Proteine elektrophoretisch getrennt und anschließend auf PVDF-Membranen elektrophoretisch transferiert. Sowohl die im Gel zurück gebliebenen Proteine als auch die auf der Membran immobilisierten Proteine wurden mit Coomassie-Brilliant-Blau (Coomassie) angefärbt.

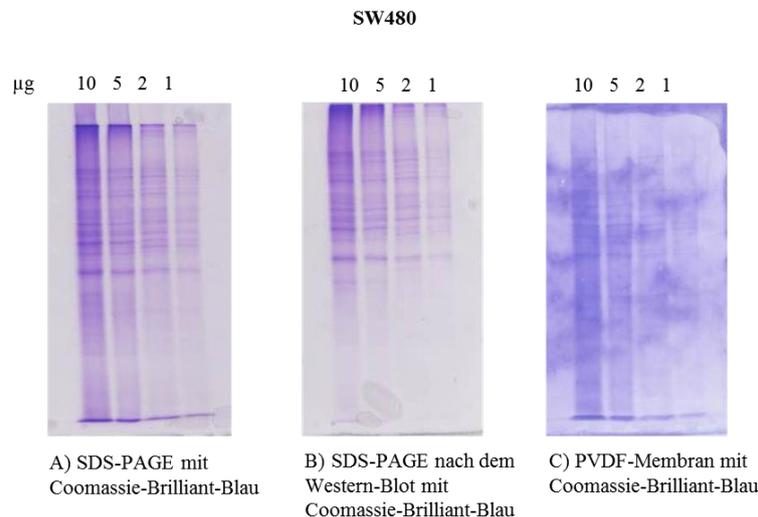


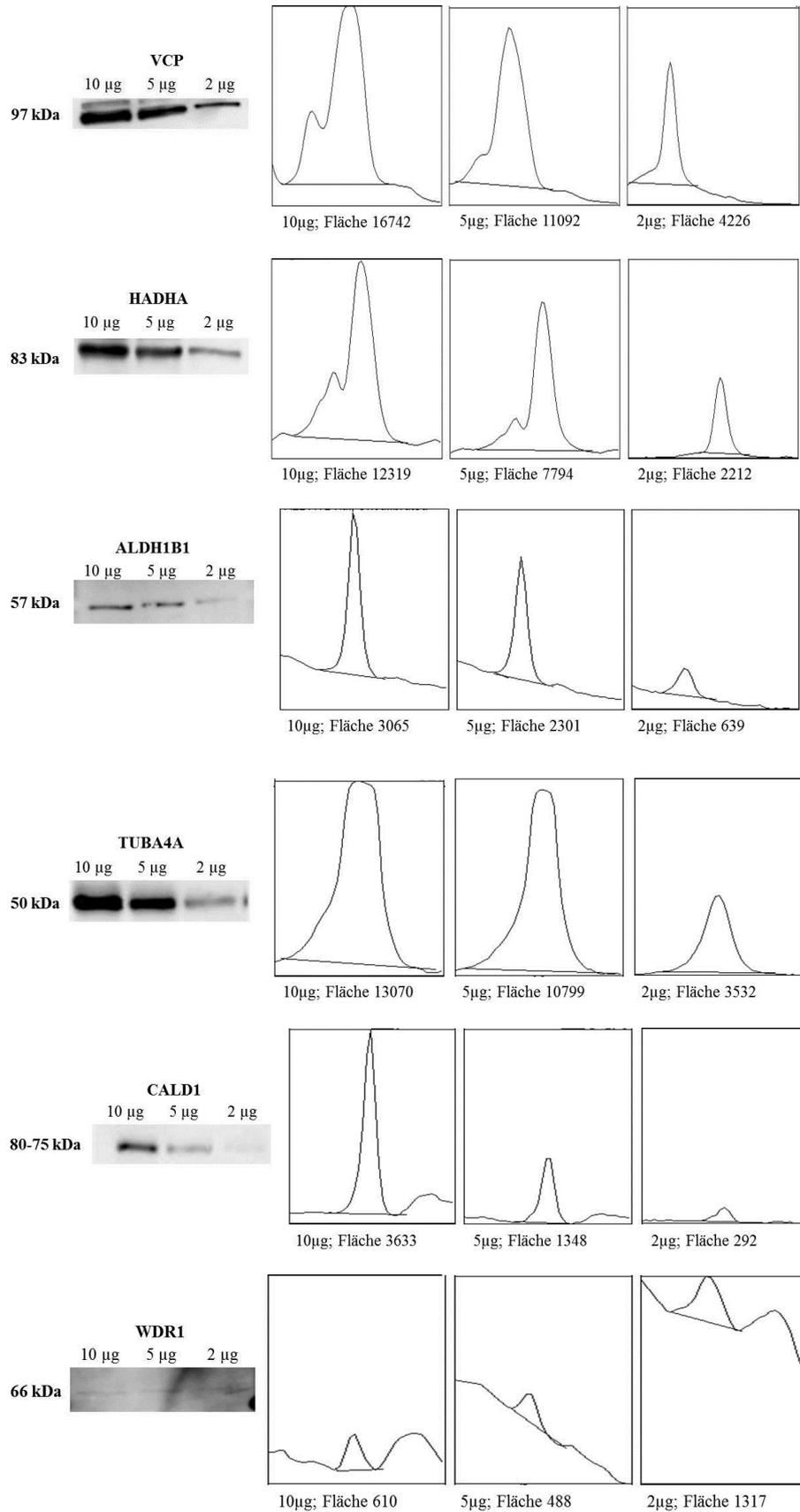
Abbildung 26: 12% SDS-PAGE unterschiedlicher Mengen eines Lysats der SW480-Zelllinie. A) SDS-PAGE mit anschließender Färbung mittels Coomassie-Brilliant-Blau; B) SDS-PAGE, nach Transfer der Proteine auf PVDF-Membran gefärbt mittels Coomassie-Brilliant-Blau; C) PVDF-Membran gefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau.

3.3.1.2.1 Test der Antikörper an einem Lysat von SW480-Zellen

Da nicht genügend Proteinmenge aus den Mikrodissektionen der Patientenbiopsien vorhanden war, wurde die Spezifität und Sensitivität der kommerziell erhältlichen Antikörper ebenfalls an dem Zelllysats der SW480-Zelllinie ausgetestet. Dazu wurden unterschiedliche Proteinmengen des Lysats (2, 5 und 10 µg) auf einem 12% Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE, Abschnitt 2.5.1 ff) aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und die

3 Ergebnisse

entsprechenden Proteine mit den einzelnen Antikörpern anhand der ECL-Technologie visualisiert (Abbildung 27).



3 Ergebnisse

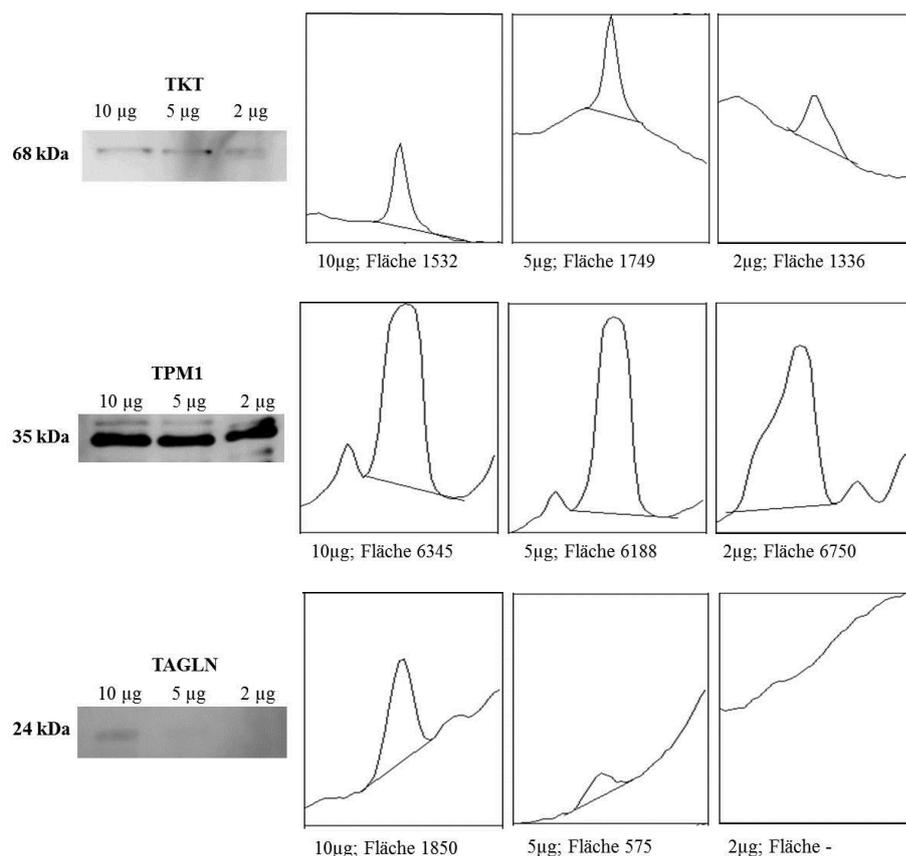


Abbildung 27: Nachweis der Sensitivität und Spezifität der Antikörper an einem Lysat einer SW480-Zelllinie. Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12% SDS-PAGE. Aufgetragen wurden 2, 5 und 10 µg Gesamtprotein. Anschließend wurden die Proteine auf PVDF-Membran transferiert und mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Die Visualisierung erfolgte mittels ECL-Technologie.

Alle getesteten Antikörper zeigten im getesteten Proteinemengenbereich von 10 µg deutlich erkennbare Proteinbanden. Für VCP, HADHA, ALDH1B1, TUBA4A, und CALD1 konnte auch eine konzentrationsabhängige Anfärbung der Proteine gezeigt werden. Für WDR1, TKT und TPM1 war mit der eingesetzten Proteinmenge keine lineare Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen, sodass eine korrekte Quantifizierung dieser Proteine in den Patientenproben nicht zu erwarten war. Auch für TAGLN war eine valide Quantifizierung nicht zu erwarten, da die Nachweisgrenze des Proteins bei eingesetzten 10 µg Gesamtprotein nahezu erreicht war.

Die Proteine MFAP4, S100A4, VDAC2 und LUM konnten in SW480 nicht nachgewiesen werden und wurden zur Validierung in den Einzelpatientenproben nicht herangezogen.

Als Referenzprotein wurde VCP („Valosin Containing Protein“) gewählt, da die gängigen Referenzproteine wie Aktin, Tubulin, Carboanhydrase 1 oder GAPDH nicht eingesetzt werden konnten, weil diese Proteine in der Proteomanalyse mittels ICPL-Strategie in den

einzelnen Probandengruppen als unterschiedlich reguliert identifiziert worden waren. Die Expression von VCP hingegen war bei den ICPL-Analysen in allen Patientengruppen gleich. Beim Austesten der Antikörper gegen VCP in SW480-Zellen konnte in dem verwendeten Proteinmengenbereich eine lineare Konzentrationsabhängigkeit gezeigt werden (siehe Abbildung 27).

3.3.1.2.2 Nachweis ausgewählter Proteine in mikrodissektiertem Patientengewebe

Wie bereits erwähnt, war die Menge an solubilisiertem Tumorprotein zu gering, um ausführliche Versuche zur Validierung durchzuführen. Aus diesem Grund wurden alle Proteine mit den entsprechenden Antikörpern, nach Ablösen und Waschen des zuletzt verwendeten Antikörpers („Stripping“; Abschnitt 2.5.1), auf dem gleichen Western-Blot nachgewiesen. Dazu wurden je 20 µg (pro Auftragsspur und Patient) des Proteinsolubilisats von 6 Patienten der RCT I (3 Responder und 3 Non-Responder) und von 8 Patienten der RCT II (4 Responder und 4 Non-Responder) auf ein 12% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Proteine nach deren Molekulargewicht getrennt. Die Proteine wurden anschließend auf PVDF-Membranen geblottet und mit den ausgewählten Antikörpern nacheinander, jeweils nach entsprechenden „Stripping“-Schritten, inkubiert. Proteine, die nicht vom Gel auf die Membran transferiert werden konnten und im Gel zurück blieben, wurden mittels Silberfärbung (Abschnitt 2.3.1.6.2) visualisiert (Abbildung 28).

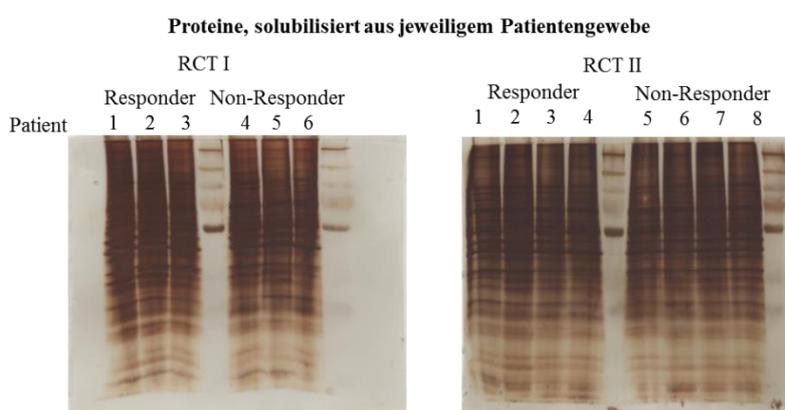


Abbildung 28: 12% SDS-PAGE des Proteinsolubilisats der einzelnen Patienten. Aufgetragen sind je Patient 20 µg Gesamtprotein. Die Proteine wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung auf PVDF-Membranen transferiert. Protein, das im Gel verblieben ist, wurde mittels Silberfärbung nach Heukeshoven sichtbar gemacht.

Wie bereits in den Vorversuchen mit den SW480-Zellen gezeigt, bleiben auch hier größere Proteinmengen, vor allem im höheren Molekulargewichtsbereich, nach dem Blotten im Gel

zurück. Dies kann zur Folge haben, dass Proteine, die in den ICPL-Experimenten identifiziert worden waren, in zu geringen Mengen auf die Membran transferiert werden und somit unter die Nachweisgrenze fallen. Anpassen der Porengröße oder Zugabe von Harnstoff oder SDS zum Blot-Puffer verbesserte zwar die Blot-Effizienz für große Proteine, verschlechterte jedoch gleichzeitig die Ergebnisse für niedermolekulare Proteine (Havinga et al., 1987).

Zunächst wurde zur Visualisierung von VCP, das als Referenzprotein ausgewählt worden war, die PVDF-Membran mit dem entsprechenden Antikörper gegen VCP inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, dessen Nachweis mithilfe von Chemilumineszenz erfolgte (ECL; Abschnitt 2.5.1). Die Detektion erfolgte bei 440 nm im Fluoreszenzscanner LAS 3000 „Imager“.

Im Gegensatz zum Nachweis von VCP in SW480-Zellen, bei dem nur eine Proteinbande nachgewiesen werden konnte, wurden in den Patientenproben drei Banden angefärbt (Abbildung 29 und Abbildung 30). Die Intensität der einzelnen Banden war zudem bei den einzelnen Patienten aller Probandenpools unterschiedlich (Tabelle 3-15 und Tabelle 3-16).

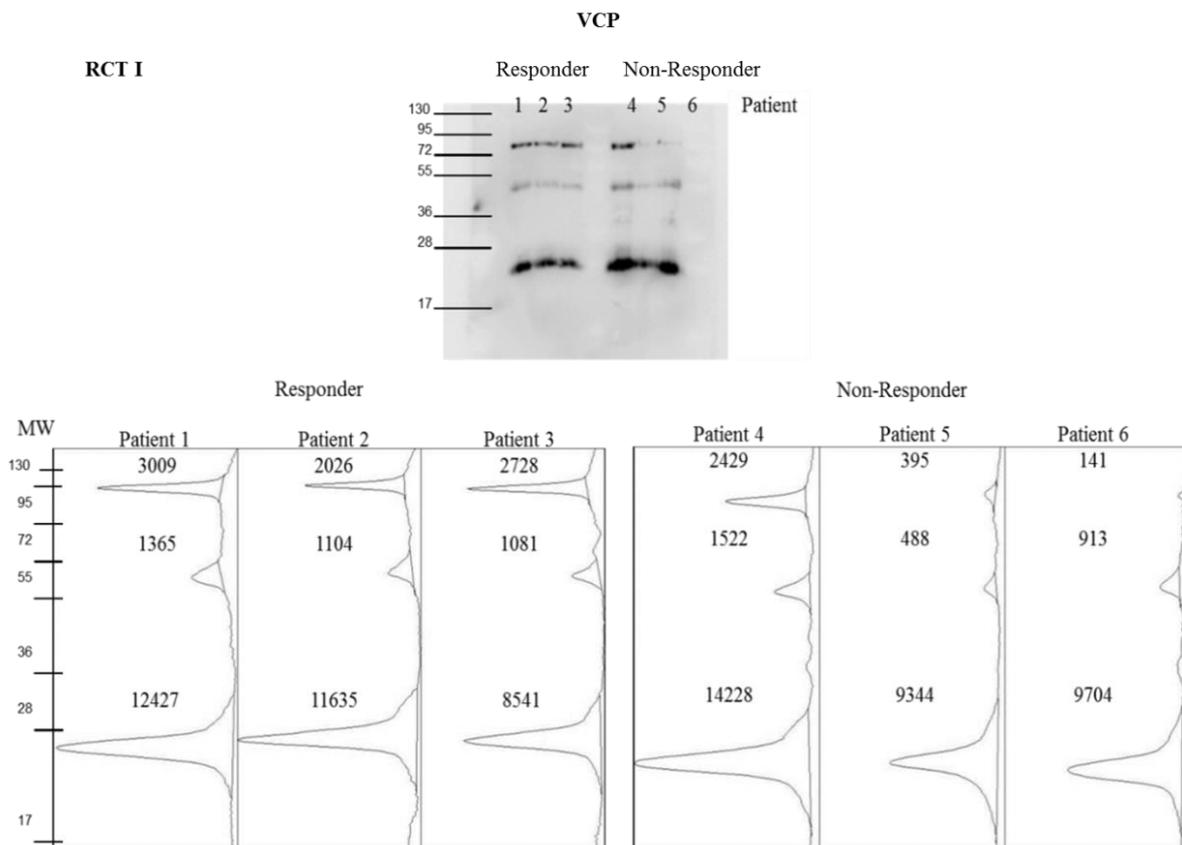


Abbildung 29: Nachweis von VCP in kolorektalen Proteinextrakten (Einzelpatienten_ RCT I) auf PVDF-Membranen nach Transfer aus 12% SDS-Polyacrylamidgelen mittels ECL.

3 Ergebnisse

Responder RCT I				Non-Responder RCT I			
Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Gesamt	Pat. 4	Pat. 5	Pat. 6	Gesamt
3009	2026	2728		2429	395	141	
1365	1104	1081		1522	488	913	
12427	11635	8541		14228	9344	9704	
16801	14765	12350	43916	18179	10227	10758	39164

Tabelle 3-15: Flächen der densitometrischen Auswertung der drei VCP-Banden, die in den einzelnen Patientenproben (Responder oder Non-Responder von RCT I) detektiert wurden. Als Gesamtsumme wurden zusätzlich die Flächen aller VCP-Banden der Patientenproben (Responder oder Non-Responder von RCT I) berechnet.

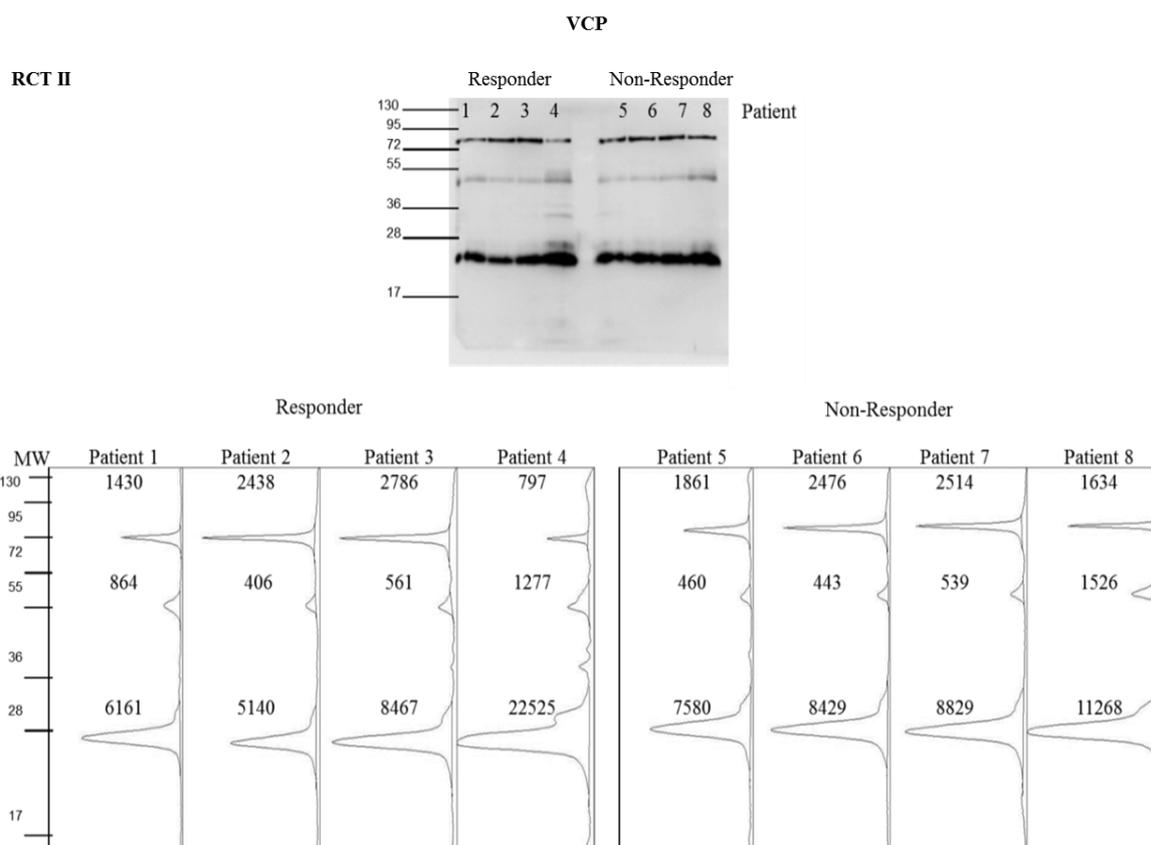


Abbildung 30: Nachweis von VCP in kolorektalen Proteinextrakten (Einzelpatienten_ RCT II) auf PVDF-Membranen nach Transfer aus 12% SDS-Polyacrylamidgelen mittels ECL.

Responder RCT II					Non-Responder RCT II				
Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Gesamt	Pat. 5	Pat. 6	Pat. 7	Pat. 8	Gesamt
1430	2438	2786	797		1861	2476	2514	1634	
864	406	561	1277		460	443	539	1526	
6161	5140	8467	22522		7580	8429	8829	11268	
8455	7984	11814	24599	52852	9901	11348	11882	14428	47559

Tabelle 3-16: Flächen der desitometrischen Auswertung der drei VCP-Banden, die in den einzelnen Patientenproben (Responder oder Non-Responder von RCT II) detektiert wurden. Als Gesamtsumme wurden zusätzlich die Flächen aller VCP-Banden der Patientenproben (Responder oder Non-Responder von RCT II) berechnet.

Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der ICPL-Experimente, bei denen VCP keiner unterschiedlichen Regulation unterlag. Es wird jedoch erklärbar, wenn die Flächen (Tabelle 3-15 und Tabelle 3-16) der Proteinbanden der einzelnen Patienten jeder Patientenkohorte addiert werden. Die Summe aller Flächen jeder Patientengruppe ist dann im Rahmen der experimentellen Fehler identisch. Dies wiederum entspricht den Ergebnissen der Poolanalyse des ICPL-Experiments. Das Auftreten von VCP in mehreren Molekulargewichtsbanden ist z.B. für die humane Nierenzelllinie 293T beschrieben (Datenblatt Santa Cruz Biotechnology, Inc.; VCP (F-5): sc-133211). Die Summe der Flächen der einzelnen Banden eines Patienten zeigt jedoch, dass VCP in den einzelnen Probanden unterschiedlich stark exprimiert ist und auch die Mengenverteilung der einzelnen Banden variiert, unabhängig welche Radiochemotherapie angewandt worden war und unabhängig, ob Responder oder Non-Responder analysiert worden waren. In der Arbeit von Yamamoto wurde eine Beeinflussung der Expression von VCP bei der Entwicklung eines kolorektalen Adenokarzinoms beschrieben (Yamamoto et al., 2004). Auch Sakai beschreibt 2012 eine vermehrte Bildung von VCP in einer DLD-1/5-FU-resistenten Zelllinie im Vergleich zu einer normalen DLD-1 Zelllinie (Sakai et al., 2012). Somit konnte VCP nicht als Referenz verwendet werden. Es blieb also nur das im Polyacrylamid-Gel zurückgehaltene Protein (Abbildung 29 und Abbildung 30) als Indiz, dass eine vergleichbare Proteinmenge für jeden Patienten eingesetzt worden war.

Dieses Ergebnis zeigt jedoch deutlich die Problematik von Analysen aus „gepooltem“ Ausgangsmaterial. Limitierte Probenmenge, wie in der vorliegenden Arbeit zum Beispiel aus Biopsien, aber auch finanzielle Restriktionen, verhindern jedoch häufig eine andere Vorgehensweise.

Zum Nachweis der weiteren ausgewählten, potenziellen Markerproteine wurden die Blots (Abschnitt 2.5.1) mit unterschiedlichen Puffern gewaschen und die gebundenen Antikörper gestripped. Anschließend wurden die Blots mit dem nächsten Antikörper inkubiert und mittels ECL detektiert. Sukzessiv wurde diese Vorgehensweise für alle nachzuweisenden Proteine (VCP, HADHA, ALDH1B1, TUBA4A, CALD1, WDR1, TKT, TPM1, TAGLN) aus Mangel an Ausgangsmaterial anhand eines Blots durchgeführt. Die prinzipielle Machbarkeit dieser Vorgehensweise war bereits mit Proteinlysate aus SW480-Zellen ausgetestet worden.

Leider zeigt sich, dass mit einer Ausgangsmenge von 20 µg Gesamtprotein für nahezu alle zu quantifizierenden Proteine die Grenze der Nachweisbarkeit erreicht war. Für Transketolase (TKT) konnte bei RCT I eine reduzierte Expressionsrate bei Non-Respondern, entsprechend

den ICPL Experimenten, gezeigt werden (Abbildung 31 und Abbildung 32). Caldesmon 1 (CALD1) zeigte eine erhöhte Expression bei einem der drei Non-Responder. Für RCT II war insgesamt nur ein Protein (HADHA) in ausreichender Menge nachweisbar. Es war jedoch bei allen Patienten unterschiedlich stark exprimiert, mit der Tendenz einer erhöhten Expression bei Non-Respondern. Da kein Biopsiematerial mehr zur Verfügung stand, wurde für eine weitere Validierung der in den ICPL-Experimenten erarbeiteten Ergebnisse eine immunhistologische Anfärbung von Dünnschnittschnitten von Patienten mit Rektalkarzinom durchgeführt.

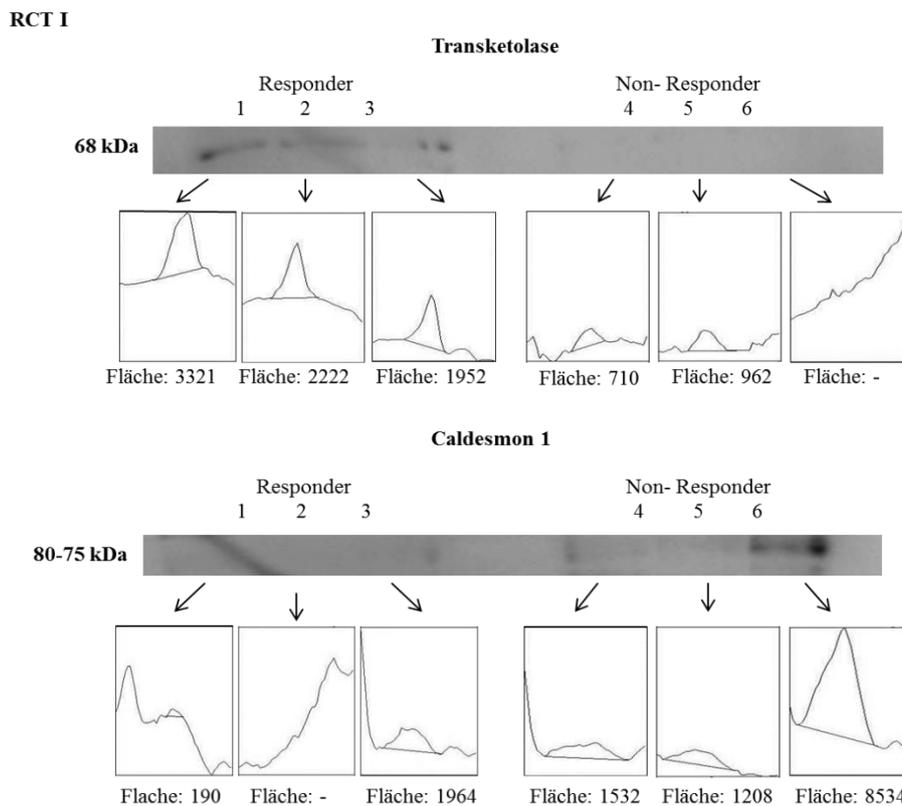


Abbildung 31: Nachweis potenzieller Markerproteine durch entsprechende Antikörper und Visualisierung mittels ECL (Einzelpatienten_ RCT I) auf PVDF-Membranen nach Transfer aus 12% SDS-Polyacrylamidgelen. Transketolase (TKT) und Caldesmon 1 (CALD1) mit densitometrischer Auswertung der Proteinbanden.

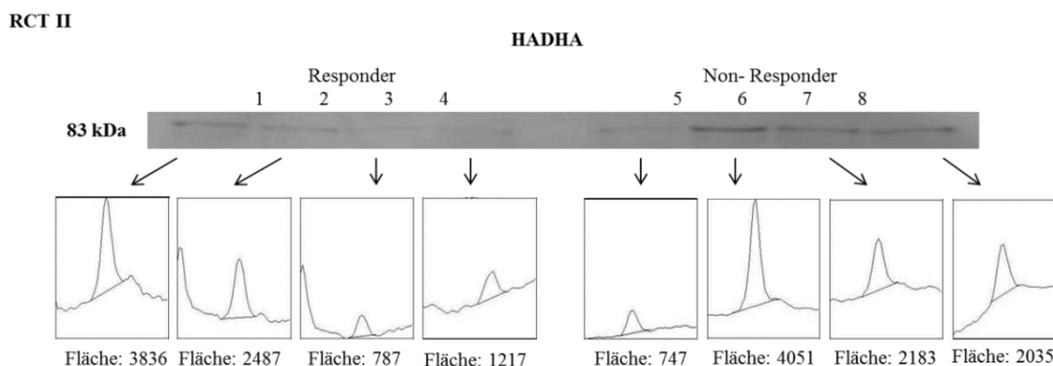


Abbildung 32: Nachweis potenzieller Markerproteine durch entsprechende Antikörper und Visualisierung mittels ECL (Einzelpatienten_ RCT II) auf PVDF-Membranen nach Transfer aus 12% SDS-Polyacrylamidgelen. HADHA mit densitometrischer Auswertung der Proteinbanden.

3.3.1.3 Immunhistochemische Validierung potenzieller Markerproteine

Zur weiteren Validierung der in den ICPL-Experimenten identifizierten differenziell exprimierten Proteine wurden auch immunhistochemische (IHC) Analysen durchgeführt. Die Anfertigung der Gewebeschnitte und die Durchführung der Immunhistochemie erfolgte in der Kooperationseinheit von Prof. Dr. med. Roland S. Croner (Geschäftsführender Oberarzt, Chirurgische Klinik, Universitätsklinikum Erlangen).

Die IHC wurde an Paraffin eingebetteten Biopsien einer unabhängigen Patientenkohorte, die auf eine Radiochemotherapie (RCT I oder RCT II) schlecht/mittelmäßig (Non-Responder) bzw. gut (Responder) angesprochen haben. Insgesamt wurden Gewebeschnitte von 37 Patientenpaaren zur Analyse verwendet. Vier Proteine, für die IHC Antikörper erhältlich waren, wurden zur Validierung herangezogen. Für RCT I wurden die Proteine Transgelin (TAGLN), Transketolase (TKT) und Plectin getestet. Für RCT II die Proteine HADHA, Transgelin (TAGLN) und Transketolase (TKT).

Der immunhistochemische Nachweis von HADHA auf den Paraffin-Schnitten konnte die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen bestätigen. Dabei zeigte HADHA eine erhöhte Expression (dunkelblaue/rote Färbung, Abbildung 33) im Tumorgewebe der Non-Responder im Vergleich zu Respondern bei RCT II. Die Expressionsraten von HADHA waren jedoch sehr unterschiedlich bei den einzelnen Patienten. Transgelin, Transketolase und Plectin konnten mit den verwendeten Antikörpern nicht nachgewiesen werden.

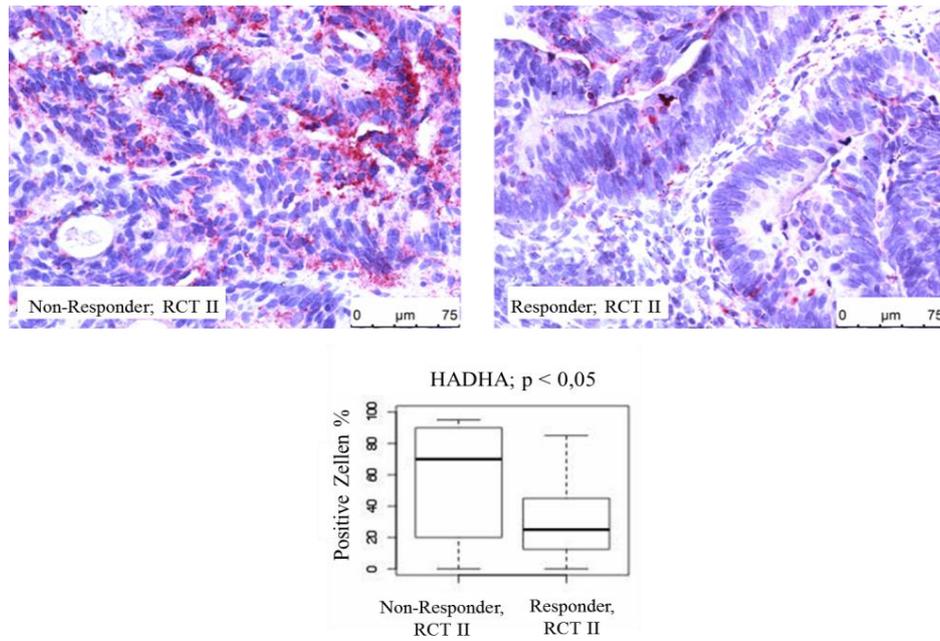


Abbildung 33: Immunhistochemischer (IHC) Nachweis der erhöhten Expression von HADHA ($p < 0,05$) in Non-Responder Tumorzellen im Vergleich zu Responder Tumorzellen aus Biopsien von Rektumkarzinom Patientengewebeschnitten (37 Einzelpatientenpaare_RCT II).

4 Diskussion

Die Proteomanalyse von klinischen Proben verfolgt in erster Linie das Ziel, diagnostische Marker zu identifizieren, deren Expressionsprofil in direkter Korrelation zum Krankheitsstatus steht. Diese Markerproteine geben einen Hinweis auf physiologische Veränderungen eines Patienten bezogen auf seinen Krankheitszustand, unter Einfluss von Medikamenten, Toxinen oder anderen äußeren Einflüssen (Zolg and Langen, 2004). Diese Proteine können in unterschiedlichen diagnostischen Applikationen zur Anwendung kommen, z.B. als Screening Marker (I), die erlauben, gesunde Populationen von kranken zu diskriminieren (Tumorentstehung). Eine weitere Anwendung finden diese Proteine als prognostische Marker (II), die nach Feststellung der Krankheit eine Auskunft über deren möglichen Verlauf erlauben, und so die Strategie der Therapie beeinflussen. Stratifizierungs-Marker (III) erlauben eine Unterscheidung von Responder und Non-Responder und ermöglichen so eine gezielte Therapie, zugeschnitten auf den einzelnen Patienten. Ein weiterer Anwendungsbereich sind Efficacy-Marker (IV), die nach Festlegung auf eine Therapie die Effizienz der Behandlung verfolgen.

Derartige Patientenproben stellen jedoch die Proteomanalyse vor besondere Herausforderungen, begründet vor allem in der begrenzten Probenmenge (i), dem heterogenem Ausgangsmaterial (ii) und einem enormen dynamischen Bereich (iii), bezogen auf die Proteinmenge der einzelnen Proteinspezies.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb eine Strategie zur Durchführung einer personalisierten/individualisierten Proteomanalyse von Patientenproben untersucht und unter besonderer Berücksichtigung der Stratifizierung von Patienten optimiert. Als Ausgangsmaterial dienten Gewebeproben und Plasma von Patienten zweier biologischer Modellsysteme, dem Conn-Syndrom und dem Rektumkarzinom.

Bei beiden Modellsystemen musste auf biopsiertes Ausgangsmaterial zurückgegriffen werden, was eine sehr begrenzte Probenmenge zur Folge hat. Außerdem bestehen Tumore meist aus sehr heterogenen Zellpopulationen. Plasma ist zum einen das beliebteste Ausgangsmaterial zur Diagnostik, stellt zum anderen aber die Analytik durch den enormen dynamischen Bereich der Proteinkonzentrationen vor die größte Herausforderung.

4.1 Modellsystem I: Proteomanalyse von Nebennierengewebe und Nebennierenvenenplasma zur Stratifizierung von Patienten mit Conn-Syndrom

Das Conn-Syndrom ist eine Erkrankung der Nebennierenrinde (Zona glomerulosa), die zu einer vermehrten Bildung des Steroidhormons Aldosteron führt (primärer Hyperaldosteronismus, PHA). Die Kontrolle der Synthese und Sekretion von Aldosteron erfolgt durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-Hormonsystem (RAAS), welches den Salz- und Wasserhaushalt reguliert und den Blutdruck konstant aufrechterhält. Beim Conn-Syndrom ist jedoch die Kontrolle der Aldosteronsynthese partiell oder vollständig vom RAAS entkoppelt. Durch die fehlende Kontrolle erfolgt eine erhöhte Natriumrückresorption über den epithelialen Natriumkanal (ENaC) und die Na-K-ATPase im distalen Tubulus und den Sammelrohren der Niere. Dies führt zu einer vermehrten Kaliumausscheidung in den Urin und einer vermehrten Wasseraufnahme aus dem Urin in das Blut, wodurch das Extrazellular- und Plasmavolumen steigt, was einen Anstieg des Blutdrucks zur Folge hat (Phakdeekitcharoen et al., 2011). Dieser deutlich erhöhte Blutdruck ist das Hauptsymptom des Conn-Syndroms (Stowasser and Gordon, 2013).

Für das Conn-Syndrom sind sechs Subtypen beschrieben. Das aldosteronproduzierende Adenom (APA), mit Adenomen in einer der beiden Nebennieren, und die idiopathische bilaterale Hyperplasie (IHA), mit Adenomen in beiden Nebennieren sind die am häufigsten auftretenden Subtypen. Generell ist für die klinische Medikation eine Subtypen-Charakterisierung von entscheidender Bedeutung, um eine möglichst positive Prognose erreichen zu können. Derzeit ist der Goldstandard der Subtyppendifferenzierung die Katheterisierung der Nebennierenvenen („Adrenal vein sampling“, AVS) zur Gewinnung von Blut aus den Nebennieren. Dabei ist die Katheterisierung insbesondere der rechten Nebennierenvene, die direkt in die Hohlvene einmündet und einen geringeren Durchmesser besitzt, häufig äußerst schwierig (Zelinka et al., 2012). Für den Patienten ist das gesamte Verfahren unangenehm und schmerzhaft und führt nicht zwangsläufig zu einer sicheren Differenzierung der Subtypen und damit häufig zu einer wenig effizienten Behandlung.

Ein einfaches, sicheres und für den Patienten angenehmes Verfahren wäre die Klassifizierung der Subtypen anhand eines Proteinmarker-Panels, das im Blut der Patienten nachweisbar sein sollte. Ziel dieses Projektes war deshalb, Proteine zu identifizieren, deren Expressionsverhalten typisch für die einzelnen Patientengruppen ist und so eine eindeutige Unterscheidung der einzelnen Subtypen zu erreichen.

Der Vorteil des Conn-Syndroms als Modellsystem ist, dass Plasma aus der Nebennierenvene der normalen Nebenniere mit Plasma der tumorösen Nebenniere des gleichen Patienten verglichen werden kann. Es ist anzunehmen, dass Proteine, die von der Nebenniere ins Plasma abgegeben werden, dort in erhöhter Konzentration vorliegen und deshalb leichter nachzuweisen sind. Außerdem muss beim Vergleich von Probenmaterial, das aus einem Patienten stammt, keine Rücksicht auf die genetische Variabilität genommen werden, die einen Vergleich von Proben verschiedener Patienten deutlich erschweren würde.

Das gleiche trifft für Biopsie-Gewebe aus tumorösen und normalen Arealen der Nebennierenrinde eines Patienten zu. Es wurden deshalb zunächst Biopsien der Nebennierenrinden von 4 Patienten analysiert.

4.1.1 Proteomanalyse von Nebennierenrindengewebe mittels ICPL-Technik

Organproben, wie sie nach Operationen oder aus Biopsien vorliegen, bestehen aus einer heterogenen Ansammlung unterschiedlichster Gewebetypen, Epithelien und Zellen. Krebszellen infiltrieren das sie umgebende „Microenvironment“, das sich z.B. aus Fibroblasten, Lymphozyten, Blutgefäßen und extrazellulärer Matrix zusammensetzt. Wird eine Proteomanalyse an derartigem Ausgangsmaterial durchgeführt, lassen sich Veränderungen im Proteinmuster keinem definierten Zelltyp mehr zuordnen (Xu, 2010). Ohnehin bereits in geringen Mengen vorkommende Proteine eines Zelltyps werden durch das Vermischen mit anderen Zellen und Stroma weiter verdünnt. Deshalb wurde bei der Aufarbeitung der Nebennierenbiopsien bereits auf der Ebene der Probengewinnung ein Schritt zur Reduktion der Heterogenität eingeführt. Die „Laser Capture Microdissection“ (LCM) ermöglicht relativ homogene Zellareale aus Gewebeschnitten zu isolieren (Fang et al., 2012; Mu et al., 2013). Diese Anreicherung definierter Zellpopulationen ist ein erster Schritt der Analysenstrategie, um auch Proteine geringerer Abundanz identifizieren zu können (Neubauer et al., 2006). Gerade aus Biopsien können jedoch meist nur geringe Gewebemengen isoliert werden, sodass letztendlich die daraus solubilisierte, geringe Proteinmenge zu den limitierenden Faktoren der LCM zählt. Auch im Fall des Modellsystems I, dem Conn-Syndrom, konnten aufgrund des geringen Volumens der Nebennierenrinde (Zona glomerulosa) nur wenige adenomatöse bzw. normale Zellareale isoliert werden. Da mittels der ICPL-Technik auch von geringen Proteinmengen noch reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen sind, wurden die Analysen der mittels LCM

gewonnenen Proben mit der Quadruplex-Version dieser Isotopenmarkierungstechnik durchgeführt. Die Proteinmenge reichte jedoch nicht aus, um weitere Fraktionierungsschritte der intakten Proteine, z.B. mittels OFFGEL, durchzuführen.

In den beschriebenen Experimenten wurde das Proteom der normalen Bereiche der Nebennierenrinde mit dem Proteom der tumorösen Zellen der Nebennierenrinde von 4 Patienten (8 Proben) verglichen. Die technische Durchführung erfolgte indem zweimal vier Proben (zwei Quadruplex-Ansätze: Ansatz A und B, siehe Abschnitt 3.1.1) mit den Isotopologen des ICPL-Reagens umgesetzt, vereinigt, proteolytisch gespalten und mittels LC-MS/MS analysiert wurden. Die Analyse der beiden Quadruplex-Ansätze erfolgte jeweils in drei technischen Replikaten. Wie in Abschnitt 3.1.1.1 beschrieben konnten insgesamt 274 Proteine in Ansatz A, bzw. 257 Proteine in Ansatz B identifiziert werden. 151 Proteine (A) bzw. 155 Proteine (B) wurden dabei in den technischen Replikaten beider Analysen überlappend quantifiziert und identifiziert. So konnten 90–95% der Proteine jedes Replikats in allen 3 Analysen wieder gefunden und identisch quantifiziert werden. Die gleichen Werte treffen auch beim Vergleich von Ansatz A und B (je 2 Patienten) zu.

Ein Grund, warum nur max. 95% der Proteine in allen technischen Replikaten quantifiziert und identifiziert werden konnten, ist in den technischen Voraussetzungen der massenspektrometrischen Analyse zu suchen. Da die Anzahl der MS- und MS/MS-Analysen pro Zeiteinheit Geräteabhängig limitiert ist, können in dieser Zeit bei komplexen Peptidgemischen nicht alle Peptide fragmentiert und damit identifiziert werden („undersampling“) (Wang et al., 2010; Wang and Li, 2008). Bei einer Wiederholung einer Analyse werden dann meistens nicht die gleichen Peptide, vor allem von niedrig-abundanten Proteinen, in jedem Lauf identifiziert.

In allen Analysen des beschriebenen Experiments konnte Lumican als reguliert identifiziert werden. Es folgte als einziges Protein dem vorgegebenen Regulationswert von $1,5 \geq 1 \geq 0,66$. Lumican war dabei im Proteom von krankem Nebennierengewebe (Herunterregulierung $\leq 0,10$) deutlich weniger exprimiert im Vergleich zu gesundem Nebennierengewebe. Lumican gehört zu der Familie der „small leucine-rich repeat“ Proteoglykane (SLRP-Familie) (Nikitovic et al., 2008) und ist in der extrazellulären Matrix verschiedener Gewebearten wie Muskel, Knorpel und Hornhaut lokalisiert (Nikitovic et al., 2008). Es ist an den Kontrollprozessen der Tumorgenese beteiligt und reguliert Funktionen der Zellproliferation, Zelladhäsion, Zellmigration und Zellinvasion. Lumican wurde bei verschiedenen Tumorerkrankungen wie Darmkrebs (Radwanska et al., 2012),

Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pan et al., 2012), Nierenkrebs (Schaefer et al., 2000), Lungenkrebs (Dolhnikoff et al., 1998), Brustkrebs (Leygue et al., 1998), Kolorektalkrebs (Lu et al., 2002b), Pankreaskrebs (Lu et al., 2002a) oder auch Knochenkrebs (Raouf et al., 2002) mit erhöhter Expression nachgewiesen. Dabei konnte eine direkte Verbindung zwischen der Lumican-Expression und der Krebsentstehung und Metastasierung gezeigt werden (Ishiwata et al., 2007). Lumican wurde jedoch bei Brustkrebs in einigen Fällen auch als herunterreguliert identifiziert, was dann mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden war (Leygue et al., 2000). Es ist somit nicht ungewöhnlich, dass Lumican auch beim Conn-Syndrom in Zusammenhang mit der Tumorentstehung eine Rolle spielen könnte.

Weitere Proteine konnten nur im Probenmaterial von drei, zwei oder auch nur einem Patienten identifiziert werden. Dies waren: Epoxide Hydrolyse 1, Mitochondrien Adrenodoxin, Apolipoprotein A-I, Cathepsin D, Mitochondrien Aldehyde Dehydrogenase, Mitochondrien Stress-70 Protein, Mitochondrien Cytochrome C Oxidase Polypeptide Va, Mitochondrien 10 kDa Heat Shock Protein, Mitochondrien Isoform Heart of ATP Synthase gamma chain, Mitochondrien ATP Synthase Subunit Alpha, Mitochondrien 60 kDa Heat Shock Protein und Mitochondrien Malate Dehydrogenase.

Außer der Mitochondrien Malate Dehydrogenase zeigen alle Proteine eine Herunterregulierung im tumorösen Nebennierengewebe. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Proteine der Atmungskette, die zur Energiebereitstellung in den Mitochondrien benötigt werden. In der Arbeit von Wen (Wen et al., 2000) konnte gezeigt werden, dass Aldosteron eine Interaktion mit der Elektronentransferkette von [2Fe-2S]-Ferredoxin, von Adrenodoxin und der NADPH-dependent Reduktase eingeht, um das erforderliche Reduktionsäquivalenz bereit stellen zu können. In Mitochondrien von Säugetieren ist Adrenodoxin an der Steroidgenese der Nebennieren und der Vitamin-D-Synthese beteiligt (Vickery, 1997; Müller et al., 2003). Während dieser Signalwege erfolgt der Transfer von Elektronen der NADPH über Adrenodoxin zu Ferredoxin. Letzteres reduziert dann die Mitglieder der mitochondrialen Cytochrome P450 (CYP) Proteinfamilie, wie P450_{scc} (CYP11A1) und deren Subgruppe CYP11B (Beilke et al., 2002). Das erste Enzym katalysiert dabei die Produktion von Pregnenolon, einem Enzym, das für den schnellen Schritt in der Steroidsynthese der Nebennieren verantwortlich ist. Die CYP11B-Enzyme hingegen sind an der Umwandlung zu Kortisol oder Aldosteron in den nachfolgenden Zwischenschritten der Steroidsynthese zuständig. Dabei ist für die Biosynthese von Aldosteron die Aldosteron-Synthase CYP11B2 verantwortlich (Sheftel et al., 2010). Da Aldosteron als das wirksamste Hormon an der Regulierung des Salz- und Wasserhaushaltes beteiligt ist, könnten die bei einigen Patienten

als unterschiedlich reguliert identifizierten Proteine durchaus in Zusammenhang mit dem Conn-Syndrom eine Rolle spielen. Neben Lumican sollten also auch einige der anderen Proteine weiteren Validierungsschritten unterzogen werden.

4.1.2 Proteomanalyse von Nebennierenvenenplasma

Zur Stratifizierung von Patienten wäre es vor allem wichtig, Proteinmarker zu verwenden, die leicht zugänglich im Blut der Patienten nachzuweisen sind. Deshalb wurden im Fall des Modellsystems I parallel zu Gewebeproben auch Plasmaproben analysiert, mit dem Ziel, weitere Markerproteine identifizieren zu können bzw. die im Gewebe bereits gefundenen auch im Plasma nachweisen zu können. Das Plasmaproteom stellt dabei die Analytik vor eine besondere Herausforderung. Von der Probenentnahme über die Lagerung bis zur Prozessierung der Proben gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten artifizielle Modifikationen an Proteinen vorzunehmen (Ray et al., 2011). Die Hauptproblematik liegt jedoch in der enormen Komplexität von Plasmaproben gepaart mit einem dynamischen Konzentrationsbereich der Proteine, der mehr als 10 Größenordnungen umfasst. Zusätzlich erschweren ca. 20 hoch-abundante Proteine die Analytik, die alleine 99% des Gesamtproteins ausmachen. Zur Detektion von niedrig-abundanten Proteinen ist es wichtig sensitive Methoden zur Analyse zu wählen (Surinova et al., 2011; Penno et al., 2012; Tucholska et al., 2009), doch sowohl elektrophoretische als auch LC-MS/MS-Methoden sind gegenwärtig nur in der Lage einen dynamischen Bereich von 10^2 bis 10^4 abzudecken. Die Arbeitsgruppe von Zhang (Zhang et al., 2011) zeigte, dass für eine sogenannte „In-Depth“-Analyse die Kombination von LC-MS/MS und SDS-PAGE verwendet werden kann. Durch die Erweiterung der Trenndimensionen und damit einer Erhöhung der Anzahl der Fraktionen war es möglich auch niedrig-abundante Proteine zu detektieren. Die Kombination beschriebener Methoden mit einer vorangegangenen Depletion mittels Affinitätschromatographie kann einen Zugang zu niedrig-abundanten Proteinen (Konzentration von ng/ml bis pg/ml) ermöglichen (Surinova et al., 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Blut der beiden Patienten mittels Katheterisierung (AVS) aus der normalen und der adenomatösen Nebennierenvene entnommen. Die Proben wurden mittels 2D-DIGE miteinander verglichen. Es konnten jedoch keinerlei Unterschiede im Proteinmuster der Plasmaproben des gleichen Patienten gefunden werden. Dies bedeutet einerseits, dass die Experimente mit höchster Reproduzierbarkeit durchgeführt worden sind,

aber auch, dass keines der 189 visualisierten Proteine im Zusammenhang mit der Erkrankung unterschiedlich exprimiert oder von der Nebenniere ins Plasma abgegeben wird. Die Anzahl der visualisierten Proteine bestätigt auch nochmals die bereits oben erwähnte Problematik, dass 99% der Proteinmenge durch wenige Proteine repräsentiert wird und deshalb bei dem geringen dynamischen Bereich, der durch die 2D-DIGE-Technik abgedeckt wird, nur wenige Proteinspots zu erwarten sind, wobei einige davon Isoformen des gleichen Genprodukts darstellen. Es war deshalb unumgänglich eine Fraktionierungsstrategie, ähnlich der von der Arbeitsgruppe Hanash beschriebenen (Zhang et al., 2011) zu verfolgen.

Zum einen sollte diese Strategie Depletionsschritte enthalten, um hoch-abundante Proteine zu entfernen, und es sollten Labelling-Techniken verwendet werden, um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit zu erreichen. Zur Abreicherung der ca. 100 höchst-abundanten Proteine wurden zwei Immunaффinitätschromatographie-Säulen verwendet (Seppro IgY14 und SuperMix). Als Labelling-Techniken wurde zur visuellen und densitometrischen Quantifizierung die 2D-DIGE-Technik angewandt. Zur massenspektrometrischen Quantifizierung kam die ICPL-Technologie zur Anwendung.

4.1.2.1 ICPL-Analyse von depletiertem Nebennierenvenenplasma

Die Analyse der depletierten Plasmaproben der Nebennieren erfolgte in einer Drei-Stufen-Analyse. Nach einer Vorfraktionierung mithilfe der Affinitätschromatographie (Seppro IgY14- und SuperMix-Säule) wurden die Proteine der depletierten Fraktionen der 4 Plasmaproben (2 Patienten, je 2 Nebennieren) mit den vier Isotopologen der ICPL-Methode umgesetzt und vereinigt. Anschließend wurde das Proteingemisch mittels OFFGEL-Elektrophorese in 24 weitere Fraktionen aufgetrennt. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden proteolytisch gespalten und die Peptide mittels LC-MS/MS analysiert. Insgesamt wurden 306 Proteine (nicht redundant) identifiziert und quantifiziert und die entsprechenden Protein-IDs aus den IPI-Datenbanken zugeordnet (siehe Abschnitt 3.1.2.2). Viele der Proteine wurden in mehreren, manche in nahezu allen 24 OFFGEL-Fraktionen identifiziert. Da Proteine in verschiedenen Proteinisofomen vorkommen können, ist eine Identifizierung in mehreren Fraktionen jedoch keine Seltenheit (Hubner et al., 2008).

8 Proteine, die im Vergleich zwischen adenomatös und normal einen Regulationsfaktor von $2,0 \geq 1 \geq 0,5$ besaßen, wurden als unterschiedlich exprimiert eingestuft. Insgesamt fünf dieser acht Proteine (Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein E, Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain, Apolipoprotein B-100 und Fibrinogen beta chain) waren Proteine, die während der

Affinitätschromatographie (Seppro IgY14- und SuperMix-Säule) von den übrigen Plasmaproteinen depletiert worden waren (Shi et al., 2012). Es ist somit anzunehmen, dass diese Proteine nicht aufgrund krankheitsbedingter Ursachen eine unterschiedliche Expression aufweisen, sondern als Folge schlecht reproduzierbarer Affinitätschromatographie. So werden zwar 45 moderat-abundante Proteine zu > 90% abgereichert und weitere 35 Proteine zu 20-90% entfernt, die Bindungskapazität der Säulen nimmt jedoch mit steigender Anzahl der Depletionen deutlich ab (Shi et al., 2012). Die übrigen drei identifizierten Proteine (Plasma protease C1 inhibitor, Filamin A alpha isoform 1 und Platelet basic Protein) besaßen ebenfalls eine erhöht Expression ($\geq 2,0$ -fach) im Plasma, das aus der Vene der gesunden Nebenniere entnommen worden war. Es ist jedoch bekannt, dass durch die Katheterisierung Venen oder auch Gewebe der Nebennieren verletzt werden können (Zelinka et al., 2012). Daher könnte es sein, dass diese Proteine ein Artefakt des Katheterisierens sind und ebenfalls hier keine relevanten Proteinsignaturen darstellen. Eine weitere Validierung wurde deshalb zunächst zurück gestellt.

4.1.2.2 DIGE-Analyse von depletiertem Nebennierenvenenplasma

Die gleichen Plasmaproben, die mittels ICPL-Technologie verglichen worden waren, wurden nach Depletion der hoch-abundanten Proteine auch anhand der 2D-DIGE-Methode analysiert. Der Vergleich der Plasmaproben der beiden Patienten mit Conn-Syndrom zeigte ähnliche Ergebnisse, wie in der oben beschriebenen ICPL-Analyse. Die identifizierten Proteine Albumin, Gelsolin, Ceruloplasmin, Prothrombin, Fetuin A, Vitamin D-bindendes Protein, Serum-Amyloid-P Komponente, Transthyretin und Aktin entsprachen den vorgegebenen Regulationswerten von $2,0 \geq 0 \geq 0,5$ und $p \leq 0,05$ und wurden als unterschiedlich exprimiert eingestuft. Auch hier handelt es sich um Proteine, die in sehr hoher Konzentration im Plasma vorliegen und die während der Depletion abgereichert werden sollten (Shi et al., 2012). Die parallel mit der ICPL-Technologie erzielten Ergebnisse wurden durch die 2D-DIGE-Analysen bestätigt. Obgleich mit beiden Techniken verschiedene Proteine als unterschiedlich exprimiert identifiziert wurden, gehören sie doch alle der Gruppe der hoch-abundanten Proteine an, die mittels Affinitätschromatographie entfernt worden waren. Da anzunehmen war, dass wie im Parallelexperiment die Ergebnisse aufgrund eines Artefakts bzw. der schlechten Reproduzierbarkeit des Depletionsschrittes zustande kamen, wurde deshalb auf eine weitere Validierung der gefundenen Proteine zunächst verzichtet.

Um dies auch für weitere Experimente abzuklären, war es unumgänglich, die Qualität der Affinitätschromatographieschritte zu überprüfen. Es war dabei weniger wichtig möglichst 100% des einzelnen Proteins zu entfernen, vielmehr galt es eine hohe Reproduzierbarkeit zu erreichen. Um dies zu überprüfen wurde eine Standardplasmaprobe eines gesunden Probanden aliquotiert ($n = 12$) und anschließend jedes Aliquot unter identischen Bedingungen einer Immunaффinitätschromatographie (Seppro IgY14- und SuperMix-Säule) unterzogen. Die nicht gebundenen Proteine wurden vergleichend mittels 2D-DIGE-Technologie analysiert. Trotz identischer Versuchsbedingungen konnten anschließend ca. 100 Proteine als vermeintlich reguliert ($2,0 \geq 0 \geq 0,5$ und $p \leq 0,05$) identifiziert werden. Es handelte sich dabei zu einem beträchtlichen Teil um Proteine, die mittels Immunaффinitätschromatographie entfernt worden waren. Weitere Proteine binden unspezifisch an hoch-abundante Proteine wie Albumin oder alpha-2-Macroglobulin, die als Trägermoleküle fungieren, und werden ebenfalls mit schlechter Reproduzierbarkeit abgereichert (Echan et al., 2005; Liu et al., 2006; Lowenthal et al., 2005). Dies zeigt, dass die Depletion mit der verwendeten Säulenkombination die Reproduzierbarkeit der Analysen von Plasma soweit verschlechtert, dass biologisch relevante Aussagen nicht mehr ohne weiteres möglich sind. Dies könnte umgangen werden, indem aus einem erweiterten Datensatz des Vergleichs der Standardplasmaproben eine Falschpositivliste erstellt wird, die all jene Proteine enthält, die fälschlicherweise als reguliert identifiziert worden sind. Die Proteine dieser Falschpositivliste müssten dann von der Liste potenzieller Biomarker subtrahiert werden, mit dem Risiko, dass dabei auch interessante Proteine verloren gehen.

Prinzipiell wäre eine weitere Möglichkeit, die Isotopenlabel bereits unmittelbar nach Probennahme einzuführen, die Proben zu vereinigen und den Depletionsschritt anschließend durchzuführen. Dazu müssten jedoch große Proteinmengen markiert werden (ca. 100 Mal mehr), was die Analytik extrem verteuern würde. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass die eingebrachten Label zumindest partiell eine Bindung der Proteine an die Antikörpersäulen verhindert. Dies könnte jedoch die Analyse von Aliquots einer Standardplasmaprobe zeigen, für die nur die beiden günstigsten Isotopenvarianten der ICPL-Technologie verwendet werden sollten.

4.2 Modellsystem II: Proteomanalyse von Rektalkarzinomgewebe zur Stratifizierung von Patienten mit Rektumkarzinom

4.2.1 ICPL-Technik als eine geeignete Methode zur Proteomanalyse von Gewebeproben

Die meisten kolorektalen Karzinome entstehen im Laufe von 10 Jahren durch genetische Veränderungen von Vorläufer-Läsionen (Shinya and Wolff, 1979), den so genannten Adenomen, gutartigen Tumoren der Dickdarmschleimhaut. Diese genetischen Veränderungen erfolgen in mehrstufigen Prozessen und sind als die Adenom-Karzinom-Sequenz (Fearon and Vogelstein, 1990) beschrieben.

Ballaststoffarme und fettreiche Ernährung aber hauptsächlich genetische Veränderungen führen zur Ausbildung von Kolonkarzinomen. Zu den molekularen Veränderungen zählen der Verlust von Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung verschiedener Onkogene (Chin and Gray, 2008). Über 80% der Adenome besitzen Mutationen im Adenomatous-polyposis-coli (APC)-Gen. Weitere Mutationen erfolgen in KRAS, BRAF, durch Inaktivierung von p53, PI3K/Akt- und TGF β -Signalwegen und im EGFR-PDGFR-cKIT-Signalweg (Carethers, 2012; Sillars-Hardebol et al., 2012; Jones et al., 2008; Cardoso et al., 2006; Kinzler and Vogelstein, 1996; Silvestri et al., 2012). Es konnte auch gezeigt werden, dass viele dieser chromosomalen Veränderungen in spezifischen Kombinationen auftreten (Hermsen et al., 2002).

Die enorme genetische Variabilität, die der Ausbildung eines Kolonkarzinoms zugrunde liegt, könnte die Ursache sein, warum Patienten, die offenbar an der gleichen Erkrankung leiden, unterschiedliche Krankheitsverläufe aufweisen (Van 't Veer and Bernards, 2008) und unterschiedlich auf die gleiche Therapie ansprechen. Aus der Vielzahl der genetischen Veränderungen konnte jedoch bisher keine Stratifizierung der Patienten abgeleitet werden.

Eine Beurteilung des Tumorstadiums und die daraus abgeleitete Behandlung erfolgt derzeit immer noch rein visuell. Der Tumor wird nach Tumorgröße (T), Lymphknotenbefall (N) und der Bildung von Metastasen (M) beurteilt. Eine detailliertere Einteilung, das „Grading“, erfolgt histologisch und zieht eine Behandlung entsprechend den einzelnen Stadien der UICC nach sich (Jessup et al., 2011; Liersch et al., 2010). Beim Rektumkarzinom werden sowohl Radio- als auch Chemotherapie eingesetzt. Um primär inoperable Tumore (UICC-Stadien II-III) in operable Stadien überzuführen („Downstaging“), erfolgt die Radiochemotherapie

(RCT) dabei vor einer operativen Therapie (Ceelen et al., 2009). Dabei ist bisher nicht vorhersehbar, bei welchen Patienten die RCT zum Erfolg führt. Um allen Patienten die optimale Behandlung zuteil werden zu lassen, ist vorab eine Einteilung der Patienten in Responder, bei denen ein gutes Ansprechen zu erwarten ist, und Non-Responder, die eine schlechte/mittelmäßige Reaktion auf die Therapie zeigen werden, unumgänglich. Es ist zu erwarten, dass die Vielzahl der genetischen Prädispositionen sich auch in unterschiedlichen Proteomen widerspiegeln.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, das Proteom von Respondern einer RCT mit dem von Non-Respondern zu vergleichen, um Proteine zu identifizieren, die unterschiedlich stark in beiden Populationen exprimiert sind. Die quantitative Analyse dieser Gruppe von Proteinmarkern (Marker-Panel) könnte dann in Zukunft eine frühzeitige Stratifizierung der Patienten ermöglichen. In den beschriebenen Experimenten wurde Tumorgewebe von Respondern und Non-Respondern nach zwei unterschiedlichen Therapien miteinander verglichen. Von den vier Patientenpopulationen stand Gewebe von je 5 Patienten zur Verfügung.

Um homogenes Tumorgewebe zu erhalten wurde auch in diesen Experimenten die LCM zur Probenvorbereitung verwendet. Um genügend Material für die Analysen einsetzen zu können, wurde das gewonnene Material der 5 Patienten jeder der vier Gruppen vereinigt und als Pool analysiert.

Für die Analyse wurde die ICPL-Technik verwendet, die als effektive Methode für die relative Quantifizierung geringer Proteinmengen beschrieben ist (Fleron et al., 2010; Com et al., 2012; Duan et al., 2009). Dabei wurde jeder der vier Probenpools mit einem der 4 ICPL-Isotope (ICPL_0, ICPL_4, ICPL_6 und ICPL_10) umgesetzt, die Proben vereinigt und gemeinsam weiter analysiert. Mit einem Aliquot erfolgte eine Vorfraktionierung der Proteine mittels OFFGEL-Elektrophorese, um die Probenkomplexität weiter reduzieren zu können (Tobolkina et al., 2012). Die Quantifizierung und Identifizierung der Proteine erfolgte mittels LC-MS/MS (siehe Abschnitt 3.3.1). Insgesamt wurden 4 Replikate der Analysen durchgeführt.

In den Analysen ohne Vorfraktionierung konnten 62 Proteine quantifiziert und identifiziert werden. Durch die Vorfraktionierung konnte die Zahl auf insgesamt 195 identifizierte Proteine erhöht werden, von denen 42 auch in den vorangegangenen Analysen ohne Vorfraktionierung enthalten waren. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass mit aufwändigeren Fraktionierungstechniken auf der Ebene der Proteine, wie der OFFGEL-Elektrophorese (Ernoul et al., 2008), auch eine signifikante Steigerung der Anzahl identifizierter Proteine

erreicht werden kann. Hanash konnte 2010 zeigen, dass durch das Einführen einer weiteren Trennstufe auf Ebene der Proteine diese Zahl noch einmal deutlich gesteigert werden kann (Zhang et al., 2011) und sich der Mehraufwand an Zeit und finanziellen Ressourcen in der Anzahl der identifizierten Proteine widerspiegelt.

Im Rahmen der Proteomanalyse der mit RCT I behandelten Patientenproben konnten 8 Proteine identifiziert werden, die den geforderten Regulationskriterien (Abschnitt 3.3.1.1) entsprachen und eine Diskriminierung von Respondern und Non-Respondern erlauben.

Dabei sind TPM1, CALD1, TAGLN, FLNB und WDR1 der Gruppe der aktinbindenden Proteine zuzuordnen, TUBA4A zu den Zytoskelett-Proteinen, LUM zu den kollagenbindenden Proteinen. Die Transketolase (TKT) ist ein zentrales Protein der Glykolyse.

Beim Vergleich der Expressionsprofile mit RCT II behandelter Rektumkarzinomproben entsprachen 12 Proteine den geforderten Regulationskriterien (Abschnitt 3.3.1.1). Davon konnten TPM1, TAGLN, PLEC1, MYH11 und FLNA den aktinbindenden Proteinen zugeordnet werden. SHROOM4 ist ein Zytoskelett-Protein und MFAP4 ein kollagenbindendes Protein. ALDH1B1 und TKT sind bei verschiedenen Stoffwechselprozessen (Alkohol Metabolismus, Glykolyse) beteiligt, während HADHA und VDAC2 im mitochondrialen Metabolismus eine Rolle spielen. S100A4 wurde im Zusammenhang mit diversen Zellzyklusprozessen beschrieben. Das Expressionsverhalten von Transketolase (TKT), Caldesmon 1 (CALD1), HADHA und Transgelin (TAGLN) erlaubte bei beiden Therapieformen eine Diskriminierung von Respondern und Non-Respondern. Sie wurden deshalb weiteren Validierungsschritten unterzogen. Zusätzlich wurden aus den insgesamt 16 gefundenen potenziellen Markerproteinen jene für eine weitere Validierung ausgewählt, die bereits in der Literatur im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren beschrieben worden waren (Abschnitt 3.3.1.2.2).

4.2.2 Validierung potenzieller Stratifizierungsmarker für Radiochemotherapie beim Rektumkarzinom mithilfe der Western-Blot-Methode und IHC

Alle 13 (inklusive Antikörper für die Kontrolle) für die Western-Blots eingesetzten Antikörper wurden zunächst an dem Proteinsolubilisat einer Kolontumorzelllinie (SW480) in Bezug auf Sensitivität und Spezifität ausgetestet. Für VCP, HADHA, ALDH1B1, TUBA4A

und CALD1 konnte im eingesetzten Mengenbereich von 1–10 µg eine konzentrationsabhängige Anfärbung der Proteine gezeigt werden. Für WDR1, TKT, TPM1 und TAGLN war mit der eingesetzten Proteinmenge keine lineare Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen bzw. war bei eingesetzten 10 µg Gesamtprotein die Nachweisgrenze des Proteins nahezu erreicht. Die Proteine MFAP4, S100A4, VDAC2 und LUM konnten mit den gewählten Antikörpern in SW480 nicht nachgewiesen werden und wurden deshalb für die weitere Validierung nicht mit einbezogen.

Es zeigte sich, dass die Proteinmenge, die für eine Quantifizierung der nachzuweisenden Proteine notwendig war, nur noch von 14 Patienten zur Verfügung stand. Auch bei diesen Analysen konnte nicht für jedes Protein ein eigener Blot durchgeführt werden, sondern musste nach Strippen der Antikörper mehrfach der gleiche Blot verwendet werden.

Die Western-Blot-Analysen erfolgten deshalb mit dem Proteinsolubilisat von 6 Patienten der RCT I (3 Responder und 3 Non-Responder) und 8 Patienten der RCT II (4 Responder und 4 Non-Responder). Biopsiematerial dieser Patienten war bereits für die ICPL-Analysen verwendet worden.

Leider hat sich gezeigt, dass mit einer Ausgangsmenge von 20 µg Gesamtprotein der Rektumkarzinomproben für nahezu alle zu quantifizierenden Proteine die Grenze der Nachweisbarkeit erreicht war. Für Transketolase (TKT) konnte bei RCT I eine reduzierte Expressionsrate bei Non-Respondern, entsprechend den ICPL-Experimenten, gezeigt werden. Caldesmon 1 (CALD1) zeigte eine deutlich erhöhte Expression bei einem der drei Non-Responder. Für RCT II war nur ein Protein (HADHA) in ausreichender Menge nachweisbar. Es war jedoch bei allen Patienten unterschiedlich stark exprimiert, mit der Tendenz einer erhöhten Expression bei Non-Respondern. Da kein Biopsiematerial mehr zur Verfügung stand, konnte keine weitere Validierung für die in den ICPL-Experimenten identifizierten Proteine mehr durchgeführt werden.

Ein weiterer Validierungsschritt an einer größeren Patientenkohorte wurde deshalb nur für die drei Kandidatenproteine (RCT I: TKT und CALD1; RCT II: HADHA) durchgeführt, die auch bei den Western-Blots einen signifikanten Unterschied in der Expressionsrate zwischen Respondern und Non-Respondern, entsprechend den ICPL-Experimenten, besaßen.

Dazu erfolgte die immunhistologische Anfärbung (IHC) von Dünnschnittschnitten von Patienten mit Rektumkarzinom. Mit der IHC konnte jedoch allein das HADHA (RCT II) signifikant in Dünnschnittschnitten nachgewiesen werden und zeigte eine erhöhte Expression bei Non-Respondern, wobei jedoch die Ergebnisse eine breite Streuung aufwiesen (Durchführung durch die Kooperationseinheit von Prof. Dr. med. Roland S. Croner,

Geschäftsführender Oberarzt, Chirurgische Klinik, Universitätsklinikum Erlangen). TKT und CALD1 konnten mit den gewählten Antikörpern nicht in paraffinfixierten Schnitten nachgewiesen werden. Eine Wiederholung dieser Analysen mit für Paraffinschnitte geeigneteren Antikörpern sollte jedoch für diese beiden Proteine ähnliche Ergebnisse erzielen wie für HADHA.

4.2.2.1 Transketolase (TKT)

Für Transketolase (TKT) wurde bei RCT I eine erniedrigte Expression ($\leq 0,38$) bei Non-Respondern in den ICPL-Experimenten gezeigt und mit der Western-Blot-Analyse zumindest teilweise bestätigt.

Die Transketolase gehört zu der Familie der Thiamindiphosphat (ThDP)-Enzyme. Es katalysiert den nicht-oxidativen Zweig des Pentose-Phosphat-Signalwegs. In der Arbeit von Zhao wurde gezeigt, dass das TKT-Enzym in Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen, Diabetes und Krebs eine reduzierte Aktivität besitzt (Zhao and Zhong, 2009). In der Arbeiten von Shin (Shin et al., 2009) erfolgte ein Vergleich von kolorektalen Karzinom-Zelllinien, die eine Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum 5-FU aufweisen, mit der Vorläufer Zelllinie SNU-C4. Diese Proteomanalyse wurde ebenfalls mit der ICPL-Technologie durchgeführt. Shin konnte dabei eine erhöhte Expression von Enzymen der Glykolyse [wie Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, Pyruvat Kinase M2 (PK-M2), Transketolase und NADP(1)-dependent Malic Enzyme 1] in den 5-FU-resistenten Zelllinien feststellen. Das schlechte Ansprechen von Patienten mit CRC auf die Behandlung mit 5-FU scheint in direkter Korrelation mit dem Expressionsverhalten der Glykolyse-Enzyme zu stehen. Xu und seine Mitarbeiter zeigten, dass eine Inhibierung der Glykolyse den Kolonkrebszellen ermöglicht, die Resistenz gegen das Medikament zu umgehen (Xu et al., 2005). Krebszellen zeigen im Allgemeinen eine erhöhte Aktivität der Glykolyse, um ATP zu generieren. Dies ist als Warburg-Effekt bekannt und bedingt durch mitochondriale Fehlfunktionen wie Hypoxie, was in vielen Fällen mit der Ausbildung einer Resistenz gegenüber therapeutischen Medikamenten verbunden ist (Zu and Guppy, 2004).

Es ist ebenfalls bekannt, dass unzureichende Sauerstoffversorgung des Tumors das Zellwachstum negativ beeinflusst, indem Gene vermehrt exprimiert werden, die zur Ausbildung von Blutgefäßen führen, ebenso wie Gene, die metastatische Faktoren produzieren. Dies führt in der Folge zur Ausbildung verstärkt maligner Phänotypen. Der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF)-1 ist dabei ein Haupttranskriptionsaktivator

sauerstoffregulierter Gene und ist konstitutiv hochreguliert bei verschiedenen Tumorerkrankungen (Unruh et al., 2003; Meijer et al., 2012).

Das Expressionsverhalten der Transketolase, dem Bindeglied von Glykolyse und Pentosephosphatweg, könnte in Kombination mit dem Expressionsmuster anderer Proteine eine Vorhersage über den Behandlungserfolg mit 5-FU/FA erlauben.

4.2.2.2 Caldesmon 1 (CALD1)

Für Caldesmon 1 (CALD1) wurde bei RCT I eine erhöhte Expression ($\geq 3,16$) bei Non-Respondern im Rahmen der ICPL-Experimente gezeigt. Die Ergebnisse konnten mit der Western-Blot-Analyse leider nur bei einem Patienten bestätigt werden.

Das Protein Caldesmon gehört zu den aktin- und myosinbindenden Proteinen. Die Isoform 1 kommt hauptsächlich in den glatten Muskelzellen („smooth muscle cells“) mit hohem Molekulargewicht (89–90 kDa) vor (Hayashi et al., 1992). Die Isoformen 2, 3, 4 und 5 kommen in nicht Muskelzellen mit geringem Molekulargewicht (59–63 kDa) vor. Die Isoformen werden durch alternatives Splicing generiert. Das CALD1, welches in dieser Arbeit identifiziert wurde, wird zum „smooth muscle“ Caldesmon gezählt. Es ist ein multifunktionelles Protein, welches an Aktin, Calmodulin, Tropomyosin und Myosin bindet (Matsumura and Yamashiro, 1993; Wang, 2008). Es gehört auch zu den Trägerproteinen vieler Proteinkinasen und wird in Verbindung mit der Regulierung zellulärer Kontraktionen gebracht (Mayanagi and Sobue, 2011). In der Arbeit von Kim (Kim et al., 2012) erfolgte die Analyse von tumorösem bzw. gesundem Gewebe aus Patienten mit kolorektalen Karzinomen (UICC III/IV), die neoadjuvant mit 5-FU und Strahlentherapie behandelte wurden. Kim konnte zeigen, dass Caldesmon in tumorösen Zellen eine höhere Expression aufweist und eins der wichtigsten calmodulinbindenden Proteine des gastrointestinalen Traktes darstellt. Calmodulin, als universelles Protein des Zytoplasmas, reguliert neben der Kalziumkonzentration in intestinalem Gewebe auch das Wachstums und die Differenzierung von normalen und neoplastischen Zellen (McGarrity et al., 1991). Zusätzlich konnte Kim eine Korrelation zwischen einer erhöhten Expression von Caldesmon und der Malignität eines Kolonkarzinoms feststellen. Das Expressionsverhalten von Caldesmon könnte also auch für die in dieser Arbeit beschriebenen Therapien ein Indikator für das Ansprechen auf die Behandlung sein.

4.2.2.3 HADHA

Für HADHA [„Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase/3-Ketoacyl-CoA Thiolase/Enoyl-CoA Hydratase (Trifunctional Protein), alpha subunit“, „Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial“, 78 kDa Gastrin-binding Protein oder TP-alpha] wurde bei Patienten, die mit RCT II behandelt wurden, eine reduzierte Expression ($\leq 0,38$) bei Non-Respondern in den ICPL-Experimenten gezeigt. Mit der Western-Blot-Analyse zeigte sich ein sehr heterogenes Expressionsverhalten bei den einzelnen Patienten. Ein Ergebnis, das auch durch IHC bestätigt wurde, mit einer Tendenz einer erhöhten Expression bei Non-Respondern.

HADHA gehört, als alpha-Untereinheit, zusammen mit HADHB, der beta-Untereinheit, zum mitochondrialen „Trifunctional“ Protein (TFP). Es ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert die letzten drei Schritte der mitochondrialen Beta-Oxidation langkettiger Fettsäuren. HADHA (79 kDa) besitzt als Enoyl-CoA-Hydratase und als 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase zwei enzymatische Funktionen. Die beta-Untereinheit (47 kDa) übernimmt eine dritte Funktion, die Spaltung des 3-Ketoacyl-CoA Substrates (Fould et al., 2010). Es sind verschiedene Mangelfunktionen von TFP, in Zusammenhang mit der Fehlfunktion der 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase beschrieben, die sogar lebensbedrohliche Folgen nach sich ziehen können (Spiekerkoetter, 2010). In den Arbeiten von Mamtani (Mamtani and Kulkarni, 2012) konnte gezeigt werden, dass bei 18–30% der Brustkrebspatienten eine verringerte Expression von HADHA vorliegt. Die Arbeitsgruppe von Kageyama (Kageyama et al., 2011) konnte mit der 2D-DIGE-Methode, im Vergleich von cisplatinresistenten mit -sensitiven Lungenkarzinomzelllinien, eine erhöhte Expression von HADHA in cisplatinresistenten Zellen feststellen. Kageyama konnte eine erhöhte Expression von HADHA ebenso in Biopsiematerial (Lungenkarzinom und Lungenadenokarzinom) von Patienten nachweisen, die eine Resistenz gegenüber einer Therapie mit Platinderivaten aufwiesen.

Diese Befunde konnten für Rektumkarzinom-Patienten in der vorliegenden Arbeit teilweise bestätigt werden. Eine erhöhte Expression von HADHA war bei der RCT II mit 5-FU/FA Oxaliplatin (Platinderivat) und einer Gesamtstrahlendosis von 50,4 Gy bei einigen Patienten mit einem schlechten Ansprechen der Therapie verbunden.

Fasst man die erhaltenen Daten zusammen, so lässt sich daraus bisher kein einzelner Marker zur Stratifizierung der Patienten ableiten. Eine signifikant verminderte Expression einiger Proteine, wie z.B. Caldesmon 1 und HADHA, nachgewiesen in den gepoolten

Gewebeproben, konnte nur bei einigen Patienten mittels Western-Blot-Analysen bestätigt werden. Auch der immunhistochemische Nachweis zeigte eine breite Streuung der Expressionsrate von HADHA bei Respondern und Non-Respondern.

Diese Ergebnisse stellen die Validität von Proteomanalysen gepoolter Ausgangsproben in Frage. Poolen von Proben für Proteomics-Experimente ist dort weit verbreitet, wo eingeschränkte finanzielle Ressourcen, Geräteengpässe und Zeitmangel die Wissenschaftler zwingen, die Anzahl biologischer Replikate möglichst gering zu halten. Ein weiterer Grund sind geringe Probenmengen von Einzelindividuen, wie dies in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Auch sollte durch Poolen der Einfluss der biologischen Variabilität auf die Analyseergebnisse möglichst ausgeschaltet werden, wobei Unterschiede, die aufgrund unterschiedlicher Behandlung hervorgerufen werden, sogar deutlicher zutage treten (Diz et al., 2009). Letzteres trifft jedoch nur zu, wenn die Anzahl der gepoolten Proben sehr groß ist. In den beschriebenen Experimenten wurden jedoch nur 5 Proben einer Patientenkohorte vereinigt und die Pools gegeneinander verglichen. Wie sich bei den Western-Blots zeigte, waren die Expressionsraten einzelner Proteine bei den einzelnen Patienten sehr unterschiedlich. Wurden also bei der zufälligen Auswahl der wenigen Patienten für die Pools der ICPL-Experimente solche gewählt, die besonders hohe oder auch besonders niedrige Expressionsraten für bestimmte Proteine aufwiesen, so konnte das Ergebnis in eine bestimmte Richtung verschoben werden.

Keines der ausgewählten Proteine konnte zwar in den Validierungsexperimenten Non-Responder eindeutig von Respondern unterscheiden, eine multivariate Analyse einer größeren Anzahl derartig regulierter Proteine könnte jedoch aus einer Vielzahl wenig aussagekräftiger Einzelproteine Regulationsmuster errechnen, die eine Unterscheidung der beiden Gruppen erlauben (Jeong et al., 2012).

Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass prinzipiell mit den beschriebenen Projekten ein Panel an Markerproteinen gefunden werden kann. Allerdings muss die Anzahl der Proteine eines derartigen Panels deutlich größer sein, um eindeutig Responder von Non-Respondern unterscheiden zu können. Um dies zu erreichen, müssen für zukünftige Projekte folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- Es muss mehr Gesamtprotein der Einzelpatienten als Ausgangsmaterial für die Analysen zur Verfügung stehen, um aufwändige Fraktionierungsschritte durchführen zu können.
- Laser Capture Mikrodisektion muss als Vorfraktionierungsschritt am Darmgewebe vorgenommen werden können.

- Wenn möglich, sollte auf Poolen von Proben innerhalb einer Patientenkohorte verzichtet werden.
- Für die Analytik ist Isotopen-Labeling (ICPL) unabdingbar.
- Multidimensionale, orthogonale Trennschritte sollten die Gesamtzahl zu quantifizierender Proteine deutlich erhöhen und damit ermöglichen, auch weniger abundante Proteine zu identifizieren. Dies setzt voraus, dass genügend finanzielle Ressourcen und massenspektrometrische Messkapazität zur Verfügung stehen.
- Eine genügend große Anzahl an Patientenproben (Biopsien und formalinfixierte Schnitte) muss zu Verfügung stehen, um Selektivität und Spezifität eines identifizierten Panels validieren zu können.
- Geeigneten Antikörper müssten für die Validierung zur Anwendung kommen. Alternativ kann „Selective Reaction Monitoring“ (SRM) zur Validierung etabliert werden. Ein SRM-Assay könnte dann auch als Analytik-Tool in der Routineanalytik verwendet werden. Unter Einsatz von isotopengelabelten Peptiden als Referenz könnten auf diese Weise bis zu 50 Proteinspezies in einem LC-MS/MS-Lauf hoch selektiv und sensitiv absolut quantifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Strategie zur Durchführung einer personalisierten/individualisierten Proteomanalyse von Patientenproben zu untersuchen und unter besonderer Berücksichtigung der Stratifizierung von Patienten zu optimieren. Besondere Herausforderungen waren die enorme Komplexität der Proteine eines Proteoms und der weite Konzentrationsbereich der einzelnen Proteinspezies. Als Probenmaterial dienten Plasma und Tumorgewebe zweier biologischer Modellsysteme.

Als erstes Modellsystem wurde Nebennierengewebe von Patienten mit Conn-Syndrom verwendet. Es wurde das Proteom normaler Bereiche der Nebennierenrinde mit dem Proteom tumoröser Zellen der Nebennierenrinde von 4 Patienten (8 Proben) verglichen. Die technische Durchführung erfolgte, indem zweimal vier Proben mit den Isotopologen des ICPL-Reagens umgesetzt, vereinigt, proteolytisch gespalten und mittels LC-MS/MS analysiert wurden. Die Analyse der beiden Quadruplex-Ansätze erfolgte jeweils in drei technischen Replikaten. Es konnten insgesamt 274 Proteine in Ansatz A, bzw. 257 Proteine in Ansatz B identifiziert werden. 151 Proteine (A) bzw. 155 Proteine (B) wurden dabei in den technischen Replikaten beider Analysen überlappend quantifiziert und identifiziert. So konnten 90–95% der Proteine jedes Replikats in allen 3 Analysen wiedergefunden und identisch quantifiziert werden. Die gleichen Werte treffen auch beim Vergleich von Ansatz A und B (je 2 Patienten) zu. Diese große Übereinstimmung der Analyseergebnisse innerhalb der technischen Replikate zeigt die gute Reproduzierbarkeit der Experimente. Die geforderten Regulationskriterien (Regulationsfaktor $1,5 \geq 1 \geq 0,66$, $CV \leq 30\%$; mit mindestens zwei Quadruplets pro Protein und ein unique Peptid pro Protein) konnten zwar von mehreren Proteinen in den unterschiedlichen Patienten erfüllt werden, jedoch nur Lumican konnte im Probenmaterial aller vier Patienten im Tumor mit einer Expressionsrate von 0,5 im Vergleich zum normalen Probenmaterial identifiziert werden.

Zusätzlich zu den Gewebeproben wurde Plasma der gleichen Patienten analysiert. Das Blut wurde direkt an der linken (z.B. tumorös) und rechten (z.B. normalen) Nebennierenvene der Patienten entnommen. Nach Aufarbeitung zu EDTA-Plasma wurden die Proben in zwei verschiedenen Ansätzen weiter analysiert.

Im Rahmen der ersten Analyse wurde das Plasma der kranken Nebenniere mit dem der gesunden mittels 2D-DIGE verglichen. Es konnten jedoch nur hoch-abundante Proteine

identifiziert werden. Die zweite Analyse erfolgte deshalb nach der Depletion der ca. 100 höchst-abundanten Proteine mittels IgY14-Säule gefolgt von einer SuperMix-Säule. Die angereicherten Proteome wurden mithilfe der 2D-DIGE-Methode bzw. der ICPL-Technik weiter analysiert. Es konnten mit beiden Techniken eine größere Anzahl regulierter Proteine identifiziert und quantifiziert werden. Es handelte sich jedoch bei allen als reguliert identifizierten Proteinen um solche, die im Rahmen der Depletion abgereichert worden waren. Da anzunehmen war, dass die erzielten Ergebnisse durch eine schlecht reproduzierbare Depletion der hoch-abundanten Proteine zustande kamen, wurde die Depletion anhand einer Standardplasmaprobe auf Reproduzierbarkeit überprüft. Dazu wurde das EDTA-Plasma eines gesunden Probanden aliquotiert ($n = 12$), die hoch-abundanten Proteine depletiert und die 12 Restproteome mittels 2D-DIGE vergleichend analysiert.

Trotz identischer Bedingungen der Versuchsdurchführung konnten in der statistischen Auswertung quantitative Veränderungen von ca. 100 Proteinspots mit einem Regulationsfaktor von $2,0 \geq 0 \geq 0,5$ und einem p-Value kleiner 0,05 identifiziert werden. Dies zeigte, dass eine Depletion die Reproduzierbarkeit der Analysen von Plasma soweit verschlechtert, dass biologisch relevante Aussagen nicht mehr möglich sind.

Mit Lumican ist ein erstes, potenzielles Markerprotein aus dem Nebennierengewebe von Patienten mit Conn- Syndrom identifiziert. Für eine Stratifizierung von Patienten ist es jedoch notwendig, ein größeres Panel zu quantifizieren. Dazu müssen die beschriebenen Versuche mit deutlich mehr Ausgangsmaterial und einer größeren Patientenkohorte wiederholt werden.

Als zweites Modellsystem wurde Gewebe vom Rektumkarzinom verwendet. Verglichen wurde Gewebe von Patienten, die gut auf eine Radiochemotherapie angesprochen (Responder) haben, mit Gewebe von Patienten die schlecht/mittelmäßig (Non-Responder) auf diese Therapie angesprochen haben. Insgesamt wurde die Wirkung von zwei verschiedenen Radiochemotherapien (RCT I und RCT II) auf Patienten verglichen. Von den vier Patientenpopulationen stand Gewebe von je 5 Patienten zur Verfügung. Um homogene Zellpopulationen zu erhalten, wurde mittels LCM eine Vorfraktionierung durchgeführt. Das Material der 5 Patienten einer Gruppe wurde vereinigt und als Pool weiter analysiert. Jeder der vier Probenpools wurde mit einem der 4 ICPL-Isotopologen umgesetzt, die Proben vereinigt und gemeinsam weiter analysiert. Mit einem Aliquot erfolgte eine Vorfraktionierung der Proteine mittels OFFGEL-Elektrophorese, um die Probenkomplexität weiter reduzieren zu können. Die Quantifizierung und Identifizierung der Proteine erfolgte mittels LC-MS/MS. Insgesamt wurden 4 Replikate der Analysen durchgeführt. Ohne Vorfraktionierung konnten

62 Proteine quantifiziert und identifiziert werden. Durch die Vorfraktionierung konnte die Zahl auf insgesamt 195 identifizierte Proteine erhöht werden. Nach stringenter Festlegung der Regulationskriterien konnten 8 (RCT I) bzw. 12 (RCT II) Proteine als reguliert identifiziert werden. Eine weitere Validierung mittels Western-Blots wurde auf jene Proteine beschränkt, die bereits in der Literatur im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren beschrieben worden waren. 13 für die Validierung eingesetzte Antikörper wurden zunächst an dem Proteinsolubilisat einer Kolontumorzelllinie in Bezug auf Sensitivität und Spezifität ausgetestet. Die Antikörper gegen neun Proteine (VCP, HADHA, ALDH1B1, TUBA4A, CALD1, WDR1, TKT, TPM1, TAGLN) schienen für eine weitere Validierung geeignet. Mit dem zur Verfügung stehenden Probenmaterial der einzelnen Patienten war jedoch die Sensitivitätsgrenze der meisten Antikörper erreicht.

So konnten nur für die Transketolase mittels Western-Blot die Ergebnisse der Proteomanalysen bestätigt werden. Caldesmon 1 zeigte nur bei einem der 3 Non-Responder eine deutlich erhöhte Expression. HADHA war bei allen Patienten deutlich unterschiedlich exprimiert, mit einer Tendenz zur erhöhten Expression bei Non-Respondern. Diese Antikörper wurden dann für einen weiteren immunhistochemischen Validierungsschritt verwendet. Auf den Paraffin-Schnitten zeigte HADHA ebenfalls eine erhöhte Expression bei Non-Respondern. Die Antikörper gegen Transketolase und Caldesmon I waren für in Paraffin eingebettete Proben jedoch nicht geeignet.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass prinzipiell mit den beschriebenen Projekten unter Einsatz der ICPL-Technik Markerproteine für die Stratifizierung von Patienten identifiziert werden können. Allerdings muss die Anzahl der Proteine eines derartigen Panels deutlich erhöht werden. Dazu sind die Validierungen weiterer, bereits identifizierter Proteine mit geeigneten Antikörpern zu wiederholen.

Außerdem muss mehr Gesamtprotein der Einzelpatienten als Ausgangsmaterial für die Analysen zur Verfügung stehen. Dadurch können aufwändige, multidimensionale und orthogonale Trennschritte die Gesamtzahl zu quantifizierender Proteine deutlich erhöhen und damit ermöglichen, dass auch weniger abundante Proteine identifiziert werden können.

„Selective Reaction Monitoring“ (SRM) als hoch selektive und sensitive Technik könnte zur Validierung etabliert werden. Unter Einsatz von isotopengelabelten Peptiden als Referenz könnten auf diese Weise bis zu 50 Proteinspezies in einem LC-MS/MS-Lauf auch in der Routineanalytik absolut quantifiziert werden. Mittels multivariater Analyse könnten aus einem derartigen Panel Muster identifiziert werden, die eine Stratifizierung erlauben.

6 Summary

The aim of this study was to investigate a strategy for a personalized/individualized proteome analysis and to optimize it, considering the stratification of patients. The main challenge to overcome was the high protein complexity of a proteome and the enormous dynamic range of protein concentrations of different protein species. For proof of concept, plasma and human tumor tissue samples from two biological model systems were analyzed.

As first model system adrenal gland tissue from patients with Conn's Syndrome was used. The proteome was isolated from healthy areas of the adrenal cortex and compared to the proteome isolated from diseased areas of the same adrenal cortex of 4 patients (8 samples). Each of the samples (2 X 4 samples) was labeled with one of the four ICPL-isotopologes (generating 2 quadruplex approaches) and pooled according to each approach. The proteins were digested into peptides, those being analyzed by LC-MS/MS. Of both quadruplex approaches 3 technical replicates were analyzed. In total 274 and 257 proteins were identified in approach A and approach B respectively. Within each replicate 151 proteins (A) and 155 proteins (B) could be quantified and identified as being identical, resulting in an overlap of 90–95% of proteins. The same values could be achieved for approach A and B (2 patients each). The data generated within the technical replicates indicate a high reproducibility of the experimental analysis. The requested regulation criteria (minimum of two multiplets per protein and one unique peptide per protein, differential expression of $1.5 \geq 1 \geq 0.66$, $CV \leq 30\%$) were applicable for some proteins in various patients, but only Lumican (differential expression of 0.5 in tumor samples) could fulfill the criteria in all 4 patients.

Besides adrenal gland tissue also blood collected directly from the left (e.g., diseased) and from the right (e.g., healthy) adrenal gland vein of the same patients was investigated. The samples were prepared as EDTA-plasma and analyzed in two different ways.

Within the first analysis, 2D-DIGE was used to compare the plasma proteome taken from the diseased adrenal gland vein with the plasma proteome taken from the healthy adrenal gland vein. Thereby, only high abundant proteins could be identified and quantified. Therefore, the second analysis was performed after depletion of approximately 100 high abundant proteins via IgY14 column followed by the SuperMix column. Using 2D-DIGE or ICPL for the analysis of the depleted plasma proteome a higher number of regulated proteins could be

quantified and identified. However, all proteins identified as regulated were among those proteins that had been depleted by the IgY14 and SuperMix columns. These results implicated that the depletion of the high abundant proteins could not be performed in a reproducible manner. Therefore, the reproducibility of the depletion step was verified using a standard plasma sample. The EDTA-plasma of a healthy test person was split into 12 aliquots. The high abundant proteins of each sample were depleted separately again using both columns. The depleted proteomes were analyzed in 2D-DIGE.

Despite identical experimental conditions about 100 proteins were identified and quantified with a regulation factor of $2.0 \geq 0 \geq 0.5$ and a p-value ≤ 0.05 . This data clearly show that biological relevant conclusions cannot be drawn, depending on the poor reproducible depletion of high abundant plasma proteins.

With Lumican a first potential marker protein could be identified from adrenal gland tissue which might help patients with Conn's Syndrome being stratified. Nevertheless, it is necessary to identify a larger panel of proteins to clearly stratify patients in their therapeutic treatment. It is necessary to use more sample material to start with and a larger patient cohort.

As second model system rectal cancer tissue was used. Tissue from patients who were responder to neoadjuvant chemoradiation (nCRT) I or II was compared to tissue from patients who did not respond to therapy with above mentioned nCRTs. Tissue from 5 patients of each cohort according to nCRT (overall 20 samples) was compared to each other. To achieve homogeneous cell populations a prefractionation using laser capture microdissection (LCM) was done. Samples of the 5 patients of each nCRT group were combined and processed as a pool. Each of those 4 sample pools was labeled with one of the 4 ICPL isotopes. After combining the ICPL labeled proteins, one aliquot was taken for a further fractionation step using OFFGEL electrophoresis to reduce sample complexity. The other aliquot was used without any further fractionation step. The proteins of each fraction were enzymatically cleaved into peptides and quantified as well as identified using LC-MS/MS. Two technical replicates of each approach were analyzed. Without any fractionation step 62 proteins could be quantified and identified. Using OFFGEL fractionation the number of quantified and identified proteins could be increased to 195. After having defined stringent regulation criteria ($2.5 \geq 1 \geq 0.4$, $CV \leq 20\%$), 8 (RCT I) and 12 (RCT II) proteins could be identified as differentially regulated, discriminating between responder and non-responder. Further validation steps were restricted to proteins having been described already in context with cancer development. 13 antibodies were tested in terms of sensitivity and specificity using

solubilized protein from a colon cancer cell line. 9 antibodies (VCP, HADHA, ALDH1B1, TUBA4A, CALD1, WDR1, TKT, TPM1, TAGLN) seemed to be suitable for use in further validation. However, the limit of antibody sensitivity was reached the amount of protein available from each patient sample.

Thus, only for Transketolase the results of the proteome analyses could be confirmed by western blot analysis. Caldesmon 1 only showed elevated expression in one of three patients. HADHA showed expression levels differing in all patients with a tendency of being elevated in Non-Responders. The antibodies towards these proteins were used for a further immunohistochemical validation step. Tumor biopsies of an independent patient cohort (n = 37) were analyzed by immunohistochemistry (IHC) showing also increased levels of HADHA. The antibodies against Transketolase and Caldesmon 1 seemed not suitable for use in paraffin embedded biopsies.

In principle these results demonstrate that the described strategy using the ICPL technology is able to identify marker proteins for patient stratification. However, it is essential to notably increase the number of proteins applied in a stratification panel. A first step should be to revalidate proteins already identified as potential marker with antibodies more suitable for western blot analysis and immunohistochemistry. Furthermore it is necessary to increase the available amount of starting material from each patient. Thus, sophisticated, multidimensional, and orthogonal separation steps will help to increase the number of identified proteins significantly, enabling also the quantification and identification of low abundant proteins.

Selective Reaction Monitoring (SRM), a highly selective and sensitive technique, could be established for data validation. The use of isotopic labeled peptides as reference could help to absolutely quantify up to 50 protein species in a single LC-MS/MS run, a technology which could be used for routine analyses, too. Multivariate analysis could help to identify regulation pattern enabling the stratification of patients.

7 Literaturverzeichnis

- Aebersold,R. and Mann,M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207.
- Anderson,N.L. and Anderson,N.G. (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 1, 845-867.
- Bantscheff,M., Schirle,M., Sweetman,G., Rick,J., and Kuster,B. (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: A critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1017-1031.
- Beilke,D., Weiss,R., Löhr,F., Pristovsek,P., Hannemann,F., Bernhardt,R., and Rüterjans,H. (2002). A new electron transport mechanism in mitochondrial steroid hydroxylase systems based on structural changes upon the reduction of adrenodoxin. *Biochemistry* 41, 7969-7978.
- Benson 3rd.,A.B., Guillem,J.G., and Minsky,B.D. (2011). Have the changes in treatment of rectal cancer made a significant difference to our patients? *Oncology* 25, 1323-1329.
- Biringer,R.G., Amato,H., Harrington,M.G., Fonteh,A.N., Riggins,J.N., and Hühmer,A.F.R. (2006). Enhanced sequence coverage of proteins in human cerebrospinal fluid using multiple enzymatic digestion and linear ion trap LC-MS/MS. *Brief. Funct. Genomics Proteomics* 5, 144-153.
- Born-Frontsberg,E. and Quinkler,M. (2009). Conn's syndrome. *Internist* 50, 17–20.
- Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brunner,A., Keidel,E.M., Dosch,D., Kellermann,J., and Lottspeich,F. (2010). ICPLQuant - A software for non-isobaric isotopic labeling proteomics. *Proteomics* 10, 315-326.
- Cardoso,J., Molenaar,L., De Menezes,R.X., Van Leerdam,M., Rosenberg,C., Möslein,G., Sampson,J., Morreau,H., Boer,J.M., and Fodde,R. (2006). Chromosomal instability in MYH- and APC-mutant adenomatous polyps. *Cancer Res.* 66, 2514-2519.
- Carethers,J.M. (2012). Proteomics, Genomics, and Molecular Biology in the Personalized Treatment of Colorectal cancer. *J. Gastrointest. Surg.* 16, 1648-1650.
- Carls Zeiss MicroImaging, Palm protocols. (2010). Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, 1-26.
- Ceelen,W.P., Van Nieuwenhove,Y., and Fierens,K. (2009). Preoperative chemoradiation versus radiation alone for stage II and III resectable rectal cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

Chakraborty,A. and Regnier,F.E. (2002). Global internal standard technology for comparative proteomics. *J. Chromatogr. A* 949, 173-184.

Chelius,D. and Bondarenko,P.V. (2002). Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using Liquid-chromatography and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 1, 317-323.

Chin,L. and Gray,J.W. (2008). Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature* 452, 553-563.

Com,E., Clavreul,A., Lagarrigue,M., Michalak,S., Menei,P., and Pineau,C. (2012). Quantitative proteomic Isotope-Coded Protein Label (ICPL) analysis reveals alteration of several functional processes in the glioblastoma. *J. Proteomics* 75, 3898-3913.

Conn,J.W. (1955). Presidential address. Part I. Painting background Part II. Primary aldosteronism, a new clinical syndrome. *J. Lab. Clin. Med.* 45, 3-17.

Coombs,K.M. (2011). Quantitative proteomics of complex mixtures. *Expert Rev. Proteomics* 8, 659-677.

Datenblatt Santa Cruz Biotechnologie, Inc.; VCP (F-5): sc-133211.

De St.Groth,S.F., Webster,R.G., and Datyner,A. (1963). Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* 71, 377-391.

Diz,A.P., Truebano,M., and Skibinski,D.O.F. (2009). The consequences of sample pooling in proteomics: An empirical study. *Electrophoresis* 30, 2967-2975.

Dong,J., Melm,C., Chapman,H., Fan,F., Chen,D.E., and Duewel,H. (2008). Development of Two Multiplex Immunoassays and Preliminary Application in Determining Protein Depletion for Seppro IgY14/SuperMix Depletion Columns. *Protein Technology and Assay, Research Biotechnology, Sigma-Aldrich Corporation*, 13-15.

Dolhnikoff,M., Morin,J., Roughley,P.J., and Ludwig,M.S. (1998). Expression of lumican in human lungs. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 19, 582-587.

Duan,X., Young,R., Straubinger,R.M., Page,B., Cao,J., Wang,H., Yu,H., Canty,J., and Qu,J. (2009). A straightforward and highly efficient precipitation/on-pellet digestion procedure coupled with a long gradient nano-LC separation and orbitrap mass spectrometry for label-free expression profiling of the swine heart mitochondrial proteome. *J. Proteome Res.* 8, 2838-2850.

Echan,L.A., Tang,H.Y., Ali-Khan,N., Lee,K., and Speicher,D.W. (2005). Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* 5, 3292-3303.

Eitner,K., Koch,U., Gaweda,T., and Marciniak,J. (2010). Statistical distribution of amino acid sequences: A proof of darwinian evolution. *Bioinformatics* 26, 2933-2935.

- Elliott,M.H., Smith,D.S., Parker,C.E., and Borchers,C. (2009). Current trends in quantitative proteomics. *J. Mass Spectrom.* 44, 1637-1660.
- Ernault,E., Gamelin,E., and Guette,C. (2008). Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation. *Proteome Sci.* 6.
- Ernault,E. and Guette,C. OFFGEL-isoelectric focusing fractionation for the analysis of complex proteome. *Li,K. W.57*, 145-158. 2011.Ref Type: Serial (Book, Monograph).
- Espina,V., Milia,J., Wu,G., Cowherd,S., and Liotta,L.A. (2006). Laser capture microdissection. *Methods Mol. Biol.* 319, 213-229.
- Ettan DIGE Imager, User Manual 11-0036-59 Edition AC. (2004). GE Healthcare.
- Fang,X., Wang,C., Balgley,B.M., Zhao,K., Wang,W., He,F., Weil,R.J., and Lee,C.S. (2012). Targeted tissue proteomic analysis of human astrocytomas. *J. Proteome Res.* 11, 3937-3946.
- Fearon,E.R., and Vogelstein,B. (1990). A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Fenn,J.B., Mann,M., Meng,C.K., Wong,S.F., and Whitehouse,C.M. (1989). Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* 246, 64-71.
- Ferlay,J., Autier,P., Boniol,M., Heanue,M., Colombet,M., and Boyle,P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology* 18, 581-592.
- Fischer,A.H., Jacobson,K.A., Rose,J., and Zeller,R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissueand cell sections. *Cold Spring Harbor Protoc.* 3.
- Fleron,M., Greffe,Y., Musmeci,D., Massart,A.C., Hennequiere,V., Mazzucchelli,G., Waltregny,D., De Pauw-Gillet,M.C., Castronovo,V., De Pauw,E., and Turtoi,A. (2010). Novel post-digest isotope coded protein labeling method for phospho- and glycoproteome analysis. *Journal of Proteomics* 73, 1986-2005.
- Fould,B., Garlatti,V., Neumann,E., Fenel,D., Gaboriaud,C., and Arlaud,G.J. (2010). Structural and functional characterization of the recombinant human mitochondrial trifunctional protein. *Biochemistry* 49, 8608-8617.
- Gauci,V.J., Wright,E.P., and Coorsen,J.R. (2011). Quantitative proteomics: Assessing the spectrum of in-gel protein detection methods. *J. Chem. Biol.* 4, 3-29.
- Geiger,T., Cox,J., and Mann,M. (2010). Proteomic changes resulting from gene copy number variations in cancer cells. *PLoS Genet.* 6.
- Görg,A. and Weiss,W. (2009). High-resolution two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* 564, 13-32.
- Görg,A., Weiss,W., and Dunn,M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665-3685.

- Gygi,S.P., Rist,B., Gerber,S.A., Turecek,F., Gelb,M.H., and Aebersold,R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* 17, 994-999.
- Hanada,N., Takahata,T., Zhou,Q.L., Ye,X.L., Sun,R.W., Itoh,J., Ishiguro,A., Kijima,H., Mimura,J., Itoh,K., Fukuda,S., and Saijo,Y. (2012). Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human Colorectal cancer. *Bmc Cancer* 12.
- Havinga,J.R., Lohse,P., and Beisiegel,U. (1987). Immunoblotting and ligand blotting of the low-density lipoprotein receptor of human liver, HepG2 cells and HeLa cells. *Febs Lett.* 216, 275-280.
- Hayashi,K., Yano,H., Hashida,T., Takeuchi,R., Takeda,O., Asada,K., Takahashi,E.I., Kato,I., and Sobue,K. (1992). Genomic structure of the human caldesmon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 12122-12126.
- Hermesen,M., Postma,C., Baak,J., Weiss,M., Rapallo,A., Sciutto,A., Roemen,G., Arends,J., Williams,R., Giaretti,W., De Goeij,A., and Meijer,G. (2002). Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 123, 1109-1119.
- Heukeshoven,J., and Dernick,R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32.
- Hubner,N.C., Ren,S., and Mann,M. (2008). Peptide separation with immobilized pI strips is an attractive alternative to in-gel protein digestion for proteome analysis. *Proteomics* 8, 4862-4872.
- Ishiwata,T., Cho,K., Kawahara,K., Yamamoto,T., Fujiwara,Y., Uchida,E., Tajiri,T., and Naito,Z. (2007). Role of lumican in cancer cells and adjacent stromal tissues in human pancreatic cancer. *Oncol. Rep.* 18, 537-543.
- Jessup,J.M., Gunderson,L.L., Greene,F.L., Washington,M.K., Compton,C.C., Sobin,L.H., Minsky,B., Goldberg,R.M., and Hamilton,S.R. (2011). 2010 Staging System for Colon and Rectal Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology* 18, 1513-1517.
- Jeong, S-K., Na, K., Kim, K-Y., Kim, H., and Paik, Y-K. (2012). PanelComposer: A Web-Based Panel Construction Tool for Multivariate Analysis of Disease Biomarker Candidates. *Proteome Res.* 11, 6277-6281.
- Jones,S., Chen,W.D., Parmigiani,G., Diehl,F., Beerenwinkel,N., Antal,T., Traulsen,A., Nowak,M.A., Siegel,C., Velculescu,V.E., Kinzler,K.W., Vogelstein,B., Willis,J., and Markowitz,S.D. (2008). Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4283-4288.

- Kageyama,T., Nagashio,R., Ryuge,S., Matsumoto,T., Iyoda,A., Satoh,Y., Masuda,N., Jiang,S.X., Saegusa,M., and Sato,Y. (2011). Hadha is a potential predictor of response to platinum-based chemotherapy for lung cancer. *Asian Pac. J. Cancer Preven.* 12, 3457-3463.
- Karas,M., and Hillenkamp,F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299-2301.
- Keller,A., Eng,J., Zhang,N., Li,X.J., and Aebersold,R. (2005). A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats. *Molecular Systems Biology* 1.
- Kellermann, J., and Lottspeich, F. Isotope-coded protein label. *Katrin, M.* 893, 143-153. 2012. Ref Type: Serial (Book,Monograph).
- Kellermann, J., von Hagen. (2008). Sample Preparation for Differential Proteome Analysis: Labeling Technologies for Mass Spectrometry. Wiley-VCH, Weinheim, Proteomics sample preparation, Kapitel 4.4, 105-118.
- Kim,H.J., Yu,M.H., Kim,H., Byun,J., and Lee,C. (2008). Noninvasive molecular biomarkers for the detection of Colorectal cancer. *Bmb Reports* 41, 685-692.
- Kim,K.H., Yeo,S.G., Kim,W.K.I., Kim,D.Y., Yeo,H.Y., Hong,J.P., Chang,H.J., Park,J.W., Kim,S.Y., Kim,B.C., and Yoo,B.C. Up-regulated expression of l-caldesmon associated with malignancy of Colorectal cancer. *Bmc Cancer* . 2012. Ref Type: In Press.
- Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (1996). Lessons from hereditary Colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.
- Kleihues,P., and Sobin,L.H. (2000). World health organization classification of tumors. *Cancer* 88, 2887.
- Klose,J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26, 231-243.
- Krüger,M., Moser,M., Ussar,S., Thievensen,I., Lubber,C.A., Forner,F., Schmidt,S., Zanivan,S., Fässler,R., and Mann,M. (2008). SILAC Mouse for Quantitative Proteomics Uncovers Kindlin-3 as an Essential Factor for Red Blood Cell Function. *Cell* 134, 353-364.
- Lackner,D.H., Schmidt,M.W., Wu,S., Wolf,D.A., and Bähler,J. (2012). Regulation of transcriptome, translation, and proteome in response to environmental stress in fission yeast. *Genome Biol.* 13.
- Leygue,E., Snell,L., Dotzlaw,H., Hole,K., Hiller-Hitchcock,T., Roughley,P.J., Watson,P.H., and Murphy,L.C. (1998). Expression of lumican in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 58, 1348-1352.
- Leygue,E., Snell,L., Dotzlaw,H., Troup,S., Hiller-Hitchcock,T., Murphy,L.C., Roughley,P.J., and Watson,P.H. (2000). Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. *J. Pathol.* 192, 313-320.

- Liersch,T., Gaedcke,J., Grade,M., Sprenger,T., Conradi,L., Becker,H., and Ghadimi,B.M. (2010). Molecular markers for response prediction in locally advanced rectal cancer. Is individualized therapy coming? *Onkologie* 16, 779-788.
- Lilley,K.S., and Friedman,D.B. (2004). All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Review of Proteomics* 1, 401-409.
- Link,V., Carvalho,L., Castanon,I., Stockinger,P., Shevchenko,A., and Heisenberg,C.P. (2006). Identification of regulators of germ layer morphogenesis using proteomics in zebrafish. *J. Cell Sci.* 119, 2073-2083.
- Liu,T., Qian,W.J., Mottaz,H.M., Gritsenko,M.A., Norbeck,A.D., Moore,R.J., Purvine,S.O., Camp II,D.G., and Smith,R.D. (2006). Evaluation of multiprotein immunoaffinity subtraction for plasma proteomics and candidate biomarker discovery using mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 2167-2174.
- Lowenthal,M.S., Mehta,A.I., Frogale,K., Bandle,R.W., Araujo,R.P., Hood,B.L., Veenstra,T.D., Conrads,T.P., Goldsmith,P., Fishman,D., Petricoin III,E.F., and Liotta,L.A. (2005). Analysis of albumin-associated peptides and proteins from ovarian cancer patients. *Clin. Chem.* 51, 1933-1945.
- Lu,Y.P., Ishiwata,T., and Asano,G. (2002a). Lumican expression in alpha cells of islets in pancreas and pancreatic cancer cells. *J. Pathol.* 196, 324-330.
- Lu,Y.P., Ishiwata,T., Kawahara,K., Watanabe,M., Naito,Z., Moriyama,Y., Sugisaki,Y., and Asano,G. (2002b). Expression of lumican in human Colorectal cancer cells. *Pathol. Int.* 52, 519-526.
- Ly,L., and Wasinger,V.C. (2011). Protein and peptide fractionation, enrichment and depletion: Tools for the complex proteome. *Proteomics* 11, 513-534.
- Lynch,H.T., Riley,B.D., Weismann,S., Coronel,S.M., Kinarsky,Y., Lynch,J.F., Shaw,T.G., and Rubinstein,W.S. (2004). Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC) and HNPCC-like families: Problems in diagnosis, surveillance, and management. *Cancer* 100, 53-64.
- Mamtani,M., and Kulkarni,H. (2012). Association of HADHA expression with the risk of breast cancer: Targeted subset analysis and meta-analysis of microarray data. *BMC Res. Notes* 5.
- Marischler,C. (2007). *Basics Endokrinologie* 1. Auflage. Elsevier GmbH, München, Kapitel 16, 62-86.
- Matsumura,F., and Yamashiro,S. (1993). Caldesmon. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 70-76.
- Mayanagi,T., and Sobue,K. (2011). Diversification of caldesmon-linked actin cytoskeleton in cell motility. *Cell Adhesion Migr.* 5, 150-159.

- McGarrity,T.J.M., Peiffer,L.P., and Billingsley,M.L. (1991). Interspecies comparison of calmodulin binding proteins throughout the gastrointestinal tract: Comparison with human colon adenomas and adenocarcinomas. *Gut* 32, 1121-1126.
- Meijer,T.W.H., Kaanders,J.H.A.M., Span,P.N., and Bussink,J. (2012). Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy. *Clin. Cancer Res.* 18, 5585-5594.
- Miller,I., Crawford,J., and Gianazza,E. (2006). Protein stains for proteomic applications: Which, when, why? *Proteomics* 6, 5385-5408.
- Morson,B.C. (1974). Evolution of Cancer of Colon and Rectum. *Cancer* 34, 845-849.
- Mu,Y., Chen,Y., Zhang,G., Zhan,X., Li,Y., Liu,T., Li,G., Li,M., Xiao,Z., Gong,X., and Chen,Z. (2013). Identification of stromal differentially expressed proteins in the colon carcinoma by quantitative proteomics. *Electrophoresis* 34, 1679-1692.
- Müller,J.J., Lapko,A., Ruckpaul,K., and Heinemann,U. (2003). Modeling of electrostatic recognition processes in the mammalian mitochondrial steroid hydroxylase system. *Biophys. Chem.* 100, 281-292.
- Neubauer,H., Clare,S.E., Kurek,R., Fehm,T., Wallwiener,D., Sotlar,K., Nordheim,A., Wozny,W., Schwall,G.P., Poznanovic,S., Sastri,C., Hunzinger,C., Stegmann,W., Schratzenholz,A., and Cahill,M.A. (2006). Breast cancer proteomics by laser capture microdissection, sample pooling, 54-cm IPG IEF, and differential iodine radioisotope detection. *Electrophoresis* 27, 1840-1852.
- Nikitovic,D., Berdiaki,K., Chalkiadaki,G., Karamanos,N., and Tzanakakis,G. (2008). The role of SLRP-proteoglycans in osteosarcoma pathogenesis. *Connect. Tissue Res.* 49, 235-238.
- Nordhoff, E., Meyer, H. E., Kuhlmann, K. (2012). *Bioanalytik* 3. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 367-424.
- O'Farrell,P.H. (1975). High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 250, 4007-4021.
- Ong,S.E., Blagoev,B., Kratchmarova,I., Kristensen,D.B., Steen,H., Pandey,A., and Mann,M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 376-386.
- Ong,S.E., Kratchmarova,I., and Mann,M. (2003). Properties of ¹³C-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *J. Proteome Res.* 2, 173-181.
- Pan,S., Chen,R., Brand,R.E., Hawley,S., Tamura,Y., Gafken,P.R., Milless,B.P., Goodlett,D.R., Rush,J., and Brentnall,T.A. (2012). Multiplex targeted proteomic assay for biomarker detection in plasma: A pancreatic cancer biomarker case study. *J. Proteome Res.* 11, 1937-1948.

- Pappin,D.J. (1997). Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 64, 165-173.
- Penno,M., Ernst,M., Hoffmann,P., Cramer,R., and Westermeier,R. Comparative 2D DIGE analysis of the depleted serum proteome for biomarker discovery. 854, 207-220. 2012.
- Perotti,D., Spreafico,F., Torri,F., Gamba,B., D'Adamo,P., Pizzamiglio,S., Terenziani,M., Catania,S., Collini,P., Nantron,M., Pession,A., Bianchi,M., Indolfi,P., D'Angelo,P., Fossati-Bellani,F., Verderio,P., Macciardi,F., and Radice,P. (2012). Genomic profiling by whole-genome single nucleotide polymorphism arrays in Wilms tumor and association with relapse. *Genes Chromosomes & Cancer* 51, 644-653.
- Phakdeekitcharoen,B., Kittikanokrat,W., Kijkunasathian,C., and Chatsudthipong,V. (2011). Aldosterone increases Na⁺-K⁺-ATPase activity in skeletal muscle of patients with Conn's syndrome. *Clin. Endocrinol.* 74, 152-159.
- Potter,S.S. and Brunskill, E.W. Laser capture. Michos, O. 886, 211-221. 2012. Ref Type: Serial (Book,Monograph).
- Radwanska,A., Litwin,M., Nowak,D., Baczynska,D., Wegrowski,Y., Maquart,F.X., and Malicka-Blaszkiwicz,M. Overexpression of lumican affects the migration of human colon cancer cells through up-regulation of gelsolin and filamentous actin reorganization. *Experimental Cell Research.* 2012. Ref Type: In Press.
- Raouf,A., Ganss,B., McMahan,C., Vary,C., Roughley,P.J., and Seth,A. (2002). Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix. *Matrix Biol.* 21, 361-367.
- Rappsilber,J., Mann,M., and Ishihama,Y. (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* 2, 1896-1906.
- Ray,S., Reddy,P.J., Jain,R., Gollapalli,K., Moiyadi,A., and Srivastava,S. (2011). Proteomic technologies for the identification of disease biomarkers in serum: Advances and challenges ahead. *Proteomics* 11, 2139-2161.
- Ross,P.L., Huang,Y.N., Marchese,J.N., Williamson,B., Parker,K., Hattan,S., Khainovski,N., Pillai,S., Dey,S., Daniels,S., Purkayastha,S., Juhasz,P., Martin,S., Bartlet-Jones,M., He,F., Jacobson,A., and Pappin,D.J. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 1154-1169.
- Sakai,A., Otani,M., Miyamoto,A., Yoshida,H., Furuya,E., and Tanigawa,N. (2012). Identification of phosphorylated serine-15 and -82 residues of HSPB1 in 5-fluorouracil-resistant Colorectal cancer cells by proteomics. *J. Proteomics* 75, 806-818.
- Samaras,P., Pestalozzi,B.C. (2007). Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms. *Onkologie* 3, 29-35.

Sasse,J., and Gallagher,S.R. (2003). Staining proteins in gels. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 10.

Sauer,R., Liersch,T., Merkel,S., Fietkau,R., Hohenberger,W., Hess,C., Becker,H., Raab,H.R., Villanueva,M.T., Witzigmann,H., Wittekind,C., Beissbarth,T., and Rodel,C. (2012). Preoperative Versus Postoperative Chemoradiotherapy for Locally Advanced Rectal Cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-94 Randomized Phase III Trial After a Median Follow-Up of 11 Years. *J Clin Oncol* 30, 1926-1933.

Schaefer,L., Grone,H.J., Raslik,I., Robenek,H., Ugorcakova,J., Budny,S., Schaefer,R.M., and Kresse,H. (2000). Small proteoglycans of normal adult human kidney: Distinct expression patterns of decorin, biglycan, fibromodulin, and lumican. *Kidney Int.* 58, 1557-1568.

Schmidt,A., Kellermann,J., and Lottspeich,F. (2005). A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* 5, 4-15.

Sheftel,A.D., Stehling,O., Pierik,A.J., Elsässer,H.P., Mühlenhoff,U., Webert,H., Hobler,A., Hannemann,F., Bernhardt,R., and Lill,R. (2010). Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11775-11780.

Shevchenko,A., Tomas,H., Havlis,J., Olsen,J.V., and Mann,M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* 1, 2856-2860.

Shevchenko,A., Wilm,M., Vorm,O., and Mann,M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.

Shi,T., Zhou,J.Y., Gritsenko,M.A., Hossain,M., Camp,D.G., Smith,R.D., and Qian,W.J. (2012). IgY14 and SuperMix immunoaffinity separations coupled with Liquid-chromatography-mass spectrometry for human plasma proteomics biomarker discovery. *Methods* 56, 246-253.

Shin,Y.K., Yoo,B.C., Hong,Y.S., Chang,H.J., Jung,K.H., Jeong,S.Y., and Park,J.G. (2009). Upregulation of glycolytic enzymes in proteins secreted from human colon cancer cells with 5-fluorouracil resistance. *Electrophoresis* 30, 2182-2192.

Shinya,H., and Wolff,W.I. (1979). Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps. An analysis of 7,000 polyps endoscopically removed. *Ann. Surg.* 190, 679-683.

Sillars-Hardebol,A.H., Carvalho,B., Van Engeland,M., Fijneman,R.J., and Meijer,G.A. (2012). The adenoma hunt in Colorectal cancer screening: Defining the target. *J. Pathol.* 226, 1-6.

Silvestri, A., Calvert, V., Belluco, C., Lipsky, M., De Maria, R., Deng, J., Colombatti, A., De Marchi, F., Nitti, D., Mammano, E., Liotta, L., Petricoin, E., and Pierobon, M. Protein

pathway activation mapping of colorectal metastatic progression reveals metastasis-specific network alterations. *Clin. Exp. Metastasis*. 2012.

Spiekerkoetter,U. (2010). Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: Clinical presentation of long-chain fatty acid oxidation defects before and after newborn screening. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33, 527-532.

Steen,H., and Mann,M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 699-711.

Stowasser,M., and Gordon,R.D. (2013). The renaissance of primary aldosteronism: What has it taught us? *Heart Lung Circul.* 22, 413-420.

Surinova,S., Schiess,R., Huttenhain,R., Cerciello,F., Wollscheid,B., and Aebersold,R. (2011). On the Development of Plasma Protein Biomarkers. *J. Proteome Res.* 10, 5-16.

Tannu,N.S., and Hemby,S.E. (2006). Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nature Protocols* 1, 1732-1742.

Tobolkina,E., Cortes-Salazar,F., Momotenko,D., Maillard,J., and Girault,H.H. (2012). Segmented field OFFGEL-electrophoresis. *Electrophoresis* 33, 3331-3338.

Tonge,R., Shaw,J., Middleton,B., Rowlinson,R., Rayner,S., Young,J., Pognan,F., Hawkins,E., Currie,I., and Davison,M. (2001). Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1, 377-396.

Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350-4354.

Tucholska,M., Bowden,P., Jacks,K., Zhu,P., Furesz,S., Dumbrowsky,M., and Marshall,J. (2009). Human serum proteins fractionated by preparative partition chromatography prior to LC-ESI-MS/MS. *J. Proteome Res.* 8, 1143-1155.

Typhoon, User's Guide v3.0, user manual. (2002). GE Healthcare.

Ünlü,M., Morgan,M.E., and Minden,J.S. (1997). Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077.

Unruh,A., Ressel,A., Mohamed,H.G., Johnson,R.S., Nadrowitz,R., Richter,E., Katschinski,D.M., and Wenger,R.H. (2003). The hypoxia-inducible factor-1 α is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 22, 3213-3220.

Van 't Veer,L.J., and Bernards,R. (2008). Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature* 452, 564-570.

Van den Bergh,G., and Arckens,L. (2004). Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Curr. Opin. in Biotechnol.* 15, 38-43.

- Vickery,L.E. (1997). Molecular recognition and electron transfer in mitochondrial steroid hydroxylase systems. *Steroids* 62, 124-127.
- Walsh,J., Desbonnet,L., Clarke,N., Waddington,J.L., and O'Tuathaigh,C.M.P. (2012). Disruption of exploratory and habituation behavior in mice with mutation of DISC1: an ethologically based analysis. *J. Neurosci Res.* 90, 1445-1453.
- Warscheid,B., Lottspeich,F. (2012). *Bioanalytik* 3. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Kapitel 41, 1077-1101.
- Wang,C.L.A. Caldesmon and the regulation of cytoskeletal functions. Gunning, P. 644, 250-272. 2008. Ref Type: Serial (Book,Monograph).
- Wang,H., Chang-Wong,T., Tang,H.Y., and Speicher,D.W. (2010). Comparison of extensive protein fractionation and repetitive LC-MS/MS analyses on depth of analysis for complex proteomes. *J. Proteome Res.* 9, 1032-1040.
- Wang,N. and Li,L. (2008). Exploring the precursor ion exclusion feature of Liquid-chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry for improving Protein-IDentification in shotgun proteome analysis. *Anal. Chem.* 80, 4696-4710.
- Wasinger,V.C., Cordwell,S.J., Cerpapoljak,A., Yan,J.X., Gooley,A.A., Wilkins,M.R., Duncan,M.W., Harris,R., Williams,K.L., and Humpherysmith,I. (1995). Progress with Gene-Product Mapping of the Mollicutes - *Mycoplasma-Genitalium*. *Electrophoresis* 16, 1090-1094.
- Webb,R., Mathur,A., Chang,R., Baid,S., Nilubol,N., Libutti,S.K., Stratakis,C.A., and Kebebew,E. (2012). What is the best criterion for the interpretation of adrenal vein sample results in patients with primary hyperaldosteronism? *Ann. Surg. Oncol.* 19, 1881-1886.
- Wen,Y.D., Liao,C.T., Liou,K.M., Wang,W.H., Huang,W.C., and Chang,B.Y. (2000). Adrenodoxin: Structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 40, 590-612.
- Westermeier,R. (2010). High performance elektrophoresis (HPE). *Serva Electrophoresis, Version 9/11*, 1-8.
- Wilkins,M.R., Sanchez,J.C., Gooley,A.A., Appel,R.D., HumpherySmith,I., Hochstrasser,D.F., and Williams,K.L. (1996). Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol and Genet. Eng. Rev.*, Vol 13, 19-50.
- Xu,B.J. (2010). Combining laser capture microdissection and proteomics: Methodologies and clinical applications. *Proteomics Clin. Appl.* 4, 116-123.
- Xu,R.H., Pelicano,H., Zhou,Y., Carew,J.S., Feng,L., Bhalla,K.N., Keating,M.J., and Huang,P. (2005). Inhibition of glycolysis in cancer cells: A novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* 65, 613-621.

- Yamamoto,S., Tomita,Y., Hoshida,Y., Sakon,M., Kameyama,M., Imaoka,S., Sekimoto,M., Nakamori,S., Monden,M., and Aozasa,K. (2004). Expression of Valosin-Containing Protein in Colorectal Carcinomas as a Predictor for Disease Recurrence and Prognosis. *Clin. Cancer Res.* 10, 651-657.
- Young,J. (2009). Primary aldosteronism - One picture is not worth a thousand words. *Ann. Intern. Med.* 151, 357-358.
- Young,W.F. (2007). Primary aldosteronism: Renaissance of a syndrome. *Clin. Endocrinol.* 66, 607-618.
- Zelinka,T., Masek,M., Vlkova,J., Kasalicky,M., Michalsky,D., Holaj,R., Petrak,O., Strauch,B., Rosa,J., Dvorakova,J., and Widimsky,J. (2012). Discrepant results of adrenal venous sampling in seven patients with primary aldosteronism. *Kidney Blood Press. Res.* 35, 205-210.
- Zhang,Q., Faca,V., and Hanash,S. (2011). Mining the plasma proteome for disease applications across seven logs of protein abundance. *J. Proteome Res.* 10, 46-50.
- Zhao,J., and Zhong,C.J. (2009). A review on research progress of transketolase. *Neurosci. Bull.* 25, 94-99.
- Zoccali,M., Krane,M., and Fichera,A. (2011). Updates on rectal cancer. *Curr. Colorectal cancer Rep.* 7, 200-210.
- Zolg,J.W., and Langen,H. (2004). How industry is approaching the search for new diagnostic markers and biomarkers. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 345-354.
- Zu,X.L., and Guppy,M. (2004). Cancer metabolism: Facts, fantasy, and fiction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 459-465.

Anhang

Die große Datenmenge, die in Modellsystemen I und II generiert wurde, wurde in Form von Excel-Files (.xlsx) auf eine CD transferiert und beinhaltet folgenden Daten:

A) Modellsystem I: Conn-Syndrom

Conn-Syndrom_ Gewebe_ ICPL-Markierung

- ICPL-Duplex-Vergleich von krankem (Tumor; ICPL_4 und ICPL_10) und gesundem (ICPL_0 und ICPL_6) Gewebe jedes Patienten. Innerhalb der quantifizierten und identifizierten Proteine (je Patient ICPL_4 zu ICPL_0 bzw. ICPL_10 zu ICPL_6; insgesamt 4 Patienten) wurden jene als unterschiedlich exprimiert eingestuft, die mindestens zwei Quadruplets pro Protein und ein uniques Peptid pro Protein aufwiesen, einen Regulationswert von $1,5 \geq 1 \geq 0,66$ besaßen und eine relative Standardabweichung (CV) von $\leq 30\%$ aufwiesen.

Conn-Syndrom_ Plasma_ ICPL-Markierung

- ICPL-Duplex-Vergleich (Aufbau als technisches Replikat) von adematösem Probenmaterial (ICPL_0 und ICPL_10) und gesundem Probenmaterial (ICPL_4 und ICPL_6), nach der Fraktionierung der Plasmaproteine in 24 OFFGEL-Fraktionen. Innerhalb der quantifizierten und identifizierten Proteine (ICPL_4 zu ICPL_0 und ICPL_6 zu ICPL_10) wurden jene als unterschiedlich exprimiert eingestuft, die mindestens zwei Quadruplets pro Protein und ein uniques Peptid pro Protein aufwiesen, einen Regulationswert von $1,5 \geq 1 \geq 0,66$ besaßen und eine relative Standardabweichung (CV) von $\leq 30\%$ aufwiesen.

Conn-Syndrom_ Plasma_ OFFGEL- (24) Fraktionen_ ICPL-Markierung

- Tabellarische Darstellung der Plasmaproteine, die in den einzelnen 24 OFFGEL-Fraktionierung identifiziert wurden.

B) Modellsystem II: Rektumkarzinom

Rektumkarzinom_ ICPL-Markierung

- Zweifacher ICPL-Duplex-Vergleich (technische Replikate) von biopsierten Tumorgewebe von insgesamt 20 Patienten mit Rektumkarzinom. Die gepoolten Proben der Responder-Gruppe (5 Patienten) von RCT I wurden dann mit ICPL_0 und die gepoolten Proben der Non-Responder-Gruppe (5 Patienten) von RCT I mit ICPL_4 markiert. Entsprechend wurden die gepoolten Proben der Non-Responder-Gruppe (5 Patienten) von RCT II mit ICPL_6 und die gepoolten Proben der Responder-Gruppe (5 Patienten) von RCT II mit ICPL_10 markiert. Das Probenmaterial wurde sowohl direkt ohne weitere Vorfraktionierung als auch nach Vorfraktionierung in 24 Fraktionen mittels OFFGEL-Methode analysiert. Innerhalb der quantifizierten und identifizierten Proteine (ICPL_4/ICPL_0 und ICPL_6/ICPL_10) wurden jene als unterschiedlich exprimiert eingestuft, die mindestens zwei Quadruplets pro Protein und ein uniques Peptid pro Protein aufwiesen, einen Regulationswert von $1,5 \geq 1 \geq 0,66$ besaßen und eine relative Standardabweichung (CV) von $\leq 30\%$ aufwiesen.

Rektumkarzinom_ OFFGEL- (24) Fraktionen_ ICPL-Markierung

- Tabellarische Darstellung der Gewebeproteine die in den einzelnen 24 OFFGEL-Fraktionierung identifiziert wurden.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die erlaubten Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Sämtliche Experimente wurden von mir selbst durchgeführt, sofern nicht explizit auf Dritte verwiesen wird.

Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation oder Teile einer Dissertation einzureichen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen.

München, den 18. September 2014

Müzeyyen Sevim

