Untersuchung molekularer Prozesse in Tumoren mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden

Investigation of molecular processes in tumors using mass spectrometry-based methods

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Olga Kraus

Hamburg, Januar 18

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Schlüter
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Sascha Rohn

Tag der Disputation: 02.03.2018

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2012 bis Juli 2015 am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Institut für Klinische Chemie, im Arbeitskreis massenspektrometrische Proteomanalytik unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hartmut Schlüter angefertigt. Die Arbeit wurde zudem von Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn vom Fachbereich Chemie der Universität Hamburg betreut.

I. Publikationsliste

 Combined Application of RGB Marking and Mass Spectrometric Imaging Facilitates Detection of Tumor Heterogeneity.
 Abramowski P*, Kraus O*, Rohn S, Riecken K, Fehse B, Schlüter H.
 Cancer Genomics Proteomics. 2015 Jul-Aug;12(4):179-87.

* Gleichberechtigte Erstautorenschaft

- MALDI imaging-based identification of prognostically relevant signals in bladder cancer using large-scale tissue microarrays.
 Steurer S, Singer JM, Rink M, Chun F, Dahlem R, Simon R, Burandt E, Stahl P, Terracciano L, Schlomm T, Wagner W, Höppner W, Omidi M, Kraus O, Kwiatkowski M, Doh O, Fisch M, Soave A, Sauter G, Wurlitzer M, Schlüter H, Minner S. Urologic Oncology. 2014 Nov;32(8):1225-33.
 DOI: 10.1016/j.urolonc.2014.06.007.
- MALDI imaging on large-scale tissue microarrays identifies molecular features associated with tumour phenotype in oesophageal cancer.
 Quaas A, Bahar AS, von Loga K, Seddiqi AS, Singer JM, Omidi M, Kraus O, Kwiatkowski M, Trusch M, Minner S, Burandt E, Stahl P, Wilczak W, Wurlitzer M, Simon R, Sauter G, Marx A, Schlüter H.
 Histopathology. 2013 Oct;63(4):455-62.
 DOI: 10.1111/his.12193.
- MALDI mass spectrometric imaging based identification of clinically relevant signals in prostate cancer using large-scale tissue microarrays.
 Steurer S, Borkowski C, Odinga S, Buchholz M, Koop C, Huland H, Becker M, Witt M, Trede D, Omidi M, Kraus O, Bahar AS, Seddiqi AS, Singer JM, Kwiatkowski M, Trusch M, Simon R, Wurlitzer M, Minner S, Schlomm T, Sauter G, Schlüter H.
 International Journal of Cancer. 2013 Aug 15;133(4):920-8.

DOI: 10.1002/ijc.28080.

II. Inhaltsverzeichnis

I.	PUBLIKATIONSLISTE			
II.	INHALTSVERZEICHNIS			
III.	ABKÜRZUNGEN9			
IV.	zus/	AMMENFASSUNG13		
v.	ABS	TRACT15		
1	EINL	EITUNG		
1.1		Das Kolonkarzinom und der Prozess der Metastasierung17		
1.2		Proteomanalytik		
1.	2.1	Massenspektrometrie-basierte Onkoproteomik		
1.	2.2	Massenspektrometrie-basierte Quantifizierungsmethoden		
1.3		Zielsetzung24		
2.	ERG	EBNISSE		
2.1		Heterogenität von Karzinomen26		
2.2		Analyse molekularer Prozesse im Kolonkarzinom		
2.	2.1	Membran- und Zelloberflächenproteine		
	2.2.1	.1 Vergleich Detergens-basierter Methoden zur Extraktion von Zellmembran-		
		und Zelloberflächenproteinen31		
	2.2.1	.2 Vergleich der Detergens-basierten FASP-Methode mit zwei Biotinylierungs-		
		Methoden zur Extraktion von Zellmembran- und Zelloberflächenproteinen		
	2.2.1	.3 Quantifizierung der Membran- und Zelloberflächenproteine zur		
		Untersuchung molekularer Prozesse im Kolonkarzinom		
2.	2.2	Differentielle Analyse intrazellulärer Proteine zur Untersuchung molekularer Prozesse		
		im Kolonkarzinom42		
2.3		Analyse molekularer Prozesse im Kolonkarzinom unter Einfluss von CD13349		
3.	DISK	USSION		
4	MAT	ERIAL UND METHODEN77		
4.1		Zelllinien		
4.2		Tumorhetorogenität77		
4.	2.1	Primärtumore für die MALDI Imaging Analyse77		
4.	2.2	Gewebevorbereitung und Matrixapplikation		
4.	2.3	MALDI Imaging Datenakquisition und Analyse78		

4.2.4	Häm	atoxylin-Eosin-Färbung der Gewebeschnitte	78
4.3	Ana	lyse molekularer Prozesse im Kolonkarzinom	79
4.3.1	Prim	ärtumore und Metastasen	79
4.3.2	Zellk	ulturbedingungen	79
4.3.3 Best		immung der Zellzahl	79
4.3.4	Zelll	yse und Freisetzung der Membranproteine	80
4.3.5	SDS	-PAGE zur Abtrennung von Natrium-dodecylsulfat (SDS)	80
4.3.6	Tryp	tischer In-Gel-Verdau	81
4.3.7	Filte	r Aided Sample Preparation (FASP)	81
4.3.8	Sulf	o-NHS-SS-Biotin – Streptavidin Methode	82
4.3.8	3.1	Markierung der Membranproteine mit NHS-SS-Biotin	83
4.3.8	3.2	Lyse der Biotin-markierten Zellen	84
4.3.8	3.3	Streptavidin-Kopplung und Freisetzung der Membranproteine	84
4.3.8	3.4	Direkte tryptische Proteolyse	85
4.3.8	8.5	Entsalzung der Proben mittels Festphasenextraktion	85
4.3.9	Bioc	ytin-Hydrazide-Streptavidin Methode	85
4.3.9	9.1	Markierung der Membranproteine mit Biocytin Hydrazide	86
4.3.9	9.2	Lyse der Biocytin-markierten Zellen	86
4.3.9	9.3	Streptavidin-Kopplung undFreisetzung der Membranproteine	87
4.3.9	9.4	Direkte tryptische Proteolyse	87
4.3.9	9.5 Entsalzung mittels Festphasenextraktion		87
4.3.10	Analy	se von zytosolischen Proteinen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D	9E)88
4.3.1	10.1	Anfertigung der 2DE-Gele	88
4.3.1	10.2	Analyse der 2DE-Gele	88
4.3.11	Mas	ssenspektrometrische Methoden	89
4.3.1	11.1	Massenspektrometrische Methode zur Identifizierung mit einem RP-nLC	
		gekoppelten Orbitrap Fusion™ Tribrid™ Massenspektrometers	89
4.3.1	11.2	Massenspektrometrische Methode zur quantitativen Messung mit dem	
		RP-nLC gekoppelten Orbitrap Fusion™ Tribrid™ Massenspektrometers	90
4.3.1	11.3	Identifizierung der Daten mit Sequest	91
4.3.1	11.4	Quantifizierung der Daten mit MAXQuant	92
4.4	Ana	lyse molekularer Prozesse im Kolonkarzinom unter Einfluss von CD133	93
4.4.1	FFP	E Tumorgewebe	93
4.4.2	Prob	envorbereitung von FFPE Tumorgewebe	93
4.4.3	Ents	alzung der Proben mittels Festphasenextraktion	94
4.4.4	Meth	node zur Identifizierung mit einem	
	nano	DUPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-Massenspektrometers	94
4.4.5	Meth	node zur quantitativen Messung mit dem RP-nLC gekoppelten Orbitrap	
	Fusi	on™ Tribrid™ Massenspektrometers	95

4.	4.6	Quantifizierung der LC ESI-MS/MS Daten mit MAXQuant) 5
4.5		Material) 6
5.	LITE	ERATURVERZEICHNIS) 9
6.	ANH	IANG10)9
6.1.		Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS10)9
6.2		Abbildungen11	1
6.3		Abbildungsverzeichnis11	3
6.4		Tabellenverzeichnis11	6
7.	KMF	R STOFFE11	17
8.	DAN	IKSAGUNG11	8
9.	EID	ESSTATTLICHE VERSICHERUNG11	9

III. Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AGC	Automatic gain control
ALDH2	Aldehyddehydrogenase 2
ANXA2	Annexin 2
APS	Ammoniumperoxidsulfat
a.u.	Arbiträre Einheiten (arbitrary units)
AUC	Area under the curve
BCAM	Basal cell adhesion molecule
BPC	Basis-Peak-Chromatogramm
CRC	Colorectal Cancer
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DDA	Datenabhängiger Aufnahmemodus (Data Dependant Aquisition)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIC	Extrahierte Ionenchromatogramme
EMT	Epithelial-mesenchymaler Übergang
ENO1	Alpha-Enolase
ENO2	Enolase 2
E.P.	Eindeutige Peptide
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESI	Elektrosprayionisation
FA	Ameisensäure
FASP	Filter Aided Sample Preparation
FAT1	Protocadherin FAT1
FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1
FDA	Food and Drug Administration
FDR	False discovery rate
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
GALM	Galactosemutarotase

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GO-Term	Gene Ontology
GPI	Glucosephosphateisomerase
H ₂ O	Wasser
HCD	High-energy collision energy
HE	Hämatoxylin Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IAA	Iodacetamid
ICAT	Isotope-coded affinity tag
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IT	Ion Trap
ITB4	Integrin beta-4
ITO	Indium-Zinnoxid
KCI	Kalimchlorid
KD	Knockdown
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC	Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography)
LDHA	Lactatdehydrogenase A
LFQ	Markierungsfreie Quantifizierung (Label free quantification)
LUC	Luziferase
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
MET	Metastasen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP	Matrixmetalloproteasen
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
NaCl	Natriumchlorid
NalO ₄	Natriumperiodat
NF-kB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumbicarbonat
QTOF	Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese

PBS	Phosphat-gepufferte	Kochsalzlösung	(Phosphate-Bu	ıffered	
PEPCK	Saline)				
	Phosphoenolpyruvalcarboxykinase 2				
PGMT	Phosphoglukomutase				
pl	Isoelektrischer Punkt				
PT	Primärtumor				
RNA	Ribonukleinsäure				
ROS	Reactive oxygen species				
RGB	Rot, Grün, Blau				
RP	Reverse Phase				
SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt (Severe Combined				
	Immunodeficiency)				
SDS	Natriumdodecylsulfat				
Seq.abd.	Sequenzabdeckung				
SILAC	Stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture				
TCA	Trichloressigsäure				
TFA	Trifluoressigsäure				
TGF-α	Transforming Growth Fa	actor-a			
TGF-β1	Transforming Growth Factor-β1				
tPA	Gewebsplasminogenaktivator				
UPLC	Ultra-Hochleistungs-Flüs	ssigchromatographie	e (Ultra	high-	
	Performance Liquid Chr	omatography)			
VEGF	Vascular endothelial gro	wth factor			
2DE	Zweidimensionalen Gele	elektrophorese			

Aminosäuren

Aminosäure	3 Buchstaben-	1 Buchstaben-
	Code	Code
Alanin	Ala	А
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	С
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	Н
Isoleucin	lle	1
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	К
Methionin	Met	М
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	Р
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	Т
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Selenocystein	Sec	U
Pyrrolysin	Pyr	0

IV. Zusammenfassung

Die steigende Anzahl an Krebsneuerkrankungen (ca. 14 Millionen weltweit in 2012 [1]) motivieren dazu, die molekularen Prozesse der Tumorgenese detaillierter zu verstehen und neue Konzepte sowie Ansätze zur Therapie voranzutreiben. In der Tumorgenese werden durch Akkumulationen von Mutationen normalen Gewebszellen stufenweise zu malignen Tumorzellen transformiert. Die Art und Wirksamkeit der Therapieansätze gegen Tumorzellen sind unterschiedlich und basieren auf der Heterogenität der Tumore sowie des heterogenen Wachstums. Ein einzelner Tumor besteht aus zahlreichen Zellpopulationen und diese zu erfassen, ist die größte Herausforderung in der Tumorforschung [2].

Zur Verdeutlichung der Tumorheterogenität wurde in dieser Arbeit MALDI Imaging (MSI) angewendet. Tumore gleichen Ursprungs konnten anhand von unterschiedlichen massenspektrometrischen Signalen voneinander unterschieden werden.

Die Untersuchung der Pathogenese wurde mittels differentieller Proteomanalyse in HT29-Kolonkarzinomzellen, sowie nach Injektion der Zellen in Mäuse, in entstandenen Primär- und Sekundärtumoren (Metastasen) durchgeführt.

Hierbei wurde die Zusammensetzung der Plasmamembran- und Oberflächenproteine Proteine analysiert. Plasmamembransowie der zytosolischen und Oberflächenproteine wurden zunächst über Filter Aided Sample Preparation (FASP) Biotin angereichert sowie über Kopplung mit und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Zytosolische Proteine wurden vor der massenspektrometrischen Analyse über eine zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) aufgetrennt. Signifikante Mengenunterschiede zwischen den drei Tumor-Entwicklungsstadien (Zelllinie, Primärtumor, Metastase) wurden u.a. bei den Plasmamembran- und Oberflächenproteinen Protocadherin FAT1, Integrin beta-4, Basal Zelladhäsionsprotein und Annexin A2 sowie den zytosolischen Proteinen Pyruvatkinase, Aldehyddehydrogenase 2 und alpha-Enolase detektiert. Diese Proteine waren bei der biologischen Interpretation der generierten Daten besonders interessant im Hinblick auf die Intravasation der Tumorzellen durch Umstrukturierung der Extrazellulären Matrix (ECM).

13

Als ein potentieller Tumorstammzellenmarker ist das Protein CD133 bekannt. Im folgenden Experiment wurde daher durch Stilllegen (*knockdown*, kd) von CD133 der Einfluss dieses Proteins auf das Proteom der HT29-Kolonkarzinomzellen untersucht. CD133 soll für Tumorprogression, Proliferation und Chemoradiotherapieresistenz verantwortlich sein und es wird in Verbindung zur mitochondrialen Dysfunktion gebracht. Nach der Auswertung wurden daher insbesondere Proteine der oxidativen Phosphorylierung und der Glykolyse/Gluconeogenese biologisch interpretiert. Die Ergebnisse deuten auf eine Umfunktionierung dieser metabolischen Wege hin, die zu einer langsameren Proliferation, jedoch erhöhten Migration der Tumorzellen führen könnten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf mögliche neue Mechanismen des HT29-Kolonkarzinoms und legen den Grundstein für weiterführende Untersuchungen der vorgestellten Proteine, um das Wissen auf dem Gebiet der Tumorgenese und Progression auszubauen. Weiterführende Erkenntnisse der molekularen Prozesse können neue Diagnostikverfahren und neue Therapieansätze im Kampf gegen Krebs ermöglichen.

V. Abstract

The ever increasing number of cancer diseases (approximately 14 million worldwide in 2012 [1]) necessitates additional studies into the molecular mechanisms of tumor processes with the goal of new concepts and approaches for cancer treatment. In the tumorigenesis, the accumulation of mutations gradually leads to the transformation of normal tissue cells into malignant tumor cells. The types and efficacy of therapeutic approaches are different and therapeutic methods are chosen based on tumor heterogeneity and their heterogeneous growth. Since a single tumor consists of numerous cell populations, the biggest challenge in tumor research is to determine them [2].

In this work, the detection of tumor heterogeneity was accomplished using MALDI-MSI. Tumors of the same origin were distinguished from each other by different mass spectrometric signals.

Furthermore, cancer pathogenesis was examined using differential proteome analysis of HT29 colorectal cancer cells as well as tumors and metastases originated from these cancer cells. For this purpose, plasma membrane- and surface protein compositions as well as the composition of cytosol proteins were analyzed. Plasma membrane- and surface proteins were enriched by filter aided sample preparation (FASP) as well as coupling with biotin and then analyzed using mass spectrometry. Cytosolic proteins were separated by two dimensional gel electrophoresis (2DE) prior to mass spectrometric analysis. Plasmamembrane- and surface proteins as protocadherin FAT1, integrin beta-4, basal cell adhesion protein and annexin A2 as well as cytosolic proteins pyruvate kinase, aldehyde dehydrogenase 2 and alpha enolase showed significant mass differences between the different developmental stages (cell line, primary tumor, metastases). Thus, these proteins are particularly interesting in terms of the intravasation of tumor cells through restructuring of the extracellular matrix (ECM) as discussed in the biological interpretation of these findings.

CD133 is known as a potential cancer stem cell marker. Therefore in the following experiment, the protein composition of HT29 colon cancer cells before and after CD133 knockdown (kd) was examined. CD133 is responsible for tumor progression, proliferation and resistance of chemoradiotherapy. Moreover, this protein is associated with a mitochondrial dysfunction. Consequently, results were interpreted

15

biologically with focus on proteins that are part of the oxidative phosphorylation and glycolysis/gluconeogenesis. Interpretations indicate a restructuring of different metabolic pathways potentially leading to slower proliferation, but increased migration of tumor cells.

The results of this work indicate new possible mechanisms of the HT29 colon cancer and provide the basis for further investigations of the introduced proteins. Gaining further knowledge about cellular mechanisms is crucial for the discovery of novel diagnostic methods as well as therapeutic approaches.

1 Einleitung

1.1 Das Kolonkarzinom und der Prozess der Metastasierung

Das Kolonkarzinom ist ein bösartiger Tumor des Dickdarms. In Deutschland wurden 2011 bei Frauen rund 29.000 und bei Männern rund 34.000 Neuerkrankungen diagnostiziert. Dabei gehört Darmkrebs in vielen Industrieländern bei beiden Geschlechtern zu den dritthäufigsten Krebserkrankungen [3].

Die Ursachen für die Entstehung von Kolonkarzinomen sind vielfältig und meist mit Veränderungen des Erbguts (Mutationen) verbunden. Diese können erblich bedingt sein, durch Umwelteinflüsse ausgelöst werden oder zufällig auftreten. Normalerweise besitzen die Zellen effiziente Reparaturmechanismen, um die Mutationen frühzeitig unschädlich zu machen. Mit zunehmendem Alter nimmt jedoch die Fähigkeit des menschlichen Organismus ab, aufgetretene Fehler zu korrigieren. Deshalb treten Krebserkrankungen im Alter wesentlich häufiger auf als in jungen Jahren [4].

Je nach Art und Anzahl der Mutationen des Kolonepithels können 5-10 Jahre zwischen initialer Entartung und invasivem Wachstum des Tumors vergehen. Ist die Ausbreitung des Tumors noch auf die Darmwand beschränkt, beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate der Patienten 90 %, sind bereits regionale Lymphknoten befallen, sinkt diese auf 33-76 %. Haben sich Fernmetastasen gebildet, besteht nur noch eine 5- bis 10 %ige Überlebenswahrscheinlichkeit nach fünf Jahren [5].

Metastasen sind für 90 % der krebsbedingten Todesursachen verantwortlich [6]. Dennoch ist über den Prozess der Metastasierung bislang wenig bekannt [7]. Die Metastasierung wird häufig als ein mehrstufiger Prozess bezeichnet und wird in Abbildung 1 dargestellt.



Abbildung 1: Prozess der Metastasierung.

 Nach der Transformation der Zelle wächst der Primärtumor heran. 2. Vaskularisation und Angiogenese haben eingesetzt. Es kommt zum massiven Einwachsen von Blutgefäßen in dem Primärtumor. 3. Einzelne Zellen lösen sich vom Tumorverbund ab und wandern in die Blutgefäße ein.
 Nach Zirkulation in den Blutgefäßen, haften sich überlebende Zellen an Endothelzellen entfernter Organe an. 5. Tumorzellen passieren das Endothel und wandern in Organe ein. 6. Proliferation der Tumorzellen zu klinisch relevanten Metastasen. (Modifiziert nach [8].)

Nach Transformation einer Zelle bildet sich zunächst ein Primärtumor. Durch Proliferation der Zellen und eine verstärkte Angiogenese wächst der Tumor. Einzelne Zellen des Primärtumors lösen sich anschließend vom Verbund ab, gelangen an das Gefäßsystem und wandern in die Blutbahn ein (Intravasation). Die Zellen zirkulieren im Blut, wobei die meisten Tumorzellen durch die Abwehrmechanismen des Immunsystems ausgeschaltet werden. Die Bildung eines Fibrin-Thrombozytenmantels, der die Tumorzellen umgibt, erlaubt es einigen Zellen das Zielorgan zu erreichen und sich dort anzusiedeln. Dabei heften sich die Tumorzellen im Kapillarbett des Zielorgans an und dringen in das umliegende Gewebe ein

(Extravasation). In dem Gewebe müssen Proliferation und Angiogenese erneut in Gang gesetzt werden, um die Größe einer klinisch sichtbaren Metastase zu erlangen [8-10].

Die metastatische Kaskade ist somit abhängig vom Verlust der Adhäsion zwischen den Zellen. Der Verlust des Zell-Zell-Kontaktes führt dazu, dass Moleküle, meist Proteine der Zellmembran wie Zelladhäsionsproteine und *Tight Junctions* (z.B. E-Cadherin) weniger stark exprimiert werden [11].

Damit der Eintritt der Tumorzelle ins Blut- und Lymphsystem ermöglicht wird, findet ein kontrollierter lokaler Abbau (Proteolyse) der extrazellulären Matrix (ECM) statt.

Die ECM setzt sich aus allen unlöslichen Bestandteilen des interzellulären Raumes zusammen und ist an dem organspezifischen räumlichen Aufbau und der Informationsvermittlung innerhalb des Organs beteiligt. Diese ist nicht nur organspezifisch, sondern auch regional innerhalb eines Organs unterschiedlich zusammengesetzt [12]. Die ECM dient als Stützsowie Filterbzw. Diffusionsbarrierenfunktion. Weiterhin beeinflusst es Zellfunktionen und eigenschaften wie Proliferation, Migration, Adhäsion, Polarität sowie den Phänotyp und dient als Speicherfunktion für Zytokine und Wachstumsfaktoren [13, 14]. Bestandteile der ECM sind hauptsächlich Faserproteine wie Kollagen und Elastin sowie Glykoproteine wie Fibronectin, Proteoglykane und Laminin [15]. Synthese und Degradation der ECM befinden sich unter physiologischen Bedingungen in einem dynamischen Gleichgewicht. Ein Verschieben dieser Homöostase ist unter physiologischen Bedingungen wie Wachstum und Embryogenese, als auch bei pathologischen Vorgängen wie Fibrogenese und Tumorwachstum möglich. Zur Regulation der ECM werden Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Factor-a (TGF- α), *Transforming Growth Factor-* β 1 (TGF- β 1) sowie verschiedene Interleukine als Transmitter von eingewanderten Zellen des Immunsystems oder lokalen Gewebszellen sezerniert und stimulieren auto- und parakrin ECM-synthetisierende Zellen. Der Matrixsynthese steht die Matrixdegradation gegenüber. Die Degradation von Kollagenen erfolgt durch ein Zusammenspiel einer Vielzahl von Enzymen, deren Aktivität durch Zytokine reguliert wird. Beteiligt sind z.B. Serinproteasen und die Matrixmetalloproteinasen (MMP) [12, 13].

1.2 Proteomanalytik

1.2.1 Massenspektrometrie-basierte Onkoproteomik

Nur 12 bis 15 % der tumorerkrankten Patienten können anhand gegenwärtiger Methoden geheilt werden. Das Methodenspektrum umfasst die operative Entfernung von erkranktem Gewebe sowie eine Strahlen- und Chemotherapie. In den meisten Fällen jedoch ist die Metastasierung des Tumors soweit im Körper fortgeschritten, dass die Heilungschancen gering sind [16]. Prävention, Früherkennung und frühzeitige Intervention sind die primären Ziele von Onkologen und Krebsbiologen. Wenn Gene als Mastercontroller des zellulären Verhaltens betrachtet werden, sind Proteine die Effektoren. Im Zusammenhang mit Krebs bedeutet dies, dass die exprimierten Proteine Tumorwachstum, Intravasation, Metastasierung, Interaktion mit umliegenden Zellen und Reaktion auf Therapie regeln [17]. Onkoproteomik ist ein Zweig der Proteomik, der sich mit der Untersuchung von Proteinen und deren Wechselwirkungen in einer Krebszelle beschäftigt. Als Proteom wird die Gesamtheit aller in einer Zelle vorliegenden Proteine unter definierten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt charakterisiert [18].

Ein Biomarker ist ein biologisches Molekül, das im Blut, anderen Körperflüssigkeiten oder Geweben gefunden wird, und als Indikator eines abnormalen Zustandes oder einer Krankheit ist. Zur Entdeckung von neuen Krebs-Biomarkern auf Proteinebene werden gesunde und tumoröse Zellen bzw. Gewebe oder Körperflüssigkeiten differentiell analysiert. Das Ursprungsmaterial wird lysiert und die Proteine extrahiert, dabei entstehen komplexe Proteinmischungen [19].

Für die Analyse komplexer Proteingemische konnte sich in den letzten Jahren die Massenspektrometrie (MS) in Kombination mit Flüssigkeitschromatographie (*Liquid Chromatography*; LC) als die Methode der Wahl etablieren.

In der Krebsforschung konnten mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden bereits mehrere Biomarker wie Apolipoprotein A1 und Transferrin identifiziert werden, die von der *Food and Drug Administration* (FDA) anerkannt und zugelassen wurden [20, 21]. Da ein einziger Biomarker bislang keine ausreichende Sensitivität und/ oder Spezifität beim Screening der Tumorpatienten zeigte, sind vermehrt ein Panel von Biomarkern für höhere Empfindlichkeit und Spezifität notwendig [22]. Die massenspektrometrische Identifizierung kann über intakte Proteine (*top-down*) oder über die weit-gängigen proteolytischen Peptide (*bottom-up*) erfolgen. Beim *bottom-up* Ansatz werden die Proteine vor der massenspektrometrischen Messung mit Proteasen zu Peptiden gespalten und die Peptide stellvertretend für die Proteine mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) analysiert. Vorher werden die Peptidbzw. Proteinmischungen in ihrer Komplexität reduziert, indem die Moleküle nach ihren physisch-chemischen Eigenschaften aufgetrennt werden [23, 24].

Auf Peptidebene kann eine isoelektrische Fokussierung (IEF) oder mehrdimensionale LC vorgeschaltet werden. Auf Proteinebene wird meist eine Gelelektrophorese, insbesondere eine zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE), eingesetzt [25].

Diese Methoden sind in der Proteomanalytik weit verbreitet, wobei hierbei hauptsächlich zytosolische Proteine analysiert werden. Limitiert in diesen Ansätzen sind die Extraktion und Detektion von Membranproteinen [26]. Zum einen ist die Extraktion der Membranproteine aufgrund der Hydrophobizität erschwert und zum anderen ist die Menge der Membranproteinen im Vergleich zu den zytosolischen Proteinen geringer [27, 28].

Membranproteine sind in bzw. an der Oberfläche der Phospholipiddoppelschicht der Zelle oder Organelle lokalisiert. Je höher die Anzahl der Transmembrandomänen eines Membranproteins, desto hydrophober ist dieses [29].

Membranproteine werden häufig über die differentielle Zentrifugation in Kombination mit einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation angereichert. [30].

Weiterhin können Membranproteine über Kopplungsmethoden mit Biotinylierungs-Reagenzien angereichert werden. Hierbei werden intakte Zellen mit den Biotinylierungs-Reagenzien inkubiert, damit das Biotin über einen aktiven Ester an primäre Aminogruppen der Membranproteine bindet. Anschließend erfolgt die Anreicherung der Biotin-markierten Membranproteine über Avidin-/oder Streptavidinbeads und gleichzeitiger Abtrennung der zytosolischen Proteine [31, 32].

Aufgrund der Hydrophobizität können Membranproteine nicht unter wässrigen Bedingungen extrahiert werden. Um die hydrophoben Komplexe in wasserlösliche Aggregate zu überführen, können Detergenzien eingesetzt werden. Detergenzien sind amphipathische Moleküle, die sowohl polare als auch hydrophobe Gruppen enthalten. Zur Solubilisierung von Membranproteinen wird häufig das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet. Für die massenspektrometrische Analyse ist das Detergens jedoch nicht kompatibel und muss somit nach der Solubilisierung und vor der proteolytischen Spaltung und massenspektrometrischen Analyse entfernt werden. Schon geringe Mengen an SDS können die enzymatische Proteolyse der Proteine hindern, die chromatographische Trennung beeinflussen und aufgrund der lonisierfähigkeit und der Abundanz im Vergleich zu einzelnen Peptiden die Spektren dominieren [33-35].

Obwohl die Analyse der Membranproteine heutzutage immer noch Schwierigkeiten bereitet, ist diese von großer Bedeutung. Membranproteine werden von etwa 30 % des menschlichen Genoms kodiert und sind für die meisten spezifischen Funktionen einer Membran, z.B. Transport von Substanzen (Membrantransport), Herstellung von Zell-Zell-Kontakten (*junctions*), Zell-Zell-Erkennung und Kontakt zum Zytoskelett verantwortlich. Weiterhin können sie auch als Enzyme, meist innerhalb eines Multienzymkomplexes oder als Rezeptor fungieren [36]. Aufgrund ihrer vielfältigen Funktion sind Membranproteine fast immer in Krankheiten wie Krebs, Diabetes und Alzheimer involviert und dienen als therapeutisches *Target* für die Wirkung von 70 % der eingesetzten Medikamente [27, 29]. Eine Analyse der Membranproteine ist daher unerlässlich.

1.2.2 Massenspektrometrie-basierte Quantifizierungsmethoden

Die Reaktionen einer Zelle auf Veränderungen in ihrer Umwelt drücken sich u.a. in einer erhöhten oder reduzierten Proteinexpression aus [37]. Viele Jahre wurde für die Quantifizierung der Proteine die 2DE angewendet. Die Auftrennung über die 2DE ermöglicht eine Detektion von bis zu 5000 Proteinspots [38]. Die Quantifizierung auf dem Proteinlevel erfolgt über den Vergleich der Spotintensitäten zwischen den Gelen. Die Quantifizierungsmethode der 2DE ist nur auf lösliche und abundante Proteine beschränkt und sie ist aufgrund der hohen Anzahl der zu analysierenden Gelspots zeitaufwendig. Die Co-Migration von Proteinen führt zudem häufig zur Identifikation mehrerer Proteine in einem Spot und folglich zu einer ungenauen Quantifizierung [39].

Durch moderne LC-MS/MS Analysen können diese Probleme umgangen werden. Die MS-basierte Quantifizierung erfolgt über markierungsfreie Ansätze (*Label free*

quantification, LFQ) oder über chemische und metabolische Markierungsstrategien, die auf stabilen Isotopenmarkierungen wie Stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture (SILAC) oder Isotope-coded affinity tag (ICAT) basieren [40-42]. Bei der markierungsfreien Quantifizierung werden die Proben und die Referenzen in LC-MS-Läufen hintereinander gemessen. getrennten Die markierungsfreie Quantifizierung ist in der Probenanzahl nicht limitiert und stellt keine zusätzlichen Kosten bezüglich der Markierungsmoleküle dar. Die Quantifizierung der identifizierten Proteine erfolgt anschließend durch die Integration der Peakflächen, area under the curve (AUC), der Peptide [40, 43].

Bei der Quantifizierung der Proteine über die Integration der Fläche werden von den Peptiden die extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) erstellt, die Flächen unter den Kurven abgelesen und mit der Referenzprobe verglichen. Manuell kann dieses Verfahren nur für einzelne Proteine durchgeführt werden. Eine Quantifizierung der AUCs aller identifizierten Proteine kann über spezielle Softwareprogramme (OpenMS, MaxQuant, SIEVE) durchgeführt werden. Die vorhandenen Programme arbeiten dabei alle nach einem ähnlichen Prinzip: Die Spektren werden zentriert und die "Features", zugeordnet. Es wird jedem Signal eine exakte Masse bei entsprechender Retentionszeit zugewiesen. Die Chromatogramme werden mit den entsprechenden Features überlagert und eine Normalisierung einer systematischen Tendenz wird durchgeführt. Zuletzt werden die ermittelten Flächen der Proben miteinander verglichen und eine Aussage über die relative Menge eines Proteins in einer Probe getroffen [43, 44].

1.3 Zielsetzung

Die Zahl der Neuerkrankungen an Krebs ist in den letzten Jahren in Deutschland drastisch gestiegen [45, 46]. Die Entwicklung neuer biomedizinischer Diagnose- und Prognoseverfahren sowie Therapien ist eine wichtige Aufgabe der medizinischen Forschung. Trotz bisheriger Bemühungen sind viele Prozesse der Tumorentstehung und -entwicklung noch unbekannt [46]. Tumore des gleichen Ursprungsgewebes zeigen in verschiedenen Patienten mitunter unterschiedliche Wachstums- und Metastasierungsverhalten. Dadurch sind Krebstherapien trotz gleicher Diagnose bei einigen Patienten wirkungsvoller als bei anderen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Heterogenität von Tumoren aus identischen Ursprungszellen untersucht. Dafür wurden Rot-, Grün-, Blau- (RGB) markierte Tumorzellen in eine Mausleber eingesetzt und das Zielorgan nach Anwachsen der fluoreszenzmikroskopisch und massenspektrometrisch Tumore untersucht. Anschließend war das Ziel dieser Arbeit Proteinzusammensetzungen von verschiedener Entwicklungsstadien Tumorgeweben bzw. -modelle massenspektrometrisch zu untersuchen und anhand der Ergebnisse die molekularen Prozesse der Pathogenese aufzudecken.

Zur Untersuchung der molekularen Prozesse der Pathogenese wurden Zellen der HT29-Kolonkarzinomzelllinie in Mäuse implantiert und bis zum Anwachsen der Tumore und Metastasen gewartet. Die Ursprungszellen, der Primärtumor und dessen Metastasen wurden massenspektrometrisch im Hinblick auf die Zusammensetzung der Plasmamembran- und Oberflächenproteine sowie intrazellulären Proteine untersucht. Plasmamembran- und Oberflächenproteine wurden nach der Zelllyse über Biotin, Biocytin oder Zentrifugation angereichert, proteolytisch gespalten und massenspektrometrisch analysiert. Intrazelluläre Proteine wurden vor der proteolytischen Spaltung und der massenspektrometrischen Analyse über die 2DE aufgetrennt.

Zusätzlich wurde die Proteinzusammensetzung der HT29-Zellen nach dem Stilllegen (*knockdown, kd*) des CD133-Proteins, dem Stammzellenmarker für Tumorprogression, Proliferation und Chemoradiotherapieresistenz untersucht und mit HT29-Kontrollzellen ohne *kd* verglichen.

24

Die differentiell regulierten Proteine wurden einer Datenbank- und Literaturrecherche unterzogen und in einen funktionellen Zusammenhang mit der Tumorprogression und Proliferation gebracht.

2. Ergebnisse

2.1 Heterogenität von Karzinomen

Zur Untersuchung der Heterogenität von Karzinomen gleichen Ursprungs und unter gleichen Wachstumsbedingungen wurden Mäuse mit humanen Tumorzellen xenotransplantiert. Vor Injektion der Tumorzellen in die Maus wurden die Tumorzellen mittels Rot-, Grün-, Blau- (RGB) Vektoren markiert (Abschnitt 4.2.1), um die Ausbreitung der Tumorzellen in der Maus im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen. Die Identifizierung der humanen Tumore in murinem Gewebe erfolgte zunächst histologisch mittels Hämatoxylin-Eosin (HE)- und Fluoreszenz-Färbung und anschließend mittels MALDI Imaging (MSI). Die Beurteilung der Heterogenität der Tumore erfolgte nach MSI-Analyse anhand der Proteinprofile.

Anhand der HE-Färbung (Abbildung 2 A) konnten 16 Tumorbereiche im Gewebe der Mausleber detektiert werden. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 2 B) konnten neun Tumorareale im Gewebe der Mausleber detektiert werden. Vier Bereiche enthielten keine Zellen mit fluoreszierenden Vektoren. Die Tumore Nr. 4, 7 und 13 waren in den Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie nicht erkennbar und sind in der Abbildung als dunkelgrüne Flächen zu erkennen.





A) HE-Färbung des Gefrierschnitts. 16 Tumorareale (umrandet) mit einer unregelmäßigen Kernform und einer violetten Färbung lokalisiert in dem rosa gefärbten Mausgewebe. B) Fluorimetrische Aufnahmen. RGB markierte fluoreszierende und nicht fluoreszierende humane Tumoren in der Mausleber. Im Anschluss an die histologische Untersuchung wurden die Gewebeschnitte mittels MSI analysiert. Das Summenspektrum der gemessenen Mausleber (Abbildung 3) zeigte im Bereich zwischen 2-10 kDa besonders hohe Signalintensitäten.

Zur Visualisierung der Massensignale wurden die Intensitäten anschließend in Farbsignale umgewandelt. Mithilfe dieser Farbsignale waren Muster erkennbar, welche die Verteilung der Signale im Gewebe darstellten (Abbildung 4).

Es konnte das Signal mit dem m/z-Wert 10090 in allen Tumorarealen des Gewebeschnittes detektiert werden (Abbildung 4 A). In 15 von 16 Tumorarealen wurde das Signal mit dem m/z-Wert 5064 detektiert (Abbildung 4 B) und in lediglich einem Tumorareal konnte das Signal mit dem m/z-Wert 6669 nachgewiesen werden (Abbildung 4 C). Signale mit den m/z-Werten 10090, 6669 und 5064 wurden in der Mausleber nicht detektiert. Ausschließlich im Mausgewebe war u.a. das Signal mit dem m/z-Wert 14168 detektierbar (Abbildung 4 D).

Die Ergebnisse der MALDI-MSI-Messung zeigen, dass die einzelnen Tumorareale anhand der MS-Signale heterogen sind, denn nicht jedes Signal wird in jedem Tumorareal detektiert.



Abbildung 3: Summenspektrum der MALDI MSI-Messung der Mausleber mit humanen Tumoren. Der gemessene Massenbereich beträgt 2-20 kDa.



Abbildung 4: MSI Abbildungen ausgewählter Signale der Mausleber

A) Das Signal mit dem m/z-Wert 10090 wurde in allen Tumorarealen auf dem Gewebeschnitt detektiert.
B) In 15 der 16 Tumorareale wurde das Signal mit dem m/z-Wert 5064 detektiert.
C) Nur in einem Tumorareal konnte das Signal mit dem m/z-Wert 6669 detektiert werden.
D) Das Signal mit dem m/z-Wert 14168 wurde ausschließlich im Mausgewebe detektiert.

Zur Verdeutlichung der Heterogenität wurde von jedem Tumorareal ein `*Density Plot*` erstellt, indem die Intensität jedes Signals gegen den m/z-Wert aufgetragen wurde. Je größer die Intensität des Signals war, desto intensiver war der Schwarzton im Plot. Der *Density Plot* der 16 Tumorareale sowie des Mausgewebes ist in Abbildung 5 dargestellt.

Signale mit m/z-Werten etwa von 9514, 10090 und 11638 wurden in allen Tumoren detektiert. Eindeutige Unterschiede zwischen den Tumoren waren im Plot ebenfalls zu erkennen. So konnte das Signal mit dem m/z-Wert 6823 in sieben Tumorarealen

(Tumore 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15), hingegen das Signal mit dem m/z-Wert 6667 in nur einem Tumorareal detektiert werden (Tumor 16). Signale der Mausleber unterscheiden sich ebenfalls von den Signalen der humanen Tumore, denn das Signal mit dem m/z-Wert von 14168 wurde ausschließlich im Mausgewebe detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass humane Tumore sich nicht nur vom murinen Lebergewebe sondern sogar untereinander unterscheiden und aufgrund der Unterschiede den einzelnen Tumoren eine Art individuellen Massen-Fingerabdruck verleihen.



Abbildung 5: Density Plot von 16 humanen Tumoren und der Mausleber.

Die Intensität jedes Signals ist gegen den m/z Wert aufgetragen. Je größer die Intensität des Signals, desto intensiver der grau-schwarz Ton im Plot. Auf der rechten y-Achse ist die Nummer des Tumors und auf der x-Achse der Massenbereich [m/z] dargestellt.

2.2 Analyse molekularer Prozesse im Kolonkarzinom

Während des Tumorwachstums und der Metastasierung geraten mehrere molekulare Prozesse aus dem Gleichgewicht und ermöglichen der Zelle eine schnelle Zellteilung. Um diese Prozesse im Kolonkarzinom zu verstehen, wurde das Proteom der Kolonkarzinom-Zelllinie HT29 in Tumoren und Metastasen untersucht und anschließend nach Proteinen mit signifikanten Konzentrationsunterschieden gefiltert. Anhand der erhaltenen Ergebnisse wurden mit Hilfe einer Literaturrecherche Rückschlüsse auf die Funktionen der Proteine gezogen, die während des Tumorwachstums und der Metastasierung von Bedeutung sein können (Abschnitt 3). Die Untersuchung wurde für Membran- und Zelloberflächenproteine (Abschnitt 4.3.7 - 4.3.9) sowie intrazelluläre Proteine (Abschnitt 4.3.10) durchgeführt. Aufgrund der zuvor beobachteten Heterogenität der Tumore (Abschnitt 2.1) wurden in den Experimenten nur Proteine berücksichtigt, die in allen biologischen Replikaten vorhanden waren.

2.2.1 Membran- und Zelloberflächenproteine

2.2.1.1 Vergleich Detergens-basierter Methoden zur Extraktion von Zellmembran- und Zelloberflächenproteinen

Zur Extraktion der Zellmembran- und Zelloberflächenproteine unter Einsatz von SDS wurden zwei Methoden 8.3.5 (Methode 1, SDS-PAGE) und 8.3.7 (Methode 2, Filter Aided Sample Preparation (FASP)) eingesetzt und miteinander verglichen. Die Beurteilung der Methoden erfolgte anhand der Anzahl an identifizierten Zellmembran- und Zelloberflächenproteinen. Dazu wurden Balkendiagramme beider Methoden mit der Anzahl an gesamten, identifizierten Proteinen, der Anzahl an Membranproteinen, der Anzahl an Plasmamembranproteinen und der Anzahl an Zelloberflächenproteinen erstellt (Abbildung 6).

Als Membranproteine wurden solche Proteine bezeichnet, die mit dem GO-Term Membranprotein (GO:0016020) annotiert waren. Der Begriff "Membranproteine" bezieht sich dabei sowohl auf Plasmamembranproteine als auch auf Proteine anderer Organellen in der Zelle, die von einer Membran umschlossen sind. Dazu zählen u.a. die Kernmembran und die Mitochondrienmembran. Mit der GO Annotation Plasmamembranproteine (GO:0005886) werden in der Datenbank alle Proteine annotiert, die mit der Zellmembran assoziiert sind. Unter Zelloberflächenproteine sind Proteine zusammengefasst, die an die Zellmembran angeheftet sind. Diese besitzen den GO-Term GO:0009986.



Abbildung 6: Balkendiagramm mit der Anzahl an identifizierten Proteinen in der Methode 1 (SDS-PAGE) und Methode 2 (FASP).

Es sind die Gesamtzahl der identifizierten Proteine (\blacksquare), Membranproteine (\blacksquare), Plasmamembranproteine (\blacksquare) und Zelloberflächenproteine (\blacksquare) dargestellt (n = 3) * p < 0,05.

Mit Methode 1 (SDS-PAGE) wurden im Durchschnitt 1304 Proteine identifiziert. Davon wurden 898 Proteine als Membranproteine, 287 Proteine als Plasmamembranproteine und 61 Proteine als Zelloberflächenproteine annotiert.

Mit Methode 2 (FASP) wurden 1800 Proteine, mit 1150 Membranproteinen, 360 Plasmamembranproteine und 68 Zelloberflächenproteine identifiziert.

Die Anzahl an identifizierten Proteinen mit FASP ist höher als mit SDS-PAGE.

Als weiterer Gesichtspunkt bei der Beurteilung der Methoden diente die Vollständigkeit der Entfernung von SDS. In den Chromatogrammen beider Methoden wurden keine Polymere, die von SDS abstammen, detektiert. Daraus lässt sich schließen, dass die Entfernung von SDS in beiden Methoden gleichermaßen effektiv war (Anhang Abbildung 39).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde FASP für die weiteren Experimente genutzt.

2.2.1.2 Vergleich der Detergens-basierten FASP-Methode mit zwei Biotinylierungs-Methoden zur Extraktion von Zellmembran- und Zelloberflächenproteinen

Zusätzlich zur Detergens-basierten FASP Methode (Abschnitt 4.3.7) wurden zwei Biotinylierungs-Methoden (Biotin-Streptavidin-Kopplung (4.3.8) und Biocytin-Streptavidin-Kopplung (4.3.9)) getestet. Die Methode mit der höchsten Anzahl an identifizierten Zellmembran- und Zelloberflächenproteinen sollte anschließend zur Untersuchung von molekularen Prozessen im Kolonkarzinom verwendet werden.

Bei der Detergens-basierten FASP Methode wurden insgesamt 997 Proteine identifiziert (n = 3). Davon waren 691 Proteine als Membranproteine und 198 als Plasmamembranproteine annotiert. Etwa 4 % (42) der identifizierten Proteine waren Oberflächenproteine (Tabelle 1).

Die erste Biotinylierungs-Methode basiert auf der Biotin-Streptavidin-Kopplung. Es konnten insgesamt 253 Proteine identifiziert werden (n = 2). Zwei Drittel der Proteine (192) waren Membranproteine. Als Plasmamembranproteine wurden 103 Proteine und als Zelloberflächenproteine 40 Proteine annotiert (Tabelle 1).

Bei der zweiten Biotinylierungs-Methode wurde Biocytin, ein Biotin-Derivat, eingesetzt. Es wurden bei der Extraktion mit Biocytin 47 Membranproteine identifiziert. Davon waren 15 Plasmamembranproteine und vier Oberflächenproteine. Insgesamt wurden mit dieser Methode 77 Proteine identifiziert (n = 3).

Eine Gegenüberstellung der identifizierten Proteine, Membranproteine, Plasmamembranproteine und Oberflächenproteine der drei Methoden ist Tabelle 1 zu entnehmen. Tabelle 1: Gegenüberstellung der extrahierten, identifizierten Proteine, Membranproteine,Plasmamembranproteine und Zelloberflächenproteine.

		, II 6	,
	FASP	Biotin	Biocytin
Proteine	997	253	77
Membranproteine	691 (69 %)	192 (76 %)	47 (61 %)
Plasmamembranproteine	198 (20 %)	103 (41 %)	15 (19 %)
Oberflächenproteine	42 (4 %)	40 (16 %)	4 (5 %)

Verwendete Methoden: FASP (n = 3), Kopplung mit Biotin (n = 2) und Kopplung mit Biocytin (n = 3).

Zur Darstellung gemeinsam identifizierter Proteine der drei Methoden wurden Venn-Diagramme erstellt (Abbildung 7).

Proteine



Abbildung 7: Venn Diagramm mit der Anzahl an identifizierten Proteinen mit den Methoden: FASP, Kopplung mit Biotin-Streptavidin und Kopplung mit Biocytin-Straptavidin.

hellgrau: Anzahl an Proteinen identifiziert mit einer Methode; grau: Anzahl an Proteinen identifiziert mit zwei Methoden; dunkelgrau: Anzahl an Proteinen identifiziert mit allen drei Methoden.

Wie in Abbildung 7 ersichtlich wird, konnten mit der FASP-Methode die meisten Proteine detektiert werden (ausschließlich 812), gefolgt von der Biotin-Methode (ausschließlich 83). Die Schnittmenge beider Methoden lag bei 118 Proteinen. Proteine identifiziert in der Biocytin-Methode wurden weitestgehend von der FASP und/ oder Biotin-Methode abgedeckt.

Ergebnisse





Abbildung 8: Venn Diagramm mit der Anzahl an identifizierten Plasmamembranproteinen mit den Methoden: FASP, Kopplung mit Biotin-Streptavidin und Kopplung mit Biocytin-Straptavidin.

hellgrau: Anzahl an Plasmamembranproteinen identifiziert mit einer Methode; grau: Anzahl an Plasmamembranproteinen identifiziert mit zwei Methoden; dunkelgrau: Anzahl an Plasmamembranproteinen identifiziert mit allen drei Methoden.

In Abbildung 8 ist das Venn-Diagramm, gefiltert nach GO-Annotation "zelluläre Komponenten" mit dem GO-Term GO:0005886 für Plasmamembranproteine, dargestellt.

In der FASP Methode (198 Proteine) wurden fast doppelt so viele Plasmamembranproteine wie in Biotin-Methode (103 Proteine) identifiziert. Die Schnittmenge beider Methoden lag bei 59 Proteinen. Mithilfe der Biocytin-Methode konnte kein zusätzliches Plasmamembranprotein detektiert werden.

Ergebnisse





Abbildung 9: Venn Diagramm mit der Anzahl an identifizierten Zelloberflächenproteinen mit den Methoden: FASP, Kopplung mit Biotin-Streptavidin und Kopplung mit Biocytin-Straptavidin.

hellgrau: Anzahl an Zelloberflächenproteinen identifiziert mit einer Methode; grau: Anzahl an Zelloberflächenproteinen identifiziert mit zwei Methoden; dunkelgrau: Anzahl an Zelloberflächenproteinen identifiziert mit allen drei Methoden.

Abbildung 9 stellt das Venn-Diagramm mit der GO-Annotation "zelluläre Komponenten" und dem GO-Term GO:0009986 für Zelloberflächenproteine dar. Mit der FASP- (42 Proteine) und der Biotin-Methode (40 Proteine) wurden gleichviele Zelloberflächenproteine detektiert. 22 Zelloberflächenproteine wurden in beiden Methoden überlappend identifiziert.

Die Biocytin-Methode ist zeitintensiv und liefert vergleichsweise weniger Plasmamembran- und Zelloberflächenproteine. Anhand der Ergebnisse wurde beschlossen, die Extraktion von Membranproteinen über die Biocytin-Methode nicht weiter zu verfolgen.

Die Methoden FASP und Biotin sind im Vergleich zu der Methode Biocytin gut geeignet. Beide Methoden erwiesen sich als komplementär in der Identifizierung von Plasmamembran- und Zelloberflächenproteinen und wurden zur weiteren Analyse, der Quantifizierung von Proteinen im Kolonkarzinom, eingesetzt.
2.2.1.3 Quantifizierung der Membran- und Zelloberflächenproteine zur Untersuchung molekularer Prozesse im Kolonkarzinom

Die Untersuchung molekularer Prozesse aufgrund der Proteinzusammensetzung an der Zelloberfläche im Kolonkarzinom erfolgte unter Einsatz von HT29-Zellen nach Tumorentwicklung und Metastasierung. Um Änderungen in der PT und Met zu vergleichen, wurden als Kontrolle HT29-Zellen verwendet. Membran- und Oberflächenproteine wurden mit der FASP- und Biotin-Streptavidin-Methode extrahiert und massenspektrometrisch analysiert.

Vor der Auswertung erfolgte die Überprüfung der Datenqualität. Die gemessenen LFQ-Intensitätswerte der Biotin- und FASP aufgearbeiteten Proben waren normalverteilt, so dass bei den Streudiagrammen der Pearson-Korrelationskoeffizient verwendet wurde. Die Koeffizienten zwischen den Replikaten und den einzelnen Proben lagen mit Werten zwischen 0,8-1 (Abbildung 10 für Biotin und Abbildung 11 für FASP).



Abbildung 10: Histogramme zur Normalverteilung (A) und Streudiagramme mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten (B) der gemessenen Proben nach Biotin-Aufarbeitung.

HT = Kontrollzellen, PT = Primärtumor, Met = Metastasen (n=2)



Abbildung 11: Histogramme zur Normalverteilung (A) und Streudiagramme mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten (B) der gemessenen Proben nach FASP-Aufarbeitung. HT = Kontrollzellen, PT = Primärtumor, Met = Metastasen (n=2)

Zur Vereinfachung der Quantifizierung wurden die erhaltenen LFQ-Intensitätswerte dekadisch logarithmiert. Anschließend wurden Suchkriterien eingefügt:

- Die Proteine sollten mindestens zwei eindeutige Peptide aufweisen, und in beiden Replikaten vorhanden sein.
- Die logarithmierten Werte sollten sich zwischen einer der drei Stadien (HT, PT, Met) um mindestens 0,3 bzw. -0,3 unterscheiden d.h. die Konzentration sollte mindestens um den Faktor 2 höher oder niedriger sein.

Abschließend wurden die Proteine nach den GO-Annotationen GO:0005886 für Plasmamembranproteine und GO:0009986 für Zelloberflächenproteine gefiltert (Tabelle 2).

	Biotin-Streptavidin	FASP						
Gesamtzahl	667	1907						
identifizierter Proteine								
	Nach Einfügen von Filtern:							
Plasmamebranproteine	26	52						
Zelloberflächenproteine	13	18						
Gesamtzahl Plasmamembran- und Zelloberflächenproteine:								
109								
Gesamtzahl nach Entfernung doppelter Proteine:								
	77							

Tabelle 2: Anzahl an identifizierten Plasmamembranproteinen und Zelloberflächenproteinen nach Anwenden von Filterkriterien

Das Anwenden der Filterkriterien ermöglichte eine starke Reduktion der Datenkomplexität. Anschließend wurden Proteine mit den meisten eindeutigen Peptiden gewählt (Protocadherin Fat 1, Integrin beta-4, Basal Zelladhäsionsprotein und Annexin A2), im Hinblick auf Tumorgenese interpretiert und diskutiert (Kapitel 7).

Protocadherin Fat 1

Protocadherin Fat 1 (FAT 1) wurde mit 84 eindeutigen Peptiden Identifiziert. Das Protein war in den Metastasen um Faktor 2 und im Primärtumor um Faktor 1,6 im Gegensatz zu den Kontrollzellen hochreguliert. Der Unterschied zwischen Metastasen und Kontrollzellen war statistisch signifikant.



Abbildung 12: Balkendiagramm der Intensitäten des Proteins Protocadherin Fat 1 in den Kontrollzellen (HT), in den Zellen des Primärtumors (PT) und in den Zellen der Metastasen (Met). Das Protein wurde mit 84 Peptiden identifiziert. (n = 2) * p-Wert < 0,05

Integrin beta-4

Integrin beta-4 (ITB4) wurde mit 37 eindeutigen Peptiden identifiziert. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen und dem Primärtumor war dieses Protein in den Metastasen um Faktor 2,6 bzw. Faktor 3,3 herrunterreguliert.



Abbildung 13: Balkendiagramm der Intensitäten des Proteins Integrin beta-4 in den Kontrollzellen (HT), in den Zellen des Primärtumors (PT) und in den Zellen der Metastasen (Met). Das Protein wurde mit 37 Peptiden identifiziert. (n = 2) * P-Wert < 0.05

Basal Zelladhäsionsprotein

Das Basal Zelladhäsionsprotein (*Basal cell adhesion molecule*, BCAM) wurde mit 28 Peptiden identifiziert. Das Protein war in den Metastasen um Faktor 2,8 und im Primärtumor um Faktor 2,3 im Gegensatz zu den Kontrollzellen herrunterreguliert. Der Unterschied zwischen Metastasen und Kontrollzellen war statistisch signifikant.



Abbildung 14: Balkendiagramm der Intensitäten des Basal Zelladhäsionsproteins in den Kontrollzellen (HT), in den Zellen des Primärtumors (PT) und in den Zellen der Metastasen (Met). Das Protein wurde mit 28 Peptiden identifiziert. (n = 2) * p-Wert < 0.05

Annexin A2

Annexin A2 (ANXA2) wurde mit insgesamt 27 eindeutigen Peptiden identifiziert. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen und dem Primärtumor war dieses Protein in den Metastasen um Faktor 1,7 bzw. Faktor 3,2 herrunterreguliert. Im Primärtumor war ANXA2 2-fach höher konzentriert als in den Kontrollzellen.



Abbildung 15: Balkendiagramm der Intensitäten des Proteins Annexin A2 in den Kontrollzellen (HT), in den Zellen des Primärtumors (PT) und in den Zellen der Metastasen (Met). Das Protein wurde mit 27 Peptiden identifiziert. (n = 2) * p-Wert < 0.05

2.2.2 Differentielle Analyse intrazellulärer Proteine zur Untersuchung molekularer Prozesse im Kolonkarzinom

Zur Untersuchung intrazellulärer Prozesse im Kolonkarzinom wurden ebenfalls HT29-Zellen nach Tumorentwicklung und Metastasierung verwendet und die Proteinextrakte mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE) analysiert. Als Kontrolle wurde die Zelllinie HT29 verwendet.

In Abbildung 16, Abbildung 18 und Abbildung 20 sind Ausschnitte aus den 2DE-Gelen dargestellt. Abbildungen der Originalgele befinden sich im Anhang (Abbildung 40).

Pyruvatkinase



Abbildung 16: Ausschnittsvergrößerungen aus 2DE-Gelanalysen (A) sowie 3D-Darstellungen (B) des Spots Pyruvatkinase (roter Pfeil).

Links: Kontrollzellen (HT); Mitte: Zellen aus Primärtumor (PT); Rechts: Zellen aus Metastasen (Met). Es wurden 100 µg Zelllysat für die 2DE-Analyse eingesetzt.

Im Gel der HT29-Zelllinie (Abbildung 16, A) wurde ein intensiver Spot detektiert (roter Pfeil). Der Spot wurde in den Gelen der Tumor- und Metastasen-Zellen mit einer niedrigeren Farbintensität detektiert. Mit der Software Melanie Viewer wurden die Spots anschließend als 3D-Abbildungen dargestellt. (Abbildung 16, B). Dabei wurden die Intensitäten der Spots als Flächen abgebildet. Die Flächen in den Gelen der Tumor- und Metastasen-Zellen waren geringer als in dem der HT29-Zelllinie. Die Identifizierung der Spots ergab, dass es sich um das Protein Pyruvatkinase PKM (Gen: PKM, m= 57,9 kDA) handelt. Ein Fragmentspektrum der Sequenz IYVDDGLISLQVK der Pyruvatkinase ist in Abbildung 17 dargestellt.



Abbildung 17: Fragmentspektrum des zweifach geladenen Peptidions (m/z 731,91) mit der identifizierten Peptidsequenz IYVDDGLISLQVK (Pyruvatkinase PKM) und der annotierten y- und b-Ionenserie

Aldehyddehydrogenase 2 (mitochondrial)

In den Gelen der Tumor- und Metastasen-Zellen wurde ein Spot detektiert, welcher in dem Gel der HT29-Zellen eine geringe Intensität aufwies (Abbildung 18, roter Pfeil). Die Analyse des Spots ergab, dass es sich um Aldehyddehydrogenase 2 (Gen: ALDH2; m= 54 kDa) handelt. Ein Fragmentspektrum der Sequenz ANNSTYGLAAAVFTK der Aldehyddehydrogenase 2 ist in Abbildung 19 dargestellt.



Abbildung 18: Ausschnittsvergrößerungen aus 2DE-Gelanalysen (A) sowie 3D-Darstellungen (B) des Spots Aldehyddehydrogenase 2, mitochondrial (roter Pfeil).

Links: Kontrollzellen (HT); Mitte: Zellen aus Primärtumor (PT); Links: Zellen aus Metastasen (Met). Es wurden 100 µg Zelllysat für die 2DE-Analyse eingesetzt.



Abbildung 19: Fragmentspektrum des zweifach geladenen Peptidions (m/z 764,39) mit der identifizierten Peptidsequenz ANNSTYGLAAAVFTK (Aldehyddehydrogenase 2, mitochondrial) und der annotierten y- und b-lonenserie.

Alpha-Enolase

Im Gel der HT29-Zellen wurde ein Spot (Abbildung 20, roter Pfeil) beobachtet, während in den Gelen der Tumor- und Metastasen-Zellen an der Position zwei Spots detektiert wurden. Mittels LC-MS/MS wurde in allen Spots das Enzym alpha-Enolase (Gen: ENO1; m= 47 kDa) identifiziert.



Abbildung 20: Ausschnittsvergrößerungen aus 2DE Gelanalysen (A) sowie 3D-Darstellungen (B) des Spots alpha-Enolase (rot markiert).

Links: Kontrollzellen (HT); Mitte: Zellen aus Primärtumor (PT); Rechts: Zellen aus Metastase (Met). Es wurden 100 µg Zelllysat für die 2DE-Analyse eingesetzt.

Aufgrund der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass das Enzym während der Tumorentwicklung und Proliferation posttranslationalen Modifizierungen unterliegt. Die Modifizierungen führen zu Unterschieden in dem isoelektrischen Punkt des Enzyms und erklären die Auftrennung bzw. Entstehung eines weiteren Spots.

Zu den häufigsten posttranslationalen Modifikationen der alpha-Enolase zählen Acetylierungs-, Methylierungs- und Phosphorylierungsreaktionen [47, 48]. Eine erneute Analyse auf folgende posttranslationale Modifizierungen wurde durchgeführt: Phosphorylierung an Serin, Threonin und Tyrosin; Acetylierung an Lysin, und Methylierung an Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Asparagin, Arginin, Glutamin, Serin, Threonin und Histidin.

Es konnte keine Phoshorylierung oder Acetylierung der alpha-Enolase identifiziert werden. Hingegen konnten Methylierungen des Enzyms detektiert werden. Eine Übersicht an identifizierten methylierten Peptiden ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Identifizierte methylierte Peptide der alpha-Enolase in den Spots der 2DE-GeleHT = Zelllinie; PT = Primärtumor; Met = Metastasen

	Peptid-Sequenz	Methyl- Modifikation	MH+(Da)	HT29	PT_1a	PT_1b	Met_1a	Met_1b
1	VNQIGSVTESLQACK	K15	1647,83					
2	GNPTVEVDLFTSK	E6; D8	1434,75					
3	FGANAILGVSLAVCK	K15	1533,85					
4	SCNCLLLK	N3	1021,51					

An der alpha-Enolase wurde ein methyliertes Peptid (Sequenz VNQIGSVTESLQACK) in allen Spots der drei Entwicklungsstadien (Zelllinie, Primärtumor, Metastase) detektiert. In den Zellen des Primärtumors in Spot PT_1a wurde zusätzlich das Peptid SCNCLLLK mit einer N-Methylierung an Asparagin detektiert.

den Zellen der Metastasen wurde ein Peptid mit Sequenz In der FGANAILGVSLAVCK und einer Methylierung am Lysinrest detektiert. Im Spot Met_1a wurde weiterhin das Peptid GNPTVEVDLFTSK mit Methylierungen an den Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure detektiert. Ein Fragmentspektrum der methylierten Sequenz GNPTVEVDLFTSK der alpha-Enolase ist in Abbildung 21 dargestellt.



Abbildung 21: Fragmentspektrum des zweifach geladenen Peptidions (m/z 717,87) mit der identifizierten Peptidsequenz GNPTVEVDLFTSK (alpha-Enolase) und der annotierten y- und b-Ionenserie

2.3 Analyse molekularer Prozesse im Kolonkarzinom unter Einfluss von CD133

Der Oberflächenmarker CD133 (auch Prominin-1) gilt als Markerprotein in einigen im kolorekralen Karzinom. CD133 Tumorarten u.a. ist ein Glykotransmembranprotein, wobei die Funktion des Proteins noch weitgehend unbekannt ist [49]. Es wird vermutet, dass es sich um einen Marker für Stammzellen handelt. Eine Tumorstammzelle ist eine Zelle innerhalb eines Tumors, welche sowohl die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (symmetrisch und asymmetrisch) als auch zum Erzeugen und Aufrechterhalten des heterogenen Zellbilds eines Tumors hat [50]. CD133 soll dabei für die Tumorprogression, Proliferation und Chemoradiotherapieresistenz verantwortlich sein [51]. Weiter konnte Griguer et al. (2008) zeigen, dass das Protein CD133 mit einer hypoxischen Mikroumgebung und mitochondrialen Dysfunktion korreliert ist [52].

Der Einfluss von CD133 auf das Kolonkarzinom wurde in Kooperation mit Dr. Daniel Wicklein (Anatomisches Institut des UKE, Hamburg) untersucht. Hierzu wurden HT29-CD133-*knockdown* Zellen (kd), HT29-Zellen sowie HT29-Zellen mit einem Kontrollvektor gegen Luziferase (Luc) subkutan in *Severe Combined Immunodeficiency* (schwerer kombinierter Immundefekt, SCID) Mäuse injiziert und das Überleben der Mäuse beobachtet. Die Überlebenskurven der Mausgruppen sind der Abbildung 22 zu entnehmen.



* : P = 0.0156; ** : P = 0.0099

Abbildung 22: Überlebenskurven der Mausgruppen mit HT29 CD133-kd-Zellen (orange), HT29 Luc (dunkelblau) und HT29 Zellen (hellblau).

(Ergebnisse: Dr. Daniel Wicklein, Anatomie, UKE, Hamburg)

Es wurde festgestellt, dass Mäuse nach Transplantation von CD133-kd-Zellen eine signifikant höhere Überlebensrate auswiesen. Nach 50 Tagen waren etwa 80 % der Mäuse mit CD133-kd-Zellen und 35 % der Mäuse mit HT29 Luc (Kontrolle) Zellen am Leben. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass das Tumorwachstum der Mäuse mit CD133-kd-Zellen verringert, die Metastasierung hingegen erhöht war.

Die Tumore der beiden Entwicklungsstadien CD133-kd und Kontrolle Luc wurden auf Transkriptom- (Dr. Daniel Wicklein) und Proteomebenen untersucht (Abschnitt 4.4).

Die tryptischen Peptide der Gewebeschnitte wurden zunächst mit einem nanoUPLC-ESI-QTOF Massenspektrometer Tumorareale analysiert. Da die in den Gewebeschnitten unterschiedlich groß waren, wurden Peptidlösungen mit verschiedenen Volumina injiziert, um annährend identische Basis-Peak-Intensitäten (BPI) im Chromatogramm zu erreichen. Bei identischen BPIs wurde eine annähernd gleiche Konzentration an Peptiden in den einzelnen Proben angenommen. Die BPIs der Proben lagen in dem Bereich 575 – 735. Die Chromatogramme mit den BPIs der Tumore von HT29 Luc Zellen sind in Abbildung 23 dargestellt und die der HT29 CD133-kd-Zellen in Abbildung 24.



Abbildung 23: Basis-Peak-Chromatogramme (BPCs) der nanoUPLC-ESI-Q-TOF-MS-Analyse der Tumore der HT29-Zellen.

Auf der y-Achse ist die Intensität [%] und auf der x-Achse die Retentionszeit [min] dargestellt.



Abbildung 24: Basis-Peak-Chromatogramme (BPCs) der nanoUPLC-ESI-Q-TOF-MS-Analyse der Tumore der HT29 CD133-kd-Zellen.

Auf der y-Achse ist die Intensität [%] und auf der x-Achse die Retentionszeit [min] dargestellt.

Nach einer ersten Abschätzung der einzusetzenden Injektionsvolumina am nanoUPLC-ESI-QTOF-Massenspektrometer wurden die einzusetzenden

Ergebnisse

Injektionsvolumina an der UHPLC-Orbitrap-MS/MS verfeinert und die LC-MS/MS-Analyse der Proben durchgeführt. Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der Daten wurde auf Normalverteilung geprüft und anschließend Streudiagramme mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten erstellt (Abbildung 25).



Abbildung 25: Histogramme zur Normalverteilung (A) und Streudiagramme mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten (B) der gemessenen Proben. CD133-kd n=3; Luc n=4. Die gemessenen LFQ-Intensitätswerte der Proben waren normal verteilt, so dass bei den Streudiagrammen der Pearson-Korrelationskoeffizienten verwendet wurde. Die Koeffizienten zwischen den Replikaten und den einzelnen Proben lagen zwischen 0,9-1, so dass eine hohe Korrelation anzunehmen war.

Es konnten mit der durchgeführten Extraktion und der massenspektrometrischen Analyse eine Vielzahl an Proteinen identifiziert und quantifiziert werden.

Zur Überprüfung der Aufarbeitung und Extraktion wurde auf Kontrollproteine zurückgegriffen. Kontrollproteine sind für die Aufrechterhaltung verschiedener Zellfunktionen essentiell und im Idealfall in konstanter Konzentration in der Zelle vorhanden, unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und den äußeren Einflüssen. Routinemäßig werden solche Proteine als Ladekontrollen bei Western-Blot-Analysen eingesetzt.

 β -Aktin wird häufig als Kontrollprotein bei Western-Blots eingesetzt [53-55]. Das Protein β -Aktin wurde in diesem Experiment lediglich mit einem eindeutigen Peptid identifiziert. Eine solch geringe Anzahl an identifizierten Peptiden wurde für die Quantifizierung nicht berücksichtigt. In den Daten des Quantifizierungsexperiments wurde gezielt nach Kontrollproteinen gesucht, die in der Literatur bei HT29-Zellen eingesetzt werden.

GAPDH

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Enzym der Glykolyse.Es wird als Ladekontrolle in Experimenten mit HT29-Zellen verwendet [56, 57].GAPDH wurde mit 19 eindeutigen Peptiden und einer Sequenzabdeckung von 70,4 % identifiziert. Wie in Abbildung 26 dargestellt, waren die Intensitäten von GAPDH in den Versuchen ohne einen signifikanten Unterschied.



Abbildung 26: Intensitäten des identifizierten Enzyms GAPDH. CD133-kd n=3; Luc n=4

ß-Tubulin

Das Protein β-Tubulin ist der Hauptbestandteil der Mikrotubuli. Es ist ein Strukturprotein des Zytoskeletts. In Western Blot-Analysen von HT29-Zellextrakten wird oftmals ß-Tubulin als Ladekontrolle verwendet [58]. ß-Tubulin wurde mit fünf eindeutigen Peptiden und einer Sequenzabdeckung von 67,3 % detektiert. Der Unterschied der Intensitäten war in den Proben ohne Signifikanz.



Abbildung 27: Intensität von ß-Tubulin. CD133-kd n=3; Luc n=4

Anschließend wurden regulierte Proteine, die mindestens eine 2-fache Erhöhung oder Verringerung der Intensität auswiesen, gefiltert. Dazu wurde der zweiseitige t-Test, mit einem Permutation-basierten FDR (*false discovery rate*) von 0,05 gewählt. Statistisch, signifikant gefilterte Proteine sind im *Volcano plot* außerhalb der hyperbolischen Kurve mit einer roten Markierung dargestellt (Abbildung 28).



Abbildung 28: Volcano plot mit identifizierten Proteinen.

Statistisch signifikant regulierte Proteine (rot) liegen außerhalb der hyperbolischen Kurve. Nicht signifikante Proteine (grau) liegen unterhalb der Kurve. x-Achse: Differenz der gemessenen logarithmierten Intensitätsmittelwerte. y-Achse: Negativer logarithmierter p-Wert.

Die regulierten Proteine des *Volcano-plots* wurden anschließend in einer *Heatmap* dargestellt (Abbildung 29). Aufgrund der Ähnlichkeiten der beiden Ansätze wurden diese zuletzt in eine hierarchiale Gruppierung zusammengefasst.

Insgesamt wiesen 309 Proteine signifikant unterschiedliche Intensitäten auf. Davon hatten 130 Proteine in dem Primärtumor der CD133-kd-Zellen eine höhere Intensität (rot) als in der Kontrolle (Luc) und 179 Proteine eine niedrigere (blau).

Ergebnisse



Abbildung 29: *Heatmap* der MS-Ergebnisse zur Darstellung differentiell exprimierter Proteine in Primärtumoren der HT29-Zellen mit CD133 kd und Luc (Kontrolle).

Jeder Strich im Cluster korreliert mit einem Protein. Blau sind verringerte und rot sind erhöhten Expressionswerten relativ zum Medianwert. FDR=0,05.

Das Vorkommen der Proteine wurde folgend in KEGG-Stoffwechselwegen (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) zusammengefasst. Dazu wurde eine DAVID-Analyse (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) durchgeführt. Es konnten 17 verschiedene Stoffwechselwege, mit mindestens drei Proteinen pro Stoffwechselweg, zugeordnet werden (Tabelle 4).

	Stoffwechsel	Proteine	p-Wert	FDR
1	Fokale Adhäsion	17	3,3E-04	3,9E-01
2	Regulation des Aktin-Zytoskeletts	14	1,3E-02	1,4E+01
3	ECM-Rezeptor Interaktion	13	4,2E-04	7,9E-03
4	Arginin- und Prolin-Metabolismus	12	3,5E-07	4,1E-04
5	Glykolyse/Gluconeogenese	8	2,0E-03	2,5E+00
6	Herz-Muskel Kontraktion	8	8,9E-03	1,0E+01
7	Oxidative Phosphorylierung	7	9,8E-02	7,1E+01
8	Amino- und Nukleotidzucker-Metabolismus	7	1,9E-03	2,2E+00
9	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR)	6	5,7E-02	5,0E+01
	Mechanismus			
10	Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie	6	7,9E02	6,2E+01
	(ARVC)			
11	Pyruvat-Metabolismus	5	3,2E-02	3,2E+01
12	Fettsäuren-Metabolismus	5	3,2E-02	3,2E+01
13	Tryptophan-Metabolismus	5	3,2E-02	3,2E+01
14	Steroidhormon-Biosynthese	5	4,9E-02	4,5E+01
15	Propanoat-Metabolismus	4	7,1E-02	5,8E+01
16	DNA-Reparatur	4	8,8E-02	6,6E+01
17	Ascorbin- und Zuckersäure-Metabolismus	3	9,2E-02	6,8E+01

Tabelle 4: Gruppierung der regulierten Proteine in KEGG-Stoffwechselwege nach DAVID.

Proteine der Stoffwechselwege oxidative Phosphorylierung und Glykolyse/Gluconeogenese wurden im Folgenden näher betrachtet, da nach Griguer *et al.* CD133 in Korrelation zur mitochondrialen Dysfunktion steht [52].

Tabelle 5: Identifizierte Proteine der oxidativen Phosphorylierung.

E.P. = eindeutige Peptide; Seq.abd. = Sequenzabdeckung; \uparrow = hochreguliert; \downarrow = niedrig reguliert

	Protein		CD133	Faktor	E. P.	Seq.abd.
1	Cytochrome b-c1 complex subunit 7	P14927	\downarrow	3	6	43
	(UQCRB)					
2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	P22695	\downarrow	5	14	50
	(UQCRC2)					
3	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske	P47985	\downarrow	5	5	19
	(UQCRFS1)					
4	Cytochrome c oxidase subunit 2	P00403	\downarrow	3	5	21
	(MT-CO2)					
5	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1	P13073	\downarrow	4	4	26
	(COX4I1)					
6	Cytochrome c oxidase subunit 5B (COX5B)	P10606	\downarrow	8	5	26
7	Pyrophosphatase 2 (PPA2)	Q9H2U2	\downarrow	6	10	43

Es wurden sieben Enzyme identifiziert, die der oxidativen Phosphorylierung zugeordnet werden konnten. Davon waren alle in den CD133 kd Zellen herrunterreguliert.

Die Glykolyse/Gluconeogenese als Stoffwechselweg ist in der Tumorbiologie gut erforscht. Es ist bekannt, dass Tumorzellen mehr Glukose verwerten, obwohl der Zitratzyklus- und die oxidative Phosphorylierung verlangsamt sind [59, 60].
 Tabelle 6: Identifizierte Proteine der Glycolyse/ Gluconeogenese.

E.P. = eindeutige Peptide; Seq.abd. = Sequenzabdeckung; \uparrow = hochreguliert; \downarrow = herrunterreguliert

	Protein		CD133	Faktor	E. P.	Seq.abd.
1	Phosphoglukomutase	P36871	↑ (7,5	10	26
2	Enolase 2	P09104	↑	3,5	6	37
3	Aldehyddehydrogenase 2	P05091	\downarrow	26,0	18	53
4	Lactatdehydrogenase A	P00338	\downarrow	6,5	20	70
5	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase 2	Q16822	\downarrow	4,3	7	15
6	Galactosemutarotase	Q96C23	\downarrow	3,5	4	19
7	Glucosephosphateisomerase	P06744	Ļ	3,3	16	51
8	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	P09467	\downarrow	3,0	9	40

In den untersuchten Proben wurden regulierte acht Enzyme der Glykolyse/Gluconeogenese identifiziert. Davon waren zwei Enzyme (Phosphoglukomutase (PGM1) und Enolase 2 (ENO2)) in der Konzentration in den CD133-kd-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Luc) erhöht. Sechs Enzyme (Aldehyddehydrogenase 2 (ALDH2), Lactatdehydrogenase А (LDHA), Phosphoenolpyruvatcarboxykinase 2 (PEPCK), Galactosemutarotase (GALM), Glucosephosphateisomerase (GPI), Fructose-1,6-bisphosphatase 1 (FBP1)) waren in der Konzentration in den CD133-kd-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Luc) reduziert.

3. Diskussion

Jedes Jahr wird weltweit bei mehr als 11 Millionen Menschen Krebs diagnostiziert. Schätzungsweise wird es bis 2020 jährlich 16 Millionen neue Fälle geben [61]. Krebs ist eine Erkrankung, die durch Fehlregulierung von zellulären Signaltransduktionswegen verursacht wird. Diese wird durch genetische Veränderungen hervorgerufen und führt zur abnormaler Zellproliferation und Apoptose [62].

Die durch Krebs verursachte Sterberate entsteht nicht aus Mangel an verfügbaren Mitteln, sondern aufgrund einer zu späten Diagnose, in der die Abhilfemaßnahmen kaum wirksam sind [63]. Prävention, Früherkennung und frühzeitige Intervention sind die primären Ziele von Onkologen und Krebsbiologen. Wenn Gene als Master-Controller des zellulären Verhaltens betrachtet werden, sind Proteine die Effektoren. Im Zusammenhang mit Krebs bedeutet dies, dass die exprimierten Proteine Tumorwachstum, Intravasation, Metastasierung, Interaktion mit umliegenden Zellen und Reaktion auf Therapie regeln [17]. Das Aufdecken des dysregulierten Protein-Signalweg-Netzwerkes könnte die molekularen Mechanismen der Progression und Metastasierung verständlicher machen. Onkoproteomiks ist ein Zweig der Proteomik, der sich mit der Untersuchung von Proteinen und deren Wechselwirkungen in einer Krebszelle beschäftigt. Das Aufkommen der Onkoproteomiks hat die Hoffnung geweckt, neuartige Biomarker für den Einsatz in Screening, Früherkennung und Vorhersage der Reaktion auf Therapie zu entdecken [64].

Das Ziel dieser Arbeit war, molekulare Mechanismen in Tumorgewebe verschiedener Entwicklungsstadien bzw. -modelle mithilfe massenspektrometrischer Methoden zu untersuchen.

Zur Etablierung der Methodik wurden zunächst Tumore auf Heterogenität geprüft. Dazu wurden humane Tumorzellen in die Maus injiziert, die im gleichen Organ unter gleichen Bedingungen zu mehreren Tumoren wuchsen.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Tumorheterogenität wurde in einem ersten Experiment die Proteinzusammensetzung der Kolonkarzinom-Zelllinie HT29, der Primärtumore und der Metastasen betrachtet. In einem zweiten Experiment wurden die Proteinzusammensetzung der Kolonkarzinom-Zelllinie HT29 unter Einfluss des Proteins CD133 (Prominin-1) untersucht. Die aus diesen Analysen generierten Ergebnisse werden anschließend anhand von Literaturrecherchen interpretiert und im Hinblick auf die Pathogenese diskutiert.

Tumorheterogenität

Es wurde die Heterogenität der Tumore, die gleichen Ursprungs, im selben Organ und unter gleichen Bedingungen gewachsen sind, auf Proteomebene überprüft. Erst wurde das Gewebe mittels HE-Färbung und Fluoreszensmikroskopie untersucht. Mit beiden Methoden konnte das Tumorgewebe vom Mausgewebe eindeutig unterschieden werden (Abbildung 2) [65].

Zur Untersuchung der Tumorheterogenität wurde MALDI-Imaging (MSI) eingesetzt. MSI bietet den Vorteil der schnellen Probenvorbereitung und der exakten Lokalisierung von Proteinen in einem Experiment. Dafür müssen die Proteine vorher weder markiert werden, noch bekannt sein [66].

Da während der Aufarbeitung keine zusätzlichen Extraktion- oder Trennverfahren durchgeführt werden, erfolgte keine Reduktion der Probenkomplexität. Es können Maskierungs- sowie Supprimierungseffekte vermehrt auftreten, die die Sensitivität der massenspektrometrischen Analyse beeinträchtigen.

Trotz der Detektion von nur 1-2 % von durchschnittlich 12,000 individuellen Proteinen eines Organs [67], konnte MSI zur Verdeutlichung der Heterogenität der Tumore genutzt werden. Wie in Abbildung 4 ersichtlich, weisen die einzelnen Tumorareale Unterschiede auf. Der *Density Plot* der unterschiedlichen Tumorareale zeigt einen sog. `Fingerabdruck' (Abbildung 5) und visualisiert die Heterogenität der Tumore. Zahlreiche gemeinsame Signale wie m/z 9,514, 10,090 und 11,638 aber auch unterschiedliche Signale wie z.B. m/z 6,823 oder 6,667 konnten in den Tumorarealen detektiert werden.

Es konnte anhand der gemessenen Signale gezeigt werden, dass humane Tumore sich vom Mausgewebe und sogar, obwohl sie denselben Ursprung haben, untereinander unterscheiden. In der Publikation von Balluff *et al.* konnte mithilfe von MSI ebenfalls die Tumorheterogenität bestätigt werden [68].

Es ist zu vermuten, dass jede Zelle sich während der Dissemination und Progression an die Umgebung anpasst und es dadurch zu physiologischen Änderungen kommt [69]. Die Heterogenität der Tumorzellen erschwert die Suche nach Proteinkandidaten, die in die Pathogenese involviert sind.

Analyse molekularer Prozesse im Kolonkarzinom

Die Untersuchung der Proteine, die an den molekularen Prozessen der Tumorbildung und Metastasierung im Kolonkarzinom beteiligt sind, erfolgte für Plasmamembran- und Oberflächenproteine sowie intrazelluläre Proteine.

Plasmamembran- und Oberflächenproteine spielen eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen. Sie sind beteiligt am molekularen Transport, an der Zellkommunikation und der Signalübertragung. Eine Fehlfunktion der Plasmamembranproteine wird in diversen Krankheiten beobachtet, so dass eine Analyse von Plasmamembranproteinen unerlässlich ist. Membranproteine stellen jedoch nach wie vor eine große Herausforderung für die Proteomikanalyse dar. Sie sind aufgrund ihrer geringen Abundanz und der schlechten Löslichkeit unterrepräsentiert. Zur Erhöhung der Löslichkeit können Detergenzien eingesetzt werden [29].

Zur Freisetzung der Plasmamembranproteine aus der Lipiddoppelschicht wurde das Detergens SDS zugesetzt.

Es ist bekannt, dass SDS vor der Analyse entfernt werden muss, da es inkompatibel mit der massenspektrometrischen Analyse ist. Zudem funktioniert der Trypsinverdau in Gegenwart von ≤0.08 % SDS nicht, da es zu einer Proteinneufaltung und aggregation kommt [29, 70]. In dieser Arbeit wurden zur Entfernung der zugesetzten SDS-Lösung zwei Methoden eingesetzt und miteinander verglichen.

Als Methode 1 wurde die SDS-PAGE gewählt. Nach dem Übergehen des SDS-Protein-Gemisches in das Gel, wurde die Elektrophorese unterbrochen. Es erfolgte keine Trennung der Proteine im Gel.

Als Methode 2 wurde die FASP Methode eingesetzt.

Beim Vergleichen der Methoden konnte kein SDS in den Chromatogrammen detektiert werden, so dass beide Methoden zur Abtrennung von SDS verwendet werden können (Anhang Abbildung 39). Nach Abtrennung mit FASP wurden jedoch insgesamt mehr Membranproteine identifiziert. (Abbildung 6). Zudem hat diese Methode noch den zeitlichen Faktor als Vorteil, weshalb in folgenden Experimenten nach SDS-Zugabe FASP verwendet wurde.

Um die Ausbeute und die Spezifität der Extraktion weiter zu erhöhen, wurden zusätzlich zur Detergens-basierten FASP Methode zwei Biotinylierungs-Methoden (Biotin-Streptavidin Kopplung und Biocytin-Streptavidin Kopplung) zur Extraktion von Membranproteinen eingesetzt.

In der ersten Kopplungsmethode wurden Membranproteine mit modifizierten Biotinreagenzien angereichert. Zur Reaktion wurde das Biotinylierungsreagenz Sulfosuccinimidyl-2-[biotinamido]ethyl-1,3-dithiopropionat (EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin) eingesetzt. Die Estergruppe im Reagenz reagiert nukleophil mit der E-Aminogruppe des Lysins zu einem stabilen Produkt. NHS-Ester können ebenfalls mit α-Aminogruppen des N-Terminus reagieren, diese sind jedoch selten zugänglich für Konjugationen. Sulfo-NHS-SS-Biotin wurde als Reagenz aufgrund seiner Ladung und daraus resultierenden Wasserlöslichkeit gewählt. Im Vergleich zu gewöhnlichen NHS-Ester Verbindungen waren zum Lösen keine organischen Lösungsmittel notwendig. Aufgrund der Ladung soll es zudem die Zellmembran nicht durchdringen und somit keine zytosolische Proteine innerhalb der Zelle markieren [71, 72]. Die Anreicherung der Biotin-markierten Membranproteine erfolate über Streptavidinbeads. Streptavidin ist ein Protein mit Tetramerstruktur (4 x 13kDa) und einer außergewöhnlich hohen Affinität gegenüber Biotin [73].

Bei der Auswertung der identifizierten Proteine wurden neben Membranproteinen auch zytosolische Proteine detektiert. Folgende Ursachen können zur Detektion zytosolischer Proteine führen: Zum einen könnte es bei der Inkubation des Reagenz mit den Proteinen der lebenden, intakten Zellen auch zur Reaktion der Proteine bzw. des Zellinhaltes toter Zellen kommen. Einige Zellen sterben während der Inkubation oder während der Kultivierung ab, die anschließend in den durchgeführten Waschschritten nicht effektiv abgetrennt werden.

Zum anderen könnten Spuren des Biotinreagenz bei der Zelllyse zurückgeblieben sein, die durch die Waschritte nicht komplett entfernt wurden und so mit den zytosolischen Proteinen reagieren.

In der zweiten Kopplungsmethode wurden die Membranproteine über Glykane mit Biocytin angereichert. Dafür wurden die Glykane zunächst oxidiert und anschließend mit Biocytin-Hydrazid zur Reaktion gebracht [74, 75]. Diese Kopplungsmethode wurde gewählt, da die Mehrheit der Membranproteine auf der Zelloberfläche glykosyliert vorliegt [76].

Mit der Biocytin-Kopplungsmethode wurden im Vergleich zu den beiden vorangegangenen Methoden deutlich weniger Proteine identifiziert. Die niedrige Ausbeute kann aus mehreren Gründen zustande gekommen sein. Eine unvollständige Oxidation der Glykane könnte im Anschluss die Reaktion mit Biocytin-Hydrazid verhindern. Weiterhin muss die N-glykosidische Bindung für das Enzym PNGaseF zugänglich sein, um eine Abspaltung des Proteins von dem Zuckerrest zu gewährleisten [77]. PNGaseF spaltet O-glykosidische Bindungen nicht, dadurch können Proteine, die über eine O-glykosidische Bindung an die Zuckereinheit gebunden sind, nicht massenspektrometrisch erfasst werden.

Im Anschluss an die Extraktion wurde überprüft, wie viel einzelne bzw. überlappende Proteine mit den jeweiligen Methoden extrahiert und identifiziert wurden. Dazu wurden Venn-Diagramme erstellt (Abbildungen 7-9).

Mit der Biocytin-Kopplungsmethode wurden insgesamt nur wenige Plasmamembranund Oberflächenproteine identifiziert. Die Methode ist überdies mit einem höheren Zeitaufwand verbunden, weshalb die Methode zur Bearbeitung der Fragestellung nicht eingesetzt wurde.

Mit den Methoden FASP sowie Biotin-Kopplung wurden zahlreiche und vor allem unterschiedliche Plasmamembran- und Oberflächenproteine extrahiert und identifiziert. Zur Untersuchung der molekularen Prozesse im Kolonkarzinom wurden im anschließenden Experiment daher beide Methoden eingesetzt.

Intrazelluläre Proteine wurden über die 2DE aufgetrennt. In der Färbung auffällige Proteinspots wurden ausgeschnitten, aufgearbeitet und mittels LC-MS/MS identifiziert.

Es erwiesen sich die in Abschnitt 2.2.1.3 und Abschnitt 2.2.2 vorgestellten Proteine, ANXA2, BCAM, ITGB4, FAT1 und ENO1 als besonders interessant im Hinblick auf die Umstrukturierung der ECM und die Zellmotilität. ANXA2 gehört zur Familie der Annexine, die Calcium-abhängig an die Lipide der Zellmembran binden. Es ist ein 36 kDa großes Protein und besitzt drei unterschiedliche funktionelle Regionen. Der N-Terminus des Proteins enthält Bindungsstellen für den Gewebsplasminogenaktivator (tPA) und das S100A10-Protein (auch p11 genannt) [78]. Die Kernregion enthält die Kalzium- und Phospholipid-bindende Stelle [79], während der C-Terminus die F-Aktin-, Heparinund Plasminogenbindungsstelle enthält [78, 80]. ANXA2 wird in vielen Tumorzellen, Endothelzellen und Makrophagen exprimiert. Lokman *et al.* berichtete, dass das Protein eine essentielle Rolle bei der Adhäsion, Intravasation und Proliferation von Tumorzellen hat [81].

Während der Metastasierung soll ANXA2 an dem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion und einem kontrollierten lokalen Abbau (Proteolyse) der ECM beteiligt sein, wodurch der Eintritt der Tumorzelle ins Blut- und Lymphsystem ermöglicht wird [82]. Die ECM ist eine Ansammlung diverser biochemischer Komponenten, die in Proteine, Proteoglykane und Glykoproteine unterteilt werden können. Zu den Proteinen zählen u.a. Fibronectin, Laminin und Nidogen, die an dem Matrixaufbau und der Zell-Adhäsion zwischen ECM und der Zelle beteiligt sind [83].

Bharadwaj et al. erläutert den Vorgang wie folgt (Abbildung 30) [84]:



Abbildung 30: Modell zur Aktivierung der MMPs durch Annexin A2 und p11 Aus ANXA2 und dem Protein p11 entsteht ein heterotetramerer Komplex Allt. Anschließend bindet dieser das Plasminogen, den tPA und kolokalisiert mit dem uPA/uPAR Komplex (Urokinase-Plasminogen Aktivator). Durch die Kolokalisation wird das Plasminogen in die aktive Form Plasmin, eine Serinproteinase, umgesetzt und aktiviert anschließend Matrixmetalloproteasen (MMP) und Cathepsin B. Die MMPs und das Cathepsin B werden von Invadopodien sekretiert und führen zur Hydrolyse und zum Umbau der ECM. Der Plasmin-vermittelte ECM Abbau ermöglicht somit der Tumorzelle eine Invasion in das umliegende Gewebe und in die Blutbahn. Abbildung nach [73].

Im Experiment war ANXA2 in den Zellen des Primärtumors um den Faktor 3,2 hochreguliert als in den Metastasen und um Faktor 2 höher als in den Kontrollzellen. Es ist zu vermuten, dass durch ANXA2 im Primärtumor eine erhöhte Aktivierung der MMPs und somit ein erhöhter Abbau der ECM stattfindet, die eine Invasion der Tumorzellen in die Blutbahn und in das umliegende Gewebe beschleunigt.

Die MMP Familie besteht aus insgesamt 23 Mitgliedern. MMP-3 und MMP-10 sind für den Abbau von Proteoglykanen, Fibronectin und Laminin zuständig [83]. Laminine spielen eine wichtige Rolle bei einer Intravasation von Tumorzellen. Hutchison et al. demonstrierte, dass Tumorstammzellen während der Migration und Progression das ECM Protein Laminin weniger oder gar nicht exprimieren. Ausdifferenzierte Zellen würden Laminin hingegen wieder exprimieren [85].

Laminin bindet im gesunden Epithel an den Rezeptor BCAM [86]. Die Abnahme der Laminin-Menge durch den MMP-vermittelten ECM-Abbau würde zu einer verminderten Zell-ECM Adhäsion führen und so die Mobilität der Tumorzellen erhöhen. Weiterhin würde aufgrund fehlender Bindungspartner die Menge des Rezeptorproteins BCAM abnehmen.

BCAM war in den Kontrollzellen am höchsten exprimiert. Nach Injektion der Zellen in eine Maus nahm die Menge des Proteins um den Faktor 2,3 in den Zellen des Primärtumors und um den Faktor 2,8 in den Zellen der Metastasen ab. Die Abnahme der BCAM Menge könnte durch die erhöhte ANXA2-Menge und die erhöhte ECM-Umstrukturierung durch MMPs, insbesondere durch Abbau von Laminin und somit verminderten Zell-Substrat-Adhäsion, begründet sein.

Neben BCAM ist ITB4 ebenfalls ein Rezeptor von Laminin. Beide Rezeptoren binden kompetitiv an Laminin [87]. Im gesunden Epithel ist ITB4 mit der ECM verankert. Beim Verlust der Verknüpfung zur ECM kann der darauffolgende Integrin Signalweg nicht ablaufen. Dies kann zu einer Inhibition des Zellwachstums und einer speziellen Form der Apoptose (Anoiki) führen. In Tumorzellen ist ITB4 am Zellwachstum beteiligt. Stewart et al. demonstrierten in ihrer Studie, dass ITB4 in Tumoren, in denen ein Funktionsverlust von p53 stattgefunden hat, das Überleben der Zelle durch Aktivierung von AKT/PKB (*serin-threonin kinase/protein kinase B*) und durch translationale Regulation der VEGF (*vascular endothelial growth factor*) Expression sichert. Auch fördert ITB4 die Angiogenese und somit die Intravasation der Tumorzellen. Es begünstigt sowohl die bFGF- (*basic fibroblast growth factor*) als auch VEGF-induzierte Angiogenese, indem es den ERK- (*extracellular signal-regulated kinase*) und NF-kB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) Signalweg erhöht [88].

Zusätzlich erhöht ITB4 die Expression des metastatischen Faktors S100A4 [89]. Das Protein S100A4 wird von Tumorzellen sekretiert und beeinflusst die Bildung eines S100A4-ANXA2-Komplexes an der Zelloberfläche der Endothelzellen. Durch diese Komplexbildung wird Plasmin aus dem Vorläufermolekül Plasminogen aktiviert, MMPs werden freigesetzt und die ECM umgebaut [90].

ITB4 war in den Zellen der Metastasen um das 2,6- bzw. 3,3-fache niedriger als in den Kontrollzellen und in dem Primärtumor.

Denkbar ist, dass ITB4 durch die höhere Regulation in den Zellen des Primärtumors indirekt die Angiogenese vorantreibt, indem die Tumorzellen S100A4 freisetzen, dieses an Endothelzellen bindet und MMPS aktiviert.

Ein möglicher Zusammenhang der Proteine ist in Abbildung 31 dargestellt.



Abbildung 31: Möglicher Mechanismus zur Invasion der Tumorzelle in die Blutbahn durch Umstrukturierung der ECM.

Erhöhte ANXA2 Mengen beeinflussen die Umstrukturierung der ECM durch Freisetzung der MMPs und Abbau des Laminins. Laminin ist ein Bindungspartner des Rezeptors BCAM. Folgend wird BCAM herrunterreguliert.

ITB4 ist ebenfalls ein Rezeptor von Laminin. ITB4 wird im Primärtumor nicht herrunterreguliert. Denn ITB4 sichert in Tumoren, in denen ein Funktionsverlust von p53 stattgefunden hat, das Überleben der Zelle und fördert die Angiogenese, in dem es die Expression von S100A4 erhöht. Folgend wird das Protein S100A4 von Tumorzellen sekretiert und setzt an der Zelloberfläche der Endothelzellen, durch Bindung an ANXA2, weitere MMPs frei. Es findet ein erhöhter ECM-Umbau statt und erleichtert die Intravasation.

FAT1, identifiziert in *Drosophila melanogaster*, ist ein großes Transmembranprotein und zählt zur Familie der Protocadherine [91]. Es reguliert die Aktin-Dynamik, den Zell-Zell-Kontakt, die Zellpolarität und interagiert mit dem synaptischen Protein Homer 3 und β -Catenin [92, 93]. FAT1 ist im invasiven Brustkarzinom und einiger Leukämie-Arten überexprimiert [94]. Laut Nishikawa *et al.* führt die Inhibition von FAT1 im oralen Plattenepithelkarzinom zu einer verminderten Migration und Invasion, es organisiert die Lokalisation von β -Catenin um und beeinflusst somit die Zellpolarität [92]. Tanoue *et al.* berichtete, dass FAT1 hauptsächlich im proliferierenden Epithelgeweben exprimiert wird und eine wichtige Rolle in den frühen Phasen des Zell-Zell-Kontaktes hat [95].

Die Lokalisierung von FAT1 an den Zell-Zell-Kontaktstellen unterscheidet sich von der von β-Catenin, was darauf hinweist, dass FAT1 nicht Bestandteil des klassischen Cadherinsystems ist. FAT1 ist vorwiegend in basolateralen Regionen lokalisiert und ist weniger an den apikalen Übergängen präsent, wo klassische Cadherine am stärksten konzentriert sind. Weitere Bindungspartner von FAT1 sind die Ena / VASP(*vasodilator-stimulated phosphoprotein*) Proteine. Diese regulieren das Aktin-Zytoskelett durch Antagonisierung von Capping Proteinen und durch Erhöhung der Dissoziationsrate der verzweigten Aktinfilamente an der Zellperipherie, der fokalen Adhäsions- oder Zell-Zell-Kontaktstellen [95].

FAT1 war in den Metastasen um den Faktor 2 und im Primärtumor um den Faktor 1,6 höher konzentriert als in den Kontrollzellen.

Die Hochregulation des Proteins in dem Primärtumor und den Metastasen kann möglicherweise durch die Zellmotilität begründet werden. Aktin, Bestandteil des Zytoskeletts, bildet im Zytoplasma der Zelle ein dichtes, dreidimensionales Netzwerk, welches die zellulären Strukturen zusammenhält und trägt so für die Stabilität und Form der Zellen und Gewebe bei. Bei der Zellbeweglichkeit wie der Tumormigration müssen Aktinfilamente flexibel sein, möglicherweise unter Beteiligung von FAT1 und der Ena / VASP Proteine, die den *Capping*-Proteinen entgegenwirken und die Verzweigungen der Aktinfilamente minimieren.

In der 2DE erwies sich die alpha-Enolase (ENO1) als besonders interessant (Abschnitt 2.2.2). ENO1 ist ein intrazellulares Enzym, das in der Glykolyse die Dehydration von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat katalysiert und in der Gluconeogenese die Reversreaktion. Neben dem intrazellulären Vorkommen ist ENO1 auch an der Zelloberfläche lokalisiert und fungiert als ein Plasminogen bindendes Protein, wodurch MMPs freigesetzt und die ECM abgebaut werden kann und so die Tumorinvasion und Metastasierung beschleunigt wird [96, 97].

In der 2DE wurde in dem Gel der Kontrollzellen ein Spot mit ENO1 detektiert, während in dem Gel des Primärtumors und der Metastase jeweils zwei Spots mit ENO1 detektiert wurden, die durch Methylierungen der Seitenketten entstanden sind. Die Methylierung der carboxylierten Seitenketten (o-Methylierung) maskierte die Ladung der Carboxylgruppen und führte zu einer Verschiebung im Gel zu einem höheren IP (Abbildung 20).

Posttranslationale Proteinmodifikationen wie Methylierungen sind häufig und wichtig für Mechanismen der Signaltransduktionswege, um rasche Reaktionsänderungen auf Hormone, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter zu induzieren. Weiter gelten diese als Schlüsselmodi der Regulierung des Zellzyklus, des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und des Stoffwechsels.

In Krebszellen sind Methylierungen der DNA und von Histonen bekannt und gelten als Markenzeichen [98, 99]. Methylierungen nicht histonischer Proteine sind zwar bekannt, bislang jedoch weniger erforscht. Capello *et al.* publizierte, dass ENO1 in Krebszellen mehr Methylierungen ausgesetzt ist als in normalen Zellen. Methylierungen der carboxylierten Seitenketten verstärken die Hydrophobie und erhöhen die Affinität des Proteins für Phospholipide [48].

Es ist zu vermuten, dass die in den hier beschriebenen Experimenten beobachteten vermehrten Methylierungsreaktionen an ENO1 die Intravasation und Metastasierung begünstigen, indem es die Affinität zu Phospholipiden steigert, wodurch Plasminogen hochreguliert und folgend MMP freigesetzt wird. Weitere Untersuchungen dieser Modifikationsart müssen erfolgen, um die Rolle in pathophysiologischen Prozessen genauer aufklären zu können.

Analyse molekularer Prozesse im Kolonkarzinom unter Einfluss von CD133

Die molekularen Prozesse im Kolonkarzinom wurden unter dem Einfluss des Oberflächenmarkers CD133 (auch Prominin-1) auf die Tumorisierung untersucht.

CD133 ist ein 120 kDa Glykotransmembranprotein, welches hauptsächlich an der Plasmamembran-Protrusionen lokalisiert ist [100, 101]. Das Protein wurde in vielen Tumoren detektiert und gilt als Marker der Tumorstammzellen, da es an der Tumorprogression und Proliferation beteiligt sein soll [102-104]. Genauere Funktionen des Proteins sind noch relativ unbekannt [105]. Bislang sind von dem Protein keine enzymatischen Aktivitäten, keine intrazellulären Bindungsproteine oder extrazelluläre Liganden bekannt. Die Expression von CD133 an Plasmamembranprotrusionen sowie die spezifischen Wechselwirkungen mit

Cholesterol-basierten Lipidflößen deuten darauf hin, dass CD133 als Regulator der Plasmamembran-Topologie fungiert. Weiter wird vermutet, dass das Protein eine Funktion in der Zellpolarität, der Zell-Zell- sowie der Zell-ECM-vermittelten Migration aufweist [100]. Griguer *et al.* (2008) konnte zeigen, dass das Protein CD133 mit einer hypoxischen Mikroumgebung und Mitochondrien-Dysfunktion korreliert ist, beides ein Markenzeichen der Zellkrebsbiologie [52].

Die Aufarbeitung der Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Tumore der CD133-kd-Zellen und Kontrollvektorzellen (Luc) erfolgte nach einer im Arbeitskreis etablierten Methode, welche erfolgreich in den Publikationen Steurer *et al.* (2013), Quaas *et al.* und Steurer *et al.* (2014) eingesetzt wurde [106-108]. Die erhaltenen Peptide wurden massenspektrometrisch analysiert, identifiziert und statistisch signifikante Proteine mithilfe der Literatur analysiert.

Die Literaturrecherche diente neben der biologischen Interpretation auch zur Überprüfung der Ergebnisse auf Plausibilität.

Es konnte gezeigt werden, dass die in der Literatur beschriebenen Haushaltsproteine GAPDH (Abbildung 26) und β-Tubulin (Abbildung 27) nach der Aufarbeitung und Messung in allen Proben gleiche Intensitäten und somit gleiche Konzentrationen aufwiesen.

Als statistisch signifikante Proteine mit mindestens einer 2-fachen Erhöhung oder Erniedrigung in der Intensität wurden insgesamt 309 Proteine (Abbildung 29) detektiert. Davon waren 130 Proteine im Primärtumor der CD133-kd-Zellen höher (rot) und 179 Proteine niedriger (blau) konzentriert als in der Kontrolle (Luc).

Die Gruppierung der identifizierten, regulierten Proteine in biologische Stoffwechselwege ergab 17 KEGG-Stoffwechselwege mit der bioinformatischen Datenbank DAVID (Tabelle 4).

Da CD133 in Korrelation zur mitochondrialen Dysfunktion steht, erwiesen sich die molekularen Prozesse der oxidativen Phosphorylierung und der Glykolyse/Gluoneogenese als besonders interessant. In Tumoren sollen Proteine der Glykolyse hochreguliert und an der Tumorprogression und Invasion beteiligt sein [52, 109].

71

Der oxidativen Phosphorylierung wurden sieben Proteine mit signifikantem Unterschied zugeordnet (Abbildung 32).



Abbildung 32: Schematische Darstellung der Elektronentransportkette mit den regulierten Komplexuntereinheiten

Proteine bzw. Untereinheiten vom Komplex III (Cytochrome b-c1 complex subunit 7 (UQCRB), Cytochrome b-c1 complex subunit 2 (UQCRC2), Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske (UQCRFS1)), Komplex IV (Cytochrome c oxidase subunit 2 (MT-CO2), Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1 (COX4I1), Cytochrome c oxidase subunit 5B (COX5B)) und die Pyrophosphatase 2 (PPA2) sind herrunterreguliert.

Anhand der Ergebnisse ist zu vermuten, dass CD133-kd-Zellen im Vergleich zu den Luc-Zellen eine verminderte Aktivität der oxidativen Phosphorylierung aufweisen. Auf molekularer Ebene kann dies zu folgenden Veränderungen führen: es kann das elektrische und chemische Transmembranpotentials verringern, es kann zu einer Funktionsänderung der Elektronentransportkette führen oder es kann den Transport anderer Metabolite in die Mitochondrien verringern. Diese Veränderungen führen wiederum zu einer Produktion von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) [110].

Der Glykolyse/Gluconeogenese wurden acht Enzyme mit signifikantem Unterschied zugeordnet. Zwei Enzyme (PGM1 und ENO2) waren in den CD133-kd-Zellen hochreguliert und sechs Enzyme (ALDH2, LDHA, PEPCK, GALM, GPI, FBP1) im Vergleich zu den Kontrollzellen (Luc) herunterreguliert.

Die identifizierten Enzyme PGM1, GALM, GPI und FBP1 gehören zum ersten Abschnitt der Glykolyse/Gluconeogenese (Abbildung 33):


Abbildung 33: Möglicher zellulärer Verlauf der Glykolyse/ Gluconeogenese nach CD133 kd

1. α -D-Glucose-6P wird durch die höher regulierte PGM1 zu α -D-Glucose-1P isomerisiert und anschließend als Glykogen abgespeichert. **2.** Glykogen wird abgebaut und α -D-Glucose-6P wird im Pentosephosphatweg zu Pentosephosphaten und Glycerinaldehyd-3P umgesetzt, welches der Glykolyse wieder zugeführt wird.

Eine Isomerisierung von α -D-Glucose-6P zu β -D-Glucose-6P oder β -D-Fructose-6P ist aufgrund des herrunterregulierten Enzyms GPI unwahrscheinlich. FBP1, ein Enzym der Gluconeogenese, ist herrunterreguliert, der anabolische Reaktionsweg z.B. aus dem Intermediat Glycerinaldehyd-3-Phosphat wird nicht ablaufen. BLAU = herrunterreguliert, ROT = hochreguliert

Maranyane beschreibt, dass im Zervixkarzinom und in Ösophagus- und Brustkrebszellen eine Hochregulation von PGM1 detektiert wurde [111]. Als eine Phosphotransferase katalysiert das Enzym PGM1 reversibel die Isomerisation zwischen Glukose-1-Phosphat und Glukose-6-Phosphat mit Magnesium als Co-Faktor. Denkbar ist, dass in den CD133 kd Zellen durch PGM1 (1) vermehrt die Synthese von Glykogen stattfindet, um die Zelle im Stresszustand der Hypoxie und/oder Glukoseverarmung mit Energie zu beliefern [112-116] oder (2) die Zellen Glykogen vermehrt abbauen, um das Intermediat Glukose-6-Phosphat in den Pentosephosphatweg, zur Gewinnung von Pentosephosphate und NADPH, einzusetzen [117]. Pentosephosphate dienen als Grundbausteine für die Biosynthese von Nukleotiden und sind dementsprechend wichtig bei der Zellteilung [118, 119]. NADPH ist essentiell für die Lipogenese und es schützt die Zelle vor oxidativen Stress und Zelltod, indem es oxidiertes Glutathion reduziert. Gluthation reduziert reaktive Sauerstoffverbindungen ROS (reactive oxygen species) und somit DNA-Schäden, die aufgrund der übermäßig hohen Proliferation und Hypoxie entstehen und oftmals höher als in gesunden Zellen sind [114, 120].

Die Enzyme PCK2, ENO2, LDHA und ALDH2 gehören zum zweiten Reaktionsabschnitt der Glykolyse, der oxidativen Phosphorylierung und zur Laktatbildung (Abbildung 34):



Abbildung 34: Möglicher zellulärer Verlauf der Glykolyse nach CD133 kd ENO2 ist hochreguliert und katalysiert 2-Phosphoenolglycerat zu Phosphoenolpyruvat und anschließend zu Pyruvat, welches zu Acetyl-Coa umgesetzt wird. L-Lactat wird aufgrund einer niedrigen LDHA Konzentration kaum gebildet. BLAU = herrunterreguliert, ROT = hochreguliert

Enolasen sind intrazelluläre Enzyme, die die Dehydration von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat sowie die Reversreaktion katalysieren. Funktionell sind Enolasen als Dimere aktiv, zusammengesetzt aus den Untereinheiten α , β , γ . ENO2 besteht aus 433 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 78 kDa und enthält 2 Isoenzyme $\gamma\gamma$ und $\alpha\gamma$. Das Enzym ist hauptsächlich lokalisiert in neuronalen und neuroendokrinen Zellen [121, 122] Vizin *et al.* berichtete, das ENO2 in Brust und Urothelialen Krebszellen höher exprimiert ist [121]. Von Chung *et al.* konnte gezeigt werden, dass ENO2 im kolorektalen Tumor erhöht war [123]. Muller *et al.* beobachteten eine Deletion des ENO1 Lokus im Glioblastom, die in einer ENO2 Expression resultierte [124]. White-Al Habeeb *et al.* publizierte ebenfalls, dass ENO2 in Patienten mit einer ENO1 Missense-Mutation erhöht war [125]. In den CD133 kd Zellen werden die Intermediate aus dem Pentosephosphatweg durch die hochregulierte ENO2 Richtung Pyruvat umsetzen.

In Studien konnte gezeigt werden, dass CD133-(+)-Stammzellen sich hauptsächlich in hypoxischen Nischen einnisten und die Selbsterneuerung unter diesen Bedingungen am höchsten ist [126]. Denkbar ist, dass die CD133 kd Zellen sich in sauerstoffreiche Umgebungen angesiedelt haben, und folgend die Milchsäuregärung durch das Enzyms LDHA herrunterreguliert wird.

Ein *knockdown* des Tumorstammzellenmarkers CD133 hat in den Versuchsmäusen zu einer höheren Überlebensrate, jedoch auch zu einem höheren Grad an Metastasierung geführt. Denkbar ist, dass durch die Umfunktionierung der Glykolyse/ Gluconeogenese- und der verminderten oxidativen Phosphorylierung (Abbildung 35) die Krebszellen sich langsam vermehren, jedoch aufgrund der vorhandenen Nährstoffe und der sauerstoffreichen Umgebung besser in andere Gewebe invadieren.



Abbildung 35: Möglicher zellulärer Verlauf der Glukolyse/ Gluconeogenese und der oxidativen Phosphorylierung nach CD133 kd.

α-D-Glucose-6-Phosphat könnte aufgrund erhöhter PGM1 Regulation zu α-D-Glucose-1-Phosphat isomerisieren und anschließend als Glykogen gespeichert werden. Oder Glykogen könnte vermehrt abgebaut werden, damit die freiwerdende Glukose dem Pentosephosphatweg zur Gewinnung von NADPH oder Pentosephosphaten zur DNA und RNA Synthese dient. Intermediate wie Glycerinaldehyd-3-Phospaht können wieder in die Glykolyse fließen. Die hochregulierte ENO2 würde die Intermediate Richtung Pyruvat umsetzen, um anschließend aus Acetyl-CoA Steroide und Fettsäuren und aus Intermediaten des Zitratzyklus Aminosäuren und Purin/Pyrimidin zu erzeugen. Alle Enzyme der oxidativen Phosphorylierung waren in CD133 kd Zellen herrunterreguliert ROT = hochreguliert

4 Material und Methoden

4.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

Karzinoid-Zelllinie BON – Die BON Zellen wurden erstmals 1986 aus der Lymphknotenmetastase eines Pankreaskarzinoids eines 28 Jahre alten Mannes isoliert [127].

Humane kolorektale Adenokarzinom-Zellen (HT29) – Die Zellen wurden erstmals 1964 aus dem Primärtumor eines kolorektalen Adenokarzinoms einer 44 Jahre alten Frau isoliert [128].

4.2 Tumorhetorogenität

4.2.1 Primärtumore für die MALDI Imaging Analyse

Die in diesem Versuch verwendeten Maustumore stammen aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Fehse (UKE). Für die Generierung von Tumoren wurden BON Zellen Rot, Grün, Blau (RGB) markiert. Dazu wurden infektiöse lentivirale Vektoren generiert und in BON Zellen transduziert. Bei der Transduktion der lentiviralen Vektoren mCherry (Rot), Venus (Grün) und Cerulean (Blau) wurde auf einen Gentransfer mit 50-70 % Effizienz pro Vektor geachtet. Durch die drei Vektoren können verschiedene Kombinationen bei der Transduktion entstehen, wodurch zahlreiche Farben erzeugt werden.

Je 5x10⁴ RGB markierte Zellen wurden in die Milz in NOD-SCID Mäuse (*Non-Obese Diabetic*, Nicht-fettleibig-diabetisch)-(*Severe Combined Immunodeficiency*, schwerer kombinierter Immundefekt) injiziert. Es bildeten sich Tumore in der Leber, die nach 2-3 Wochen den Mäusen entnommen und eingefroren wurden [65, 129].

4.2.2 Gewebevorbereitung und Matrixapplikation

Von der gefrorenen Mausleber mit humanen Tumoren wurden mit einem Kryo-Microtom 6 µm dünne Schnitte angefertigt und auf einen Indium-Zinnoxid (ITO) beschichteten Objektträger aufgebracht. Nachdem die Gewebeschnitte zweimal in 70 % Ethanol und in 100 % Ethanol gewaschen wurden, folgte eine einminütige Trocknung. Anschließend wurde die Matrix Sinapinsäure (10 g/L, gelöst in 60 % Acetonitril (ACN)/ 0,2 % Trifluoressigsäure (TFA)) auf das Gewebe mittels *ImagePrep* aufgebracht und der Schnitt massenspektrometrisch analysiert [65].

4.2.3 MALDI Imaging Datenakquisition und Analyse

Der Gewebeschnitt wurde mit einem Autoflex seed MALDI-TOF Massenspektrometer (*Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time off light*/ Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeit Massenspektrometer, Bruker Daltonics, Bremen), ausgestattet mit einem Smartbeam II Laser, analysiert. Die Spektren wurden im positiven Modus im m/z-Bereich 2000-21000 aufgenommen. Es wurden bei einer konstanten Laserenergie und einer Laserfrequenz von 1000 Hz 500 Einzelspektren generiert. Die Rasterweite zwischen den einzelnen Spots lag bei 160 µm.

Die Datenanalyse und Generierung der Bilder erfolgte mit der Software FlexImaging 3.0. Relevante Signale im Spektrum wurden anschließend manuell analysiert [65, 108].

4.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Gewebeschnitte

Der Gewebeschnitt wurde in 100 % Xylol für 5 Minuten gewaschen, um die MALDI-Matrix zu entfernen. Anschließend wurde in Hämatoxylin und in Eosin (HE) inkubiert [65].

4.3 Analyse molekularer Prozesse im Kolonkarzinom

4.3.1 Primärtumore und Metastasen

Die in diesen Experimenten verwendete Tumore und Metastasen stammen aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Fehse. Für die Generierung der Tumore und Metastasen wurden HT29 Zellen RGB markiert. Dazu wurden infektiöse lentivirale Vektoren generiert und in HT29 Zellen transduziert. Bei der Transduktion der lentiviralen Vektoren *mCherry, Venus* und *Cerulean* wurde auf einen Gentransfer mit 50-70 % Effizienz pro Vektor geachtet. Durch die drei Vektoren können verschiedene Kombinationen bei der Transduktion entstehen, wodurch zahlreiche Farben erzeugt werden.

Je 1x10⁶ RGB markierte Zellen wurden subkutan in *pfp/rag*^{-/-} Mäuse injiziert. Nach 4 Wochen wurden die Tumore und Metastasen der Lunge den Mäusen entnommen und zur Vermehrung der Zellen wieder kultiviert [129-131].

4.3.2 Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden in einer sterilen Kulturflasche in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) Medium 1640 kultiviert, welches zusätzlich 10 % fetales Kälberserum (FCS), 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin enthielt. Die Zellen wurden bei 37 °C in feuchter Atmosphäre bei 5 % CO₂ kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Bei 90 % Konfluenz wurden die Zellen erneut passagiert.

Anschließend wurden die adhärenten Zellen durch einen Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 330 x g zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde vorsichtig verworfen und das Zellpellet mit je 3 x 8 mL Pufferlösung (*Phosphate-Buffered Saline*; PBS) mit Protease-Inhibitoren gewaschen.

4.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Das Zellpellet wurde in 4 mL einer PBS-Lösung mit Protease-Inhibitoren resuspendiert. Von der entstandenen Zellsuspension wurden 10 μ L entnommen und mit 90 μ L Tryptanblau versetzt.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer Zählkammer unter einem Mikroskop. Nach der Bestimmung wurden die Zellen in mehrere 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert.

4.3.4 Zelllyse und Freisetzung der Membranproteine

Die HT29-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und für 30 Minuten bei 4 °C bei 11000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet mit 200 µL einer hypotonischen Lösung (1,5 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂), 1 mM Kaliumchlorid (KCl), 1 mM Dithiothreitol (DTT), 10 mM Hepes, Protease-Inhibitor, pH 8.0) versetzt und in einem Trockeneis/Ethanol Gemisch (ca. -80 °C) für 5 Minuten eingefroren. Die Zellen wurden in einem Inkubationsschüttler bei 37 °C 3 min lang aufgetaut. Um die Zellen mechanisch zu lysieren, wurden die Proben insgesamt fünfmal eingefroren und aufgetaut. Um die freigesetzten intrazellulären Proteine abzutrennen, wurde 15 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Zellpellet wurde mit einer Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) (2 % SDS, 0,1 M DTT in 100 mM Tris, pH 7,6) im Verhältnis 1:10 versetzt und bei 95 °C für 3 Minuten inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Zellpellet für 10 Sekunden sonifiziert. Die Prozedur wurde insgesamt dreimal wiederholt, bis das gesamte Pellet gelöst war. Zur Reduktion der Viskosität wurde die Probe mit 5 µL Benzonase versetzt und 10 Minuten bei 32 °C inkubiert.

4.3.5 SDS-PAGE zur Abtrennung von Natrium-dodecylsulfat (SDS)

Für den Proteinverdau sowie die darauffolgende Identifizierung und Quantifizierung der Proteine ist es unabdingbar, das SDS aus dem Proteinextrakt zu entfernen. Dafür wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt.

Es wurden ein Criterion Precast XT 12 % Bis-Tris-Gel und ein XT-MES Laufpuffer (2-Morpholinoethansulfonsäure, Natriumlaurylsulfat) verwendet. Es wurden jeweils 12,5 µL Probenlösung mit destilliertem Wasser auf das einheitliche Volumen von 21 µL gebracht und mit 7,5 µL XT Probenpuffer und 1,5 µL Reduzierungsreagenz versetzt. Die Proben wurden 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurden die Proben in die Geltaschen überführt und anschließend die Elektrophorese ca. 5 Minuten bei einer konstanten Spannung von 200 V durchgeführt. Sobald das Proteingemisch vollständig in das Gel eingelaufen ist, wurde die Trennung unterbrochen und die Proteine im Gel tryptisch verdaut.

4.3.6 Tryptischer In-Gel-Verdau

Die zu identifizierenden Gelbanden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten oder, im Falle von 2DE-Gelen, mit einer Pipettenspitze ausgestanzt. Die Gelbanden wurden in ungefähr 1x1 mm große Würfel geschnitten und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Banden mit 100 % ACN, 100 mM Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3) und erneut 100 % ACN jeweils für 10 Minuten unter Schütteln gewaschen.

Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurden die Gelbanden für 30 min bei 56 °C mit einer 10 mM DTT-Lösung (gelöst in 100 mM NH₄HCO₃) inkubiert, erneut mit 100 % ACN für 10 Minuten gewaschen und anschließend mit einer 55 mM lodacetamid-Lösung (IAA) (gelöst in 100 mM NH₄HCO₃) 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur alkyliert. Um das Alkylierungsreagenz und den Farbstoff Coomassie vollständig zu entfernen, wurde ein Waschprozess durchgeführt. Dabei wurde drei Mal abwechselnd mit 100 % ACN und 100 mM NH₄HCO₃ jeweils für 10 Minuten unter Schütteln inkubiert.

Die Gelbanden wurden in einer Trypsin-Lösung (0,25 µg/µL) aufgenommen und auf Eis für 2 Stunden inkubiert. Nach dem Entfernen des Trypsin-Überstandes und dem Aufnehmen der Gelstücke im Puffer, erfolgte der Verdau bei 37 °C über Nacht.

Zur Extraktion der Peptide aus dem Gel wurde der Überstand entnommen und abwechselnd drei Mal für 30 Minuten mit der Extraktionslösung (65 % ACN, 5 % Ameisensäure (FA)) oder Wasser inkubiert. Die jeweiligen Überstände wurden vereint und in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingeengt. Die fertigen Proben wurden bei -20 °C gelagert.

4.3.7 Filter Aided Sample Preparation (FASP)

Als alternative Methode zur Entfernung von SDS vom Proteinextrakt wurden Zentrifugenfilter eingesetzt (FASP-Methode).

Das Proteingemisch wurde mit 200 μ L einer 8 M Harnstoff-Lösung in eine 10 kDa Filtereinheit pipettiert und für 8 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Zentrifugation mit 200 μ L einer 8 M Harnstoff-Lösung

wiederholt. Das Proteingemisch in der Filtereinheit wurde mit 50 μ L einer 50 mM IAA-Lösung versetzt und im Dunkeln 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wurden zweimal 100 μ L Harnstoff-Lösung in die Filtereinheit zu dem Proteingemisch pipettiert und für jeweils 8 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Weiterhin wurden zweimal 100 μ L einer 40 mM NH₄HCO₃-Lösung in die Filtereinheit pipettiert und ebenfalls für 8 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 100 μ L der NH₄HCO₃-Lösung und modifiziertes Trypsin (Promega) im Verhältnis Enzym:Protein 1:200 zu dem Proteingemisch zugesetzt und bei 37 °C für 16 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Filtereinheit in ein neues Auffangsystem überführt. Das Aufsammeln der tryptischen Peptide erfolgte durch Zentrifugation bei 11000 x g für 8 Minuten. Die Filtereinheit wurde zwei weitere Male mit 100 μ L NH₄HCO₃-Lösung benetzt und bei 11000 x g für 8 Minuten zentrifugiert. Zuletzt wurde die Filtereinheit mit 50 μ L einer 0,5 M Natriumchlorid-Lösung (NaCl) versetzt und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss mit den tryptischen Peptiden wurde anschließend zur Entsalzung mittels Festphasenextraktion (Abschnitt 4.3.8.5) eingesetzt.

4.3.8 Sulfo-NHS-SS-Biotin – Streptavidin Methode

Die Anreicherung von intakten Zellmembranproteinen und Zelloberflächenproteinen kann über eine Biotin-Markierung und anschließende Kopplung an Streptavin-Beads erfolgen (Abbildung 36). Zur Reaktion wird ein Thiol-spaltbares, Amin-reaktives Biotinylierungsreagenz (Sulfosuccinimidyl-2-[biotinamido]ethyl-1,3-dithiopropionat, EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin) eingesetzt.



Abbildung 36: Reaktion der Membranproteine mit Sulfo-NHS-SS-Biotin sowie die anschließende Freisetzung der markierten Membranproteine. Abbildung nach [132].

Die Estergruppe im Reagenz reagiert nukleophil mit der ε -Aminogruppe des Lysins zu einem stabilen Produkt. *N*-Hydroxysulfosuccinimid entsteht als Nebenprodukt. Nach Bindung von Biotin an Streptavidin wird das Protein von Biotin durch Spaltung der Disulfidbrücke durch reduzierende Chemikalien wie DTT oder *B*-Mercaptoethanol freigesetzt [72].

4.3.8.1 Markierung der Membranproteine mit NHS-SS-Biotin

Das Protokoll mit einigen Modifizierungen wurde nach Scheurer *et al.* durchgeführt [71]. Die Zellen in den Kulturflaschen wurden jeweils dreimal mit 6 mL einer Proteaseinhibitor enthaltenden, eiskalten PBS-Lösung gewaschen. Es folgte die Zugabe von 6 mL einer 500 µM NHS-SS Biotin-Lösung (Succinimidyl 2-(biotinamido)-ethyl-1,3'-Dithiopropionat) und eine Inkubation auf einem Schüttler bei 4 °C für 30 Minuten. Der Biotinylierungsvorgang wurde durch zweimaliges Spülen mit eiskalter PBS und anschließender Inkubation mit 6 mL einer Tris-haltigen Lösung (25 mM Tris, 0,15 M NaCl in PBS) für 5 Minuten bei 4 °C gestoppt. Die Zellen wurden durch einen Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in einem 15 mL Reaktionsgefäß gesammelt. Der Überstand wurde nach dreiminütiger Zentrifugation bei 330 x g abdekantiert und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl (4.3.3) wurden jeweils 2 Millionen Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß aliquotiert.

4.3.8.2 Lyse der Biotin-markierten Zellen

Die Zellsuspensionen wurden bei 330 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in 0,5 mL Lysepuffer (2 % w/v NP-40 substitute, 0,2 % w/v SDS, 0,1 µM Glutathion und Protease-Inhibitor) resuspendiert. Die Zellen wurden 30 Minuten auf Eis lysiert, wobei im Abstand von 5 Minuten für jeweils 5 Sekunden geschüttelt wurde. Danach wurden die Proben 20 Minuten bei 9000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein 1,5 mL Gefäß überführt und die Lyse der Pellets mit 0,2 mL Lysepuffer wiederholt. Die gesammelten Überstände wurden bei -20 °C aufbewahrt.

4.3.8.3 Streptavidin-Kopplung und Freisetzung der Membranproteine

Es wurden 500 µL *Streptavidin Sepharose high performance* Beads in jeweils 1,5 mL Eppendorf-Gefäße gegeben, bei 13000 x g für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden dreimal mit 500 µL Waschpuffer A (1 % w/v NP-40 substitute, 0,1 % SDS w/v in PBS und Protease-Inhibitor) bei 4 °C gerührt und für 10 Sekunden bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zu den Beads wurden jeweils 700 µL der Lysatfraktionen gegeben. Diese Suspensionen wurden anschließend bei 4 °C 2 Stunden unter kontinuierlicher Bewegung auf einer Drehscheibe inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 1000 x g 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit den nicht-gebundenen Proteinen abgenommen. Die Beads wurden dreimal mit Waschpuffer A, zweimal mit Waschpuffer B (0,1 % w/v NP-40 substitute, 0,5 M w/v NaCl in PBS und Protease-Inhibitor) und Waschpuffer C (50 mM Tris-HCl, pH 7,4) gewaschen. Hierzu wurde jedes Mal 3 Minuten bei 4 °C gerührt und bei 2000 x g zentrifugiert, um den Überstand zu entnehmen.

Zur Elution der Membranproteine von den Biotin-Streptavidin Beads wurden 400 µL ß-Mercaptoethanol (5 % w/v in PBS und Protease-Inhibitor) zugesetzt und 30 Minuten bei 4 °C gerührt. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt, die gesammelten Überstände vereint und bei -20 °C aufbewahrt. Anschließend wurden die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurden die Lösungen auf Eis aufgetaut, mit 120 μ L 100 % TCA (entspricht 10 % TCA) versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 11000 x g abgenommen und das Pellet mit 200 μ L eines Ether/Ethanol-Gemischs (1:1, v/v) versetzt. Nach Abdampfen des Lösungsmittelgemisches wurden die Proteine zur tryptischen Proteolyse eingesetzt.

4.3.8.4 Direkte tryptische Proteolyse

Das Proteingemisch wurde in einer 8 M Harnstoff-Lösung gelöst. Es wurde 1 μ L einer 100 mM DTT-Lösung zugesetzt und 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 μ L einer 300 mM IAA-Lösung zugesetzt und im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Zur tryptischen Proteolyse wurden die Proben mit 425 μ L NH₄HCO₃ und modifiziertem Trypsin (Verhältnis Enzym:Protein 1:200) versetzt und bei 37 °C für 16 Stunden inkubiert. Zum Abstoppen der Proteolyse wurde 1 μ L 100 % FA zugesetzt. Die Lösung wurde mittels Festphasenextraktion entsalzt.

4.3.8.5 Entsalzung der Proben mittels Festphasenextraktion

Die verwendete stationäre Phase bestand aus einem hydrophil-lipophilen, wasserbenetzbaren Kopolymer aus Divinylbenzol und *N*-Vinylpyrrolidol (HLB Plus Short Kartuschen). Zunächst wurde die stationäre Phase dreimal mit je 3 mL 100 % Methanol konditioniert und anschließend mit 3 mL einer Mischung aus 5 % (v/v) Methanol und 0,2 % (v/v) FA äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wurde die stationäre Phase mit 3 mL einer Mischung aus 5 % (v/v) Methanol und 0,2 % (v/v) FA äquilibriert. Die Elution der Peptide erfolgte mit 1,5 mL 60 % und 1,5 mL 100 % Methanol. Die Eluate wurden vereint und in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert.

4.3.9 Biocytin-Hydrazide-Streptavidin Methode

Die Extraktion von Zellmembranproteinen und Zelloberflächenproteinen erfolgte über die Biotinylierung der Zuckerreste (Abbildung 37). Mittels Natriumperiodat (NaIO₄) wurden in einer milden Reaktion Glykane zu Aldehyden oxidiert und an Biocytin Hydrazid gekoppelt. Nach Bindung der Glykoproteine an Streptavidinbeads wurden diese über Affinitätschromatographie anreichert. *N*-glykosylierte Proteine wurden anschließend durch PNGaseF enzymatisch von den Straptavidinbeads abgelöst und zur tryptischen Proteolyse eingesetzt [133].



Abbildung 37: Reaktion der oxidierten Glukoproteine mit Hydrazid-Biocytin [133]

4.3.9.1 Markierung der Membranproteine mit Biocytin Hydrazide

Die Markierung der Membranproteine wurde nach Hofmann *et al.* mit einigen Modifizierungen durchgeführt [75]. Die in den Kulturflaschen enthaltenen Zellen wurden dreimal mit 6 mL einer eiskalten PBS-Lösung mit Protease-Inhibitor gewaschen. Nachdem die Zellen mit 6 mL einer 1,6 mM NaIO₄-Lösung versetzt wurden, erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf einem Schüttler. Anschließend wurde das enthaltene NaIO₄ durch Waschen mit 6 mL einer eiskalten PBS-Lösung entfernt. Zur Biotinylierung wurden 6 mL einer 3 mM Biocytin-Hydrazid-Lösung zugegeben und 60 Minuten bei 4 °C geschüttelt.

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, durch einen Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in einem 15 mL Reaktionsgefäß gesammelt. Der Überstand wurde nach dreiminütiger Zentrifugation bei 330 x g abdekantiert und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl (4.3.3) wurden jeweils 2 Millionen Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß aliquotiert.

4.3.9.2 Lyse der Biocytin-markierten Zellen

Die Lyse erfolgte wie unter 4.3.4 beschrieben.

4.3.9.3 Streptavidin-Kopplung undFreisetzung der Membranproteine

Es wurden 450 µL *Streptavidin Plus UltraLink Resin*[®] in jeweils ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß gegeben, bei 13000 x g für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Ähnlich wie unter 4.3.8.3 beschrieben, wurden die Beads dreimal mit 500 µL Waschpuffer A bei 4 °C gerührt und für 10 Sekunden bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde jedes Mal verworfen. Zu den Beads wurden jeweils 700 µL der Lysatfraktionen gegeben. Diese Suspensionen wurden anschließend bei 4 °C 2 Stunden unter kontinuierlicher Bewegung auf einer Drehscheibe inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 1000 x g 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand, der nicht-gebundene Proteine enthielt, entnommen. Die Beads wurden dreimal mit Waschpuffer A, zweimal mit Waschpuffer B und Waschpuffer C (100 mM NH₄HCO₃) gewaschen. Gleichzeitig wurde jeweils 3 Minuten bei 4 °C gerührt und bei 2000 x g zentrifugiert, um den Überstand zu entnehmen.

Die Beads wurden mit 500 µL NH₄HCO₃ und 1 µL PNGase F (Biolabs, 500.000 U/mL) versetzt und über Nacht bei 37 °C unter Rühren inkubiert. Der Überstand mit den gelösten Membranproteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Beads wurden zweimal mit 100 NH₄HCO₃ gewaschen und die Überstände vereint. Nach der Lyophilisation wurden die Proben bei -20 °C gelagert und anschließend zur tryptischen Proteolyse eingesetzt.

4.3.9.4 Direkte tryptische Proteolyse

Die tryptische Proteolyse erfolgte wie unter 4.3.8.4 beschrieben.

4.3.9.5 Entsalzung mittels Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion erfolgte wie unter 4.3.8.5 beschrieben.

4.3.10 Analyse von zytosolischen Proteinen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2DE)

4.3.10.1 Anfertigung der 2DE-Gele

Der Proteome Factory (Berlin, Deutschland) wurden je 5 Millionen Zellen zur Verfügung gestellt. Die 2DE-Analyse wurde von Frau Karola Lehmann in der Proteome Factory nach dem Protokoll von Kobaltz und Klose durchgeführt [134]. In der ersten Dimension wurden 100 µg Proteinextrakt auf ein Gelstreifen (9 M Harnstoff, 4 % Acrylamid, 0,3 % PDA (Polydiacetylen), 5 % Glycerin, 0,06 % TEMED (Tetramethyldiamin) und 2 % Ampholyten-Lösung (pH 2-11). 0.02 % Ammoniumperoxidsulfat (APS)) aufgebracht und bei 8820 V/h isoelektrisch fokussiert. Nach der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurde das IEF-Gel in dem Äquilibrationspuffer (125 mM Trisphosphate (pH 6,8), 40 % Glycerol, 65 mM DTT und 3 % SDS) 10 Minuten inkubiert.

Für die zweite Dimension wurde ein SDS-PAGE Gel (20 cm x 30 cm x 0,1 cm, 375 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,8), 12 % Acrylamid, 0,2 % Bisacrylamid, 0,1 % SDS and 0,03 % TEMED) angefertigt. Der IEF-Gelstreifen wurde auf das SDS-PAGE Gel aufgebracht und die Elektrophorese bei 140 mA für 5,5 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die Spots im Gel über eine Silberfärbung (Proteome Factory, PS-2001) sichtbar gemacht.

Die Digitalisierung der Gele erfolgte mit einem MicroTek 9800XL Scanner mit einem transparenten Adapter bei einer Auflösung von 300 dpi.

4.3.10.2 Analyse der 2DE-Gele

Die 2DE-Gele wurden übereinander gelegt und miteinander verglichen. Auffällige Spots (Intensitätsänderung oder fehlende Spots) wurden anschließend ausgeschnitten und die Proteine zur tryptischen Proteolyse im Gel eingesetzt (4.3.6)

4.3.11 Massenspektrometrische Methoden

4.3.11.1 Massenspektrometrische Methode zur Identifizierung mit einem RP-nLC gekoppelten Orbitrap Fusion[™] Tribrid[™] Massenspektrometers

Die Analyse tryptischer Peptide erfolgte an einer nanoUPLC-Anlage (Ultimate[™] 3000 RSLCnano, Thermo Scientific, USA), die über eine ESI-Quelle an ein Q-OT-qIT Massenspektrometer (Orbitrap Fusion[™] Tribrid[™], Thermo Scientific, USA) gekoppelt war.

Ein Aliquot der gelösten Peptide wurde mit einem Autosampler bei einer Laufmitttelzusammensetzung aus 98 % Lösungsmittel A (0,1 % (v/v) FA in HPLC-Wasser) und 2 % Lösungsmittel B (0,1 % (v/v) FA in ACN) in das nLC-System injiziert.

Die Peptide wurden zunächst auf einer Vorsäule (Acclaim® PepMap 100, C18, 300 μ m x 5 mm, 5 μ m, 100 Å) bei einer Flussrate von 5 μ L/min gesammelt und für 10 Minuten mit Lösungsmittel A gewaschen. Anschließend erfolgte die Trennung der Peptide bei einer Flussrate von 0,3 μ L/min auf der analytischen Säule (Acclaim® PepMap 100, C18, 75 μ m x 2 cm, 3 μ m 100 Å) bei 45 °C in einem 40-minütigen Gradienten. Nach der Elution wurde die Säule reequilibriert. Nachfolgend ist der Laufmittelgradient (Tabelle 7) der Methode zusammengefasst.

Zeit (min)	Flussrate (nL/min)	Lösungsmittel A (%)	Lösungsmittel B (%)
0	0,3	98	2
5	0,3	98	2
35	0,3	70	30
40	0,3	30	70
45	0,3	30	70
46	0,3	98	2
60	0,3	98	2

Tabelle 7: Laufmittelgradient der LC-Methode zur Identifizierung von Peptiden

Die getrennten Peptide eluierten in die Ionenquelle des Massenspektrometers. Das Spray wurde bei einer Spannung von 2000 V und einer Temperatur von 300 °C generiert. Steuerung und Datenakquisition erfolgte mit der Software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific).

Die Massenspektren wurden im Bereich des Masse-Ladungsverhältnisses (m/z) 400-1300 Da und einer Auflösung von 120,000 (bei m/z 200) aufgenommen. Der Wert für die automatische Verstärkungsregelung (*Automatic gain control*, AGC) lag bei 3e⁵ mit 50 ms Injektionszeit (bei einer Füllzeit von 50 ms).

Die MS/MS Messungen basierten auf dem datenabhängigen Aufnahmemodus (*Data Dependent Acquisition*; DDA). Zum Fragmentieren wurden Ionen mit einer Intensität größer als $2e^5$ und einer Ladung zwischen 2-5 ausgewählt. Diese wurden im HCD-Modus (*high-energy collision energy*) mit einer normalisierten Kollisionsenergie (NCE) von 27 % fragmentiert. Als Kollisionsgas diente Helium. Der Scan-Bereich startete bei m/z = 120. Der AGC-Wert lag bei $1e^4$ mit 200 ms Injektionszeit. Nach dem Fragmentieren wurden die Ionen mit einer Toleranz von ± 10 ppm für 6 Sekunden aus dem Fragmentierprozess ausgeschlossen. Die Isolation auf der MS²-Ebene erfolgte mit einem Quadropol und einer Abweichung von $\pm 1,6$ ppm.

4.3.11.2 Massenspektrometrische Methode zur quantitativen Messung mit dem RP-nLC gekoppelten Orbitrap Fusion[™] Tribrid[™] Massenspektrometers

Zur Quantifizierung der Proteine wurden die einzelnen Parameter der Methoden zur Identifizierung (4.3.11.1) angepasst.

Die Trennung der Peptide erfolgte in einem 100-minütigen Gradienten. Es wurde der in Tabelle 8 dargestellte Gradient verwendet.

Zeit (min)	Flussrate (nL/min)	Lösungsmittel A (%)	Lösungsmittel B (%)
0	0,3	98	2
10	0,3	98	2
100	0,3	70	30
110	0,3	30	70
113	0,3	10	90
115	0,3	10	90
116	0,3	98	2
130	0,3	98	2

Tabelle 8: Laufmittelgradient der LC-Methode zur Quantifizierun

Die Massenspektren wurden in dem Bereich m/z 400-1500 mit einer Auflösung von 120,000 (bei m/z 200) aufgenommen. Der AGC-Wert lag bei $4e^5$ mit 50 ms Injektionszeit.

Die MS/MS Messungen basierten auf dem DDA-Modus. Für die Fragmentierung wurden Ionen mit einer Intensität größer als $1e^5$ und einer Ladung zwischen 2-6 ausgewählt. Es wurde im HCD-Modus mit einer NCE von 30 % fragmentiert. Der Scan-Bereich startete bei m/z = 120. Der AGC-Wert lag bei 1e4 mit 50 ms Injektionszeit. Nach dem Fragmentieren wurden die Ionen mit einer Toleranz von ± 10 ppm für 12 Sekunden von weiteren Fragmentierungen ausgeschlossen. Die Isolation auf der MS²-Ebene erfolgte mit einem Quadropol und einer Abweichung von ± 1,5 ppm.

4.3.11.3 Identifizierung der Daten mit Sequest

Die Proteinidentifizierung wurde mit den Suchalgorithmen von Sequest durchgeführt. Sequest ist in die Software Proteome Discoverer[™] (Version 1.4) integriert. In Abbildung 38 ist der Arbeitsablauf für die Identifizierung von Peptiden dargestellt.



Abbildung 38: Arbeitsablauf für die Identifizierung von Peptiden mit Proteome Discoverer[™].

Zunächst wurden die Rohdaten der massenspektrometrischen Messungen in die Software geladen. Es wurden Peptide zwischen 350 – 4,000 Da für die Identifizierung berücksichtigt. Die Peptid- und Proteinidentifizierung erfolgten über den Abgleich mit einer humanen Datenbank (SwissProt, vom 10.11.2014, 47,772 Einträge). Als Enzym wurde Trypsin gewählt und maximal zwei tryptische Schnittstellen durften überlesen werden (*missed cleavages sites*). Die Massentoleranzen lagen bei 10 ppm im MS1 und bei 0,2 Da im MS²-Modus. Carbamidomethylierung von Cystein wurde als feste Modifikation und Oxidation von Methionin als variable Modifikation gewählt. Die *false discovery rate* für Peptididentifizierungen wurde auf 1 % und der DeltaCn auf 0,05 festgelegt.

4.3.11.4 Quantifizierung der Daten mit MAXQuant

Die quantitative Auswertung erfolgte mit der Software MaxQuant v. 1.5.2.8 und der humanen Datenbank (SwissPro*t*, vom 10.11.2014, 47,772 Einträge). MaxQuant enthält einen LFQ-Algorithmus für die Anpassung von Retentionszeiten, Übertragung von Identifizierungen zwischen den gemessenen Läufen, Normalisierung der Intensitäten sowie Quantifizierung der Proteine [135, 136]

Es wurden folgende Parameter eingestellt: Als unveränderliche Modifikation wurde Cysteincarbamidomethylierung und als variable Modifikation oxidiertes Methionin gewählt. Es wurden Peptide mit einer Länge von 8-25 Aminosäuren bis 4,600 Da berücksichtigt. Die *missed cleavages sites* lag bei 2. Für die Vorläuferionen wurde eine Massentoleranz bis 20 ppm für die Schnellsuche, bis 4,5 ppm für die Hauptsuche und bis zu 20 ppm für die fragmentierten Ionen zugelassen. Die FDR wurde auf 1 % für die Protein- und Peptididentifikation gesetzt. Der Multiplicity-Parameter wurde auf 1 gesetzt.

Voraussetzung für eine Proteinquantifizierung war eine sichere, reproduzierbare Proteinidentifizierung. Es wurden zur Quantifizierung nur Proteine gewählt, in denen mindestens zwei Peptide in allen biologischen Replikaten identifiziert wurden. Die Proteinquantifizierung basierte ausschließlich auf den eindeutigen Peptiden eines Proteins. Die weitere statistische Auswertung wurde mit der Software Office Excel (Microsoft) durchgeführt. Die erhaltenen Intensitäten wurden dekadisch logarithmiert und die Verhältnisfaktoren der einzelnen Proteine als Differenzen der logarithmierten LFQ-Intensitäten der Probe bestimmt. Signifikant unterschiedliche Proteine wurden mit einem zweiseitigen t-Test über die logarithmierten LFQ-Intensitäten ermittelt. Proteine mit einem Verhältnisfaktor von mindestens 2 und einem Signifikanzniveau von p < 0,05 wurden als signifikant differenziell erachtet.

4.4 Analyse molekularer Prozesse im Kolonkarzinom unter Einfluss von CD133

4.4.1 FFPE Tumorgewebe

Die in diesem Versuch verwendeten FFPE Schnitte von murinen Tumoren stammen aus einer Kooperation mit Dr. Daniel Wicklein (Anatomisches Institut, UKE, Hamburg). Für die Generierung der Tumore wurden HT29 Zellen mit einem shRNA Vektor gegen CD133 versetzt, um ein *knockdown* des Proteins CD133 zu gewährleisten. Als Kontrolle wurde ein shRNA Vektor gegen Luziferase verwendet. Je 1x10⁶ Zellen wurden subkutan in SCID Mäuse injiziert. Nach ca. 4 Wochen wurden die Tumore den Mäusen entnommen, das Gewebe in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

4.4.2 Probenvorbereitung von FFPE Tumorgewebe

Zur Analyse wurden von dem fixierten Gewebe zehn 10 µM Gewebeschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger gebracht und für jeweils 5 Minuten zweimal in Xylol, zweimal in Ethanol jeweils 100 %, 95 %, 70 % und 30 % gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Skalpell von den Objektträgern abgetragen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 1 mL Antigen Retrivial Puffer überführt. Zur Deparaffinisierung wurden die Schnitte 4 Stunden bei 65 °C erwärmt [107], anschließend 5 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand des Puffers verworfen. Das Gewebepellet wurde dreimal mit H₂O gewaschen und mit 200 µL einer 100 mM DTT-Lösung in 100 mM NH₄HCO₃ versetzt. Nach einer 10minütigen Inkubation bei 56 °C wurde für 5 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Gewebepellet wurde mit 200 µL einer 300 mM IAA-Lösung in NH₄HCO₃ versetzt und im Dunkeln bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation bei 120000 g für 5 Minuten entfernt und die Proteine des Gewebes mit Trypsin in 100 mM NH₄HCO₃ bei 37 °C über Nacht proteolytisch gespalten. Die tryptischen Peptide im Überstand (Ü1) wurden in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und das Gewebepellet mit 50 % ACN versetzt. Nach einer 2-minütigen Inkubation unter Schütteln wurde der Überstand nach 10-minütiger Zentrifugation bei 120000 x g abgenommen und mit dem vorherigen Überstand (Ü1) vereint. Die Lösung mit den tryptischen Peptiden wurde bis zur Trockene eingeengt [106].

4.4.3 Entsalzung der Proben mittels Festphasenextraktion

Die Entsalzung erfolgte wie unter 4.3.8.5 beschrieben.

4.4.4 Methode zur Identifizierung mit einem nanoUPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS-Massenspektrometers

Die Analysen erfolgten mit einer nanoUPLC-Anlage (nanoACQUITY UPLC, Waters, UK), die über eine ESI-Quelle mit einem Q-TOF-MS-System (Q-TOF Premier, Micromass/Waters, UK) gekoppelt war. Die Probenlösungen wurden bei einer Laufmittelzusammensetzung aus 98 % Lösungsmittel A (0,1 % (v/v) FA in HPLC-Wasser) und 2 % Lösungsmittel B (0,1 % (v/v) FA in ACN) in das UPLC-System injiziert. Die Peptide wurden zunächst 2 Minuten auf einer Vorsäule (C18, 180 μ m x 20 μ M, Partikelgröße 5 μ m) bei einer Flussrate von 5 μ L/min gewaschen. Die Trennung erfolgte anschließend auf einer Trennsäule (C18, 100 μ m x 100 mm, Partikelgröße 1,7 μ m) bei einer Flussrate von 0,2 μ L/min. Es wurde der in Tabelle 9 dargestellte Gradient für die Elution verwendet.

Zeit (min)	Flussrate (nL/min)	Lösungsmittel A (%)	Lösungsmittel B (%)
0	0,2	98	2
2	0,2	98	2
30	0,2	70	30
34	0,2	30	70
36	0,2	30	70
37	0,2	98	2
60	0,2	98	2

Tabelle 9: Laufmittelgradient der LC-Methode zur Identifizierung von Peptiden

Nach erfolgter Trennung wurde die Probe direkt über eine *Fused-Silica*-Kapillare in die Ionenquelle des Massenspektrometers überführt. Die angelegte Spannung an der Kapillare betrug 1520 V. Die Messung erfolgte im datenabhängigen Aufnahmemodus (*Data Dependent Acquisition*; DDA). Im MS-Modus wurde zunächst ein Übersichtsscan im Bereich m/z 300 – 1500 Da durchgeführt. Es wurde mit einer Scan-Zeit von 0,6 Sekunden und einer Inter-Scan-Zeit von 0,05 Sekunden gearbeitet. Nach 0,65 Sekunden wurde ein neuer Scan-Zyklus gestartet. Der MS/MS-Modus wurde über einen m/z-Bereich von 100–1800 Da mit einer Scan-Rate von 1,90 s aufgenommen. Der Inter-Scan-Delay betrug 0,05 s.

Für die Fragmentierung wurden die zwei intensivsten Signale des Full-Scan-Spektrums selektiert. Bevorzugte Ladungszustände waren zwei-, drei- und vierfach geladene Peptide. Waren Peptide einmal für die Fragmentierung ausgewählt, wurden diese mit einer Toleranz von ±2 Da für 20 Sekunden vom Fragmentierungsprozess ausgeschlossen. Die Fragmentierung erfolgte mit ansteigender Kollisionsenergie (20 bis 30 eV).

Die Injektionsvolumina der unterschiedlichen Proben wurden anhand der Gesamtintensität der Basis-Peak-Chromatogramme (BPC) angeglichen.

4.4.5 Methode zur quantitativen Messung mit dem RP-nLC gekoppelten Orbitrap Fusion[™] Tribrid[™] Massenspektrometers

Die verwendete Methode wurde unter 4.3.11.2 beschrieben.

4.4.6 Quantifizierung der LC ESI-MS/MS Daten mit MAXQuant

Die Auswertung mit MaxQuant wurde unter 4.3.11.4 beschrieben. Die bioinformatische Analyse wurde mit Perseus durchgeführt.

4.5 Material

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	
Acetonitril	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
Ameisensäure	Fluka (Steinheim, Deutschland)	
Ammoniumbicarbonat	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
Ammoniumperoxidsulfat	Fluka (Steinheim, Deutschland)	
Dithiothreitol	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
D-PBS	Gibco (Eggenstein, Deutschland)	
Eosin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)	
Ethanol	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
Ether	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
Hämatoxylin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)	
Harnstoff	Merck (Darmstadt, Deutschland)	
HEPES	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
HPLC-Wasser	Fluka (Steinheim, Deutschland)	
Iodacetamid	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)	
L-Glutathion, oxidiert	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
Methanol	Fluka (Steinheim, Deutschland)	
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)	
PBS	Gibco (Eggenstein, Deutschland)	
Propanol	Fluka (Steinheim, Deutschland)	
Retrievit TM2, Target Retrieval	Biogenex (Fremont, USA)	
Solution×10		
SDS	Sigma (Steinheim, Deutschland)	
Sinapinsäure	Bruker (Bremen, Deutschland)	
Trypsin-Resuspensionspuffer	Promega (Madison, USA)	
XT MES Laufpuffer (20x)	Biorad (Hercules, USA)	
XT Probenpuffer 4x	Biorad (Hercules, USA)	
XT reduzierendes Agens 20x	Biorad (Hercules, USA)	

Tabelle 11: Verwendetes Biomaterial

Biomaterial	Hersteller
Benzonase (10000U/vial)	Merck
MALDI Peptid Standard	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
Proteaseinhibitor Mischung (Compete	Roche
tablets, EDTA-free	
Proteinmarker für SDS-PAGE	Biorad (Hercules, USA)
(Kaleidoscope Prestained Standard)	
Trypsin	Promega (Madison, USA)

Tabelle 12: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Eppendorf Tischzentrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kühlzentrifuge Universal 3212	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Laufkammer SDS-Page Criterion	Biorad (Hercules, USA)
Gelsystem	
Skalpell	B. Braun (Tuttlingen, Deutschland)
TissueLyzer II	QIAGEN (USA)
Neubauer Zählkammer	SupeRior (Marienfeld, Deutschland)
Vakuumzentrifuge mit Kühlfalle RCF 10	Thermoscientific

Tabelle 13: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien			Hersteller	
ACQUITY	UPLC	PST	C18	Waters (Manchester, UK)
nanoACQUITY Column 10K psi, 130Å,			130Å,	
1.7 µm, 75 µm	X 150			
ACQUITY	UPLC	PST	C18	Waters (Manchester, UK)
nanoACQUITY Trap 10K psi MV, 100Å,				
5 µm, 180 µm X 20 mm				
Criterion Precast XT BIS-Tris Gele			Biorad (Hercules, USA)	
Oasis HLB Plus Short Kartuschen			Waters (Eschborn, Deutschland)	

Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1000 µL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäß 15 mL, 50 mL	Greiner Bio One (Kremsmünster,
	Österreich
Reaktionsgefäße safe lock 1,5 mL, 2 mL	Eppendorg (Hamburg, Deutschland)
Spritzen 1mL, 3 mL	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Sterile Pipettenspitzen 5 mL, 10 mL	Nunc A/S (Roskilde, Deutschland)
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Nunc A/S (Roskilde, Deutschland)
Zellschaber	Nunc A/S (Roskilde, Deutschland)

Tabelle 14: Verwendete Software

Software	Hersteller
FlexImaging 3.0	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
FlexControl 3.3	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
GraphPad Prism 4	GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA)
Mascot In-House Server Version 2.3.02	Matrix Science (Boston, USA)
MaxQuant 1.5.2.8	Max-Planck-Institut (München,
	Deutschland)
Melanie Viewer 7.0.6	SIB Swiss Institute of Bioinformatics
	(Schweiz)
Microsoft Office Edition 2003	Microsoft (USA)
MassLynx 4.1	Waters (Manchester, UK)
Perseus	Max-Planck-Institut (München,
	Deutschland)
ProteomDiscoverer 1.4	ThermoFischer Scientific (Waltham,
	USA)
Xcalibur	ThermoFischer Scientific (Waltham,
	USA)

5. Literaturverzeichnis

- 1. World Health Organization http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/: Stand: 01.12.2017.
- 2. Kumar D. Role of tumor heterogeneity in drug resistance. Global Journal of Cancer Therapy. 2017;3(2):032-3.
- 3. Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut, Darmkrebs http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node. html: Stand: 25.03.2015.
- 4. Deutsches Krebsforschungszentrum Krebsinformationsdienst https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/darmkrebs/risikofaktoren.php: Stand: 23.03.15.
- Link KH, Sagban TA, Morschel M, Tischbirek K, Holtappels M, Apell V, et al. Colon cancer: survival after curative surgery. Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie. 2005;390(2):83-93. Epub 2004/09/30. doi: 10.1007/s00423-004-0508-5. PubMed PMID: 15455234.
- 6. Spano D, Heck C, De Antonellis P, Christofori G, Zollo M. Molecular networks that regulate cancer metastasis. Seminars in cancer biology. 2012;22(3):234-49. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.03.006. PubMed PMID: 22484561.
- 7. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. Science. 2011;331(6024):1559-64. doi: 10.1126/science.1203543. PubMed PMID: 21436443.
- 8. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. Nature reviews Cancer. 2003;3(6):453-8. Epub 2003/06/05. doi: 10.1038/nrc1098. PubMed PMID: 12778135.
- 9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74. PubMed PMID: 21376230.
- Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. Cancer research. 2010;70(14):5649-69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1040. PubMed PMID: 20610625; PubMed Central PMCID: PMC4037932.
- 11. Joosse SA, Pantel K. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. Cancer research. 2013;73(1):8-11. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3422. PubMed PMID: 23271724.
- Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. Nature reviews Molecular cell biology. 2014;15(12):786-801. doi: 10.1038/nrm3904. PubMed PMID: 25415508; PubMed Central PMCID: PMCPMC4316204.
- 13. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. EMBO Rep. 2014;15(12):1243-53. doi: 10.15252/embr.201439246. PubMed PMID: 25381661; PubMed Central PMCID: PMCPMC4264927.
- 14. Hubmacher D, Apte SS. The biology of the extracellular matrix: novel insights. Curr Opin Rheumatol. 2013;25(1):65-70. doi: 10.1097/BOR.0b013e32835b137b. PubMed PMID: 23143224; PubMed Central PMCID: PMCPMC3560377.
- Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. Nature reviews Molecular cell biology. 2014;15(12):771-85. doi: 10.1038/nrm3902. PubMed PMID: 25370693; PubMed Central PMCID: PMCPMC4682873.

- 16. CHATTERJI1 B, RITORTO MS, GARAGUSO I, BELAU E, GAZZANA G, BORLAK J. Onkoproteomics von Lungentumoren. BIOspektrum. 2006:732-5.
- 17. Yarbrough WG, Slebos RJ, Liebler D. Proteomics: clinical applications for head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck. 2006;28(6):549-58. doi: 10.1002/hed.20357. PubMed PMID: 16475197.
- Srinivas PR, Verma M, Zhao Y, Srivastava S. Proteomics for cancer biomarker discovery. Clinical chemistry. 2002;48(8):1160-9. Epub 2002/07/27. PubMed PMID: 12142368.
- Feist P, Hummon AB. Proteomic challenges: sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. Int J Mol Sci. 2015;16(2):3537-63. doi: 10.3390/ijms16023537. PubMed PMID: 25664860; PubMed Central PMCID: PMCPMC4346912.
- 20. Lu M, Faull KF, Whitelegge JP, He J, Shen D, Saxton RE, et al. Proteomics and mass spectrometry for cancer biomarker discovery. Biomarker insights. 2007;2:347-60. Epub 2007/01/01. PubMed PMID: 19662217; PubMed Central PMCID: PMCPmc2717808.
- 21. Li D, Chan DW. Proteomic cancer biomarkers from discovery to approval: it's worth the effort. Expert Rev Proteomics. 2014;11(2):135-6. doi: 10.1586/14789450.2014.897614. PubMed PMID: 24646122; PubMed Central PMCID: PMCPMC4079106.
- 22. Khadir A. Proteomics Approaches towards Early Detection and Diagnosis of Cancer. Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis. 2013;S14. doi: 10.4172/2157-2518.s14-002.
- 23. Jungblut PR, Schlüter H. Proteinbiochemie Proteinanalyse Proteomics. BIOspektrum. 2008;14(1):37-40.
- 24. Han X, Aslanian A, Yates JR, 3rd. Mass spectrometry for proteomics. Curr Opin Chem Biol. 2008;12(5):483-90. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.07.024. PubMed PMID: 18718552; PubMed Central PMCID: PMCPMC2642903.
- 25. Wolters DA. Anwendungen der MudPIT Technologie. BIOspektrum. 2004;2:162-4.
- 26. Cai Z, Chiu JF, He QY. Application of proteomics in the study of tumor metastasis. Genomics, proteomics & bioinformatics. 2004;2(3):152-66. Epub 2005/05/03. PubMed PMID: 15862116.
- 27. Helbig AO, Heck AJ, Slijper M. Exploring the membrane proteome--challenges and analytical strategies. J Proteomics. 2010;73(5):868-78. Epub 2010/01/26. doi: 10.1016/j.jprot.2010.01.005. PubMed PMID: 20096812.
- 28. Fischer F, Wolters D, Rogner M, Poetsch A. Toward the complete membrane proteome: high coverage of integral membrane proteins through transmembrane peptide detection. Mol Cell Proteomics. 2006;5(3):444-53. doi: 10.1074/mcp.M500234-MCP200. PubMed PMID: 16291997.
- 29. Vuckovic D, Dagley LF, Purcell AW, Emili A. Membrane proteomics by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Analytical approaches and challenges. Proteomics. 2013;13(3-4):404-23. doi: 10.1002/pmic.201200340. PubMed PMID: 23125154.
- 30. Lin S-H, Guidotti G. Chapter 35 Purification of Membrane Proteins. 2009;463:619-29. doi: 10.1016/s0076-6879(09)63035-4.
- 31. Tan S, Tan HT, Chung MC. Membrane proteins and membrane proteomics. Proteomics. 2008;8(19):3924-32. PubMed PMID: 18763712.

- 32. Shin BK, Wang H, Yim AM, Le Naour F, Brichory F, Jang JH, et al. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. J Biol Chem. 2003;278(9):7607-16. PubMed PMID: 12493773.
- 33. Wisniewski JR, Zougman A, Mann M. Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. J Proteome Res. 2009;8(12):5674-8. PubMed PMID: 19848406.
- 34. Wisniewski JR, Zielinska DF, Mann M. Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-glycoproteomic analysis by the filter-aided sample preparation method. Anal Biochem. 2010;410(2):307-9. PubMed PMID: 21144814.
- 35. Lin Y, Wang K, Yan Y, Lin H, Peng B, Liu Z. Evaluation of the combinative application of SDS and sodium deoxycholate to the LC-MS-based shotgun analysis of membrane proteomes. J Sep Sci. 2013. PubMed PMID: 23832743.
- 36. Lehner I, Niehof M, Borlak J. An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins. Electrophoresis. 2003;24(11):1795-808. PubMed PMID: 12783457.
- 37. Ralston A. Environmental Mutagens, Cell Signalling and DNA Repair. Nature Education. 2008;1(1):114.
- Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics. 2004;4(12):3665-85. doi: 10.1002/pmic.200401031. PubMed PMID: 15543535.
- 39. Bondarenko PV, Chelius D, Shaler TA. Identification and Relative Quantitation of Protein Mixtures by Enzymatic Digestion Followed by Capillary Reversed-Phase Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Analytical Chemistry. 2002;74(18):4741-9. doi: 10.1021/ac0256991.
- 40. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. Analytical and bioanalytical chemistry. 2007;389(4):1017-31. doi: 10.1007/s00216-007-1486-6. PubMed PMID: 17668192.
- 41. Ong SE. The expanding field of SILAC. Analytical and bioanalytical chemistry. 2012;404(4):967-76. doi: 10.1007/s00216-012-5998-3. PubMed PMID: 22526667.
- 42. Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. Nature reviews Molecular cell biology. 2006;7(12):952-8. doi: 10.1038/nrm2067. PubMed PMID: 17139335.
- 43. Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, et al. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. Proteomics. 2011;11(4):535-53. doi: 10.1002/pmic.201000553. PubMed PMID: 21243637.
- 44. Nahnsen S, Bielow C, Reinert K, Kohlbacher O. Tools for label-free peptide quantification. Mol Cell Proteomics. 2013;12(3):549-56. doi: 10.1074/mcp.R112.025163. PubMed PMID: 23250051; PubMed Central PMCID: PMC3591650.
- 45. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2011/2012. Berlin: ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN, 2015.
- 46. Koch-Institut R. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin: 2016.
- 47. Zhou W, Capello M, Fredolini C, Piemonti L, Liotta LA, Novelli F, et al. Mass spectrometry analysis of the post-translational modifications of alpha-enolase from pancreatic ductal adenocarcinoma cells. J Proteome Res. 2010;9(6):2929-36. doi: 10.1021/pr901109w. PubMed PMID: 20433201.

- 48. Capello M, Ferri-Borgogno S, Cappello P, Novelli F. alpha-Enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. The FEBS journal. 2011;278(7):1064-74. Epub 2011/01/26. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08025.x. PubMed PMID: 21261815.
- 49. Feng H-L, Liu Y-Q, Yang L-J, Bian X-C, Yang Z-L, Gu B, et al. Expression of CD133 correlates with differentiation of human colon cancer cells. Cancer Biology & Therapy. 2014;9(3):216-23. doi: 10.4161/cbt.9.3.10664.
- 50. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer research. 2006;66(19):9339-44. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3126. PubMed PMID: 16990346.
- 51. Ren F, Sheng WQ, Du X. CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. World journal of gastroenterology : WJG. 2013;19(17):2603-11. doi: 10.3748/wjg.v19.i17.2603. PubMed PMID: 23674867; PubMed Central PMCID: PMC3645378.
- 52. Griguer CE, Oliva CR, Gobin E, Marcorelles P, Benos DJ, Lancaster JR, Jr., et al. CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. PLoS One. 2008;3(11):e3655. doi: 10.1371/journal.pone.0003655. PubMed PMID: 18985161; PubMed Central PMCID: PMCPMC2577012.
- 53. Monteleone G, Franchi L, Fina D, Caruso R, Vavassori P, Monteleone I, et al. Silencing of SH-PTP2 defines a crucial role in the inactivation of epidermal growth factor receptor by 5-aminosalicylic acid in colon cancer cells. Cell death and differentiation. 2006;13(2):202-11. doi: 10.1038/sj.cdd.4401733. PubMed PMID: 16082388.
- 54. Said HM, Polat B, Hagemann C, Anacker J, Flentje M, Vordermark D. Absence of GAPDH regulation in tumor-cells of different origin under hypoxic conditions in vitro. BMC research notes. 2009;2:8. doi: 10.1186/1756-0500-2-8. PubMed PMID: 19144146; PubMed Central PMCID: PMC2646737.
- 55. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. Cell. 2009;137(6):1100-11. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.021. PubMed PMID: 19524512.
- 56. Kim B, Song J-L, Ju J-H, Kang S-A, Park K-Y. Anticancer effects of kimchi fermented for different times and with added ingredients in human HT-29 colon cancer cells. Food Science and Biotechnology. 2015;24(2):629-33. doi: 10.1007/s10068-015-0082-3.
- 57. Bagchi P, Bhowmick R, Nandi S, Kant Nayak M, Chawla-Sarkar M. Rotavirus NSP1 inhibits interferon induced non-canonical NFkappaB activation by interacting with TNF receptor associated factor 2. Virology. 2013;444(1-2):41-4. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.003. PubMed PMID: 23890813.
- 58. Fazzone W, Wilson PM, Labonte MJ, Lenz HJ, Ladner RD. Histone deacetylase inhibitors suppress thymidylate synthase gene expression and synergize with the fluoropyrimidines in colon cancer cells. Int J Cancer. 2009;125(2):463-73. doi: 10.1002/ijc.24403. PubMed PMID: 19384949.
- 59. Hamanaka RB, Chandel NS. Targeting glucose metabolism for cancer therapy. The Journal of experimental medicine. 2012;209(2):211-5. doi: 10.1084/jem.20120162. PubMed PMID: 22330683; PubMed Central PMCID: PMC3280882.
- 60. Marini C, Ravera S, Buschiazzo A, Bianchi G, Orengo AM, Bruno S, et al. Discovery of a novel glucose metabolism in cancer: The role of endoplasmic reticulum beyond glycolysis and pentose phosphate shunt. Scientific reports. 2016;6:25092. doi:

10.1038/srep25092. PubMed PMID: 27121192; PubMed Central PMCID: PMC4848551.

- 61. Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. Mol Cancer. 2007;6:25. doi: 10.1186/1476-4598-6-25. PubMed PMID: 17407558; PubMed Central PMCID: PMCPMC1852117.
- 62. Zhang DY, Ye F, Gao L, Liu X, Zhao X, Che Y, et al. Proteomics, pathway array and signaling network-based medicine in cancer. Cell Div. 2009;4:20. doi: 10.1186/1747-1028-4-20. PubMed PMID: 19863813; PubMed Central PMCID: PMCPMC2780394.
- 63. Veenstra TD, Prieto DA, Conrads TP. Proteomic patterns for early cancer detection. Drug Discovery Today. 2004;9(20):889-97. doi: 10.1016/s1359-6446(04)03246-5.
- 64. Shruthi BS, Vinodhkumar P, Selvamani. Proteomics: A new perspective for cancer. Adv Biomed Res. 2016;5:67. doi: 10.4103/2277-9175.180636. PubMed PMID: 27169098; PubMed Central PMCID: PMCPMC4854039.
- 65. Abramowski P, Kraus O, Rohn S, Riecken K, Fehse B, Schluter H. Combined Application of RGB Marking and Mass Spectrometric Imaging Facilitates Detection of Tumor Heterogeneity. Cancer genomics & proteomics. 2015;12(4):179-87. Epub 2015/07/03. PubMed PMID: 26136218.
- 66. Enthaler B, Pruns JK, Wessel S, Rapp C, Fischer M, Wittern KP. Improved sample preparation for MALDI-MSI of endogenous compounds in skin tissue sections and mapping of exogenous active compounds subsequent to ex-vivo skin penetration. Analytical and bioanalytical chemistry. 2012;402(3):1159-67. doi: 10.1007/s00216-011-5562-6. PubMed PMID: 22139470.
- 67. Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Moghaddas Gholami A, Lieberenz M, Savitski MM, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. Nature. 2014;509(7502):582-7. Epub 2014/05/30. doi: 10.1038/nature13319. PubMed PMID: 24870543.
- 68. Balluff B, Frese CK, Maier SK, Schone C, Kuster B, Schmitt M, et al. De novo discovery of phenotypic intratumour heterogeneity using imaging mass spectrometry. The Journal of pathology. 2014. Epub 2014/09/10. doi: 10.1002/path.4436. PubMed PMID: 25201776.
- 69. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med. 2012;366(10):883-92. doi: 10.1056/NEJMoa1113205. PubMed PMID: 22397650; PubMed Central PMCID: PMCPMC4878653.
- 70. Zhang N, Li L. Effects of common surfactants on protein digestion and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of the digested peptides using two-layer sample preparation. Rapid Commun Mass Spectrom. 2004;18(8):889-96. doi: 10.1002/rcm.1423. PubMed PMID: 15095358.
- 71. Scheurer SB, Rybak JN, Roesli C, Brunisholz RA, Potthast F, Schlapbach R, et al. Identification and relative quantification of membrane proteins by surface biotinylation and two-dimensional peptide mapping. Proteomics. 2005;5(11):2718-28. PubMed PMID: 15986331.
- 72. Scientific T. EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21331: Stand: 07.06.2017.
- 73. Chivers CE, Koner AL, Lowe ED, Howarth M. How the biotin-streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. Biochem J. 2011;435(1):55-63. doi: 10.1042/BJ20101593. PubMed PMID: 21241253; PubMed Central PMCID: PMCPMC3062853.

- 74. Hofmann A, Gerrits B, Schmidt A, Bock T, Bausch-Fluck D, Aebersold R, et al. Proteomic cell surface phenotyping of differentiating acute myeloid leukemia cells. Blood. 2010;116(13):e26-34. doi: 10.1182/blood-2010-02-271270. PubMed PMID: 20570859.
- 75. Hofmann A, Bausch-Fluck D, Wollscheid B. CSC technology: selective labeling of glycoproteins by mild oxidation to phenotype cells. Methods Mol Biol. 2013;951:33-43. doi: 10.1007/978-1-62703-146-2_3. PubMed PMID: 23296522.
- 76. Harvey Lodish AB, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. Protein Glycosylation in the ER and Golgi Complex. Molecular Cell Biology. 4 ed. New York: W.H. Freeman; 2000.
- 77. Gey M. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. 3 ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg2015.
- 78. Wang CY, Lin CF. Annexin A2: its molecular regulation and cellular expression in cancer development. Disease markers. 2014;2014:308976. doi: 10.1155/2014/308976. PubMed PMID: 24591759; PubMed Central PMCID: PMC3925611.
- 79. Hajjar K. Annexin II A Mediator of the Plasmin /Plasminogen Activator System. Trends in Cardiovascular Medicine. 1999;9(5):128-38. doi: 10.1016/s1050-1738(99)00020-1.
- 80. Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. J Biol Chem. 1994;269(33):21191-7. Epub 1994/08/19. PubMed PMID: 8063740.
- 81. Lokman NA, Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C. The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society. 2011;4(2):199-208. doi: 10.1007/s12307-011-0064-9. PubMed PMID: 21909879; PubMed Central PMCID: PMC3170418.
- 82. Singh P. Role of Annexin-II in GI cancers: interaction with gastrins/progastrins. Cancer letters. 2007;252(1):19-35. Epub 2006/12/26. doi: 10.1016/j.canlet.2006.11.012. PubMed PMID: 17188424; PubMed Central PMCID: PMCPmc1941619.
- Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011;3(12). doi: 10.1101/cshperspect.a005058. PubMed PMID: 21917992; PubMed Central PMCID: PMCPMC3225943.
- 84. Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, Waisman D. Annexin A2 heterotetramer: structure and function. Int J Mol Sci. 2013;14(3):6259-305. doi: 10.3390/ijms14036259. PubMed PMID: 23519104; PubMed Central PMCID: PMCPMC3634455.
- 85. Hutchison CJ. Do lamins influence disease progression in cancer? Adv Exp Med Biol. 2014;773:593-604. doi: 10.1007/978-1-4899-8032-8_27. PubMed PMID: 24563367.
- 86. Zen Q, Batchvarova M, Twyman CA, Eyler CE, Qiu H, De Castro LM, et al. B-CAM/LU expression and the role of B-CAM/LU activation in binding of low- and high-density red cells to laminin in sickle cell disease. Am J Hematol. 2004;75(2):63-72. doi: 10.1002/ajh.10442. PubMed PMID: 14755370.
- Kikkawa Y, Ogawa T, Sudo R, Yamada Y, Katagiri F, Hozumi K, et al. The lutheran/basal cell adhesion molecule promotes tumor cell migration by modulating integrin-mediated cell attachment to laminin-511 protein. J Biol Chem. 2013;288(43):30990-1001. doi: 10.1074/jbc.M113.486456. PubMed PMID: 24036115; PubMed Central PMCID: PMCPMC3829412.

- Stewart RL, O'Connor KL. Clinical significance of the integrin alpha6beta4 in human malignancies. Lab Invest. 2015;95(9):976-86. doi: 10.1038/labinvest.2015.82.
 PubMed PMID: 26121317; PubMed Central PMCID: PMCPMC4554527.
- 89. Kim TH, Kim HI, Soung YH, Shaw LA, Chung J. Integrin (alpha6beta4) signals through Src to increase expression of S100A4, a metastasis-promoting factor: implications for cancer cell invasion. Molecular cancer research : MCR. 2009;7(10):1605-12. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0102. PubMed PMID: 19808905.
- 90. Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, et al. Metastasisassociated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. J Biol Chem. 2005;280(21):20833-41. doi: 10.1074/jbc.M412653200. PubMed PMID: 15788416.
- 91. Moeller MJ, Soofi A, Braun GS, Li X, Watzl C, Kriz W, et al. Protocadherin FAT1 binds Ena/VASP proteins and is necessary for actin dynamics and cell polarization. The EMBO journal. 2004;23(19):3769-79. doi: 10.1038/sj.emboj.7600380. PubMed PMID: 15343270; PubMed Central PMCID: PMCPMC522787.
- 92. Nishikawa Y, Miyazaki T, Nakashiro K, Yamagata H, Isokane M, Goda H, et al. Human FAT1 cadherin controls cell migration and invasion of oral squamous cell carcinoma through the localization of beta-catenin. Oncology reports. 2011;26(3):587-92. doi: 10.3892/or.2011.1324. PubMed PMID: 21617878.
- 93. Zhang X, Liu J, Liang X, Chen J, Hong J, Li L, et al. History and progression of Fat cadherins in health and disease. Onco Targets Ther. 2016;9:7337-43. doi: 10.2147/OTT.S111176. PubMed PMID: 27942226; PubMed Central PMCID: PMCPMC5138043.
- 94. Dikshit B, Irshad K, Madan E, Aggarwal N, Sarkar C, Chandra PS, et al. FAT1 acts as an upstream regulator of oncogenic and inflammatory pathways, via PDCD4, in glioma cells. Oncogene. 2013;32(33):3798-808. doi: 10.1038/onc.2012.393. PubMed PMID: 22986533.
- 95. Tanoue T, Takeichi M. Mammalian Fat1 cadherin regulates actin dynamics and cellcell contact. The Journal of cell biology. 2004;165(4):517-28. doi: 10.1083/jcb.200403006. PubMed PMID: 15148305; PubMed Central PMCID: PMC2172355.
- 96. Diaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, Garcia-Melero A, Lopez-Alemany R. alpha-Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. Journal of biomedicine & biotechnology. 2012;2012:156795. doi: 10.1155/2012/156795.
 PubMed PMID: 23118496; PubMed Central PMCID: PMC3479624.
- 97. Alfarouk KO, Verduzco D, Rauch C, Muddathir AK, Adil HH, Elhassan GO, et al. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. Oncoscience. 2014;1(12):777-802. doi: 10.18632/oncoscience.109. PubMed PMID: 25621294; PubMed Central PMCID: PMCPMC4303887.
- 98. Sun X, Liu X. Cancer metastasis: enactment of the script for human reproductive drama. Cancer Cell Int. 2017;17:51. doi: 10.1186/s12935-017-0421-y. PubMed PMID: 28469531; PubMed Central PMCID: PMCPMC5414196.
- 99. Cock-Rada A, Weitzman JB. The methylation landscape of tumour metastasis. Biol Cell. 2013;105(2):73-90. doi: 10.1111/boc.201200029. PubMed PMID: 23198959.
- 100. Donovan LK, Pilkington GJ. CD133: holy of grail of neuro-oncology or promiscuous red-herring? Cell Prolif. 2012;45(6):527-37. doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00842.x. PubMed PMID: 23106300.

- 101. Mak AB, Blakely KM, Williams RA, Penttila PA, Shukalyuk AI, Osman KT, et al. CD133 protein N-glycosylation processing contributes to cell surface recognition of the primitive cell marker AC133 epitope. J Biol Chem. 2011;286(47):41046-56. doi: 10.1074/jbc.M111.261545. PubMed PMID: 21937449; PubMed Central PMCID: PMCPMC3220513.
- 102. Xia J, Zhang Y, Qian J, Zhu X, Zhang Y, Zhang J, et al. Isolation, identification and expression of specific human CD133 antibodies. Scientific reports. 2013;3:3320. doi: 10.1038/srep03320. PubMed PMID: 24271022.
- 103. Zhao P, Li Y, Lu Y. Aberrant expression of CD133 protein correlates with Ki-67 expression and is a prognostic marker in gastric adenocarcinoma. BMC cancer. 2010;10:218. doi: 10.1186/1471-2407-10-218. PubMed PMID: 20487522; PubMed Central PMCID: PMCPMC2891633.
- 104. Li Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. Exp Hematol Oncol. 2013;2(1):17. doi: 10.1186/2162-3619-2-17. PubMed PMID: 23815814; PubMed Central PMCID: PMCPMC3701589.
- 105. Sahlberg SH, Spiegelberg D, Glimelius B, Stenerlow B, Nestor M. Evaluation of cancer stem cell markers CD133, CD44, CD24: association with AKT isoforms and radiation resistance in colon cancer cells. PLoS One. 2014;9(4):e94621. doi: 10.1371/journal.pone.0094621. PubMed PMID: 24760019; PubMed Central PMCID: PMCPMC3997403.
- 106. Quaas A, Bahar AS, von Loga K, Seddiqi AS, Singer JM, Omidi M, et al. MALDI imaging on large-scale tissue microarrays identifies molecular features associated with tumour phenotype in oesophageal cancer. Histopathology. 2013;63(4):455-62. doi: 10.1111/his.12193. PubMed PMID: 23855813.
- 107. Steurer S, Borkowski C, Odinga S, Buchholz M, Koop C, Huland H, et al. MALDI mass spectrometric imaging based identification of clinically relevant signals in prostate cancer using large-scale tissue microarrays. Int J Cancer. 2013;133(4):920-8. Epub 2013/02/06. doi: 10.1002/ijc.28080. PubMed PMID: 23381989.
- 108. Steurer S, Singer JM, Rink M, Chun F, Dahlem R, Simon R, et al. MALDI imagingbased identification of prognostically relevant signals in bladder cancer using largescale tissue microarrays. Urologic oncology. 2014;32(8):1225-33. doi: 10.1016/j.urolonc.2014.06.007. PubMed PMID: 25131659.
- 109. Modica-Napolitano J, Kulawiec M, Singh K. Mitochondria and Human Cancer. Current Molecular Medicine. 2007;7(1):121-31. doi: 10.2174/156652407779940495.
- 110. Nicolson GL. Mitochondrial Dysfunction and Chronic Disease: Treatment With Natural Supplements. Integr Med (Encinitas). 2014;13(4):35-43.
- 111. Maranyane HM. Phosphoglucomutase 1 (PGM1) expression and regulation in cancer cells. Cape Town: University of Cape Town; 2015.
- 112. Pescador N, Villar D, Cifuentes D, Garcia-Rocha M, Ortiz-Barahona A, Vazquez S, et al. Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. PLoS One. 2010;5(3):e9644. doi: 10.1371/journal.pone.0009644. PubMed PMID: 20300197; PubMed Central PMCID: PMCPMC2837373.
- 113. Pelletier J, Bellot G, Gounon P, Lacas-Gervais S, Pouyssegur J, Mazure NM. Glycogen Synthesis is Induced in Hypoxia by the Hypoxia-Inducible Factor and Promotes Cancer Cell Survival. Front Oncol. 2012;2:18. doi: 10.3389/fonc.2012.00018. PubMed PMID: 22649778; PubMed Central PMCID: PMCPMC3355943.

- 114. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? Nature reviews Cancer. 2016;16(10):635-49. doi: 10.1038/nrc.2016.77. PubMed PMID: 27634447.
- 115. Favaro E, Bensaad K, Chong MG, Tennant DA, Ferguson DJ, Snell C, et al. Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells. Cell Metab. 2012;16(6):751-64. doi: 10.1016/j.cmet.2012.10.017. PubMed PMID: 23177934.
- 116. Lee WN, Guo P, Lim S, Bassilian S, Lee ST, Boren J, et al. Metabolic sensitivity of pancreatic tumour cell apoptosis to glycogen phosphorylase inhibitor treatment. British journal of cancer. 2004;91(12):2094-100. doi: 10.1038/sj.bjc.6602243. PubMed PMID: 15599384; PubMed Central PMCID: PMCPMC2409791.
- Perl A, Hanczko R, Telarico T, Oaks Z, Landas S. Oxidative stress, inflammation and carcinogenesis are controlled through the pentose phosphate pathway by transaldolase. Trends Mol Med. 2011;17(7):395-403. doi: 10.1016/j.molmed.2011.01.014. PubMed PMID: 21376665; PubMed Central PMCID: PMCPMC3116035.
- 118. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. Nature reviews Cancer. 2011;11(2):85-95. doi: 10.1038/nrc2981. PubMed PMID: 21258394.
- 119. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. Trends Biochem Sci. 2014;39(8):347-54. doi: 10.1016/j.tibs.2014.06.005. PubMed PMID: 25037503; PubMed Central PMCID: PMCPMC4329227.
- 120. Tsouko E, Khan AS, White MA, Han JJ, Shi Y, Merchant FA, et al. Regulation of the pentose phosphate pathway by an androgen receptor-mTOR-mediated mechanism and its role in prostate cancer cell growth. Oncogenesis. 2014;3:e103. doi: 10.1038/oncsis.2014.18. PubMed PMID: 24861463; PubMed Central PMCID: PMCPMC4035695.
- 121. Vizin T, Kos J. Gamma-enolase: a well-known tumour marker, with a less-known role in cancer. Radiol Oncol. 2015;49(3):217-26. doi: 10.1515/raon-2015-0035. PubMed PMID: 26401126; PubMed Central PMCID: PMCPMC4577217.
- 122. Poposka BIA, S.; Metodieva, M.; Spirovski, M.; Trajkov, D.; Stefanovski, T. Neuron specific enolase selective marker for small-cell lung cancer. Radiology and Oncology. 2004;38(1):21-6.
- 123. Chung FY, Huang MY, Yeh CS, Chang HJ, Cheng TL, Yen LC, et al. GLUT1 gene is a potential hypoxic marker in colorectal cancer patients. BMC cancer. 2009;9:241. doi: 10.1186/1471-2407-9-241. PubMed PMID: 19619276; PubMed Central PMCID: PMCPMC3087329.
- Muller FL, Colla S, Aquilanti E, Manzo VE, Genovese G, Lee J, et al. Passenger deletions generate therapeutic vulnerabilities in cancer. Nature. 2012;488(7411):337-42. doi: 10.1038/nature11331. PubMed PMID: 22895339; PubMed Central PMCID: PMCPMC3712624.
- 125. White-Al Habeeb NM, Di Meo A, Scorilas A, Rotondo F, Masui O, Seivwright A, et al. Alpha-enolase is a potential prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. Clin Exp Metastasis. 2015;32(6):531-41. doi: 10.1007/s10585-015-9725-2. PubMed PMID: 26037892.
- Song K, Kwon H, Han C, Zhang J, Dash S, Lim K, et al. Active glycolytic metabolism in CD133(+) hepatocellular cancer stem cells: regulation by MIR-122. Oncotarget. 2015;6(38):40822-35. doi: 10.18632/oncotarget.5812. PubMed PMID: 26506419; PubMed Central PMCID: PMCPMC4747371.

- 127. Evers BM, Ishizuka JIN, Townsend CM, Thompson JC. The Human Carcinoid Cell Line, BON. Annals of the New York Academy of Sciences. 1994;733(1 Molecular and):393-406. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb17289.x.
- 128. Cohen E, Ophir I, Shaul YB. Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. J Cell Sci. 1999;112 (Pt 16):2657-66. Epub 1999/07/22. PubMed PMID: 10413674.
- 129. Weber K, Thomaschewski M, Benten D, Fehse B. RGB marking with lentiviral vectors for multicolor clonal cell tracking. Nat Protoc. 2012;7(5):839-49. Epub 2012/04/07. doi: 10.1038/nprot.2012.026. PubMed PMID: 22481527.
- 130. Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral 'gene ontology' (LeGO) vectors for functional gene analysis. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2008;16(4):698-706. Epub 2008/03/26. doi: 10.1038/mt.2008.6. PubMed PMID: 18362927.
- 131. Weber K, Thomaschewski M, Warlich M, Volz T, Cornils K, Niebuhr B, et al. RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. Nature medicine. 2011;17(4):504-9. Epub 2011/03/29. doi: 10.1038/nm.2338. PubMed PMID: 21441917.
- 132.
 Covachem.
 Sulfo-NHS-SS-Biotin

 http://www.covachem.com/sulfo_nhs_ss_biotin.html: Stand: 14.03.2017.
 Sulfo-NHS-SS-Biotin
- 133. Scientific T. EZ-LinkTM Hydrazide-Biocytin: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/28020; [Stand: 07.06.2017].
- 134. Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. Electrophoresis. 1995;16(6):1034-59. Epub 1995/06/01. PubMed PMID: 7498127.
- 135. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. Nat Protoc. 2016;11(12):2301-19. doi: 10.1038/nprot.2016.136. PubMed PMID: 27809316.
- 136. Cox J, Matic I, Hilger M, Nagaraj N, Selbach M, Olsen JV, et al. A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. Nat Protoc. 2009;4(5):698-705. doi: 10.1038/nprot.2009.36. PubMed PMID: 19373234.
6. Anhang

6.1. Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS

Chemikalie	GHS-	P-Sätze	H-Sätze
	Symbol		
2-Morpholinoethansulfonsäure		261-305+351+338	315-319-335
Acetonitril		210-305+351+338-403+235	225-332-
	$\lor \lor$		302-312-319
Ameisensäure		260-280-301+330+331-	226-314
	~ ~	305+351+338-308+310	
Ammoniumhydrogencarbonat			302
Antigen Retriever		280	317
Biocytin-Hydrazid		261-305+351+338	315-319-335
Bis-Tris		261-305+351+338	315-319-335
Dithiothreitol		302+352-305+351+338	302-315-319
Ethanol		210-240-305+351+338-	225-319
	\checkmark	403+233	
Ether		210-240-403+235	224-302-336
Eosin		260-305+351+338	319
Hämatoxylin		261-305+351+338	302-315-
	`		319-335
lodacetamid		261-280-301+310-342+311	301-317-
	~ ~		334-413
MES Probenpuffer 4x		280-264-305+351+338-310-	319
	~	405-501	
Methanol		210-233-280-302+352	225-331-
	٠		311-301-370
Natriumdodecylsulfat		210-261-280-301+312+330-	228-302+332
	$\langle \cdot \rangle^{\sim}$	305+351+338+310-370+378	-315-318-

			335-412
Natriumperiodat		210-221-273-280-301+330+	271-314-
		331-305+351+338-	372-400
		371+380+375-308+310	
NP-40 Substitute		273-280-305+351+338	302-318-400
Ortho-Phosphorsäure	\diamond	280-301+330+331-	304-290
	~	305+351+338-309+310	
Reduzierungsreagenz 20x	(!)	260-303+361+353-305+351+	319
	~	338-310-405-501	
Salzsäure		234-260-304+340-303+361+	290-314-335
	~ ~	353-305+351+338-309+311-	
		501	
Sinapinsäure		261-305+351+338	315-319-335
Trifluoressigsäure		271-273-301+330+331-	332-314-412
	\sim	305+351+338-309+310	
Tris		261-305+351+338	315-319-335
Trypsin		285-261-305+351+338-	319-335-
	×	321-405-501	315-334
Tryptanblau		201-308+313	350
Xylol		210-260-301+310-302+352-	226-304-
	Ň	331	312+332-
	V		315-319-
			335-373
ß-Mercaptoethanol		273-280-302+352-304+340-	301+331-310
	XX	305+351+338-308+310	-315-317-
	VV		318-373-410

6.2 Abbildungen



Abbildung 39: Basis-Peak-Chromatogramme der LC-MS-Analysen der extrahierten Membranproteine nach Abtrennung von SDS durch Methode A) SDS-PAGE und B) FASP.



Abbildung 40: Zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) der HT29 Zellen.

HT29: 2DE des Proteinextrakts der Kontrollzellen (m= 100 μ g). HT29 PT: 2DE des Proteinextrakts der Primärtumoren (m= 100 μ g). HT29 Met: 2DE des Proteinextrakts der Metastasen (m= 100 μ g).

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozess der Metastasierung
Abbildung 2: Histologische Analyse vom Gefrierschnitt der Mausleber mit humanen
Tumoren
Abbildung 3: Summenspektrum der MALDI MSI-Messung der Mausleber mit
humanen Tumoren
Abbildung 4: MSI Abbildungen ausgewählter Signale der Mausleber 28
Abbildung 5: Density Plot von 16 humanen Tumoren und der Mausleber
Abbildung 6: Balkendiagramm mit der Anzahl an identifizierten Proteinen in der
Methode 1 (SDS-PAGE) und Methode 2 (FASP)
Abbildung 7: Venn Diagramm mit der Anzahl an identifizierten Proteinen mit den
Methoden: FASP, Kopplung mit Biotin-Streptavidin und Kopplung mit Biocytin-
Straptavidin
Abbildung 8: Venn Diagramm mit der Anzahl an identifizierten
Plasmamembranproteinen mit den Methoden: FASP, Kopplung mit Biotin-
Streptavidin und Kopplung mit Biocytin-Straptavidin
Abbildung 9: Venn Diagramm mit der Anzahl an identifizierten
Zelloberflächenproteinen mit den Methoden: FASP, Kopplung mit Biotin-
Streptavidin und Kopplung mit Biocytin-Straptavidin
Abbildung 10: Histogramme zur Normalverteilung (A) und Streudiagramme mit dem
Pearson-Korrelationskoeffizienten (B) der gemessenen Proben nach Biotin-
Aufarbeitung
Abbildung 11: Histogramme zur Normalverteilung (A) und Streudiagramme mit dem
Pearson-Korrelationskoeffizienten (B) der gemessenen Proben nach FASP-
Aufarbeitung
Abbildung 12: Balkendiagramm der Intensitäten des Proteins Protocadherin Fat1 in
den Kontrollzellen (HT), in den Zellen des Primärtumors (PT) und in den Zellen
der Metastasen (Met) 40
Abbildung 13: Balkendiagramm der Intensitäten des Proteins Integrin beta-4 in den
Kontrollzellen (HT), in den Zellen des Primärtumors (PT) und in den Zellen der
Metastasen (Met) 40

Abbildung 14: Balkendiagramm der Intensitäten des Basal Zelladhäsionsproteins in
den Kontrollzellen (HT), in den Zellen des Primärtumors (PT) und in den Zellen
der Metastasen (Met) 41
Abbildung 15: Balkendiagramm der Intensitäten des Proteins Annexin A2 in den
Kontrollzellen (HT), in den Zellen des Primärtumors (PT) und in den Zellen der
Metastasen (Met) 41
Abbildung 16: Ausschnittsvergrößerungen aus 2DE-Gelanalysen (A) sowie 3D-
Darstellungen (B) des Spots Pyruvatkinase43
Abbildung 17: Fragmentspektrum des zweifach geladenen Peptidions (m/z 731,91)
mit der identifizierten Peptidsequenz IYVDDGLISLQVK (Pyruvatkinase PKM)
und der annotierten y- und b-Ionenserie 44
Abbildung 18: Ausschnittsvergrößerungen aus 2DE-Gelanalysen (A) sowie 3D-
Darstellungen (B) des Spots Aldehyddehydrogenase 2, mitochondrial
Abbildung 19: Fragmentspektrum des zweifach geladenen Peptidions (m/z 764,39)
mit der identifizierten Peptidsequenz ANNSTYGLAAAVFTK
(Aldehyddehydrogenase 2, mitochondrial) und der annotierten y- und b-
Ionenserie
Abbildung 20: Ausschnittsvergrößerungen aus 2DE Gelanalysen (A) sowie 3D-
Darstellungen (B) des Spots alpha-Enolase 46
Abbildung 21: Fragmentspektrum des zweifach geladenen Peptidions (m/z 717,87)
mit der identifizierten Peptidsequenz GNPTVEVDLFTSK (alpha-Enolase) und
der annotierten y- und b-Ionenserie 48
Abbildung 22: Überlebenskurven der Mausgruppen mit HT29 CD133-kd-Zellen
(orange), HT29 Luc (dunkelblau) und HT29 Zellen (hellblau)
Abbildung 23: Basis-Peak-Chromatogramme (BPCs) der nanoUPLC-ESI-Q-TOF-MS-
Analyse der Tumore der HT29-Zellen 51
Abbildung 24: Basis-Peak-Chromatogramme (BPCs) der nanoUPLC-ESI-Q-TOF-MS-
Analyse der Tumore der HT29 CD133-kd-Zellen.
Abbildung 25: Histogramme zur Normalverteilung (A) und Streudiagramme mit dem
Pearson-Korrelationskoeffizienten (B) der gemessenen Proben
Abbildung 26: Intensitäten des identifizierten Enzyms GAPDH54
Abbildung 27: Intensität von ß-Tubulin
Abbildung 28: Volcano plot mit identifizierten Proteinen

Abbildung 29: Heatmap der MS-Ergebnisse zur Darstellung differentiell exprimierter
Proteine in Primärtumoren der HT29-Zellen mit CD133 kd und Luc 56
Abbildung 30: Modell zur Aktivierung der MMPs durch Annexin A2 und p11 66
Abbildung 31: Möglicher Mechanismus zur Invasion der Tumorzelle in die Blutbahn
durch Umstrukturierung der ECM68
Abbildung 32: Schematische Darstellung der Elektronentransportkette mit den
regulierten Komplexuntereinheiten72
Abbildung 33: Möglicher zellulärer Verlauf der Glykolyse/ Gluconeogenese nach
CD133 kd
Abbildung 34: Möglicher zellulärer Verlauf der Glykolyse nach CD133 kd74
Abbildung 35: Möglicher zellulärer Verlauf der Glukolyse/ Gluconeogenese und der
oxidativen Phosphorylierung nach CD133 kd76
Abbildung 36: Reaktion der Membranproteine mit Sulfo-NHS-SS-Biotin sowie die
anschließende Freisetzung der markierten Membranproteine
Abbildung 37: Reaktion der oxidierten Glukoproteine mit Hydrazide Biocytin
Abbildung 38: Arbeitsablauf für die Identifizierung von Peptiden mit Proteome
Discoverer TM
Abbildung 39: Basis-Peak-Chromatogramme der LC-MS-Analysen der extrahierten
Membranproteine nach Abtrennung von SDS durch Methode A) SDS-PAGE
und B) FASP111
Abbildung 40: Zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) der HT29 Zellen112

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle	1:	Gegenübe	rstellung	der	extrah	ierten,	identifizierter	n Proteine,
Membranproteine, Plasmamembranproteine und Zelloberflächenproteine								
Tabelle	2:	Anzahl	an i	dentifizie	erten	Plasma	membranprote	einen und
Zelloberfl	ächer	nproteinen r	nach Anv	venden v	on Filte	erkriterie	n	39
Tabelle 3	: Iden	tifizierte me	ethylierte	Peptide	der alp	ha-Enol	ase in den Sp	ots der 2DE-
Gele								47
Tabelle 4	1: Gru	ippierung d	er regul	ierten P	roteine	in KEG	G-Stoffwechse	elwege nach
DAVID								57
Tabelle 5	: Iden	tifizierte Pro	oteine de	er oxidativ	ven Pho	osphoryl	ierung	58
Tabelle 6	: Iden	tifizierte Pro	oteine de	er Glycoly	/se/ Glu	uconeog	enese	59
Tabelle 7: Laufmittelgradient der LC-Methode zur Identifizierung von Peptiden 89								
Tabelle 8: Laufmittelgradient der LC-Methode zur Quantifizierung von Peptiden 90								
Tabelle 9: Laufmittelgradient der LC-Methode zur Identifizierung von Peptiden 94								
Tabelle 1	0: Ve	rwendete C	hemikali	en				
Tabelle 1	1: Ve	rwendetes E	Biomater	ial				97
Tabelle 1	2: Ve	rwendete G	eräte					97
Tabelle 1	3: Ve	rwendete V	erbrauch	smateria	alien			97
Tabelle 1	4: Ve	rwendete Se	oftware					98

7. KMR Stoffe

In dieser Arbeit wurden keine krebserzeugenden, erbgutveränderten oder fortpflanzungsgefährdenden Stoffe (KMR-Stoffe) der Kategorie GHS 1A und 1B verwendet.

8. Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Herrn Prof. Dr. Hartmut Schlüter für die gute Aufnahme in die Arbeitsgruppe, viele konstruktive Diskussionen und eine großartige Betreuung bedanken.

Mein herzlicher Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn für die Unterstützung und Betreuung von Seiten der Lebensmittelchemie.

Für die gute Kooperation und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Boris Fehse, Pierre Abramowski und Daniel Wicklein.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe der Klinischen Chemie bedanke ich mich für die wunderbare Zusammenarbeit und die schöne Zeit. Vor allem Laura Heikaus, Marcus Wurlitzer, Pascal Steffen und Sönke Harder möchte ich für das Korrekturlesen, die vielen Kaffee-Diskussionsrunden und die lustigen Stunden in und außerhalb der Arbeitszeit danken.

Ganz wichtig, meine "Uni-Mädels": Catharina Lüdeke, Katja Schilling, Clara John, Katrin Häußler und Yvonne Peglow. Vielen Dank für Eure Unterstützung und die tolle Freundschaft.

Meinen Eltern möchte ich vom Herzen danken, die immer für mich da sind und mir so vieles ermöglicht haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten Paul, der mich allzeit in jeder Situation unterstützt und motiviert. Und Danke an meine Tochter für die tägliche Ablenkung mit viel Lachen und Unsinn machen.

DANKE!

9. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.