

**Früherkennung von Vorstufen  
des kolorektalen Karzinoms:  
Identifizierung und Charakterisierung  
potentieller Tumorbiomarker**

**DISSERTATION**

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Universität Hamburg;  
Fakultät für Mathematik, Informatik  
und Naturwissenschaften;  
Department Chemie

vorgelegt von

Anne-Kristin Fentz

Hamburg 2010

Die Promotionsarbeit wurde in Absprache mit dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Department Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg von August 2004 bis Juli 2008 in der Firma Indivumed GmbH durchgeführt.

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Bredehorst
2. PD Dr. K. David

Datum der Disputation: 01.10.2010

## INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1 Einleitung .....	1
1.1 Das kolorektale Karzinom .....	1
1.2 Die kolorektale Karzinogenese .....	1
1.3 Früherkennung und Diagnostik kolorektaler Karzinome .....	3
1.4 Tumorbiomarker .....	6
1.4.1 Entdeckung neuer Tumorbiomarker durch Untersuchung des Proteoms .....	6
1.4.1.1 Analyse des Serumproteoms .....	7
1.4.1.2 Analyse des Gewebeproteoms .....	10
1.4.2 Anforderungen an Studien zur Entdeckung neuer Tumorbiomarker ..	11
1.5 Aufgabenstellung .....	12
2 Material .....	13
2.1 Probenmaterial von Patienten .....	13
2.1.1 Serum .....	13
2.1.2 Gewebe .....	13
2.2 Zelllinien und Kultivierung .....	14
2.3 Bakterien und Kultivierung .....	14
2.4 Chemikalien .....	14
2.5 Peptide und Proteine .....	15
2.5.1 Peptid- und Proteinstandards .....	15
2.5.2 Enzyme .....	15
2.5.3 Antikörper .....	16
2.5.4 weitere Proteine .....	17
2.6 ProteinChip Arrays und Targets .....	17
2.7 Chromatographie- und Affinitätsmatrices, Partikel und Säulen .....	17
2.8 Protein-Gelsystem .....	18
2.9 Substrate bei der Chemilumineszenz-Methode .....	18
2.10 Oligonukleotide .....	18
2.11 Vektoren .....	19
2.12 DNA-Standards .....	19
2.13 Kits .....	19
2.14 Plastikmaterialien .....	20
2.15 Geräte .....	20
2.16 Gefahrstoffliste .....	22

---

3	Methoden .....	25
3.1	Gewinnung des Probenmaterials.....	25
3.1.1	Auswahl der Patienten .....	25
3.1.2	Serumproben.....	25
3.1.3	Gewebeproben.....	25
3.2	Massenspektrometrische Methoden .....	26
3.2.1	SELDI-TOF MS .....	26
3.2.1.1	Präparation der ProteinChip® Arrays .....	26
3.2.1.2	SELDI-TOF MS-Analyse.....	29
3.2.2	MALDI-TOF MS und MALDI-TOF/TOF MS.....	29
3.2.2.1	Matrix- und Probenpräparation auf den Targets .....	30
3.2.2.2	MALDI-TOF MS-Analyse: linearer Modus.....	32
3.2.2.3	MALDI-TOF MS-Analyse: Reflektor-Modus .....	33
3.2.2.4	MALDI-TOF/TOF MS-Analyse: Lift™-Modus.....	33
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	34
3.3.1	Herstellung von Gewebelysaten aus stickstofffixierten Gewebeproben.....	34
3.3.1.1	Herstellung von Kryostatschnitten.....	34
3.3.1.2	Färbung von Kryo-Gewebeschnitten mit Hämatoxylin und Eosin (HE) und Mikroskopie.....	34
3.3.1.3	Färbung von Kryo-Gewebeschnitten mit Kresylviolett.....	35
3.3.1.4	Herstellung von Lysaten aus Kryo-Gewebeschnitten.....	35
3.3.2	Herstellung von Gewebelysaten aus frisch präparierten Gewebeproben.....	36
3.3.3	Herstellung von Zellextrakten .....	36
3.3.4	Isolierung von Zellverbänden aus Gewebeschnitten durch Mikrodissektion.....	37
3.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	38
3.3.6	Beadbasierte chromatographische Methoden .....	38
3.3.6.1	Fraktionierung mit dem „Serum Fractionation Kit“ .....	38
3.3.6.2	Fraktionierung mit „Q Ceramic HyperD F (QHD) Spin Columns“ .....	39
3.3.6.3	Fraktionierung mit Reverse Phase (RP)-Beads .....	40
3.3.6.4	Umpuffern mit magnetischen HIC (hydrophobe Interaktionschromatographie)-Beads .....	42
3.3.7	Säulenchromatographische Methoden mit niedrigem Druck .....	42
3.3.7.1	Aufreinigung von GRP94 .....	42
3.3.7.2	Affinitätschromatographische Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins mit Hilfe von Ni-NTA-Säulen.....	43
3.3.8	High performance liquid chromatography (HPLC).....	43

---

3.3.9	Konzentrieren von Proben.....	45
3.3.9.1	Vakuumzentrifugation .....	45
3.3.9.2	Zentrifugationsfiltereinheiten .....	45
3.3.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	45
3.3.11	Western Blot und Immunprinting .....	46
3.3.12	Coomassie-Färbung von Proteinbanden .....	47
3.3.12.1	Kolloidale Coomassie-Färbung .....	47
3.3.12.2	Coomassie-Färbung mit „SimplyBlue™ Safe Stain“ .....	47
3.3.13	Silberfärbung von Proteinbanden .....	48
3.3.14	Trocknen von Polyacrylamidgelen.....	48
3.3.15	Ausschneiden von Proteinbanden aus Polyacrylamidgelen .....	49
3.3.16	Passive Elution von Peptiden und Proteinen aus Polyacrylamidgelen .....	49
3.3.17	Proteolytischer Verdau von Peptiden und Proteinen mit Trypsin im Gel .....	49
3.3.18	Proteolytischer Verdau von Peptiden und Proteinen in Lösung.....	51
3.3.18.1	Verdau mit Trypsin.....	52
3.3.18.2	Verdau mit Chymotrypsin.....	52
3.3.18.3	Verdau mit der Endoproteinase Glu-C .....	53
3.3.19	Spaltung des rekombinanten Fusionsproteins durch Enterokinase ....	53
3.3.20	Untersuchung zur hypothetischen Spaltung von GRP94 durch Calpain .....	55
3.3.21	Untersuchung zur Spaltung von GRP94 durch proteolytisch aktive Gewebelysate.....	55
3.3.22	Immunaффinitätsmessung von Transthyretin mit dem ProteinChip PG20 .....	56
3.3.23	Immunpräzipitation von Transthyretin .....	56
3.3.24	C3a ELISA.....	57
3.3.25	Radiale Immundiffusion zur Quantifizierung von Transthyretin .....	57
3.4	Bioinformatische Analyse.....	57
3.5	Zellkulturmethoden .....	58
3.5.1	Kultivierung.....	58
3.5.2	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität .....	59
3.6	Molekularbiologische Methoden .....	59
3.6.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	59
3.6.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	60
3.6.3	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen.....	60
3.6.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	61
3.6.5	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen.....	61
3.6.6	Ligation von DNA-Fragmenten .....	61
3.6.7	Transformation .....	62
3.6.8	Klonierung mit dem TOPO TA Cloning® Kit.....	62

---

3.6.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen .....	62
3.6.10	Expression rekombinanter Fusionsproteine in <i>E.coli</i> .....	62
3.6.11	Lagerung von <i>E.coli</i> -Klonen .....	64
4	Ergebnisse .....	65
4.1	Entdeckung und Charakterisierung potentieller Tumorbiomarker im Serum .....	65
4.1.1	Differentielle Analyse von Massenprofilen zur Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Serum .....	65
4.1.2	Validierung der initialen Studie zur Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Serum .....	68
4.1.3	Identifizierung des Proteins p8940 als C3a-desArg.....	70
4.1.4	Identifizierung des Proteins p13770 als Transthyretin.....	72
4.1.5	Antikörperbasierte Assays für C3a-desArg und Transthyretin.....	73
4.1.6	Untersuchung zur Spezifität der potentiellen Tumorbiomarker C3a-desArg und Transthyretin .....	77
4.2	Entdeckung und Charakterisierung potentieller Tumorbiomarker im Gewebe.....	79
4.2.1	Differentielle Analyse von Massenprofilen zur Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Gewebe.....	79
4.2.2	Identifizierung und nähere Charakterisierung des Proteins p10320...83	
4.2.2.1	Untersuchung zur Spezifität des potentiellen Tumorbiomarkers p10320.....	83
4.2.2.2	Untersuchung von mikrodisezierten Gewebeproben - Validierung des Proteins p10320 als potentiellen Tumorbiomarker.....	84
4.2.2.3	Identifizierung des Proteins p10320 als N-terminales Fragment von GRP94 .....	89
4.2.3	Gewinnung von GRP94 und dessen N-terminalem Fragment für die Generierung spezifischer Antikörper .....	92
4.2.3.1	Analyse der Primärstruktur des N-terminalen GRP94- Fragmentes.....	93
4.2.3.2	Klonierung der DNA des N-terminalen GRP94-Fragmentes in den Expressionsvektor pRSET A .....	93
4.2.3.3	Expression des N-terminalen GRP94-Fragmentes in <i>E.coli</i> BL21-AI™ und Reinigung.....	95
4.2.3.4	Entfernung des Fusions-Tags und Reinigung.....	97
4.2.3.5	Aufreinigung von GRP94 aus Zelllinien .....	101
4.2.3.6	Herstellung von Antikörpern und Überprüfung der selektierten Antikörper im Western Blot .....	102
4.2.4	Hypothesen zur inhärenten Spaltung von GRP94 .....	105
4.2.5	Aufreinigung des Peptids p4835 und Identifizierungsversuche .....	108

---

5	Diskussion.....	117
5.1	Methodik und Strategie.....	117
5.2	Studiendesign.....	119
5.3	Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Serum.....	121
5.3.1	Differentielle Analyse von Massenprofilen zur Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Serum.....	121
5.3.2	Identifizierung und biologische Bedeutung der potentiellen Tumorbiomarker.....	122
5.3.3	Validierung von C3a-desArg und Transthyretin als potentielle Tumorbiomarker und Ausblick auf die Anwendung.....	124
5.4	Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Gewebe.....	125
5.4.1	Differentielle Analyse von Massenprofilen zur Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Gewebe.....	126
5.4.2	Identifizierung und Charakterisierung des Proteins p10320.....	127
5.4.3	Validierung des N-terminalen Fragmentes von GRP94 als potentiellen Tumorbiomarker und Ausblick auf die Anwendung.....	133
5.4.4	Aufreinigung und Identifizierungsversuche des Peptids p4835.....	134
5.4.5	Nähere Charakterisierung der Peptide mit $m/z$ 3375 $\pm$ 3, $m/z$ 3442 $\pm$ 3 und $m/z$ 3487 $\pm$ 3.....	135
5.5	Ausblick.....	136
6	Zusammenfassung.....	139
7	Summary.....	141
8	Literaturverzeichnis.....	143
	Veröffentlichungen und Patentanmeldungen.....	157
	Danksagung.....	159
	Eidesstattliche Erklärung.....	161





**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A	Adenom
AcN	Acetonitril
AFP	Alpha-Fetoprotein
ASP	<i>acylation-stimulating protein</i>
% (v/v)	Volumenprozent (Volumen pro Volumen)
% (w/v)	Gewichtsprozent (Gewicht pro Volumen)
a.u.	<i>arbitrary units</i>
AUC	<i>area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CA	<i>cancer antigen</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i> (Karzinoembryonales Antigen)
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (Zimtsäure)
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DHB	Dihydroxybenzoesäure
D-MEM	<i>Dulbeccos' s modified Eagle medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DTT	Dithiothreitol
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Reticulum
ESI-TOF	<i>electron spray ionization-time of flight</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GRP	<i>glucose-regulated protein</i>
HCG	humanes Choriongonadotropin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)

HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSP	<i>heat shock protein</i> (Hitzeschockprotein)
IMAC	<i>immobilized metallion affinity chromatography</i>
K	Karzinom
KG	Kontrollgruppe
LCM	<i>laser capture microdissection</i>
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight</i>
MS	<i>mass spectrometry</i> (Massenspektrometrie)
N	Normalgewebe
NSE	Neuronen-spezifische Enolase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q-TOF	<i>quadropole-time of flight</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROC (-Kurve)	<i>receiver operating characteristic</i> (-Kurve)
RP	<i>reversed phase</i>
Stabw.	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
SE	<i>standard error</i> (Standardfehler)
SELDI-TOF	<i>surface-enhanced laser desorption/ionisation-time of flight</i>
SPA	3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-zimtsäure (Sinapinsäure)
T	Tumorgewebe
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TFA	<i>Trifluoro acetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Triton X-100	t-Octylphenoxyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
TTR	Transthyretin
UICC	<i>union internationale contre le cancer</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
vs.	versus (gegen)

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das kolorektale Karzinom

Unter dem allgemeinen Begriff Darmkrebs werden die malignen Tumoren des Darmes zusammengefasst, wobei die kolorektalen Karzinome mehr als 95% der bösartigen Darmtumoren ausmachen. Als Risikofaktoren gelten neben einer genetischen Prädisposition sowie bestimmten entzündlichen Erkrankungen ein hohes Alter und ernährungsbedingte Faktoren. Darmkrebs ist in vielen Industrieländern bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Krebserkrankung. In Deutschland erkranken jährlich mehr als 60000 Menschen an Darmkrebs, im Jahr 2007 starben laut Statistischem Bundesamt ca. 18000 Patienten an Darmkrebs. Somit ist Darmkrebs in Deutschland die zweithäufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen, sowohl bei Frauen als auch bei Männern (1, 2).

## 1.2 Die kolorektale Karzinogenese

Beim kolorektalen Karzinom verläuft die Entwicklung in 90% der Fälle sehr langsam über benigne Darmpolypen, die auch als Adenome bezeichnet werden (3). Beim Adenom handelt es sich um eine Proliferation des Mukosaepithels mit geringerer Differenzierung gegenüber normalen Mukosazellen sowie Strukturveränderungen der Drüsen. In der Regel weisen Adenome ein exophytisches, in das Darmlumen hineinragendes Wachstum auf (tubuläres oder villöses Adenom), seltener entstehen flache Adenome. Obwohl die genauen Vorgänge bei der Entstehung der Tumoren umstritten sind, wird angenommen, dass sie aus mutierten epithelialen Stammzellen hervorgehen (70). Es werden hauptsächlich zwei Wegen der kolorektalen Karzinogenese unterschieden, der sogenannte „gatekeeper pathway“ und der „caretaker pathway“ (4).

Der „gatekeeper pathway“ wird in ungefähr 85% der sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinome sowie bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis beschritten. Die „gatekeeper“-Gene regulieren die Proliferation der Zellen (5). Fearon und Vogelstein (1990) entwickelten ein Modell der kolorektalen Karzinogenese,

welches als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet wird und die maligne Progression durch Anhäufung von Mutationen in Tumorsuppressor- und Protoonkogenen beschreibt (6). Ein frühes Ereignis stellte dabei die Mutation und/oder der Verlust der Heterozygotie auf Chromosom 5 im Bereich des APC- („adenomatous polyposis coli“) Gens, einem Tumorsuppressorgen, dar. Bei der familiären adenomatösen Polypose liegt bereits eine Keimbahnmutation des APC-Gens vor. Diese erbliche Form des kolorektalen Karzinoms ist charakterisiert durch das Auftreten von hundert bis tausend kolorektalen Adenomen. Mutationen des K-ras- Gens finden ebenfalls in frühen Phasen der Karzinogenese statt. Im weiteren Verlauf können neben Mutationen im TGF-beta-II-Rezeptor Deletionen des Chromosoms 18q nachgewiesen werden, welche mit dem Verlust der DCC- („deleted in colorectal cancer“), DPC4- („deleted in pancreatic carcinoma, locus 4“) und SMAD2- („small tail and mothers against decapentaplegic“) Tumorsuppressorgene einhergehen. In der späten Phase der Karzinogenese kommt es zur Mutation des Tumorsuppressorgens p53, von welcher angenommen wird, dass sie den Übergang des Tumors vom späten Adenom zum Karzinom durch Umgehung von Zellzyklusarrest und Apoptose ermöglicht. Die neoplastische Progression wird begleitet von weiteren genetischen Veränderungen, ebenso können die Mutationen in anderer Abfolge auftreten (7, 8).

Bei dem zweiten Entstehungsweg von kolorektalen Karzinomen, dem „caretaker pathway“, spielen Mutationen in DNA-Reparaturgenen (häufig MSH2, MLH1, MSH6) die entscheidende Rolle in der Tumorgenese. Sie tragen zur Entwicklung des HNPCC-Syndroms („hereditary non polyposis colorectal cancer syndrome“) bei, finden sich jedoch auch bei einem Teil der nicht hereditären Karzinome. Diese sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinome sind vor allem durch zur Inaktivierung führende DNA-Methylierung der Promotorregion von MLH1 gekennzeichnet (8). Durch die fehlende DNA-Reparatur akkumulieren Mutationen und führen zur Entartung der Zellen (4). Häufig resultiert aus der DNA-Reparaturdefizienz eine Mikrosatelliteninstabilität, was auch als „replication error positive“- (REP+) Phänotyp bezeichnet wird (7). In 20-30% der sporadischen kolorektalen Karzinome können Veränderungen des Methylierungsmusters der DNA nachgewiesen werden. Der durch Hypermethylierung gekennzeichnete Phänotyp wird als CIMP („CpG island methylator phenotype“) bezeichnet. Die Methylierung von

CpG-Motiven in Promotorregionen führt zur Inaktivierung der Transkription der Gene, u. a. auch von MLH1. CIMP-positive Karzinome scheinen unterschiedliche genotypische, phänotypische und prognostische Eigenschaften zu besitzen. Hierzu zählen Mutationen von BRAF, K-ras und p53, Mikrosatelliteninstabilität ebenso wie Lokalisation und Histologie der Tumoren und Alter und Geschlecht der Patienten (8).

Ergänzend werden alternative Wege der Karzinogenese beschrieben, wie der sogenannte „serrated pathway“ (9), der bei der Entstehung von 7,5% aller kolorektalen Karzinome beschrritten wird (10). Charakterisiert wird dieser Weg durch frühe genetische Veränderungen des BRAF- oder seltener des K-Ras-Gens, die zur Verminderung der p53-abhängigen Apoptose führen (10, 11). Außerdem konnte eine gehäufte CpG-Inselmethylierung nachgewiesen werden und sowohl mikrosatelliteninstabile als auch mikrosatellitenstabile Tumoren (10, 12).

Die verschiedenen Wege der kolorektalen Karzinogenese können nicht völlig voneinander getrennt betrachtet werden, es existieren Überschneidungen. So kann das APC-Gen als „caretaker“ fungieren und die DNA-Reparaturgene können direkten Einfluss auf die Zellproliferation nehmen (5).

### **1.3 Früherkennung und Diagnostik kolorektaler Karzinome**

In Abhängigkeit von der Art und Anzahl der genetischen Veränderungen des Kolonepithels können 5-10 Jahre vergehen, bis der Tumor ein invasives Wachstum aufweist (3). Ist die Ausbreitung des Tumors noch auf die Darmwand beschränkt, beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate 90%, sind bereits regionale Lymphknoten befallen, sinkt sie auf 33-76% und haben sich Fernmetastasen gebildet, besteht nur noch eine 5- bis 10%ige Fünf-Jahres-Überlebensrate (13, 14). Die Prognose hängt somit neben dem histologischen Differenzierungsgrad vor allem vom Tumorstadium ab. Mehr als 55% der kolorektalen Karzinome werden jedoch erst diagnostiziert, wenn regionale Lymphknoten betroffen oder sogar Fernmetastasen vorhanden sind (13). Da allerdings die Heilungschancen bei rechtzeitiger Erkennung und Entfernung von Adenomen und Karzinomen in Frühstadien hervorragend sind, kann durch entsprechende Früherkennungsmaßnahmen die Inzidenz- und die Mortalitätsrate der

kolorektalen Karzinome deutlich reduziert werden (15, 16, 17, 18). Ab einem Alter von 50 Jahren treten Darmtumoren gehäuft auf, daher werden ab diesem Alter Früherkennungsuntersuchungen empfohlen. Zurzeit stehen zur Früherkennung unterschiedliche Testverfahren zur Verfügung.

Die Koloskopie ist die wichtigste und aussagekräftigste Untersuchung zur Früherkennung und Diagnostik von Darmkrebs. Mit ihr lassen sich mit hoher Sicherheit selbst kleine Tumoren und Darmpolypen aufspüren und entfernen. Allerdings ist diese Methode sehr kostenaufwendig und für den Patienten nicht frei von Risiken (3, 19).

Neben den invasiven Darmuntersuchungen gilt der Hämoccult-Stuhltest (gFOBT, „guaiac-based fecal-occult blood testing“) derzeit als Standardtest. Er basiert auf dem Nachweis von Blut in Stuhlproben, woraus der größte Nachteil des Tests resultiert. Da kleine Adenome (< 1 cm) meist nicht bluten, besitzt der Test vor allem bei der Erkennung von Frühstadien eine geringe Sensitivität. Auch größere Polypen und Karzinome bluten nur zeitweise, was die Sammlung und Analyse mehrerer Proben erforderlich macht. Die Sensitivität wird in verschiedenen Studien unterschiedlich angegeben und kann durch jährliche Tests wesentlich erhöht werden, für größere Adenome kann sie bis zu 41% und für Karzinome bis zu 79% betragen. Die Spezifität der Tests beträgt 87% für sensitivere und 98% für die nicht sensitiven Tests (19). Durch Verzehr von bestimmten Nahrungsmitteln oder durch Blutungen anderer Bereiche des Gastrointestinaltraktes werden falsch positive oder negative Testergebnisse erhalten. Im Falle eines positiven Testergebnisses müssen sich die Patienten zur genaueren Abklärung einer Koloskopie unterziehen (20).

Ein weiterer erhältlicher Stuhltest basiert ebenfalls auf dem Nachweis von okkultem Blut, allerdings mit Hilfe einer immunologischen Methode (iFOBT, „immunological FOBT“, oder FIT, „fecal immunochemical test“). Die Antikörper erkennen Sequenzen des humanen Globins, wodurch nahrungsbedingte falsch positive und negative Ergebnisse entfallen. Gegenüber den gFOBT-Tests scheinen die immunologischen Tests in Bezug auf Sensitivität und Spezifität vorteilhaft zu sein, da Sensitivitäten über 80% für Karzinome und um 30% für Adenome mit fortgeschrittener Neoplasie bei Spezifitäten von bis zu 97% angegeben werden (8, 21, 22). Die Senkung der

Mortalitätsrate bezüglich des kolorektalen Karzinoms mit Hilfe dieser Tests wurde allerdings noch nicht direkt nachgewiesen (8, 19).

Erstmals wurden im Jahr 2008 DNA-Stuhltests in die von US-Fachgesellschaften herausgegebenen Empfehlungen zu Früherkennungsmaßnahmen aufgenommen (19). Diese Tests basieren auf den molekularen Kenntnissen über die kolorektale Karzinogenese und weisen multiple Mutationen in den am häufigsten betroffenen Genen nach (20). In verschiedenen Studien wurden DNA-Stuhltests zum Screening nach Darmtumoren eingesetzt, dabei wurden für Karzinome Sensitivitäten von 52-91% und für Adenome von 15-82% bei Spezifitäten zwischen 93-97% erreicht (23, 24, 25, 26, 27). Hierbei wurden die geringeren Sensitivitäten sowohl für die okkulten Bluttests als auch für die DNA-Stuhltests in den Studien angegeben, die mit einer asymptomatischen Bevölkerung durchschnittlichen Risikos durchgeführt wurden.

Neben dem Nachweis von okkultem Blut oder tumorspezifischer DNA im Stuhl existieren Bemühungen, Änderungen der Genexpression durch Analyse von mRNA oder Detektion tumorspezifischer Proteine im Stuhl zur Früherkennung einzusetzen (20). Bisher sind diese Tests jedoch nicht spezifisch genug, um eine Population mit durchschnittlichem Risiko zu untersuchen (28). Eine weitere Möglichkeit bieten Tests, die eine während der Karzinogenese veränderte Mucinstruktur und -expression nachweisen. Da abnormale Mucine auch bei entzündlichen Erkrankungen wie Colitis ulcerosa gebildet werden können, weisen diese Tests relativ geringe Spezifitäten von ungefähr 85% auf. Größere klinische Studien sollen zeigen, ob die bisher in Studien verwendeten Tests für ein Screening zur Früherkennung des kolorektalen Karzinoms akzeptabel erscheinen (20).

Von allen Früherkennungsuntersuchungen werden zurzeit von den Krankenkassen die Kosten für die Koloskopie und für den Stuhltest auf okkultes Blut ab einem Alter von 55 Jahren übernommen, wobei bisher nur 48% Frauen und ungefähr 19% der Männer diese Maßnahmen in Anspruch nehmen (3). Während die geringe Sensitivität des Stuhltests einen großen Nachteil für die von der Bevölkerung eher akzeptierte nichtinvasive Untersuchung bedeutet, stellt die invasive Koloskopie zwar eine gute Früherkennungsmaßnahme dar, wird jedoch von vielen Menschen aufgrund der Unannehmlichkeiten einer endoskopischen Darmuntersuchung gemieden (19). Möglicherweise kann die virtuelle Koloskopie mit der

Computertomografie in Zukunft eine Alternative bieten, auch wenn sie die konventionelle Koloskopie nicht vollständig ersetzen kann, da keine Polypen abgetragen und keine Gewebeproben entnommen werden können (19). Noch liegt die Empfindlichkeit bei der Detektion von flachen Läsionen oder kleinen Polypen hinter der endoskopischen Untersuchung, bei Polypen über 6 mm weisen beide Methoden vergleichbare Sensitivitäten auf (19, 29).

## **1.4 Tumorbiomarker**

Die Bereitschaft der Bevölkerung zur Teilnahme an Früherkennungsmaßnahmen könnte durch den Einsatz von Bluttests deutlich gesteigert werden. Hierfür müssen Substanzen mit Protein-, Lipid- oder Kohlenhydrat-Charakter, die durch die Tumorzellen oder ihre Umgebung gebildet werden, in die Blutzirkulation gelangen und im Plasma oder Serum nachweisbar sein. Man fasst diese zirkulierenden bzw. humoralen Marker neben den morphologischen, immunhistologischen, genetischen und oberflächenspezifischen Markern unter dem Begriff Tumorbiomarker zusammen. Diese nachweisbaren oder messbaren Substanzen weisen auf einen Tumor hin, tragen zu seiner Charakterisierung und Messung der Ausbreitung bei oder ermöglichen Vorhersagen auf das Ansprechen bestimmter Therapien. Zu den bisher identifizierten tumorassoziierten Substanzen zählen biosynthetisch veränderte Vorstufen normaler Antigene, z. B. Blutgruppensubstanzen wie CA 19-9 und CA 50, ektopisch gebildete normale Antigene, z. B. Hormone wie HCG, Enzyme wie PSA und NSE, ontogenetisch alte reaktivierte Antigene wie AFP und CEA, Mucine, Zytokeratine und andere Moleküle wie das  $\beta$ 2-Mikroglobulin. Diese Tumorbiomarker eignen sich aufgrund mangelnder Sensitivität und Spezifität nicht für das Früherkennungsscreening (30). Eine umstrittene Ausnahme bildet das Prostata-spezifische Antigen (PSA), welches zur Früherkennung von Prostatakarzinomen eingesetzt wird (31). Serummarker wie CEA können allerdings prognostische Informationen geben und zur Therapieüberwachung genutzt werden (32).

### **1.4.1 Entdeckung neuer Tumorbiomarker durch Untersuchung des Proteoms**

Die Entdeckung neuer Biomarker und die Entwicklung sensitiver, anwendungsfreundlicher und kostengünstiger Früherkennungsmethoden besitzen eine große



Bedeutung. In den letzten Jahren existierten große Bemühungen, mit Hilfe neuer Technologien die komplexen molekularen Vorgänge der Karzinogenese zu verstehen und dadurch sowohl neue potentielle Behandlungsziele zu finden als auch neue Früherkennungsmarker zu identifizieren (33). Die sogenannten -omics-Technologien haben die Identifizierung von Schlüssel-molekülen ermöglicht, die mit den Signalwegen des Zellwachstums, des Metabolismus und des Zelltods assoziiert sind (34). Die Analyse des Proteoms liefert dabei wertvolle Informationen, da es durch temporale und funktionelle Regulation der Transkription, differentielles Splicing der mRNAs und posttranslationale Modifikationen die qualitativen und quantitativen Veränderungen während der malignen Transformation widerspiegelt (33, 34). Mit Hilfe der Proteomics-Technologien kann der Informationsfluss zwischen der Mikroumgebung der Zellen und der Makroumgebung wie dem Blutsystem näher charakterisiert werden (35).

Neben der traditionellen zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) mit anschließender Protein-Identifizierung durch die Massenspektrometrie werden zunehmend neue Techniken eingesetzt. Hierzu zählen eher quantitative Methoden wie „isotope-coded affinity tags“ (ICAT<sup>TM</sup>) und „isotope tags for relative and absolute quantification“ (iTRAQ<sup>TM</sup>), Techniken, die einen hohen Probendurchsatz ermöglichen, wie die hochauflösende und hochsensitive Massenspektrometrie zu denen die „matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight MS“ (MALDI-TOF MS) zählt, auch in Kombination mit Flüssigkeitschromatographie (LC-MS-MS), sowie Proteinchips und Protein-Microarrays und eine Bioinformatik, die die Datenbearbeitung und Interpretation erleichtert (34, 52).

#### **1.4.1.1 Analyse des Serumproteoms**

In den letzten Jahren konnte eine große Zahl neuer Tumorbiomarkerkandidaten bzw. Kombinationen aus mehreren Biomarkerkandidaten gefunden werden, wobei ein Schwerpunkt auf der Analyse des Serumproteoms mit Hilfe der Massenspektrometrie lag. In vielen dieser Studien wurde vor allem die MALDI-Variante SELDI-TOF MS („surface-enhanced laser desorption/ionisation - time of flight mass spectrometry“) Technologie genutzt, bei welcher zunächst ein Teil der Proteine durch eine spezifische chromatographische Chipoberfläche selektiert und anschließend

massenspektrometrisch analysiert wird. Mit ausgewählten Peaks als Tumorbiomarker konnten sehr gute Sensitivitäten und Spezifitäten von meist weit über 90% erreicht werden (36-40), die Ergebnisse müssen jedoch noch in unabhängigen Studien validiert werden. Solche tumorassoziierten Proteine bzw. Proteinpattern wurden u. a. für Brustkrebs (36), das Ovarialkarzinom (37), Lungenkrebs (38), Prostatakrebs (39) und auch für das kolorektale Karzinom (40) gefunden.

Es wurde postuliert, dass die Kenntnis der Peakidentität nicht von essentieller Bedeutung sein sollte, da die Technik direkt zur Diagnose eingesetzt werden könnte (41). Um jedoch Einblicke in die zugrunde liegenden pathologischen Vorgänge zu erhalten, ist eine Identifizierung der Peaks notwendig (37, 41, 42). Für eine unabhängige Validierung mit anderen Methoden und damit schließlich die klinische Anwendung stellt die Kenntnis der Identität ebenfalls eine wichtige Voraussetzung dar (37, 42). In den letzten Jahren sind die Bemühungen zur Identifizierung der Markerkandidaten gestiegen, inzwischen sind die Identitäten mehrerer der unterschiedlich regulierten Peptide und Proteine bekannt (37, 43, 44, 45, 46). Oft handelt es sich um relativ abundante Serumproteine oder um modifizierte Formen dieser Proteine, beispielsweise Apolipoproteine (37, 43), Transthyretin (37, 47, 48) oder die schwere Kette 4 des Inter- $\alpha$ -Trypsin-Inhibitors (37, 49). Die entdeckten Markerkandidaten zählen häufig zu den Akute-Phase-Proteinen, deren Konzentration sich während einer Entzündung über 25% ändern kann (43). Entzündungsprozesse sind kritische Komponenten der Tumorprogression, sie fördern die Proliferation, das Überleben sowie die Migration und Metastasierung (50). Solche Akute-Phase-Reaktanten können daher ein Epiphänomen eines Tumors repräsentieren, aber unspezifisch für die Tumorart sein (42). Andererseits konnten in verschiedenen Tumorarten differentiell vorliegende Isoformen nachgewiesen werden, was mit einer tumorspezifischen Enzymaktivität assoziiert zu sein scheint (49, 51).

Die Ursache für die Entdeckung abundanter Serumproteine als potentielle Marker wird in der nicht ausreichenden Sensitivität vor allem bei den auf Massenspektrometrie basierenden Technologien gesehen, da die Detektion der gering abundanten Proteine durch die Konkurrenz gegenüber den hoch abundanten Proteinen beim Binden und/ oder der Messung behindert wird (42, 53). Humanes Plasma beinhaltet in 99% der Totalproteinmenge 22 der abundantesten Proteine,

während die restlichen 1% vielleicht Hunderte bis Tausende weitere Proteine und Peptide enthalten (54). Zwischen dem hoch abundanten Albumin, welches normalerweise in Konzentrationen von 35-50 mg/ml im Plasma bzw. Serum enthalten ist, und dem am unteren Ende der bekannten gering abundanten Proteine messbaren Interleukin 6 mit einer normalen Konzentration von 0-5 pg/ml liegt ein Faktor von  $10^{10}$  (55). Der klassische Tumorbiomarker CEA liegt beispielsweise bei gesunden Personen meistens in Konzentrationen bis zu 4,6 ng/ml im Plasma bzw. Serum vor (56). Dieser extreme dynamische Bereich der Proteine kann bisher nur mit Methoden gemessen werden, bei denen die Identitäten der Analyten bekannt sind. Die heutigen Standardtechnologien zur Entdeckung unbekannter Proteine ermöglichen lediglich die Analyse eines dynamischen Bereichs von  $10^2$ - $10^4$  (55).

Um eine höhere Sensitivität für das gesamte Proteom und vor allem im Bereich der geringer abundanten Proteine im Nanogramm-pro-Milliliter-Konzentrationsbereich und darunter zu erreichen, sind Methoden zur spezifischen und effektiven Entfernung hoch abundanter Proteine entwickelt worden. Dabei stehen antikörperbasierende Methoden wegen ihrer hohen Effizienz an erster Stelle. Es existieren Entwicklungen, um 50-100 Proteine in einem Schritt zu entfernen (54). Neuere mehrdimensionale Trennungsstrategien, die mehr als 2 Dimensionen zur Fraktionierung nutzen, sollen die Analyse der gering abundanten Proteine ermöglichen (57). Um eine breite Anwendung bei der quantitativen Suche nach neuen Biomarkern zu finden, müssen bei diesen Methoden zunächst die Reproduzierbarkeit und die Selektivität kritisch betrachtet werden, wobei das Risiko besteht, potentiell interessante Proteine zu verdünnen oder zu verlieren (54, 58). Ein Nachteil, der sich aus umfangreichen Fraktionierungen ergibt, liegt in der Reduktion des Probendurchsatzes und einer steigenden Anzahl zu analysierender Fraktionen (58). Es stellt eine Herausforderung dar, den gesamten dynamischen Bereich des Serum- bzw. Plasmaproteoms zu untersuchen, gering abundante Proteine und Peptide und damit neue potentielle Biomarker detektieren zu können.

Eine weitere Problematik, die beachtet werden muss, entsteht bei der Analyse sehr großer Datenmengen, wie sie u. a. in der Massenspektrometrie produziert werden. Durch das sogenannte „overfitting“ resultieren nicht reproduzierbare Ergebnisse, wenn eine große Zahl von potentiellen Prädiktoren genutzt wird, um eine im

Verhältnis geringe Anzahl von Proben zu diskriminieren. Daher besteht die Notwendigkeit der Validierung solcher Modelle mit einer ausreichenden Anzahl unabhängiger Proben (59).

Eine andere wichtige Komponente, die berücksichtigt werden muss, betrifft die Probensammlung, Lagerung und Präparation. Von der Probennahme bis zur Analyse der Proben können multiple Faktoren das Ergebnis beeinflussen. Es muss ausgeschlossen werden können, dass die Unterschiede zwischen den analysierten Gruppen auf präanalytischen und analytischen Variablen beruhen (33, 42, 59). Beim Studiendesign kommen kritische Faktoren wie die Auswahl der Patienten und der Kontrollgruppe hinzu. Beachtet werden sollten neben vergleichbarer Alters- und Geschlechterverteilung beispielsweise auch Alkohol- und Nikotinkonsum, Erkrankungen, Medikamenteneinnahme, präoperative Maßnahmen wie eine Fastenzeit oder Anästhetika (42, 59). Die Entdeckung neuer Biomarker erfordert eine Standardisierung auf allen Ebenen, hohe Qualität der Proben, passende Kontrollen, reproduzierbare Methoden und einen effektiven Prozess zur Bestätigung der potentiellen Marker durch unabhängige Validierungsstudien (60).

#### **1.4.1.2 Analyse des Gewebeproteoms**

Ein anderer Ansatz, um spezifische Biomarker zu entdecken, basiert auf der vergleichenden Analyse von Tumor- und Normalgewebe. Neben Einblicken in die zugrunde liegenden pathologischen Mechanismen können unter den differentiell exprimierten Proteinen Markerkandidaten identifiziert werden, die sich möglicherweise mit Hilfe antikörperbasierter Techniken im Blut detektieren lassen. Solche Proteine können von Tumor- oder Stromazellen gebildet werden, in den Zellen oder im extrazellulären Raum lokalisiert sein. Auf diesem Weg konnten zum Beispiel die im Kolontumorgewebe identifizierten differentiell exprimierten Proteine Nicotinamid-N-Methyltransferase und die humanen neutrophilen Peptide in Folgestudien auch im Serum von Patienten in höheren Konzentrationen als bei gesunden Personen nachgewiesen werden (61, 62, 63).

Um möglichst homogene Gewebeproben untersuchen zu können, aber auch um spezifische Zellpopulationen im Kontext ihrer heterogenen Gewebemikroumgebung zu analysieren, wird die „Laser Capture Microdissection“ (LCM)-Technologie

eingesetzt (63, 64, 65, 66). Diese Technik ermöglicht die Separation reiner Zellpopulationen aus dem Gewebe, beispielsweise der Tumorepithelzellen oder der Stromazellen (64, 65, 67). Obwohl die Kombination von Mikrodissektion mit den derzeit verfügbaren Proteomics-Techniken noch nicht so verbreitet ist wie die Kombination mit Applikationen zur Analyse von DNA, RNA-Transkripten und zur Erstellung von cDNA-Bibliotheken, stellt sie einen möglichen Weg bei der Suche nach signifikant differentiell exprimierten Proteinen im Gewebe dar (66).

Ein besonderes Interesse entwickelte sich in letzter Zeit für das Sekretom, eine bedeutende Klasse von Proteinen, die auf dem klassischen oder dem nicht klassischen Weg sekretiert werden. Sie regulieren und kontrollieren eine große Zahl von biologischen und physiologischen Prozessen, wodurch sie eine klinisch relevante Ressource für Biomarker und therapeutische Ziele bilden (68). Zu diesen Proteinen zählen zum Beispiel Wachstumsfaktoren, die extrazelluläre Matrix degradierende Proteasen, Zellmotilitätsfaktoren, immunregulatorische Zytokine und andere bioaktive Moleküle. Sie sind durch Regulation von Zell-Zell-Kontakten und der Interaktionen zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix essentiell in den Prozess der Differenzierung, Invasion, Metastasierung und Angiogenese involviert. Durch die extrazelluläre Lokalisation erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für diese Proteine, in die Blut- oder Lymphbahn zu gelangen und dort mit Hilfe nicht invasiver Assays detektierbar zu werden (69). Eine Herausforderung bei der Analyse des Sekretoms bildet die Entwicklung geeigneter Methoden zur Untersuchung von *in vivo* Bedingungen. In den meisten Studien werden derzeit noch Zellkultursysteme genutzt, die sich aber deutlich von tatsächlichen physiologischen Situationen im Gewebe unterscheiden (69).

#### **1.4.2 Anforderungen an Studien zur Entdeckung neuer Tumorbiomarker**

In den letzten Jahren ist das Verständnis der komplexen Vorgänge der Karzinogenese gewachsen. Neue Technologien ermöglichen die Entdeckung von Biomarkerkandidaten zur Früherkennung und Risikobeurteilung. Die Suche nach sensitiven und spezifischen diagnostischen Markern wird weiterhin verfolgt, ebenso wie die Entwicklung von Strategien zur Entdeckung prädiktiver Marker, die eine personalisierte oder sogar individualisierte Therapie ermöglichen, sowie die

Identifizierung von neuen Angriffspunkten für Therapeutika. Dabei gewinnt die Standardisierung des gesamten Prozesses zunehmend an Bedeutung. Nur bei hoher Qualität der Proben, einem sorgfältig ausgearbeiteten Studiendesign und reproduzierbaren Methoden bei der Datengewinnung und -auswertung kann die Entdeckung neuer Biomarker erfolgreich verlaufen. Um das Ziel einer klinischen Anwendung zu erreichen, müssen sich die Biomarkerkandidaten in unabhängigen Studien validieren lassen und bei Bevölkerungsgruppen durchschnittlichen Risikos eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen.

## **1.5 Aufgabenstellung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entdeckung neuer Biomarkerkandidaten zur Früherkennung von Vorstufen des kolorektalen Karzinoms. Die protein-basierten Untersuchungen von Serum- und Gewebeproben sollten mit Hilfe der SELDI-TOF MS-Technologie erfolgen. Die Auswahl der Patienten bzw. der Proben sollte mit besonderer Sorgfalt und die Durchführung von der Probenentnahme bis zur Datenauswertung standardisiert erfolgen. Ein weiteres Ziel war die Identifizierung und Charakterisierung der Biomarkerkandidaten. Es war angestrebt, die potentiellen Tumorbiomarker zu validieren, was bei Verfügbarkeit geeigneter Antikörper mit immunologischen Methoden erfolgen sollte.

---

## **2 MATERIAL**

### **2.1 Probenmaterial von Patienten**

Allen Patienten wurde vor der Operation die Probenentnahme und der Zweck der Verwendung der Proben erklärt. Es wurden nur Proben von Patienten verwendet, die ihr Einverständnis hierfür gegeben hatten. Der Datenschutz wird nach gesetzlichen Vorschriften und internationalen ethischen Richtlinien gewährleistet.

#### **2.1.1 Serum**

In den beiden unabhängigen Studien wurden Serumproben von je 30 Patienten ohne Tumorerkrankung (Kontrollgruppe), je 29 Patienten mit kolorektalen Adenom und 28 bzw. 30 Patienten mit kolorektalem Karzinom des UICC Stadiums III analysiert. Aliquots der Serumproben dienten der Identifizierung der entdeckten Biomarkerkandidaten und Validierung mit antikörperbasierten Methoden. Weiterhin wurden Seren von Patienten mit Prostatakarzinom (n=30), Seren von Patientinnen mit Brustkrebs (n=30) und Seren von Patientinnen mit benigner Erkrankung der Brust (Mastopathie) (n=30) untersucht.

#### **2.1.2 Gewebe**

Für die Studie zur Entdeckung der Biomarkerkandidaten im Gewebe wurden Tumorgewebe sowie korrespondierendes Normalgewebe von 30 Adenom-Patienten und 30 Karzinom-Patienten des UICC Stadiums III untersucht. Weiterhin wurden Gewebeproben von je 3 kolorektalen Adenomen und Karzinomen der UICC Stadien I und III und Gewebeproben von malignen Tumoren von Oesophagus, Magen, Lunge, Brust und Prostata und den jeweiligen korrespondierenden Normalgeweben analysiert. Jeweils 7 Gewebeproben von kolorektalen Adenomen und Karzinomen mit korrespondierendem Normalgewebe wurden mikrodissektiert. Weitere Gewebeproben kolorektaler Adenome und Karzinome dienten der Aufreinigung und Identifizierung der Biomarkerkandidaten.

## 2.2 Zelllinien und Kultivierung

Die Zelllinie HT29 wurde zur Aufreinigung von GRP94 verwendet. Die HT29-Zellen wurden 1964 aus einem kolorektalen Adenokarzinom des Tumorstadiums II gewonnen und von der „American Type Culture Collection“ (ATCC) erworben. Die Zelllinie A413, welche aus einem kolorektalen Adenokarzinom durch Mitarbeiter der Indivumed GmbH hergestellt worden war, diente ebenfalls der Aufreinigung von GRP94.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Kulturmedium D-MEM (Gibco™ Invitrogen) mit 10% (v/v) FCS (PAA, Cölbe) und 1% (v/v) Pen/Strep (PAA, Cölbe).

## 2.3 Bakterien und Kultivierung

Für die Amplifikation von Plasmiden wurde der Bakterienstamm *E.coli* TOP10 und für die rekombinante Expression des N-terminalen GRP94-Fragmentes der Stamm *E.coli* BL21-AI™ verwendet. Die Bakterien wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

- Genotyp TOP10:  $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$
- Genotyp BL21-AI™:  $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-)gal dcm araB::T7RNAP-tetA$

Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium (Roth, Karlsruhe) oder auf LB-Agar (Roth, Karlsruhe).

## 2.4 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Invitrogen (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Qiagen (Hilden), PAA (Cölbe), Bio-Rad (München), Bruker (Bremen) und von CIPHERGEN Biosystems Inc. (Fremont, CA, USA) bezogen.



## 2.5 Peptide und Proteine

### 2.5.1 Peptid- und Proteinstandards

Der Kalibrierung des SELDI-TOF Massenspektrometers dienten Standardpeptide und –proteine, welche von CIPHERGEN Biosystems Inc. (Fremont, CA, USA) und von Bio-Rad (München) bezogen wurden. Die für die Kalibrierung des MALDI-TOF Massenspektrometers verwendeten Peptide und Proteine wurden von Bruker (Bremen) bezogen. Diese Proteine wurden ebenfalls als Kontrollproteine bei den Identifizierungsversuchen verwendet. Die bei SDS-PAGE- und Western Blot-Analysen eingesetzten Peptid- und Proteinstandards wurden von Invitrogen (Karlsruhe) und Bio-Rad (München) erworben.

### 2.5.2 Enzyme

Die folgenden Enzyme wurden verwendet:

**Tab. 1: verwendete Enzyme**

Verwendungszweck	Enzym	Hersteller
proteolytische Spaltung von Peptiden und Proteinen zur Identifizierung	Trypsin (Proteomics Grade)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	$\alpha$ -Chymotrypsin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Endoproteinase Glu-C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Subkultivierung von Zellen	Trypsin-EDTA	PAA, Cölbe
Spaltungsversuche von GRP94	Calpain II	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PCR	AmpliTaQ Gold	Roche, Mannheim
Restriktionsverdau	BamHI	NEB, Frankfurt
	EcoRI	NEB, Frankfurt
Ligation	T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt
Herstellung Bakterienlysat	Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	Benzonase	Merck, Darmstadt
Entfernung des His-Tags vom rekombinanten Fusionsprotein	Enterokinase	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.5.3 Antikörper

Folgende Antikörper und Antikörperkonjugate wurden für Antikörper ProteinChips, Immunpräzipitation und Western Blot-Analysen verwendet:

**Tab. 2: verwendete Antikörper**

Antikörper	Hersteller	Verwendungszweck	Verdünnung
anti-human Präalbumin (Transthyretin); Kaninchen (polyklonal)	DakoCytomation, Hamburg	Antikörper Proteinchip, Immunpräzipitation	0,2 µg/µl, 0,1 µg/µl
anti-gp96; Kaninchen (polyklonal)	Zymed Laboratories, Berlin bzw. Invitrogen, Karlsruhe	Western Blot-Analysen	2,5 µg/ml
anti-GRP94 (SPA-850); Ratte (monoklonal)	Stressgen; Biomol GmbH, Hamburg	Western Blot-Analysen	0,5 µg/ml
anti-GAPDH; Maus (monoklonal)	Ambion, Applied Biosystems, Weiterstadt	Western Blot-Analysen	1 µg/ml
anti-GRP94-NT, AbD06604.1	AbD Serotec, Martinsried/Planegg	Western Blot-Analysen, (ELISA)	2 µg/ml
anti-GRP94-NT, AbD06605.1	AbD Serotec, Martinsried/Planegg	Western Blot-Analysen, (ELISA)	2 µg/ml
anti-GRP94-NT, AbD06606.1	AbD Serotec, Martinsried/Planegg	Western Blot-Analysen, (ELISA)	2 µg/ml
anti-GRP94-NT, AbD07019.1	AbD Serotec, Martinsried/Planegg	Western Blot-Analysen, (ELISA)	5 µg/ml
anti-GRP94-NT, AbD07020.1	AbD Serotec, Martinsried/Planegg	Western Blot-Analysen, (ELISA)	5 µg/ml
anti-Kaninchen; HRP Konjugat	Pierce, Sankt Augustin	Western Blot-Analysen	1:10000
anti-Maus; HRP Konjugat	Pierce, Sankt Augustin	Western Blot-Analysen	1:20000
anti-Ratte; HRP Konjugat	Stressgen; Biomol GmbH, Hamburg	Western Blot-Analysen	1:10000
anti-IgG F(ab') <sub>2</sub> ; HRP Konjugat	AbD Serotec, Martinsried/Planegg	Western Blot-Analysen	1:5000

### 2.5.4 weitere Proteine

Für die Spaltungsversuche von GRP94 wurde Maus GP96 von immatics biotechnologies GmbH (Tübingen) verwendet.

## 2.6 ProteinChip Arrays und Targets

Die ProteinChip Arrays für die SELDI-TOF MS-Analysen wurden bis 2006 von Ciphergen Biosystems Inc. (Fremont, CA, USA), anschließend von Bio-Rad (München) bezogen. Die Targets für die MALDI-TOF MS-Analysen wurden von Bruker (Bremen) erworben.

## 2.7 Chromatographie- und Affinitätsmatrices, Partikel und Säulen

Für die Immunpräzipitation wurde Protein A/G Agarose von Pierce (Sankt Augustin) verwendet. Die Aufreinigung von Proteinen erfolgte mit folgenden chromatographischen Materialien:

**Tab. 3: verwendete Chromatographiematrices, Partikel und Säulen**

<b>Chromatographiematrices, Partikel und Säulen</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Aufreinigung von</b>
Q Ceramic Hyper D <sup>®</sup> F spin columns	Ciphergen Biosystems Inc., Fremont, CA, USA; Bio-Rad, München	Biomarkerkandidaten
Reverse Phase Beads RPC (Poly Beads <sup>™</sup> )	BioSeptra, Cergy, Frankreich	Biomarkerkandidaten
RPC beads Low Pressure PLRP-S Media	Polymer Laboratories GmbH, Darmstadt	Biomarkerkandidaten
Econo-Pac <sup>®</sup> High Q Cartridge	Bio-Rad, München	GRP94
Econo-Pac <sup>®</sup> High S Cartridge	Bio-Rad, München	GRP94
Econo-Pac <sup>®</sup> CHT-II Cartridge	Bio-Rad, München	GRP94

Chromatographiematrices, Partikel und Säulen	Hersteller	Aufreinigung von
Zorbax SB-C18 (Stable Bond C18), 0,5 mm x 150 mm, 5 µm Beads	Agilent, Waldbronn	Biomarkerkandidaten, rekombinantes GRP94- Fragment
mRP-C18 (Macroporous Reversed- Phase C18 Column), 0,5 mm x 100 mm	Agilent, Waldbronn	rekombinantes GRP94- Fragment

## 2.8 Protein-Gelsystem

Die SDS-PAGE-Analysen wurden mit dem Novex<sup>®</sup>- und NuPAGE<sup>®</sup>-System von Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt. Es wurden Novex<sup>®</sup> 16%ige Tris-Tricin, Novex<sup>®</sup> 18%ige Tris-Glycin, NuPAGE<sup>®</sup> Novex 10%ige Bis-Tris und 4-12%ige Bis-Tris Gele mit den jeweiligen Puffersystemen verwendet.

## 2.9 Substrate bei der Chemilumineszenz-Methode

Als Substrate für die HRP dienten SuperSignal<sup>®</sup> West Pico oder Dura Chemiluminescent (Pierce, Sankt Augustin).

## 2.10 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von TIB MOLBIO Syntheselabor GmbH (Berlin) synthetisiert.

Tab. 4: verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5'-3')	Schnittstellen
GRPf2 (sense Primer)	CGCGGATCCGACGATGAAGTTGATGTGGATGG	BamHI
GRPr2 (antisense Primer)	CCGCGAATTCTTAAGCATCAGAAGCATTGAAATCAGTTC	EcoRI

## 2.11 Vektoren

Folgende Vektoren wurden verwendet:

**Tab. 5: verwendete Vektoren**

Vektor	Hersteller	Verwendung
pDEST17-D18/ Ins.GRP94	RZPD, Berlin	Expressionsvektor mit Teilen der GRP94-Sequenz; verwendet als PCR- Template
pCRII/Ins.18S	lag bei der Individumed GmbH vor	pCRII mit dem Insert humane 18S DNA
pCRII <sup>®</sup> -TOPO <sup>®</sup>	Invitrogen, Karlsruhe	Bestandteil des „TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit“ zur Klonierung von PCR-Produkten
pRSET A	Invitrogen, Karlsruhe; zur Verfügung gestellt von P. Ziegelmüller (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg)	Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>

## 2.12 DNA-Standards

Der Größenabschätzung von DNA-Fragmenten nach Agarose-Gelelektrophorese diente der 1 kb DNA Standard von Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

## 2.13 Kits

In dieser Arbeit wurde mit folgenden kommerziell erhältlichen Kits gearbeitet:

**Tab. 6: verwendete Kits**

Kit	Hersteller
C3a EIA Kit	Quidel, San Diego, CA, USA
Serum Fractionation Kit / Q HyperD resin	Ciphergen Biosystems Inc., Fremont, CA, USA
Profiling Kit 100 MB- HIC 8	Bruker, Bremen
ProteinChip Antibody Capture Kit	Ciphergen Biosystems Inc., Fremont, CA, USA

Kit	Hersteller
Protein MW Standards Kit	Ciphergen Biosystems Inc., Fremont, CA, USA
TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen, Karlsruhe
GenElute <sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAexpress <sup>®</sup> Ni-NTA Fast Start Kit	Qiagen, Hilden

## 2.14 Plastikmaterialien

Plastikmaterialien wurden von Eppendorf (Hamburg), Corning (Corning, NY, USA) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

## 2.15 Geräte

Für die Analysen wurden folgende Geräte verwendet:

**Tab. 7: verwendete Geräte:**

Gerätebezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	A&D Engineering, Milpitas, CA, USA
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Bühler Schüttler mit Inkubationshaube	J. Otto GmbH, Hechingen
CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank Inkubator Hera Cell 150	Thermo Life Science, Frankfurt
Digital Graphik Printer UP-D895	Sony; Berlin
Durchlichtmikroskop	Carl Zeiss Jena AG, Jena
Eppendorf Research <sup>®</sup> Pipette variabel (0,1-2,5 µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research <sup>®</sup> Pipette variabel (0,5-10 µl)	Eppendorf; Hamburg
Eppendorf Research <sup>®</sup> Pipette variabel (2-20 µl)	Eppendorf; Hamburg
Eppendorf Research <sup>®</sup> Pipette variabel (20-200 µl)	Eppendorf; Hamburg

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Eppendorf Research® Pipette variabel (100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage BP 110 S	Sartorius, Göttingen
Finnpipette	Thermo Scientific, Langenselbold
FLUOstar Optima	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Geldokumentation® Raytest, Diana II Kamera	Isotopen Messgeräte GmbH; Straubenhardt
Heizblock HTM 130	HLP, Bovenden
Kapillar HPLC 1200	Agilent, Waldbronn
MACSmix	Miltenyi, Bergisch Gladbach
autoflex III MALDI-TOF/TOF	Bruker, Bremen
PALM R MICROBEAM/ Axiovert 200	Carl Zeiss MicroImaging, München
PCR-Gerät iCycler	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
pH-Meter SevenEasy	MettlerToledo, Greifensee, Schweiz
Pipettierhilfe „Pipettus“	VWR International, Hamburg
Power Supply: Power Pac 300	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
ProteinChip SELDI System, Model PBSII	Ciphergen Biosystems Inc., Fremont, CA, USA
PROTEINEER fc II	Bruker, Bremen
Schüttler MicroMix 5	DPC-Biermann, Bad Nauheim
Schüttler Promax 1020	Heidolph, Schwalbach
Schüttler Promax 150	Heidolph, Schwalbach
Sterilwerkbank HERAsafe KS	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Stickstofftonne, groß Arpege 170	Air Liquide Kryotechnik GmbH, Düsseldorf
Stickstofftonne, klein KGW Isotherm	Roth, Karlsruhe
Trockenschrank ED 53	Binder GmbH, Tuttlingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Digitec	Bandelin, Berlin
Vakuum Zentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Vortexer REAXtop	Heidolph, Schwalbach
Wasserbad GFL® 1083	GFL, Burgwedel

Gerätebezeichnung	Hersteller
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415 R, kühlbar	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 1645	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich, Tuttlingen

## 2.16 Gefahrstoffliste

Die folgenden Gefahrstoffe wurden entsprechend ihrer Gefahreneinstufung und den R- und S-Sätzen verwendet und nach Abschluss der Analysen entsorgt:

Tab. 8: Gefahrstoffliste

Substanzbezeichnung / Handelsname	Gefahren symbol	R- und S-Sätze	
Aceton	F, Xi	R 11-36-66-67	S (2)-16-26-46
Acetonitril	F, Xn	R 11-20/21/22-36	S (1/2)-16-36/37
Ameisensäure	C	R 35	S (1/2)-23-26-45
Ammoniumhydrogencarbonat	Xn	R 22	S -
Bicinchoninicsäure-Lsg.	-	R 36	S 26-36
Bis-Tris	Xi	R 36/37/38	S 26-36
Calciumchlorid	Xi	R 36	S 22-24
CHAPS	T	R 36/37/38-61	S 26-36/37/39-45
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (CHCA; Zimtsäure)	Xi	R 36/37	S 22-24/25- 36/37/39-38
Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Xi	R 36/37/38	S 26-36
Dinatriumcarbonat	Xi	R 36	S 22/26
Dinatrium-EDTA	Xn	R 22	S 2-4
3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-zimtsäure (SPA; Sinapinsäure)	Xi	R 36/37/38	S 26-36
Dithiothreitol	Xn	R 22-36/38	S 22-36/37/39



Substanzbezeichnung / Handelsname	Gefahren symbol	R- und S-Sätze	
DMSO	Xi	R 36/38	S 26
Eosin Y	F, Xn	R 11-20/21/22- 68/20/21/22	S 16-36/37-45
Essigsäure	C	R 10-35	S 23-26-45
Ethanol	F	R 11	S 7-16
Flüssigstickstoff	-	R -	S 9-23-26
Formaldehyd 37%	T	R 23/24/25-34-40-43	S (1/2)-26- 36/37/39-45-51
Formalin 4%	T	R 20/21/22-40-43	S 36/37
Glutaraldehyd 25%	T, N	R 23/25-34-42/43-50	S (1/2)-26- 36/37/39-45-61
Hämatoxylin	Xi	R 36/37/38	S 26-36
Imidazol	C	R 22-34	S 22-26-36/37/39- 45
Iodacetamid	T	R 25-42/43	S 22-36/37-45
Isopropanol	Xi, F	R 11-36-67	S 7-16-24/25-26
Kupfersulfat	Xn, N	R 22-36/38-50/53	S 22-60-61
Magnesiumchlorid	Xi	R 36/37	S 26-39
Methanol	F, T	R 11-23/24/25- 39/23/24/25	S 7-16-36/37-45
β-Mercaptoethanol	T	R 22-24-34-51/53	S 26-36/37/39-45- 61
Natriumcarbonat	Xi	R 36	S (2)-22-26
Natriumcitrat	-	-	S 25
Natriumdithionit	Xn	R 7-22-31	S (2)-7/8-26-28-43
Natriumhydrogencarbonat	Xi	R 36	S 22/26
Natriumhydroxid	C	R 35	S 26-37/39-45
Natriumphosphat	Xi	R 36/37/38	S 26
Penicillin G und Streptomycinsulfat	Xn und T	R 42/43 und R 61-22	S36 und S 45- 36/37/39-22

Substanzbezeichnung / Handelsname	Gefahren symbol	R- und S-Sätze	
Phenol	T,C	R 23/24/25-34- 48/20/21/22-68	S 24/25-26-28- 36/37/39-45
Roti <sup>®</sup> -Histokitt II	Xn	R 10-20/21-38	S25-36/37
Salzsäure 37%	C	R 34-37	S 26-36/37/39-45
Silbernitrat		R 8-34-50/53	S (1/2)-26- 36/37/39-45-60-61
SuperSignal <sup>®</sup> West Pico, Dura	Xn	R 22	S -
Trifluoressigsäure (TFA)	C	R 20-35-52/53	S (1/2)-9-26-27-28- 45-61
Triiodothyronin	Xn	R 20/21/22	S 36
Tris	Xi	R 36/38	S 26
Triton X-100	Xn	R 22-41	S 26-36-23
Trypanblau-Lösung 0,4%	T	R 45	S 53-45
Trypsin	Xn	R 42	S 22
Xylol	Xn	R 10-20/21-38	S 25

---

## **3 METHODEN**

### **3.1 Gewinnung des Probenmaterials**

#### **3.1.1 Auswahl der Patienten**

Die Auswahl der Patienten erfolgte unter Berücksichtigung einer statistischen Gleichverteilung von Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum, „body-mass-index“ (BMI), metabolischen Erkrankungen (z.B. Diabetes) und Prämedikation zwischen den analysierten Gruppen. Die Fastenzeiten vor den Operationen waren vergleichbar (16 Stunden). Patienten mit anderen Tumorerkrankungen neben der untersuchten Tumorerkrankung, sowohl akut als auch in der Vergangenheit, wurden ausgeschlossen. Die Patienten der Kontrollgruppe hatten sich aufgrund eines Leistenbruchs bzw. wegen Gallenblasensteinen oder chronischer Divertikulitis ebenfalls einer Operation unterziehen müssen. Sie besaßen weder Symptome von kolorektalen Adenomen oder Karzinomen, noch litten sie in der Vergangenheit daran.

#### **3.1.2 Serumproben**

Die Blutproben wurden kurz nach dem Operationsbeginn entnommen und durch Mitarbeiter der Indivumed GmbH unter sofortiger Kühlung nach einer standardisierten Vorgehensweise („Standard Operating Procedure“) innerhalb von 4 Stunden zu Serum aufgearbeitet. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.1.3 Gewebeproben**

Die Gewebeproben wurden nach der operativen Entfernung des Darmgewebes durch Mitarbeiter der Indivumed GmbH entnommen und in flüssigem Stickstoff konserviert. Die kalte Ischämiezeit der verwendeten Gewebeproben betrug maximal 12 Minuten.

## 3.2 Massenspektrometrische Methoden

### 3.2.1 SELDI-TOF MS

Eine Methode zur Untersuchung des Proteoms stellt die Analyse mit Hilfe der SELDI-TOF MS („surface-enhanced laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry“)-Technologie dar, eine Variante der MALDI-TOF MS („matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry“). Im Gegensatz zur MALDI-TOF MS, bei der inerte Metalloberflächen eingesetzt werden, beruht das Prinzip der SELDI-TOF MS auf einer chromatographischen Anreicherung von Peptiden und Proteinen basierend auf ihren biochemischen Eigenschaften auf den Chipoberflächen. Im nachfolgenden Schritt werden die immobilisierten Peptide und Proteine mit Matrixmolekülen kokristallisiert, durch Beschuss mit einem Laser desorbiert und ionisiert, im elektrischen Feld beschleunigt und deren Flugzeit, welche von Masse (und Ladung) abhängig ist, bestimmt. Durch Messung von Peptiden und Proteinen bekannter Masse kann nach Kalibrierung die ermittelte Flugzeit zur Bestimmung der molekularen Masse eingesetzt werden. Die Peakauflösung der SELDI-TOF MS liegt bei ca. 600 und die Massengenauigkeit beträgt ungefähr 1000 ppm. Das für jede Probe charakteristische Spektrum wurde durch bioinformatische Programme ausgewertet (ProteinChip Data Analysis Program, Biomarker Wizard Program, Biomarker Patterns Software, Ciphergen Biosystems Inc., Fremont, CA, USA).

#### 3.2.1.1 Präparation der ProteinChip® Arrays

Es wurden folgende Chiptypen verwendet (Ciphergen Biosystems Inc., Fremont, CA, USA und ab 2006 Bio-Rad, München):

**Tab. 9: verwendete ProteinChip® Arrays**

ProteinChip® Array	chromatographische Oberfläche	Verwendung
CM10 ProteinChip® Array	negativ geladene Carboxylgruppen, schwacher Kationenaustauscher	Studie zur Entdeckung von Biomarkern im Serum („profiling“), Analyse nach Fraktionierungen, Analyse nach Immunpräzipitation

<b>ProteinChip® Array</b>	<b>chromatographische Oberfläche</b>	<b>Verwendung</b>
Q10 ProteinChip® Array	positiv geladene quaternäre Amine, starker Anionenaustauscher	Studie zur Entdeckung von Biomarkern im Gewebe („profiling“), Analyse von mikrodisektierten Gewebeproben und Zelllysaten, Analyse nach Fraktionierungen
NP20 ProteinChip® Array	Normal-Phasen-Chromatographie mit Silikat-Funktionalität	Analyse nach Fraktionierungen, Analyse nach Gelelution, Analyse nach proteolytischen Spaltungen
PG20 ProteinChip® Array	rekombinantes Protein G gebunden an präaktivierte Oberfläche mit Epoxid-Funktionalität	Bestandteil des „ProteinChip Antibody Capture Kit“
Gold ProteinChip® Array	keine chromatographische Oberfläche	Analyse nach HPLC-Fraktionierungen, Analyse nach Umpuffern mit HIC- Beads

Für die Studien zur Entdeckung von Biomarkern („profiling“), die Analyse von mikrodisektierten Gewebeproben sowie von Zelllysaten und die Analyse der Immunpräzipitation wurden die jeweiligen ProteinChip® Arrays in einen Bioprozessor eingespannt, der die Verwendung von Puffer- und Probenvolumina bis zu 250 µl je Spot ermöglichte. Der Vorteil des Bioprozessors gegenüber einer direkten Auftragung „on Spot“ bestand in der höheren Reproduzierbarkeit durch die Verwendung größerer Volumina, insbesondere bei der automatisierten Präparation. Die Proben wurden in Doppelbestimmungen präpariert und vermessen. Für alle anderen Anwendungen, vor allem die Analyse nach Fraktionierungen, wurde die „on-Spot“ Präparation bevorzugt, da hier nur sehr geringe Probenvolumina von 1-2 µl benötigt wurden. Alle Präparationen wurden nach Angabe des Herstellers mit folgenden Puffern und folgender Matrix durchgeführt:

Tab. 10: verwendete Puffer bei der Präparation der ProteinChip® Arrays

ProteinChip® Array	CM10	Q10	NP20
<b>Äquilibrieren</b>	„CM10 binding buffer“ (CIPHERGEN Biosystems Inc., Fremont, CA, USA) oder 100 mM Natriumacetat pH 4	100 mM Tris-HCl pH 7,5	H <sub>2</sub> O (für HPLC)
<b>Binden</b>	„CM10 binding buffer“ (CIPHERGEN Biosystems Inc., Fremont, CA, USA) oder 100 mM Natriumacetat pH 4	100 mM Tris-HCl pH 7,5 oder Probe in „LP50“ unverdünnt	Probe unverdünnt
<b>Waschen 1</b>	„CM10 binding buffer“ (CIPHERGEN Biosystems Inc., Fremont, CA, USA) oder 100 mM Natriumacetat pH 4	100 mM Tris-HCl pH 7,5	H <sub>2</sub> O (für HPLC)
<b>Waschen 2</b>	H <sub>2</sub> O (für HPLC)	H <sub>2</sub> O (für HPLC)	H <sub>2</sub> O (für HPLC)
<b>Matrix</b>	2 x 1 µl SPA		

Die Präparation des PG20 ProteinChip® Array wurde wie in der Anleitung des „ProteinChip Antibody Capture Kit“ beschrieben, durchgeführt. Auf den Gold ProteinChip® Array wurde ein Proben-Matrix-Gemisch (1 Teil Probe + 1 Teil Matrix) aufgetragen.

Als Matrix für alle SELDI-TOF MS Anwendungen diente Sinapinsäure (SPA), welche von CIPHERGEN Biosystems Inc. (Fremont, CA, USA) und ab 2006 von Bio-Rad (München) bezogen wurde. Um eine Endkonzentration von 12,5 mg/ml zu erhalten, wurden 200 µl 100% Acetonitril und 200 µl 1% (v/v) TFA zugegeben, für 5 min auf einem Vortexer geschüttelt und anschließend für 2 min bei 16000 x g zentrifugiert. Die Matrix wurde für die Studien täglich frisch präpariert und im Dunkeln gelagert.

Die ProteinChip® Arrays wurden innerhalb von 24 Stunden vermessen. Während der Studienphasen wurden alle Chips innerhalb von 5 Tagen präpariert und gemessen, wobei jeder Chip über Nacht gelagert wurde. Eine randomisiert verteilte, auf jedem Chip mitgeführte Kontrolle (Pool aus Seren bzw. Gewebelysaten) diente der Berechnung des Variationskoeffizienten.

### **3.2.1.2 SELDI-TOF MS-Analyse**

Die Massenspektren wurden mit dem CIPHERGEN ProteinChip Reader (Model PBSII) (CIPHERGEN Biosystems Inc., Fremont, CA, USA) aufgenommen. Die Kalibrierung erfolgte mit dem Protein MW Standards Kit (CIPHERGEN Biosystems Inc., Fremont, CA, USA). Für jedes Spektrum wurden 195 Laserschüsse gesammelt. Die Laserintensität und die Detektorsensitivität wurden den jeweiligen Proben angepasst und während einer Studie nicht verändert.

### **3.2.2 MALDI-TOF MS und MALDI-TOF/TOF MS**

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie basiert auf dem unter 3.2.1 für die SELDI-TOF Massenspektrometrie beschriebenen Funktionsprinzip. Die Unterschiede bestehen u.a. in der Probenpräparation und in dem längeren Flugrohr des MALDI Gerätes. Die Proben werden auf eine inerte Metalloberfläche, das sogenannte Target, aufgetragen. Chromatographische Auftrennungen der Peptide und Proteine müssen vorher, z.B. durch Beads oder die HPLC, erfolgen. Durch die ebene Oberfläche des Targets und die längere Flugstrecke werden mit der MALDI-TOF MS eine höhere Peakauflösung und eine größere Massengenauigkeit im Vergleich zur SELDI-TOF MS erreicht. Das verwendete Gerät „autoflex III“ (Bruker, Bremen) ermöglicht die Analyse von Peptiden und Proteinen im linearen Modus mit einer Auflösung von 600-1000 und Massengenauigkeit von 100-300 ppm. Weiterhin können Peptide bis 4000 Da im Reflektor-Modus mit einer Auflösung von 14000-20000 und einer Massengenauigkeit von 5-20 ppm analysiert werden. Der Reflektor-Modus eignet sich somit zur Messung von Peptidfragmenten nach sequenzspezifischer Proteolyse, um Proteine durch „Peptide Mapping“ zu identifizieren. Eine weitere Funktion, die sogenannte (LIFT™) TOF/TOF-Technologie, ermöglicht nach der Selektion eines

Peptids die Analyse der Massen von Fragmentationen dieses Peptids. Dabei werden diese durch Anheben der Spannung erneut beschleunigt und ihre Flugzeit bestimmt.

Die Einstellung aller Messparameter und die Messung selbst erfolgten mit dem Programm „flexControl™“ (Bruker, Bremen), die Analyse der Spektren in „flexAnalysis™“ (Bruker, Bremen). HPLC-Fraktionierungen wurden mit Hilfe des Programms „WARP-LC“ und „ClinProTools“ (Bruker, Bremen) analysiert. Die „Peptide Mapping“- und die Sequenzanalysen wurden mit Hilfe des Programms „BioTools“ (Bruker, Bremen) durchgeführt.

### 3.2.2.1 Matrix- und Probenpräparation auf den Targets

Für die MALDI-TOF MS-Analysen wurden das „Polished steel“ und der „AnchorChip 800 µm“ Targets (Bruker, Bremen) verwendet. Der „AnchorChip 800 µm“ besitzt einen hydrophilen Anker, durch welchen die Proben konzentriert werden und so die Empfindlichkeit von Probenmessungen erhöht wird.

#### **Reinigung der Targets**

Die Targets wurden intensiv unter heissem Wasser gereinigt und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Danach wurden sie in einem Ultraschallbad für mindestens 10 min mit 50% (v/v) Methanol/5% (v/v) Essigsäure gereinigt. Anschließend wurden sie mehrmals mit 100% Aceton, danach mit 100% Methanol abgewischt, schließlich mit 100% Methanol gespült und getrocknet.

#### **Präparation**

Es wurden die folgenden Matrices verwendet:

**Tab. 11: verwendete Matrices**

<b>Name der Matrix</b>	<b>Einsatzmöglichkeit</b>	<b>Verwendung</b>
α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (Zimtsäure, CHCA)	geeignet für Peptide und Proteine von 800 bis 10000 Da	Identifizierungsversuche p4835



Name der Matrix	Einsatzmöglichkeit	Verwendung
Dihydroxybenzoesäure (DHB)	geeignet für Peptide und Proteine von 800 bis 10000 Da, robust gegenüber Salzen und Verunreinigungen	Identifizierungsversuche p4835
3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-zimtsäure (Sinapinsäure, SPA)	geeignet für größere Peptide und Proteine von 2500 bis 100000 Da	Analyse der Fraktionierungen

Um Zimtsäurematrix (gesättigte Lösung) herzustellen, wurden 50 mg CHCA mit 250 µl 100% Acetonitril und 250 µl 1% (v/v) TFA versetzt und unter Schütteln für mindestens 10 min und zusätzlich im Ultraschallbad für 5 min gelöst. Nach Zentrifugation bei 16000 x g für 1 min wurde die gesättigte Matrixlösung abgenommen. Die Matrix wurde im Dunkeln gelagert und war mindestens 3 Tage haltbar. 1 Teil Probe wurde mit 1 Teil CHCA-Matrix gemischt, 1 µl auf das „Polished steel target“ aufgetragen und getrocknet („Dried droplet“-Methode). Alternativ wurde eine Dünnschichtpräparation mit CHCA-Matrix auf dem „AnchorChip 800 µm“ verwendet. Hierfür wurde zunächst eine gesättigte CHCA-Matrixlösung in Aceton hergestellt. Anschließend wurden 97 µl dieser Matrixlösung mit 3 µl 10 mM Ammoniumphosphat monobasisch/0,1% (v/v) TFA Puffer versetzt, um eine 97 %ige CHCA-Matrixlösung zu erhalten. 10 µl dieser Matrixlösung wurden durch rasches Verteilen auf den Anker aufgebracht. Nach der Kristallisation der Matrix wurden 1-3 µl Probe auf den Anker aufgetragen. Dabei musste je nach Probenzusammensetzung empirisch ermittelt werden, ob das Eintrocknen der Proben auf der Matrixoberfläche oder das Entfernen des Probenvolumens die qualitativ besten Spektren ergab. Anschließend wurden die Ankerspots 2 x mit 4 µl 10 mM Ammoniumphosphat monobasisch/0,1% (v/v) TFA Puffer gewaschen und getrocknet, um Salzaddukte zu entfernen.

Für die Herstellung von DHB-Matrix wurde DHB (Bruker, Bremen) in einer Endkonzentration von 10 mg/ml in 50% (v/v) Acetonitril/0,5% (v/v) TFA oder in HPLC-Wasser gelöst. 1 Teil Probe wurde mit 1 Teil DHB-Matrix gemischt, 1 µl auf einen „AnchorChip 800 µm“ aufgetragen und getrocknet. Die Peptide reichern sich im äußeren Bereich des Ankers an und können dort am besten gemessen werden,

während Salze und andere Kontaminationen im innereren Bereich des „AnchorChips“ verbleiben.

Die Sinapinsäurematrix wurde in einer Endkonzentration von 10 mg/ml in 50% (v/v) Acetonitril/ 0,5% (v/v) TFA eingesetzt. Zum Lösen der Sinapinsäure wurde die Matrixlösung unter Schütteln für mindestens 10 min gelöst. Die Matrix wurde im Dunkeln gelagert und war mindestens 1 Tag haltbar. 1 Teil Probe wurde mit 1 Teil SPA-Matrix gemischt, 1-1,5 µl auf das „Polished steel target“ aufgetragen und getrocknet. Nach dem Trocknen konnte durch zusätzliches Auftragen des Proben-Matrix-Gemisches die Detektion verstärkt werden. Die analytischen HPLC-Fractionen wurden unter direkter Zugabe von SPA-Matrix in den HPLC-Fluss mit Hilfe des LC-MALDI Fraktionssammlers „PROTEINEER fc II“ (Bruker, Bremen) auf ein „Polished steel“ Target gespottet.

### 3.2.2.2 MALDI-TOF MS-Analyse: linearer Modus

Die Analyse von Fraktionierungen wurde im linearen Modus des MALDI-Gerätes durchgeführt. Dieser Modus wurde ebenfalls zur Kontrolle der proteolytischen Verdauung verwendet, um die Peptide und Proteine mit Molekulargewichten über 3000 Da zu detektieren. Die Kalibrierung erfolgte durch den ClinProt Standard (CPS, Zusammensetzung Tabelle 12; Bruker, Bremen). Es wurden in der Regel 3000 Laserschüsse pro Probenposition aufsummiert, um ein Durchschnittsspektrum zu generieren. Die Instrumentenparameter wurden ausgehend von den Grundeinstellungen des Herstellers nur geringfügig geändert, um eine möglichst hohe Peakintensität bei hoher Auflösung zu erzielen. Die Peakauflösung wurde dabei für den Massenbereich zwischen 4-12 kDa optimiert.

**Tab. 12: Zusammensetzung des ClinProt Standards**

<b>Substanz</b>	<b>durchschnittliche Masse (M+H)<sup>+</sup></b>
Angiotensin II	1047,18
Angiotensin I	1297,48
Substanz P	1348,64
Bombesin	1620,86

<b>Substanz</b>	<b>durchschnittliche Masse (M+H)<sup>+</sup></b>
ACTH clip 1-17	2094,42
ACTH clip 18-39	2466,68
Somatostatin 28	3149,57
Insulin	5734,56
Ubiquitin	8565,89
Cytochrom C	12360,97
Myoglobin	16952,31

### **3.2.2.3 MALDI-TOF MS-Analyse: Reflektor-Modus**

Die Analyse der proteolytischen Verdauung wurde im Reflektor-Modus des MALDI-Gerätes durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte durch den „Peptide Calibration Standard“ (Bruker, Bremen). Alle Parameter wurden den jeweiligen Proben angepasst.

### **3.2.2.4 MALDI-TOF/TOF MS-Analyse: LIFT™-Modus**

Neben der Analyse von Peptidfragmenten nach sequenzspezifischer Proteolyse („Peptide Mapping“) konnten Proteine auch durch eine Analyse der Fragmentationen eines selektierten Peptids identifiziert werden. Diese Methode beruht auf dem physikalischen Phänomen des „post-source-decay“ (PSD). Durch PSD kommt es zur Entstehung von Peptidbrüchen und damit zu Peptidfragmenten während die Peptide die Flugröhre des MALDI durchqueren. Die entstehenden PSD-Fragmente können statistisch an verschiedenen Stellen des Peptidrückgrates entstehen und ihre Massenabfolge zur Aufklärung der Primärsequenz eines Peptids eingesetzt werden. Der LIFT-Modus des verwendeten MALDI Geräts erlaubt über einen Ionenselektor die gezielte Selektion eines bestimmten Ions (Vorläuferion) zusammen mit seinen Bruchstücken. Durch Nachbeschleunigung in der sogenannten LIFT-Zelle werden dann nachfolgend die Fragmente vom Vorläuferion getrennt und können mit ihren genauen Massen detektiert werden. Das entstandene Massenspektrum wurde mit Datenbanken abgeglichen und zur Identifizierung eingesetzt.

### **3.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.3.1 Herstellung von Gewebelysaten aus stickstofffixierten Gewebeproben**

##### **3.3.1.1 Herstellung von Kryostatschnitten**

Die in Flüssigstickstoff konservierten Gewebeproben wurden mit Hilfe von Gewebekleber (Cryoembedding Compound; Microm, Walldorf) auf den Auffrierstempel aufgefroren und in den Kryostaten eingespannt. Nach dem Anschnitt wurde ein Kontrollschnitt von 6 µm hergestellt und auf einen Objektträger aufgezo- gen, 2 min getrocknet und anschließend in Formalin fixiert. Der Kontrollschnitt wurde einer HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) unterzogen und diente der mikroskopischen Kontrolle sowie dem Abschätzen des Tumoranteils der Schnitte. Anschließend wurden Gewebeschnitte von 20 µm Dicke hergestellt und jeweils 8 Schnitte in ein mit eiskaltem 500 µl DPBS/Complete gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

---

Dulbecco's-PBS (DPBS) ohne Ca/ Mg (steril) (PAA, Cölbe)

Complete Mini (EDTA-free) (Roche, Mannheim)

---

##### **3.3.1.2 Färbung von Kryo-Gewebeschnitten mit Hämatoxylin und Eosin (HE) und Mikroskopie**

Durch HE-Färbungen werden Gewebestrukturen erkennbar gemacht. Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen blau an, insbesondere die Zellkerne. Durch Eosin werden alle acidophilen Strukturen angefärbt, so dass vor allem das Zytoplasma und die Zellzwischenräume rötlich/rosa erscheinen.

Die Kontrollschnitte wurden nach mindestens 2-minütiger Inkubation in 4% phosphatgepuffertem Formaldehyd in destilliertem Wasser gespült und anschließend in 250 ml Hämatoxylin (Sigma, Taufkirchen) für 8-10 s gefärbt. Die Schnitte wurden kurz mit destilliertem Wasser gespült und danach 1-2 min in Leitungswasser zur Bläuung der Schnitte gewässert. Anschließend erfolgte die Färbung für 8-10 s in 250 ml Eosin Y mit Phloxin (Sigma, Taufkirchen). Die Schnitte wurden in destilliertem Wasser gespült, 5-10 s in 80% (v/v) Ethanol, 1 min in 96% (v/v) Ethanol und 1 min in

100% Ethanol entwässert. Nach mindestens 2 min in Xylol wurden die Schnitte mit Eindeckmittel und Deckglas eingedeckt und konnten daraufhin mikroskopiert werden. Neben der allgemeinen mikroskopischen Kontrolle der Schnitte bzw. der Gewebe wurden das Tumor/Stromaverhältnis und der Anteil des Muskelgewebes bestimmt.

### **3.3.1.3 Färbung von Kryo-Gewebeschnitten mit Kresylviolett**

Durch Färbungen mit Kresylviolett werden die Zellkerne violett angefärbt. Diese Färbung wurde verwendet, wenn aus den Gewebeschnitten Zellverbände durch Mikrodissektion isoliert werden sollten (Kapitel 3.3.4).

Mit einem Kryostaten wurden 10 µm Gewebeschnitte hergestellt und auf einen mit einer PEN-Membran versehenen Objektträger (MembranSlide 1.0 PEN; Carl Zeiss MicroImaging, München) aufgezogen. Der Objektträger wurde in eisgekühlten 70%igen (v/v) Ethanol überführt und für 1 min inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 1-3 min in 1%iger (w/v) Kresylviolettlösung gefärbt, für 30 s in 70% (v/v) Ethanol und für 30 s in 100% Ethanol gewaschen. Nach 2-minütigem Trocknen der Schnitte wurden die Objektträger in Aluminiumfolie verpackt, in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei -80°C gelagert.

---

#### **1%ige (w/v) Kresylviolettlösung**

0,5 g Kresylviolettacetat

50 ml 50% (v/v) Ethanol

filtrieren

---

### **3.3.1.4 Herstellung von Lysaten aus Kryo-Gewebeschnitten**

Die in DPBS/Complete vorliegenden Gewebeschnitte wurden kurz auf einem Vortexer geschüttelt und anschließend für 5 min bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl DPBS/Complete aufgenommen und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 100-150 µl eiskaltem Lysispuffer resuspendiert, mit einem Vortexer gemischt und auf Eis inkubiert. Nach 20 min wurde für 1 min mit einem Vortexer gemischt und nochmals 20 min auf Eis inkubiert. Die lysierten Gewebeproben wurde erneut für 1 min mit einem Vortexer gemischt und die DNA

sowie nicht lysierte Gewebeschnittreste für 10 min bei 16000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand enthielt den Gewebezelleextrakt, welcher aliquotiert und bei -80°C gelagert wurde.

---

**Lysispuffer „LP50“**

20 mM Tris-HCl

50 mM NaCl

0.5% (v/v) Triton X-100

1x Complete (EDTA-free) (Roche, Mannheim)

pH 7,2

---

Für die Untersuchungen zur inhärenten Spaltung von GRP94 wurde der Lysispuffer ohne Proteaseinhibitoren (Complete) verwendet.

**3.3.2 Herstellung von Gewebelysaten aus frisch präparierten Gewebeproben**

Zunächst wurde aus dem Gewebe eine Zellsuspension nach dem Protokoll aus der Dissertation von A. Sprüssel (152) gewonnen. Nach dem Pelletieren der Zellen wurden diese in einem von der Größe des Zellpellets abhängigen Volumen eiskaltem Lysispuffer solubilisiert, mit einem Vortexer gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Hierfür wurde der Lysispuffer „LP50“ ohne Proteaseinhibitoren (Complete) verwendet, da die Lysate den Untersuchungen zur inhärenten Spaltung von GRP94 dienen. Die DNA und nicht lysierte Gewebereste wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 16000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand enthielt den Gesamtzelleextrakt.

**3.3.3 Herstellung von Zellextrakten**

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von den Kulturschalen abgelöst und bei 600 x g für 5 min sedimentiert. Das Pellet wurde in eiskaltem DPBS/Complete resuspendiert und für 5 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in einem von der Größe des Zellpellets abhängigen Volumen eiskaltem Lysispuffer „LP75“ solubilisiert, mit einem Vortexer gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 16000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand enthielt den Gesamtzelleextrakt.

---

**Lysispuffer „LP75“**

20 mM Tris-HCl

75 mM NaCl

0.5% (v/v) Triton X-100

1x Complete (Roche, Mannheim)

pH 8,3

---

**3.3.4 Isolierung von Zellverbänden aus Gewebeschnitten durch Mikrodissektion**

Aus Gefrierschnitten von Normal- und Tumorgewebe wurden mit Hilfe der LCM (Laser Capture Microdissection)-Technologie mit einem Laser unter mikroskopischer Kontrolle Epithelzellen, Stromazellen und Immunzellen isoliert.

Die kresylviolett gefärbten und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Schnitte (Kapitel 3.3.1.3) wurden aufgetaut und die Objektträger sowie ein  $500\ \mu\text{l}$  „AdhesiveCap“ (Carl Zeiss MicroImaging, München) in das Laser-Mikrodisektionsgerät (Axiovert 200/ PALM R MICROBEAM, Carl Zeiss MicroImaging, München) eingespannt und ausgerichtet. Die Zellverbände wurden zunächst mit Hilfe der zugehörigen Software (PALM-Robosoftware, Carl Zeiss MicroImaging, München) markiert und anschließend mit Hilfe eines Lasers herausgeschnitten und in den Deckel eines „AdhesiveCaps“ katapultiert. Für die Analyse der einzelnen Kompartimente jeder Gewebeprobe (Normalgewebe: Epithel, Stroma und Immunzellen; Tumorgewebe: Epithel, Stroma und Immunzellen) wurde eine Fläche von jeweils  $1000000\ \mu\text{m}^2$  isoliert. Die isolierten Zellverbände im Deckel des „AdhesiveCaps“ wurden mit  $10\ \mu\text{l}$  Lysispuffer „LP50“ überschichtet und bei  $10000\ \times\ g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, bis sich alle ausgeschnittenen Elemente am Boden des „AdhesiveCaps“ befanden. Die Zellen wurden durch eine Inkubation im Ultraschallbad (dreimal 5 min), eine 30-minütige Inkubation auf Eis und anschließendes Durchmischen mit Hilfe eines Vortexers lysiert. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur massenspektrometrischen Analyse mittels SELDI-TOF MS unter Verwendung des Q10 ProteinChip® Arrays.

### 3.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden in einer Mikrotiterplatte mit der BCA (Bicinchoninsäure)-Methode nach Smith et al. (153), die eine Weiterentwicklung der Lowry-Proteinbestimmung darstellt, bestimmt. Der Test ist im Gegensatz zur Lowry-Proteinbestimmung weniger störanfällig gegenüber Lösungsmitteln und Detergenzien.

Je 10 µl einer proteinhaltigen Probe wurden mit 200 µl Lösung C versetzt, gut gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlung der Mikrotiterplatte wurden die Proben bei 550 nm im FluoStar optima (BMG Labtech GmbH, Offenburg) vermessen. Als Eichreihe diente eine BSA-Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 0; 100; 200; 500; 800; 1200; 1500 µg/ml. Alle Messungen wurden mindestens als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Lösung A	Lösung B	Lösung C
Bicinchoninsäure Lösung (Sigma-Aldrich; Taufkirchen)	4% (w/v) CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	50 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B

### 3.3.6 Beadbasierte chromatographische Methoden

#### 3.3.6.1 Fraktionierung mit dem „Serum Fractionation Kit“

Für die Fraktionierung der Serumproben vor der massenspektrometrischen Analyse wurde das „Serum Fractionation Kit“ (Q HyperD resin, CIPHERGEN Biosystems, Inc., Fremont, CA, USA) verwendet. Dabei wurden die Proteine mit Hilfe von Anionenaustauschchromatographie im automatisierten 96-well Format (Biomek2000, CIPHERGEN, Göttingen) nach der Anleitung des Herstellers fraktioniert. Nach dem Binden wurden die Proteine schrittweise durch einen pH-Gradienten eluiert. Es wurden 6 Fraktionen erhalten, welche massenspektrometrisch unter Verwendung von CM10 ProteinChip® Arrays mit SELDI-TOF MS analysiert wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.



### 3.3.6.2 Fraktionierung mit „Q Ceramic HyperD F (QHD) Spin Columns“

Bei der Aufreinigung der Biomarkerkandidaten wurde im ersten Schritt auf eine beadbasierte Anionenaustauschchromatographie mit Hilfe der „Q Ceramic HyperD F (QHD) Spin Columns“ zurückgegriffen. Als Grundlage für die Fraktionierungen wurden die Anleitung und Puffersysteme des Herstellers (Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, CA, USA und Biorad, München) verwendet. Die Elutionsbedingungen mussten für den jeweiligen Biomarkerkandidaten optimiert werden:

**Tab. 13: verwendete Elutionspuffer bei der Fraktionierung mit QHD Zentrifugationssäulen**

Fraktion	p8940	p10320	p4835
	1 Teil Serum + 1 Teil U9; max. 800 µl	1 Teil Lysat + 1 Teil U9; max. 800 µl	1 Teil Lysat + 1 Teil U9; max. 800 µl
1	nicht gebundene Proteine	nicht gebundene Proteine	nicht gebundene Proteine
1.2	200 µl WP1	-	-
2	-	-	200 µl WP2
3	-	200 µl WP3	200 µl WP3*
3.2	-	200 µl WP3	
4	-	200 µl WP4	200 µl WP4*
5	-	200 µl WP5	200 µl WP5*
5.2	-	-	100 µl WP5*
6	-	-	200 µl WP6
7	-	200 µl WP7	200 µl WP7
7.2	-	200 µl WP7	-
8	-	-	200 µl WP8

#### U9 Puffer

9 M Harnstoff  
50 mM Tris-HCl  
2% (w/v) CHAPS  
pH 9

#### WP1

50 mM Tris-HCl  
0,1% (w/v) OGP  
pH 9

#### WP2

30 mM Natriumphosphat  
pH 7,4

<b>WP3</b>	<b>WP4</b>	<b>WP5</b>
100 mM Natriumacetat	100 mM Natriumacetat	50 mM Natriumcitrat
0,1% (w/v) OGP	0,1% (w/v) OGP	0,1% (w/v) OGP
* ohne Detergenz	* ohne Detergenz	* ohne Detergenz
pH 5	pH 4	pH 3
<b>WP6</b>	<b>WP7</b>	<b>WP8</b>
50 mM Glycin	33,3% (v/v) Isopropanol	50% (v/v) Acetonitril
pH 2,5	16,7% (v/v) Acetonitril	0,5% (v/v) TFA
	0,1% (v/v) TFA	

Die Durchführung erfolgte bei Raumtemperatur. Die erhaltenen Fraktionen wurden zunächst auf Eis gelagert und ein Aliquot für die Analyse entnommen. Die Lagerung der Fraktionen erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Alle Fraktionen wurden massenspektrometrisch analysiert. Hierfür wurden 1-2  $\mu\text{l}$  Probe auf CM10 ProteinChip<sup>®</sup> Arrays für das Protein p8940, auf NP20 ProteinChip<sup>®</sup> Arrays für das Protein p10320 oder auf Q10 ProteinChip<sup>®</sup> Arrays für das Peptid p4835 aufgetragen und mit SELDI-TOF MS die Anreicherung und Aufreinigung der entsprechenden Proteine und Peptide untersucht. Bei der Aufreinigung des Peptids p4835 wurden 1,5  $\mu\text{l}$  der Fraktionen 7 und 8 mit MALDI-TOF MS analysiert.

### 3.3.6.3 Fraktionierung mit Reverse Phase (RP)-Beads

Die im „Batch“ Verfahren durchgeführte Reversed Phase-Fraktionierung mit RP-Beads (Poly Beads<sup>™</sup> von BioSeptra; Cergy, Frankreich) und Low Pressure PLRP-S Media von Polymer Laboratories GmbH (Darmstadt)) diente der weiteren Aufreinigung der Biomarkerkandidaten p8940 und p10320. Hierbei wurde das Ziel verfolgt, nach der Anionenaustauschchromatographie (Kapitel 3.3.6.2) mit Hilfe einer orthogonalen Trennmethode eine zusätzliche Anreicherung der Zielproteine und Abreicherung unerwünschter Proteine zu erreichen. Ein Vorteil dieses zweiten Aufreinigungsschrittes bestand außerdem darin, durch Verwendung von salzfreien Elutionspuffern eine Aufkonzentrierung in der Vakuum-Zentrifuge zu ermöglichen. Bei der Aufreinigung des Peptids p4835 diente die Methode weiterhin dem Umpuffern der QHD-Fraktion 6 (50 mM Glycin; pH 2,5) vor der weiteren Auftrennung mit Hilfe der HPLC.

250 µl RP-Beads wurden mit 500 µl 50% (v/v) Acetonitril/ 0,1% (v/v) TFA für 30 min unter Schütteln bei 1400 rpm (Thermomixer Eppendorf) äquilibriert und anschließend für 1 min bei 2300 x g zentrifugiert. Die Beads wurden dreimal 10 min mit 200 µl 10% (v/v) Acetonitril/ 0,1% (v/v) TFA unter Schütteln bei 1400 rpm (Thermomixer Eppendorf) gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Beads für 1 min bei 2300 x g zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Beads in 200 µl 10% (v/v) Acetonitril/ 0,1% (v/v) TFA aufgenommen. Die zu fraktionierende Probe wurde auf eine Lösungsmittelkonzentration von 10% (v/v) Acetonitril/ 0,5% (v/v) TFA eingestellt. Für ein Probenvolumen bis zu 500 µl wurden 80 µl Beadsuspension verwendet, wobei die Beads vor Probenzugabe für 1 min bei 2300 x g abzentrifugiert wurden. Nach Zugabe der Probe wurde für 30 min unter Schütteln bei 1400 rpm inkubiert. Anschließend wurde für 1 min bei 2300 x g zentrifugiert, der Überstand enthielt nicht gebundene Peptide und Proteine. Die Elution erfolgte schrittweise mit ansteigender Acetonitrilkonzentration (Tabelle 14). Dabei wurden die Beads für jeweils 10 min unter Schütteln bei 1400 rpm mit dem jeweiligen Elutionspuffer inkubiert und anschließend für 1 min bei 2300 x g abzentrifugiert.

**Tab. 14: verwendete Elutionspuffer bei der Fraktionierung mit RP-Beads**

Fraktion	p8940	p10320	p4835
1	nicht gebundene Proteine	nicht gebundene Proteine	nicht gebundene Proteine
2	200 µl 10% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA	200 µl 10% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA	200 µl 10% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA
3	200 µl 20% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA	200 µl 20% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA	200 µl 20% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA
4	200 µl 30% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA	200 µl 30% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA	150 µl 30% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA
4.2	-	-	100 µl 30% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA
5	200 µl 40% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA	200 µl 40% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA	-
6	200 µl 50% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA	200 µl 50% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA	-
7	200 µl 60% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA	200 µl 60% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA	200 µl 60% (v/v) AcN/ 0,1% (v/v) TFA

Die Durchführung erfolgte bei Raumtemperatur. Die erhaltenen Fraktionen wurden in „LoBind Tubes“ (Eppendorf, Hamburg) gesammelt, zunächst auf Eis gestellt und ein Aliquot für die Analyse entnommen. Die Lagerung der Fraktionen erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Alle Fraktionen wurden massenspektrometrisch analysiert. Hierfür wurden für das Protein p8940 5  $\mu\text{l}$  Probe auf NP20 ProteinChip<sup>®</sup> Arrays und für das Protein p10320 3  $\mu\text{l}$  Probe auf NP20 ProteinChip<sup>®</sup> Arrays aufgetragen und die Anreicherung und Aufreinigung der entsprechenden Proteine und Peptide mit SELDI-TOF MS untersucht. Bei der Aufreinigung des Peptids p4835 wurden 1,5  $\mu\text{l}$  Probe mit MALDI-TOF MS analysiert.

#### **3.3.6.4 Umpuffern mit magnetischen HIC (hydrophobe Interaktionschromatographie)-Beads**

Nach der Reinigung des rekombinanten GRP94-Fragmentes mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule (Kapitel 3.3.7.2) wurde das Eluat umgepuffert, um das Fragment anschließend mit der HPLC (Kapitel 3.3.8) weiter aufzureinigen zu können. Das Umpuffern wurde mit magnetischen HIC-Beads (Profiling Kit 100 MB-HIC 8; Bruker, Bremen) durchgeführt, welches auf der hydrophoben Interaktion der Peptide und Proteine und der C8 Funktionalität auf der Oberfläche der super-paramagnetischen Partikel basiert.

35  $\mu\text{l}$  Eluat wurden mit 35  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer vermischt und anschließend 10  $\mu\text{l}$  der Beadsuspension zugegeben. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die gebundenen Peptide und Proteine wurden mit 20  $\mu\text{l}$  70% (v/v) Acetonitril/ 0,5% (v/v) TFA eluiert und massenspektrometrisch unter Verwendung des Gold ProteinChip<sup>®</sup> Array (Biorad, München) mit SELDI-TOF MS oder mit MALDI-TOF MS auf das Vorhandensein des GRP94-Fragmentes analysiert.

### **3.3.7 Säulenchromatographische Methoden mit niedrigem Druck**

#### **3.3.7.1 Aufreinigung von GRP94**

Die Aufreinigung wurde nach einem Protokoll aus der Dissertation von S. Heiligtag (151) aus HT29- und A413-Zellen unter Verwendung der Anionenaustauschchromatographie-Säule Econo Q (Biorad, München), der Kationenaustausch-

chromatographie-Säule Econo S (Biorad, München) und der Hydroxyapatit-chromatographie-Säule Econo CHTII (Biorad, München) durchgeführt. Das Umpuffern während der Aufreinigung von GRP94 erfolgte mit Hilfe von PD10-Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Anleitung des Herstellers. Die Säulen wurden nach Angaben des Herstellers äquilibriert und gespült. Bei einer Flussrate von 700 µl/min wurden Fraktionen von 500 µl gesammelt. Die Aufreinigung von GRP94 wurde durch Analyse der Fraktionen mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung sowie im Western Blot überprüft.

### **3.3.7.2 Affinitätschromatographische Reinigung des rekombinanten Fusionsproteins mit Hilfe von Ni-NTA-Säulen**

Das rekombinante Fusionsprotein wurde mit Hilfe des N-terminalen Polyhistidin-Tags und Ni-NTA-Säulen gereinigt. Hierfür wurde das QIAexpress<sup>®</sup> Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, Hilden) verwendet und die Reinigung nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Die Aufreinigung des Fusionsproteins wurde durch Analyse der Fraktionen unter Verwendung des NP20 ProteinChip<sup>®</sup> Arrays mit SELDI-TOF MS, mit Hilfe eines coomassiegefärbten Gels und im Western Blot überprüft.

### **3.3.8 High performance liquid chromatography (HPLC)**

Die Separation von Peptiden und Proteinen erfolgte mit Hilfe der HPLC (High performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie), wenn aufgrund der Komplexität der Probe mit der beadbasierten Reversed Phase-Chromatographie (Kapitel 3.3.6.3) nicht die erforderliche Auftrennung erzielt werden konnte. Hierfür wurden die C-18 Reversed Phase-Säulen Zorbax SB-C18 und mRP-C18 (Agilent, Waldbronn) verwendet, die nach Angabe des Herstellers äquilibriert, gespült und gereinigt wurden. Die Trennung der Peptide und Proteine erfolgte durch einen Acetonitrilgradienten. Nach jedem HPLC-Lauf mit Probenmaterial wurde ein verkürzter Lauf mit 0,1%igem TFA in Reinstwasser durchgeführt, um Probenreste von der Säule zu entfernen. Die HPLC-Anlage war mit einem LC-MALDI Fraktionssammler „PROTEINEER fc II“ (Bruker, Bremen) verbunden, der durch Zugabe von Matrix in den LC-Fluss das direkte Spotten der Fraktionen auf ein

MALDI Target ermöglichte, was bei der grundlegenden Optimierung der jeweiligen HPLC-Methode eingesetzt wurde. Für mikropräparative Zwecke konnten die HPLC-Fractionen in Mikrotiterplatten („LoBind“ Mikrotiterplatten, Eppendorf, Hamburg) überführt werden. Die Lagerung der Fractionen erfolgte bei -80°C.

#### ***Aufreinigung des Biomarkerkandidaten p4835***

Für die Aufreinigung des Biomarkerkandidaten p4835 wurde eine Zorbax SB-C18-Säule (Agilent, Waldbronn) verwendet. Injiziert wurden zwischen 8-48 µl der Fraction 5 (pH 3) und der umgepufferten Fraction 6 (vorher pH 2,5) der Anionenaustauschchromatographie (Kapitel 3.3.6.2). In der Optimierungsphase betrug die Flussrate 5 µl/min und die Fraktionsgröße 20 s, so dass 1,7 µl des LC-Flusses mit 1,5 µl Matrix versetzt und auf einem MALDI-Target gespottet wurden. Die präparative Fraktionierung erfolgte bei einer Flussrate von 12 µl/min durch einen Acetonitrilgradienten von 20-40% (v/v) über einen Zeitraum von 40 min bei 30°C. Die Fraktionsgröße betrug 45 s bzw. 9 µl. 1 µl der Fraction wurde mit je einem 1 µl Matrix direkt auf dem MALDI-Target vermischt und die Fractionen anschließend mit MALDI-TOF MS analysiert.

#### ***Aufreinigung des enterokinasegespaltenen rekombinanten N-terminalen GRP94-Fragmentes***

Die Aufreinigung des umgepufferten, enterokinasegespaltenen rekombinanten N-terminalen GRP94-Fragmentes (Kapitel 3.6.10, 3.3.19, 3.3.6.4) erfolgte mit einer mRP-C18 (Agilent, Waldbronn). In der Optimierungsphase betrug die Flussrate 6 µl/min und die Fraktionsgröße 15 s, so dass 1,5 µl des LC-Flusses mit 1,5 µl Matrix versetzt und auf einem MALDI-Target gespottet wurden. Die präparative Fraktionierung erfolgte bei einer Flussrate von 12 µl/min durch einen Acetonitrilgradienten von 15-55 % über einen Zeitraum von 60 min bei 60°C. Die Fraktionsgröße betrug 45 s bzw. 9 µl. 1 µl der Fraction wurde mit je einem 1 µl Matrix direkt auf dem MALDI-Target vermischt und die Fractionen anschließend mit MALDI-TOF MS analysiert. Für die Analyse mit SELDI-TOF MS wurden 0,8 µl der Fractionen mit je 0,8 µl Matrix direkt auf dem ProteinChip Gold Array (Biorad, München) vermischt.

### **3.3.9 Konzentrieren von Proben**

#### **3.3.9.1 Vakuumzentrifugation**

Nach den Auftrennungen der Peptide und Proteine durch die Reversed Phase-Chromatographie (Kapitel 3.3.6.3, 3.3.8) erfolgte eine Konzentrierung der Proben mit Hilfe einer Vakuum-Zentrifuge. Dabei wurden die Proben eingetrocknet, wenn sie anschließend durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese weiter aufgetrennt werden sollten. Sofern die Proben im Anschluss in die HPLC injiziert werden sollten, wurden sie bis auf ein Restvolumen von ca. 5-8 µl konzentriert, um die Acetonitrilkonzentration zu senken.

#### **3.3.9.2 Zentrifugationsfiltereinheiten**

Die Konzentration des rekombinanten GRP94-Fragmentes und des 94 kDa großen GRP94 erfolgte mit YM-30 Microcon<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA, USA) Zentrifugationsfiltereinheiten. Die zu konzentrierenden Proben wurden in das Probenreservoir der Filtereinheit pipettiert und anschließend bei 14000 x g und 4°C solange zentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht wurde. Um die konzentrierte Probe in ein neues Gefäß zu transferieren, wurde die Filtereinheit invertiert in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt und bei 1000 x g und 4°C für 3 min zentrifugiert.

#### **3.3.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE-Analysen wurden mit dem Novex<sup>®</sup>- und NuPAGE<sup>®</sup>-System von Invitrogen (Karlsruhe) nach den Protokollen des Herstellers durchgeführt. Tabelle 15 fasst die verwendeten Gele und die jeweiligen Puffer zusammen. Durch Zugabe von „NuPAGE<sup>®</sup> Reducing Agent (10 x)“ zum Probenpuffer ermöglichte die Proben unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Durch Vakuumzentrifugation getrocknete Proben wurden mit 1 x konzentriertem Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese fand mit dem Tricin-Puffer für 90 min, mit dem Tris-Glycin-Puffer für 110 min, mit dem MES-Puffer für 30-35 min und mit dem MOPS-Puffer für 50 min bei 200 V in einer „XCell SureLock<sup>™</sup>“-Laufkammer (Invitrogen) statt.

Tab. 15: verwendete Gele und Puffer bei den SDS-PAGE-Analysen

Bezeichnung des Gels	Probenpuffer	Laufpuffer	Verwendung
Novex® 16% Tris-Tricin	Novex® Tricine SDS Sample Buffer (2x)	Novex® Tricine SDS Running Buffer (10x)	Identifizierung p8940
Novex® 18% Tris-Glycin	Novex® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x)	Novex® Tris-Glycine SDS Running Buffer (10x)	Identifizierung p4835
NuPAGE® Novex 10% Bis-Tris	NuPAGE® LDS LDS Sample Buffer (4x)	NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)	Identifizierung p10320, Analysen der Expression und Aufreinigung des rekombinanten GRP94- Fragmentes
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris	NuPAGE® LDS LDS Sample Buffer (4x)	NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)	Analysen der Aufreinigung des rekombinanten GRP94-Fragmentes, Analysen zur Verwendbarkeit der Antikörper
		NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)	Analysen der Aufreinigung von GRP94, Analyse der GRP94 Expression im Gewebe

### 3.3.11 Western Blot und Immunprinting

Der Transfer von gelelektrophoretisch getrennten Proteinen auf Blot-Membranen wurde mit dem „XCell II™ Blot Module“ (Invitrogen, Karlsruhe) und der XCell SureLock™-Laufkammer (Invitrogen) mit der Tank-Blot-Methode durchgeführt. Als Transfermembran wurde eine PVDF-Membran (Millipore, Billerica, MA, USA) verwendet. Die PVDF-Membran wurde in absolutem Methanol für 2 s, in ddH<sub>2</sub>O für 5 min und schließlich in 1 x Transfer-Puffer (Invitrogen) für 15 min äquilibriert. Der Transfer erfolgte mit 1 x Transfer-Puffer (Invitrogen), der je Gel 10% (v/v) Methanol enthielt, gemäß dem Invitrogen-Protokoll bei 30 V für 60 min. Nach Beendigung des elektrophoretischen Transfers der Proteine wurde die Membran zunächst zweimal für 5 min in Waschpuffer gewaschen. Dann wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen der Membran für 1 h mit Blockierungspuffer blockiert. Die Membran wurde



anschließend dreimal für je 5 min in Waschpuffer gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in entsprechender Verdünnung (siehe unter 2.5.3, Tab. 2) in Blockierungspuffer für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Es folgten drei Waschschriffe von je 5 min. Die Membran wurde dann mit einem sekundären Antikörper HRP-Konjugat in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung in Blockierungspuffer für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschriffen in Waschpuffer von je 5 min erfolgte die Detektion mit Hilfe der Chemilumineszenz-Methode. Hierzu wurde die Membran für 5 min mit der Substratlösung aus gleichen Teilen Luminol/Verstärker-Lösung und Peroxidase-Lösung (SuperSignal® West Pico oder Dura Chemiluminescent Substrate, Pierce, Sankt Augustin) inkubiert. Die Membran wurde anschließend luftblasenfrei zwischen 2 Plastikfolien gelegt. Die Chemilumineszenz wurde im Geldokumentationssystem mit einer Licht-sensitiven Kamera (Diana II, raytest®, Straubenhardt) detektiert.

---

**Waschpuffer**

50 mM Tris  
150 mM NaCl  
0,3% (v/v) Tween 20  
pH 8,0

**Blockierungspuffer**

5% (w/v) Magermilchpulver  
in Waschpuffer

---

### 3.3.12 Coomassie-Färbung von Proteinbanden

#### 3.3.12.1 Kolloidale Coomassie-Färbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Polyacrylamidgele für 15-20 h mit der Färbelösung Roti Blue (Roth, Karlsruhe) gefärbt. Anschließend wurde mit 25%igem (v/v) Methanol entfärbt, bis der Hintergrund des Gels klar war.

#### 3.3.12.2 Coomassie-Färbung mit „SimplyBlue™ Safe Stain“

Die „Safe Stain“ Methode ist eine schnelle Färbemethode, die auf der Färbung mit Coomassie G-250 beruht. Die Färbung zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und die Unbedenklichkeit der Reagenzien aus.

Die Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese dreimal für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen, um SDS zu entfernen. Anschließend wurden die Gele in der Färbelösung „SimplyBlue™ Safe Stain“ (Invitrogen, Karlsruhe) für 1 h inkubiert. Eine Entfärbung war nur notwendig, wenn die Proteine im Anschluss massenspektrometrisch analysiert wurden oder ein absolut klarer Hintergrund erzielt werden sollte. Sie erfolgte mit destilliertem Wasser für 1-3 h.

### 3.3.13 Silberfärbung von Proteinbanden

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele für 1 h fixiert und anschließend für 1-12 h in der Inkubationslösung inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit destilliertem Wasser für je 10 min wurden die Gele für 30 min in Färbelösung inkubiert. Nach der Färbung wurden die Gele kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend entwickelt. Die Entwicklung wurde durch Überführen der Gele in eine EDTA-Lösung gestoppt.

---

#### Fixierlösung

30% (v/v) Ethanol  
10% (v/v) Eisessig

#### Inkubationslösung

500 mM Natriumacetat  
14 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
25% (v/v) Ethanol  
0,5% (v/v) Glutaraldehyd (25%ig)

#### Färbelösung

6 mM AgNO<sub>3</sub>  
0,06% (v/v) Formaldehyd (37%ig)

#### Entwicklungslösung

263 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
0,06% (v/v) Formaldehyd (37%ig)

#### Stopplösung

50 mM Na<sub>2</sub>EDTA

---

### 3.3.14 Trocknen von Polyacrylamidgelen

Die Polyacrylamidgele wurden luftblasenfrei zwischen zwei durchnässte Cellophan-Folien in einem „Easy Breeze Air Gel Dryer“-Rahmen (Amersham-Biotech, Freiburg) eingespannt und etwa 24 Stunden an der Luft getrocknet.

### 3.3.15 Ausschneiden von Proteinbanden aus Polyacrylamidgelen

Zur Identifizierung der Peptide und Proteine wurden die entsprechenden Banden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten. Alle hierfür verwendeten Materialien wurden zunächst mit Methanol gereinigt und das Polyacrylamidgel vorm Ausschneiden der Proteinbanden zur Dokumentation eingescannt. Die Peptid- und Proteinbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, nach Bedarf geteilt oder in kleine Stücke geschnitten und in ein „LoBind Tube“ (Eppendorf, Hamburg) überführt. Die Gelstücke konnten bei -80°C gelagert werden.

### 3.3.16 Passive Elution von Peptiden und Proteinen aus Polyacrylamidgelen

Nach dem Ausschneiden der Peptid- und Proteinbanden wurde ein Teil der Bande dazu verwendet, das Peptid oder Protein in intakter Form aus dem Gel zu eluieren. Dieser Schritt diente der Verifizierung des Molekulargewichtes vor dem nachfolgenden proteolytischen Verdau.

Die Gelstücke wurden dreimal für 5 min mit HPLC Wasser unter Schütteln gewaschen, mit 100 µl 100% Acetonitril für 15 min unter Schütteln dehydriert und für 5 min bei 50°C getrocknet. Anschließend wurde soviel Elutionspuffer zugegeben, dass die Gelstücke bedeckt waren. Die Elution erfolgte für 2 h unter Schütteln. Die Eluate wurden in ein neues „LoBind Tube“ (Eppendorf, Hamburg) überführt und auf das Vorhandensein der jeweiligen Zielproteins hin massenspektrometrisch analysiert.

---

#### Elutionspuffer

50% (v/v) Ameisensäure

30% (v/v) Acetonitril

10% (v/v) Isopropanol

---

### 3.3.17 Proteolytischer Verdau von Peptiden und Proteinen mit Trypsin im Gel

Der proteolytische Verdau mit Trypsin im Gel wurde nach Shevchenko et al. (154) durchgeführt. Trypsin katalysiert die Hydrolyse von Peptidbindungen am C-terminalen Ende der Aminosäuren Arginin und Lysin. Da aus der hochspezifischen

Spaltung eine limitierte Zahl tryptischer Peptide resultiert, wird das Enzym routinemäßig für das „Peptide Mapping“ und Proteinsequenzierungen eingesetzt.

Als Positivkontrolle diente Cytochrom C (Protein MW Standards Kit; CIPHERGEN Biosystems Inc., Fremont, CA, USA und ClinProt Standard (CPS); Bruker, Bremen), als Negativkontrolle ein leeres Gelstück. Bei den Waschschrritten betrug das Volumen des Lösungsmittels das Zweifache des Gelvolumens. Bei den Reaktionsschritten wurde das Volumen so gewählt, dass die Gelstücke ausreichend mit der Pufferlösung bedeckt waren.

### ***Waschen und Entfärben***

Die Gelstücke wurden zweimal für 10 min mit HPLC Wasser gewaschen und zweimal für 10 min mit Bicarbonat/Acetonitrilpuffer entfärbt. Anschließend wurden sie mit 100% Acetonitril dehydriert. Nach erfolgter Dehydrierung wurden die Gelstücke für 1-3 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

---

#### **Bicarbonat/Acetonitrilpuffer**

12,5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$

50% (v/v) Acetonitril

---

### ***Reduktion von Disulfidbrücken und Alkylierung freier Cystein-Thiolgruppen***

Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurden die Gelstücke mit Reduktionslösung überschichtet und für 45 min bei 56°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung abgenommen und sofort durch die Alkylierungslösung ersetzt. Die Alkylierung freier Cystein-Thiolgruppen erfolgte 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Danach wurde die Alkylierungslösung abgenommen und die Gelstücke zweimal für 15 min mit Bicarbonat/Acetonitrilpuffer gewaschen. Die Gelstücke wurden mit ausreichend 100% Acetonitril bedeckt und nach dem Dehydrieren für 1-3 min in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet.

---

<b>Bicarbonat/Acetonitrilpuffer</b>	<b>Reduktionslösung</b>	<b>Alkylierungslösung</b>
12,5 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	10 mM DTT	55 mM Iodacetamid
50% (v/v) Acetonitril	12,5 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	12,5 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3$

---

### ***Verdau mit Trypsin***

Trypsin (Proteomics Grade; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde nach Anleitung des Herstellers in 1 mM HCl gelöst. Erst nach dem Verdünnen der Trypsin-Stammlösung in einem Überschuss eines 12,5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  Puffers und der damit verbundenen Anhebung des pH-Wertes wird das Enzym proteolytisch aktiv. Die Gelstücke wurden mit 10  $\mu\text{l}$  der Trypsinlösung (3 ng/ $\mu\text{l}$  Trypsin in 12,5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) zunächst für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gelstücke mit 12,5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  vollständig überschichtet. Der tryptische Verdau erfolgte über Nacht für mindestens 16 Stunden bei 37°C.

### ***Extraktion der Peptide***

Sofern nach der Inkubation mit der Trypsinlösung weniger als 3  $\mu\text{l}$  Flüssigkeit im Reaktionsgefäß enthalten waren, wurde HPLC-Wasser zugegeben. Die Peptide wurden im Ultraschallbad für 10 min extrahiert, der Überstand in ein neues „LoBind Tube“ (Eppendorf, Hamburg) überführt. Zu den Gelstücken wurde 3  $\mu\text{l}$  Extraktionslösung zugegeben und für 10 min im Ultraschallbad extrahiert. Der Überstand wurde mit dem der ersten Extraktion vereinigt. Zu den Gelstücken wurde erneut 3  $\mu\text{l}$  Extraktionslösung zugegeben und für 10 min im Ultraschallbad extrahiert. Der Überstand wurde mit dem der vorherigen Extraktionen vereinigt. Die Lösung mit den extrahierten Peptiden wurde aliquotiert (je 3  $\mu\text{l}$ ) und mit jeweils 1  $\mu\text{l}$  wurde eine „Peptide Mapping“-Analyse durchgeführt. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C.

---

#### **Extraktionslösung**

50% (v/v) Acetonitril

1% (v/v) TFA

---

### **3.3.18 Proteolytischer Verdau von Peptiden und Proteinen in Lösung**

Bei Peptiden und Proteinen die in Lösung vorlagen, so z.B. nach passiver Elution aus dem Gel oder in HPLC-Fractionen, wurde der proteolytische Verdau in Lösung durchgeführt. Hierfür wurden die Peptide und Proteine entweder mit der Vakuum-Zentrifuge konzentriert oder das Lösungsmittel wurde mit Bicarbonat Puffer verdünnt, bis ein basischer pH-Wert erreicht wurde.

### 3.3.18.1 Verdau mit Trypsin

Trypsin (Proteomics Grade; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde nach Anleitung des Herstellers in HCl gelöst (siehe auch Kapitel 3.3.17). Die Probe wurde in Ammoniumbicarbonatpuffer verdünnt bzw. aufgenommen, so dass eine Konzentration von 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  bei einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  erreicht wurde. Als Positivkontrolle wurden 2 pmol Cytochrom C (Protein MW Standards Kit; Ciphergen Biosystems Inc., Fremont, CA, USA und ClinProt Standard; Bruker, Bremen) verwendet. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne Enzymzugabe. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurde 0,5  $\mu\text{l}$  Reduktionslösung zu den Proben zugegeben und für 15 min bei 50°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Alkylierung der freien Cystein-Thiolgruppen durch Zugabe von 0,5  $\mu\text{l}$  Alkylierungslösung und Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach der Reduktion und Alkylierung wurde 1  $\mu\text{l}$  Trypsinlösung (1 ng/ $\mu\text{l}$  Trypsin in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) zur Probe zugegeben (0,2 – 1 ng Trypsin auf 10 ng Protein). Der tryptische Verdau wurde für 2-4 h oder über Nacht bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 0,8  $\mu\text{l}$  10% (v/v) TFA abgestoppt und die tryptischen Peptidfragmente massenspektrometrisch analysiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 3.3.18.2 Verdau mit Chymotrypsin

$\alpha$ -Chymotrypsin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) katalysiert die Hydrolyse von Peptidbindungen auf der C-terminalen Seite von Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan und Leucin.

Das Enzym wurde nach Anleitung des Herstellers gelöst. Die Probe wurde in Ammoniumbicarbonatpuffer verdünnt, so dass eine Konzentration von 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  bei einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  erreicht wurde. Nach Reduktion von Disulfidbrücken und Alkylierung der freien Cystein-Thiolgruppen wurde 1  $\mu\text{l}$  Chymotrypsinlösung (1 ng/ $\mu\text{l}$  Chymotrypsin in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /10 mM  $\text{CaCl}_2$ ) zur Probe gegeben. Der Verdau wurde für 1-4 h bei 30°C durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 0,8  $\mu\text{l}$  10% (v/v) TFA abgestoppt und die Peptidfragmente massenspektrometrisch analysiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 3.3.18.3 Verdau mit der Endoproteinase Glu-C

Die Endoproteinase Glu-C (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) katalysiert bei pH 4,0 und pH 7,8 die Hydrolyse von Peptidbindungen auf der C-terminalen Seite von Glutamat und Aspartat.

Das Enzym wurde nach Anleitung des Herstellers gelöst. Die Probe wurde so in Puffer verdünnt, dass eine Konzentration von 100 mM  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  oder 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  bei einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  erreicht wurde. Nach der Reduktion von Disulfidbrücken und Alkylierung der freien Cystein-Thiolgruppen wurde 1  $\mu\text{l}$  Enzymlösung (1 ng/ $\mu\text{l}$  Glu-C in 100 mM  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  oder 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) zur Probe gegeben. Der Verdau wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 0,8  $\mu\text{l}$  10% (v/v) TFA abgestoppt und die Peptidfragmente massenspektrometrisch analysiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 3.3.19 Spaltung des rekombinanten Fusionsproteins durch Enterokinase

Das N-terminale GRP94-Fragment wurde rekombinant als Fusionsprotein mit Enterokinaseschnittstelle exprimiert (Kapitel 3.6.10), welche die Entfernung des N-terminalen His-Tags ermöglichte. Hierfür wurde die EnterokinaseMax™ (EKMax™) (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, welche die Aminosäuresequenz DDDDK erkennt und nach dem Lysinrest spaltet.

#### ***Spaltung durch Enterokinase in Lösung***

Die Spaltungsreaktion wurde hinsichtlich Enzymkonzentration, Temperatur und Reaktionszeit mit der folgenden Reaktionsmischung optimiert:

**Tab. 16: Reaktionsansatz zur Spaltung des Fusionsproteins durch Enterokinase**

---

Fusionsprotein	10 $\mu\text{g}$
10 x EKMax™ Puffer	1,5 $\mu\text{l}$
EKMax™	0,5-2 $\mu\text{l}$
destilliertes Wasser	ad 15 $\mu\text{l}$

---

Nach der entsprechenden Reaktionszeit wurden die Reaktionsansätze auf das Vorhandensein des rekombinanten GRP94-Fragmentes massenspektrometrisch analysiert.

Mit den optimierten Parametern von 0,1 unit EKMax™, einer Reaktionszeit von 2 h bei 37°C, wurde die Spaltungsreaktion mit 20 µg Protein durchgeführt, welche im Anschluss umgepuffert (Kapitel 3.3.6.4) und mit Hilfe der HPLC aufgereinigt wurde (Kapitel 3.3.8).

### ***Spaltung durch Enterokinase an Ni-NTA-Beads***

Das rekombinante Fusionsprotein wurde zunächst an magnetische Ni-NTA-Beads (Qiagen, Hilden) für 1 h bei 4°C unter Schütteln gebunden. Hierfür wurde 33 µl Beadsuspension auf 10 µg Protein in Bindungspuffer eingesetzt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in einen Magnetseparator überführt und der Überstand abgenommen. Die Beads wurden in 200 µl Waschpuffer aufgenommen, durch zwanzigmaliges Hin- und Hersetzen im Magnetseparator gewaschen und der Puffer entfernt. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Die Beads wurden in 100 µl 1 x EKMax™ Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen, durch zwanzigmaliges Umsetzen im Magnetseparator gewaschen und der Puffer entfernt. Anschließend wurden 30 µl 0, 0,025, 0,05, 0,1 oder 0,5 units EnterokinaseMax™ in 1 x EKMax™ Puffer für 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder 15 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Abspaltung des GRP94-Fragmentes durch die Enterokinase wurden die Reaktionsgefäße in den Magnetseparator überführt und der Überstand mit dem GRP94-Fragment abgenommen. Ungespaltene Fusionsproteine, die His-Tag-Peptide und alle unspezifisch gebundenen Proteine sollten weiterhin an die Beads gebunden vorliegen. Um die Effizienz der Reaktion zu prüfen, wurden alle gebundenen Peptide und Proteine eluiert. Hierfür wurden die Beads zunächst dreimal mit 200 µl Waschpuffer durch jeweils zwanzigmaliges Umsetzen im Magnetseparator gewaschen. Die Elution erfolgte durch Inkubation mit 30 µl Elutionspuffer für 5 min bei 20°C unter Schütteln. Die verschiedenen Überstände und die Eluate wurden unter Verwendung des NP20 ProteinChip® Array mit SELDI-TOF MS oder mit MALDI-TOF MS auf das Vorhandensein des rekombinanten GRP94-Fragmentes untersucht.



<b>Bindungspuffer</b>	<b>Waschpuffer</b>	<b>Elutionspuffer</b>
50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
300 mM NaCl	1 M NaCl	300 mM NaCl
20 mM Imidazol	20 mM Imidazol	250 mM Imidazol
0,05% (v/v) Tween 20	0,05% (v/v) Tween 20	0,05% (v/v) Tween 20
pH 8,0	pH 8,0	pH 8,0

### 3.3.20 Untersuchung zur hypothetischen Spaltung von GRP94 durch Calpain

Die Untersuchung der *in vitro* Spaltung von GRP94 durch Calpain erfolgte modifiziert nach Reddy et al. (148). Die Spaltung durch Calpain (Calpain II; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde mit aufgereinigtem GRP94, Maus GP96 (immatics biotechnologies GmbH, Tübingen) sowie Normal- und Tumorgewebelysaten aus stickstofffixiertem oder frisch präpariertem Gewebe durchgeführt. Ein Ansatz ohne Enzym diente der Kontrolle. Die folgenden Reaktionsansätze wurden für 30 min bei 30°C inkubiert:

**Tab. 17: Reaktionsansatz zur Spaltung von GRP94 durch Calpain II**

10 µg aufgereinigtes GRP94 oder 1 µg Maus GP96 oder Gewebelysat
0,2 units Calpain II
50 mM Tris-HCl Puffer; pH 7,5
5 mM CaCl <sub>2</sub> oder ohne CaCl <sub>2</sub>
1,5 mM β-Mercaptoethanol oder DTT oder ohne Reduktionsmittel

Anschließend wurden die Reaktionsansätze unter Verwendung des NP20 ProteinChip® Array mit SELDI-TOF MS auf das Vorhandensein des GRP94-Fragmentes p10320 untersucht.

### 3.3.21 Untersuchung zur Spaltung von GRP94 durch proteolytisch aktive Gewebelysate

Um zu prüfen, ob im Tumorgewebe ein aktives Enzym vorliegt, welches GRP94 in das p10320-Fragment spalten kann, wurden Normal- und Tumorgewebelysate aus stickstofffixiertem oder frisch präpariertem Gewebe mit aufgereinigtem GRP94 oder Maus GP96 (immatics biotechnologies GmbH, Tübingen) inkubiert. Als Kontrolle

diente ein Ansatz ohne kein GRP94. Die folgenden Reaktionsansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert:

**Tab. 18: Reaktionsansatz zur Spaltung von GRP94**

---

10 µg aufgereinigtes GRP94 oder 10 µg Maus GP96  
Gewebeelysat  
0, 5 oder 10 mM CaCl<sub>2</sub>

---

Anschließend wurden die Peakintensität des GRP94-Fragmentes p10320 unter Verwendung des NP20 ProteinChip® Array mit SELDI-TOF MS gemessen.

### 3.3.22 Immunaffinitätsmessung von Transthyretin mit dem ProteinChip PG20

Die Immunaffinitätsmessung von Transthyretin wurde mit Hilfe des „ProteinChip Antibody Capture Kit“ (CIPHERGEN Biosystems, Inc.) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden 0,2 µg/µl polyklonale anti-Transthyretin Antikörper (Dako, Hamburg) an Protein G Arrays gebunden (0,4 µg Antikörper/Spot). Die ProteinChips wurden gewaschen und anschließend mit den entsprechenden Serumfraktionen von je 6 Kontroll-Patienten, Adenom-Patienten oder Karzinom-Patienten inkubiert. Die ProteinChips wurden erneut gewaschen, getrocknet, mit SPA-Matrix versetzt und die Massen der Transthyretin-Isoformen mit SELDI-TOF MS detektiert.

### 3.3.23 Immunpräzipitation von Transthyretin

Um Transthyretin aus dem Serum bzw. den Serumfraktionen zu präzipitieren, wurde 50 µl Probe mit 15 µl polyklonalem anti-Transthyretin Antikörper (Dako, Hamburg) (6,75 µg Antikörper/ Probe) versetzt und für 2 h bei 4°C inkubiert. Eine Probe mit hohen Intensitäten des Peaks mit *m/z* 13770 wurde ohne Antikörper inkubiert und diente als Negativkontrolle. Anschließend wurde 50 µl Protein A/G-Agarose (Pierce, Sankt Augustin) zugegeben und 16 h unter Rotation (MACSmix; Miltenyi, Bergisch Gladbach) bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 3300 x g und 4°C wurde der Überstand abgenommen (nicht gebundene Proteine) und das Pellet dreimal mit DPBS (PAA, Cölbe) gewaschen. Das Agarosepellet wurde in 20 µl U9 Puffer aufgenommen und für 10 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Zentrifugation für 5 min bei 16000 x g und Raumtemperatur wurde der Überstand, der das präzipitierte Protein enthielt, abgenommen. Nicht gebundene Proteine und das Präzipitat wurden unter Verwendung des CM10 ProteinChip® Arrays mit SELDI-TOF MS auf das Vorhandensein der Peaks mit  $m/z$  13770,  $m/z$  13900 und  $m/z$  14060 analysiert.

---

**U9 Puffer**

9 M Harnstoff

50 mM Tris-HCl

2% (w/v) CHAPS

pH 9

---

**3.3.24 C3a ELISA**

Die Quantifizierung von C3a im Serum erfolgte mit Hilfe des Quidel C3a Enzym-Immunoassay Kits, welches für C3a-desArg spezifisch ist (Quidel, San Diego, CA, USA). Die Serumproben wurden 1:500 verdünnt und der Assay nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

**3.3.25 Radiale Immundiffusion zur Quantifizierung von Transthyretin**

Die Quantifizierung von Transthyretin im Serum erfolgte durch radiale Immundiffusion mit einem Assay von Roche Diagnostics (Mannheim) und wurde in einem klinischen Servicelabor (Arndt & Partner, Hamburg) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

**3.4 Bioinformatische Analyse**

Die Analyse der SELDI-TOF MS Daten auf differentiell exprimierte Proteine erfolgte mit den Programmen „Biomarker Wizard Program“ und „Biomarker Patterns Software“ (CIPHERGEN Biosystems Inc. (Fremont, CA, USA)). Die statistischen Analysen und das „data mining“ wurden mit dem Programm „Statistica“ (Version 7.1), Statsoft (Tulsa, USA) durchgeführt. Die statistische Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilks-W-Test geprüft. Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen

wurden in Abhängigkeit vom Skalenniveau und von der Verteilung der Daten mit t-Test, Mann-Whitney U-Test und Chi Quadrat-Test analysiert. Unterschiede der Peakintensitäten zwischen drei Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-ANOVA Rangtest berechnet. „Cut off“-Werte und Analysen zur Separation der Gruppen wurden mit Entscheidungsbaumanalysen unter Verwendung des CART Algorithmus evaluiert. Diese Analysen sowie die Generierung von ROC („Receiver Operating Characteristic“) Kurven erfolgten mit der „Acomed statistics“ Software (Leipzig). Die Sensitivität wurde definiert als Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich positiven Sachverhalt auch durch ein positives Testergebnis zu erkennen (Richtigpositiv-Rate). Die Spezifität wurde definiert als Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich negativen Sachverhalt auch durch ein negatives Testergebnis zu erkennen (Richtignegativ-Rate). Die Sensitivität und Spezifität der untersuchten Klassifikationsmodelle wurde in ROC Kurven, den dazugehörigen Flächen unter der Kurve (AUC) mit Standardfehler dargestellt. In allen durchgeführten Analysen wurden p-Werte kleiner als 0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

## **3.5 Zellkulturmethoden**

### **3.5.1 Kultivierung**

Die verwendeten Zelllinien HT-29 und A413 wurden in D-MEM Kulturmedium (Gibco™ Invitrogen) mit 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Pen/Strep kultiviert.

Nachdem die Zellen ein konfluentes Wachstum zeigten, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen kurz mit einigen Millilitern D-PBS (PAA) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bis zum Ablösen mit Trypsin-EDTA (Gibco™ Invitrogen) inkubiert. Zur Neutralisation des Trypsin-EDTA wurde Medium hinzugefügt und die Zellen in 50 ml Röhrchen überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 174 x g wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche überführt.

Die Inkubation erfolgte unter CO<sub>2</sub>-Begasung (5%) bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit.

### 3.5.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach entsprechender Verdünnung der Zellen und Zugabe einer identischen Menge an Trypanblau-Lösung (10% (v/v)) in einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellen in den vier Großquadranten der Neubauer-Zählkammer wurden unter dem Mikroskop gezählt und der Mittelwert berechnet. Die Zellzahl/ml in der Ausgangssuspension ergibt sich aus:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Zellzahl in 4 Großquadranten} : 4) \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

Die Vitalität wurde durch die Bestimmung des Verhältnisses von nicht blaugefärbten Zellen zu der gesamten Anzahl der Zellen bestimmt.

## 3.6 Molekularbiologische Methoden

### 3.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (155) wurde verwendet, um die DNA, welche das 10320 Da große GRP94-Fragment codiert, spezifisch zu amplifizieren. Als Template diente der Expressionsvektor pDEST17-D18/Ins.GRP94 (RZPD, Berlin), der einen Teil der humanen GRP94-Sequenz enthielt. Mit Hilfe von speziell synthetisierten Primern wurde durch die PCR ein Stopcodon an die das GRP94-Fragment codierende Sequenz angefügt. Weiterhin wurde die DNA mit flankierenden Restriktionsschnittstellen für BamHI am 5'Ende und EcoRI am 3'Ende versehen. Die Reaktion wurde mit der thermostabilen DNA Polymerase AmpliTaq Gold (Roche, Mannheim) mit folgendem 50 µl Reaktionsansatz durchgeführt:

**Tab. 19: PCR-Ansatz**

Template (2 ng/µl pDEST17-D18/Ins.GRP94)	5 µl
10 x PCR-Puffer Gold	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	5 µl
10 mM dNTPs	4 µl
10 pmol/µl sense-Primer (s. 2.10, Tab. 4)	1 µl
10 pmol/µl antisense-Primer (s. 2.10, Tab. 4)	1 µl
AmpliTaq Gold	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	28,5 µl

In einem Kontrollansatz wurde statt des Templates H<sub>2</sub>O eingesetzt. Die Reaktionen wurden im iCycler (Bio-Rad, München) mit dem in Tabelle 20 aufgeführten Programm durchgeführt. Die Analyse des Amplifikates erfolgte mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese.

**Tab. 20: PCR-Programm**

Reaktion	Zeit	Temperatur
1. Primärdenaturierung	10 min	95°C
2. Denaturierung	1 min	95°C
3. Hybridisierung	1 min	58°C
4. Elongation 35fache Wiederholung der Schritte 2-4	45 s	72°C
5. terminale Elongation	7 min	72°C

### 3.6.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung wurde in einer Quarzküvette mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bei 260/280 nm bestimmt. Eine optische Dichte von 1 ( $OD_{260}=1$ ) entspricht einem empirischen Wert von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml. Reine Nukleinsäuren weisen dabei ein Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm von 1,8 bis 2,0 auf.

### 3.6.3 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Restriktionsansätze unterschiedlicher Größe (20-60 µl) enthielten ein variables Volumen DNA-Lösung, maximal 10% Restriktionsenzym (BamHI und/oder EcoRI), 10% des jeweiligen Puffers und BSA; das Endvolumen wurde mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Verdau erfolgte nach Herstellerangaben. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung oder durch Zugabe von 6 x Gelladepuffer (Roti<sup>®</sup>-Load DNA; Roth, Karlsruhe) gestoppt.

### 3.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde zur Charakterisierung von DNA und zur präparativen Isolierung der Fragmente eingesetzt. Für analytische Gelelektrophoresen wurden 1,2%ige Agarosegele, für präparative Gelelektrophoresen 1%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose (Roche, Mannheim) wurde in TBE-Puffer (Roth, Karlsruhe) aufgekocht und nach kurzem Abkühlen wurde 1 µl SYBR<sup>®</sup> Green I (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) auf 100 ml Agaroselösung zugegeben. Die Proben wurden mit 6 x Gelladepuffer (Roti<sup>®</sup>-Load DNA; Roth, Karlsruhe) versetzt. Der Größenabschätzung von DNA-Fragmenten diente der 1 kb DNA Standard von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) sowie eine 200 bp DNA, welche durch den Restriktionsverdau des Vektors pCR II/Ins.18S generiert wurde. Die DNA wurde bei 70 V bzw. 50 V für präparative Gele aufgetrennt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit der Kamera eines Geldokumentationssystems (Diana II, raytest<sup>®</sup>, Straubenhardt) detektiert.

### 3.6.5 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Nach einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese wurde die DNA mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers aus dem Gel extrahiert.

### 3.6.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Der verwendete Vektor pRSET A (Invitrogen, Karlsruhe) wurde im Verhältnis 1:3 zum Insert eingesetzt. Die Ligationsansätze wiesen folgende Zusammensetzung auf:

**Tab. 21: Ligationsansatz**

Vektor (pRSET A)	0,79 µl
Insert (N-term.GRP94 DNA)	x µl
10 x T4-DNA-Ligase-Puffer (NEB, Frankfurt)	1 µl
T4-DNA-Ligase (NEB, Frankfurt)	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Ligation wurde für 16 h bei 16°C durchgeführt und die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 65°C für 10 min gestoppt.

### **3.6.7 Transformation**

Die hitzeschock-kompetenten *E.coli*-Zellen (TOP10 oder BL21-AI™; Invitrogen, Karlsruhe) wurden auf Eis lagernd aufgetaut. 100 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl des Ligationsansatzes oder 5-10 ng präpariertem Plasmid versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz 30 s bei 42°C und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Zu der Suspension wurde 500 µl SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienzellsuspension auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin-Zusatz (50 µg/ml) ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

### **3.6.8 Klonierung mit dem TOPO TA Cloning® Kit**

Mit dem „TOPO TA Cloning® Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) wurde das durch die Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Produkt direkt in den Vektor pCR®II-TOPO® kloniert. Die Durchführung erfolgte mit 4 µl PCR-Produkt nach Anleitung des Herstellers.

### **3.6.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus 3-5 ml Kulturen (Mini-Präparation) wurde mit dem „GenElute™ Plasmid Miniprep Kit“ (Sigma-Aldrich; Taufkirchen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Midi-Präparationen von Plasmid-DNA erfolgten aus 25 ml Kulturen mit dem „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers.

### **3.6.10 Expression rekombinanter Fusionsproteine in *E.coli***

Der Expressionsvektor pRSET A (Invitrogen, Karlsruhe) ermöglicht die Protein Expression von klonierten Genen in *E.coli* unter Kontrolle des T7 Promotors und die anschließende Reinigung dieser Proteine mit Hilfe eines N-terminalen Polyhistidin-



Tags. Der verwendete BL21-AI™ *E.coli* Stamm (Invitrogen, Karlsruhe) enthält eine chromosomale Insertion des T7 RNA-Polymerase codierenden Gens in den *araB* locus des *araBAD* Operons, so dass die Expression der T7 RNA-Polymerase durch die Zucker L-Arabinose (Induktion) und Glukose (Repression) reguliert werden kann.

### ***Pilot Expression***

Um die zeitabhängige Expression des N-terminalen GRP94-Fragmentes durch BL21-AI™-Zellen zu untersuchen, wurden 10 ml LB-Medium mit Ampicillin-Zusatz (50 µg/ml) mit einer rekombinanten *E.coli* Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit 500 µl dieser Über-Nacht-Kultur wurden 25 ml LB-Medium mit Ampicillin-Zusatz (50 µg/ml) angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Für die 0 h Probe wurde 1 ml der Kultur entnommen, pelletiert (Zentrifugation für 3 min, 16000 x g, 4°C) und bei -20°C gelagert. Die verbleibenden Zellen wurden mit 0,2% (w/v) L-Arabinose versetzt, um die Expression des rekombinanten Fusionsproteins zu induzieren. Die Kultur wurde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 1,5 h wurde 1 ml der Kultur entnommen, pelletiert und bei -20°C gelagert. Nach jeweils einer weiteren Stunde wurde die Probenentnahme wiederholt. Die letzte Probe wurde 5,5 h nach Induktion der Expression entnommen. Zur Analyse der zeitabhängigen Expression wurden die Pellets in jeweils 250 µl Lysispuffer „Cellytic™B“ (mit Lysozym und Benzonase; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) resuspendiert und mit einem Vortexer durchmischt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde für 5 min bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt lösliche Proteine und wurde durch SDS-PAGE und Western Blots mit anti-GRP94 Antikörper auf die Expression des rekombinanten Proteins analysiert.

### ***Expression des rekombinanten Fusionsproteins zur Gewinnung des terminalen GRP94-Fragmentes***

Eine 10 ml LB-Medium mit Ampicillin-Zusatz (50 µg/ml) wurde mit einer rekombinanten *E.coli* Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Über-Nacht-Kultur wurden 250 ml LB-Medium mit Ampicillin-Zusatz (50 µg/ml) angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach dem Abnehmen einer 500 µl Probe (nicht induzierte Kontrolle),

welche pelletiert und bei -20°C gelagert wurde, erfolgte die Induktion der Expression mit 0,2% (w/v) L-Arabinose. Nach 4-5 h Inkubation bei 37°C unter Schütteln wurde eine 500 µl Probe (induzierte Kontrolle) entnommen, pelletiert und bei -20°C gelagert. Die 250 ml Kultur wurde in 50 ml Röhrchen aliquotiert und für 15 min bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden bei -20°C gelagert. Die beiden Kontrollen wurden nach der Lyse massenspektrometrisch und durch einen Western Blot auf das Vorhandensein des rekombinanten Proteins analysiert. Die Pellets der 250 ml Kultur wurden verwendet, um das rekombinante Fusionsprotein mit Hilfe des „QIAexpress® Ni-NTA Fast Start Kits“ aufzureinigen (Kapitel 3.3.7.2).

### **3.6.11 Lagerung von *E.coli*-Klonen**

*E.coli*-Klone konnten für 1 Monat auf Agarplatten invertiert bei 4°C gelagert werden. Zur Langzeitlagerung wurde 850 µl *E. coli*-Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase mit 150 µl Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Entdeckung und Charakterisierung potentieller Tumorbiomarker im Serum**

Zur Früherkennung des kolorektalen Karzinoms würde eine nicht invasive Untersuchung durch einen Serumtest einen großen Fortschritt bedeuten, da ein solcher Test in der Bevölkerung eine höhere Akzeptanz als die Koloskopie aufweist. Hierfür werden sensitive und spezifische Biomarker benötigt, weshalb bekannte Tumorbiomarker wie CEA zur Früherkennung ungeeignet sind.

#### **4.1.1 Differentielle Analyse von Massenprofilen zur Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Serum**

Um neue Biomarkerkandidaten zu entdecken, wurden in einer initialen Studie Seren von drei Patientengruppen mit Hilfe der SELDI-TOF MS-Technologie untersucht. Hierbei sollten die Proteinmuster der Seren von Kontroll-Patienten ohne Tumorerkrankung (n=30) mit denen von Adenom-Patienten (n=29) und Karzinom-Patienten mit Tumorstadium III (n=28) verglichen werden. Die Seren wurden pH-abhängig mit Hilfe von Anionenaustauschermaterial (Q Ceramic Hyper D<sup>®</sup> F) fraktioniert. Für die weiteren Messungen wurden die 2 Fraktionen ausgewählt, in denen die meisten Peaks detektiert werden konnten. Dabei handelte es sich um die Fraktion, welche die Proteine enthielt, die bei einem pH-Wert von 9 nicht an das Anionenaustauschermaterial gebunden hatten, und um die Fraktion, bei der die Proteine bei einem pH-Wert von 4 eluiert werden konnten (nicht gezeigt). Diese beiden Fraktionen wurden unter Verwendung des CM10 ProteinChip<sup>®</sup> Arrays analysiert. Die Reproduzierbarkeit wurde durch einen mitgeführten Serumpool überprüft, der Variationskoeffizient betrug 30%.

Es konnten mehr als 20 zwischen den Gruppen differenziell exprimierte Proteine detektiert werden ( $p < 0,001$ ), eine Auswahl dieser Peaks zeigen Tabellen 22 und 23. Es wurden sowohl Peaks detektiert, deren Intensitäten von Kontroll-Patienten über Adenom-Patienten zu den Karzinom-Patienten anstiegen, als auch Peaks, deren

Intensitäten abnehmen. Trotz unterschiedlicher Mittelwerte zwischen den Gruppen zeigten die Peakintensitäten eine große Streuung innerhalb einer Patientengruppe.

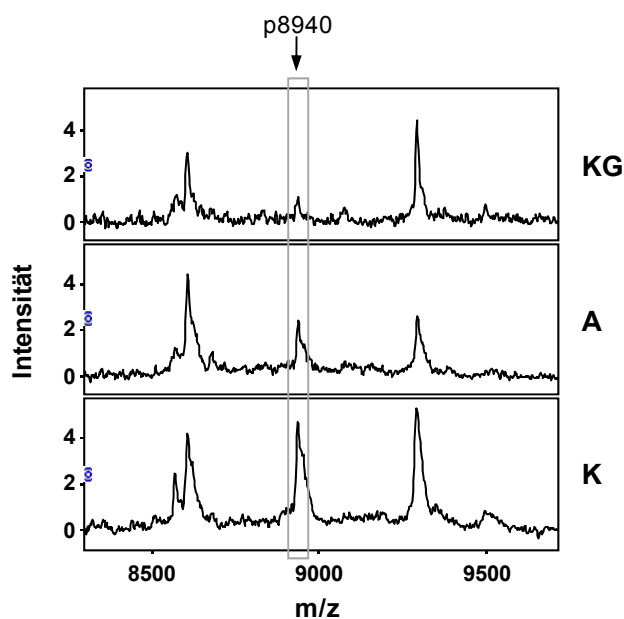
**Tab. 22: Durchschnittliche Peakintensitäten ausgewählter Biomarkerkandidaten der pH 9-Fraktion mit p-Werten kleiner als 0,001.** Die pH-abhängig fraktionierten Seren wurden unter Verwendung des CM10 ProteinChip® Arrays analysiert. Die p-Werte wurden mit nicht parametrischen Tests der Biomarker Wizzard Applikation generiert. Stabw.=Standardabweichung, KG=Kontrollgruppen-Patienten, A=Adenom-Patienten, K=Karzinom-Patienten

m/z	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Regulation	
	KG	KG	A	A	K	K	A/KG	K/KG
5347	0,97	0,45	1,24	0,67	1,65	0,81	1,3	1,7
5820	1,32	0,63	1,80	1,21	2,81	1,37	1,4	2,1
6121	5,07	1,90	5,88	1,94	8,12	3,24	1,2	1,6
6139	3,38	1,36	4,01	1,44	5,35	2,35	1,2	1,6
7175	1,23	0,71	1,63	0,95	2,26	1,98	1,3	1,8
8632	1,04	0,71	1,69	1,19	2,08	1,39	1,6	2,0
<b>8940</b>	<b>0,70</b>	<b>0,51</b>	<b>1,37</b>	<b>1,04</b>	<b>1,63</b>	<b>1,48</b>	<b>2,0</b>	<b>2,3</b>
79850	0,48	0,33	0,33	0,25	0,23	0,13	0,7	0,5

**Tab. 23: Durchschnittliche Peakintensitäten ausgewählter Biomarkerkandidaten der pH 4-Fraktion mit p-Werten kleiner als 0,001.** Die pH-abhängig fraktionierten Seren wurden unter Verwendung des CM10 ProteinChip® Arrays analysiert. Die p-Werte wurden mit nicht parametrischen Tests der Biomarker Wizzard Applikation generiert. Stabw.=Standardabweichung, KG=Kontrollgruppen-Patienten, A=Adenom-Patienten, K=Karzinom-Patienten

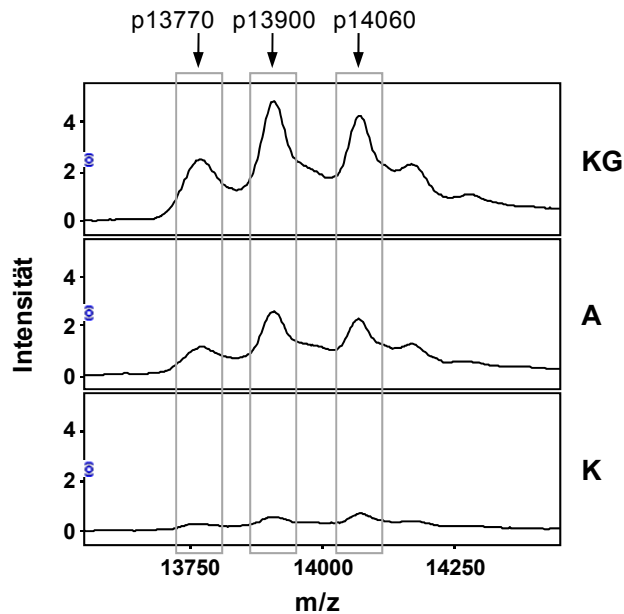
m/z	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Regulation	
	KG	KG	A	A	K	K	A/KG	K/KG
4975	0,31	0,15	0,49	0,26	0,72	0,45	1,6	2,3
6645	9,41	2,44	6,05	2,03	6,86	3,19	0,6	0,7
6850	1,10	0,29	0,69	0,21	0,81	0,33	0,6	0,7
6885	1,16	0,30	0,79	0,25	0,74	0,31	0,7	0,6
7055	0,75	0,16	0,55	0,15	0,51	0,20	0,7	0,7
<b>13770</b>	<b>1,73</b>	<b>0,46</b>	<b>1,16</b>	<b>0,33</b>	<b>1,01</b>	<b>0,49</b>	<b>0,7</b>	<b>0,6</b>
13900	3,66	0,88	2,59	0,81	2,30	1,04	0,7	0,6
14060	3,40	0,83	2,56	0,80	2,23	0,89	0,8	0,7

Die Peaks wurden bezüglich ihrer Qualität als Biomarkerkandidaten analysiert. Wichtige Faktoren für die Beurteilung waren neben den p-Werten die Streuung innerhalb der Gruppen, der Regulationsfaktor gegenüber der Kontrollgruppe, sowie die Sensitivität und die Spezifität der Biomarkerkandidaten. Die Adenom-Patienten ließen sich von den Kontroll-Patienten am besten mit Hilfe des Peaks mit  $m/z$   $8940 \pm 9$  separieren, das Protein wies durchschnittlich eine zweifache Regulation auf. Ebenso ermöglichte dieser Peak eine gute Trennung der Karzinom-Patienten von den Kontroll-Patienten. In beiden Gruppen der Tumor-Patienten, also sowohl bei den Adenom-Patienten als auch bei den Karzinom-Patienten, wurden im Durchschnitt für diesen Peak höhere Intensitäten als bei den Kontroll-Patienten detektiert. Repräsentative Massenspektren der drei Gruppen sind für diesen Peak in Abbildung 1 gezeigt.



**Abb. 1: Repräsentative Massenspektren der Serumfraktion pH 9 der drei Gruppen im Massenbereich des Biomarkerkandidaten mit  $m/z$   $8940 \pm 9$ .** SELDI-TOF MS-Analyse unter Verwendung des CM10 ProteinChip® Arrays. KG=Kontrollgruppen-Patient, A=Adenom-Patient, K=Karzinom-Patient

Ein weiterer vielversprechender Markerkandidat stellte der Peak mit  $m/z$   $13770 \pm 14$  dar, welcher im Gegensatz zu dem Protein p8940 in den Tumor-Patientengruppen geringere Peakintensitäten als bei den Kontroll-Patienten aufwies. Zwei Peaks mit ähnlichem Molekulargewicht ( $m/z$   $13900 \pm 14$  und  $m/z$   $14060 \pm 14$ ) zeigten ebenfalls eine Abnahme der Peakintensitäten und korrelierten hoch mit dem Peak mit  $m/z$   $13770 \pm 14$  ( $r= 0,75 - 0,93$ ). Dies deutet auf einen möglicherweise bestehenden Zusammenhang zwischen den Peaks hin. In Abbildung 2 sind repräsentative Massenspektren für die drei Gruppen dargestellt.



**Abb. 2: Repräsentative Massenspektren der Serumfraktion pH 4 der drei Gruppen im Massenbereich des Biomarkerkandidaten mit  $m/z$  13770  $\pm$  14.** SELDI-TOF MS-Analyse unter Verwendung des CM10 ProteinChip® Arrays. KG=Kontrollgruppen-Patient, A= Adenom-Patient, K=Karzinom-Patient

Basierend auf der Kombination der beiden Proteine p8940 und p13770 konnten alle Kontroll-Patienten, 20 der 29 Adenom-Patienten und 20 der 28 Karzinom-Patienten richtig klassifiziert werden. Dies entspricht einer Sensitivität von 70% bei einer Spezifität von 100% für die Unterscheidung der Kontroll-Patienten von den Adenom- und Karzinom-Patienten.

#### 4.1.2 Validierung der initialen Studie zur Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Serum

In einer zweiten Studie sollten die potentiellen Tumormarker durch Analyse unabhängiger Proben validiert werden. Hierfür wurden Serumproben von Patienten ohne Tumorerkrankung (n=30), Adenom-Patienten (n=29) und Karzinom-Patienten mit Tumorstadium III (n=30) untersucht. Wie in der initialen Studie wurden die Seren mit Hilfe von Anionenaustauschermaterial (Q Ceramic Hyper D® F) pH-abhängig fraktioniert und unter Verwendung des CM10 ProteinChip® Arrays mit Hilfe der SELDI-Technologie analysiert. Die Reproduzierbarkeit wurde durch einen mitgeführten Serumpool überprüft, der Variationskoeffizient betrug 27%.

Die meisten potentiellen Markerproteine der initialen Studie zeigten erneut signifikante Unterschiede der durchschnittlichen Peakintensitäten zwischen den Kontroll-Patienten, den Adenom- und den Karzinom-Patienten. Auch die beiden ausgewählten Proteine p8940 und p13770, deren Kombination in der initialen Studie

zu einer erfolgreichen Klassifizierung der meisten Tumor-Patienten geführt hatte, wiesen eine ähnliche Verteilung der Peakintensitäten wie in der initialen Studie auf. In der zweiten Studie wurden allerdings für den Peak mit  $m/z$  8940  $\pm$  9 Da bei den Adenom-Patienten durchschnittlich höhere Intensitäten als bei den Karzinom-Patienten gemessen. Die Intensitäten des Peaks mit  $m/z$  13770  $\pm$  14 zeigten in der zweiten Studie generell höhere Intensitäten als in der initialen Studie. Bedingt durch eine größere Varianz der Peakintensitäten innerhalb der Gruppen lassen sich die Patienten mit Hilfe dieses Peaks weniger erfolgreich als in der initialen Studie klassifizieren. Dadurch reduzierte sich die Sensitivität der Kombination beider Peaks auf 53% bei einer Spezifität von 93% für die Diagnostik der Tumor-Patienten im Vergleich zur initialen Studie. Dennoch erwiesen sich sowohl das Protein p8940 als auch das Protein p13770 in beiden Studien als vielversprechende Tumormarkerkandidaten und wurden für weitere Analysen selektiert.

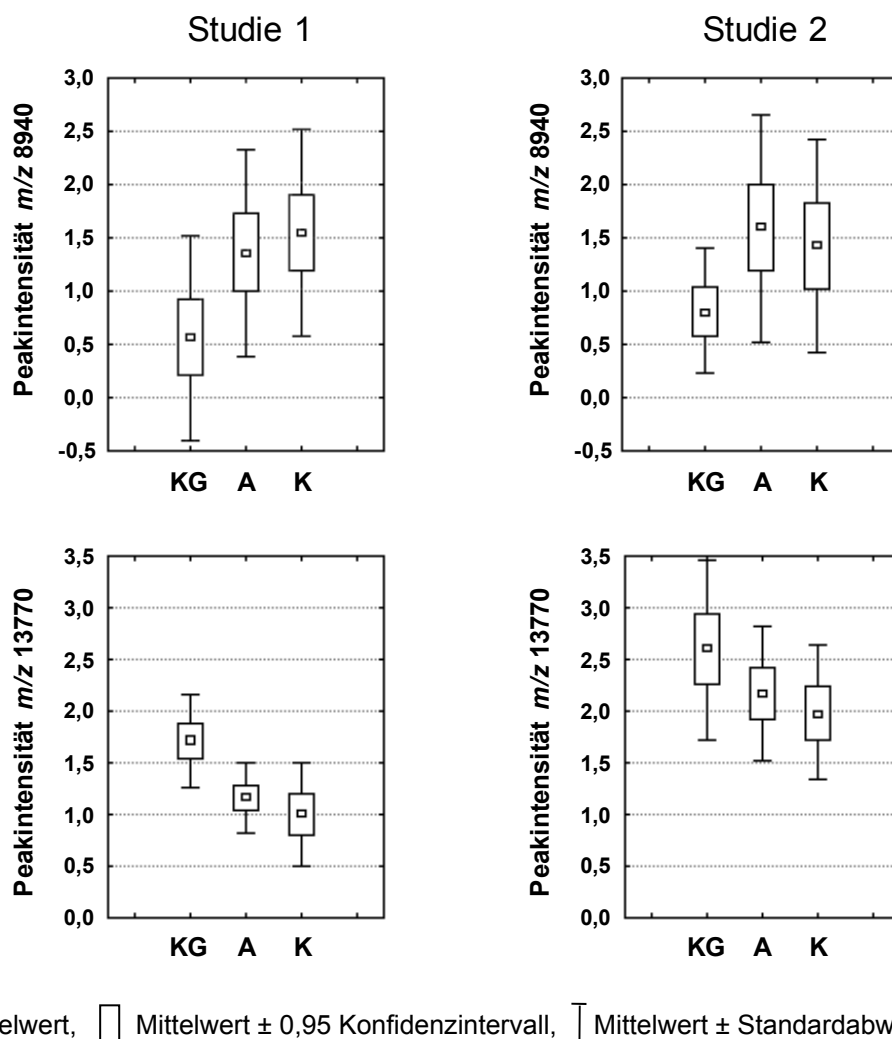


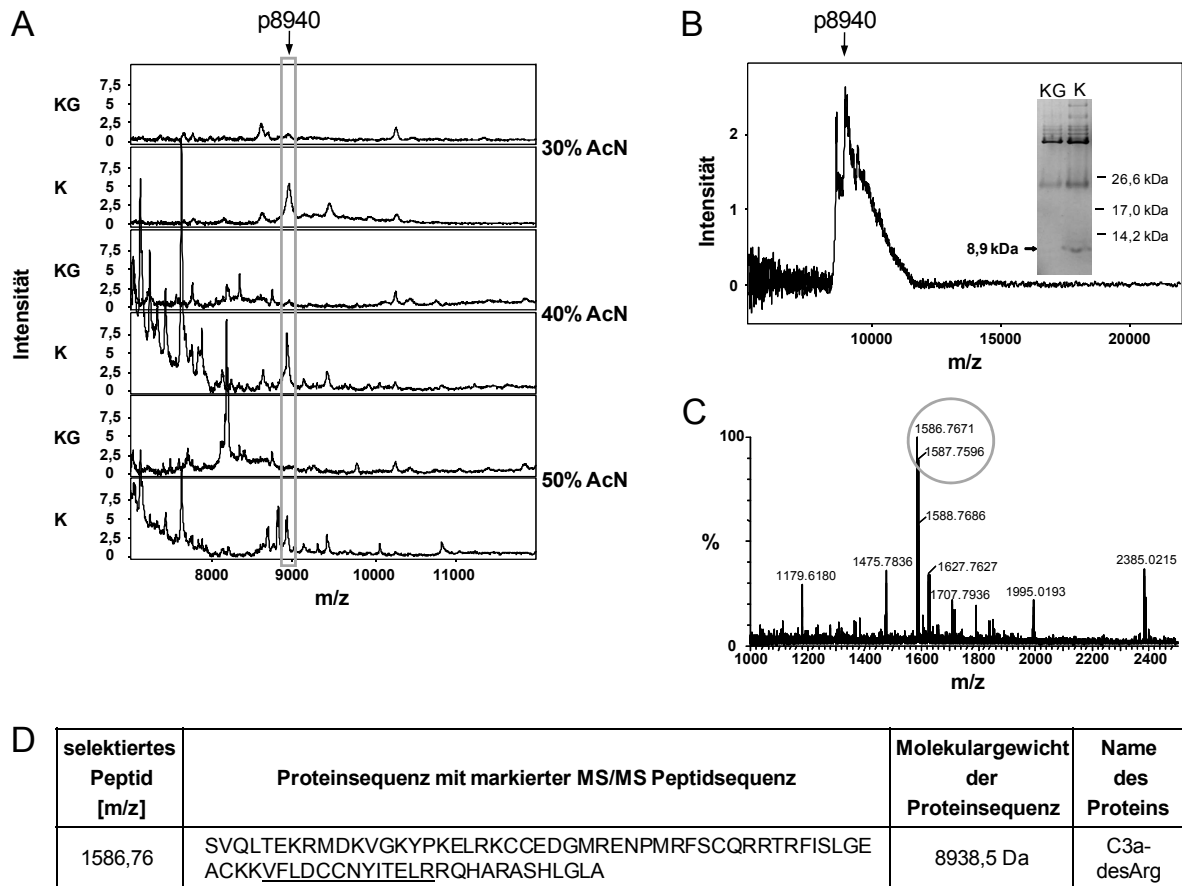
Abb. 3: Box Plots der mit SELDI-TOF MS gemessenen Peakintensitäten der drei Gruppen beider Studien für die Proteine p8940 und p13770. KG=Kontrollgruppen-Patienten, A=Adenom-Patienten, K=Karzinom-Patienten

### 4.1.3 Identifizierung des Proteins p8940 als C3a-desArg

Um das Protein p8940 näher zu charakterisieren und die massenspektrometrische Serumanalyse durch antikörperbasierte Methoden überprüfen zu können, sollte dieses Protein identifiziert werden. Basierend auf den Kenntnissen der chromatographischen Eigenschaften des Proteins aus den Studien, wurde als erster Schritt der Anreicherungs- und Aufreinigungsstrategie die Anionenaustauschchromatographie gewählt. Dieses Protein konnte im Gegensatz zu vielen anderen Serumproteinen nicht an das verwendete Anionenaustauschermaterial (Q Ceramic Hyper D<sup>®</sup> F) gebunden werden (Fraktion pH 9). Somit bestand der erste Schritt der Anreicherung in der Herstellung einer ausreichenden Menge dieser Fraktion. Hierfür wurde ein Serumpool von Kontroll-Patienten und ein Serumpool von Karzinom-Patienten analog zu den Studien behandelt und fraktioniert. Die erhaltenen pH 9-Fraktionen wurden einem weiteren Aufreinigungsschritt unterzogen, bei dem die Proteine an Reversed Phase-Beads (Poly Beads<sup>™</sup>, BioSeptra) gebunden und anschließend durch ansteigende Acetonitrilkonzentrationen eluiert wurden. Die Kontrolle der erhaltenen Fraktionen erfolgte durch SELDI-TOF MS. Wie in Abbildung 4A gezeigt, konnte eine Anreicherung und ausreichende Aufreinigung des Biomarkerkandidaten in der 30% Acetonitril- und in der 40% Acetonitril-Fraktion erzielt werden. Diese beiden Fraktionen wurden aufkonzentriert und die Proteine anschließend in einem 16%igen Tris-Tricin-Gel aufgetrennt (Abb. 4B, Gelausschnitt). Proteinbanden, die sich im erwarteten Molekulargewichtsbereich befanden und bei denen ein deutlicher Unterschied zwischen den Proben der Kontroll- und Tumor-Patienten erkennbar war, wurden ausgeschnitten. Nach der Elution der Proteine erfolgte deren Molekulargewichtsbestimmung. Das Eluat, welches den Biomarkerkandidaten enthielt (Abb. 4B, Spektrum), wurde einem Trypsinverdau unterzogen und dieser zunächst mit SELDI-TOF MS analysiert (nicht gezeigt). Sieben der Peptidfragmente ließen sich dem Komplementfaktor C3 zuordnen. Die genauere Analyse der tryptischen Peptidfragmente führte die Firma Ciphergen mit einem ProteinChip Interface, welches an ein Q-TOF MS-System gekoppelt war, durch. Neben dem „Peptide Mapping“ erfolgte die Sequenzierung des Peptids mit  $m/z$  1586,76 (Abb. 4C). Die erhaltene Sequenz VFLDCCNYITELR konnte bestätigen, dass es sich bei dem Biomarkerkandidaten mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Protein C3a Anaphylatoxin handelt (Abb. 4D). Das geringere Molekulargewicht des potentiellen Biomarkers von ca. 8940 Da gegenüber dem publizierten



Molekulargewicht von 9094 Da für C3a legt einen Verlust des C-terminalen Arginins nahe. C3a-desArg stellt die stabilere und nichtreaktive Form des C3a Anaphylatoxins dar (71).

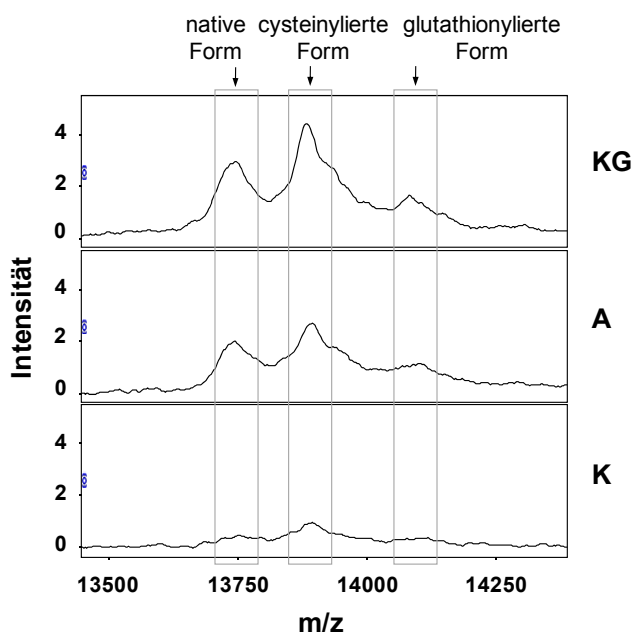


**Abb. 4: Aufreinigung und Identifizierung des Proteins p8940 als C3a-desArg.** A) SELDI-TOF Massenspektren (NP20 ProteinChip® Array) einzelner Fraktionen nach Anreicherung und Aufreinigung mit Hilfe von RP-Beads. Nach dem Binden wurden die Proteine durch einen schrittweise ansteigenden Acetonitril-Gradienten von 10 bis 60% eluiert. B) Weitere Auftrennung der Proteine der Fraktionen 30 und 40% Acetonitril mit Hilfe eines 16%igen Tris-Tricin-Gels (nicht reduzierend). Proteinbanden im erwarteten Molekulargewichtsbereich, die eine Hochregulation bei der Probe der Tumor-Patienten aufwiesen, wurden ausgeschnitten und die Proteine passiv eluiert. Durch Analyse mit SELDI-TOF MS unter Verwendung des NP20 ProteinChip® Arrays wurde das Eluat bestimmt, welches den Biomarkerkandidaten enthielt. C) Q-TOF Massenspektrum der tryptischen Peptidfragmente des Proteins p8940. Die tryptischen Peptide wurden mit einem ProteinChip Interface gekoppelt an ein Q-TOF MS-System gemessen und das Peptid mit  $m/z$  1586,76 sequenziert. D) Identifizierung des Proteins durch die erhaltene Peptidsequenz als C3a-desArg. KG=Kontrollgruppen-Patienten, K=Karzinom-Patienten, AcN=Acetonitril

#### 4.1.4 Identifizierung des Proteins p13770 als Transthyretin

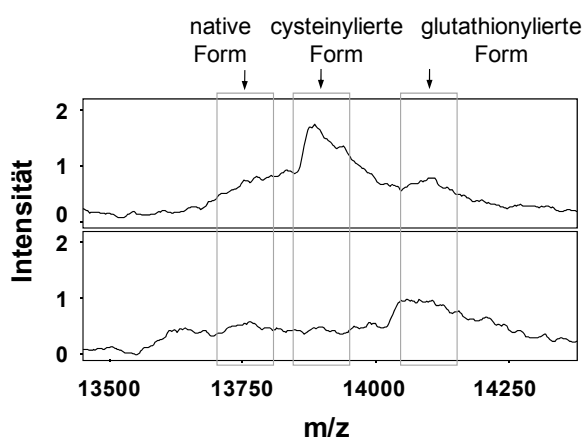
Das Protein p13770 allein und in der Kombination mit dem als C3a-desArg identifizierten Protein p8940 ermöglichte eine Klassifizierung der Patienten und war daher zur Identifizierung selektiert worden. Das Molekulargewicht des Peaks mit  $m/z$  13770  $\pm$  14 zusammen mit den weiteren Peaks mit  $m/z$  13900  $\pm$  14 und mit  $m/z$  14060  $\pm$  14 legten die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Peak um eine Kette des Serumproteins Transthyretin handeln könnte. Neben der nativen Form ( $m/z$  13758  $\pm$  7) liegt im Serum und Plasma vor allem die S-cysteinylierte Variante ( $m/z$  13876  $\pm$  13) vor, weiterhin wurden eine S-cysteinglycinylierte ( $m/z$  13924  $\pm$  21) und eine glutathionylierte Form ( $m/z$  14062  $\pm$  24) beschrieben (72).

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde Serum mit Hilfe des „ProteinChip Antibody Capture Kit“ (CIPHERGEN Biosystems Inc.) getestet. Dabei wurden polyklonale anti-Transthyretin Antikörper an einen Protein G Array gebunden und anschließend mit der entsprechenden Serum-Fraktion von je 6 Kontroll-Patienten, Adenom-Patienten oder Karzinom-Patienten inkubiert. Es ließen sich Peaks detektieren, deren Molekulargewichte 13761 Da, 13914 Da and 14102 Da mit dem für Transthyretin typischen Muster posttranslationaler Modifikationen übereinstimmen. Wie in den beiden Studien wiesen die Seren der Patienten der Kontrollgruppe die höchsten Peakintensitäten auf, bei den Seren der Adenom-Patienten wurden geringere Werte gemessen und die Seren der Karzinom-Patienten zeigten die geringsten Intensitätswerte (Abb. 5).



**Abb. 5: Repräsentative SELDI-TOF Massenspektren der Immunoaffinitätsmessung von Transthyretin und dessen Derivaten.** Auf Protein G Arrays wurden polyklonale anti-Transthyretin Antikörper immobilisiert, mit den Serumfraktionen pH 4 inkubiert und mit SELDI-TOF MS analysiert. KG=Kontrollgruppen-Patient, A=Adenom-Patient, K=Karzinom-Patient

Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde eine Immunpräzipitation mit dem anti-Transthyretin Antikörper durchgeführt. Im Präzipitat konnten 3 Proteine mit Molekulargewichten von 13776 Da, 13883 Da und 14103 Da nachgewiesen werden. Die Proteine mit den Molekulargewichten 13776 Da und 13883 Da waren im Überstand signifikant reduziert, während die Variante mit dem Molekulargewicht von 14103 Da nicht depletiert werden konnte (Abb. 6). Diese Versuche bestätigten die Annahme, dass es sich bei dem Biomarkerkandidaten p13770 um eine Variante einer Kette des Transthyretins handelt.



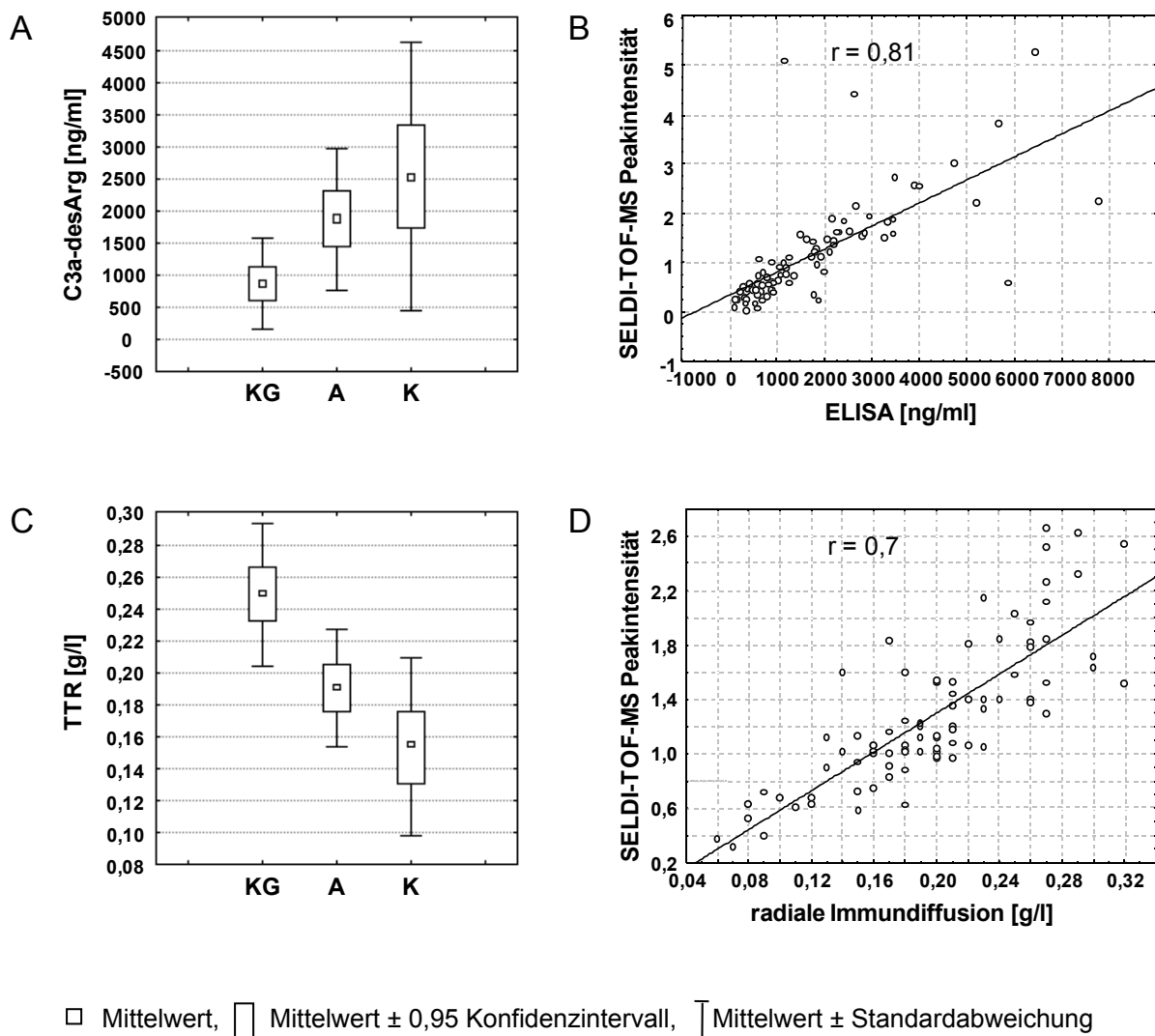
**Abb. 6: SELDI-TOF Massenspektren der Immunpräzipitation von Transthyretin und dessen Derivaten.** Die Serumfraktionen pH 4 wurden mit anti-Transthyretin Antikörper inkubiert. Anschließend wurde mit Protein A/G Agarose präzipitiert. Präzipitat und Überstand wurden mit SELDI-TOF MS unter Verwendung des CM10 Protein Chip® Arrays analysiert. P=Präzipitat, ÜS=Überstand

#### 4.1.5 Antikörperbasierte Assays für C3a-desArg und Transthyretin

Da nun die Identität der potentiellen Tumormarker bekannt war, konnten die mit der SELDI-TOF MS-Technologie erhaltenen Daten durch antikörperbasierte Methoden überprüft werden. Die C3a-desArg-Konzentrationen der Seren der Patienten der initialen Studie wurden durch einen ELISA-Test, die Konzentrationen von Transthyretin in einem klinischen Servicelabor mit Hilfe von radialer Immundiffusion bestimmt.

Die Mittelwerte der Serumkonzentrationen von C3a-desArg waren bei den Adenom-Patienten ( $1871 \pm 1091$  ng/ml) und bei den Karzinom-Patienten ( $2513 \pm 2060$  ng/ml) signifikant höher als bei den Kontroll-Patienten ( $864 \pm 679$  ng/ml) (Abb. 7A). Der Mittelwert der C3a-desArg-Konzentration der Karzinom-Patienten lag über dem der Adenom-Patienten, sie unterschieden sich jedoch nicht signifikant. Der Serumlevel von Transthyretin nahm von den Kontroll-Patienten ( $0,25 \pm 0,04$  g/l) zu den Adenom-Patienten ( $0,19 \pm 0,03$  g/l) und zu den Karzinom-Patienten ( $0,15 \pm 0,05$  g/l) in den

Mittelwerten deutlich ab (Abb. 7C). Wie die Streudiagramme in Abbildung 7 demonstrieren, korrelieren die Peakintensitäten der Proteine p8940 (Abb. 7B) und p13770 (Abb. 7D) hoch mit den Konzentrationen von C3a-desArg und Transthyretin. In Tabelle 24 sind die Mittelwerte und die p-Werte beider Tumormarkerkandidaten von der SELDI-TOF MS-Messung sowie von den antikörperbasierten Methoden zusammengefasst.

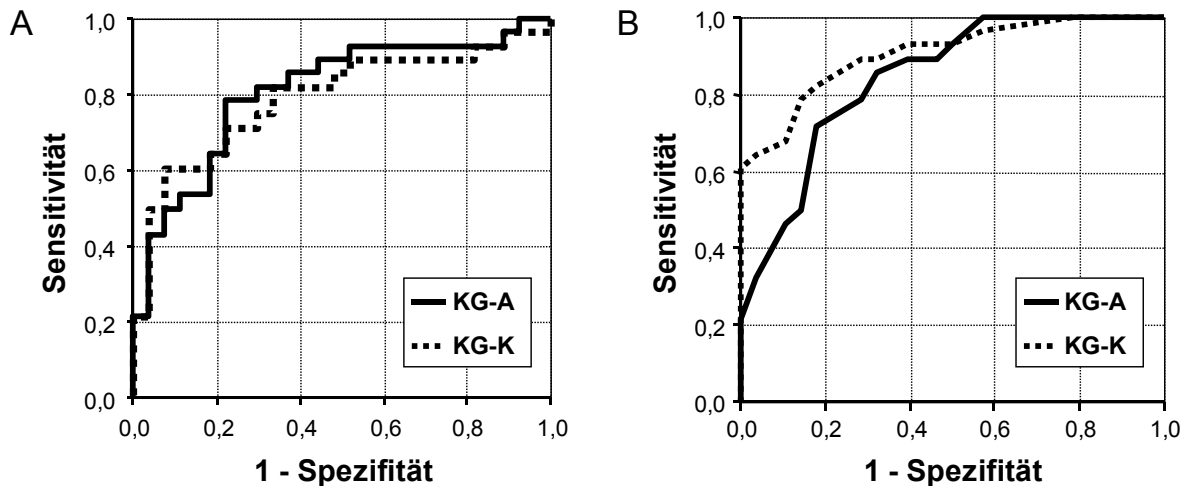


**Abb. 7: Analyse von Serum der Patienten der initialen Studie mit Hilfe von antikörperbasierten Methoden.** A) Box Plot der C3a-desArg-Serumkonzentrationen der drei Gruppen. Die Konzentrationen von C3a-desArg wurden mit Hilfe eines ELISA-Tests ermittelt. B) Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Intensität des Peaks mit  $m/z$  8940  $\pm$  9 und der Konzentration von C3a-desArg. C) Box Plot der Transthyretin-Serumkonzentrationen der drei Gruppen. Die Konzentrationen von Transthyretin wurden durch radiale Immundiffusion bestimmt. D) Streudiagramm zur Darstellung der Korrelation zwischen der Intensität des Peaks mit  $m/z$  13770  $\pm$  14 und der Konzentration von Transthyretin. TTR=Transthyretin,  $r$ =Korrelationskoeffizient, KG=Kontrollgruppen-Patienten, A=Adenom-Patienten, K=Karzinom-Patienten

**Tab. 24: Serumlevel der Biomarkerkandidaten in den drei Gruppen bestimmt durch massenspektrometrische Analyse sowie Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von antikörperbasierten Methoden.** Nach Kenntnis der Identität der potentiellen Biomarker p8940 und p13770 wurden die Serumkonzentrationen von C3a-desArg durch einen ELISA-Test und die Serumkonzentrationen von Transthyretin mit Hilfe von radialer Immundiffusion bestimmt. Hierfür wurden die Seren der Patienten der initialen Studie verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung für die drei Gruppen sowie die p-Werte. Stabw.=Standardabweichung, KG=Kontrollgruppen-Patienten, A=Adenom-Patienten, K=Karzinom-Patienten

	Serumlevel der Biomarkerkandidaten (Mittelwert $\pm$ Stabw.)				p-Werte			
	KG (n=28)	A (n=28)	K (n=28)	A + K (n=56)	KG vs. A	KG vs. K	KG vs. A + K	A vs. K
<b>m/z 8940</b> [Peakintensität] SELDI-TOF MS	0,57 $\pm$ 0,38	1,36 $\pm$ 1,01	1,55 $\pm$ 1,27	1,45 $\pm$ 1,14	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,54
<b>C3a-desArg</b> [ng/ml] ELISA	863,51 $\pm$ 678,93	1871,12 $\pm$ 1090,62	2513,33 $\pm$ 2060,46	2192,23 $\pm$ 1665,25	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,15
<b>m/z 13770</b> [Peakintensität] SELDI-TOF MS	1,72 $\pm$ 0,46	1,12 $\pm$ 0,28	0,99 $\pm$ 0,49	1,06 $\pm$ 0,40	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,24
<b>Transthyretin</b> [g/l] Immundiffusion	0,25 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,0046

Die ermittelten Serumkonzentrationen von C3a-desArg und Transthyretin ermöglichen eine Klassifizierung der Patienten mit kolorektalem Adenom und Karzinom (Abb. 8A und 8B). Mit diesen Daten ergeben sich für die Diagnostik von Adenom-Patienten mit Hilfe von C3a-desArg eine Sensitivität von 78,5% bei einer Spezifität von 77,5% und für die Diagnostik mit Hilfe von Transthyretin eine Sensitivität von 85,7% bei einer Spezifität von 67,8% (Tab. 25). Werden die Konzentrationen von C3a-desArg und Transthyretin zur Klassifizierung mit Hilfe von Entscheidungsbäumen unter Nutzung des CART-Algorithmus eingesetzt, können die Sensitivität und die Spezifität für die Adenom-Patienten auf 96,4% und 70,3% erhöht werden. C3a-desArg ermöglicht die Klassifizierung der Karzinom-Patienten mit einer Sensitivität von 60,7% bei einer Spezifität von 92,5%, Transthyretin die Klassifizierung mit einer Sensitivität von 60,7% bei einer Spezifität von 100%. Im Gegensatz zur Diagnostik der Adenom-Patienten kann bei den Karzinom-Patienten keine Verbesserung bezüglich der Sensitivität und Spezifität durch die Kombination beider Biomarkerkandidaten erzielt werden (Tab. 25).



**Abb. 8: Vergleich der ROC-Kurven für die Serumkonzentrationen von C3a-desArg und Transthyretin der Patienten der initialen Studie.** A) ROC-Kurve für C3a-desArg-Serumkonzentrationen der Kontrollgruppe vs. Adenom-Patienten (KG-A) und der Kontrollgruppe vs. Karzinom-Patienten (KG-K). Die Konzentrationen von C3a-desArg wurden mit Hilfe eines ELISA-Tests ermittelt. Fläche unter der Kurve (AUC=area under the curve): 0,958; Standardfehler (SE=standard error): 0,028 vs. AUC 0,844; SE 0,054). B) ROC-Kurve für Transthyretin-Serumkonzentrationen der Kontrollgruppe vs. Adenom-Patienten (KG-A) und der Kontrollgruppe vs. Karzinom-Patienten (KG-K). Die Konzentrationen von Transthyretin wurden durch radiale Immundiffusion bestimmt. AUC 0,842; SE 0,054 vs. AUC 0,905; SE 0,042. KG=Kontrollgruppen-Patienten, A=Adenom-Patienten, K=Karzinom-Patienten

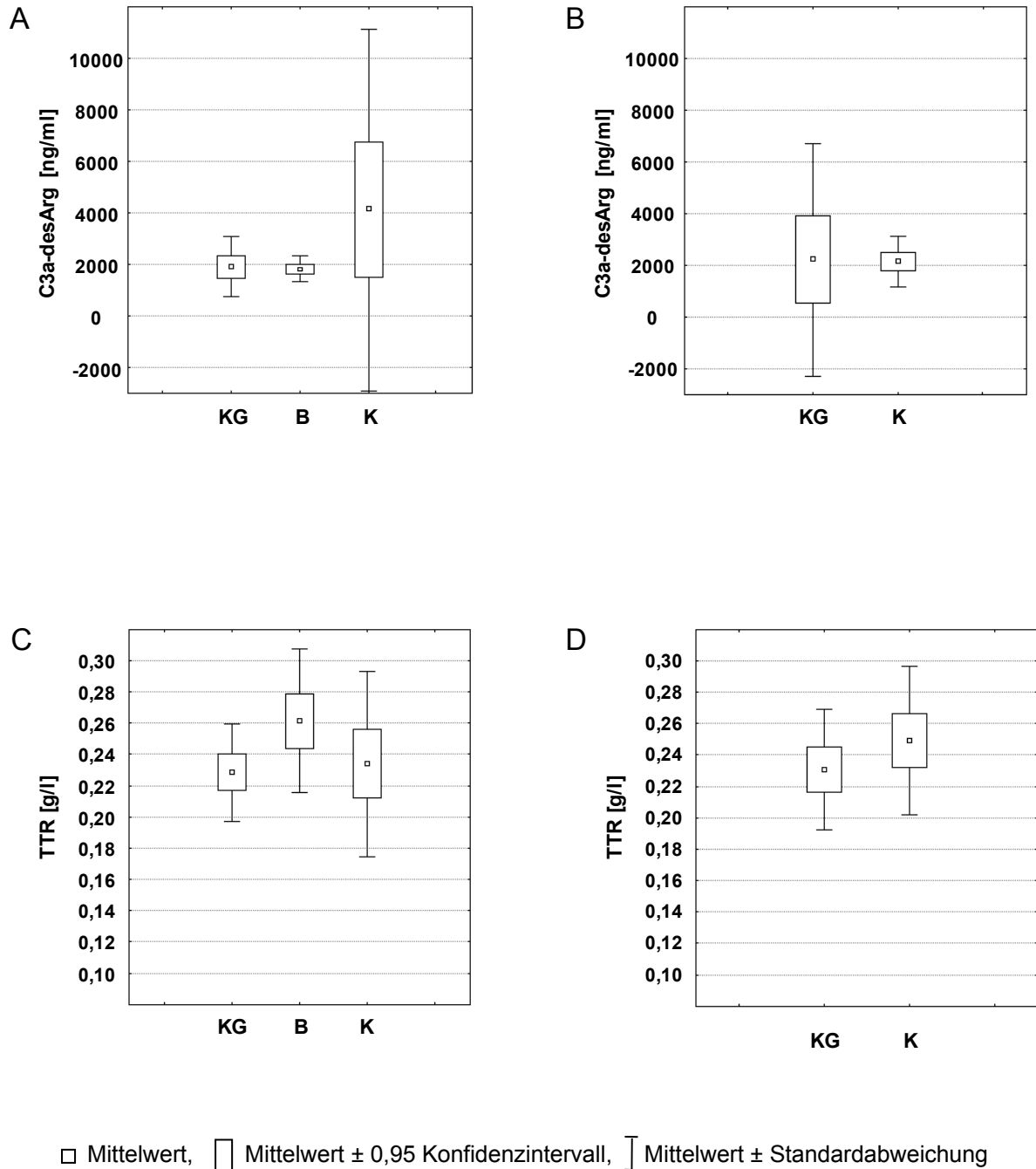
**Tab. 25: Kalkulation der Sensitivität und Spezifität bei optimalen Cut-off-Werten für die Konzentrationen von C3a-desArg und Transthyretin und die Kombination beider Proteinkonzentrationen.** Die Serumkonzentrationen von C3a-desArg wurden durch einen ELISA-Test und die Serumkonzentrationen von Transthyretin mit Hilfe von radialer Immundiffusion bestimmt. Hierfür wurden die Seren der Patienten der 1. Studie verwendet. TTR=Transthyretin, KG=Kontrollgruppen-Patienten, A=Adenom-Patienten, K=Karzinom-Patienten

	C3a-desArg		Transthyretin		C3a-desArg + Transthyretin	
	Sensitivität	Spezifität	Sensitivität	Spezifität	Sensitivität	Spezifität
<b>KG vs. A</b>	78,5% (cut off 990 ng/ml)	77,5%	85,7% (cut off 0,225 g/l)	67,8%	96,4% (cut off 1974 ng/ml C3a und 0,225 g/l TTR)	70,3%
<b>KG vs. K</b>	60,7% (cut off 1786 ng/ml)	92,5%	60,7% (cut off 0,165 g/l)	100%	60,7% (cut off 0,165 g/l TTR)	100%

#### **4.1.6 Untersuchung zur Spezifität der potentiellen Tumorbiomarker C3a-desArg und Transthyretin**

Um zu prüfen wie spezifisch die beiden Biomarkerkandidaten C3a und Transthyretin für das kolorektale Adenom und Karzinom sind, wurden Seren von Patienten mit Prostatakarzinom und Seren von Patientinnen mit Mammakarzinom untersucht. Weiterhin wurden Seren von Patientinnen analysiert, bei denen eine benigne Erkrankung der Brust diagnostiziert worden war. Die Konzentrationen von C3a-desArg wurden mit einem ELISA, die Transthyretin-Konzentrationen mit radialer Immundiffusion bestimmt.

Weder die C3a-desArg-Konzentrationen noch die Transthyretin-Konzentrationen zeigten statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Karzinom-Patienten (Abb. 9). Im Gegensatz zu den Adenom-Patienten, bei denen eine Abnahme der Transthyretin-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet wurde, nahmen die Serumkonzentrationen bei den Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen signifikant zu. Die C3a-desArg-Serumlevel wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Aufgrund dieser initialen Daten kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Biomarkerkandidaten C3a-desArg und Transthyretin nicht zur Diagnostik des Prostatakarzinoms und des Mammakarzinoms geeignet sind, sondern spezifisch für kolorektale Tumorerkrankungen sein könnten, was in Folgestudien validiert werden müsste.



**Abb. 9: Bestimmung der C3a-desArg und Transthyretin Serumkonzentrationen von Patienten mit anderen Tumorerkrankungen mit Hilfe antikörperbasierter Methoden.** A, C) Box Plots der C3a-desArg- (A) und Transthyretin- (C) Serumkonzentrationen bei Kontrollgruppen-Patientinnen, Patientinnen mit benigner Brustkrankung (Mastopathie) und Patientinnen mit Mammakarzinom. B, D) Box Plots der C3a-desArg- (B) und Transthyretin- (D) Serumkonzentrationen bei Kontrollgruppen-Patienten und Patienten mit Prostatakarzinom. Die Konzentrationen von C3a-desArg wurden mit Hilfe eines ELISA-Tests und die Konzentrationen von Transthyretin mit Hilfe von radialer Immundiffusion bestimmt. TTR=Transthyretin, KG=Kontrollgruppen-Patienten, B=Patientinnen mit benigner Brustkrankung (Mastopathie), K=Karzinom-Patienten



## **4.2 Entdeckung und Charakterisierung potentieller Tumorbiomarker im Gewebe**

Neben der Suche nach Tumorbiomarkern zur Früherkennung im Blut wurde eine weitere Strategie verfolgt, nämlich die vergleichende Analyse von Tumor- und Normalgewebe. Durch diese Untersuchungen können differentiell exprimierte Proteine identifiziert werden, die entweder direkt durch den Tumor oder das den Tumor umgebende Gewebe synthetisiert oder modifiziert werden. Solche Proteine können neben neuen Erkenntnissen über die Veränderungen des Proteoms bei der malignen Transformation eine Bedeutung als Früherkennungsmarker erlangen, wenn sie sich mit Hilfe antikörperbasierter Methoden im Blut detektieren lassen.

### **4.2.1 Differentielle Analyse von Massenprofilen zur Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Gewebe**

In dieser Studie wurden Tumorgewebe sowie korrespondierendes Normalgewebe von Adenom-Patienten (n=30) und Karzinom-Patienten mit Tumorstadium III (n=30) untersucht. Die stickstofffixierten Gewebeproben wurden mit einem Kryostaten geschnitten und mikroskopisch kontrolliert. Dabei erfolgte beim Tumorgewebe die Bestimmung des Tumor-/Stroma-Verhältnisses im Gewebeschnitt. Die Gewebeschnitte wurden lysiert und die Proteine unter Verwendung des SAX2 ProteinChip<sup>®</sup> Arrays massenspektrometrisch mit Hilfe der SELDI-Technologie gemessen. Die Reproduzierbarkeit wurde durch einen mitgeführten Pool aus Gewebelysaten überprüft, der Variationskoeffizient betrug 16%.

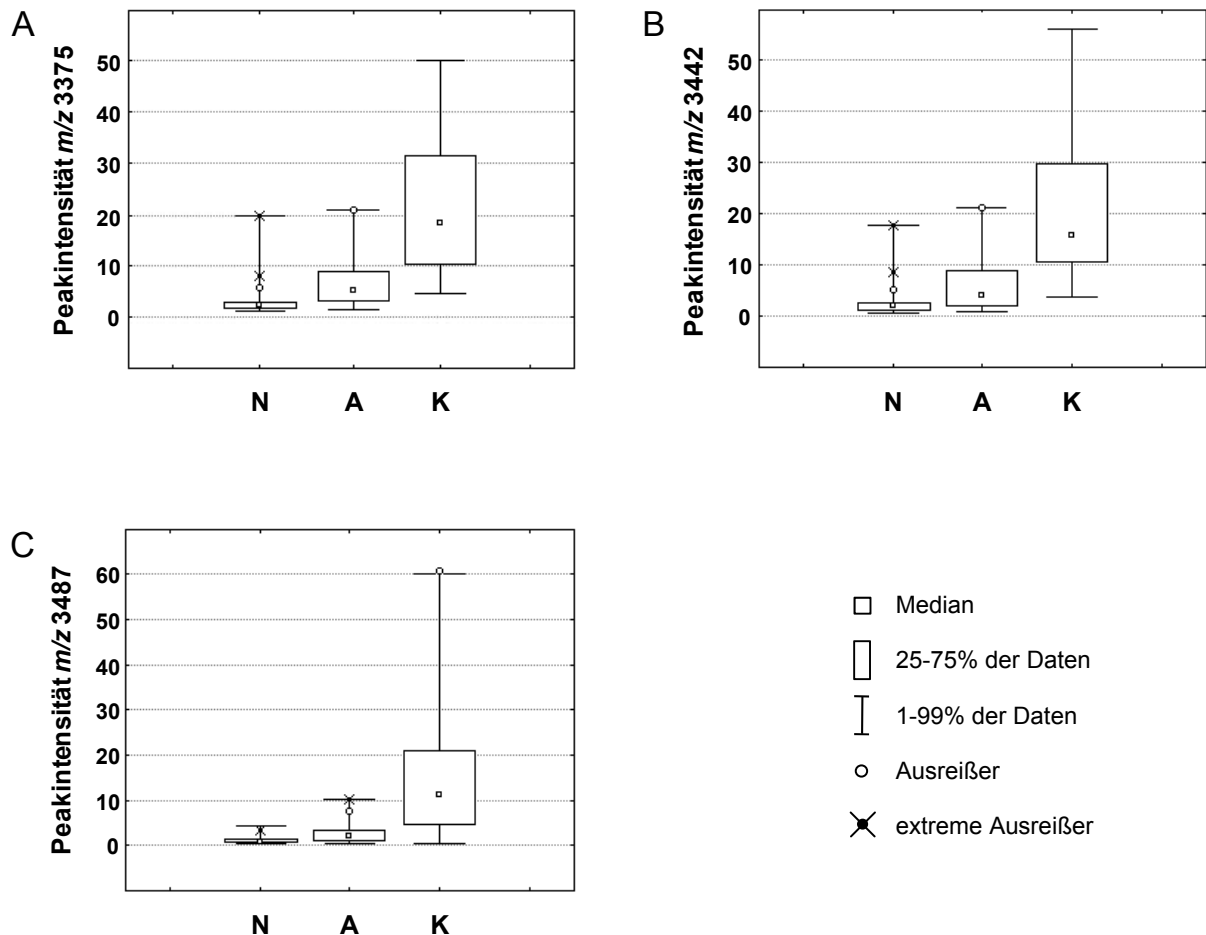
In dieser Studie konnten sehr viele Peaks mit signifikanten durchschnittlichen Intensitätsunterschieden zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe detektiert werden. Der Vergleich zwischen Normalgewebe und Adenomgewebe zeigte bei mehr als 60 Peaks p-Werte kleiner als 0,001. Von diesen Peaks wiesen 11 Peaks eine mehr als zweifache Änderung der durchschnittlichen Intensität auf. Die Analyse von Normal- und Karzinomgewebe ergab 61 Peaks mit p-Werten kleiner als 0,001. Von diesen lagen 14 Proteine in den Mittelwerten mehr als zweifach differentiell exprimiert vor. 23 Peaks zeigten eine in den Mittelwerten der Peakintensitäten ansteigende oder abfallende Tendenz von Normalgewebe über Adenomgewebe zu

Karzinomgewebe mit p-Werten kleiner als 0,001. Von diesen waren 6 Proteine durchschnittlich jeweils mindestens zweifach reguliert. Tabelle 26 fasst alle Peaks mit p-Werten kleiner als 0,001 und einer mindestens zweifachen Änderung der Peakintensität zusammen.

**Tab. 26: Durchschnittliche Peakintensitäten ausgewählter Biomarkerkandidaten mit p-Werten kleiner als 0,001 und mindestens zweifacher Intensitätsänderung beim Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe (Markierung).** Die Gewebelysate wurden unter Verwendung des SAX ProteinChip® Arrays analysiert. Die p-Werte wurden mit nicht-parametrischen Tests der Biomarker Wizzard Applikation generiert. Stabw.=Standardabweichung, N=Normalgewebe, A=Adenomgewebe, K=Karzinomgewebe

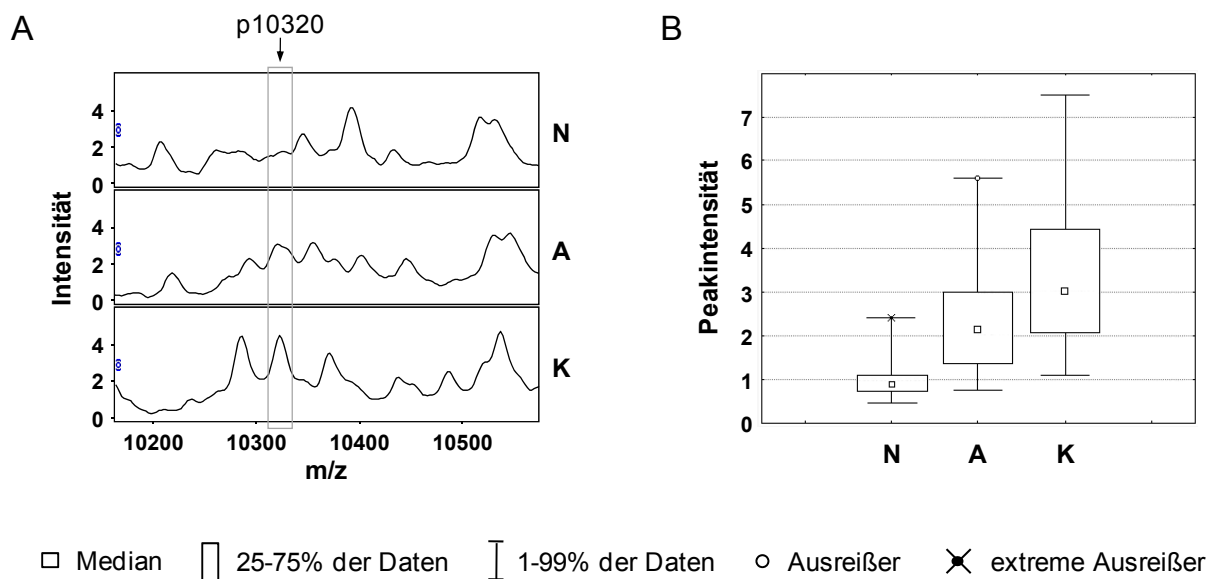
<i>m/z</i>	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Regulation	
	N	N	A	A	K	K	A/N	K/N
3375	3,24	3,25	6,67	4,76	21,38	13,15	<b>2,1</b>	<b>6,6</b>
3442	2,74	3,17	5,74	5,20	20,20	13,66	<b>2,1</b>	<b>7,4</b>
3487	1,28	1,13	2,52	2,44	15,27	13,77	<b>2,0</b>	<b>11,9</b>
3609	1,03	1,03	1,61	1,13	2,13	1,27	1,6	<b>2,1</b>
4570	1,87	1,12	1,53	1,30	4,12	2,33	0,8	<b>2,2</b>
4837	0,57	0,27	1,68	1,13	0,59	0,23	<b>2,9</b>	1,0
5615	0,66	0,37	1,03	0,50	1,41	0,53	1,6	<b>2,1</b>
5742	0,66	0,58	0,33	0,23	0,34	0,25	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>
5802	1,04	0,72	0,54	0,37	0,43	0,36	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>
6704	1,17	0,61	0,85	0,35	0,56	0,29	0,7	<b>0,5</b>
7754	3,64	1,52	1,44	0,71	2,02	0,88	<b>0,4</b>	0,6
7977	0,61	0,42	0,45	0,25	1,97	1,31	0,7	<b>3,2</b>
8217	0,84	0,94	1,77	1,66	1,19	0,73	<b>2,1</b>	1,4
8837	0,97	0,48	0,88	0,29	1,96	1,20	0,9	<b>2,0</b>
10324	0,99	0,68	2,32	1,31	3,48	1,56	<b>2,4</b>	<b>3,5</b>
10945	0,43	0,14	0,43	0,12	0,85	0,35	1,0	<b>2,0</b>
13548	0,62	0,28	1,00	0,46	1,30	0,61	1,6	<b>2,1</b>
15121	2,26	2,02	1,21	0,85	1,69	0,73	<b>0,5</b>	0,7
15871	1,48	1,49	0,69	0,56	0,93	0,43	<b>0,5</b>	0,6

Zu den Peaks, bei denen die größten Intensitätsunterschiede zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe detektiert wurden, gehörten die drei Peptide mit  $m/z$  3375  $\pm$  3 (Abb. 10A),  $m/z$  3442  $\pm$  3 (Abb. 10B) und  $m/z$  3487  $\pm$  3 (Abb. 10C). Dabei wurden vor allem bei den Karzinomgewebelysaten sehr hohe Peakintensitäten gemessen. Besonders bei den Peptiden p3375 und p3442 schienen die detektierten Peakintensitäten der Gewebelysate eine ähnliche Verteilung zu zeigen. Dies deutet auf einen bestehenden Zusammenhang zwischen den Peptiden hin. Bei Untersuchungen von Gewebe mit der SELDI-TOF MS-Technologie konnten andere Arbeitsgruppen diese 3 Peaks bereits als humane neutrophile Peptide 1-3 (bzw. Defensine) identifizieren (62, 63).



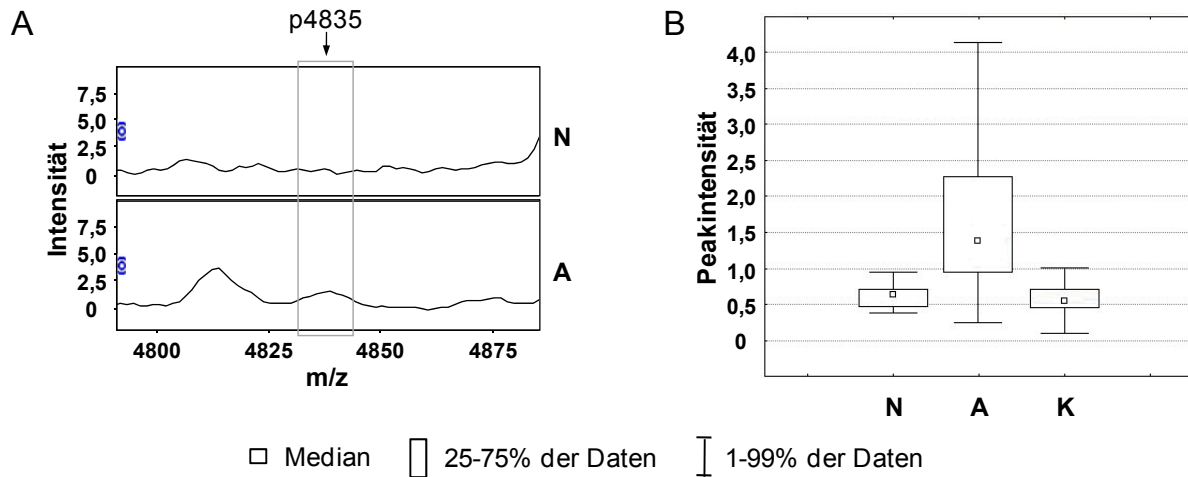
**Abb. 10:** Box Plots der mit SELDI-TOF MS gemessenen Intensitäten für die Peaks mit  $m/z$  3375 (A),  $m/z$  3442 (B) und  $m/z$  3487 (C) der untersuchten Gewebelysate. N=Normalgewebe, A=Adenomgewebe, K=Karzinomgewebe

Ein besonders interessantes Protein mit  $m/z$  von  $10324 \pm 10$  zeigte einen Anstieg der Peakintensitäten von Normalgewebe zu Adenomgewebe und eine weitere Zunahme der Peakintensität bei den Karzinomgewebeproben (Abb. 11). Neben eindeutig höheren Intensitätsmittelwerten der Tumorgewebe gegenüber denen der Normalgewebe gab es nur wenige Tumorgewebe, die im Intensitätsbereich des Normalgewebes lagen. Bei diesen Gewebeproben handelte es sich um Tumorgewebe mit einem Tumoranteil unter 50%.



**Abb. 11: Repräsentative SELDI-TOF Massenspektren (A) und Box Plots der Peakintensitäten (B) von Normal-, Adenom- und Karzinomgewebelysaten für den Biomarkerkandidaten mit  $m/z$   $10324 \pm 10$ .** Die SELDI-TOF MS-Analyse erfolgte unter Verwendung des SAX ProteinChip® Arrays. N=Normalgewebe, A=Adenomgewebe, K=Karzinomgewebe

Bei einem weiteren interessanten Peak mit  $m/z$   $4837 \pm 5$  handelt es sich um einen Biomarkerkandidaten, welcher ausschließlich im Adenomgewebe erhöht vorzuliegen scheint. Die Intensitäten, welche für diesen Peak bei den Karzinomgewebelysaten gemessen wurden, unterschieden sich nicht von den Intensitäten der Normalgewebelysate (Abb. 12). Von allen differentiell exprimierten Peptiden und Proteinen wies p4835 die stärkste Regulation im Adenomgewebe gegenüber dem Normalgewebe auf (Tab. 26). Auch hier zeigte sich, dass die Adenomgewebelysate, welche in den Intensitätsbereich des Normalgewebes fielen, einen Tumoranteil unter 50% aufwiesen.



**Abb. 12: Repräsentative SELDI-TOF Massenspektren (A) und Box Plots der Peakintensitäten (B) für den Biomarkerkandidaten mit  $m/z$   $4837 \pm 5$ .** Die SELDI-TOF MS-Analyse erfolgte unter Verwendung des SAX ProteinChip® Arrays. N=Normalgewebe, A=Adenomgewebe, K=Karzinomgewebe

Sowohl das Protein p10320 als auch das Protein p4835 wurden für weitere Analysen selektiert und sollten identifiziert werden.

## 4.2.2 Identifizierung und nähere Charakterisierung des Proteins p10320

### 4.2.2.1 Untersuchung zur Spezifität des potentiellen Tumorbiomarkers p10320

Zur Erweiterung des Datensatzes wurden von je 3 Patienten Gewebeproben des kolorektalen Adenoms und des Karzinoms mit Tumorstadium I und III und die korrespondierenden Normalgewebeproben untersucht. Die Spezifität für das Darmgewebe sollte durch die Untersuchung von Gewebeproben anderer Tumorarten analysiert werden. Die Proben wurden wie in der Gewebestudie präpariert und die Proteine der Lysate mit der SELDI-TOF MS gemessen.

Wie in der vorhergehenden Studie wurden bei diesen Darmgewebeproben für das Protein p10320 in den Tumorgewebelysaten höhere Peakintensitäten als in den Normalgewebelysaten detektiert. Bei den Adenomgewebelysaten wurden im Gegensatz zur vorhergehenden Studie höhere Peakintensitäten als bei den Karzinomgewebelysaten ermittelt. Die Proben des Tumorstadiums I zeigten geringere durchschnittliche Peakintensitäten als die Proben des Tumorstadiums III. Das Protein p10320 konnte bei den Gewebelysaten der anderen Tumorarten kaum

oder nicht detektiert werden. Bei den verwendeten Proben waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den Intensitäten der Normalgewebelysate und der Tumorgewebelysate feststellbar. Eine Ausnahme bildet das Oesophagusgewebe, hier konnte ein Unterschied zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe gemessen werden. Allerdings wurden in Normal- und Tumorgewebelysate nur sehr geringe Peakintensitäten detektiert (Tab. 27).

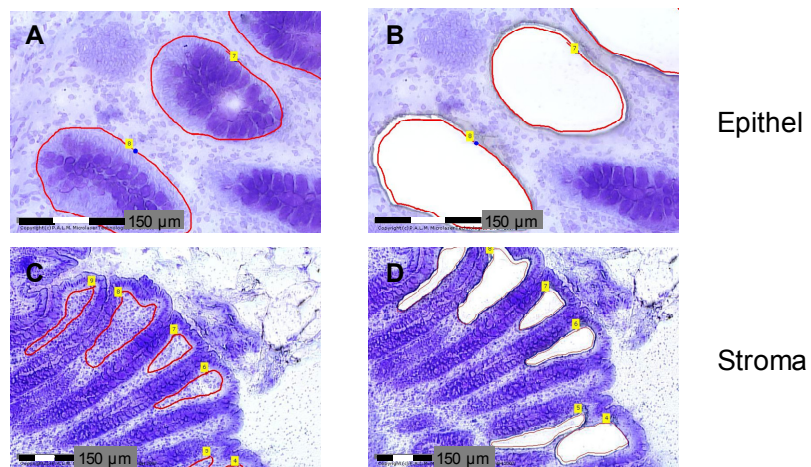
**Tab. 27: Intensitäten des Peaks bzw. des Spektrums bei  $m/z$  10320  $\pm$  10 repräsentativer Gewebelysate.** Die Gewebelysate wurden unter Verwendung des SAX ProteinChip® Arrays mit SELDI-TOF MS analysiert. N=Normalgewebe, T=Tumorgewebe, A=Gewebeprobe von Adenom-Patienten, K=Gewebeprobe von Karzinom-Patienten, I=Tumorstadium I, III=Tumorstadium III

Gewebeprobe		N	T	Regulation T/N
Darm	A	1,17	4,32	3,7
	K I	0,95	2,38	2,5
	K III	1,04	3,28	3,2
Oesophagus	K	0,51	0,94	1,8
Magen	K	1,85	1,63	0,9
Lunge	K	1,43	1,91	1,3
Brust	K	1,00	0,67	0,7
Prostata	K	0,93	0,85	0,9

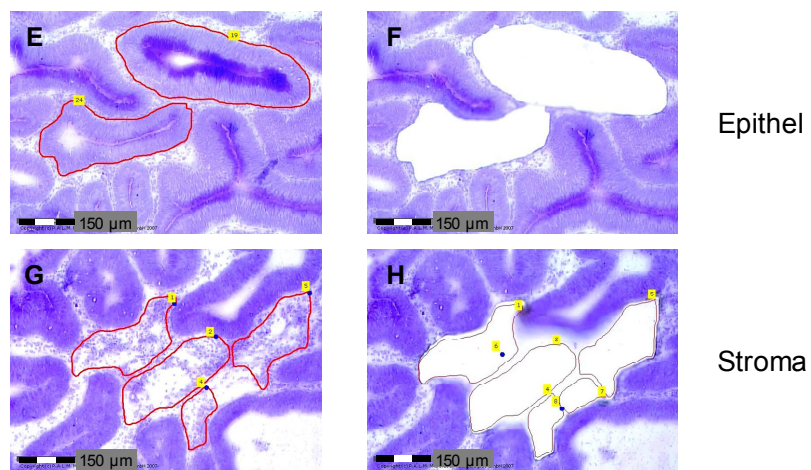
#### 4.2.2.2 Untersuchung von mikrodisezierten Gewebeprobe – Validierung des Proteins p10320 als potentiellen Tumorbiomarker

Um die Lokalisation des Proteins p10320 näher zu bestimmen, wurden Gewebeprobe von Adenom-Patienten (n=7) und Karzinom-Patienten mit Tumorstadium III (n=7) mikrodiseziert. Hierzu wurden aus den Gewebeschnitten des Normal- und des Tumorgewebes mit Hilfe der LCM („Laser Capture Microdissection“)-Technologie Epithelzellverbände und Stromazellverbände mit einer Fläche von jeweils 1000000  $\mu\text{m}^2$  isoliert (Abb. 13). Sofern im Gewebeschnitt Immunzellen enthalten waren, wurden diese ebenfalls mikrodiseziert.

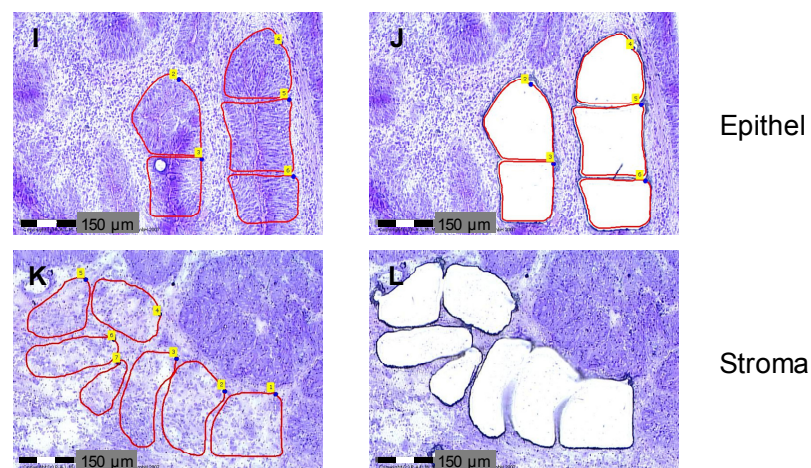
### Normalgewebe



### Adenomgewebe

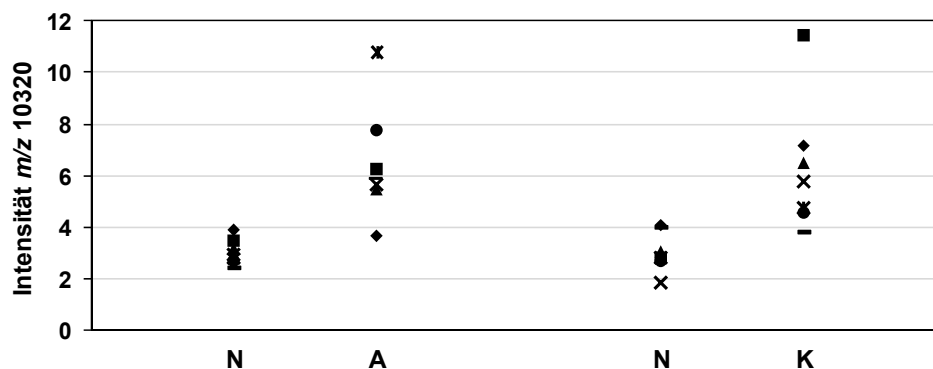


### Karzinomgewebe



**Abb. 13: Isolierung von Zellverbänden aus Gewebeschnitten durch Mikrodissektion.** Aus Gefrierschnitten von Normal- (A-D), Adenom- (E-H) und Karzinomgewebe (I-L) wurden mit Hilfe der LCM („Laser Capture Microdissection“)-Technologie unter mikroskopischer Kontrolle Epithelzell- und Stromazellverbände markiert (A, C, E, G, I, K), mit dem Laser geschnitten und in ein „AdhesiveCap“ katapultiert. B, D, F, H, J, L zeigen die Gewebeschnitte nach Isolierung der markierten Zellverbände.

Die mikrodisssektierten Zellverbände wurden lysiert und die Proteine unter Verwendung des Q10 ProteinChip® Arrays mit Hilfe der SELDI-Technologie analysiert. Zur Kontrolle der verwendeten Gewebe und Validierung des Peaks als Tumormarkerkandidat wurden Gewebeschnitte analog zur Studie behandelt und die Lysate unter Verwendung des Q10 ProteinChip® Arrays mit der SELDI-TOF MS gemessen. Die Reproduzierbarkeit wurde durch einen mitgeführten Pool aus Gewebelysaten überprüft, der Variationskoeffizient betrug 20%.



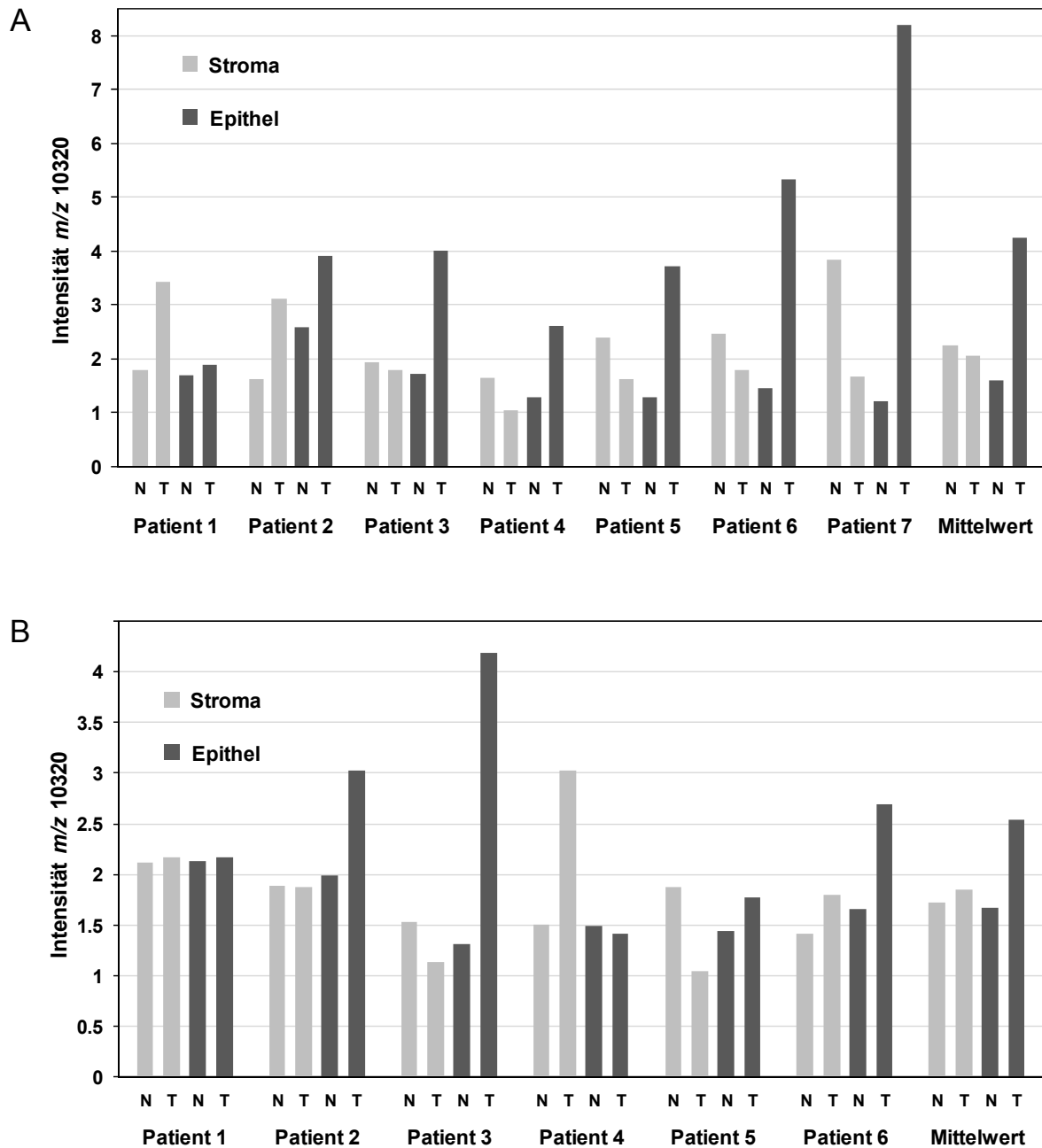
**Abb. 14: Streudiagramm der Peakintensitäten des Biomarkerkandidaten p10320 der untersuchten Gewebelysate.** Die Gewebelysate wurden unter Verwendung des Q10 ProteinChip® Arrays mit SELDI-TOF MS analysiert. In der Darstellung wurden für Normalgewebe und Tumorgewebe eines Patienten die gleichen Symbole verwendet. N=Normalgewebe, A=Adenomgewebe, K=Karzinomgewebe

Wie Abbildung 14 zeigt, wiesen jeweils 6 der 7 Tumorgewebelysate eine höhere Peakintensität als das Lysat des korrespondierenden Normalgewebes auf. Die Analyse der Gewebelysate konnte somit die in der Studie detektierte erhöhte Peakintensität für das Protein p10320 im Adenom- und im Karzinomgewebe gegenüber dem Normalgewebe weitgehend bestätigen. Die Mittelwerte der Peakintensitäten der Tumorgewebe zeigen eine zweifach erhöhte Regulation gegenüber dem Normalgewebe (Tab. 28).

**Tab. 28: Durchschnittliche Intensitäten des Peaks mit  $m/z$  10320  $\pm$  10.** Die Gewebelysate wurden unter Verwendung des Q10 ProteinChip® Arrays mit SELDI-TOF MS analysiert. Stabw.=Standardabweichung, N=Normalgewebe, T=Tumorgewebe, A=Gewebeproben von Adenom-Patienten, K=Gewebeproben von Karzinom-Patienten

	Mittelwert $m/z$ 10320 N	Stabw. $m/z$ 10320 N	Mittelwert $m/z$ 10320 T	Stabw. $m/z$ 10320 T	Regulation $m/z$ 10320 T/N
A	3,07	0,51	6,50	2,24	2,1
K	3,04	0,78	6,29	2,56	2,1





**Abb. 15: Detektierte Peakintensitäten des Biomarkerkandidaten mit  $m/z$  10320  $\pm$  10 in den Stroma- und Epithelzelllysaten von Tumorgewebe und korrespondierendem Normalgewebe.** Die Lysate der mikrodisssektierten Zellverbände wurden unter Verwendung des Q10 ProteinChip<sup>®</sup> Arrays mit SELDI-TOF MS analysiert. A) Gewebeproben von Patienten mit Adenom. B) Gewebeproben von Patienten mit Karzinom. N=Normalgewebe, A=Adenomgewebe, K=Karzinomgewebe

Bei der Untersuchung der Kompartimente von Adenom- und dem korrespondierenden Normalgewebe konnten die höchsten Peakintensitäten für den Biomarkerkandidaten p10320 mit einer Ausnahme bei den Lysaten der Epithelzellverbände des Tumorgewebes detektiert werden (Abb. 15A). Die im Mittelwert höchste Peakintensität wurde bei den Tumorzellen des Epithels

nachgewiesen, sie lag ca. zweifach über den durchschnittlichen Intensitäten der anderen Zellverbände (Tab. 29). Die gemessenen durchschnittlichen Peakintensitäten der Stromazellen des Tumorgewebes unterschieden sich dagegen nicht von denen der Zellen des Normalgewebes (Abb. 15A, Tab. 29). Die Analyse der Karzinomgewebekompartimente und der jeweiligen Normalgewebezellen erzielte bei der Betrachtung der Mittelwerte aus den 6 auswertbaren Datensätzen ein sehr ähnliches Ergebnis (Abb. 15B, Tab. 29). Der Mittelwert der Peakintensität der Epithelzellen des Tumorgewebes lag über den Mittelwerten der Stromazellen und über denen der Normalgewebekompartimente. Dieser deutliche Trend basiert allerdings auf den großen Unterschieden, die bei 3 der 6 Proben detektiert werden konnten (Abb. 15B). In den Lysaten der Immunzellen wurden nur geringfügige Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe gemessen (Tab. 29).

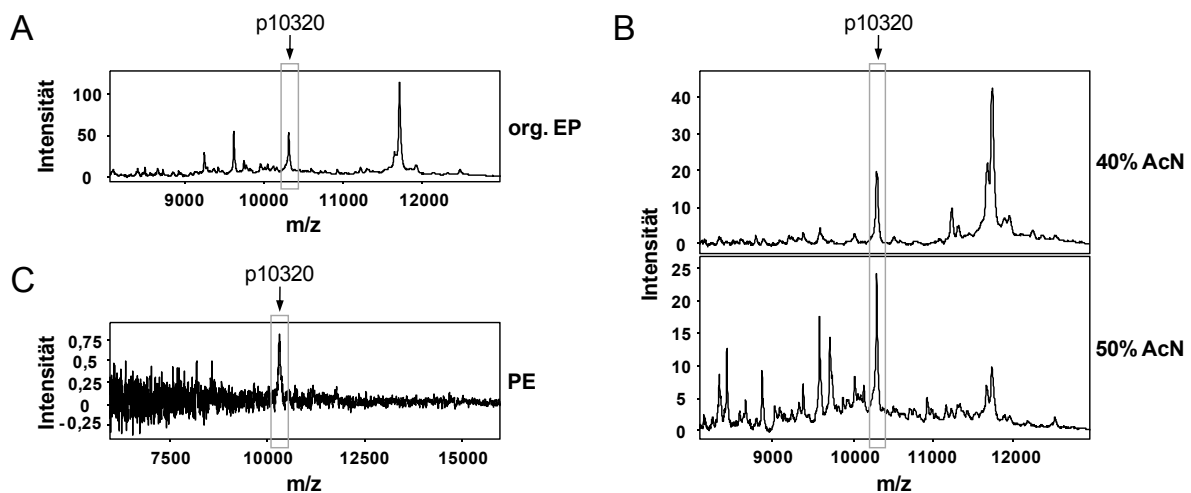
Somit deutet die Analyse der Gewebekompartimente des Adenomgewebes und des korrespondierenden Normalgewebes auf eine Lokalisation des Proteins p10320 in den Epithelzellen des Tumorgewebes hin. Die Untersuchung der Kompartimente des Karzinomgewebes und des korrespondierenden Normalgewebes zeigten durchschnittlich den gleichen Trend, allerdings mit weniger deutlichen Unterschieden.

**Tab. 29: Durchschnittliche Intensitäten des Peaks mit  $m/z$  10320 in den Stroma-, Epithel- und Immunzelllysaten des Tumorgewebes und des korrespondierenden Normalgewebes.** Die Zelllysate wurden unter Verwendung des Q10 ProteinChip<sup>®</sup> Arrays mit SELDI-TOF MS analysiert. Stabw.=Standardabweichung, N=Normalgewebe, T=Tumorgewebe, A=Gewebeproben von Adenom-Patienten, K=Gewebeproben von Karzinom-Patienten

	Stromazellen $m/z$ 10320 Mittelwert $\pm$ Stabw.		Epithelzellen $m/z$ 10320 Mittelwert $\pm$ Stabw.		Immunzellen $m/z$ 10320 Mittelwert $\pm$ Stabw.	
	N	T	N	T	N	T
<b>A</b>	2,23 $\pm$ 0,78	2,06 $\pm$ 0,86	1,60 $\pm$ 0,48	4,24 $\pm$ 2,06	1,76 $\pm$ 0,80	1,26 $\pm$ 0,78
<b>K</b>	1,72 $\pm$ 0,28	1,85 $\pm$ 0,73	1,67 $\pm$ 0,32	2,54 $\pm$ 0,99	1,80 $\pm$ 0,24	1,57 $\pm$ 0,33

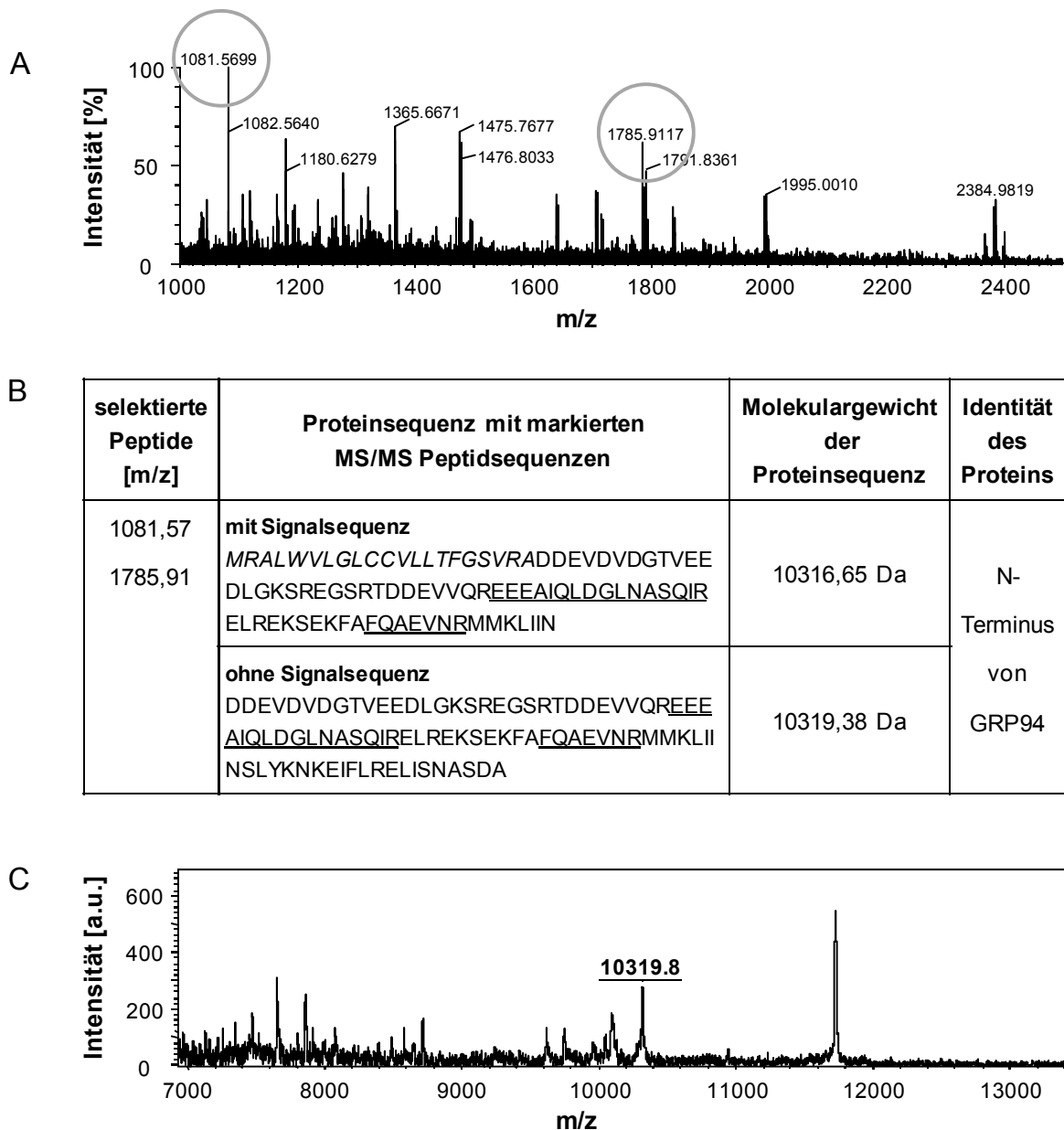
### 4.2.2.3 Identifizierung des Proteins p10320 als N-terminales Fragment von GRP94

Das Protein p10320 stellte einen sehr interessanten Biomarkerkandidaten dar und wurde daher zur Identifizierung selektiert. Hierfür wurde Tumorgewebe von Karzinom-Patienten mit einem Kryostaten geschnitten, mikroskopisch kontrolliert und lysiert. Der erste Schritt der Aufreinigungsstrategie basierte auf den bekannten chromatographischen Eigenschaften des Proteins aus der Studie zur Entdeckung der Gewebemarkers, dem Binden an Anionenaustauschermaterial (Q Ceramic Hyper D<sup>®</sup> F). Die Elution der Proteine erfolgte mit Hilfe eines pH-Gradienten.



**Abb. 16: Anreicherung und Aufreinigung des Proteins p10320.** A) SELDI-TOF Massenspektrum (NP20 ProteinChip<sup>®</sup> Array) der Fraktion, welche mit organischem Puffer vom Anionenaustauschermaterial eluiert werden konnte. Die Proteine des Gewebelysates wurden bei pH 9 gebunden und durch einen pH-Gradienten eluiert. B) SELDI-TOF Massenspektren (NP20 ProteinChip<sup>®</sup> Array) einzelner Fraktionen nach Aufreinigung mit Hilfe von RP-Beads. Nach dem Binden wurden die Proteine durch einen schrittweise ansteigenden Acetonitril-Gradienten von 10-60% eluiert. C) Massenspektrometrische Analyse nach gelelektrophoretischer Auftrennung (10%iges Bis-Tris-Gel) der Proteine der Fraktionen 40 und 50% Acetonitril und passiver Elution aus dem Gel. Durch SELDI-TOF MS unter Verwendung des NP20 ProteinChip<sup>®</sup> Arrays wurde das Eluat bestimmt, welches den Biomarkerkandidaten enthält. org. EP=organischer Elutionspuffer, AcN=Acetonitril, PE=passives Eluat aus den ausgeschnittenen Gelstücken

Wie die anschließende Kontrolle der Fraktionen mit der SELDI-TOF MS zeigte, konnte das Protein p10320 mit dem abschließenden Elutionsschritt im sauren pH-Bereich durch organischen Puffer eluiert werden (Abb. 16A). Diese Fraktion wurde einem zweiten Aufreinigungsschritt unterzogen, der Reversed Phase Chromatographie mit Hilfe von RP-Beads (Poly Beads<sup>TM</sup>, BioSeptra). Eine deutliche Anreicherung des Biomarkerkandidaten konnte in der 40% Acetonitril- und in der 50% Acetonitril-Fraktion detektiert werden (Abb. 16B). Die weitere Separation der Proteine erfolgte nach Aufkonzentrierung der beiden Fraktionen durch eine Gelelektrophorese (10%iges Bis-Tris-Gel, NuPAGE, Invitrogen). Alle Banden im erwarteten Molekulargewichtsbereich wurden ausgeschnitten und die Proteine passiv eluiert. Der Tumormarkerkandidat konnte aus einer Bande der 50% Acetonitril-Fraktion eluiert werden (Abb. 16C). Das Eluat wurde tryptisch verdaut, die resultierenden Peptide wurden mit SELDI-TOF MS kontrolliert und anschließend extern mit einem ProteinChip Interface, welches an ein Q-TOF MS-System gekoppelt war, gemessen (Abb. 17A). Durch die Fragmentation der zwei Peptide mit  $m/z$  1081,57 und  $m/z$  1785,91 wurden Sequenzen erhalten, welche mit N-terminalen Teilen des Proteins GRP94 übereinstimmen. Somit handelt es sich bei dem Tumormarkerkandidaten sehr wahrscheinlich um ein N-terminales Fragment von GRP94. Dabei könnte es sich sowohl um das N-terminale Fragment von GRP94 mit Signalsequenz für das endoplasmatische Reticulum als auch um die prozessierte Form ohne Signalsequenz handeln (Abb. 17B). Aus diesem Grund wurde das Molekulargewicht des Tumormarkerkandidaten im linearen Modus mit externer Kalibrierung durch MALDI-TOF MS auf  $m/z$  10319,8  $\pm$  1 näher bestimmt (Abb. 17C). Dieses Molekulargewicht deutete auf die Aminosäuresequenz des Biomarkerkandidaten ohne Signalsequenz für das endoplasmatische Reticulum hin, was durch eine Sequenzanalyse bestätigt werden konnte (Kapitel 4.2.3.1).



**Abb. 17: Identifizierung des Proteins p10320 als N-terminales Fragment von GRP94.** A) Q-TOF Massenspektrum der tryptischen Peptidfragmente. Das Eluat, welches das Protein mit  $m/z$  10320 enthielt, wurde mit Trypsin gespalten. Die tryptischen Peptide wurden mit einem ProteinChip Interface gekoppelt an ein Q-TOF MS-System gemessen und die Peptide mit  $m/z$  1081,57 und  $m/z$  1785,91 sequenziert. B) Identifizierung des Proteins durch die erhaltenen Peptidsequenzen als N-terminales Fragment des Proteins GRP94. Basierend auf den Peptidsequenzen und dem Molekulargewicht des Tumormarkerkandidaten ergeben sich zwei mögliche Sequenzen für das GRP94-Fragment, inklusive (kursiv) oder exklusive des Signalpeptids für das endoplasmatische Reticulum. C) Bestimmung der Masse des Tumormarkerkandidaten mit MALDI-TOF MS auf  $10319 \pm 1$  Da.

### 4.2.3 Gewinnung von GRP94 und dessen N-terminalem Fragment für die Generierung spezifischer Antikörper

Die Basis für weitere Untersuchungen des Tumormarkerkandidaten bilden spezifische Antikörper. Neben der Validierung der Identität mit antikörperbasierten Methoden und einer näheren Untersuchung möglicher physiologischer Prozesse, in die der Markerkandidat involviert sein könnte, werden Antikörper für die Detektion des potentiellen Biomarkers im Blut benötigt. Kommerziell verfügbare anti-GRP94 Antikörper erwiesen sich als ungeeignet, da mit ihnen die geringen Konzentrationen des GRP94-Fragmentes im Gewebelysat nicht detektierbar waren. Dagegen ermöglichen sie einen sehr effektiven Nachweis des 94 kDa Proteins, wodurch ein spezifischer Nachweis des Fragmentes in einem einfachen ELISA-Test ausgeschlossen werden würde.

Die Herstellung bzw. die Selektion spezifischer Antikörper, die nur mit dem N-terminalen Fragment von GRP94 und nicht mit dem 94 kDa Protein interagieren, stellte eine besondere Herausforderung dar. Hiermit beauftragt wurde die Firma AbD Serotec, welche für die Generierung der Antikörper die HuCAL<sup>®</sup>-Technologie (Human Combinatorial Antibody Library) verwendet. Die Strategie zur Selektion der Antikörper sollte auf der C-terminalen Aminosäure des 10,3 kDa großen GRP94-Fragmentes und deren Carboxylgruppe basieren, da das 94 kDa Protein diese Struktur nicht besitzt. Somit bildete die Kenntnis der genauen Sequenz des N-terminalen GRP94-Fragmentes eine Voraussetzung für die weiteren Schritte. Für die Selektion und die Qualitätskontrolle der Antikörper wurden sowohl 500 µg des N-terminalen GRP94-Fragmentes als auch des 94 kDa Proteins in einer Konzentration von mindestens 0,15 µg/µl benötigt. Die Proteine sollten in einem coomassiegefärbten Gel bei einer Beladung von 3 µg Protein eine Reinheit von mehr als 80 Prozent aufweisen. Während das 94 kDa GRP94 hierfür aus Zelllinien aufgereinigt werden kann, liegt das N-terminale Fragment in zu geringen Mengen in den Gewebeproben vor. Daher sollte das Fragment in *E.coli* rekombinant exprimiert werden.

#### 4.2.3.1 Analyse der Primärstruktur des N-terminalen GRP94-Fragmentes

Für eine umfassende Charakterisierung der Aminosäuresequenz des GRP94-Fragmentes, die als Basis für die Strategie zur Selektion der Antikörper dienen sollte, wurde eine weitere Anreicherung und Aufreinigung des N-terminalen GRP94-Fragmentes aus Tumorgewebe durchgeführt. Sie erfolgte nach dem bereits für die Identifizierung etablierten Protokoll. Nach dem letzten Aufreinigungsschritt, der Gelelektrophorese, wurde allerdings nur ein Viertel der Bande zur Überprüfung des Molekulargewichtes verwendet. Die Bande, die das Protein mit dem passenden Molekulargewicht enthielt, wurde zur Sequenzierung an die Firma Protagen versendet. Die Sequenzanalyse erfolgte nach einer tryptischen und einer chymotryptischen Spaltung des Proteins und wurde unter Nutzung von MALDI-TOF MS und nano LC-ESI-Q-TOF MS durchgeführt. Die detektierten tryptischen und chymotryptischen GRP94-Peptide deckten 78% der Sequenz des GRP94-Fragmentes ohne Signalsequenz für das endoplasmatische Reticulum ab. Durch das Peptid LRELISNASDA wurde die C-terminale Aminosäure als Alanin identifiziert (Abb. 18).

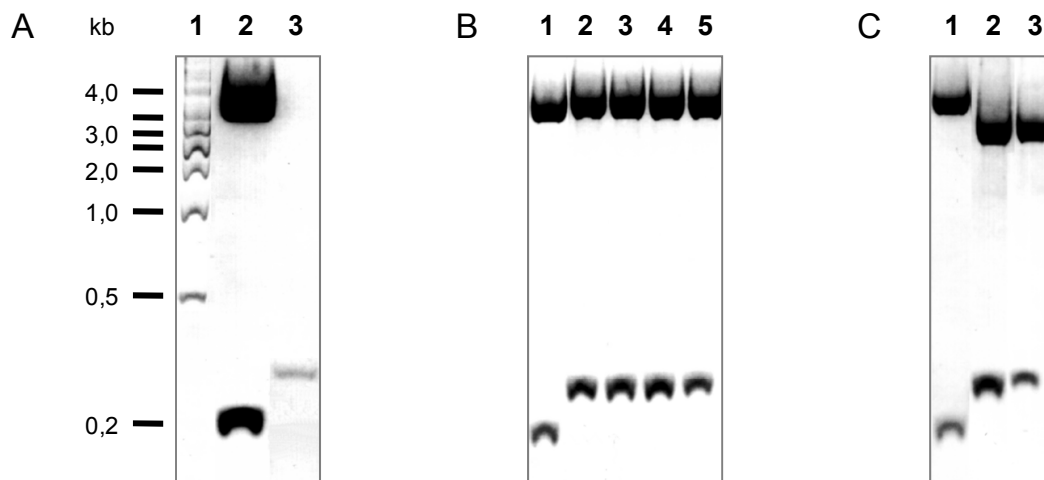
10                      20                      30                      40                      50  
 DDEVVDGTV EEDLGKSREG SRTDDEVVQR EEEAIQLDGL NASQIRELRE  
 60                      70                      80                      90  
 KSEKFAFQAE VNRMMKLIIN SLYKNKEIFL RELISNASDA

**Abb. 18: Zusammenfassung der detektierten tryptischen und chymotryptischen GRP94 Peptide.** Die innerhalb der N-terminalen GRP94-Sequenz (ohne Signalsequenz) markierten Peptide wurden mit MALDI-TOF MS/MS und nano LC-ESI-Q-TOF MS/MS detektiert.

#### 4.2.3.2 Klonierung der DNA des N-terminalen GRP94-Fragmentes in den Expressionsvektor pRSET A

Als Basis für die Klonierung und rekombinante Expression des N-terminalen GRP94-Fragmentes diente ein Expressionsvektor, welcher einen Teil der humanen GRP94-Sequenz enthielt (pDEST17-D18/Ins.GRP94, RZPD). Nach Optimierung der PCR konnte die DNA-Sequenz (292 bp) amplifiziert werden, die das 10320 Da große GRP94-Fragment codiert. Durch diese PCR wurde ein Stoppcodon an die das GRP94-Fragment codierende Sequenz angefügt. Weiterhin wurde die DNA mit flankierenden Restriktionsschnittstellen für BamHI am 5'Ende und EcoRI am 3'Ende

versehen. Da die Ausbeute der PCR sehr gering war (Abb. 19A) und sich die an den Restriktionsverdau anschließende Ligation des Amplifikates in den Expressionsvektor pRSET A (Invitrogen) als schwierig erwies, wurde das Amplifikat zunächst in das einfache Klonierungssystem mit dem Vektor pCRII®-TOPO® kloniert (TOPO TA Cloning®, Invitrogen). Nach Transformation in *E.coli* TOP10-Zellen wurde das Vorhandensein des Inserts durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und EcoRI überprüft. Dabei zeigten 4 Klone im analytischen Agarosegel eine DNA-Bande der erwarteten Größe von ca. 280 bp (Abb. 19B). Die Sequenzierung der DNA von 4 Klonen zeigte, dass die amplifizierte DNA ohne Mutationen vorlag (durchgeführt von der Firma AGOWA). Von diesen Klonen wurden die Plasmide präpariert und diese wie der Vektor pRSET A (Invitrogen) einem Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und EcoRI unterzogen. Nach präparativer Gelelektrophorese und Ligation der gereinigten DNA in den Expressionsvektor pRSET A erfolgte die Transformation in *E.coli* BL21-AI™-Zellen. Wie die Restriktionsanalyse zeigte, enthielten 2 Klone das Insert (Abb. 19C).



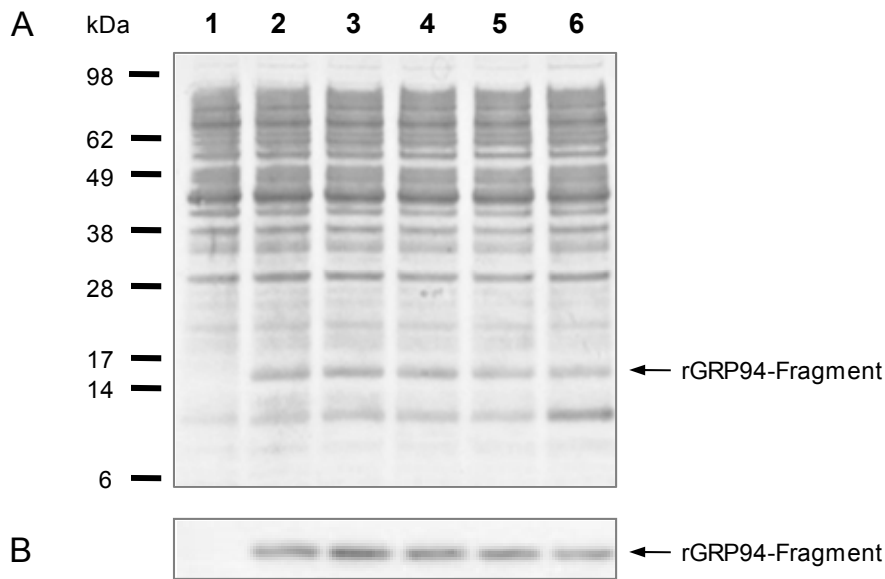
**Abb. 19: Amplifikation und Klonierung der DNA des N-terminalen GRP94-Fragmentes.** A) PCR zur Amplifikation der DNA des N-terminalen GRP94-Fragmentes, Anfügen eines Stop-Codons an das 3'Ende und Erzeugung von flankierenden Restriktionsschnittstellen für BamHI am 5'Ende und EcoRI am 3'Ende. Die PCR wurde mit den Primern GRP94F-f(BamHI) und GRP94F-r(EcoRI) sowie dem Vektor pDEST17-D18/Ins.GRP94 (RZPD) als Template durchgeführt. Bahn 1) DNA Ladder, 1 kb (Sigma). Bahn 2) 200 bp 18S DNA zur Größenabschätzung. Bahn 3) Amplifikat. 1,2%iges Agarosegel. B) Restriktionsanalyse nach Klonierung des Amplifikates in den Vektor pCRII®-TOPO®. Die DNA der Klone pCRII/Ins.GRP94F wurde mit den Enzymen BamHI und EcoRI geschnitten. Bahn 1) 200 bp 18S DNA zur Größenabschätzung. Bahn 2-5) restringierte DNA. 1,2%iges Agarosegel. C) Restriktionsanalyse nach Klonierung der DNA des N-terminalen GRP94-Fragmentes in den Vektor pRSET A. Die DNA der Klone pRSET A/Ins.GRP94F wurde mit den Enzymen BamHI und EcoRI geschnitten. Bahn 1) 200 bp 18S DNA zur Größenabschätzung. Bahn 2-3) restringierte DNA. 1,2%iges Agarosegel.



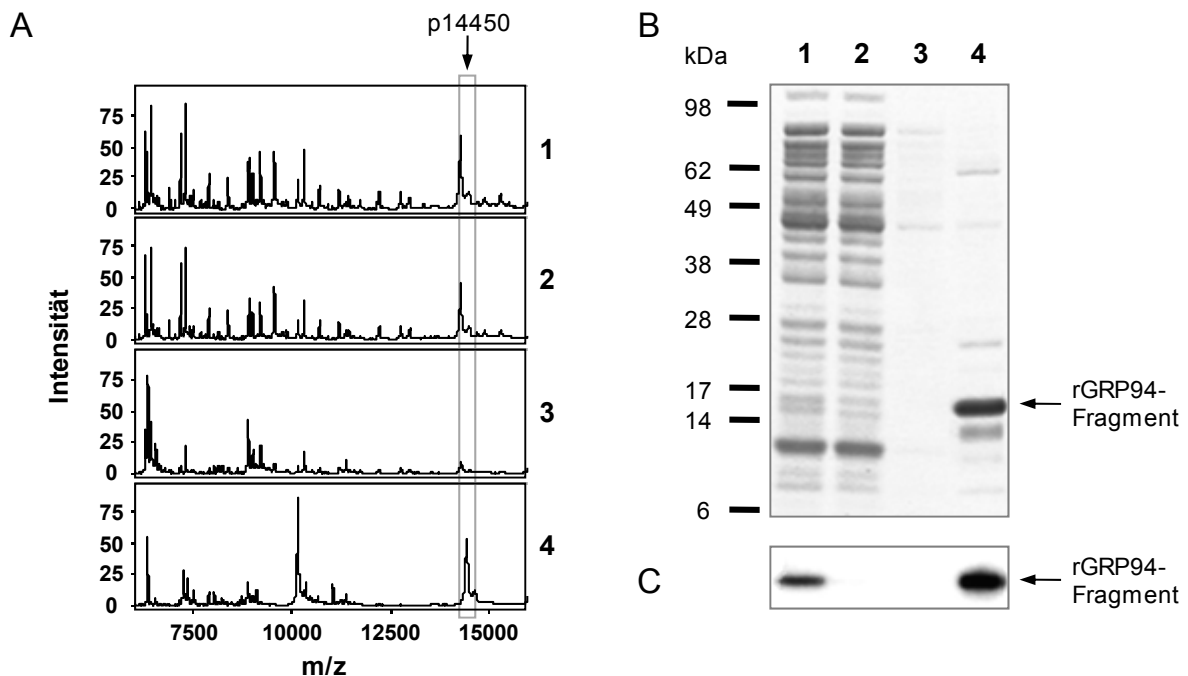
#### 4.2.3.3 Expression des N-terminalen GRP94-Fragmentes in *E.coli* BL21-AI™ und Reinigung

Der Expressionsvektor pRSET A ermöglicht die Proteinexpression von klonierten Genen in *E.coli* und die anschließende Reinigung dieser Proteine mit Hilfe eines N-terminalen Polyhistidin-Tags. Zwischen dieser metallbindenden Domäne und dem rekombinanten Protein ist eine Enterokinase-Schnittstelle lokalisiert, die eine Entfernung des N-terminalen Fusionspeptids vom gereinigten rekombinanten Protein erlaubt. Die Expression der interessierenden Gene wird durch den starken T7 Promotor kontrolliert, der von der T7 RNA-Polymerase spezifisch erkannt wird. Daher sind *E.coli*-Zellen erforderlich, welche die T7 RNA-Polymerase bilden können, wie der verwendete BL21-AI™ *E.coli* Stamm. Er enthält eine chromosomale Insertion des T7 RNA-Polymerase codierenden Gens in den *araB* locus des *araBAD* Operons, so dass die Expression der T7 RNA-Polymerase durch die Zucker L-Arabinose (Induktion) und Glukose (Repression) reguliert werden kann.

Zunächst wurde die zeitabhängige Expression des rekombinanten GRP94-Fragmentes untersucht. Hierfür wurde die Bakterienkultur nach Induktion mit 0,2% L-Arabinose für 1,5 Stunden inkubiert und eine Probe entnommen. Nach jeweils einer weiteren Stunde wurde die Probenentnahme wiederholt. Die letzte Probe wurde 5,5 Stunden nach Induktion der Expression entnommen. Eine nicht induzierte Probe diente als vergleichende Kontrolle. Alle Proben wurde pelletiert, lysiert und durch ein coomassiegefärbtes Gel sowie einen Western Blot mit anti-GRP94 Antikörper analysiert (Abb. 20). Bereits nach einer Induktion von 1,5 Stunden konnte eine coomassiefärbbare Bande im Gel nachgewiesen werden, die beim Lysat der nicht induzierten Bakterienkultur nicht erkennbar war (Abb. 20A). Ebenso war im Western Blot nach 1,5-stündiger Expression eine GRP94-spezifische Bande detektierbar. Innerhalb der Zeitreihe änderte sich die Menge an rekombinantem Protein nur geringfügig (Abb. 20B).



**Abb. 20: Untersuchung der zeitabhängigen Expression des rekombinanten GRP94-Fragmentes in *E.coli* BL21-AI™.** Nichtinduzierte Kontrolle (Bahn 1). Die Expression wurde durch 0,2% L-Arabinose induziert und nach 1,5 h (Bahn 2), 2,5 h (Bahn 3), 3,5 h (Bahn 4), 4,5 h (Bahn 5) und 5,5 h (Bahn 6) eine Probe entnommen. Die entnommenen Bakterienproben wurden lysiert, die Proteinlysate durch ein 10%iges Bis-Tris-Gel aufgetrennt (reduzierend) und anschließend mit colloidalem Coomassie gefärbt (A) oder mit Hilfe eines Western Blots (B) analysiert. Die Detektion des rekombinanten Proteins erfolgte durch anti-GRP94 Antikörper (Zymed).



**Abb. 21: Analyse der Aufreinigung des rekombinanten GRP94-Fragmentes.** Nach Induktion mit 0,2% L-Arabinose wurden die *E.coli* BL21-AI™-Zellen für 4 Stunden inkubiert. Die Bakterien wurden lysiert und das rekombinante Protein mit Hilfe des QIAexpress® Ni-NTA Fast Start Kits (Qiagen) aufgereinigt. Das Lysat (1), der Durchfluss (2), die Waschschritte (3) und das Eluat (4) wurden mit SELDI-TOF MS unter Verwendung des NP20 ProteinChip® Arrays analysiert (A), die Proteine durch ein 10%iges Bis-Tris-Gel aufgetrennt (reduzierend) und anschließend mit Coomassie gefärbt (B) oder mit Hilfe eines Western Blots (C) untersucht. Die Detektion des rekombinanten Proteins erfolgte durch anti-GRP94 Antikörper (Zymed).

Bei den folgenden Expressionsversuchen wurden die Bakterien nach der Induktion für mindestens 4 Stunden inkubiert. Nach Reinigung des rekombinanten Proteins mit Hilfe des QIAexpress<sup>®</sup> Ni-NTA Fast Start Kits (Qiagen) wurden die Fraktionen massenspektrometrisch (Abb. 21A), mit Hilfe eines coomassiegefärbten Geles (Abb. 21B) und durch Detektion mit anti-GRP94 Antikörper im Western Blot (Abb. 21C) analysiert. Die Spektren der Fraktion des Lysates und des Säulendurchflusses unterschieden sich kaum in Peakanzahl und Peakmuster. Im coomassiegefärbten Gel zeigten sich ebenfalls nur geringfügige Unterschiede. Während im Coomassiegel kaum Banden in der Waschfraktion detektierbar waren, zeigten die Spektren jedoch die Effektivität dieses Schrittes. Im Eluat ließen sich neben dem Fusionsprotein mit  $m/z$  von ungefähr 14450 noch weitere Peaks detektieren, auch im Gel waren neben der mutmaßlichen Bande des rekombinanten Proteins weitere Proteine nachweisbar. Die Reinheit lag schätzungsweise bei 70-80%. GRP94-reaktive Banden konnten im Lysat und im Eluat der Ni-NTA-Säule detektiert werden.

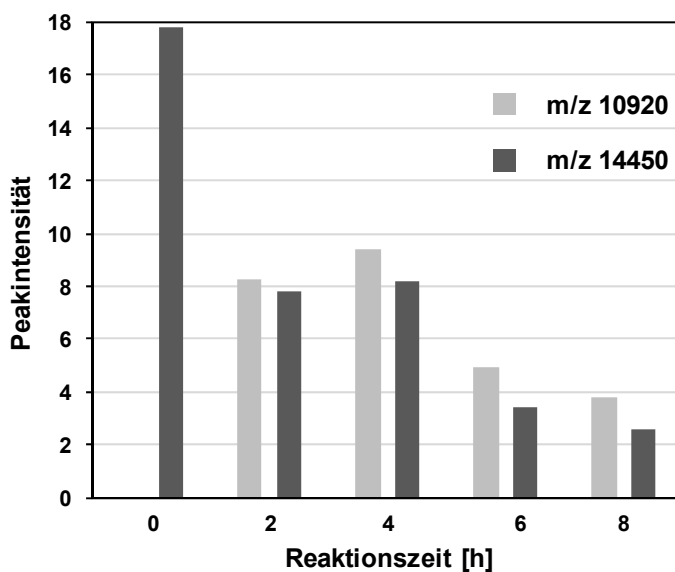
Um die Reinheit des rekombinanten Proteins zu erhöhen, wurden Zentrifugationsfiltereinheiten mit verschiedenen Porengrößen (Millipore), Dialysekassetten (Perbio) und Beads mit chromatographischen Eigenschaften (Q Ceramic Hyper D<sup>®</sup> F (Biorad), IMAC, HIC-3, HIC-18 (Bruker)) getestet. Mit keiner Methode konnte eine Verbesserung der Reinheit erzielt werden. Weitere Versuche wurden mit Ni-NTA-Beads (Qiagen) durchgeführt, bei welchen die Bindungs- und Waschbedingungen durch Veränderungen der Imidazol- und Salzkonzentration der Puffer optimiert werden sollten. Hierfür wurden Bakterienlysate, aber auch bereits mit Hilfe der Ni-NTA-Säule gereinigte Fraktionen verwendet. Im Vergleich zur Ni-NTA-Säule konnte bei der beadbasierten Aufreinigung des Bakterienlysates keine Verbesserung erzielt werden. Die zusätzliche Reinigung des NiNTA-Eluates mit Hilfe der Beads sah im kleineren Maßstab zunächst erfolgversprechend aus, konnte jedoch mit größeren Volumina nicht reproduziert werden.

#### **4.2.3.4 Entfernung des Fusions-Tags und Reinigung**

Um das rekombinante GRP94-Fragment der Sequenz des mutmaßlichen Tumormarkers weiter anzunähern, sollte das N-terminale His-Tag abgespalten werden. Das Fusionsprotein besitzt eine Enterokinase-Schnittstelle, welche die

Entfernung des Tags ermöglicht. Das resultierende rekombinante Protein besitzt eine Masse von ca. 10920 Da.

Die Spaltungsreaktion wurde hinsichtlich Enzymkonzentration, Temperatur und Reaktionszeit optimiert. Verglichen wurden zunächst 1, 2 und 4 units Enterokinase pro 10 µg Protein bei Reaktionstemperaturen von 22°C und 37°C. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Proteine massenspektrometrisch analysiert. Die höchsten Peakintensitäten des Proteins mit  $m/z$  10920 konnten bei 37°C mit 1 unit Enterokinase erzielt werden. Obwohl mit ansteigender Enzymmenge auch zunehmend vom 14450 Da großen Fusionsprotein umgesetzt wurde, zeigte das Spaltungsprodukt mit  $m/z$  10920 keine entsprechende Intensitätszunahme (nicht gezeigt). In weiteren Optimierungsschritten konnte die höchste Peakintensität des Spaltungsproduktes und das beste Verhältnis zwischen dem Produkt mit  $m/z$  10920 und dem Substrat mit  $m/z$  14450 mit 0,1 unit Enterokinase pro 10 µg Protein detektiert werden (nicht gezeigt).

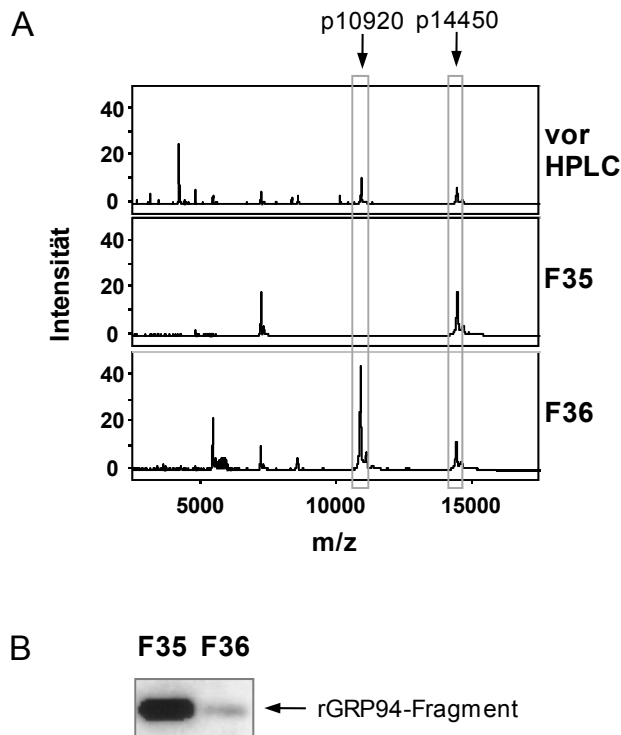


**Abb. 22: Zeitlicher Verlauf der Reaktion zur Entfernung des N-terminalen Polyhistidin-Tags durch Enterokinase.** Dargestellt sind die Mittelwerte der Intensitäten der Peaks mit  $m/z$  10920 (Protein ohne His-Tag) und mit  $m/z$  14450 (Protein mit His-Tag) aus 2 parallelen Ansätzen. Nach 2-, 4-, 6- und 8-stündiger Inkubation mit 0,1 unit Enterokinase/ 10 µg Protein wurde die Spaltungsreaktion unter Verwendung des NP20 ProteinChip® Arrays mit SELDI-TOF MS analysiert.

Anschließend wurde der zeitliche Verlauf der Spaltungsreaktion mit 0,1 unit Enterokinase je 10 µg Protein in zwei parallelen Ansätzen nach 2-, 4-, 6- und 8-stündiger Inkubation bei 37°C massenspektrometrisch analysiert (Abb. 22). Die höchsten Intensitäten für den Peak mit  $m/z$  10920 konnten nach 2 und nach 4 Stunden detektiert werden. In dieser Zeit wurde ca. die Hälfte des Fusionsproteins mit  $m/z$  14450 gespalten. Nach 6-stündiger Reaktionszeit nahm die Intensität des

Spaltungsproduktes bereits wieder ab. Diese Ergebnis konnte durch zwei weitere Zeitreihen, in denen die enzymatische Umsetzung von 0 bis 4 Stunden untersucht wurde, bestätigt werden (nicht gezeigt).

Im Anschluss an die Spaltungsreaktionen wurden Versuche unternommen, das rekombinante GRP94-Fragment ohne His-Tag aus der Proteinmischung anzureichern und aufzureinigen. Hierfür wurden zunächst Ni-NTA-Beads (Qiagen) verwendet. Mit Hilfe der Ni-NTA-Beads konnte nach 15-minütiger Inkubation ein Teil der Proteine und Peptide, insbesondere das 14450 Da große Fusionsprotein, unter minimalen Verlusten des Spaltungsproduktes aus der komplexen Proteinmischung entfernt werden (nicht gezeigt). Die erforderliche Reinheit des rekombinanten GRP94-Fragmentes für die Herstellung bzw. Selektion der Antikörper wurde jedoch nicht erreicht. Aus diesem Grund sollten die Peptide und Proteine nach der Enterokinase-Spaltung durch die HPLC separiert werden. Nach dem Umpuffern mit Hilfe von HIC-Beads (Bruker) wurden die Peptide und Proteine unter Verwendung einer mRP-C18-Säule (Agilent) durch einen Acetonitrilgradienten von 15-55% für 60 min bei 60°C (Fraktionsgröße 45 s, Flussrate 12 µl/min) aufgetrennt, die Fraktionen in Mikrotiterplatten gesammelt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Nach Optimierung des Elutionsgradienten konnte eine Anreicherung des Proteins mit  $m/z$  10920 in Fraktion 36 erzielt werden (Abb. 23A). Die Trennung vom 14450 Da großen Fusionsprotein, welches vorwiegend in Fraktion 35 detektiert werden konnte, gelang teilweise. Nach Aufkonzentration der Fraktionen, welche das 14450 Da große Protein und das 10920 Da große Protein enthielten, wurden beide Fraktionen mit Hilfe eines Western Blots untersucht (Abb. 23B). Während Fraktion 35, welche das Fusionsprotein enthält, eine deutliche Bande im erwarteten Molekulargewichtsbereich zeigte, konnte in Fraktion 36 nur eine sehr schwache Bande detektiert werden. Durch den geringen Unterschied im Molekulargewicht zwischen dem Fusionsprotein und dem Spaltungsprodukt kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass beide Proteine in einer Bande detektiert werden. Das Ergebnis des Western Blots steht im Gegensatz zur massenspektrometrischen Analyse, bei welcher in Fraktion 36 und damit für das Spaltungsprodukt ( $m/z$  10920) wesentlich höhere Intensitäten als in Fraktion 35 für das Protein mit His-Tag ( $m/z$  14450) gemessen wurden.



**Abb. 23: Aufreinigung des rekombinant exprimierten GRP94-Fragmentes mit Hilfe der HPLC.** Nach der Abspaltung des His-Tags durch die Enterokinase und Umpuffern wurden die Peptide und Proteine mit Hilfe einer mRP-C18-Säule durch die HPLC aufgetrennt (15-55% Acetonitrilgradient, 60 min, 60°C, Fraktionsgröße 45 s, Flussrate 12 µl/min). A) SELDI-TOF Massenspektren des rekombinanten Proteins vor und nach HPLC-basierter Separation. Die Proben wurden mit Matrix versetzt und unter Verwendung des Gold ProteinChip® Arrays analysiert. B) Die Proteine der Fraktionen 35 und 36 wurden mit Hilfe eines 4-12%igen Bis-Tris-Gels aufgetrennt (nicht reduzierend). Nach dem Western Blot erfolgte die Detektion des rekombinanten Proteins durch anti-GRP94 Antikörper (Zymed).

Da durch das notwendige Umpuffern und Konzentrieren der Probe vor der Auftrennung durch die HPLC Verluste zwischen 50 und 70% einkalkuliert werden müssen, wurde eine weitere Strategie zur Abspaltung des N-terminalen His-Tags vom Fusionsprotein verfolgt, bei welcher der abschließende Reinigungsschritt entfallen könnte. Proteine mit Affinität für die Ni-NTA-Beads sollten zunächst an diese gebunden werden und anschließend das GRP94-Fragment mit  $m/z$  10920 durch die Enterokinase entfernt werden. Ungespaltene Fusionsproteine mit  $m/z$  14450, die Polyhistidin-enthaltenden Peptide nach Enterokinase-Spaltung und alle unspezifisch an die Beads adhären Proteine sollten dabei weiterhin an die Beads gebunden vorliegen. Trotz Optimierung von Enzymkonzentration, Inkubations- und Reaktionszeiten sowie Vorreinigung des Bakterienlysates mit Hilfe der Ni-NTA-Säule lag die Effizienz der Spaltungsreaktion an Beads weit unter der Ausbeute der Spaltungsreaktion, die in Lösung durchgeführt wurde (nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte als beste Reinigungsstrategie eine Vorreinigung des Bakterienlysates mit Hilfe der Ni-NTA-Säule, Spaltung des rekombinanten Fusionsproteins durch 0,1 unit Enterokinase/ 10 µg Protein für 2-4 Stunden und anschließende Reinigung des Spaltungsproduktes mit  $m/z$  10920 mit Hilfe der HPLC ermittelt werden. Infolge der hohen Verluste bei dieser Aufreinigungsstrategie und

der limitierten Kapazität der verwendeten HPLC-Anlage auf ein bestimmtes Probenvolumen und einen bestimmten Durchfluss müssten mindestens 500 Läufe gesammelt werden. Ein sich an diese Methode anschließendes Problem stellte der Puffer dar, in welchem sich das Protein nach der HPLC befindet. Die Proteine müssen pelletiert werden und in einem für die Antikörperselektion geeigneten Puffer aufgenommen werden. Diese Schritte sind nur unter erneuten Verlusten möglich. In Versuchen hierzu lag die Proteinkonzentration unter der Nachweisgrenze der Methode von 0,1 µg/µl trotz des geringen Probenvolumens von 10 µl.

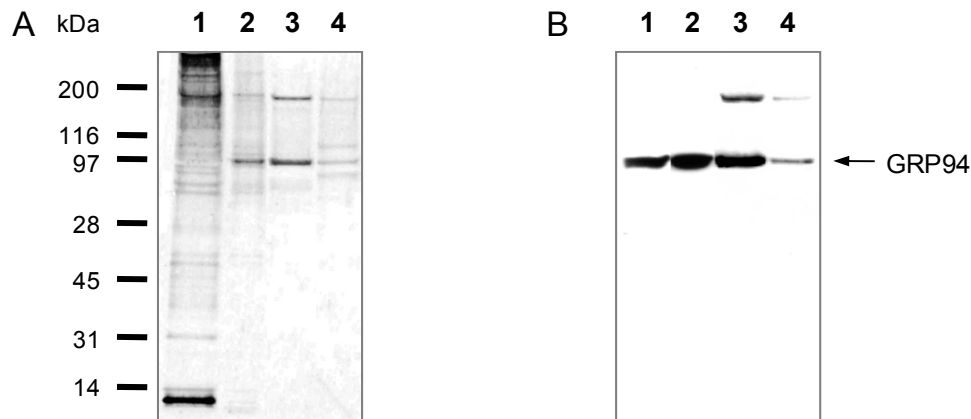
Um die für weitere Versuche zur Validierung und Charakterisierung des N-terminalen GRP94-Fragments notwendigen spezifischen Antikörper im Rahmen dieser Arbeit zu erhalten, musste aus Zeitgründen auf das Abspalten des His-Tag-Peptides verzichtet werden. Für die Selektion der Antikörper wurde das 14450 Da große GRP94-Fragment mit His-Tag eingesetzt, da die anderen getesteten Methoden ohne HPLC-Reinigung nicht zur geforderten Reinheit von 80% führten.

#### **4.2.3.5 Aufreinigung von GRP94 aus Zelllinien**

Für die Herstellung der Antikörper, die nur das N-terminale GRP94-Fragment erkennen, wurden für den Selektionsprozess und die Qualitätskontrolle neben dem GRP94-Fragment auch das 94 kDa große GRP94 Protein benötigt.

Die Aufreinigung erfolgte nach einem Protokoll aus der Dissertation von S. Heiligtag (151) aus HT29- und A413-Zellen. Die Proteine des Zelllysates wurden zunächst mit Hilfe von Anionenaustauschchromatographie (Econo Q, Biorad) getrennt, GRP94 eluierte mit 1 M Natriumchlorid (Abb. 24). Nach dem Vereinigen und Umpuffern der 1 M Natriumchlorid-Fractionen mit Hilfe von PD-10-Säulen (Amersham Biosciences) erfolgte der nächste Auftrennungsschritt durch die Kationenaustauschchromatographie (Econo S, Biorad). Der Durchfluss, welcher GRP94 enthielt, wurde direkt auf eine Hydroxyapatitchromatographie-Säule (Econo CHTII, Biorad) aufgetragen. GRP94 eluierte in einem Gradienten von 200-300 mM Natriumphosphat, wobei die 200 mM Natriumphosphat-Fractionen den größten Anteil des GRP94 enthielten. Wie das Silbergel zeigte, war in diesen Fractionen neben deutlich schwächer gefärbten Banden eine weitere Proteinbande erkennbar (Abb. 24A). Diese Bande scheint GRP94 zu enthalten, da sich im entsprechenden

Molekulargewichtsbereich im Western Blot mit anti-GRP94 Antikörper (Stressgen) ebenfalls eine Bande detektieren ließ (Abb. 24B).



**Abb. 24: Analyse der Aufreinigung von GRP94.** A413-Zelllysate wurden einer Anionenaustauschchromatographie (Econo Q) unterzogen. Die Elution erfolgte durch einen Natriumchloridstufengradienten, GRP94 eluierte bei einer Konzentration von 1 M Natriumchlorid (Bahn 1). Nach Umpuffern wurde eine Kationenaustauschchromatographie (Econo S) durchgeführt. GRP94 konnte im Durchfluss detektiert werden (Bahn 2), welcher auf eine Hydroxyapatitchromatographie Säule (Econo CHTII) aufgetragen wurde. Die Elution erfolgte durch einen Natriumphosphatstufengradienten. GRP94 konnte in den Fraktionen 200 (Bahn 3) und 300 mM Natriumphosphat (Bahn 4) nachgewiesen werden. Nach chromatographischer Trennung wurden die Fraktionen einer Gelelektrophorese (4-12%iges Bis-Tris-Gel; Bahn 1, 2 reduzierend, Bahn 3, 4 nicht reduzierend) mit anschließender Silberfärbung unterzogen (A) oder es wurde ein Western Blot durchgeführt (B). Die Detektion erfolgte durch anti-GRP94 Antikörper (Stressgen).

#### 4.2.3.6 Herstellung der Antikörper und Überprüfung der selektierten Antikörper im Western Blot

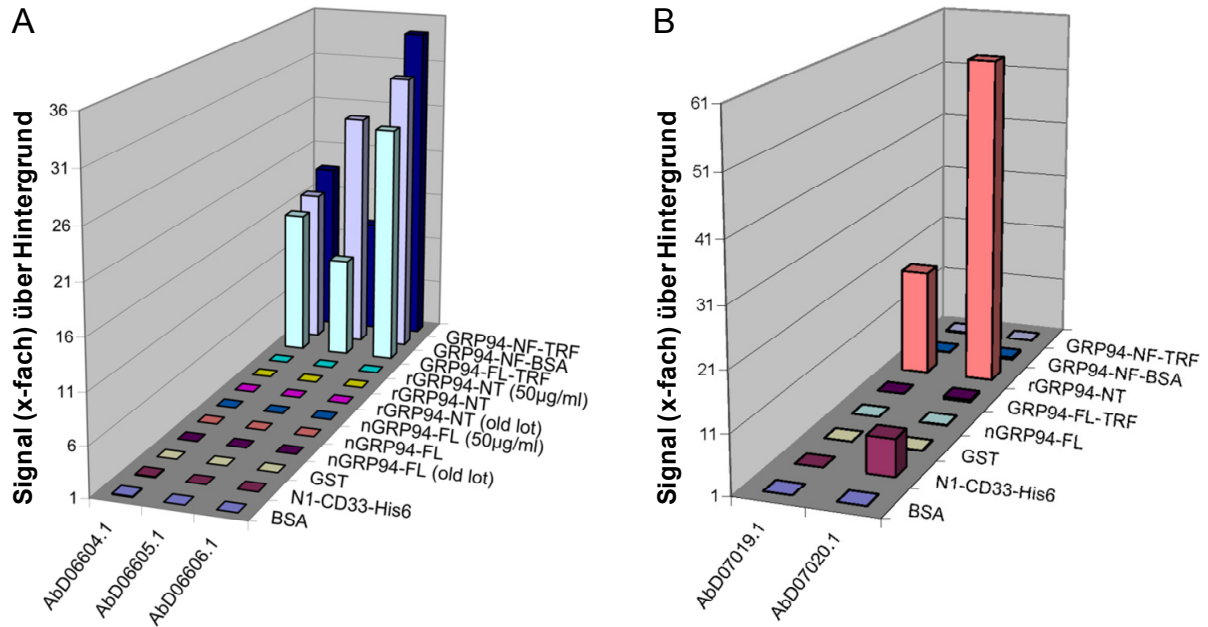
Die Herstellung bzw. Selektion der Antikörper erfolgte durch die Firma AbD Serotec, die hierfür die HuCAL<sup>®</sup>-Technologie (Human Combinatorial Antibody Library) verwendet. Die Bibliothek zeichnet sich durch eine hohe Diversität aus, sie enthält ungefähr  $1,6 \times 10^{10}$  Varianten. Dieses Repertoire setzt sich zusammen aus der Kombination von 49 Antikörpergrundgerüsten und einem Maximum an Diversität der antigenbindenden Regionen durch Diversifikation aller sechs CDRs, wobei Gerüstregionen und CDRs auf der natürlichen Zusammensetzung von humanen Antikörpern basieren. Spezifische Antikörper können nach einem initialen Screening durch Austausch von CDRs weiter optimiert werden. Für die Selektion wird die CysDisplay<sup>™</sup> Screening-Technologie verwendet, durch die Binder mit einer hohen Affinität aus der Antikörperbibliothek mit Hilfe filamentöser Phagen selektiert werden. Die Selektion der Antikörper unter Verwendung der HuCAL<sup>®</sup>-Technologie soll bei



bestimmten Applikationen Vorteile gegenüber der Herstellung von Antikörpern, die auf der Immunisierung von Tieren basieren, bieten. Hierzu wird die Selektion von Antikörpern gezählt, die nicht mit einem eng verwandten Protein interagieren. Dabei werden cross-reaktive Antikörper durch bestimmte Substraktionsstrategien eliminiert. Einen weiteren Vorteil dieser Methode gegenüber der Immunisierung von Tieren stellte der angestrebte Zeitrahmen von zwei Monaten dar (HuCAL<sup>®</sup> Antibodies Technical Manual, AbD Serotec).

Anhand der durch die Firma AbD Serotec dargestellten Ergebnisse musste festgestellt werden, dass die selektierten Antikörper nicht vollständig den gewünschten Kriterien entsprachen. Die primären Selektionen verliefen größtenteils erfolgreich. Hierfür waren von der Firma AbD Serotec zwei Peptide generiert worden, auf deren Basis die primären Selektionen durchgeführt wurden. Dabei sollten die Antikörper mit dem Peptid GRP94-NF-TRF bzw. GRP94-NF-BSA (GRP94 N-terminales Fragment, gekoppelt mit Carrierprotein Transferrin bzw. BSA), welches dem C-terminalen Bereich des 10320 Da großen GRP94-Fragmentes entsprach, interagieren. Diese Antikörper sollten jedoch nicht an das zweite generierte Peptid GRP94-FL-TRF (GRP94 full length protein, gekoppelt mit Carrierprotein Transferrin) binden, dessen C-terminale Sequenz über die des 10320 Da großen GRP94-Fragmentes hinausging. Obwohl die Antikörper in den primären Selektionsrunden die geforderte Spezifität zeigten, waren sie im anschließenden ELISA zur Qualitätskontrolle nicht in der Lage, das rekombinante GRP94-Fragment (rGRP94-NT= rekombinantes N-terminales GRP94-Fragment) zu erkennen (Abb. 25A). Sie konnten lediglich an die bei der primären Selektion verwendeten Peptide binden. Trotzdem sollten die Antikörper im Western Blot getestet werden, da die Proteine hierbei im denaturierten Zustand vorliegen und die Antikörper möglicherweise ein verändertes Bindungsverhalten aufweisen. Beim nächsten Selektionsversuch wurde ein direktes Panning auf dem rekombinanten GRP94-Fragment unter geringfügiger Blockierung mit GRP94 durchgeführt. Im primären ELISA-Screening des Pannings konnten zahlreiche positive Klone selektiert werden. Die Antikörper zweier Klone mit unterschiedlichen Sequenzen wurden im ELISA auf den Proteinen und den Peptidkonjugaten getestet. Beide Antikörper zeigten eine Bindung an das rekombinante GRP94-Fragment (rGRP94-NT= rekombinantes N-terminales GRP94-Fragment), jedoch nicht an die Peptidkonjugate (Abb. 25B). Es wurde kein Signal mit

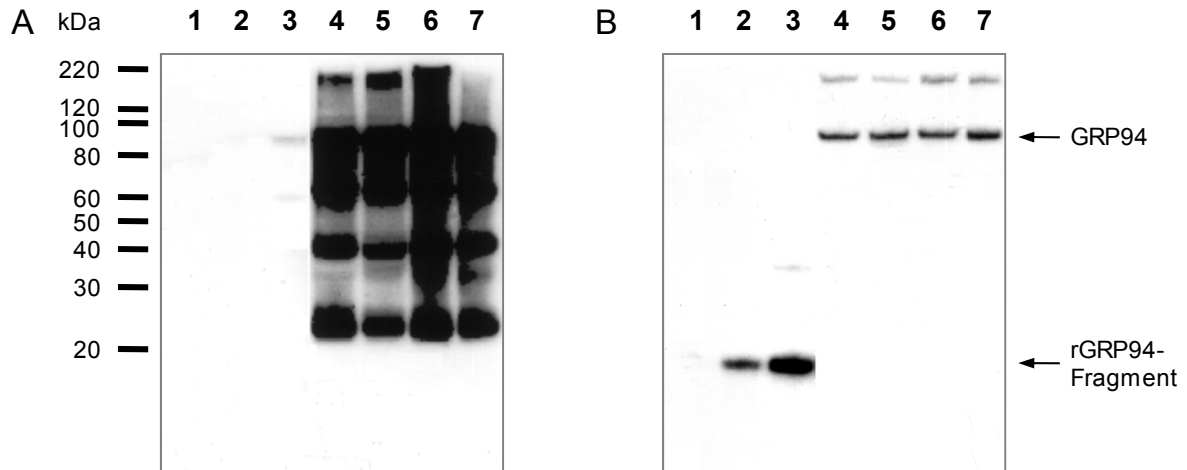
GRP94 (nGRP94-FL= natives GRP94 full length protein) sowie dem entsprechenden Peptidkonjugat detektiert. Ein Antikörper zeigte eine leichte Kreuzreaktivität auf ein Kontrollprotein (N1-CD33-His6).



**Abb. 25: ELISA zur Qualitätskontrolle der anti-GRP94-NT Antikörper.** A) ELISA nach der ersten Selektionsstrategie. Die primären Selektionen des Pannings wurden auf GRP94-Peptidkonjugaten durchgeführt. Dabei erfolgte eine positive Selektion auf dem Peptid, welches dem C-terminalen Bereich des GRP94-Fragmentes entsprach, und eine negative Selektion gegenüber dem Peptid, dessen Sequenz über den C-Terminus des GRP-Fragmentes hinausging. Es konnten 3 Binder selektiert werden. Nach Expression in *E.coli* und Aufreinigung wurden die Antikörper (AbD06604.1, AbD06605.1, AbD06606.1) in einem ELISA zur Qualitätskontrolle auf ihr Bindungsverhalten überprüft. B) ELISA nach der zweiten Selektionsstrategie. Das Panning wurde auf dem rGRP94-NT unter geringer Blockierung mit nGRP94-FL durchgeführt. Im Screening wurden mehr als 250 Binder erhalten, von denen 20 sequenziert wurden. Es ergaben sich 2 unterschiedliche Sequenzen. Nach Expression in *E.coli* und Aufreinigung wurden die Antikörper (AbD07019.1, AbD07020.1) in einem ELISA zur Qualitätskontrolle auf ihr Bindungsverhalten überprüft. Durchführung und Auswertung erfolgte durch die Firma Abd Serotec. Kontrollproteine: GST=Glutathion-S-Transferase, N1-CD33-His6=humanes CD33 mit His-Tag, BSA=bovines Serumalbumin

Alle 5 erhaltenen Antikörper wurden auf ihre Verwendbarkeit im Western Blot geprüft. Als Antigene wurden das rekombinante GRP94-Fragment, GRP94 und Lysate von Gewebeschnitten eingesetzt. Die Proteine wurden durch 4-12% Bis-Tris NuPAGE Gradientengele (Invitrogen) aufgetrennt und einem Western Blot unterzogen. Kein Antikörper war in der Lage, 500 ng des rekombinanten GRP94-Fragmentes zu detektieren. Abbildung 26A zeigt dieses Ergebnis für den Antikörper AbD07019, die Western Blot-Analysen mit den anderen Antikörpern waren vergleichbar. Mit dem als Kontrolle eingesetzten anti-GRP94 Antikörper (Zymed) konnten dagegen neben dem

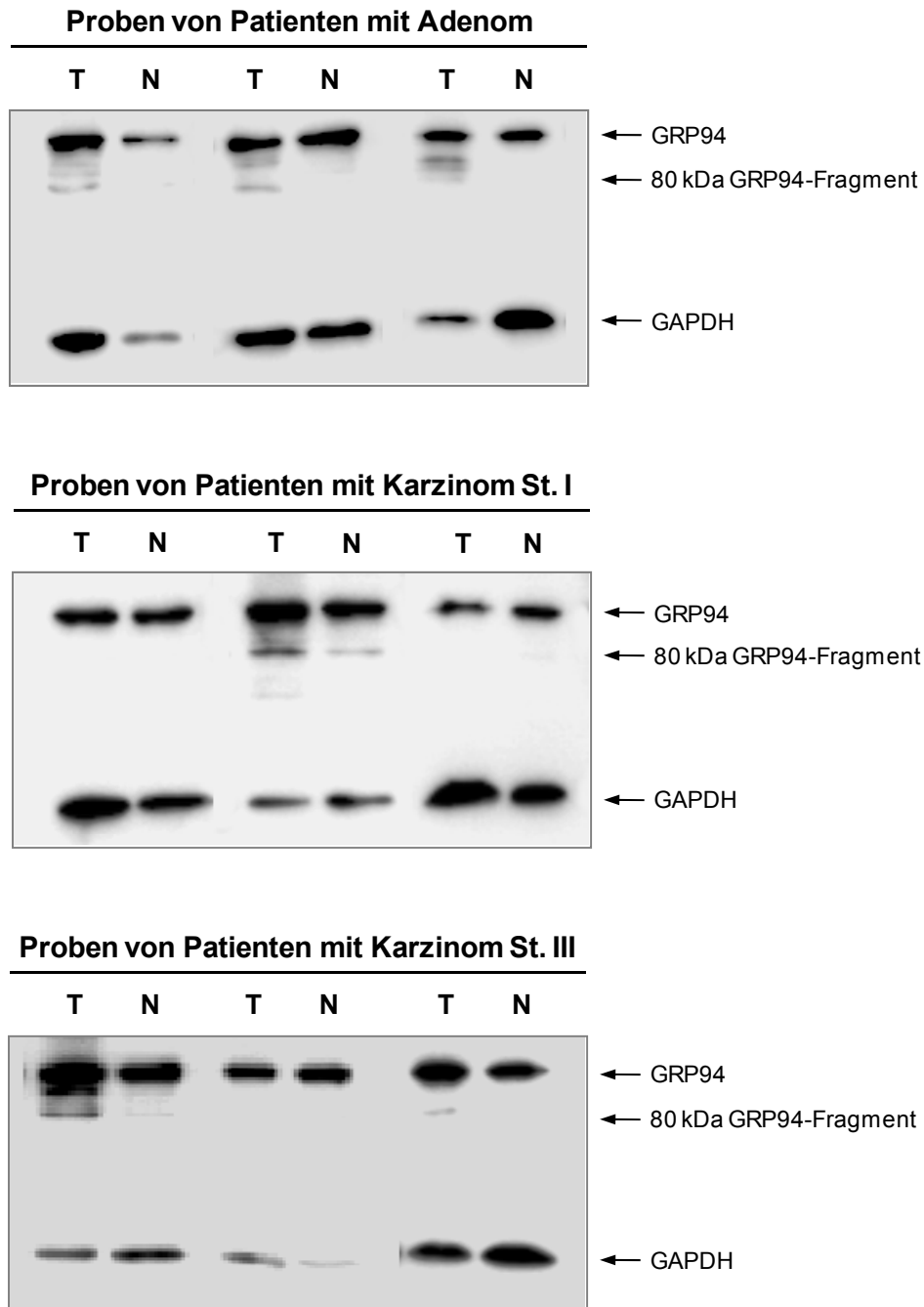
94 kDa Protein 100 ng des rekombinanten GRP94-Fragmentes detektiert werden (Abb. 26B). Alle von AbD Serotec selektierten Antikörper zeigten starke Kreuzreaktionen mit Proteinen der Gewebelysate. Somit erwiesen sich diese Antikörper als ungeeignet.



**Abb. 26: Repräsentative Western Blots zur Prüfung der Verwendbarkeit der selektierten Antikörper.** Die Proteine wurden mit Hilfe eines 4-12%igen Bis-Tris-Gels aufgetrennt (nicht reduzierend) und einem Western Blot unterzogen. Die Detektion erfolgte durch HuCAL® Antikörper AbD07019 (AbD Serotec) (A) oder durch anti-GRP94 Antikörper (Zymed) (B). Bahn 1) 10 ng rekombinantes GRP94-Fragment. Bahn 2) 100 ng rekombinantes GRP94-Fragment. Bahn 3) 500 ng rekombinantes GRP94-Fragment. Bahn 4) Lysat von Kolon-Normalgewebeschnitten eines Patienten mit Adenom. Bahn 5) Lysat von Kolon-Tumorgewebeschnitten eines Patienten mit Adenom. Bahn 6) Lysat von Kolon-Normalgewebeschnitten eines Patienten mit Karzinom. Bahn 7) Lysat von Kolon-Tumorgewebeschnitten eines Patienten mit Karzinom.

#### 4.2.4 Hypothesen zur inhärenten Spaltung von GRP94

GRP94 zeichnet sich durch ein ubiquitäres Vorkommen aus, wobei nach Induktion von ER-Stress und in Tumorzellen eine erhöhte Expression beschrieben wird (119, 120, 121, 146). Dagegen konnte das in dieser Arbeit als Markerkandidat identifizierte GRP94-Fragment mit massenspektrometrischen Methoden im Normalgewebe kaum detektiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Entstehung des GRP94-Fragmentes um eine in tumorabhängige Prozesse involvierte Reaktion handeln könnte. Dabei würde das Fragment im Tumorgewebe verstärkt gebildet oder sein Abbau verhindert werden.



**Abb. 27: Untersuchung der Expression und Spaltung von GRP94 in Normal-, Adenom- und Karzinomgewebe der Tumorstadien I und III von jeweils drei Patienten.** Die Proteinlysate der Gewebeschnitte wurden mit Hilfe eines 4-12%igen Bis-Tris-Gels aufgetrennt (reduzierend) und einem Western Blot unterzogen. Die Detektion erfolgte durch anti-GRP94 Antikörper (Stressgen). Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

In Western Blot-Analysen von Gewebeproben konnte die Hochregulation des 94 kDa Proteins im Tumorgewebe nicht nachgewiesen werden (Abb. 27). Jedoch wurden neben dem 94 kDa GRP94 im Tumorgewebelysat Banden mit geringerem Molekulargewicht detektiert, die auf eine Spaltung von GRP94 hindeuten. Reddy et al. beschrieben die Spaltung von GRP94 während Etoposide-induzierter Apoptose in

ein nachweisbares ca. 80 kDa großes und ein hypothetisches 14 kDa Fragment durch Calpain (148). Nach Induktion von ER-Stress durch Thapsigargin in renalen Zellen konnten Muruganandan et al. ebenfalls eine Calpain-abhängige Spaltung von GRP94 beobachten (149). In kolorektalen Karzinomen wiesen Lakshmikuttyamma et al. eine signifikant höhere Aktivität und Expression von m-Calpain nach (150). Auch in Polypen konnte eine erhöhte Aktivität, welche geringer als im Karzinomgewebe war, sowie eine moderat erhöhte Expression gezeigt werden (150). So wäre denkbar, dass es sich beim Tumormarkerkandidaten um ein durch Calpain-Spaltung gebildetes GRP94-Fragment handelt.

Zunächst wurde geprüft, ob aufgereinigtes GRP94 mit Calpain unter Entstehung eines 10320 Da Fragmentes gespalten werden kann. Die Durchführung erfolgte modifiziert nach Reddy et al. (148). Neben dem aufgereinigten GRP94 wurde kommerziell erworbenes Maus GP96 verwendet. Nach 30 Minuten Inkubation wurden die Spaltungsversuche mit SELDI-TOF MS untersucht. Weder im Ansatz mit aufgereinigtem GRP94 noch im Ansatz mit Maus GP96 konnte der Peak bei  $m/z$  10320 detektiert werden (nicht gezeigt). Eine Spaltung von GRP94 durch Calpain, bei welcher das Fragment mit 10320 Da gebildet wird, konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Um den zugrunde liegenden Spaltungsprozess näher zu untersuchen, sollte geprüft werden, ob im Tumorgewebe ein aktives Enzym vorliegt, welches GRP94 in ein 10320 Da Fragment spalten kann. Hierfür wurden stickstofffixierte Normal- und Adenom- und Karzinomgewebeproben geschnitten, die Schnitte lysiert und mit aufgereinigtem GRP94 inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Lysate mit SELDI-TOF MS analysiert. Es konnte keine Intensitätsänderung des Peaks  $m/z$  10320 detektiert werden (nicht gezeigt). Auch die Verwendung von unfixierten Gewebeproben führte nicht zu einer nachweisbaren Spaltung des GRP94 in ein 10320 Da Fragment (nicht gezeigt).

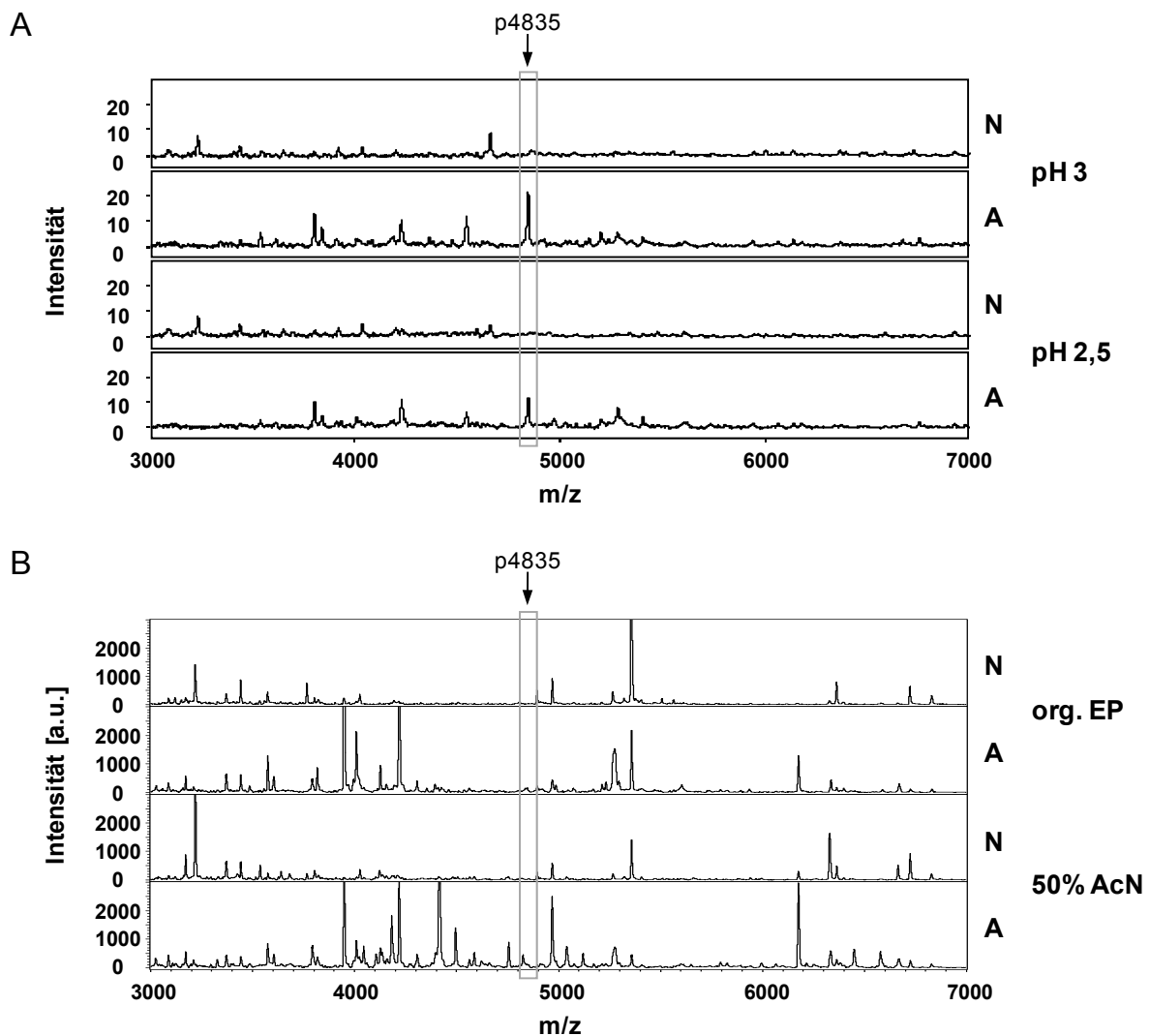
#### 4.2.5 Aufreinigung des Peptids p4835 und Identifizierungsversuche

Neben dem als GRP94-Fragment identifizierten Protein war der Peak mit  $m/z$  4837  $\pm$  5 zur Identifizierung selektiert worden. Die höchsten Peakintensitäten für diesen Biomarkerkandidaten waren im Adenomgewebe detektiert worden, während sowohl Normal- als auch Karzinomgewebe deutlich geringere Intensitäten des Peaks aufwiesen.

Um eine Aufreinigung für eine anschließende Identifizierung des Peptids zu erreichen, wurden zunächst verschiedene Methoden getestet. Hierzu zählten Anionen- und Kationenaustauschchromatographie in Form von Beads und Säulen mit unterschiedlichen Puffersystemen. Weiterhin wurden Hydroxyapatitsäulen sowie Aufreinigungsmethoden, die auf hydrophoben Wechselwirkungen basieren, eingesetzt. Dabei stellten die sehr geringen Ausgangsmengen dieses Peptids im Gewebelysate, das niedrige Molekulargewicht des Biomarkerkandidaten, die große Komplexität der Gewebeproben und die individuelle Zusammensetzung des Proteoms jeder einzelnen Gewebeprobe eine große Herausforderung bei der Aufreinigung dar. Die Kombination von beadbasierter Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Reversed Phase Chromatographie erwies sich als erfolgversprechendste Strategie. Die zunächst verwendeten RP-Beads führten jedoch nicht zu einer ausreichenden Auftrennung der Peptide und Proteine. Daher wurde als zweiter Reinigungsschritt die Separation des Biomarkerkandidaten mit Hilfe der HPLC etabliert. Bedingt durch die individuelle Zusammensetzung der Peptide und Proteine jeder Gewebeprobe konnte nur mit sehr wenigen Gewebeproben eine für die Identifizierung ausreichende Separierung der Peptide und Proteine erzielt werden.

Um das Peptid p4835 aufzureinigen, wurden zunächst Proben von Adenomgewebe und korrespondierendem Normalgewebe mit einem Kryostaten geschnitten, mikroskopisch kontrolliert und lysiert. Die Lysate wurden massenspektrometrisch analysiert. Da mit großen Verlusten während der Aufreinigungsschritte gerechnet werden musste, wurden nur Lysate mit einer ausreichenden Intensität des Peaks mit  $m/z$  4837  $\pm$  5 verwendet. Im ersten Schritt der Aufreinigung wurden die Peptide und Proteine an Anionenaustauschermaterial (Q Ceramic Hyper D<sup>®</sup> F) gebunden. Die Elution der Proteine erfolgte mit Hilfe eines pH-Gradienten. Im Anschluss wurden

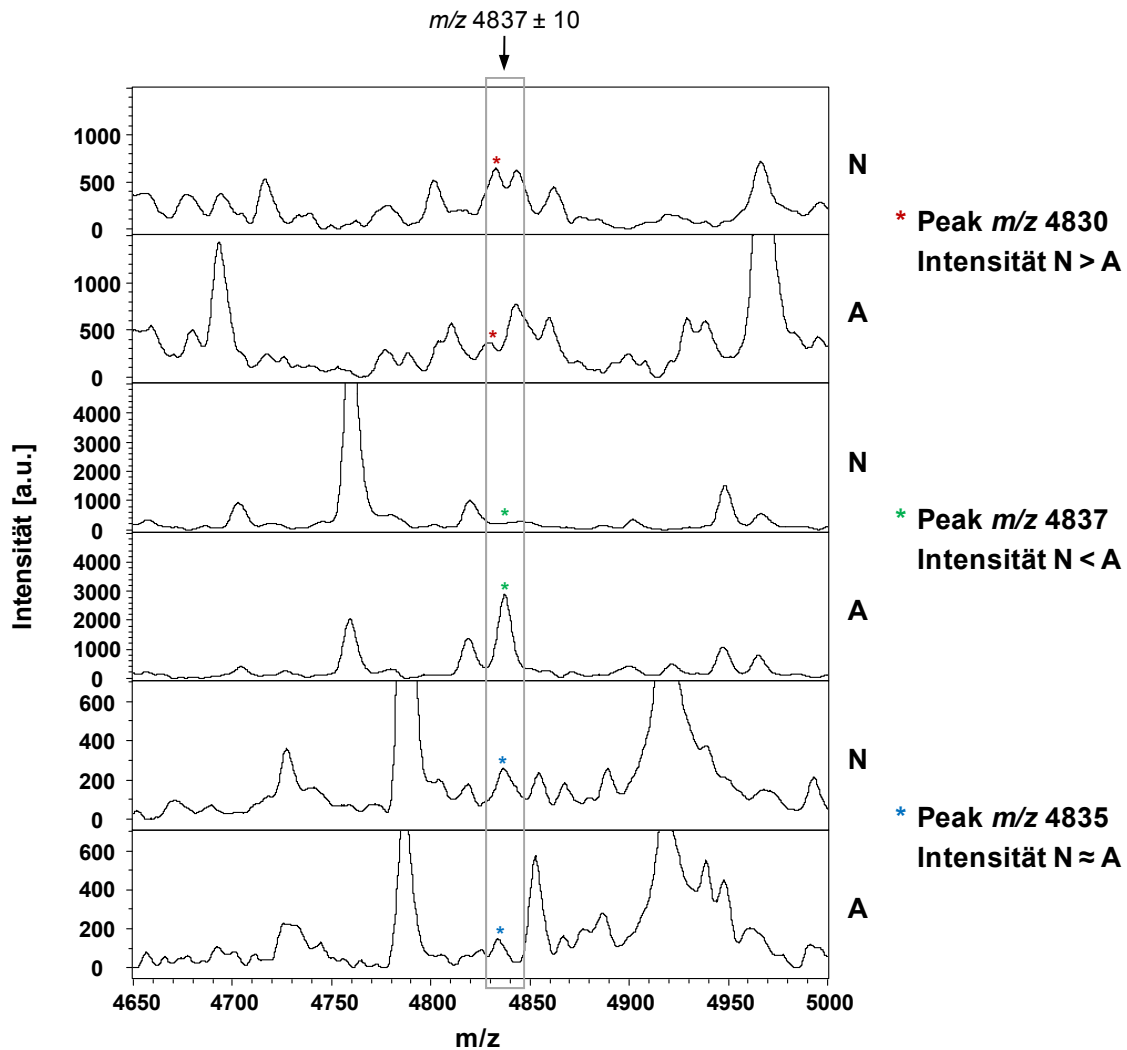
zwei weitere Elutionsschritte mit Acetonitril durchgeführt, um möglichst alle gebundenen Peptide und Proteine von den Beads zu entfernen. Wie die massenspektrometrische Untersuchung der Fraktionen zeigte, konnte ein Peptid mit  $m/z$  4837  $\pm$  5 hauptsächlich bei pH 3 und pH 2,5 eluiert werden (Abb. 28A). Mit geringeren Peakintensitäten wurde das Peptid in der Fraktion des organischen Elutionspuffers und im nachfolgenden Schritt, der mit 50% Acetonitril eluierten Fraktion detektiert (Abb. 28B).



**Abb. 28: Aufreinigung des Peptids p4835 mit Hilfe von Anionenaustauschchromatographie.** Die Peptide und Proteine der Gewebelysate wurden bei pH 9 an Q Ceramic Hyper D<sup>®</sup> F Material gebunden und durch einen pH-Gradienten und anschließend mit organischen Puffern eluiert. A) SELDI-TOF Massenspektren (Q10 ProteinChip<sup>®</sup> Array) einzelner Fraktionen nach Elution bei pH 3 sowie pH 2,5. B) MALDI-TOF Massenspektren einzelner Fraktionen nach Elution mit organischem Puffer sowie mit 50% Acetonitril. N=Normalgewebe, A=Adenomgewebe, org. EP=organischer Elutionspuffer, AcN=Acetonitril

Wegen der messtechnisch bedingten möglichen Molekulargewichtsabweichung des Biomarkerkandidaten sollten zunächst alle Fraktionen, die einen Peak im Bereich von  $4837 \pm 10$  Da aufwiesen, dem nächsten Aufreinigungsschritt unterzogen werden. Hierfür musste die Fraktion pH 2,5 umgepuffert werden, was durch die zuvor bereits etablierte Reversed Phase Chromatographie mit Hilfe von RP-Beads (Poly Beads<sup>TM</sup>, BioSeptra) erfolgte. Das Peptid p4835 wurde in der 30% Acetonitril-Fraktion detektiert. Zu den weiteren vorbereitenden Schritten zählte das Konzentrieren aller acetonitrilhaltigen Fraktionen in einer Vakuumzentrifuge, um den Acetonitrilgehalt auf 5% zu reduzieren. Im Anschluss wurden die Peptide und Proteine unter Verwendung einer Zorbax SB-C18 Säule (Agilent) durch einen Acetonitrilgradienten von 2-60% für 45 min bei 30°C (Fraktionsgröße 20 s, Flussrate 5  $\mu$ l/min) mit Hilfe der HPLC aufgetrennt, mit Matrix versetzt, auf ein Stahltarget gespottet und anschließend mit MALDI-TOF MS analysiert. Durch den Vergleich von Normalgewebeprobe und Tumorgewebeprobe wurden die Fraktionen ermittelt, welche den potentiellen Adenomgewebemarker mit p4835 enthielten. In allen untersuchten Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie nach der HPLC-basierten Auftrennung konnten zahlreiche Peaks in dem Molekulargewichtsbereich von  $4837 \pm 10$  Da detektiert werden. Von diesen zeigten die meisten Peaks keine signifikante Regulation zwischen Normal- und Tumorgewebe und einige schienen im Normalgewebe hochreguliert zu sein, Abbildung 29 zeigt beispielhaft Spektren ausgewählter Fraktionen. Ein Peak bei  $4837 \pm 5$  Da, der bei ungefähr 30% Acetonitril von der Säule eluierte, wies eine deutlich höhere Peakintensität bei der Tumorgewebeprobe als bei der Normalgewebeprobe auf. Er konnte mit der entsprechenden Regulation nach HPLC-basierter Auftrennung der Fraktionen pH 3, pH 2,5 und schwächer in der Fraktion des organischen Elutionspuffers der Anionenaustauschchromatographie detektiert werden. In der 50% Acetonitril-Fraktion der Anionenaustauschchromatographie war dieser Peak dagegen nach der HPLC nicht mit mindestens zweifacher Regulation nachweisbar. Für die weiteren Versuche wurden die Fraktionen pH 3 und pH 2,5 der Anionenaustauschchromatographie verwendet.

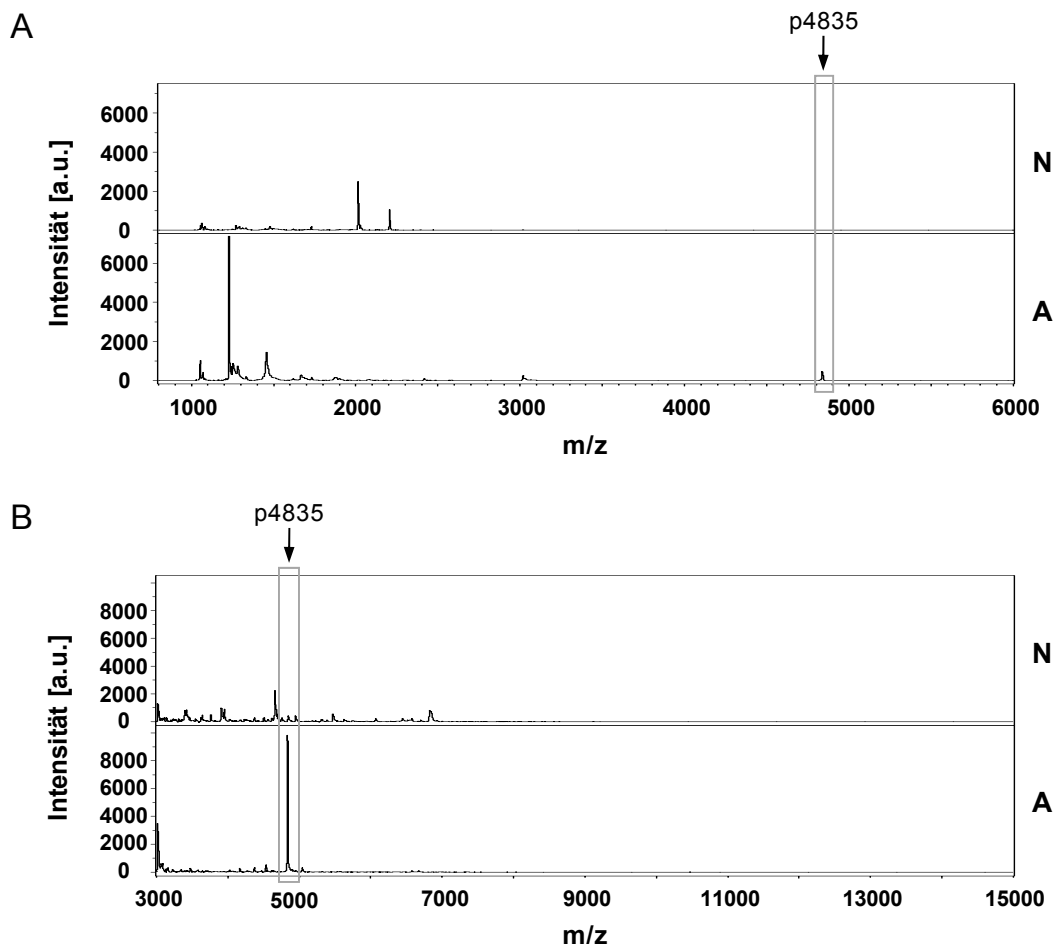




**Abb. 29: Ausgewählte Fraktionen nach analytischer Auftrennung mit Hilfe der HPLC zur Aufreinigung des Peptids p4835.** Die Peptide und Proteine der Fraktionen pH 3 der Anionenaustauschchromatographie wurden mit Hilfe einer Zorbax SB-C18 Säule durch die HPLC aufgetrennt (2-60% Acetonitrilgradient, 45 min, 30°C, Fraktionsgröße 20 s, Flussrate 5  $\mu$ l/min). Die Fraktionen wurden mit Hilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. N=Normalgewebe, A=Adenomgewebe

Da die Komplexität der HPLC-Fractionen für die Identifizierung des potentiellen Biomarkers immer noch zu hoch war, erfolgte eine Optimierung des Acetonitrilgradienten auf 20-40% für 40 min bei 30°C, sowie der Flussrate auf 12  $\mu$ l/min. Die Fraktionsgröße wurde auf ein Volumen von 9  $\mu$ l (bzw. 45 s) umgestellt, um einen weiteren Aufreinigungsschritt mit Hilfe der Gelelektrophorese oder einen Verdau in Lösung zu ermöglichen. Die Fraktionen wurden in Mikrotiterplatten gesammelt und mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie kontrolliert. Unter den optimierten Bedingungen wurden ungefähr 80 HPLC-Läufe gesammelt, bei der Tumorgewebeprobe enthielten je Lauf 1-2 Fraktionen das potentielle Biomarker-

peptid. Von diesen Fraktionen konnten 33 Fraktionen der Tumorgewebeprobe und die korrespondierenden Fraktionen der Normalgewebeprobe für die Identifizierung verwendet werden. Die übrigen Fraktionen wiesen neben dem Biomarkerkandidaten zu viele weitere Peptide und Proteine auf und wurden zum Testen der Methode eingesetzt. Während der Aufreinigung zeigte sich, dass das Peptid p4835 durch die Lagerung an Intensität verliert, daher wurden bei einem Teil der Anionenaustauschchromatographien Proteaseinhibitoren zugesetzt.



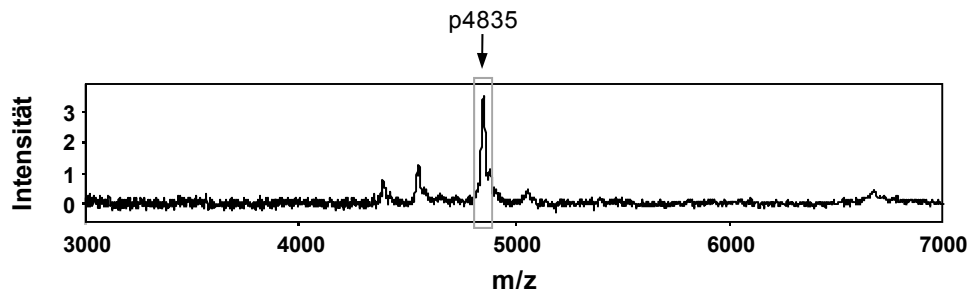
**Abb. 30: Aufreinigung des Peptids p4835 mit Hilfe der HPLC.** Die Peptide und Proteine der Fraktionen pH 3 und pH 2,5 der Anionenaustauschchromatographie wurden mit Hilfe einer Zorbax SB-C18 Säule durch die HPLC aufgetrennt (20-40% Acetonitrilgradient, 40 min, 30°C, Fraktionsgröße 45 s, Flussrate auf 12 µl/min) und die Fraktionen mit MALDI-TOF MS analysiert. Fraktionen, die den Peak mit  $m/z$   $4835 \pm 5$  in ausreichender Reinheit enthielten, wurden vereinigt. Mit den entsprechenden Fraktionen des korrespondierenden Normalgewebes wurde ebenso verfahren. A) MALDI-TOF Massenspektren im Bereich 800 bis 6000 Da der Fraktionen ohne Proteaseinhibitoren. B) MALDI-TOF Massenspektren im Bereich 3000 bis 15000 Da der Fraktionen ohne Proteaseinhibitoren. N=Normalgewebe, A=Adenomgewebe

Nach dem Vereinigen der für die Identifizierung geeigneten Fraktionen erfolgte eine Mengenabschätzung des Peptids p4835 mit Hilfe des Standardproteins Insulin (5733,56 Da, CPS-Standard, Bruker). Die HPLC-Fraktionen ohne Proteaseinhibitoren enthielten eine geschätzte Gesamtmenge an Peptid p4835 von ca. 8 pmol. Die Gesamtmenge an Peptid, welche die HPLC-Fraktionen enthielten, die aus Läufen mit inhibitorhaltigen Anionenaustauscherfraktionen stammten, wurde auf ca. 4 pmol geschätzt. Einen Überblick über die Peptide und Proteine bis 15 kDa wurde durch Präparation der Proben mit Zimtsäurematrix für den Peptidbereich und Sinapinsäurematrix für den Proteinbereich und MALDI-TOF MS Messung erhalten (Abb. 30).

Im Anschluss sollten die Peptide und Proteine der HPLC-Fraktionen mit Hilfe der Gelelektrophorese weiter getrennt und durch Färbung des Gels sichtbar gemacht werden. Dieser Schritt ermöglicht insbesondere die Separation und Detektion von Proteinen mit höherem Molekulargewicht, welche durch die massenspektrometrische Analyse nicht messbar sind, in den HPLC-Fraktionen jedoch enthalten sein könnten. Bei Verwendung von HPLC-Fraktionen für einen direkten Identifizierungsversuch des Biomarkerkandidaten musste diese Problematik beachtet werden.

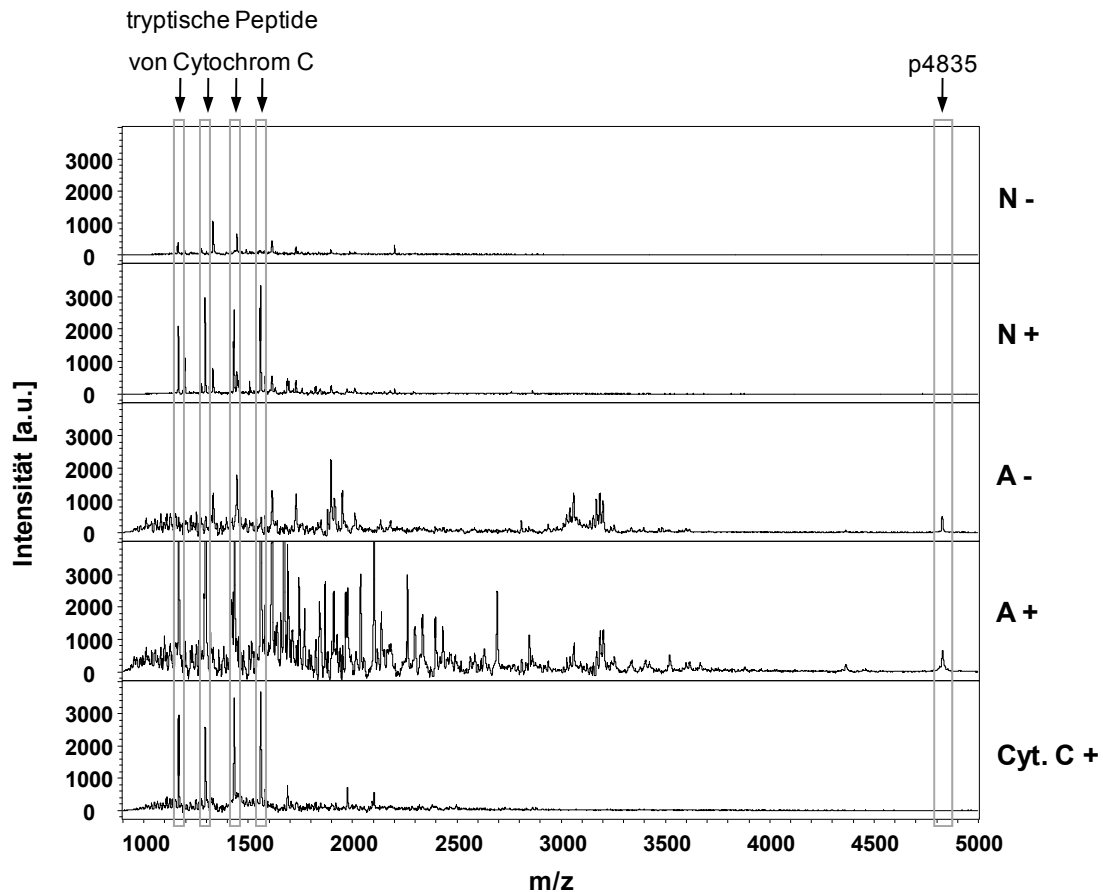
Da vorausgehende Versuche gezeigt hatten, dass die geringen Mengen des Peptids p4835 nach der Gelelektrophorese weder durch Coomassie- noch durch Silberfärbung sichtbar gemacht werden konnten (nicht gezeigt), sollte getestet werden, ob auf eine Färbung verzichtet werden kann. Die Peptide und Proteine wurden in einem 18%igen Tris-Glycin-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel im Anschluss fortlaufend in schmale Streifen geschnitten und diese halbiert. Die eine Hälfte wurde genutzt, um durch passive Elution und anschließende massenspektrometrische Analyse den Gelstreifen zu bestimmen, der den potentiellen Marker enthält. Die andere Hälfte wurde für einen tryptischen Verdau des Peptids mit anschließender Elution der Peptide verwendet. Wie die Abbildung 31 zeigt, konnte der Biomarkerkandidat passiv eluiert werden. Jedoch waren weder nach der tryptischen Spaltung des Peptids in der anderen Gelhälfte noch dem in Lösung durchgeführten tryptischen Verdau des eluierten Peptids spezifische Peptide detektierbar. Neben der Möglichkeit, dass sich das Peptid p4835 nicht tryptisch spalten lässt oder die Reaktion inhibiert wurde, mussten verschiedene Ursachen in Betracht gezogen werden. Unter anderem könnte der durch das Konzentrieren vor der Gelelektrophorese verursachte Verlust der Probe zu nicht detektierbaren Mengen

an tryptischen Peptiden geführt haben. Um solche Faktoren ausschließen zu können, wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen der Verdau der Peptide und Proteine der entsprechenden HPLC-Fractionen direkt und ohne vorherige Gelelektrophorese stattfinden sollte. Durch den subtraktiven Abgleich der tryptischen Peptide der HPLC-Fractionen von Normal- und Tumorgewebeprobe wäre außerdem eine Identifizierung des Peptids p4835 denkbar.



**Abb. 31: Massenspektrometrische Analyse der Peptide und Proteine nach Gelelektrophorese und passiver Elution aus dem Gel.** Nach HPLC-basierter Auftrennung wurden Fraktionen, die das Peptid p4835 enthielten, mit Hilfe eines 18%igen Tris-Glycin-Gels weiter aufgetrennt. Im erwarteten Molekulargewichtsbereich wurde das Gel in schmale Streifen geschnitten und diese halbiert. Aus jeweils einer Gelhälfte wurden die Peptide und Proteine passiv eluiert. Durch Analyse mit SELDI-TOF MS wurde das Eluat bestimmt, welches den Biomarkerkandidaten enthielt.

Wie in Abbildung 32 erkennbar ist, ließ sich der Peak bei  $m/z$   $4835 \pm 5$  nach Inkubation mit Trypsin mit ähnlicher Intensität wie im Ansatz ohne Enzym nachweisen. Dagegen konnte das Kontrollprotein Cytochrom C gespalten werden, wie die Detektion der spezifischen tryptischen Peptide zeigte. Weiterhin war es möglich, zum Spaltungsansatz des Biomarkerkandidaten zugegebenes Cytochrom C zu verdauen, so dass eine Inhibition der enzymatischen Reaktion durch die Verwendung von HPLC-Fractionen und damit möglicherweise ungünstigen Pufferbedingungen ausgeschlossen werden kann. Daher besteht die Annahme, dass sich der Markerkandidat wahrscheinlich nicht durch Trypsin spalten lässt. Das Spektrum enthielt jedoch zahlreiche Peaks, die sich nach tryptischem Verdau und nicht in der Probe des Normalgewebes detektieren ließen. Diese Peaks wiesen zum größten Teil Massen auf, deren Nachkommastellen nicht auf Peptide hindeuten. Detektierte Peptidpeaks könnten von anderen in der HPLC-Fraktion enthaltenen Proteinen stammen.



**Abb. 32: MALDI-TOF MS-Analyse der tryptischen Spaltung der Peptide und Proteine der HPLC-Fraktion mit dem Peptid p4835 sowie der korrespondierenden Fraktion der Normalgewebeprobe.** Die inhibitorfreie HPLC-Fraktion mit dem Peptid p4835 und die entsprechende HPLC-Fraktion des Normalgewebes wurden nach Zugabe von Cytochrom C als Kontrollprotein mit Trypsin (+) inkubiert. Ein paralleler Ansatz ohne Trypsin (-) diente als Kontrolle. In einem weiteren Kontrollansatz wurde Cytochrom C tryptisch gespalten. Anschließend wurden die Peptide mit MALDI-TOF MS analysiert. N=Normalgewebe, A=Adenomgewebe, Cyt. C=Cytochrom C

Neben dem tryptischen Verdau wurden weitere Enzyme wie Chymotrypsin und Glu-C getestet, auch hier konnten keine spezifischen Peptide detektiert werden (nicht gezeigt).

Bei einem Molekulargewicht von 4837 Da bestand die Möglichkeit, das ungespaltene Peptid direkt durch ESI-TOF MS zu identifizieren. Hierfür wurden HPLC-Fractionen verwendet, die keine Proteaseinhibitoren enthielten. Die Peptid- und Proteinmischung wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Bruker durch LC-ESI-TOF MS analysiert. Ein in der Probe enthaltenes sehr dominantes Peptid, welches in den MALDI-TOF MS-Messungen deutlich schwächer erschien, verhinderte jedoch die Identifizierung des p4835 Biomarkerkandidaten (nicht gezeigt).



## 5 DISKUSSION

Kolorektale Karzinome entwickeln sich in den meisten Fällen durch Akkumulation von Mutationen aus benignen Adenomen. Werden die Tumoren bereits im Stadium der Adenome oder in Frühstadien der Karzinome diagnostiziert, kann diese Erkrankung sehr erfolgreich behandelt werden. Zurzeit erlauben vor allem endoskopische Untersuchungen eine zuverlässige Detektion von prämaligen Tumoren und Karzinomen. Nachteile dieser invasiven Früherkennungsmethode stellen neben den Kosten vor allem die geringe Akzeptanz in der Bevölkerung dar. Die Entwicklung neuer sensitiver und spezifischer Methoden zur frühzeitigen Diagnose ist daher dringend erforderlich. Dabei spielt die Entdeckung von Biomarkern zur Früherkennung eine entscheidende Rolle.

### 5.1 Methodik und Strategie

In dieser Arbeit wurden für die Entdeckung und Identifizierung potentieller Tumorbiomarker massenspektrometrische Methoden eingesetzt. Im Gegensatz zu traditionellen Methoden wie der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) ermöglichte die Massenspektrometrie neben der Verwendung von Fraktionierungs- und Automatisierungstechniken einen hohen Probendurchsatz (34). Zur Entdeckung neuer Biomarker wurde die SELDI-TOF MS-Technologie verwendet, welche als Variante der MALDI-TOF MS betrachtet werden kann. Der Vorteil der SELDI-TOF MS-Technologie bestand in der Möglichkeit, durch Nutzung der chromatographischen Oberflächen der ProteinChip<sup>®</sup> Arrays die Proteinproben direkt während der Präparation für die anschließende massenspektrometrische Analyse zu fraktionieren und zu reinigen (52, 125). Obwohl bei der Analyse des Serums der Chippräparation noch ein weiterer Fraktionierungsschritt vorausging, konnten nur relativ hoch abundante Proteine als Biomarkerkandidaten identifiziert werden. Diese Problematik wurde bei den auf Massenspektrometrie basierenden Technologien erkannt, da die Detektion der gering abundanten Proteine durch die Konkurrenz gegenüber den hoch abundanten Proteinen beim Binden und/oder bei der Messung behindert wird (42, 53). In Zukunft könnten neuere mehrdimensionale

Trennungsstrategien die Analyse der gering abundanten Proteine ermöglichen (57). Wenn effektivere chromatographische Separationsschritte, wie beispielsweise die RP-HPLC, eingesetzt werden, kann auf die ProteinChip® Arrays verzichtet und stattdessen die im Vergleich zur SELDI-TOF MS besser auflösende und durch höhere Massengenauigkeit gekennzeichnete MALDI-TOF MS verwendet werden. Dieser Nachteil der SELDI-TOF MS führte dazu, dass die Identifizierung der entdeckten Biomarkerkandidaten mit anderen massenspektrometrischen Methoden durchgeführt werden musste. So wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die SELDI-TOF MS-Technologie zunehmend durch MALDI-TOF MS ersetzt. Bei der Aufreinigung des Peptids p4835 konnte die effiziente Trennung durch die HPLC mit der anschließenden Detektion durch die MALDI-TOF Massenspektrometrie kombiniert werden. Die chromatographische Auftrennung, die MALDI-TOF MS-basierte Suche nach Biomarkern und die anschließende MALDI-TOF/TOF MS/MS-basierte Identifizierung werden zunehmend automatisiert und direkt („on-line“) gekoppelt durchgeführt (126).

Um komplexe Proteinproben zu analysieren, konnten zwei verschiedene Strategien verfolgt werden, der sogenannte „Bottom-up“- und „Top-down“-Ansatz. Bei der Analyse hochkomplexer Proben stellt der „Bottom-up“-Ansatz, die Analyse der nach enzymatischer oder chemischer Spaltung der Proteine resultierenden Peptide, die Standardstrategie dar (129). Die Analyse längerer Peptide und Proteine, bezeichnet als „Top-down“-Strategie, erlaubt eine umfangreichere Charakterisierung des Proteins. Derzeit kann diese Methodik jedoch nur mit einzelnen Proteinen oder einfachen Proteinmischungen durchgeführt werden (129), da „Top-down“-Ansätze die Gasphasen-Ionisierung und anschließende hochauflösende Massenbestimmung intakter Proteine erfordern, gefolgt von ihrer direkten Fragmentierung im Massenspektrometer ohne vorherige proteolytische Spaltung (130).

Um den Informationsverlust der „Bottom-up“-Proteomics (129) zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit intakte Peptide und Proteine analysiert. Durch Nutzung der SELDI-TOF MS-Technologie, die eine Variante der „Top-down“-Strategie darstellt (136), konnte der Vorteil der „Top-down“-Strategie genutzt werden, neben der Analyse von quantitativen Veränderungen auch die qualitativen Veränderungen des Proteoms während der malignen Transformation, die durch differentielles Splicen der mRNAs und posttranslationale Modifikationen auftreten, untersuchen zu können (129, 135).



Die Identifizierung der Peptide und Proteine erfolgte jedoch nicht wie beim klassischen „Top-down“-Ansatz durch direkte Fragmentierung, sondern nach Separation und anschließender enzymatischer Spaltung durch „Peptide Mapping“ bzw. Sequenzanalyse der Fragmentionen der resultierenden Peptide. Basierend auf der Analyse des ungespaltenen Proteoms konnten im Serum von Patienten mit kolorektalen Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe die differentiell vorliegenden Isoformen des Transthyretins und das Fragment C3a-desArg als potentielle Biomarker identifiziert werden. Die Analyse von Gewebeproben führte zu einem Biomarkerkandidaten, dem N-terminalen Fragment von GRP94, welcher mit der „Bottom-up“-Strategie nicht entdeckt hätte werden können, da auf das 94 kDa Protein rückgeschlossen worden wäre. In der Literatur wurden für verschiedene Krebserkrankungen Proteine beschrieben, deren Isoformen, modifizierte Varianten oder Fragmente als diagnostische Biomarker dienen könnten (37, 45, 47, 49, 51, 134). Während der Validierung der Biomarkerkandidaten muss sich zeigen, ob die beobachteten Modifikationen tatsächlich tumorspezifisch sind oder ob sie auf der Proteindiversität innerhalb der humanen Population basieren (136).

## 5.2 Studiendesign

Die Entdeckung neuer Biomarker stellt aufgrund der Komplexität des Proteoms und der Heterogenität der Erkrankung, zwischen einzelnen Individuen und bei der Probengewinnung eine große Herausforderung dar (60). Die Nutzung von „Proteomic Profiling“ führte zu kontroversen Diskussionen bezüglich des Einflusses der sogenannten konfundierenden Faktoren, zu denen klinische Variablen, das Alter und Geschlecht der Patienten und die Probenpräparation gehören (131). Beim Design der Studien dieser Arbeit wurde darauf geachtet, die Patienten u. a. bezüglich Alters- und Geschlechterverteilung, Nikotinkonsum, aber auch klinischer Variablen möglichst gematcht auszuwählen. Die Kontrollgruppen-Patienten ohne Tumorerkrankung unterlagen ebenso einer präoperativen Fastenzeit und erhielten Anästhetika. Dadurch sollte verhindert werden, dass die entdeckten Biomarkerkandidaten nicht das Vorhandensein eines Tumors indizieren, sondern auf anderen Unterschieden zwischen den untersuchten Gruppen basieren (33, 42, 59). Die Entdeckung von Biomarkern in einer heterogenen Population würde aufgrund der großen

biologischen Varianz die Analyse einer sehr viel größeren Anzahl von Proben erforderlich machen. Der vorliegenden Arbeit gingen intensive Untersuchungen zur Qualitätssicherung bei der Probennahme, Präparation und Datengewinnung voraus, durch welche die entscheidene Rolle der Standardisierung nachgewiesen wurde. In den letzten Jahren wurde zunehmend die große Bedeutung der Standardisierung und Validierung bei der Suche nach neuen Biomarkern erkannt (83-88, 128, 131). Die Blutabnahme und Gewebeentnahme sowie die weitere Probenpräparation und Lagerung erfolgte nach SOP-Kriterien durch Mitarbeiter der Indivumed GmbH. Die Qualität der Gewebeproben wurde anhand von Kontrollschnitten geprüft und der Tumoranteil bestimmt. Bei allen vorbereitenden Schritten, zu denen die Fraktionierung der Seren und die Präparation der ProteinChip® Arrays zählten, sowie bei der massenspektrometrischen Messung wurde ein Probenpool randomisiert mitgeführt. Durch die Analyse der Daten dieses Pools wurde die Reproduzierbarkeit kontrolliert.

Die Gruppe von Patienten mit kolorektalem Adenom wurde gewählt, um Biomarkerkandidaten zu identifizieren, die eine Früherkennung im benignen Stadium der Erkrankung ermöglichen. Der Analyse des kolorektalen Karzinoms dienten Proben des UICC-Stadiums III. Durch die Gruppengröße von  $n=30$  konnte eine Normalverteilung der Daten angenommen werden und somit bei der statistischen Auswertung neben den robusten nichtparametrischen Tests auch parametrische Tests eingesetzt werden. Die erforderliche Probenanzahl jeder Gruppe ist von der biologischen und von der technischen Varianz abhängig (137). In einer Pilotstudie analysierten Cairns et al. Blut- und Urinproben unter Verwendung der SELDI-TOF MS-Technologie und ermittelten eine erforderliche Probenanzahl von  $n=22$ , die zwar nicht direkt auf andere Arbeiten übertragen werden kann, jedoch aufgrund der gleichen Technologie einen Anhaltspunkt lieferte (137). Nach der Entdeckung von potentiellen Biomarkern muss sich zeigen, ob die Biomarkerkandidaten auch bei der Untersuchung einer Population mit durchschnittlichem Risiko zur Diagnostik verwendet werden können.

### **5.3 Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Serum**

In dieser Arbeit wurde zunächst die Strategie verfolgt, Biomarkerkandidaten zur Früherkennung von kolorektalen Adenomen und Karzinomen im Serum zu entdecken. Die Verwendung von einfach zu gewinnenden Blutproben wurde gewählt, da die Bestandteile des zirkulierenden Systems diverse physiologische und pathologische Zustände reflektieren (60) und bei einer späteren Anwendung ein solcher Screeningtest eine höhere Akzeptanz in der Bevölkerung als die invasive Koloskopie aufweisen würden (19, 20, 139, 140).

#### **5.3.1 Differentielle Analyse von Massenprofilen zur Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Serum**

Die SELDI-TOF MS-basierte Analyse von Proben einer Kontroll-Patientengruppe ohne Tumorerkrankung, Patienten mit einem Adenom und Patienten mit einem Karzinom des Tumorstadiums III führte zu über 20 zwischen den Gruppen differenziell exprimierten Proteinen mit p-Werten kleiner als 0,001. Viele dieser Proteine zeigten innerhalb der untersuchten Gruppen eine große Streuung, die neben der präparativen und messtechnischen Varianz vor allem auf interindividuelle Unterschiede zwischen den Patienten zurückgeführt werden könnte (137). Basierend auf den Kriterien niedriger p-Wert, hoher Regulationsfaktor gegenüber der Kontrollgruppe und den statistischen Kenngrößen der Sensitivität und der Spezifität erwiesen sich die Proteine p8940 und p13770 als besonders vielversprechende Biomarkerkandidaten. Während die durchschnittlichen Peakintensitäten des Proteins p8940 von den Kontroll-Patienten über die Adenom-Patienten zu den Karzinom-Patienten anstiegen, zeigten die Peakintensitäten des Proteins p13770 den entgegengesetzten Verlauf. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen detektierter Peakintensität und Tumorstadium hindeuten, da der gemessene Spiegel eines Tumormarkers im Blut die Tumormasse und -ausbreitung reflektiert (30). Beide Proteine konnten durch eine zweite unabhängige Studie als Tumormarkerkandidaten bestätigt werden.

### 5.3.2 Identifizierung und biologische Bedeutung der potentiellen Tumorbiomarker

Die sich anschließende Identifizierung beider Proteine ermöglichte neben der näheren Charakterisierung als Tumormarkerkandidaten eine Validierung durch antikörperbasierte Methoden. Das Protein p8940 konnte als C3a-desArg oder ASP („acylation-stimulating protein“) und das Protein p13770 als Transthyretin identifiziert werden.

C3a wird während der Aktivierung des Komplementsystems generiert und stellt das aktive Spaltungsprodukt des Komplementfaktors C3 dar, welcher direkt durch Tumorantigene aktiviert werden kann. Daher könnten erhöhte Level C3a eine immunologische Reaktion gegen den Tumor repräsentieren (81). C3a ist ein multifunktionaler proinflammatorischer Mediator, ihm werden umfassende Funktionen zugeschrieben; u. a. wirkt C3a chemotaktisch auf Leukozyten, bewirkt die Steigerung der Durchlässigkeit der Blutkapillaren, Spasmen glatter Muskelfasern und die Freisetzung aktiver Mediatoren wie Histamin. Im Blut wird es sehr schnell in die stabilere desarginierte Form gespalten. C3a-desArg wird auch als ASP („acylation-stimulating protein“) bezeichnet, von Fett- und Leberzellen sekretiert und ist als hormoneller Faktor in den Lipidmetabolismus involviert (82). Weiterhin kann C3a-desArg von Fibroblasten unter Kontrolle von Interleukin-6 und anderen Cytokinen produziert werden (82), was eine komplexe Rolle und Beteiligung in der Interaktion zwischen Tumor- und Stromazellen suggeriert.

C3a und dessen modifizierte Formen konnten in mehreren auf Massenspektrometrie basierenden Studien als potentielle Biomarker für Krebserkrankungen identifiziert und zum Teil validiert werden. Hierzu zählen die akute lymphoblastische Leukämie (90), chronische lymphoide Krebserkrankungen (91), das Mammakarzinom (36, 46, 89) und das kolorektale Karzinom (43, 92). In den meisten Studien konnten in den Seren der Patienten erhöhte Level des Proteins im Vergleich zu den Kontrollgruppen detektiert werden. Ein besonderes Interesse bei der Früherkennung des kolorektalen Karzinoms besteht im Nachweis der Adenome. Die in dieser Arbeit detektierten erhöhten Konzentrationen von C3a-desArg in Seren von Patienten mit Adenomen konnten auch in einer Studie von Habermann et al. nachgewiesen werden. Sie lagen ebenfalls zwischen den Werten der Kontrollgruppe und der Gruppe der Patienten mit Karzinom (92).

Der zweite in dieser Arbeit identifizierte potentielle Biomarker, Transthyretin, transportiert im Blut Thyroxin, Triiod-thyronin und Retinol durch Interaktion mit dem Retinol bindenden Protein. Transthyretin wurde als ein Protein beschrieben, welches in Beziehung zu metabolischen Funktionsstörungen steht (73, 74). Werte unterhalb des Normalbereiches werden mit Mangelernährung, verändertem Metabolismus nach akutem Verletzungsstress, Dysfunktion der Leber und Krebserkrankungen korreliert (73, 75-80). Wie C3a wurde auch Transthyretin in mehreren Studien zur Suche neuer Tumorbiomarker mit Hilfe der Massenspektrometrie als potentieller Kandidat identifiziert und teilweise validiert. So konnten reduzierte Serumlevel von Transthyretin im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen bei Patienten mit Ovarialkarzinom (37, 49, 93, 94), Mycosis fungoides (47), Gallengangskarzinom (95), Lungenkrebs (48) und dem kolorektalen Karzinom (49) gemessen werden. Zur Differenzierung der verschiedenen Karzinome diskutierten Escher et al. und Fung et al. die Analyse der Isoformen von Transthyretin (47, 49). Fung et al. schlugen das Konzept „host response protein amplification cascade“ vor, in welchem beschrieben wird, wie es möglich sein könnte, Krebserkrankungen in Frühstadien zu diagnostizieren. Verschiedene Erkrankungen wie Entzündungen, Infektionen oder Krebs führen zur Expression verschiedener Untergruppen von Proteasen und Proteaseinhibitoren. Aus dieser sehr speziellen Proteinzusammensetzung im Tumor und dessen Mikroumgebung resultiert die spezifische Prozessierung zirkulierender Proteine. Bei den zirkulierenden Proteinen könnte es sich beispielsweise um die Akute-Phase-Proteine handeln. Die Messung von solchen Substraten und enzymatischen Produkten würde dann ein amplifiziertes Signal von Enzymen und anderen Faktoren des Tumors repräsentieren. Während die tumorspezifisch exprimierten Proteine lediglich in den Spätstadien im Serum detektierbare Level erreichen, könnten die modifizierten zirkulierenden Proteine permanent detektiert werden. Fung et al. konnten zeigen, dass die Seren von Patientinnen mit Ovarialkarzinom signifikant geringere Level als die Kontrollgruppe bezüglich einer verkürzten Form des Transthyretins mit  $m/z$  12828, der nicht modifizierten Isoform, der cysteinylierten Isoform sowie der glutationylierten Isoform aufwiesen (49). Die ebenfalls analysierten Seren der Patienten mit Kolonkarzinom zeigten dagegen nur reduzierte Level der verkürzten und der unmodifizierten Form. In der vorliegenden Arbeit konnten im Gegensatz dazu signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe für die native Form, die cysteinylierte und die glutationylierte Isoform

detektiert werden, dabei wiesen die native und die cysteinylierte Form die größten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Tumorpatienten auf. Die proteolytisch verkürzte Variante wurde nicht detektiert. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf die verschiedenen Methoden bei der Vorbehandlung der Seren zurückgeführt werden. Die 3 Isoformen des Transthyretins wurden auch von Liu et al. beim Gallengangskarzinom (95), von Escher et al. bei Seren von Patienten mit Mycosis fungoides (47) und von Liu et al. bei Lungenkrebs (48) als signifikant reduziert im Vergleich zu den Kontrollgruppen angegeben. Daher scheint die Nutzung der Isoformen von Transthyretin als alleinigem Biomarker zur Diagnostik nicht ausreichend zu sein.

### **5.3.3 Validierung von C3a-desArg und Transthyretin als potentielle Tumorbiomarker und Ausblick auf die Anwendung**

C3a-desArg und Transthyretin konnten mit Hilfe von antikörperbasierten Methoden als Biomarkerkandidaten bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass C3a-desArg und Transthyretin das Potential besitzen, als Früherkennungsmarker für kolorektale Adenome und Karzinome zu dienen, und ihre Verwendung wurde als Patent angemeldet (PCT/EP2005/008742). Da beide Proteine zu den abundanten Serumproteinen gezählt werden und ein Epiphänomen des Tumors darstellen könnten, müsste sich die Spezifität aus der Kombination beider Biomarkerkandidaten oder zusätzlicher Biomarker ergeben. Mit einer Kombination aus mehreren charakteristischen Merkmalen, z. B. einem spezifischen Muster an Peptiden und Proteinen, kann eine höhere Präzision bei der Diagnose in einer heterogenen Population erreicht werden als mit einem einzelnen Protein als Biomarker (41). Für die Früherkennung, d. h. für die Diagnostik von Adenomen, zeigte die Kombination beider antikörperbasierter Assays eine Sensitivität von 96% bei einer Spezifität von 70%. Dabei wurde das Erreichen einer hohen Sensitivität auf Kosten der Spezifität favorisiert, d. h. die korrekte Diagnose möglichst aller kolorektalen Adenome und Karzinome wurde bevorzugt und dafür falsch positive Testergebnisse in Kauf genommen. Nach diesem ersten Screening müssten sich im Anschluss lediglich die Patienten mit einem pathologischen Serumlevel einer Koloskopie unterziehen. Bei einer vorausgegangenen Testspezifität von 70% würden dann nur 30% keine Tumorerkrankung aufweisen. Ein solcher Screeningtest würde vor allem für die

Detektion der Adenome ein wesentlich größeres Potential als die Hämoccult-Stuhltests besitzen, welche Sensitivitäten bis zu 41% und Spezifitäten von 87 bis 98% aufweisen (19). Die in der Bevölkerung höhere Akzeptanz nicht invasiver Untersuchungen und die Reduktion der Kosten bieten einen entscheidenden Vorteil gegenüber der derzeit als Früherkennungsmaßnahme favorisierten Koloskopie.

Die Spezifität der beiden potentiellen Tumorbiomarker für kolorektale Adenome und Karzinome konnte durch die Analyse von Seren von Patienten mit Prostatakarzinom und Seren von Patientinnen mit benigner und maligner Erkrankung der Brust gezeigt werden. In Zukunft müsste die Eignung des Tests als Screeningmethode durch die Validierung mit einer großen Anzahl von Proben, welches auch die Analyse von Serumproben von Patienten mit anderen Krebserkrankungen beinhaltet, geprüft werden. Da die Probensammlung und -verarbeitung unter standardisierten Bedingungen erfolgte, muss weiterhin untersucht werden, ob der Screeningtest unter gewöhnlichen Bedingungen bei einer unauffälligen Bevölkerungsgruppe mit durchschnittlichem Risiko ebenso erfolgreich eingesetzt werden kann. Die Entdeckung neuer Biomarker, auch wenn es sich um relativ hoch abundante Serumproteine handelt, kann durch ihre Kombination in einem Immunoassay zu einer erfolgreichen klinischen Anwendung führen, wie mit der Vermarktung des OVA1™-Tests durch Vermillion, Inc. (Fremont, CA, USA) gezeigt wurde (127).

#### **5.4 Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Gewebe**

Die zweite in dieser Arbeit verfolgte Strategie, die vergleichende Analyse von Normal- und Tumorgewebe, sollte zur Entdeckung von Biomarkern führen, welche noch spezifischer als C3a-desArg und Transthyretin die Diagnostik von Adenomen und Karzinomen in Frühstadien erlaubt. Die Verwendung von Tumorgewebe stellt bei der Identifizierung potentieller Biomarker den direktesten Ansatz dar, da sie im Tumorgewebe in den höchsten Konzentrationen vorliegen (138). Tumorspezifische Peptide und Proteine liefern Einblicke in das Proteom bei der Tumorprogression und könnten, sofern sie im Blut detektierbar wären, als Früherkennungsmarker dienen. Mit Hilfe dieser Strategie konnten Albrethsen et al. und Melle et al. die humanen neutrophilen Peptide (62, 63), Roessler et al. die Nicotinamid-N-Methyltransferase (61) und die Proteasom-Aktivator-Komplex Untereinheit 3 (PSME3) (139) sowie

Thierolf et al. das Protein S100A12 (140) als potentielle Biomarker für das kolorektale Karzinom identifizieren und anschließend im Blut nachweisen. Melle et al. entdeckten ebenfalls auf diesem Weg HSP27 als Biomarkerkandidaten für das Pankreaskarzinom (141).

#### **5.4.1 Differentielle Analyse von Massenprofilen zur Entdeckung potentieller Tumorbiomarker im Gewebe**

Durch die Analyse von Tumorgewebe von Patienten mit Adenom und Patienten mit Karzinom des Tumorstadiums III sowie den jeweiligen korrespondierenden Normalgeweben konnten mit Hilfe der SELDI-TOF MS-Technologie mehr als 60 differentiell exprimierte Peptide und Proteine detektiert werden ( $p < 0,001$ ). Die Peaks, welche die größten Differenzen zwischen Normal- und Tumorgewebe zeigten, wurden ausgewählt, um sie zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Hierzu zählten die 3 Peaks mit  $m/z 3375 \pm 3$ ,  $m/z 3442 \pm 3$  und  $m/z 3487 \pm 3$ , die sehr ähnliche Intensitätsverteilungen aufwiesen, was auf einen möglicherweise bestehenden Zusammenhang zwischen den drei Peaks hindeutete. Der Peak mit  $m/z 10324 \pm 10$  wurde ebenfalls selektiert, um ihn zu identifizieren. Für diese Peaks wurde eine ansteigende durchschnittliche Intensität vom Normal- über Adenom- zum Karzinomgewebe detektiert, was einen Zusammenhang zwischen der Tumorprogression und der Expression der drei Peptide bzw. des Proteins p10320 suggeriert. Weiterhin wurde der Peak mit  $m/z 4837 \pm 5$  ausgewählt, der interessanterweise nur im Adenomgewebe einen erhöhten Level aufzuweisen scheint. Im Karzinomgewebe konnten im Vergleich zum Normalgewebe keine Intensitätsunterschiede detektiert werden. Peptide und Proteine können während der Adenom-Karzinom-Sequenz verschiedene Expressionslevel aufweisen und ausschließlich in den benignen Vorstufen in erhöhten Konzentrationen vorliegen, wie beispielsweise von Cui et al. für die Th1 Zytokine (142) und von Lü et al. für die Expressionsprofile ribosomaler Proteine sowie Proteine des Glukosemetabolismus (143) gezeigt werden konnte.



### 5.4.2 Identifizierung und Charakterisierung des Proteins p10320

Der potentielle Tumorbiomarker p10320 konnte als N-terminales Fragment des Proteins GRP94 identifiziert werden. GRP94 (glucose regulated protein), auch als gp96 (glycoprotein), CaBP4 (calcium binding protein), TRA-1 (tumor rejection antigen), Endoplasmin oder ERp99 bezeichnet, gehört zu den Chaperonen der HSP90-Familie des endoplasmatischen Reticulums. Die translatierte Sequenz von GRP94 weist 803 Aminosäuren auf, von denen die N-terminale 21 Aminosäuren lange Signalsequenz für das ER abgespalten wird. GRP94 besitzt 5 potentielle N-Glykosylierungsstellen und die C-terminale ER-Retentionssequenz KDEL (100). Wie die Analyse des Molekulargewichtes, die Sequenzierung der Peptidfragmente und die Bestimmung der C-terminalen Aminosäure zeigten, liegt das als potentieller Tumorbiomarker identifizierte N-terminale Fragment von GRP94 ohne Signalsequenz für das endoplasmatische Reticulum vor und umfasst die Aminosäuren 22-111 der translatierten GRP94-Sequenz.

Das N-terminale Fragment des GRP94 wurde im Tumorgewebe in erhöhtem Level im Vergleich zum Normalgewebe detektiert. GRP94 wird in allen Zellen konstitutiv exprimiert und mit einem anderen wichtigen Chaperon des ER, GRP78, auf transkriptioneller Ebene coreguliert (107). Interferon (108) und Stressbedingungen, welche die ER-Funktionen störend beeinflussen, wie beispielsweise Glukosemangel (109), Depletion des Calciumspeichers (110), Blockierung der Glykosylierung (111) und Überexpression falsch gefalteter Proteine (112), induzieren die Hochregulation der Expression beider Proteine. In verschiedenen Untersuchungen konnten erhöhte Level von GRP94 in Tumorzelllinien, in Tiermodellen und humanem Gewebe mit zunehmender Tumorigenität korreliert werden (113-117). Wang et al. wiesen in humanen Kolonkarzinomen einen Zusammenhang zwischen erhöhten Expressionsleveln von GRP94 und der Tumorprogression nach (118). Basierend auf den erhöhten Konzentrationen von GRP94 im Tumorgewebe könnten aus der Spaltung des Proteins die erhöhten Level des N-terminalen Fragmentes resultieren.

#### ***Spaltung von GRP94 unter Bildung des N-terminalen Fragmentes p10320***

Aus der Detektion der erhöhten Level des N-terminalen GRP94-Fragmentes im Tumorgewebe ergab sich die Frage nach dem zugrunde liegenden

Spaltungsprozess. Die im Normalgewebe mit massenspektrometrischen Methoden kaum nachweisbaren Konzentrationen des N-terminalen GRP94-Fragmentes suggerieren eine vom Tumorgeschehen abhängige Bildung des potentiellen Biomarkers. Die nähere Bestimmung der Lokalisation des Proteins p10320 durch Analyse der mikrodisektierten Gewebekompartimente deutete auf einen Prozess hin, der in den Epithelzellen des Tumors stattfindet, da die höchsten Intensitäten des Peaks in den Tumorzelllysaten detektiert wurden. Es könnte sich sowohl um eine unspezifische als auch um eine spezifische Spaltung handeln. In Western Blot-Analysen konnten im Tumorgewebe weitere Fragmente des GRP94 detektiert werden. Der Bildung dieser Fragmente und der Generierung des als Biomarkerkandidat identifizierten N-terminalen GRP94-Fragmentes könnte derselbe Prozess, möglicherweise ein allgemeiner Abbau von GRP94, zugrunde liegen. Die ersten 72 translatierten Aminosäuren von GRP94, auch als prä-N-terminale Domäne bezeichnet, gelten als proteolytisch sensibler Bereich (124). Das GRP94-Fragment p10320 umfasst allerdings die Sequenz bis zur Aminosäure 111 der translatierten Sequenz, was auf eine spezifische Spaltung nach dieser Aminosäure hindeutet. GRP94 ist in 3 strukturellen Domänen organisiert, die N-terminale Domäne mit der Bindungsstelle für regulatorische Liganden, die mittlere Domäne für die Interaktion mit den Klientenproteinen und die C-terminale Domäne, welche die Dimerisierung ermöglicht (101). Die Helix 1 der N-terminalen Domäne bildet einen Teil des Fragmentes p10320. Es wurde postuliert, dass die Helix 1 nach Bindung des regulatorischen Liganden ATP zur Dimerisierung und offenen Konformation der N-terminalen Domäne führt und so die Aktivität des Chaperons reguliert wird (101). Durch Abspaltung des N-terminalen Fragmentes p10320 und damit der Helix 1 würde das Protein möglicherweise inaktiviert werden können, da die Dimerisierung durch Interaktion von den Helices 1 und den Strängen 1 die relative Orientierung der N-terminalen und der mittleren Domäne des Proteins stabilisiert, was für die Ausrichtung der katalytischen Reste von entscheidender Bedeutung ist (124).

Die im Tumorgewebe erhöhten Level des N-terminalen GRP94-Fragmentes bzw. von GRP94 selbst könnten auf der Induktion des Chaperons während der Tumorprogression als Folge von ER-Stress basieren. Die unzureichende Vaskularisierung solider Tumore führt zu Azidose, hypoxischen Bedingungen und Glukosemangel, wodurch die GRPs mit ihren protektiven Funktionen im Rahmen des

UPR („unfolded protein response“) induziert werden (119, 120, 121). In Zellen, die den ER-Stress nicht durch die UPR beheben können, werden apoptotische Wege aktiviert (119). Auch die Mikroumgebung eines Tumors soll einen potenten physiologischen Stimulus der GRP94-Transkription darstellen (146), was erhöhte GRP94-Konzentrationen und daraus möglicherweise resultierende erhöhte Level des N-terminalen Fragmentes in den besser versorgten Adenomen erklären würde. GRP94 könnte gespalten werden, um dessen protektive Funktion zu neutralisieren, wie Reddy et al. diskutierten (148). Sie konnten während Etoposide-induzierter Apoptose eine Spaltung von GRP94 in ein 80 kDa großes und ein hypothetisches 14 kDa Fragment durch Calpain detektieren. Muruganandan et al. beschrieben eine Calpain-abhängige Spaltung von GRP94 in renalen Zellen nach Induktion von ER-Stress (149). Neben den apoptotischen Vorgängen beeinflusst die Calpain-medierte Proteolyse weitere Prozesse, zu denen die Proliferation und Zellmigration zählen (122, 123). Einer dieser in den Tumorzellen ablaufenden Prozesse könnte zur Calpain-abhängigen Spaltung von GRP94 unter Bildung des potentiellen Tumorbiomarkers p10320 führen. Basierend auf dem ähnlichen Molekulargewicht des hypothetischen 14 kDa Fragmentes und dem im Rahmen dieser Arbeit entdeckten p10320 wurde untersucht, ob der Generierung des Biomarkerkandidaten p10320 ebenfalls eine Calpain-medierte Spaltung zugrunde liegt. Dabei wurde geprüft, ob im Tumorgewebe ein GRP94-spaltendes aktives Enzym, möglicherweise Calpain, vorliegt. Jedoch führte weder die Inkubation von Extrakten aus frisch präparierten noch aus stickstoffkonservierten Gewebeproben mit aufgereinigtem GRP94 zu einer detektierbaren Bildung des p10320-Fragmentes. Es kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden, dass unter anderen Versuchsbedingungen eine solche Spaltung möglich gewesen wäre. Die Analyse des Spaltungsversuches von Calpain mit aufgereinigtem GRP94 zeigte ebenfalls keine detektierbare Bildung des N-terminalen GRP94-Fragmentes.

Wie für GRP94 wurde für das cytoplasmatische paraloge HSP90 nach Induktion von Stresssituationen durch UVB-Strahlung (144) und oxidativem Stress (145) eine Spaltung des Proteins beobachtet. Beck et al. konnten zeigen, dass die Spaltungsstelle in der N-terminalen Domäne lokalisiert sein sollte (145). Da HSP90 für die Stabilität verschiedener Proteine verantwortlich ist, die in der malignen Transformation eine essentielle Rolle spielen, führt die Spaltung von HSP90 zur

Degradation einiger kritischer Proteine und somit zum Zelltod (145). Eine solche direkte Rolle kann zwar für die Spaltung der GRP94 aufgrund der bekannten Klientenproteine nicht angenommen werden, sie deuten jedoch auf die protektive Funktion von GRP94 durch seine wichtige Rolle in der ER-Qualitätskontrolle hin. Neben der Interaktion mit sekretierbaren und an der Zelloberfläche lokalisierten Proteinen wie Rezeptoren und Liganden konnte eine Präferenz für mutierte Proteine, nicht korrekt gefaltete Intermediate und unvollständige Proteinkomplexe beobachtet werden (100). Werden diese infolge des durch Spaltung inaktivierten GRP94 in den Zellen angereichert, führt dies zur UPR und damit möglicherweise zum Zelltod. Eine andere Gruppe von Klientenproteinen des GRP94 stellen kurze Peptide dar, zu denen auch Tumorantigene und Antigene von Pathogenen zählen (102). Es konnte gezeigt werden, dass diese Komplexe zu einer tumorspezifischen Immunantwort führen (103-106). Tumorzellen könnten diese durch die Inaktivierung von GRP94 infolge der Spaltung des Proteins umgehen.

Neben der Hypothese der Spaltung von GRP94 zur Neutralisierung der protektiven Funktion des Proteins durch Inaktivierung könnten andererseits auch aktive Fragmente gebildet werden. Diese könnten, vergleichbar mit anderen antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2, durch die Spaltung in Effektorproteine umgewandelt werden (148). Weiterhin könnte auch das p10320-Fragment eine aktive Rolle in der Tumorprogression spielen, auch wenn dies ohne weitere Kenntnisse über den Spaltungsprozess unwahrscheinlich zu sein scheint.

Um die Frage nach dem zur Bildung des N-terminalen GRP94-Fragmentes führenden Prozesses bzw. des involvierten Enzyms klären zu können, wären weitere Versuche notwendig. Bei solchen Untersuchungen würde die spezifische Analyse des GRP94-Fragmentes mit antikörperbasierten Methoden gegenüber der massenspektrometrischen Methode einen Vorteil bieten, da bei der Analyse der komplexen Zell- und Gewebelysate Proteine sehr ähnlichen Molekulargewichtes zu artifiziell erhöhten Peakintensitäten bzw. Überlagerungen des Peaks von p10320 führen können.

### ***Herstellung des rekombinanten N-terminalen GRP94 Fragmentes für die Generierung von spezifischen Antikörpern***

Spezifische Antikörper waren neben der Analyse des Spaltungsprozesses von GRP94 zur Validierung des Biomarkerkandidaten notwendig. Der antikörperbasierte Nachweis des potentiellen Biomarkers p10320 im Serum stellte einen erforderlichen Schritt auf dem Weg zur Anwendung als Tumorbiomarker im Früherkennungsscreening dar. Jedoch konnte das N-terminale Fragment mit keinem kommerziell erhältlichen anti-GRP94 Antikörper detektiert werden. Eine zusätzliche Voraussetzung für die Validierung des potentiellen Biomarkers p10320 mit Hilfe eines Immunoassays, welcher ohne Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht durchgeführt werden soll, stellen Antikörper dar, die nur mit dem N-terminalen Fragment, nicht jedoch mit dem 94 kDa Protein interagieren. Die Generierung solcher spezifischer Antikörper stellte eine große Herausforderung dar. Neben der Möglichkeit der Immunisierung von Tieren bietet sich die Herstellung von Antikörpern mit Hilfe von filamentösen Phagen an. Die Firma AbD Serotec, welche hierfür die HuCAL<sup>®</sup> Technologie (Human Combinatorial Antibody Library) verwendet, wurde beauftragt, spezifische Antikörper für das N-terminale GRP94-Fragment zu selektieren. Bei bestimmten Applikationen, zu denen die Selektion von Antikörpern zählt, die nicht mit eng verwandten Proteinen interagieren, sollte die HuCAL<sup>®</sup> Technologie Vorteile gegenüber der Herstellung von Antikörpern, die auf der Immunisierung von Tieren basieren, bieten. So können cross-reaktive Antikörper durch bestimmte Substraktionsstrategien eliminiert werden (HuCAL<sup>®</sup> Antibodies Technical Manual, AbD Serotec). Einen weiteren Vorteil dieser Methode gegenüber der Immunisierung von Tieren stellte der geringere Zeitbedarf dar.

Die Strategie zur Selektion spezifischer Antikörper, die nur das GRP94-Fragment binden, basierte auf der Kenntnis der C-terminalen Aminosäure des Fragmentes und deren Carboxylgruppe, eine Struktur, die das 94 kDa Protein nicht aufweist. Für die Selektion der Antikörper und die Qualitätskontrollen wurden das N-terminale Fragment und das 94 kDa Protein benötigt. Das 94 kDa GRP94 konnte aus Zelllysaten humaner Kolonzelllinien aufgereinigt werden. Da die Aufreinigung des N-terminalen Fragmentes aus Gewebeproben aufgrund der geringen Ausbeute nicht möglich war, wurde es rekombinant als His-Tag-Fusionsprotein exprimiert. Die Entfernung des N-terminalen His-Tags sollte der Annäherung der

Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins an die Sequenz des identifizierten Biomarkerkandidaten dienen. Im Verlauf der Reaktion konnte neben der Abnahme der Substratmenge auch die Abnahme des Levels an dem Spaltungsprodukt beobachtet werden, was auf eine Instabilität des N-terminalen GRP94-Fragmentes hindeutet, wie sie für den N-terminalen Bereich von GRP94 beschrieben wurde (124). Das rekombinante Protein ohne His-Tag konnte zwar mit Hilfe der HPLC in ausreichender Reinheit gewonnen werden, jedoch führte die Entfernung des His-Tags und die anschließende Reinigungsstrategie zu großen Verlusten. Die Diskrepanz in den Mengen der rekombinanten Proteine zwischen massenspektrometrischer und Western Blot-Analyse könnte einerseits auf Unterschiede im Ionisierungsverhalten und in der Detektierbarkeit der beiden Proteine bei der massenspektrometrischen Analyse zurückgeführt werden. Kleinere Proteine lassen sich in der Regel besser detektieren, woraus ein höherer Peak für das kleinere Protein bei gleicher oder geringerer Menge resultieren kann. Andererseits könnten Verluste an rekombinantem Protein ohne His-tag bei der Western Blot-Analyse, die einen zusätzlichen Schritt darstellt, durch die Instabilität des N-terminalen Bereiches erklärt werden. Da die Aufreinigung von größeren Volumina technisch nicht möglich war, musste auf die Abspaltung des His-Tags verzichtet und das rekombinante Protein mit His-tag für die Selektion der Antikörper verwendet werden.

Obwohl zwei verschiedene Strategien zur Selektion spezifischer Antikörper eingesetzt wurden und die ELISA-Qualitätskontrolle des zweiten Ansatzes Antikörper der gewünschten Spezifität nachzuweisen schien, wurde in der anschließenden Western Blot-Analyse weder das rekombinante Protein noch das GRP94-Fragment in den Gewebeschnittlysaten detektiert. Stattdessen interagierten die Antikörper mit zahlreichen Proteinen des Gewebes und waren somit ungeeignet. Verschiedene Faktoren könnten zu diesem Ergebnis geführt haben. Da das rekombinante GRP94-Fragment nicht rein vorlag und es bei der zweiten Strategie sowohl für Selektion als auch für die ELISA-Kontrolle verwendet wurde, könnten Antikörper selektiert worden sein, welche mit anderen Proteinen interagierten. In Western Blot-Analysen wären nur Banden zu erwarten, wenn die Antikörper an die denaturiert vorliegenden Proteine binden könnten. Möglicherweise lag das zur Selektion verwendete

rekombinante Protein in gefalteter oder sogar in der nativen Struktur des Biomarkerkandidaten p10320 vor.

Zur Generierung spezifischer Antikörper könnte in Zukunft einerseits die Selektion von Antikörpern mit Hilfe von filamentösen Phagen mit einem sehr reinen N-terminalen GRP94-Fragment möglichst ohne His-Tag erneut durchgeführt werden, andererseits auf die Immunisierung von Tieren und Gewinnung monoklonaler Antikörper zurückgegriffen werden. Die Schwierigkeiten liegen dabei ebenfalls in der Generierung spezifischer Antikörper, welche ausschließlich mit der C-terminalen Aminosäure des Fragmentes und deren Carboxylgruppe interagieren, oder die aufgrund von möglichen Konformationsunterschieden zwischen dem N-terminalen Fragment und GRP94 nur an den potentiellen Biomarker p10320 und nicht an das intakte GRP94 binden.

#### **5.4.3 Validierung des N-terminalen Fragmentes von GRP94 als potentiellen Tumorbiomarker und Ausblick auf die Anwendung**

In weiterführenden massenspektrometrischen Analysen konnte das Protein p10320 als potentieller Tumorbiomarker bestätigt werden. Ob der in der „Profiling“-Studie detektierte, aber in diesen Analysen nicht mehr eindeutig vorhandene Anstieg der Peakintensität vom Adenomgewebe zum Karzinomgewebe bei der Mehrheit der Tumorgewebe tatsächlich vorliegt, könnte in Zukunft die Untersuchung einer größeren Anzahl von Gewebeproben zeigen. Die Untersuchungen anderer Gewebe- bzw. Tumorarten deuten darauf hin, dass dieses Protein für kolorektale Adenome und Karzinome spezifisch zu sein scheint, was in Folgestudien bestätigt werden müsste.

Das N-terminale Fragment von GRP94 besitzt ein großes Potential zur Diagnostik kolorektaler Adenome und Karzinome und seine Anwendung wurde als Patent angemeldet (PCT/EP2005/009005). Zwingende Voraussetzung hierfür sind allerdings die Validierung mit antikörperbasierten Methoden und die Detektion des Biomarkerkandidaten im Blut.

#### 5.4.4 Aufreinigung und Identifizierungsversuche des Peptids p4835

Das Peptid p4835 scheint für das Adenomgewebe spezifisch zu sein, da sowohl im Normalgewebe als auch im Karzinomgewebe keine erhöhten Level detektiert werden konnten. Aufgrund dieser interessanten Regulation wurde es für die Identifizierung ausgewählt. Das relativ niedrige Molekulargewicht, die sehr geringen Ausgangsmengen des Peptids im Gewebelysat, die große Komplexität und individuelle Zusammensetzung des Proteoms jeder Gewebeprobe sowie der Abbau des Peptids bei Lagerung machten die Aufreinigung zu einer komplizierten Aufgabe. Insbesondere die Komplexität im Molekulargewichtsbereich von 4825 bis 4845 Da führte zu großen Schwierigkeiten während des Aufreinigungsprozesses. Obwohl die Proteine bereits durch Ionenaustauschchromatographie fraktioniert wurden, zeigte die massenspektrometrische Analyse der HPLC-Fractionen das Vorhandensein zahlreicher Peptide im Molekulargewichtsbereich des Biomarkerkandidaten. Dies verdeutlichte die Bedeutung effizienter Trennungsmethoden vor der Identifizierung, wie sie auch bei der Analyse von tryptischen Peptiden beim „Bottom-up“-Ansatz eingesetzt werden, um die Komplexität zu reduzieren (129). Die Überlagerung von Peaks hätte bei einer nicht so umfangreichen Auftrennung möglicherweise nicht zu der Identifizierung des Biomarkerkandidaten, sondern zur Identifizierung eines Peptids mit ähnlichem Molekulargewicht führen können. Von entscheidender Bedeutung bei der Separierung der Proteinmischung war die vergleichende Analyse aller Fraktionen von Normal- und Tumorgewebeprobe. Nur so konnten die Fraktionen detektiert werden, die den potentiellen Biomarkerkandidaten enthielten. Mit Hilfe der HPLC und durch das Testen sehr vieler Gewebeproben konnte das Peptid p4835 schließlich so weit aufgereinigt werden, dass eine Identifizierung möglich wurde. Wie gezeigt wurde, scheint das Peptid p4835 nicht mit Trypsin spaltbar zu sein. Daher wurden Versuche unternommen, die proteolytische Spaltung mit anderen Enzymen wie Chymotrypsin und Glu-C durchzuführen, es konnten jedoch keine spezifischen Peptide detektiert werden. Hinsichtlich dieser Reaktionen besteht allerdings noch Optimierungsbedarf, so dass das Peptid p4835 mit Hilfe dieser Enzyme in Zukunft identifiziert werden könnte. Ein weiterer Identifizierungsversuch wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Bruker unter Verwendung der LC-ESI-TOF MS durchgeführt, da diese Technologie die Identifizierung von Peptiden bis zu 9 kDa erlaubt (126). Obwohl durch Verwendung von MALDI-TOF MS und ESI-TOF MS die positive Identifizierungsrate deutlich erhöht werden sollte (126), konnte der



potentielle Biomarker p4835 aufgrund eines in der Probe enthaltenen dominanteren Peptids nicht identifiziert werden. Für die Identifizierung mit Hilfe der LC-ESI-TOF MS müsste zukünftig eine noch effektivere Trennungsstrategie etabliert werden.

#### **5.4.5 Nähere Charakterisierung der Peptide mit $m/z$ 3375 $\pm$ 3, $m/z$ 3442 $\pm$ 3 und $m/z$ 3487 $\pm$ 3**

Zu den Peaks, welche die größten Differenzen ihrer Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe aufwiesen, zählten die 3 Peaks mit  $m/z$  3375  $\pm$  3,  $m/z$  3442  $\pm$  3 und  $m/z$  3487  $\pm$  3. Albrethsen et al. und Melle et al. identifizierten Peptide mit diesen Molekulargewichten als humane neutrophile Peptide 1-3 (bzw. alfa-Defensine) und konnten ihr Potential als Biomarker für kolorektale Karzinome im Serum zeigen (62, 63). Obwohl die humanen neutrophilen Peptide 1-3 zwischen Normal- und Adenomgewebe differentiell exprimiert zu sein scheinen, wie sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch von Mothes et al. gezeigt werden konnte (99), wurden für die Peptide im Plasma von Patienten mit kolorektalen Karzinomen in Frühstadien keine erhöhten Werten nachgewiesen (132).

Als ein Teil der Defensin-Familie zählen sie zu den fundamentalen Komponenten des Immunsystems. Sie können ein breites Spektrum an Pathogenen inaktivieren und sind an der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt. Die humanen neutrophilen Peptide 1-3 wurden bereits in Zusammenhang mit verschiedenen Tumorerkrankungen gebracht, wo sie von infiltrierten eosinophilen und neutrophilen Leukozyten sezerniert werden (96, 97, 98). Bei kolorektalen Adenomen und Karzinomen scheint eine Expression auch durch die Tumorzellen selbst zu erfolgen (99). Daher wird diskutiert, ob die humanen neutrophilen Peptide 1-3 direkt in die Tumorentstehung involviert sein könnten (62, 99). In der vorliegenden Arbeit wurden im Karzinomgewebe gegenüber dem Adenomgewebe nochmals erhöhte Level detektiert, während Mothes et al. keine Korrelation der Expressionslevel zum Tumorstadium feststellen konnten (99). Die Analysen müssten mit einer größeren Probenanzahl validiert werden.

## 5.5 Ausblick

Die systematische Suche nach Proteinen im Blut, die als biologische Indikatoren bzw. Biomarker für Krebserkrankungen dienen können, wird weiterhin von vielen Arbeitsgruppen verfolgt (60). Die Entdeckung spezifischer diagnostischer und prädiktiver Biomarker, die eine personalisierte oder sogar individualisierte Therapie ermöglichen, erfordert eine hohe Qualität der Proben, ein sorgfältig ausgearbeitetes Studiendesign, reproduzierbare Methoden bei der Datengewinnung und -auswertung sowie eine unabhängige Validierung der entdeckten Biomarker (59, 60, 133).

Die im Rahmen dieser Arbeit entdeckten Biomarkerkandidaten müssten durch die Untersuchung einer größeren Probenanzahl validiert werden, bei der Proben aller Tumorstadien vertreten sein sollten. Um eine höhere Spezifität und Sensitivität zu erreichen, könnten C3a-desArg und Transthyretin auch mit anderen diagnostischen Markern kombiniert werden. Eine klinische Anwendung kann letztlich nur erfolgen, wenn alle potentiellen Biomarker bei einer Bevölkerungsgruppe durchschnittlichen Risikos eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen.

Das im Tumorgewebe differentiell exprimierte N-terminale GRP94-Fragment wurde erstmals nachgewiesen und zukünftige Analysen müssen klären, bei welchem Prozess das Fragment gebildet wird und ob es in die Tumorprogression involviert sein könnte. Diese Untersuchungen sowie die Validierung erfordern die Herstellung spezifischer Antikörper. Solche Antikörper könnten weiterhin die Detektion des Früherkennungsmarkers im Blut ermöglichen. Der zweite im Gewebe entdeckte Biomarkerkandidat, das für das Adenomgewebe spezifische Peptid p4835, wurde so weit aufgereinigt, dass nun die Identifizierung erfolgen kann. Als Voraussetzung hierfür müssten die proteolytischen Spaltungsreaktionen weiter optimiert werden.

Um in Zukunft neue und auch gering abundante Biomarkerkandidaten zu entdecken, könnten die sehr komplexen Proteinmischungen vor der Analyse verstärkt weiteren Separationsstrategien, wie beispielsweise die Trennung mit Hilfe der HPLC, unterzogen werden. Die Gewebeproben könnten zunächst mikrodisektiert werden, hierdurch werden außerdem Informationen über die Lokalisation der potentiellen Biomarker erhalten. Eine Trennung in Zellkompartimente wäre ebenfalls denkbar, um die Komplexität der Proben zu reduzieren. Der analysierte Molekulargewichtsbereich der Peptide und Proteine kann durch die Kombination mehrerer Strategien, z. B.

„Top-down“- und „Bottom-up“-Ansätze, erweitert werden. In absehbarer Zukunft wird weiterhin sehr wahrscheinlich die multidimensionale Separation der Peptid- und Proteinmischungen gekoppelt mit Massenspektrometrie und MS/MS als Strategie zur Entdeckung von neuen Biomarkern eingesetzt werden (147).



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Darmkrebs ist in vielen Industrieländern bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Krebserkrankung und die zweithäufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen. Eine Entwicklung neuer, nicht invasiver Früherkennungsmethoden würde die Akzeptanz von Früherkennungsmaßnahmen weiter verbessern und zudem Kosten für aufwendige Koloskopien sparen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Biomarkerkandidaten zur Früherkennung des kolorektalen Karzinoms, insbesondere der benignen Vorstufen, den Adenomen, zu entdecken und zu identifizieren.

Mit Hilfe der SELDI-TOF MS-Technologie wurden in zwei unabhängigen Untersuchungen unter standardisierten Bedingungen Serumproben von Patienten mit kolorektalen Adenomen und Karzinomen (Stadium III) sowie Patienten ohne Tumorerkrankung (Kontrollgruppe) analysiert. Zwei Biomarkerkandidaten mit hoher Signifikanz konnten als C3a-desArg und Transthyretin identifiziert werden. Beide Proteine zählen zu den Akute-Phase-Reaktanten. Die anschließende Validierung mit antikörperbasierten Methoden bestätigte ihr Potential, als Biomarker zur Früherkennung kolorektaler Adenome und Karzinome zu dienen. Mit der Kombination beider Biomarkerkandidaten konnte eine Sensitivität von 96% bei einer Spezifität von 70% erzielt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Gewebeproben von Adenomen und Karzinomen (Stadium III) sowie dem korrespondierenden Normalgewebe mit Hilfe der SELDI-TOF MS-Technologie untersucht. Ziel war es, durch die Untersuchung von Gewebe noch spezifischere Biomarker zu entdecken. Zu den interessantesten Kandidaten zählte ein Protein mit  $m/z$   $10324 \pm 10$ , dessen Level einen deutlichen Anstieg von Normal- zum Adenomgewebe und weiter zum Karzinomgewebe zeigte ( $p < 0,001$ ). Dieser Biomarkerkandidat konnte als N-terminales Fragment des Proteins GRP94 identifiziert werden, einem konstitutiv exprimierten und durch Stressbedingungen induzierbaren Chaperon des endoplasmatischen Reticulums. Wie die Analyse von mikrodisektierten Gewebekompartimenten zeigte, scheint das N-terminale Fragment von den Epithelzellen des Tumorgewebes gebildet zu werden. Spezifische Antikörper waren erforderlich, um einerseits die proteolytische Spaltung des GRP94 unter Entstehung des N-terminalen Fragmentes näher zu untersuchen und

andererseits eine Validierung und eine Analyse des Serums durchführen zu können. Für die Generierung solcher Antikörper mit Hilfe der HuCAL<sup>®</sup> Technologie wurde das N-terminale GRP94-Fragment in *E.coli* rekombinant exprimiert und mit Hilfe des N-terminalen Polyhistidin-Tags gereinigt. GRP94 konnte aus Zellen einer Kolonzelllinie aufgereinigt werden. Leider gelang es nicht, spezifische Antikörper zu generieren, um das GRP94-Fragment als Tumorbiomarker zu validieren und weiter zu charakterisieren.

Ein weiterer interessanter Biomarkerkandidat mit  $m/z$   $4837 \pm 5$  wies nur im Adenomgewebe erhöhte Level auf. Im Karzinomgewebe konnten im Vergleich zum Normalgewebe keine Intensitätsunterschiede detektiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit Hilfe hochqualitativer Proben und moderner Technologien potentielle Tumorbiomarker zur Früherkennung des kolorektalen Karzinoms identifiziert werden. In weiteren Studien sollte nun mit großen heterogenen Gruppen die Validierung der Biomarkerkandidaten erfolgen, um in Zukunft eine klinische Anwendung zu ermöglichen.

## 7 SUMMARY

In many industrial countries, intestinal cancer is the second most common cancer in men and women and the second most frequent cause of death among cancer diseases. A development of new, non-invasive early detection methods would continue to improve the acceptance of early detection measures and would furthermore save costs for complex colonoscopies. The aim of the present dissertation was to discover and identify new biomarker candidates for the early detection of colorectal carcinoma, particularly of benign precursors: the adenomas.

In two independent analyses under standardised conditions, sera samples of patients with colorectal adenomas and carcinomas (stage III) as well as of patients without cancer (control group) were analysed using SELDI-TOF MS technology. Two biomarker candidates with high significance could be identified as C3a-desArg and transthyretin. Both proteins are among the acute phase reactants. The subsequent validation using antibody-based methods confirms their potential to be used as biomarkers for the early detection of colorectal adenomas and carcinomas. With the combination of both biomarker candidates, a sensitivity of 96% in combination with a specificity of 70% could be achieved.

In the second part of the work, tissue samples of adenomas and carcinomas (stage III) as well as of the corresponding normal tissues were examined using SELDI-TOF-MS technology. The aim was to discover even more specific biomarkers by examination of the tissues. One of the most interesting candidates was a protein with  $m/z$  10324  $\pm$  10, whose level significantly rose from normal to adenoma tissue and further to carcinoma tissue ( $p < 0.001$ ). This biomarker candidate could be identified as N-terminal fragment of the protein GRP94, representing a chaperone of the endoplasmic reticulum, which is constitutively expressed and induced under stress conditions. The analysis of microdissected tissue compartments showed that the N-terminal fragment seems to be expressed by the epithelial cells of the tumour tissue. Specific antibodies were necessary, on the one hand, to examine the proteolytic cleavage of GRP94 more closely, which results in the N-terminal fragment, and, on the other, to carry out a validation and an analysis of the sera. For the generation of such antibodies using the HuCAL<sup>®</sup> technology, the N-terminal GRP94 fragment was recombinantly expressed in *E.coli* and purified using an N-terminal polyhistidine tag.

GRP94 could be purified from cells of a colon cell line. Unfortunately, it failed to generate specific antibodies in order to validate and further characterise the GRP94 fragment as a tumour biomarker.

Another interesting biomarker candidate with  $m/z$   $4837 \pm 5$  showed increased levels only in the adenoma tissue. No differences in intensity could be detected between the carcinoma tissue and the normal tissue.

Within the scope of this work, potential tumour biomarkers for the early detection of colorectal carcinoma could be identified using high-quality samples and modern technologies. In further studies, the biomarker candidates should now be validated using large, heterogeneous groups in order to allow clinical application in the future.



## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Statistisches Bundesamt, [www.destatis.de](http://www.destatis.de), 2008
- 2 Broschüre „Krebs in Deutschland“ von der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) und dem Robert-Koch-Institut, 6. überarbeitete Auflage, 2008
- 3 Beck, V., Nioduschewski, G., Sieg, A., Weismüller, J., Darmkrebs verhindern – Fragen und Antworten. Informationen zur Vermeidung und Früherkennung. Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 3. aktualisierte Auflage, 2003
- 4 Kinzler, K., Vogelstein, B., Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*. 1997 Apr; 386 (6627): 761-763
- 5 Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle, P.R., Büchler, M.W., Colorectal cancer. *Lancet*. 2005 Jan; 365: 153-165
- 6 Fearon E.R., Vogelstein B., A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun; 61 (5): 759-767
- 7 Gryfe, R., Swallow C., Bapat B., Redston M., Gallinger S., Couture J., Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer*. 1997 Sep-Oct; 21 (5): 233-300
- 8 Booth, R.A., Minimally invasive biomarkers for detection and staging of colorectal cancer. *Cancer Letters*. 2007 Apr; 249 (1): 87-96
- 9 Jass, J.R., Whitehall, V.L., Young, J., Leggett, B.A., Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology*. 2002 Sep; 123 (3): 862-876
- 10 Mäkinen, M.J., Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2007 Jan; 50 (1): 131-150
- 11 Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M.J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B.A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G.J., Bigner D.D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J.W., Leung S.Y., Yuen S.T., Weber B.L., Seigler H.F., Darrow T.L., Paterson H., Marais R., Marshall C.J., Wooster R., Stratton M.R., Futreal P.A., Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun; 417 (6892): 949-954
- 12 Kim, Y.H., Kakar, S., Cun, L., Deng, G., Kim, Y.S., Distinct CpG island profiles and BRAF mutation status in serrated and adenomatous colorectal polyps. *Int J Cancer*. 2008 Sep; 123 (11): 2587-2593

- 13 Ries L.A.G, Melbert D., Krapcho M., Mariotto A., Miller B.A., Feuer E.J., Clegg L., Horner M.J., Howlader N., Eisner M.P., Reichman M., Edwards B.K. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2004/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/), based on November 2006 SEER data submission, posted to the SEER Web site, 2007
- 14 Link K.H., Sagban T.A., Mörschel M., Tischbirek K., Holtappels M., Apell V., Zayed K., Kornmann M., Staib L., Colon Cancer: survival after curative surgery. *Langenbecks Arch Surg.* 2005 Apr; 390 (2): 83-93
- 15 Hardcastle J.D., Chamberlain J.O., Robinson M.H., Moss S.M., Amar S.S., Balfour T.W., James P.D., Mangham C.M., Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet.* 1996 Nov; 348 (9040): 1472-1477
- 16 Kronborg O., Fenger C., Olsen J., Jørgensen O.D., Søndergaard O., Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet.* 1996 Nov; 348 (9040): 1467-1471
- 17 Mandel J.S., Church T.R., Bond J.H., Ederer F., Geisser M.S., Mongin S.J., Snover D.C., Schuman L.M., The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000 Nov; 343 (22): 1603-1607
- 18 Jørgensen O.D., Kronborg O., Fenger C., Rasmussen M., Influence of long-term colonoscopic surveillance on incidence of colorectal cancer and death from the disease in patients with precursors (adenomas). *Acta Oncol.* 2007; 46 (3): 355-360
- 19 Levin B., Lieberman D.A., McFarland B., Smith R.A., Brooks D., Andrews K.S., Dash C., Giardiello F.M., Glick S., Levin T.R., Pickhardt P., Rex D.K., Thorson A., Winawer S.J., Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology.* 2008 May; 134 (5): 1570-1595
- 20 Ouyang D.L., Chen J.J., Getzenberg R.H., Schoen R.E., Noninvasive Testing for Colorectal Cancer: A Review. *Am J Gastroenterol* 2005; 100 (6): 1393-1403
- 21 Allison J.E., Sakoda L.C., Levin T.R., Tucker J.P., Tekawa I.S., Cuff T., Pauly M.P., Shiager L., Palitz A.M., Zhao W.K., Schwartz J.S., Ransohoff D.F., Selby J.V., Screening for colorectal cancer neoplasms with new fecal occult blood tests: update on performance characteristics. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Oct; 99 (19): 1462-1470
- 22 Guittet L., Bouvier V., Mariotte N., Vallee J.P., Arsène D., Boutreux S., Tichet J., Launoy G., Comparison of a guaiac based and an immunochemical faecal occult blood test in screening for colorectal cancer in a general average risk population. *Gut.* 2007 Feb; 56 (2): 210-214

- 23 Ahlquist D.A., Skoletsky J.E., Boynton K.A., Harrington J.J., Mahoney D.W., Pierceall W.E., Thibodeau S.N., Shuber A.P., Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology*. 2000 Nov; 119 (5): 1219-1227
- 24 Ahlquist D.A., Sargent D.J., Loprinzi C.L., Levin T.R., Rex D.K., Ahnen D.J., Knigge K., Lance M.P., Burgart L.J., Hamilton S.R., Allison J.E., Lawson M.J., Devens M.E., Harrington J.J., Hillman S.L., Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia. *Ann Intern Med*. 2008 Oct; 149 (7): 441-450
- 25 Calistri D., Rengucci C., Bocchini R., Saragoni L., Zoli W., Amadori D., Fecal multiple molecular tests to detect colorectal cancer in stool. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2003 Sep; 1 (5): 377-383
- 26 Syngal S., Stoffel E., Chung D., Willett C., Schoetz D., Schroy P., Jagadeesh D., Morel K., Ross M., Detection of stool DNA mutations before and after treatment of colorectal neoplasia. *Cancer*. 2006 Jan; 106 (2): 277-283
- 27 Imperiale T.F., Ransohoff D.F., Itzkowitz S.H., Turnbull B.A., Ross M.E., Colorectal Cancer Study Group. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med*. 2004 Dec; 351 (26): 2704-2714
- 28 Loganayagam A., Faecal screening of colorectal cancer. *Int J Clin Pract*. 2008 Mar; 62 (3): 454-459
- 29 Pickhardt P.J., Choi J.R., Hwang I., Butler J.A., Puckett M.L., Hildebrandt H.A., Wong R.K., Nugent P.A., Mysliwiec P.A., Schindler W.R., Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *N Engl J Med*. 2003 Dec; 349 (23): 2191-2200
- 30 Lamerz R., Stieber P., Tumormarker. *Dtsch Med Wochenschr* 2004; 129: 2722-2728
- 31 Hernández J., Thompson I.M., Prostate-specific antigen: a review of the validation of the most commonly used cancer biomarker. *Cancer*. 2004 Sep; 101 (5): 894-904
- 32 Duffy M.J., van Dalen A., Haglund C., Hansson L., Klapdor R., Lamerz R., Nilsson O., Sturgeon C., Topolcan O., Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer*. 2003 Apr; 39 (6): 718-727
- 33 Srinivas P.R., Verma M., Zhao Y., Srivastava S., Proteomics for Cancer Biomarker Discovery. *Clin Chem*. 2002 Aug; 48 (8): 1160-1169
- 34 Cho W.C., Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer*. 2007 Apr; 6: 25
- 35 Petricoin E.F., Liotta L.A., Proteomic approaches in cancer risk and response assessment. *Trends Mol Med*. 2004 Feb; 10 (2): 59-64

- 36 Li J., Zhang Z., Rosenzweig J., Wang Y.Y., Chan D.W., Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem.* 2002 Aug; 48 (8): 1296-1304
- 37 Zhang Z., Bast R.C. Jr, Yu Y., Li J., Sokoll L.J., Rai A.J., Rosenzweig J.M., Cameron B., Wang Y.Y., Meng X.Y., Berchuck A., Van Haaften-Day C., Hacker N.F., de Bruijn H.W., van der Zee A.G., Jacobs I.J., Fung E.T., Chan D.W., Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2004 Aug; 64 (16): 5882-5890
- 38 Yang S.Y., Xiao X.Y., Zhang W.G., Zhang L.J., Zhang W., Zhou B., Chen G., He D.C., Application of serum SELDI proteomic patterns in diagnosis of lung cancer. *BMC Cancer.* 2005 Jul; 5: 83
- 39 Adam B.L., Qu Y., Davis J.W., Ward M.D., Clements M.A., Cazares L.H., Semmes O.J., Schellhammer P.F., Yasui Y., Feng Z., Wright G.L. Jr., Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res.* 2002 Jul; 62 (13): 3609-3614
- 40 Chen Y.D., Zheng S., Yu J.K., Hu X., Artificial neural networks analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectra of serum protein pattern distinguishes colorectal cancer from healthy population. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec; 10 (24): 8380-8385
- 41 Petricoin E. 3rd, Liotta L.A., Counterpoint: The vision for a new diagnostic paradigm. *Clin Chem.* 2003 Aug; 49 (8): 1276-1278
- 42 Diamandis E.P., Mass Spectrometry as a Diagnostic and Cancer Biomarker Discovery Tool. *Mol Cell Proteomics.* 2004 Apr; 3 (4): 367-378
- 43 Ward D.G., Suggett N., Cheng Y., Wei W., Johnson H., Billingham L.J., Ismail T., Wakelam M.J., Johnson P.J., Martin A., Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis. *Br J Cancer.* 2006 Jun; 94 (12): 1898-1905
- 44 Le L., Chi K., Tyldesley S., Flibotte S., Diamond D.L., Kuzyk M.A., Sadar M.D., Identification of serum amyloid A as a biomarker to distinguish prostate cancer patients with bone lesions. *Clin Chem.* 2005 Apr; 51 (4): 695-707
- 45 Malik G., Ward M.D., Gupta S.K., Trosset M.W., Grizzle W.E. Adam B.L., Diaz J.I., Semmes O.J., Serum levels of an isoform of apolipoprotein A-II as a potential marker for prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb; 11 (3): 1073-85
- 46 Li J., Orlandi R., White C.N., Rosenzweig J., Zhao J., Seregini E., Morelli D., Yu Y., Meng X.Y., Zhang Z., Davidson N.E., Fung E.T., Chan D.W., Independent validation of candidate breast cancer serum biomarkers identified by mass spectrometry. *Clin Chem.* 2005 Dec; 51 (12): 2229-2235

- 
- 47 Escher N., Kaatz M., Melle C., Hipler C., Ziemer M., Driesch D., Wollina U., von Eggeling F., Posttranslational modifications of transthyretin are serum markers in patients with mycosis fungoides. *Neoplasia*. 2007 Mar; 9 (3): 254-259
- 48 Liu L., Liu J., Dai S., Wang X., Wu S., Wang J., Huang L., Xiao X., He D., Reduced transthyretin expression in sera of lung cancer. *Cancer Sci*. 2007 Oct; 98 (10): 1617-1624
- 49 Fung E.T., Yip T.T., Lomas L., Wang Z., Yip C., Meng X.Y., Lin S., Zhang F., Zhang Z., Chan D.W., Weinberger S.R., Classification of cancer types by measuring variants of host response proteins using SELDI serum assays. *Int J Cancer*. 2005 Jul; 115 (5): 783-789
- 50 Coussens L.M., Werb Z., Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec; 420 (6917): 860-867
- 51 Song J., Patel M., Rosenzweig C.N., Chan-Li Y., Sokoll L.J., Fung E.T., Choi-Miura N.H., Goggins M., Chan D.W., Zhang Z., Quantification of fragments of human inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 by surface-enhanced laser desorption/ionisation-based immunoassay. *Clin Chem*. 2006 Jun; 52 (6): 1045-1053
- 52 Engwegen J.Y., Gast M.C., Schellens J.H., Beijnen J.H., Clinical proteomics: searching for better tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry. *Trends Pharmacol Sci*. 2006 May; 27 (5): 251-259
- 53 Polanski M., Anderson N.L., A List of Candidate Cancer Biomarkers for Targeted Proteomics. *Biomarker Insights* 2006; 2: 1-48
- 54 Liu T., Qian W.J., Mottaz H.M., Gritsenko M.A., Norbeck A.D., Moore R.J., Purvine S.O., Camp D.G. 2nd, Smith R.D., Evaluation of multiprotein immunoaffinity subtraction for plasma proteomics and candidate biomarker discovery using mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Nov; 5 (11): 2167-2174
- 55 Anderson N.L., Anderson NG., The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002 Nov; 1 (11): 845-867
- 56 Roche Diagnostics, Tumormarker Praktischer Einsatz und Bedeutung
- 57 Hoffman S.A., Joo W.A., Echan L.A., Speicher D.W., Higher dimensional (Hi-D) separation strategies dramatically improve the potential for cancer biomarker detection in serum and plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 Apr; 849 (1-2): 43-52
- 58 Faca V., Pitteri S.J., Newcomb L., Glukhova V., Phanstiel D., Krasnoselsky A., Zhang Q., Struthers J., Wang H., Eng J., Fitzgibbon M., McIntosh M., Hanash S., Contribution of protein fractionation to depth of analysis of serum and plasma proteomes. *J Proteome Res*. 2007 Sep; 6 (9): 3558-3565

- 59 Ransohoff D.F., Rules of evidence for cancer molecular-marker discovery and validation. *Nat Rev Cancer*. 2004 Apr; 4 (4): 309-314
- 60 Hanash S.M., Pitteri S.J., Faca V.M., Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature*. 2008 Apr; 452 (7187): 571-579
- 61 Roessler M., Rollinger W., Palme S., Hagmann M.L., Berndt P., Engel A.M., Schneidinger B., Pfeffer M., Andres H., Karl J., Bodenmüller H., Rüschoff J., Henkel T., Rohr G., Rossol S., Rösch W., Langen H., Zolg W., Tacke M., Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel serum tumor marker for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep; 11 (18): 6550-6557
- 62 Albrethsen J., Bøgebo R., Gammeltoft S., Olsen J., Winther B., Raskov H., Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. *BMC Cancer*. 2005 Jan; 19; 5: 8
- 63 Melle C., Ernst G., Schimmel B., Bleul A., Thieme H. Kaufmann R., Mothes H., Settmacher U., Claussen U., Halbhuber K.J., Von Eggeling F., Discovery and identification of alpha-defensins as low abundant, tumor-derived serum markers in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2005 Jul; 129 (1): 66-73
- 64 Melle C., Ernst G., Schimmel B., Bleul A., Koscielny S., Wiesner A., Bogumil R., Moller U., Osterloh D., Halbhuber K.J., von Eggeling F., Biomarker discovery and identification in laser microdissected head and neck squamous cell carcinoma with ProteinChip technology, two-dimensional gel electrophoresis, tandem mass spectrometry, and immunohistochemistry. *Mol Cell Proteomics*. 2003 Jul; 2 (7): 443-452
- 65 Espina V., Heiby M., Pierobon M., Liotta L.A., Laser capture microdissection technology. *Expert Rev Mol Diagn*. 2007 Sep; 7 (5): 647-657
- 66 Mustafa D., Kros J.M., Luidert T., Combining laser capture microdissection and proteomics techniques. *Methods Mol Biol*. 2008; 428: 159-178
- 67 Thalhammer S., Lahr G., Clement-Sengewald A., Heckl W.M., Burgemeister R., Schütze K., *Laser Microtools in Cell Biology and Molecular Medicine*. 2003; 13 (5): 681-691
- 68 Hathout Y., Approaches to the study of the cell secretome. *Expert Rev Proteomics*. 2007 Apr; 4 (2): 239-248
- 69 Xue H., Lu B., Lai M., The cancer secretome; a reservoir of biomarkers. *J Transl Med*. 2008 Sep; 6: 52
- 70 Leedham S.J., Wright N.A., Expansion of mutated clone: from stem cell to tumour. *J Clin Pathol*. 2008 Feb; 61 (2): 164-171
- 71 Zwirner J., Werfel T., Wilken H.C., Theile E., Götze O., Anaphylatoxin C3a but not C3a(desArg) is a chemotaxin for the mouse macrophage cell line J774. *Eur J Immunol*. 1998 May; 28(5): 1570-1577

- 72 Gericke B., Raila J., Sehouli J., Haebel S., Könsgen D., Mustea A., Schweigert F.J., Microheterogeneity of transthyretin in serum and ascitic fluid of ovarian cancer patients. *BMC Cancer*. 2005 Oct; 5: 133
- 73 Bernstein L.H., Ingenbleek Y., Transthyretin: its response to malnutrition and stress injury. clinical usefulness and economic implications. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Dec; 40(12): 1344-1348
- 74 Pleban WE., Prealbumin: a biochemical marker of nutritional support. *Conn Med*. 1989 Jul; 53(7): 405-407
- 75 Straus D.S., Nutritional regulation of visceral markers in rat liver and cultured hepatoma cells. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Dec; 40(12): 1274-1280
- 76 Milano G., Cooper E.H., Goligher J.C., Giles G.R., Neville A.M., Serum prealbumin, retinol-binding protein, transferrin, and albumin levels in patients with large bowel cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1978 Sep; 61(3): 687-691
- 77 Mählick C.G., Grankvist K., Plasma prealbumin in women with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Obstet Invest*. 1994; 37(2): 135-140
- 78 Suresh U.R., Wilkes S., Hasleton P.S., Prealbumin in the diagnosis of bronchopulmonary carcinoid tumours. *J Clin Pathol*. 1991 Jul; 44(7): 573-575
- 79 Benvenga S., Bartalena L., Antonelli A., Li Calzi L., Di Pasquale G., Trimarchi F., Pinchera A., Radioimmunoassay for human thyroxine-binding prealbumin. *Ann Clin Lab Sci*. 1986 May-Jun; 16(3): 231-240
- 80 Joelsson B., Alwmark A., Gullstrand P., Bengmark S., Hultberg B., Serum proteins in liver cirrhosis: effects of shunt surgery. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1987 Dec; 25(12): 865-868
- 81 Verhaegen H., De Cock W., De Cree J., Verbruggen F., Increase of serum complement levels in cancer patients with progressing tumors. *Cancer*. 1976 Oct; 38(4):1608-1613
- 82 Cianflone K., Xia Z., Chen L.Y., Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Jan 31;1609(2):127-143
- 83 Hsieh S.Y., Chen R.K., Pan Y.H., Lee H.L., Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling. *Proteomics*. 2006 May;6(10):3189-3198
- 84 West-Nielsen M., Høgdall E.V., Marchiori E., Høgdall C.K., Schou C., Heegaard N.H., Sample handling for mass spectrometric proteomic investigations of human sera. *Anal Chem*. 2005 Aug 15;77(16):5114-5123
- 85 Banks R.E., Stanley A.J., Cairns D.A., Barrett J.H., Clarke P., Thompson D., Selby P.J., Influences of blood sample processing on low-molecular-weight proteome identified by surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Chem*. 2005 Sep;51(9):1637-1649

- 86 Timms J.F., Arslan-Low E., Gentry-Maharaj A., Luo Z., T'Jampens D., Podust V.N., Ford J., Fung E.T., Gammerman A., Jacobs I., Menon U., Preanalytic influence of sample handling on SELDI-TOF serum protein profiles. *Clin Chem.* 2007 Apr;53(4):645-656
- 87 Villanueva J., Philip J., Chaparro C.A., Li Y., Toledo-Crow R., DeNoyer L., Fleisher M., Robbins R.J., Tempst P., Correcting common errors in identifying cancer-specific serum peptide signatures. *J Proteome Res.* 2005 Jul-Aug;4(4):1060-1072
- 88 Engwegen J.Y.M.N., Alberts M., Knol J.C., Jimenez C.R., Depla A.C.T.M., Tuynman H., Snel P., Smits M.E., Cats A., Schellens J.H.M., Beijnen J.H., Influence of variations in sample handling on SELDI-TOF MS serum protein profiles for colorectal cancer. *Proteomics Clin Appl* 2008; 2(6): 936-945
- 89 van Winden A.W., Gast M.C., Beijnen J.H., Rutgers E.J., Grobbee D.E., Peeters P.H., van Gils C.H., Validation of previously identified serum biomarkers for breast cancer with SELDI-TOF MS: a case control study. *BMC Med Genomics.* 2009 Jan 19;2:4
- 90 Shi L., Zhang J., Wu P., Feng K., Li J., Xie Z., Xue P., Cai T., Cui Z., Chen X., Hou J., Zhang J., Yang F., Discovery and identification of potential biomarkers of pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Proteome Sci.* 2009 Mar 16;7:7
- 91 Miguet L., Bogumil R., Decloquement P., Herbrecht R., Potier N., Mauvieux L., Van Dorsselaer A., Discovery and identification of potential biomarkers in a prospective study of chronic lymphoid malignancies using SELDI-TOF-MS. *J Proteome Res.* 2006 Sep;5(9):2258-2269
- 92 Habermann J.K., Roblick U.J., Luke B.T., Prieto D.A., Finlay W.J., Podust V.N., Roman J.M., Oevermann E., Schiedeck T., Homann N., Duchrow M., Conrads T.P., Veenstra T.D., Burt S.K., Bruch H.P., Auer G., Ried T., Increased serum levels of complement C3a anaphylatoxin indicate the presence of colorectal tumors. *Gastroenterology.* 2006 Oct;131(4):1020-1029
- 93 Kozak K.R., Su F., Whitelegge J.P., Faull K., Reddy S., Farias-Eisner R., Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics.* 2005 Nov;5(17):4589-4596
- 94 Su F., Lang J., Kumar A., Ng C., Hsieh B., Suchard M.A., Reddy S.T., Farias-Eisner R., Validation of candidate serum ovarian cancer biomarkers for early detection. *Biomark Insights.* 2007 Oct 16;2:369-375
- 95 Liu L., Wang J., Liu B., Dai S., Wang X., Chen J., Huang L., Xiao X., He D., Serum levels of variants of transthyretin down-regulation in cholangiocarcinoma. *J Cell Biochem.* 2008 Jun 1;104(3):745-755
- 96 Bateman A., Singh A., Jothy S., Fraser R., Esch F., Solomon S., The levels and biologic action of the human neutrophil granule peptide HP-1 in lung tumors. *Peptides.* 1992 Jan-Feb;13(1):133-139



- 
- 97 Mizukawa N., Sugiyama K., Kamio M., Yamachika E., Ueno T., Fukunaga J., Takagi S., Sugahara T., Immunohistochemical staining of human alpha-defensin-1 (HNP-1), in the submandibular glands of patients with oral carcinomas. *Anticancer Res.* 2000 Mar-Apr;20(2B):1125-1127
- 98 Lundy F.T., Orr D.F., Gallagher J.R., Maxwell P., Shaw C., Napier S.S., Gerald Cowan C., Lamey P.J., Marley J.J., Identification and overexpression of human neutrophil alpha-defensins (human neutrophil peptides 1, 2 and 3) in squamous cell carcinomas of the human tongue. *Oral Oncol.* 2004 Feb;40(2):139-144
- 99 Mothes H., Melle C., Ernst G., Kaufmann R., von Eggeling F., Settmacher U., Human Neutrophil Peptides 1-3--early markers in development of colorectal adenomas and carcinomas. *Dis Markers.* 2008;25(2):123-129
- 100 Yang Y., Li Z., Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? *Mol Cells.* 2005 Oct 31;20(2):173-182. Review.
- 101 Dollins D.E., Immormino R.M., Gewirth D.T., Structure of unliganded GRP94, the endoplasmic reticulum Hsp90. Basis for nucleotide-induced conformational change. *J Biol Chem.* 2005 Aug 26;280(34):30438-30447
- 102 Srivastava P., Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:395-425
- 103 Blachere N.E., Li Z., Chandawarkar R.Y., Suto R., Jaikaria N.S., Basu S., Udono H., Srivastava P.K., Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med.* 1997 Oct 20;186(8):1315-1322
- 104 Suto R., Srivastava P.K., A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science.* 1995 Sep 15;269(5230):1585-1588
- 105 Doody A.D., Kovalchin J.T., Mihalyo M.A., Hagymasi A.T., Drake C.G., Adler A.J., Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *Immunol.* 2004 May 15;172(10):6087-6092
- 106 Binder R.J., Srivastava P.K., Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat Immunol.* 2005 Jun;6(6):593-599
- 107 Liu E.S., Lee A.S., Common sets of nuclear factors binding to the conserved promoter sequence motif of two coordinately regulated ER protein genes, GRP78 and GRP94. *Nucleic Acids Res.* 1991 Oct 11;19(19):5425-5431
- 108 Anderson S.L., Shen T., Lou J., Xing L., Blachere N.E., Srivastava P.K., Rubin B.Y., The endoplasmic reticular heat shock protein gp96 is transcriptionally upregulated in interferon-treated cells. *J Exp Med.* 1994 Oct 1;180(4):1565-1569

- 109 Shiu R.P., Pouyssegur J., Pastan I., Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Sep;74(9):3840-3844
- 110 Welch W.J., Garrels J.I., Thomas G.P., Lin J.J., Feramisco J.R., Biochemical characterization of the mammalian stress proteins and identification of two stress proteins as glucose- and Ca<sup>2+</sup>-ionophore-regulated proteins. *J Biol Chem.* 1983 Jun 10;258(11):7102-7111
- 111 Kim Y.K., Kim K.S., Lee A.S., Regulation of the glucose-regulated protein genes by beta-mercaptoethanol requires de novo protein synthesis and correlates with inhibition of protein glycosylation. *J Cell Physiol.* 1987 Dec;133(3):553-559
- 112 Ramakrishnan M., Tugizov S., Pereira L., Lee A.S., Conformation-defective herpes simplex virus 1 glycoprotein B activates the promoter of the grp94 gene that codes for the 94-kD stress protein in the endoplasmic reticulum. *DNA Cell Biol.* 1995 May;14(5):373-384
- 113 Gazit G., Lu J., Lee A.S., De-regulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 Mar;54(2):135-146
- 114 Zheng H.C., Takahashi H., Li X.H., Hara T., Masuda S., Guan Y.F., Takano Y., Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas. *Hum Pathol.* 2008 Jul;39(7):1042-1049
- 115 Ménoret A., Meflah K., Le Pendu J., Expression of the 100-kDa glucose-regulated protein (GRP100/endoplasmic reticulum chaperone) is associated with tumorigenicity in a model of rat colon adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 1994 Feb 1;56(3):400-405
- 116 Bini L., Magi B., Marzocchi B., Arcuri F., Tripodi S., Cintorino M., Sanchez J.C., Frutiger S., Hughes G., Pallini V., Hochstrasser D.F., Tosi P., Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue. *Electrophoresis.* 1997 Dec;18(15):2832-2841
- 117 Wang Q., He Z., Zhang J., Wang Y., Wang T., Tong S., Wang L., Wang S., Chen Y., Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance. *Cancer Detect Prev.* 2005;29(6):544-551
- 118 Wang X.P., Qiu F.R., Liu G.Z., Chen R.F., Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human colonic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005 Feb 21;11(7):1056-1059
- 119 Ni M., Lee A.S., ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett.* 2007 Jul 31;581(19):3641-3651

- 120 Feldman D.E., Chauhan V., Koong A.C., The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors. *Mol Cancer Res.* 2005 Nov;3(11):597-605
- 121 Lee A.S., The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci.* 2001 Aug;26(8):504-510
- 122 Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K., Structure and physiological function of calpains. *Biochem J.* 1997 Dec 15;328 ( Pt 3):721-732.
- 123 Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J., The calpain system. *Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):731-801
- 124 Dollins D.E., Warren J.J., Immormino R.M., Gewirth D.T., Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. *Mol Cell.* 2007 Oct 12;28(1):41-56
- 125 Wulfkuhle J.D., Liotta L.A., Petricoin E.F., Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003 Apr;3(4):267-275
- 126 Menzel C., Guillou V., Kellmann M., Khamenya V., Juergens M., Schulz-Knappe P., High-throughput biomarker discovery and identification by mass spectrometry. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2005 Dec;8(8):743-755
- 127 Fung E.T., A recipe for proteomics diagnostic test development: the OVA1 test, from biomarker discovery to FDA clearance. *Clin Chem.* 2010 Feb;56(2):327-329
- 128 Hsieh S.Y., Chen R.K., Pan Y.H., Lee H.L., Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling. *Proteomics.* 2006 May;6(10):3189-3198
- 129 Han X., Aslanian A., Yates J.R. 3rd., Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* 2008 Oct;12(5):483-490
- 130 McLafferty F.W., Breuker K., Jin M., Han X., Infusini G., Jiang H., Kong X., Begley T.P., Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics. *FEBS J.* 2007 Dec;274(24):6256-6268
- 131 Solassol J., Jacot W., Lhermitte L., Boulle N., Maudelonde T., Mangé A., Clinical proteomics and mass spectrometry profiling for cancer detection. *Expert Rev Proteomics.* 2006 Jun;3(3):311-320
- 132 Albrethsen J., Møller C.H., Olsen J., Raskov H., Gammeltoft S., Human neutrophil peptides 1, 2 and 3 are biochemical markers for metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2006 Nov;42(17):3057-3064

- 133 Apweiler R., Aslanidis C., Deufel T., Gerstner A., Hansen J., Hochstrasser D., Kellner R., Kubicek M., Lottspeich F., Maser E., Mewes H.W., Meyer H.E., Müllner S., Mutter W., Neumaier M., Nollau P., Nothwang H.G., Ponten F., Radbruch A., Reinert K., Rothe G., Stockinger H., Tarnok A., Taussig M.J., Thiel A., Thiery J., Ueffing M., Valet G., Vandekerckhove J., Verhuven W., Wagener C., Wagner O., Schmitz G., Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in fluid proteomics. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(6):724-744
- 134 Maciel C.M., Junqueira M., Paschoal M.E., Kawamura M.T., Duarte R.L., Carvalho Mda G., Domont G.B., Differential proteomic serum pattern of low molecular weight proteins expressed by adenocarcinoma lung cancer patients. *J Exp Ther Oncol.* 2005;5(1):31-38
- 135 Siuti N., Kelleher N.L., Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. *Nat Methods.* 2007 Oct;4(10):817-821
- 136 Nedelkov D., Kiernan U.A., Niederkofler E.E., Tubbs K.A., Nelson R.W., Population proteomics: the concept, attributes, and potential for cancer biomarker research. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Oct;5(10):1811-1818
- 137 Cairns D.A., Barrett J.H., Billingham L.J., Stanley A.J., Xinarianos G., Field J.K., Johnson P.J., Selby P.J., Banks R.E., Sample size determination in clinical proteomic profiling experiments using mass spectrometry for class comparison. *Proteomics.* 2009 Jan;9(1):74-86.
- 138 Barderas R., Babel I., and Casal J.I., Colorectal cancer proteomics, molecular characterization and biomarker discovery. *Proteomics Clin. Appl.* 2010 Feb;4(2):159–178
- 139 Roessler M., Rollinger W., Mantovani-Endl L., Hagmann M.L., Palme S., Berndt P., Engel A.M., Pfeffer M., Karl J., Bodenmüller H., Rüschoff J., Henkel T., Rohr G., Rossol S., Rösch W., Langen H., Zolg W., Tacke M., Identification of PSME3 as a novel serum tumor marker for colorectal cancer by combining two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with a strictly mass spectrometry-based approach for data analysis. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Nov;5(11):2092-20101
- 140 Thierolf M., Hagmann M.L., Pfeffer M., Berntenis N., Wild N., Roeßler M., Palme S., Karl J., Bodenmüller H., Rüschoff J., Rossol S., Rohr G., Rösch W., Friess H., Eickhoff A., Jauch K.W., Langen H., Zolg W., Tack M., Towards a comprehensive proteome of normal and malignant human colon tissue by 2-D-LC-ESI-MS and 2-DE proteomics and identification of S100A12 as potential cancer biomarker. *Proteomics Clin. Appl.* 2008 Jan;2(1):11–22
- 141 Melle C., Ernst G., Escher N., Hartmann D., Schimmel B., Bleul A., Thieme H., Kaufmann R., Felix K., Friess H.M., Settmacher U., Hommann M., Richter K.K., Daffner W., Täubig H., Manger T., Claussen U., von Eggeling F., Protein profiling of microdissected pancreas carcinoma and identification of HSP27 as a potential serum marker. *Clin Chem.* 2007 Apr;53(4):629-635

- 142 Cui G., Goll R., Olsen T., Steigen S.E., Husebekk A., Vonen B., Florholmen J., Reduced expression of microenvironmental Th1 cytokines accompanies adenomas-carcinomas sequence of colorectum. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Jul;56(7):985-995
- 143 Lü B., Xu J., Lai M., Zhang H., Chen J., A transcriptome anatomy of human colorectal cancers. *BMC Cancer.* 2006 Feb 23;6:40.
- 144 Chen H., Xia Y., Fang D., Hawke D., Lu Z., Caspase-10-mediated heat shock protein 90 beta cleavage promotes UVB irradiation-induced cell apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2009 Jul;29(13):3657-3664
- 145 Beck R., Verrax J., Gonze T., Zappone M., Pedrosa R.C., Taper H., Feron O., Calderon P.B., Hsp90 cleavage by an oxidative stress leads to its client proteins degradation and cancer cell death. *Biochem Pharmacol.* 2009 Feb 1;77(3):375-383
- 146 Reddy R.K., Dubeau L., Kleiner H., Parr T., Nichols P., Ko B., Dong D., Ko H., Mao C., DiGiovanni J., Lee A.S., Cancer-inducible transgene expression by the Grp94 promoter: spontaneous activation in tumors of various origins and cancer-associated macrophages. *Cancer Res.* 2002 Dec 15;62(24):7207-7212
- 147 Palmblad M., Tiss A., Cramer R., Mass spectrometry in clinical proteomics – from the present to the future. *Proteomics Clin. Appl.* 2009 Jan;3(1):6–17
- 148 Reddy R.K., Lu J., Lee A.S., The endoplasmic reticulum chaperone glycoprotein GRP94 with Ca(2+)-binding and antiapoptotic properties is a novel proteolytic target of calpain during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999 Oct 1; 274(40):28476-28483
- 149 Muruganandan S., Cribb A.E., Calpain-induced endoplasmic reticulum stress and cell death following cytotoxic damage to renal cells. *Toxicol Sci.* 2006 Nov; 94(1):118-128
- 150 Lakshmikuttyamma A., Selvakumar P., Kanthan R., Kanthan S.C., Sharma R.K., Overexpression of m-calpain in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Oct; 13(10):1604-1609
- 151 Heiligtag S., Induction of Apoptosis in Neuroblastoma – Analysis of apoptotic pathways and putative apoptosis-mediating receptors. 2001
- 152 Sprüssel A., Entwicklung von organo-typischen In vitro-Kultursystemen des kolorektalen Karzinoms und einer auf ihnen basierenden multi-funktionellen Medikamententestplattform. 2009
- 153 Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76-85

- 154 Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M., Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996 Mar 1;68(5):850-858
- 155 Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):487-491

---

## Veröffentlichungen

### Poster

Fentz A.K., Spörl M., Zornig C., Juhl H., David K.A., Identification of biomarkers for early detection of colorectal cancer. (# A4807). AACR Annual Meeting 2005; Anaheim, CA; April 2005

Fentz A.K., Spörl M., Spangenberg J., List H.J., Zornig C., Dörner A., Juhl H., David K.A., Detection of colorectal adenoma and cancer based on transthyretin and C3a-desArg serum levels. (# A2856). AACR Annual Meeting 2006; Washington, DC; April 2006

### Artikel

Fentz A.K., Spörl M., Spangenberg J., List H.J., Zornig C., Dörner A., Layer P., Juhl H., David K.A., Detection of colorectal adenoma and cancer based on transthyretin and C3a-desArg serum levels. *Proteomics Clin Appl* 2007; 1(6): 536-544

## Patentanmeldungen

„Use of C3a and derivatives thereof as a biomarker for colorectal adenoma and/or carcinoma; method for detection and test system“, Pub. No.: WO/2006/053592, Publication Date: 26.05.2006, International Application No.: PCT/EP2005/008742, International Filing Date: 11.08.2005, Inventors: Juhl, Hartmut; David, Kerstin; Fentz, Anne-Kristin

„Use of an endoplasmin fragment and derivatives thereof as a biomarker for colorectal adenoma and/or carcinoma; method for detection and test system“, Pub. No.: WO/2007/019875, Publication Date: 22.02.2007, International Application No.: PCT/EP2005/009005, International Filing Date: 19.08.2005, Inventors: Juhl, Hartmut; David, Kerstin; Fentz, Anne-Kristin





## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. R. Bredehorst für die Übernahme der universitären Betreuung und des Koreferates. Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. K. David für die wissenschaftliche Betreuung, die stete Unterstützung und Anleitung. Herrn Prof. Dr. H. Juhl danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und für die Beschäftigung bei der Firma Indivumed GmbH.

Herrn Dr. Jörg Spangenberg danke ich für die Beratungen zu statistischen Auswertungen und molekularbiologischen Methoden, Herrn Dr. Markus Meyer für die vielen wissenschaftlichen wie praktischen Anregungen und Ratschläge. Ich danke Herrn Dr. Patrick Ziegel Müller (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg) für die Beratung bei molekularbiologischen Fragestellungen und die Zurverfügungstellung des Expressionsvektors.

Mein Dank gilt besonders meiner Laborkollegin Frau Monika Spörl für die vielen fachlichen und persönlichen Gespräche, die praktische Unterstützung und Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Ich danke zudem Frau Dr. Annika Sprüssel für die fachlichen und persönlichen Diskussionen und für ihre Unterstützung. Weiterhin möchte ich Frau Christiane Gorski und Frau Katja Pursche für die tatkräftige Unterstützung bei der Herstellung der zahlreichen Kryogewebeschnitte danken. Ich danke allen MitarbeiterInnen der Forschungsabteilung der Firma Indivumed GmbH für die nette Atmosphäre, ohne sie hätte die Arbeit sicher nicht so viel Spaß gemacht. Weiterhin möchte ich dem gesamten Routine- und Klinikteam der Firma Indivumed GmbH für die freundliche Zusammenarbeit danken.

Ich danke meiner Familie für die Unterstützung und Hilfe bei allen alltäglichen und nicht alltäglichen Problemen. Und ich danke allen, die an mich geglaubt haben.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst sowie keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hamburg, d. 26.05.2010

Anne-Kristin Fentz