

**Untersuchung der Eignung des
iTRAQ-basierten, proteomanalytischen
Quantifizierungsverfahrens zur Identifizierung
zellulärer Mechanismen des Einflusses von
Proteasominhibitoren auf die Metastasierung**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

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

von

Verena Richter

aus Nortorf

Hamburg, Januar 2014

Diese Arbeit wurde in der Zeit von August 2010 bis September 2013 am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Institut für Klinische Chemie, im Arbeitskreis Massenspektrometrische Proteomanalytik unter Anleitung von Prof. Dr. Hartmut Schlüter angefertigt. Die Arbeit wurde zudem von Prof. Dr. Dr. Christian Betzel vom Department Chemie der Universität Hamburg betreut.

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christian Betzel

Prof. Dr. Hartmut Schlüter

Tag der Disputation: 28. März 2014

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	7
1.1	Proteomanalytik	7
1.1.1	Massenspektrometrie-basierte Quantifizierungsmethoden.....	7
1.1.2	Quantifizierung mit iTRAQ	10
1.1.3	Bioinformatische Auswertung von proteomanalytischen Experimenten.....	14
1.2	Proteomanalytik für die Untersuchung von metastatischen Prozessen	14
1.3	Die Rolle von Endothelzellen bei der Metastasierung	16
1.4	Das Ubiquitin-Proteasom-System	17
1.5	Proteasominhibition	20
1.6	Zielsetzung	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Zellbiologische Methoden	23
2.1.1	Zelllinie	23
2.1.2	Zellkulturbedingungen	23
2.1.3	Zytotoxizitäts- und Proliferationstests	23
2.1.3.1	Bestimmung der Zellzahl	24
2.1.3.2	Ermittlung der Zellzahl für die Proliferationstests unter Bortezomib	24
2.1.3.3	Untersuchung der Proliferation von HPMECs unter Bortezomib	24
2.2	Identifizierung und Quantifizierung mit den 8-plex iTRAQ-Reagenzien	25
2.2.1	Übersicht	25
2.2.2	Inkubation der HPMECs in An- und Abwesenheit von Bortezomib und TNF- α	27
2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mit der BCA-Methode	28
2.2.4	Tryptische Proteolyse	28
2.2.5	Entsalzung mittels Festphasenextraktion.....	29
2.2.6	Markierung tryptischer Peptide mittels iTRAQ.....	30
2.2.7	Auftrennung iTRAQ-markierter, tryptischer Peptide durch isoelektrische Fokussierung.....	30

2.2.8	Auftrennung der iTRAQ-Proben über RP-UPLC mit anschließender online ESI-MS/MS-Analyse	31
2.2.9	Prozessierung der Rohdaten aus der LC ESI-MS/MS-Messung	33
2.2.10	Identifizierung und Quantifizierung der Daten aus der LC ESI-MS/MS-Analyse	33
2.2.11	Prozessierung der Daten aus dem LC ESI-MS/MS-Experiment in Mathematica	37
2.2.11.1	Filtern der Daten	37
2.2.11.2	Berechnen der Peptid-Ratios	37
2.2.11.3	Normalisieren der Daten	38
2.2.11.4	Berechnen der Protein-Ratios	39
2.2.11.5	Berechnen der gewichteten Standardabweichung	40
2.2.11.6	Zusammenstellen der Daten mit Mathematica	40
2.2.12	Analyse der iTRAQ-markierten tryptischen Peptide mittels LC MALDI-MS/MS	41
2.2.12.1	Auftrennung der iTRAQ-Proben mittels RP-HPLC mit anschließender MALDI MS/MS-Analyse	41
2.2.12.2	Prozessierung der Rohdaten aus der LC MALDI-MS/MS-Messung	43
2.2.12.3	Identifizierung und Quantifizierung der Daten aus der MALDI-MS/MS-Analyse	43
2.3	Analyse ubiquitinylierter Proteine in HPMECs nach Bortezomib-Behandlung	44
2.3.1	Inkubation der HPMECs mit Bortezomib	44
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Absorption bei 280 nm	44
2.3.3	Nachweis ubiquitinylierter Proteine mittels PAGE und Western-Blot	45
2.4	Material	46
2.4.1	Chemikalien	46
2.4.2	Biomaterialien	47
2.4.3	Geräte	48
2.4.4	Verbrauchsmaterialien	49
2.4.5	Software	50

3	Ergebnisse	51
3.1	Untersuchung der Wirkung von Bortezomib auf die Proliferation von HPMECs mit dem XTT-Reagenz.....	51
3.2	Auftrennung der iTRAQ-markierten Peptide mittels RP-Chromatographie.....	53
3.3	Datenprozessierung der iTRAQ-Daten aus der LC ESI-MS/MS-Analyse.....	55
3.3.1	Überprüfung der Datenprozessierung.....	57
3.3.1.1	Prozessierung der Rohspektren	57
3.3.1.2	Prozessierung mit dem iTRAQ-Analyzer.....	58
3.3.2	Prozessierung der Daten in Mathematica	62
3.4	Betrachtung der Effizienz der Markierung von tryptischen Peptiden mit den iTRAQ- Reagenzien	65
3.5	LC MALDI-MS/MS-Analyse der iTRAQ-markierten Peptide.....	67
3.6	Ergebnisse der Identifizierungs- und Quantifizierungs-Pipeline der LC ESI-MS/MS-Analyse	70
3.6.1	Klassifizierung der Proteine nach ihren Protein-Ratios	70
3.6.1.1	Einzelbetrachtung der Protein-Ratios	72
3.7	Identifizierte und quantifizierte Proteine der iTRAQ-Analyse.....	72
3.7.1	Vergleich der experimentellen Daten aus der iTRAQ-Analyse mit der Literatur	73
3.7.1.1	Proteine konstanter zellulärer Konzentration unter Bortezomib oder TNF- α	73
3.7.1.2	β -Tubulin	75
3.7.1.3	GAPDH.....	76
3.7.1.4	Hitzeschockproteine 90 kDa	77
3.7.2	Proteine mit veränderter Konzentration unter Bortezomib oder TNF- α	78
3.7.2.1	Hitzeschockproteine 70 kDa	78
3.7.2.2	Proteasom-Untereinheiten	80
3.7.2.3	Ubiquitin	83
3.7.3	Proteinkandidaten mit veränderter Konzentration unter Bortezomib oder TNF- α	85
3.7.3.1	Caveolin-1	85

3.7.3.2	Vimentin	86
3.7.3.2.1	Vergleich der ESI-basierten und MALDI-basierten massen- spektrometrischen Quantifizierung am Beispiel des Proteins Vimentin	87
3.7.3.3	Fibronectin.....	88
3.7.3.4	Cortactin	89
3.7.3.5	Rab7a.....	90
3.7.3.6	Wnt-6.....	90
3.8	Untersuchung ubiquitinylierter Proteine in HPMECs nach Bortezomib- Behandlung.....	91
4	Diskussion	93
5	Literaturverzeichnis.....	118
6	Anhang	140
6.1	Ergänzende Abbildungen und Tabellen.....	140
6.2	Gefahrstoffinformation.....	142
6.3	Abkürzungsverzeichnis.....	145
7	Zusammenfassung	149
8	Summary	150
	Curriculum Vitae	151
	Publikationen	152
	Eidesstattliche Erklärung.....	153
	Danksagung	154

1 Einleitung

1.1 Proteomanalytik

Das Hauptziel der Proteomanalytik ist die detaillierte Charakterisierung des Proteoms. Das Proteom ist definiert als das Proteinkomplement zum Genom und beschreibt die Zusammensetzung aller Proteinspezies eines Organismus zu einem definierten Zeitpunkt und einem definierten Ort [1, 2]. Proteomanalytische Methoden dienen der Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen und finden Anwendung bei vielfältigen biologischen Fragestellungen, zum Beispiel bei der Untersuchung der Struktur und Funktion von Proteinen. Für die Analyse komplexer Proteingemische konnte sich in den letzten Jahren die Massenspektrometrie (MS) in Kombination mit Flüssigkeitschromatographie (Liquid Chromatography; LC) als die Methode der Wahl etablieren [3, 4].

1.1.1 Massenspektrometrie-basierte Quantifizierungsmethoden

Um differentielle Unterschiede auf Proteinebene nachzuweisen, müssen identifizierte Proteine quantifiziert werden. MS-basierte Quantifizierungsmethoden basieren auf dem linearen Zusammenhang zwischen dem Signal eines Analyten und seiner molekularen Konzentration [5]. Diese Linearität gilt auch für die MS-basierte Analyse von Proteinen und Peptiden [6, 7].

Weit gängiger als die Quantifizierung intakter Proteine (Top-Down Ansatz) ist die Quantifizierung proteolytischer Peptide (Bottom-up Ansatz) [8]. Beim Bottom-up Ansatz werden die Proteine vor der massenspektrometrischen Messung mithilfe von Proteasen zu Peptiden verdaut und die Peptide werden stellvertretend für die Proteine mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) analysiert. Generell werden hierbei zwei Techniken unterschieden: die markierungsfreie Quantifizierung und die Quantifizierung mittels Markierung.

Die markierungsfreie Quantifizierung basiert auf der Proportionalität zwischen der Intensität beziehungsweise der Fläche des gemessenen Signals der intakten Vorläufer-Peptide oder zwischen der Anzahl aufgenommener MS-Spektren und der Proteinabundanz. Dabei werden zum Beispiel eine Probe und eine Referenz in zwei getrennten LC MS/MS-Läufen analysiert. Die Quantifizierung wird dann typischerweise anhand von extrahierten Ionenchromatogrammen (EIC) der intakten Vorläufer-Peptide durchgeführt, indem die Peakflächen der Signale im EIC von der Probe und der Referenz verglichen und in Relation zueinander gesetzt werden [9]. Aber auch eine Korrelation der

Anzahl an MS-Spektren pro Protein und dessen absoluter Menge ist möglich, denn je höher die Proteinkonzentration ist, desto mehr Spektren der dazugehörigen Peptide werden aufgenommen [10].

Eine neuere Methode der markierungsfreien LC MS-Quantifizierung ist die MS^E-Methode [11]. Durch den alternierenden Einsatz von niedriger und erhöhter Kollisionsenergie werden die Peptide aus einem komplexen Gemisch identifiziert und quantifiziert. Dabei werden in einem ersten Scan und niedrigem Energiemodus exakte Massen der Vorläufer-Peptide und deren Signalintensitäten bestimmt. Die relative Quantifizierung erfolgt dann durch den Vergleich der Signalintensitäten von identischen Vorläufer-Peptiden aus zwei oder mehreren Proben, die in getrennten LC MS-Messungen analysiert wurden. Die erhöhte Energie im MS/MS-Modus wird eingesetzt, um alle präsenten Vorläufer-Peptide gemeinsam zu fragmentieren. Das MS/MS-Spektrum der generierten Peptid-Fragmente liefert zusammen mit dem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z), ermittelt aus dem MS-Spektrum, die nötigen Informationen für die Identifizierung [11].

Bei der Quantifizierung mittels Markierung werden Proteine oder Peptide entweder durch chemische, enzymatische oder metabolische Methoden mit einer zusätzlichen Masse versehen. Die Erhöhung des Molekulargewichts erfolgt in der Regel durch schwere, nicht-radioaktive Isotope, zum Beispiel durch schwere Atome des Kohlenstoffs (¹³C), Wasserstoffs (²H), Stickstoffs (¹⁵N) oder Sauerstoffs (¹⁸O). Auf diese Weise können ansonsten identische Proteine oder Peptide, die in verschiedenen Proben vorliegen, mit unterschiedlichen Massen markiert und je nach eingesetzter Methode auf MS- oder MS/MS-Ebene voneinander unterschieden werden. Die zu untersuchenden Proben werden nach erfolgter Markierung zu einer Probe vereint und können dann im Gegensatz zu der markierungsfreien Quantifizierung simultan analysiert werden.

Bei der metabolischen Markierung erfolgt der Einbau schwerer Isotope in das Proteom von sich teilenden Zellen. Typischerweise wird die als Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC) bezeichnete Methode für proteomanalytische Experimente unter Verwendung von kultivierten Zellen eingesetzt. Zellen werden in Medium kultiviert, das Aminosäuren mit schweren Isotopen enthält, zum Beispiel ¹³C₆- L-Arginin. Das Markieren des Proteoms erfolgt dann durch den natürlichen metabolischen Umsatz der Zelle, während dem die zugesetzte schwere Aminosäure in das Proteom eingebaut wird [12]. Eine zweite Zellpopulation, die beispielsweise als Referenz dient, wird in Medium kultiviert, das Aminosäuren mit leichten Isotopen enthält, zum Beispiel ¹²C₆- L-Arginin. Nach der Ernte werden die Zellpopulationen vereint und in der Regel mittels Bottom-up Ansatz massenspektrometrisch analysiert. Die Erhöhung des Molekulargewichts führt dann zu einer Verschiebung des Signals im MS-Spektrum im Vergleich zu dem Signal eines

ansonsten identischen, unmarkierten Peptids, so dass das Signal des Peptids mit den schweren Aminosäuren und das Signal des Peptids mit den leichten Aminosäuren unterschieden und einer Probe eindeutig zugeordnet werden können [13]. Die Intensität beziehungsweise die Fläche des Signals des Vorläufer-Peptids im MS-Spektrum liefert die Information für die Quantifizierung, während die Information aus dem MS/MS-Spektrum für die Identifizierung benötigt wird.

Bei der enzymatischen Markierungsmethode werden Proteine durch enzymatische Proteolyse in ^{18}O -haltigem Wasser zu Peptiden gespalten. Während des Verdaus mit Serinproteasen wie Trypsin erfolgt dann die Inkorporation von zwei ^{18}O -Atomen am Carboxyl-Terminus jedes generierten Peptids, so dass eine Massenverschiebung im Massenspektrum beobachtet werden kann im Vergleich zu dem Peptid, das in ^{16}O -haltigem Wasser generiert wurde [14, 15]. Hier findet die Quantifizierung auch auf MS-Ebene statt, während die MS/MS-Spektren wichtige Informationen für die Identifizierung liefern.

Für die chemische Markierung von Peptiden steht eine Reihe von Techniken zur Verfügung. Die Isotope-Coded Affinity Tag (ICAT) Technologie ist der Prototyp der chemischen Modifizierung von Proteinen [16]. ICAT erlaubt den Vergleich von zwei Zuständen. Freie, oxidierte Cystein-Reste von Proteinen reagieren mit den ICAT-Reagenzien, Iodacetamid-Analoga mit neun ^{13}C -Atomen beziehungsweise ^{12}C -Atomen, so dass die Proteine markiert werden. Nach erfolgter Markierung werden die zwei Proben vereint und tryptisch verdaut. Da die ICAT-Reagenzien zusätzlich mit einem Biotin-Molekül ausgestattet sind, können die ICAT-markierten Peptide vor der massenspektrometrischen Messung über Avidin-Säulen chromatographisch aufgereinigt werden. Die Quantifizierung findet wie bei SILAC und der enzymatischen Markierungsmethode auf der MS-Ebene statt, indem die Signalintensitäten beziehungsweise die Peakflächen der Signale der Vorläufer-Peptide miteinander verglichen werden. Die Information für die Identifizierung ergibt sich wieder aus dem m/z -Verhältnis der Peptide, ermittelt im MS-Modus, und den Signalen der Peptid-Fragmente aus dem MS/MS-Spektrum.

Die Tandem Mass Tag (TMT) Reagenzien werden ebenfalls zur chemischen Markierung von Peptiden eingesetzt. Die TMT-Reagenzien bestehen aus drei Bausteinen: einem aminoreaktiven *N*-Hydroxysuccinimid-Ester, einer Gruppe mit der Funktion zum Ausgleich der Masse (Balancegruppe) und einer Reportergruppe. Die TMT-Reagenzien sind isobar, was bedeutet, dass sie alle dieselbe Gesamtmasse und chemische Struktur aufweisen, aber in der Anzahl und Kombination schwerer Isotope in der Reportergruppe und der Balancegruppe kovariieren. Durch die Variation der schweren und leichten Isotope ist eine massenspektrometrische Zuordnung der Reagenzien möglich. Die Markierung der Peptide erfolgt über die Reaktion des *N*-Hydroxysuccinimid-Esters eines TMT-Reagenzes mit einer

freien Aminogruppe eines Peptids. Die Peptide von jeder zu untersuchenden Probe werden mit einem anderen TMT-Reagenz markiert. Im Anschluss werden die markierten Peptidproben zu einer Probe vereint und mittels LC MS/MS-Messung analysiert. Durch die Fragmentierung der Peptid-Vorläufer im MS/MS-Modus werden die Reportergruppen der TMT-Reagenzien freigesetzt und erzeugen ein eigenes Signal im MS/MS-Spektrum. Mithilfe der Signalintensität des Signals der Reportergruppe wird die Quantifizierung durchgeführt [17]. Jedes Signal einer Reportergruppe kann einer Probe und damit einem Versuchsansatz eindeutig zugeordnet werden. Sowohl die Identifizierung als auch die Quantifizierung finden bei der TMT-Methode im MS/MS-Modus statt. Mit der neusten Weiterentwicklung der TMT-Markierungsstrategie können bis zu zehn Peptidproben parallel markiert und simultan analysiert werden [18, 19]. Eine den TMT-Reagenzien ähnliche Strategie wird mit den iTRAQ-Reagenzien (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) verfolgt, die in dem Kapitel 1.1.2 näher vorgestellt wird.

Die beschriebenen Verfahren werden in der Regel für eine semiquantitative Quantifizierung eingesetzt, indem identische Proteine aus unterschiedlichen Proben in Relation zueinander quantifiziert werden. Die absolute Proteinmenge bleibt dabei unbekannt. Für eine absolute Quantifizierung werden für MS-basierte Analysen Standardpeptide oder seltener Standardproteine verwendet. Als interne Standards werden vor allem synthetisch hergestellte, mit schweren Isotopen markierte Peptide verwendet. Ein synthetisches Peptid mit schweren Isotopen besitzt gleiche chemische und physikalische Eigenschaften wie sein Pendant des natürlich vorkommenden Peptids, wodurch die beiden sich im Hinblick auf die Retentionszeit, Ionisierungseffizienz und den Fragmentierungsmechanismus nicht unterscheiden [20].

1.1.2 Quantifizierung mit iTRAQ

Zu den chemischen Markierungsstrategien mit dem Ziel der Proteinquantifizierung gehört auch iTRAQ. Die iTRAQ-Reagenzien bestehen wie die TMT-Reagenzien aus einer Reportergruppe, einer Balancegruppe und einer aminoreaktiven Gruppe (Abbildung 1 A). Ein *N*-Hydroxysuccinimid-Ester als aminoreaktive Gruppe ist verantwortlich für die Kopplung über die Bildung einer Amid-Bindung an freie Aminogruppen der zu markierenden Peptide. Durch den Einsatz schwerer Kohlenstoff- und Stickstoffatome (^{13}C und ^{15}N) kovariiert die Reportergruppe in ihrer Masse mit der Balancegruppe. Mittels Integration der verschiedenen Isotope in die chemische Struktur unterscheiden sich die Reagenzien weder in der Masse noch der Struktur. Damit sind iTRAQ-Reagenzien wie die TMT-Reagenzien isobar (Abbildung 1). Das hat den Vorteil, dass alle iTRAQ-Reagenzien die gleichen chemischen Eigenschaften aufweisen, was zum Beispiel bei

chromatographischen Trennverfahren bedeutet, dass identische Peptide mit variierendem iTRAQ-Tag das gleiche Elutionsverhalten aufweisen, im MS-Modus das gleiche Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) besitzen und im MS/MS-Modus den gleichen Fragmentierungsmechanismen unterliegen.

Kommerziell erhältlich ist ein Kit mit 4-plex iTRAQ-Reagenzien und ein Kit mit 8-plex iTRAQ-Reagenzien, mit denen bis zu vier beziehungsweise acht Proben simultan identifiziert und quantifiziert werden können. Typische Einsatzgebiete sind zum Beispiel differentielle Untersuchungen von zeitlichen Verläufen, von Replikaten oder von behandelten und unbehandelten Proben. In dieser Arbeit wurden die 8-plex iTRAQ-Reagenzien eingesetzt, bei denen der m/z -Wert der Reportergruppe von 113 - 119 Da und 121 Da und der m/z -Wert der Balancegruppe von 192 - 186 Da und 184 Da kovariieren. Der isobare Tag aller iTRAQ-Reagenzien weist somit eine Gesamtmasse von 305 Da auf (siehe Abbildung 1 A).

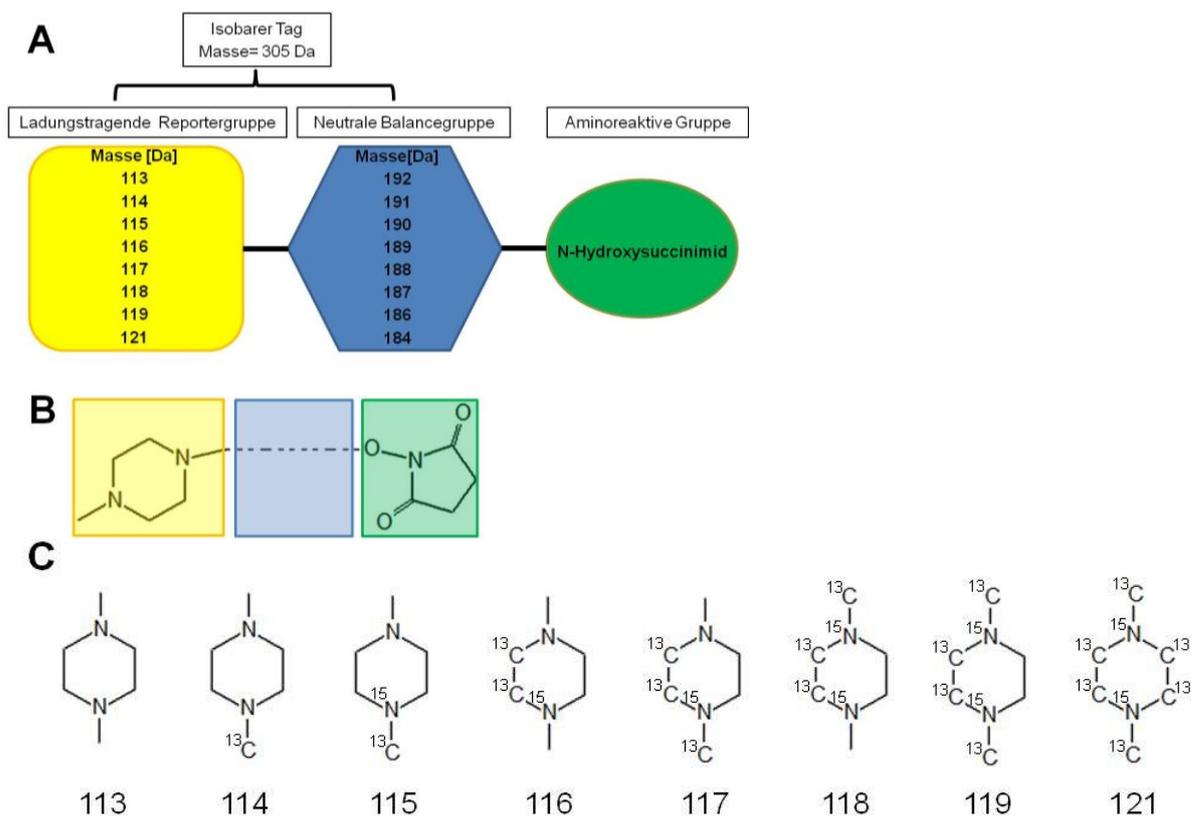


Abbildung 1: Schematische Darstellung der 8-plex iTRAQ-Reagenzien. [A] Ein iTRAQ-Reagenz besteht aus einer ladungstragenden Reportergruppe, einer neutralen Balancegruppe und einer aminoreaktiven Gruppe. Die Balancegruppe kovariiert in der Masse mit der Reportergruppe, so dass die iTRAQ-Reagenzien isobar sind. Modifiziert nach [21, 22]. [B] Die Struktur der iTRAQ-Reagenzien. Die Basis der Reportergruppe ist ein *N, N*-Dimethylpiperazin-Ring. Die Struktur der Balancegruppe wurde noch nicht publiziert und ist deshalb durch - - - angedeutet. Die aminoreaktive Gruppe besitzt einen *N*-Hydroxysuccinimid-Ester, der mit primären Aminogruppen reagiert. Modifiziert nach [23]. [C] Die Struktur der Reportergruppe. Durch den sequentiellen Einbau schwerer Isotopen entstehen die Reportergruppen 113 - 119 und 121 [24].

Einer der ersten Schritte bei der Durchführung eines Experimentes unter Verwendung von iTRAQ-Reagenzien beinhaltet den Verdau von Proteinen aus maximal acht Proben durch die Protease Trypsin, welche spezifisch C-terminal zu den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin schneidet. Anschließend werden die Proben mit den tryptischen Peptiden mit jeweils einem iTRAQ-Reagenz inkubiert, so dass die Markierung der Peptide erfolgt (siehe Abbildung 2).

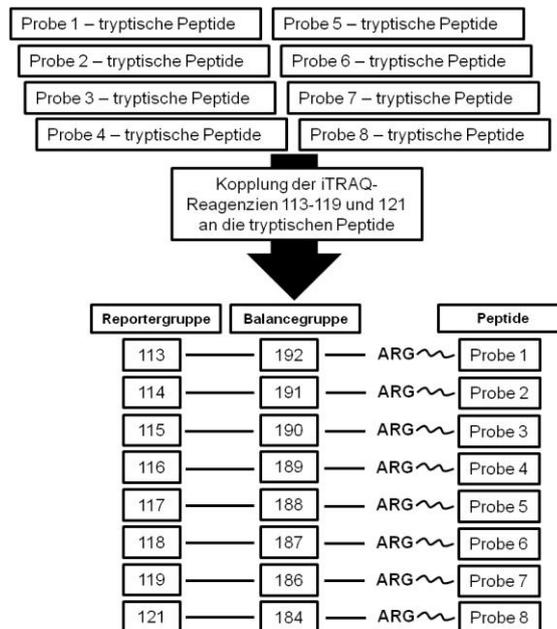


Abbildung 2: Schema der Markierung von tryptischen Peptiden mit den 8-plex-iTRAQ-Reagenzien. Jede der maximal acht Proteinproben wird zunächst tryptisch verdaut und anschließend mit einem iTRAQ-Reagenz inkubiert. Die Markierung der tryptischen Peptide erfolgt durch die Bindung der aminoreaktiven Gruppen (ARG) an freie Aminogruppen der Peptide. In Anlehnung an [25].

Nach erfolgter Markierung werden die einzelnen Proben zu einer einzigen Probe vereint. Die Probe wird je nach Komplexität vor der massenspektrometrischen Messung fraktioniert, zum Beispiel mittels chromatographischer Trennverfahren. Die aus verschiedenen Proben stammenden derivatisierten Peptide zeigen aufgrund der isobaren Zusammensetzung der Reagenzien ein identisches Elutionsverhalten, was die simultane Identifizierung und Quantifizierung ermöglicht. Identische Peptide, die lediglich mit unterschiedlichen iTRAQ-Reagenzien markiert sind, eluieren zur selben Zeit und weisen im MS-Modus den gleichen m/z -Wert auf. Im MS-Spektrum erzeugen diese Peptide deshalb nur ein Signal (siehe Abbildung 3 A). Im MS/MS-Modus werden die Peptide dann beispielsweise durch kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) fragmentiert. Die Fragmentierung mittels CID führt vorwiegend zu der Generierung von y - und b -Fragmentationenserien [26], anhand derer die Aminosäuresequenz im MS/MS-Spektrum abgelesen werden kann (siehe Abbildung 3 B). Die Detektion der Signale der

Peptidfragmente liefert dann zusammen mit dem m/z -Wert der Vorläuferpeptide die Information für die Identifizierung.

Die Bindung der Reportergruppe an die Balancegruppe ist labil, so dass die Reportergruppe während der Fragmentierungsreaktion abfliegt. An der Reportergruppe verbleibt eine Ladung, so dass dessen Signal im unteren Massenbereich ($m/z = 113 - 119$ und 121 Da) des MS/MS-Spektrums erfasst wird (siehe Abbildung 3 B und C). Die isolierte Balancegruppe hingegen liegt im MS/MS-Prozess im ungeladenen Zustand vor und entzieht sich damit als Neutralverlust der massenspektrometrischen Detektion. Die Intensitäten beziehungsweise die integrierten Flächen der Signale der Reportergruppe im MS/MS-Spektrum korrelieren mit der Peptid-Konzentration und erlauben so eine relative Quantifizierung der für die Fragmentierung ausgewählten Vorläuferpeptide [21].

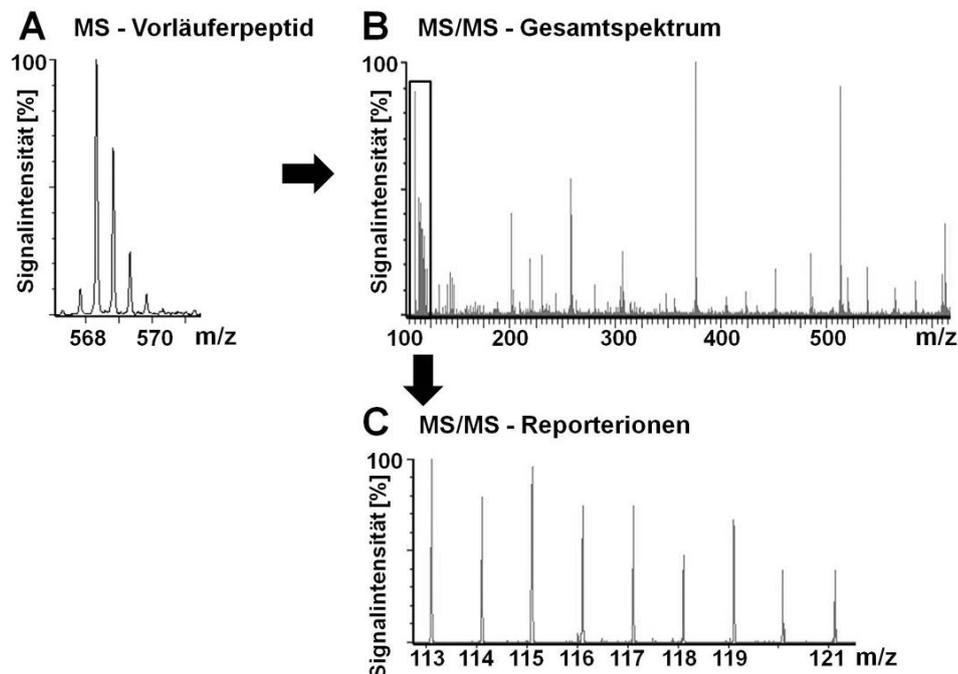


Abbildung 3: Beispiel für eine massenspektrometrische Analyse von iTRAQ-markierten Peptiden. [A] Im MS-Modus besitzen Peptide mit identischer Aminosäuresequenz und identischem Ladungszustand, aber unterschiedlicher iTRAQ-Markierung, den gleichen m/z -Wert, so dass diese alle zusammen ein Signal erzeugen. [B] Wird dieser m/z -Wert im MS/MS-Modus zur Fragmentierung ausgewählt, werden die Signale der Peptidfragmente, die eine Identifizierung ermöglichen, und die Signale der Reporterionen detektiert. [C] Mithilfe der Signale der Reporterionen $113 - 119$ und 121 wird die relative Quantifizierung durchgeführt, da die Signalintensität mit der Peptidabundanz korreliert.

1.1.3 Bioinformatische Auswertung von proteomanalytischen Experimenten

In MS-basierten, proteomanalytischen Experimenten werden in der Regel große Mengen an komplexen Daten generiert. Gerade bei der Kombination von Daten aus einer Identifizierung und Quantifizierung werden typischerweise mehrere Gigabytes an Daten generiert, zumal häufig nicht nur eine Probe, sondern mehrere Proben in einem Experiment analysiert und miteinander verglichen werden [27]. Differentielle Analysen von zwei oder mehr Proben dienen zum Beispiel dem Vergleich zwischen Proben von gesunden und kranken Probanden oder der Untersuchung von zeitlichen Verläufen. Die Auswertung solcher Daten stellt eine große Herausforderung dar und wäre ohne bioinformatische Hilfsmittel nicht möglich. Deshalb ist es essentiell, dass bei der Planung und Durchführung eines proteomanalytischen Experimentes neben der Probengenerierung, Probenvorbereitung und massenspektrometrischen Messung die anschließende bioinformatische Prozessierung und Interpretation der Daten berücksichtigt werden. Dabei bedeutet die Bewältigung der bioinformatischen Analyse eines der größten Hindernisse bei der Durchführung von proteomanalytischen Experimenten [28].

Mittlerweile stehen Anwendern im Proteomics-Bereich eine Reihe an kommerziell und frei erhältlichen Softwareprogrammen für die Datenprozessierung und -auswertung zur Verfügung. Viele der kommerziellen Programme sind anwenderfreundlich, jedoch sind sie für den Operator häufig wenig transparent, weil die Algorithmen und deren Quellcodes selten publiziert sind. Dadurch hat der Operator oft nicht die Möglichkeit, die Funktionsweise der einzelnen Prozessierungsschritte innerhalb der Auswertepipeline vollständig zu verstehen [29]. Frei erhältliche Software-Pakete im Proteomics-Bereich sind für jeden zugänglich und ermöglichen somit jedem die bioinformatische Auswertung komplexer Daten. Die Dateiformate sind üblicherweise allgemein verwendete Standardformate und die implementierten Algorithmen sind publiziert. OpenMS ist eine solche freie Software (Open-Source-Software), die einen flexiblen Rahmen für die Entwicklung und Integration von verschiedenen Softwares bietet, wie zum Beispiel The OpenMS Proteomics Pipeline (TOPP) für die Auswertung von LC MS-Experimenten [28, 30].

1.2 Proteomanalytik für die Untersuchung von metastatischen Prozessen

Genanalysen mit DNA-Microarrays ermöglichen den Vergleich der Expression tausender von Genen in einem Experiment, so dass eventuelle relative Veränderungen in Zellen von

Krebspatienten aufgedeckt werden können. Jedoch muss die Information, die auf Genebene ermittelt wurde, nicht zwangsläufig mit der tatsächlichen Situation auf Proteinebene übereinstimmen. Eine große Zahl an Proteinen geht aus einer kleineren Anzahl an Genen hervor, was durch RNA- und Protein-Prozessierung begründet ist. Um die tatsächliche Situation auf Proteinebene zu untersuchen, werden proteomanalytische Methoden eingesetzt, mit deren Hilfe ein globaler Blick auf Proteine möglich ist. Bei der Analyse des Proteoms wird die Proteinzusammensetzung eines Organismus untersucht. Da das Proteom im Gegensatz zum Genom orts- und zeitabhängig ist, muss bei proteomanalytischen Studien der biologische Hintergrund und damit verbunden posttranslationale Modifikationen (PTMs), die dreidimensionale Struktur oder Interaktionen mit anderen Makromolekülen berücksichtigt werden [2, 31].

Zwei Hauptziele werden bei der Untersuchung der Metastasierung mittels Proteomanalytik verfolgt. Zum einen sollen neue Biomarker identifiziert werden, mit deren Hilfe Tumorerkrankungen frühzeitig diagnostiziert und prognostiziert werden können. Zum anderen sollen Signalwege aufgedeckt werden, die bei der Metastasierung beteiligt sind. Involvierte Signalwege zu verstehen, ist ein Schlüssel bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien.

Metastasen sind für 90 % der krebsbedingten Todesursachen verantwortlich. Dennoch ist die Metastasierung einer der am wenigsten verstandenen Prozesse bei der Pathogenese von Krebs [32, 33]. Bei der Metastasierung kommt es ausgehend vom Primärtumor zur Dissemination einzelner Tumorzellen, die über Lymphbahnen oder Blutgefäße zu peripheren Geweben wandern und dort einen Sekundärtumor, eine Metastase, bilden.

Der Prozess der Metastasierung wird oft als Kaskade bezeichnet, da er ein Zusammenspiel mehrerer komplexer, sequentiell ablaufender Schritte ist (Abbildung 4). Zunächst bildet sich ein Primärtumor in der Regel aus einer einzelnen transformierten Tumorzelle. Der Primärtumor wächst durch verstärkte Proliferation und Angiogenese. Einzelne Tumorzellen lösen sich aus dem Zellverbund des Primärtumors, wandern in das umliegende Gewebe und dringen in Lymph- oder Blutgefäße ein (Intravasation). Dadurch gelangen Tumorzellen in periphere Organe, wo sie dann durch Adhäsion verweilen, die Lymph- oder Blutgefäße verlassen (Extravasation) und in das umliegende Gewebe dringen können. In der Peripherie muss eine Adaption an die neue Umgebung stattfinden, so dass die Tumorzellen proliferieren und eine Metastase bilden können [34].

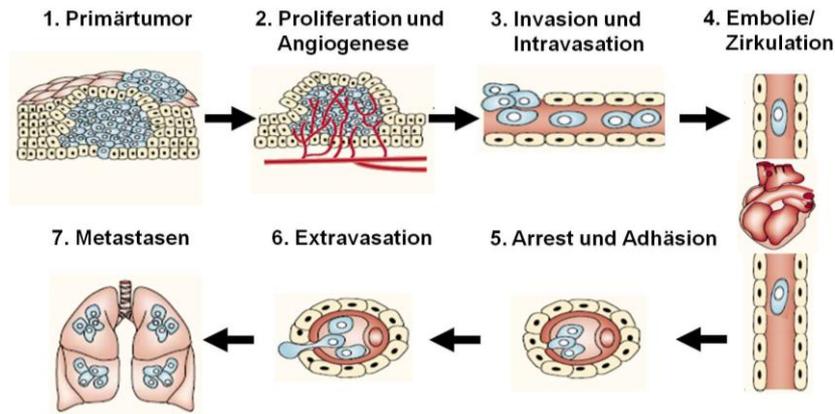


Abbildung 4: Hauptschritte der hämatogenen Metastasierung. 1. Transformierte Zellen wachsen zu einem Primärtumor heran. 2. Durch die Synthese und Sekretion von angiogenen Faktoren kommt es zum massiven Einwachsen von Blutgefäßen. 3. Einzelne Tumorzellen lösen sich aus dem Zellverband, wandern in Blutgefäße ein und gelangen so in den Blutkreislauf. 4. Im Blutstrom können Tumorzellen eine Embolie verursachen oder im Blut zirkulieren. 5. Tumorzellen, die im Blutstrom überleben, können durch Adhäsion an Endothelzellen im Kapillarbett eines entfernten Organs verweilen. 6. Tumorzellen haben die Fähigkeit, das Endothel zu durchdringen und in das umliegende Gewebe zu wandern. 7. Schaffen es die Tumorzellen an diesem Ort zu proliferieren, resultieren klinisch relevante Metastasen. Modifiziert nach [34].

Mittlerweile steht eine Vielzahl an proteomanalytischen Methoden zur Verfügung, die bereits für die Analyse der Tumorinvasion und Metastasierung eingesetzt worden sind [35]. Neben immunanalytischen und gel-basierten Methoden haben für die differentielle Untersuchung der Proteinzusammensetzung MS-basierte Methoden in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Die Massenspektrometrie gilt mittlerweile als Methode der Wahl für die Analyse komplexer Proteinproben [3, 4].

1.3 Die Rolle von Endothelzellen bei der Metastasierung

Nicht nur Tumorzellen sind an der Metastasierung beteiligt. Es bestehen auch kooperative Interaktionen mit anderen Zellen, wie Leukozyten, Makrophagen oder Endothelzellen [36]. Endothelzellen kleiden das Lumen von Gefäßen aus und trennen auf diese Weise das Blut und das umliegende Gewebe voneinander. Das intakte Endothel stellt eine wichtige semipermeable Barriere dar. Ein gezielter Transport von gelösten Stoffen vom Gewebe in das Blut und umgekehrt ist parazellulär oder transzellulär möglich [37]. Inflammatorische Stimuli, wie Zytokine oder Chemokine, bewirken eine erhöhte Permeabilität, so dass vermehrt Wasser und Proteine das Endothel uneingeschränkt passieren können [37]. Zytokine und Chemokine, die von den Tumorzellen selbst, aber auch von anderen Zellen des Tumormikromilieus sekretiert werden, schaffen eine für den Tumor günstige Umgebung und begünstigen auf diese Weise die Tumorprogression und Metastasierung

[38, 39]. Ein Beispiel ist das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), das über die Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen das Anheften von Tumorzellen an Endothelzellen fördern kann [39, 40]. Zudem erhöht TNF- α die Permeabilität von Endothelzellen, was mit einer gesteigerten transendothelialen Migration von Tumorzellen einhergeht [41, 42]. Obwohl die Signalwege von TNF- α komplex und nicht vollständig aufgeklärt sind, ist bekannt, dass die proinflammatorische Wirkung vor allem auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B) zurückzuführen ist [43].

Tumor-assoziierte Endothelzellen sind an diversen Prozessen der metastatischen Kaskade beteiligt [44]. Damit ein proliferierender Tumor mit ausreichenden Nährstoffen versorgt wird, müssen verstärkt Gefäße gebildet werden. Die Angiogenese läuft unter Beteiligung angrenzender Endothelzellen ab. Des Weiteren sind tumor-assoziierte Endothelzellen bei der Intravasation beteiligt. Neben tumor-assoziierten Endothelzellen sind Endothelzellen in der Peripherie in die Metastasierung involviert: Eine Tumorzelle hat die Zirkulation durch das Blutsystem unbeschadet überstanden. Bevor sie das periphere Gewebe erreichen kann, muss die Tumorzelle an umliegenden Endothelzellen adhären. Einer der nächsten Schritte der metastatischen Kaskade ist die Transmigration, bei der die Tumorzelle das Blutgefäß verlässt und durch die Basalmembran und das Endothel wandert (Extravasation) [45 - 47]. Für Zellen diverser Tumorarten ist beobachtet worden, dass sie das Endothel durchdringen können [48]. Es wird angenommen, dass das Endothel die Bildung von Metastasen aktiv regulieren kann, indem es die Adhäsion beziehungsweise Transmigration von Tumorzellen blockiert oder unterstützt [48 - 51]. Die genauen molekularen Mechanismen der transendothelialen Migration sind jedoch nur zum Teil bekannt und ein besseres Verständnis gerade der initialen Phasen der Metastasierung könnte helfen, neue Strategien im Kampf gegen Krebs zu entwickeln [42, 52].

1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist an vielen wichtigen zellulären Prozessen beteiligt. So spielt es zum Beispiel zusammen mit den Lysosomen eine zentrale Rolle im Abbau von intrazellulären Proteinen. Neben der Proteindegradation ist das UPS auch beteiligt an Vorgängen wie die Apoptose, Transkription, Zelladhäsion, Angiogenese, Antigenpräsentation und dem Zellzyklus [53].

Ubiquitin ist ein 8,5 kDa großes Protein, das aus 76 Aminosäuren besteht. Es ist ein ubiquitär vorkommendes, konserviertes Molekül. Die reversible Bindung von Ubiquitin an

Substratproteine ist eine bedeutende posttranslationale Modifikation (PTM) (siehe Review [54]). Die Verknüpfung von Ubiquitin an Substratproteine, die Ubiquitylierung, ist ein mehrstufiger Prozess, an dem ein System aus drei Enzymen beteiligt ist: E1, E2 und E3. Im ersten Schritt bindet ATP-abhängig das ubiquitin-aktivierende Enzym E1 sein Substrat Ubiquitin über die Bildung eines Thioesters aus dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und dem katalytischen Cystein des E1-Enzyms. Ebenfalls über einen Thioester wird Ubiquitin im zweiten Schritt an das konjugierende E2-Enzym gekoppelt. Im letzten Schritt bindet die Ligase E3 sowohl den E2-Ubiquitin-Komplex als auch das zu ubiquitylierende Substratprotein und transferiert Ubiquitin auf das Substratprotein, wobei eine Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und einer primären Aminogruppe des Substratproteins entsteht.

Die Ubiquitylierung ist reversibel und wird in einem dynamischen Prozess im Gleichgewicht gehalten, bei dem das Enzymsystem aus E1, E2 und E3 und die Familie der deubiquitylierenden Enzyme (DUBs) beteiligt sind. DUBs können basierend auf strukturellen und sequentiellen Ähnlichkeiten in sechs Klassen unterteilt werden, deren Aktivität bei drei Prozessen entscheidend ist: (1) der Dekonjugation von Ubiquitin-Molekülen, (2) der Prozessierung von Ubiquitin-Vorläufermolekülen und (3) der Neuordnung von Ubiquitin-Ketten, was die Bedeutung des Ubiquitin-Signals und damit den anschließenden biologischen Prozess verändern kann [55]. DUBs spalten sowohl die Isopeptidbindung zwischen zwei Ubiquitin-Molekülen als auch die Isopeptidbindung zwischen Ubiquitin und einem Substratprotein.

Bei der Modifikation eines Proteins durch Ubiquitin sind sowohl Mono-, Multi- als auch Polyubiquitylierungen möglich. Bei der Monoubiquitylierung wird ein einzelnes Ubiquitin-Molekül an einen Lysin-Rest eines Substratproteins gekoppelt. Werden einzelne Ubiquitin-Moleküle auf zwei oder mehrere Lysin-Reste eines Substratproteins übertragen, liegt eine Multi-Monoubiquitylierung vor. Eine Polyubiquitylierung beschreibt die Anheftung einer Kette aus zwei oder mehreren Ubiquitin-Molekülen an einen Lysin-Rest des Substratproteins. Je nach Ubiquitylierungsmuster und Art der Verknüpfung der Ubiquitin-Moleküle untereinander werden verschiedene Prozesse in der Zelle aktiviert beziehungsweise deaktiviert. Eine Monoubiquitylierung hat zum Beispiel eine regulatorische Funktion und ist an Prozessen wie DNA-Reparatur und Histon-Regulation beteiligt. Zusammen mit der Multi-Monoubiquitylierung kann die einfache Monoubiquitylierung ein Startsignal für die Endozytose und die Degradation von Proteinen durch Proteasomen oder Lysosomen darstellen [56 - 61].

Das in der Literatur am besten beschriebene Signal für den proteasomalen Abbau ist die Polyubiquitylierung eines Proteins an der ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Restes, bei der die Ubiquitin-Moleküle untereinander über ihren Lysin 48-Rest verbunden sind. Ist ein Protein

mit einer Polyubiquitin-Kette modifiziert, bei der die Ubiquitin-Moleküle über Lysin 48 verknüpft sind, wird es vom 26S Proteasom erkannt und anschließend abgebaut. Dies betrifft fehlerhafte Proteine, die durch Fehlfaltung oder durch Aggregation ihre funktionellen Eigenschaften verlieren oder sogar toxisch wirken können [54, 62].

Das 26S Proteasom ist ein circa 2,4 MDa großer Multi-Enzymkomplex, der im Zytoplasma und im Nukleus eukaryotischer Zellen lokalisiert ist. Das 26S Proteasom erkennt spezifisch ubiquitinylierte Proteine und ist zuständig für deren Abbau [63].

Unter ATP-Verbrauch lagern sich die zwei regulatorische 19S-Einheiten an eine 20S-Einheit, so dass das proteolytisch aktive 26S Proteasom entsteht (siehe Abbildung 5). Die 20S-Einheit ist aufgebaut aus jeweils zwei cyclischen α -Untereinheiten, die ober- und unterhalb von zwei identischen, aufeinanderliegenden β -Untereinheiten liegen. Die zwei α -Untereinheiten bilden zusammen mit zwei β -Untereinheiten einen röhrenartigen, zylinderförmigen Komplex mit einem Hohlraum in der Mitte. Die 19S-Einheiten sitzen wie Deckel jeweils unterhalb und oberhalb der 20S-Einheit.

An die 19S-Einheit werden Proteine gebunden, die durch eine Ubiquitinylierung für den proteasomalen Abbau markiert sind. Die 19S-Einheit bereitet gebundene Proteine für die Proteolyse vor, indem sie diese deubiquitinyliert und entfaltet [64]. Die α -Untereinheiten der 20S-Einheit bilden den Eingang in die Cavität und gewähren nur entfaltenen Proteinen Einlass. In der Cavität der β -Untereinheiten befindet sich die proteolytische Aktivität, die für den Abbau der Proteine nötig ist. Es sind drei enzymatische Aktivitäten des Proteasoms beschrieben: eine trypsin-ähnliche, eine chymotrypsin-ähnliche und eine peptidyl-glutamyl-peptid-ähnliche Domäne. In der Cavität werden Substratproteine proteolytisch zu Oligopeptiden zerlegt. Ubiquitin hingegen wird nicht abgebaut, sondern wird der Zelle für erneute Ubiquitinylierungen zur Verfügung gestellt. Dies geschieht durch DUBs an der 19S-Proteasomuntereinheit, die Ubiquitin-Moleküle von Substratproteinen trennen. Polyubiquitin-Ketten werden durch DUBs zu einzelnen Ubiquitin-Molekülen abgebaut, die von der Zelle ebenfalls für neue Ubiquitinylierungen genutzt werden können. Durch den Abbau von Proteinen nimmt das Proteasom eine wichtige Funktion bei zellulären Vorgängen ein [63].

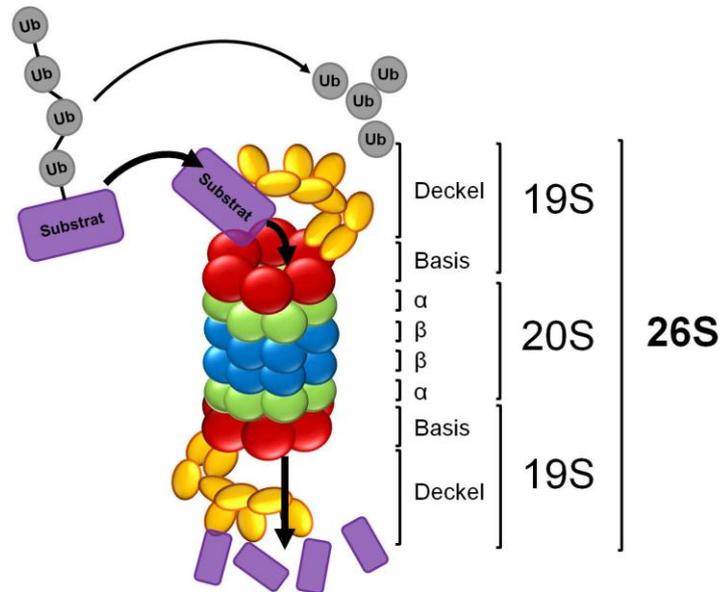


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Proteindegradation durch ein 26S Proteasom. Zwei 19S-Einheiten können jeweils unten und oben an die 20S-Einheit andocken, so dass das 26S Proteasom entsteht. Die regulatorische 19S-Einheit besteht aus einem Deckel- und Basis-Modul. Die α - und β -Untereinheiten der 20S-Einheit bilden zusammen einen röhrenförmigen Komplex. Die proteolytischen Aktivitäten besitzen die β 1-, β 2- und β 5-Untereinheiten. Substrate, die durch Ubiquitin (Ub) für die proteasomale Degradation markiert sind, docken an die 19S-Einheit und werden in die 20S-Einheit geleitet, wo sie proteolytisch abgebaut werden. Die Ubiquitin-Moleküle werden vorher durch DUBs der 19S-Einheit freigesetzt und stehen der Zelle wieder zur Verfügung. In Anlehnung an [65, 66].

1.5 Proteasominhibition

Der Proteasominhibitor Bortezomib ist ein borsäure-haltiges Dipeptid, das über eine stabile, aber reversible Bindung mit der Hydroxylgruppe des N-terminalen Threonin-Rests der chymotrypsin-ähnlichen Domäne des 20S-Proteasoms reagiert. Bortezomib inhibiert auf diese Weise vornehmlich die chymotrypsin-ähnliche Aktivität an der β 5-Untereinheit und zu einem geringeren Teil die trypsin-ähnliche Aktivität an der β 1-Untereinheit des 20S-Proteasoms [67].

Eine Inhibition des Proteasoms verhindert den Abbau von Proteinen und kann damit die Homöostase, Zellproliferation und wichtige Signalkaskaden, wie zum Beispiel die des Transkriptionsfaktors NF- κ B, beeinflussen [68]. Im Zytosol liegt NF- κ B inaktiviert im Komplex mit seinem Inhibitor I- κ B vor. Binden Zytokine wie TNF- α an ihre Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wird I- κ B zunächst phosphoryliert und dann ubiquitinyliert. Die Ubiquitinylierung markiert I- κ B für den Transport zum Proteasom, wo es schließlich abgebaut wird. NF- κ B liegt dann frei und somit aktiviert im Zytosol vor. Nach Aktivierung wandert NF- κ B in den Zellkern, wo es die Transkription aktiviert von zum Beispiel

Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Enzymen und anderen Regulatoren des Zellzyklus [69]. Eine Proteasominhibition verhindert die Aktivierung von NF- κ B [68].

Bortezomib, Handelsname Velcade[®], ist als erster Vertreter der Proteasominhibitoren, einer neuen Wirkstoffklasse, seit 2004 in Deutschland zur Behandlung des multiplen Myeloms (MM) zugelassen. Die Arzneimittelbehörde der USA, die Food and Drug Administration (FDA), erteilte 2006 zudem die Zulassung für Bortezomib zur Behandlung des Mantelzelllymphoms. Neben Bortezomib hat die FDA 2012 als zweiten Proteasominhibitor Carfilzomib zur Behandlung von Patienten mit rezidivem, refraktärem MM zugelassen [70]. Das MM ist eine maligne Erkrankung des B-Zell-Systems. Beim MM kommt es zu einer malignen Transformation von Plasmazellen, terminal differenzierte B-Lymphozyten. Die transformierten Plasmazellen akkumulieren im Knochenmark und produzieren dort verstärkt monoklonale Immunglobuline, wodurch Organ- und Gewebeschäden entstehen (siehe Review [71]).

Der Begriff Metastasierung wird hauptsächlich für die Ausbreitung invasiver solider Tumoren verwendet, weniger für hämatologische Tumoren wie das MM. Beim MM findet dennoch eine kontinuierliche Dissemination einzelner Tumorzellen vom Primärtumor im Knochenmark zu anderen Regionen im Knochenmark statt, die ähnlich der metastatischen Kaskade verläuft. MM-Zellen können sich auch in extramedullären Regionen ansiedeln, zum Beispiel in der Leber, im Darm oder der Lunge [72]. Das MM ist die zweithäufigste maligne, hämatologische Erkrankung und macht circa 1 % aller Tumorerkrankungen aus [73]. Jährlich erkranken in Deutschland etwa 3000 Männer und 2700 Frauen an einem MM [74]. Das MM wird als unheilbare Krankheit angesehen, deren heutige mediane Überlebensrate über fünf Jahre nach Diagnosestellung beträgt, was bedeutet, dass durch den Einsatz von Wirkstoffen wie Thalidomid, Lenalidomid oder Bortezomib und neuen Therapieschemata die mediane Überlebensrate in etwa verdoppelt werden konnte [75 - 77].

Bortezomib ist für eine Monotherapie oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen zugelassen [78]. Der Einsatz von Bortezomib bei bisher unbehandeltem MM verbesserte die Überlebensrate für Patienten signifikant im Vergleich zu Patienten, die eine Therapie ohne Bortezomib erhielten [75]. Eine 5-Jahres-Nachuntersuchung zeigte einen medianen Überlebensvorteil von 13,3 Monaten für Patienten, die mit Bortezomib in Ergänzung zu Melphalan und Prednison therapiert wurden im Vergleich zu Patienten, die eine Behandlung mit Melphalan und Prednison erhielten [79]. Die Kombination aus Melphalan, Prednison und Bortezomib hat sich in Europa als Standardmedikation für erwachsene Patienten mit MM etabliert [73].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Bortezomib neben dem MM [80] und Mantelzelllymphom [81] in vivo und in vitro eine Aktivität gegen zahlreiche maligne Tumore

aufweist, unter anderem dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, Eierstock-, Prostata- und Pankreaskrebs [82 - 86]. Valentiner *et al.* haben gezeigt, dass Bortezomib in einem Maus-Xenograft-Modell die Ausbreitung von Metastasen in die Lunge verhindert hat [87]. Auch in anderen Studien wurde demonstriert, dass Bortezomib die Metastasierung von Tumorzellen reduzieren kann [88, 89]. Die hierfür verantwortlichen zellulären Mechanismen sind nur teilweise erforscht. Weitere Erkenntnisse über zelluläre Mechanismen des Proteasominhibitors Bortezomib im Hinblick auf Tumorprogression und Metastasierung können dazu beitragen, die Indikation von Proteasominhibitoren zu erweitern und neue Therapiestrategien zu entwickeln.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob mittels eines semiquantitativen, proteomanalytischen Ansatzes unter Anwendung der iTRAQ-Technologie Hinweise auf zelluläre Mechanismen auf molekularer Ebene gesammelt werden können, welche bei der Behandlung mit Proteasominhibitoren eine Metastasierung verhindern. Als Modellsystem dienten kultivierte Endothelzellen, um die Proteinzusammensetzung nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α in An- oder Abwesenheit des Proteasominhibitors Bortezomib zu untersuchen. Endothelzellen wurden gewählt, weil diese während der Metastasierung eine wichtige Rolle spielen, zum Beispiel bei der Extravasation und Intravasation von Tumorzellen. Um die Veränderungen des Proteoms von Endothelzellen unter dem Einfluss des Proteasominhibitors erfassen zu können, sollte ein Protokoll für die Quantifizierung mit den 8-plex iTRAQ-Reagenzien etabliert werden, inklusive Probenvorbereitung, massenspektrometrischer Analyse, bioinformatischer Datenprozessierung und -auswertung. Für die bioinformatische Auswertung sollte unter Verwendung des OpenMS-Systems eine Identifizierungs- und Quantifizierungs-Pipeline entwickelt, getestet und optimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Zelllinie

Es wurden humane mikrovaskuläre Lungenendothelzellen (Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells; HPMECs) verwendet. HPMECs sind primäre, adhärenente Lungenendothelzellen, die von einem Spender gewonnen wurden.

2.1.2 Zellkulturbedingungen

HPMECs wurden in sterilen Zellkulturflaschen in Endothelial Cell Growth Medium MV kultiviert, das zusätzlich 10 % fetales Kälberserum (FCS), Supplement-Mischung, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthielt (vgl. Kapitel 2.4.2). Die Zellen wurden bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

Verbrauchtes Medium wurde bei Bedarf alle zwei bis vier Tage durch frisches Medium ersetzt. Bei Erreichen einer Konfluenz von 90 % wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen passagiert. Dazu wurde altes Medium abgesaugt und die Zellen mit phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (Phosphate-Buffered Saline; PBS) gewaschen. Anschließend wurden die adhärenenten Zellen durch den Zusatz von 0,05 % Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Das vollständige Ablösen der Zellen wurde unter einem Mikroskop kontrolliert. Durch Zugabe von frischem Medium wurde die Trypsinierung gestoppt. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 10 - 20 % in eine neue sterile Zellkulturflasche ausgesät und zusätzlich mit frischem Medium versorgt.

2.1.3 Zytotoxizitäts- und Proliferationstests

Die Zellproliferation und -viabilität in Anwesenheit des Proteasominhibitors Bortezomib wurden mittels eines kolorimetrischen Tests bestimmt. Hierfür wurde das Reagenz 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxid (XTT) verwendet. Da nur viable Zellen das XTT-Reagenz umsetzen, wird der Test auch zur Bestimmung der Toxizität von Substanzen herangezogen.

Der XTT-Test wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Eine detailliertere Beschreibung ist in den Kapiteln 2.1.3.2 und 2.1.3.3 aufgeführt.

2.1.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden zunächst durch Trypsinierung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von frischem Medium gestoppt. Die erhaltene Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rounds per minute; rpm) zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt, so dass eine für die Zellzählung geeignete Zellsuspension vorlag. Die Zellzahl wurde unter dem Mikroskop mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.1.3.2 Ermittlung der Zellzahl für die Proliferationstests unter Bortezomib

Zur Festlegung der Zellzahl, die sich für einen späteren Proliferationsversuch unter Zusatz von Bortezomib eignete, wurde im Vorfeld eine Proliferationskurve unter Verwendung verschiedener HPMEC-Verdünnungen erstellt. Während der Versuche galten die gleichen Bedingungen wie für den späteren Proliferationsversuch mit Bortezomib. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, wie in Kapitel 2.1.3.1 beschrieben, und es wurden Zellsuspensions-Verdünnungen hergestellt, die 750, 1953, 3906, 7813, 15625, 31250, 62500, 125000, 250000 und 500000 Zellen/ml enthielten. Je 90 µl der Zellsuspensions-Verdünnungen wurden in die Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte pipettiert. Die Zellen wurden 24 Stunden (h) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, so dass die Zellen am Boden der Mikrotiterplatte adhären konnten. Am nächsten Tag wurden 10 µl PBS zugegeben, was der Trägerlösung entsprach, in der Bortezomib gelöst worden war. Es folgte eine Inkubation für 24 h bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Danach wurden 50 µl XTT-Reagenz hinzugefügt. Nach 4 h bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ wurde der Farbumschlag photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm bestimmt. Für jede Zellsuspensions-Verdünnung wurden sechs parallele Ansätze durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1).

2.1.3.3 Untersuchung der Proliferation von HPMECs unter Bortezomib

Die Untersuchung der Proliferation von HPMECs unter Bortezomib wurde mit dem XTT-Reagenz durchgeführt. Zunächst wurde eine Suspension mit 31250 Zellen/ml hergestellt. Diese Anzahl wurde zuvor durch Erstellen einer Proliferationskurve unter Verwendung verschiedener HPMEC-Verdünnungen bestimmt (vgl. Kapitel 2.1.3.2 und 3.1). Je 90 µl der Zellsuspension wurden in die Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte gegeben und 24 h bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert, so dass die Zellen am Boden der Mikrotiterplatte adhären konnten. Anschließend erfolgte der Zusatz von 10 µl

PBS mit und ohne Zusatz von Bortezomib in den Verdünnungen 10^{-5} bis 10^2 μM . Die Bortezomib-Verdünnungen wurden dabei in Zehnerschritten eingesetzt. Die Zellen wurden 24 h bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 inkubiert. 50 μl vom XTT-Reagenz wurden zugefügt und nach 4 h bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 wurde der Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm photometrisch vermessen. Die Absorption der Zellen, die mit PBS statt mit Bortezomib behandelt worden waren, wurde gleich einer Viabilität von 100 % gesetzt. Die Absorption der mit Bortezomib behandelten Zellen wurde ins Verhältnis gesetzt. Es wurden fünf parallele Ansätze für jede Bortezomib-Verdünnung durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1).

2.2 Identifizierung und Quantifizierung mit den 8-plex iTRAQ-Reagenzien

2.2.1 Übersicht

Für die Untersuchung des Einflusses des Proteasominhibitors Bortezomib auf das Proteom der humanen Lungenendothelzelllinie HPMEC wurde ein semiquantitativer, proteomanalytischer Ansatz unter Verwendung der 8-plex iTRAQ-Reagenzien (iTRAQ® Reagenz 8-plex Kit) durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte des iTRAQ-Protokolls kurz vorgestellt. Eine detaillierte Beschreibung der Arbeitsschritte folgt in den Kapiteln 2.2.2 bis 2.2.12.

Die HPMECs wurden zunächst mit Bortezomib oder PBS (Kontrolllösung) behandelt. PBS wurde als Kontrolllösung gewählt, da Bortezomib und $\text{TNF-}\alpha$ in PBS gelöst vorlagen. Die Inkubation mit Bortezomib beziehungsweise PBS erfolgte über die Dauer von 1 h und 24 h. Anschließend erfolgten der Zusatz von $\text{TNF-}\alpha$ oder der Kontrolllösung PBS und eine weitere Inkubation für 4 h. Die Zellen aus den acht Ansätzen wurden geerntet, lysiert und die Konzentrationen der isolierten Proteine wurden mittels eines kolorimetrischen Tests bestimmt. Anschließend wurde ein tryptischer Verdau der acht Proteinlösungen durchgeführt, wobei diese jeweils die gleiche absolute Proteinmenge enthielten. Die tryptischen Peptide wurden einzeln mit den iTRAQ-Markierungsreagenzien 113 - 119 und 121, benannt nach den Massen der Reportergruppen, inkubiert. Anschließend wurden die acht Lösungen zu einer einzigen Probe vereint. Die vereinte Probe wurde anschließend mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) nach ihren isoelektrischen Punkten (pI) in 24 Fraktionen aufgetrennt. Eine Übersicht dieser ersten Arbeitsschritte ist in Abbildung 6 dargestellt.

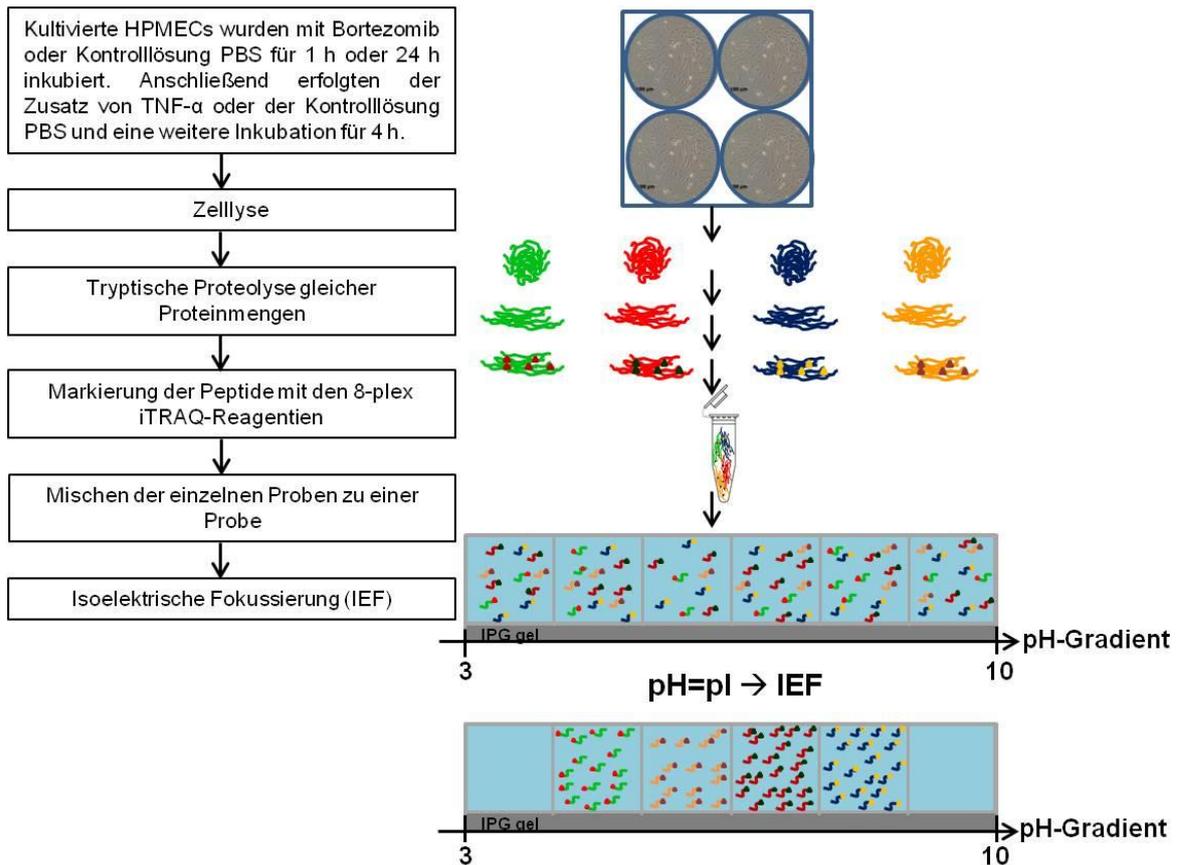


Abbildung 6: Schema der ersten Arbeitsschritte des iTRAQ-Protokolls dargestellt anhand von vier Proben. Die HPMECs wurden zunächst kultiviert und mit Bortezomib oder der Kontrolllösung PBS für 1 h oder 24 h behandelt. Danach erfolgten entweder der Zusatz von TNF- α oder der Kontrolllösung PBS und eine 4-stündige Inkubation. Die Zellen wurden daraufhin geerntet und lysiert. Die Proteinkonzentration in den Proben wurde bestimmt. Gleiche absolute Proteinmengen wurden mit dem Enzym Trypsin proteolytisch verdaut. Anschließend erfolgte die Markierung der Peptide durch Inkubation mit den iTRAQ-Reagenzien 113 - 119 und 121. Nach erfolgter Markierung wurden die einzelnen Proben zu einer Probe vereint. Die Peptide wurden daraufhin nach ihren isoelektrischen Punkten (pI) mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) fraktioniert.

Nach der IEF erfolgte eine zweite Trennung über eine Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (Reversed-Phase Liquid Chromatography; RP-LC). Direkt im Anschluss wurden die Proben massenspektrometrisch analysiert. Die generierten Daten wurden bioinformatisch prozessiert und anschließend ausgewertet. Eine Übersicht der Arbeitsschritte, die nach der IEF folgten, ist in Abbildung 7 dargestellt. Die in diesem Kapitel vorgestellten Schritte der iTRAQ-Methode werden in den Kapiteln 2.2.2 bis 2.2.12 näher beschrieben.

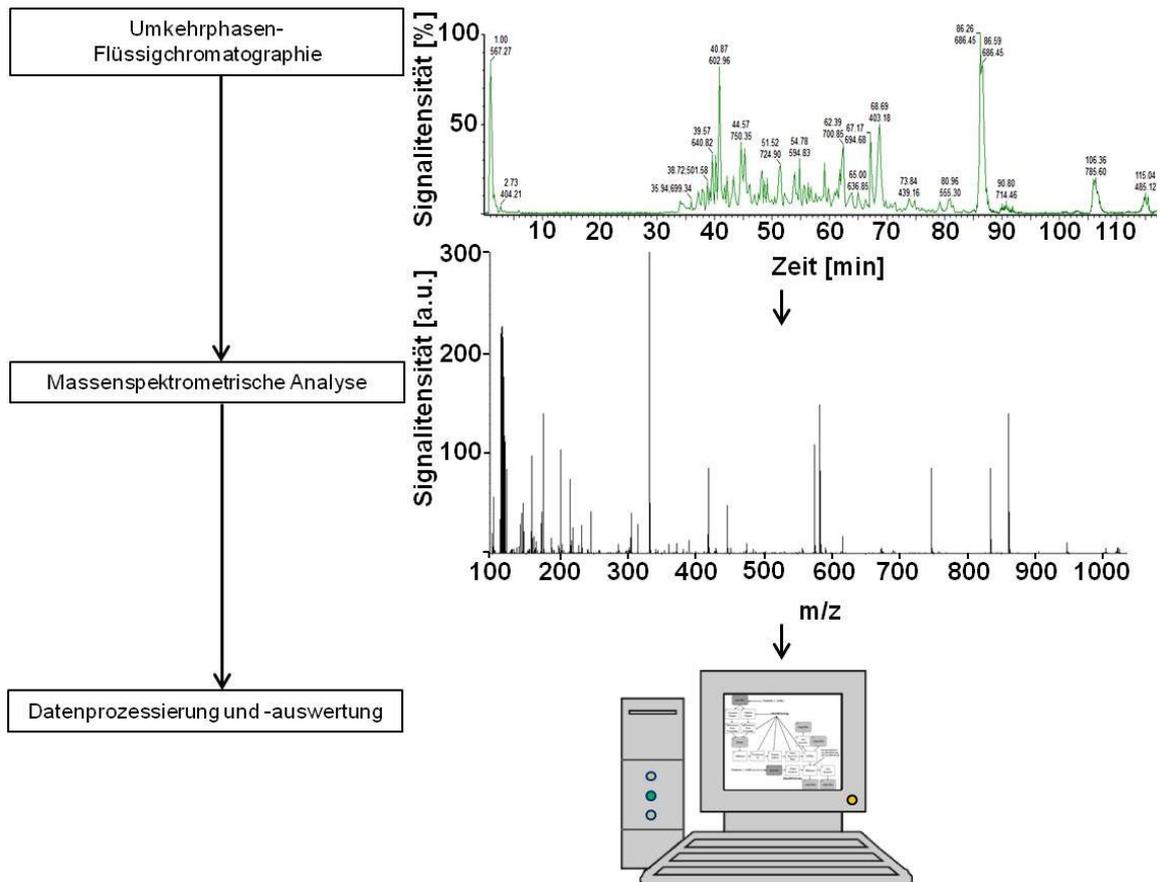


Abbildung 7: Schema der Arbeitsschritte nach der IEF. Die 24 Fraktionen aus der IEF wurden in der zweiten Dimension über eine Umkehrphasen-Flüssigchromatographie getrennt und online mittels ESI-MS/MS vermessen. Die generierten Daten wurden im Anschluss bioinformatisch prozessiert und ausgewertet.

2.2.2 Inkubation der HPMECs in An- und Abwesenheit von Bortezomib und TNF- α

HPMECs wurden in sterilen Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90 - 95 % kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde entfernt und durch jeweils auf 37 °C vorgewärmtes, frisches Medium ersetzt, das 20 nM Bortezomib oder das entsprechende Volumen PBS (Trägerlösung von Bortezomib) enthielt. Die Zellen wurden für 1 h oder 24 h bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ng/ml TNF- α stimuliert oder mit dem entsprechenden Volumen PBS (Trägerlösung von TNF- α) behandelt und für weitere 4 h bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert (siehe Abbildung 8). Das Medium wurde entfernt. Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem Zellsammelpuffer (0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 20 mM Natriumfluorid in PBS) versetzt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und in ein sauberes 25 ml Gefäß überführt. Mit einem Mikroskop wurde die vollständige Ablösung der Zellen

vom Flaschenboden kontrolliert. Die gesammelten Zellsuspensionen wurden bei 1500 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in Lysepuffer (0,96 M Triethylammonium Bicarbonat (TEAB), 0,05 % w/v Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate; SDS), 0,1 mM PMSF, 20 mM Natriumfluorid und Proteaseinhibitor-Mischung) resuspendiert. Die Zellen wurden in einem vierfachen Zyklus aus Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C lysiert. Danach wurden die Proben 30 Minuten bei 12500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend in ein 1,5 ml Gefäß überführt. Die Pellets wurden verworfen. Die gesammelten Überstände wurden bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der BCA-Methode

Die Bestimmung der Gesamtproteinmengen in den Proben erfolgte mit einem Bichinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit nach Anweisung des Herstellers. Zur Erstellung einer Kalibrierkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA)-Standards in den Konzentrationen 2000, 1500, 1000, 500, 250, 125, 25 und 0 µg/ml angefertigt. Die Proben wurden verdünnt (1:10 und 1:50) eingesetzt. Es wurden 25 µl sowohl der Standard- als auch der Probelösungen im Triplikat mit 200 µl Arbeitslösung (working reagent: 50 Teile BCA Protein Assay Reagent A plus 1 Teil BCA Protein Assay Reagent B) gemischt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt.

2.2.4 Tryptische Proteolyse

Für die tryptische Proteolyse wurde von jeder Probe ein Volumen eingesetzt, das 130 µg Protein entsprach. Es folgte der Zusatz von Harnstoff, so dass in jeder Probe eine finale Konzentration von 6 M Harnstoff vorlag. Die Disulfidbrücken der Proteine wurden durch 5 mM Tris-2-Carboxyethylphosphin-Hydrochlorid für 15 Minuten bei Raumtemperatur reduziert. Um eine irreversible Alkylierung der Cystein-Seitenketten zu erzielen, erfolgte der Zusatz von 10 mM Iodacetamid mit anschließender Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Zur Kontrolle, dass bis zu diesem Zeitpunkt noch keine unspezifische Degradation durch Proteasen oder Phosphatasen stattgefunden hatte, wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Hierzu wurden ein Criterion Precast Gel 12 % Bis-Tris-Gel und XT-MES Laufpuffer (2-Morpholinoethansulfonsäure, Natriumlaurylsulfat) verwendet. Es wurden jeweils 2 µl Probenlösung eingesetzt. Nachdem die Proben mit destilliertem Wasser auf das

einheitliche Volumen von 14 μl gebracht worden waren, erfolgte der Zusatz von 5 μl XT-Probenpuffer und 1 μl reduzierendem Agens. Die Proben wurden 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden anschließend auf das Gel aufgetragen und die Trennung der Proteine erfolgte mit einer konstanten Spannung von 200 V für 60 Minuten. Die Detektion erfolgte mittels Silberfärbung mit dem FireSilver Staining Kit nach Herstellerangaben. Es waren einzelne individuelle, von einander abgegrenzte Proteinbanden sichtbar, was zeigte, dass keine vorzeitige Proteolyse stattgefunden hatte und deshalb mit den Proben weitergearbeitet werden konnte.

Es folgte der tryptische Verdau der Proteine. Dafür wurden 100 μg Protein pro Probe eingesetzt. Die Proben wurden auf 5 mM TEAB eingestellt. Danach erfolgte der Zusatz von Trypsin im Verhältnis 1:100 zur Proteinmenge. Die Proben wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde erneut Trypsin zugesetzt, so dass das Verhältnis Trypsin zu Protein in der Probe 1:50 betrug. Die Proben wurden für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert.

Um die Vollständigkeit der tryptischen Proteolyse aller Proben zu kontrollieren, wurden jeweils 5 μl Probenlösung mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Probenvorbereitung, Trennung und Detektion erfolgte wie oben beschrieben. Da die Gelbahnen lediglich Schlieren ohne definierte Proteinbanden aufwiesen, wurde von einer vollständigen Proteolyse in den acht Proben ausgegangen.

2.2.5 Entsalzung mittels Festphasenextraktion

Probenvolumina kleiner gleich (\leq) 2 ml wurden über eine Festphasenextraktion basierend auf einem hydrophil-lipophilen, wasserbenetzbaren Kopolymer aus Divinylbenzol und *N*-Vinylpyrrolidol als stationäre Phase entsalzt (HLB Plus Short Kartuschen).

Die stationäre Phase wurde zunächst mit 3 ml 100 % Methanol konditioniert und anschließend mit 3 ml einer Mischung aus 5 % (v/v) Methanol und 0,2 % (v/v) Ameisensäure äquilibriert. Nach Probenauftrag erfolgten drei Waschschriffe mit jeweils 1 ml einer Mischung aus 5 % (v/v) Methanol und 0,2 % (v/v) Ameisensäure, um nichtbindende Substanzen zu entfernen. Die Elution erfolgte in zwei Stufen mit zunächst 1 ml 60 % und anschließend mit 1 ml 100 % Methanol. Die zwei Eluate wurden vereint und in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert.

2.2.6 Markierung tryptischer Peptide mittels iTRAQ

Die acht Proben wurden wie in Kapitel 2.2.5 entsalzt und lyophilisiert. Im Anschluss erfolgte die Markierung mit den 8-plex iTRAQ-Reagenzien nach Angaben des Herstellers. Der Ablauf der Markierungsreaktion ist im Folgenden kurz dargestellt.

Die Proben wurden jeweils in 30 µl 0,5 M TEAB-Puffer, pH 8,5, aufgenommen. Die acht iTRAQ-Reagenzien wurden in jeweils 50 µl Isopropanol gelöst und zu den Proben gegeben. Welches iTRAQ-Reagenz zu welcher Probe gegeben wurde, zeigt Abbildung 8. Der pH-Wert der Proben wurde mit pH-Indikatorpapier überprüft. Bei allen Proben lag der pH-Wert im geforderten Bereich zwischen 7,5 und 8,5, was für eine effektive Markierungsreaktion wichtig ist. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Im Anschluss wurden die acht Proben zu einer Probe vereint und gemischt.

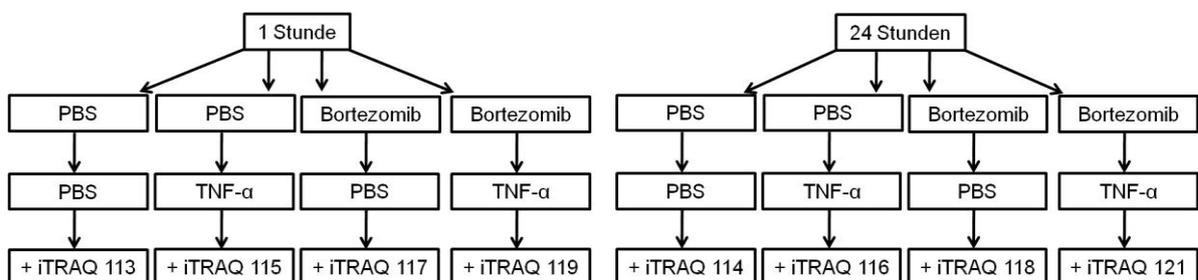


Abbildung 8: Schematische Übersicht der acht generierten Proben und deren Zuordnung zu den entsprechenden 8-plex iTRAQ-Reagenzien. Die zwei Zweige „1 Stunde“ und „24 Stunden“ ergeben sich durch die zwei gewählten Zeiträume, über die HPMECs mit Bortezomib beziehungsweise der Trägerlösung PBS als Kontrolle behandelt wurden. Im Anschluss wurden HPMECs mit TNF- α oder der Trägerlösung PBS als Kontrolle für 4 h behandelt. Nach der Zellernte, Lyse und der tryptischen Proteolyse wurden die Peptide aus einem Ansatz mit einem der acht iTRAQ-Reagenzien 113 - 119 und 121 markiert.

2.2.7 Auftrennung iTRAQ-markierter, tryptischer Peptide durch isoelektrische Fokussierung

Die iTRAQ-markierten Peptide wurden nach ihren isoelektrischen Punkten (pI) fraktioniert. Für die Trennung der iTRAQ-markierten Proben mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) wurde ein Aliquot der Probe eingesetzt, das einer ursprünglichen Proteinmenge von 500 µg entsprach. Die Probe wurde zunächst wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben entsalzt, lyophilisiert und dann in Probenauftragspuffer aus 3,3 % (v/v) Methanol und 0,17 % (v/v) IPG- (immobilisierter pH-Gradient) Puffer, pH 3 - 10, aufgenommen. Die 24 cm langen IPG-Gelstreifen mit einem linearen pH-Gradienten von 3 - 10 wurden mit Probenauftragspuffer aus 3,3 % (v/v) Methanol und 0,17 % (v/v) IPG-Puffer, pH 3 - 10, rehydriert. Die Probe wurde zu gleichen Volumina in jede der 24 Kammern eines Offgel-

Fraktionierers pipettiert. Bei einer Stromstärke von 50 μ A erfolgte die IEF, bis 50 Kilowattstunden erreicht waren, was einer Dauer von circa 24 h entsprach. Die 24 Fraktionen wurden aus den Kammern des Offgel-Fraktionierers pipettiert und in 24 Reaktionsgefäße überführt. Jede Kammer wurde mit einer Mischung aus 50 % (v/v) Methanol und 1 % (v/v) Ameisensäure gewaschen [90, 91]. Die Waschlösungen wurden zu der zuvor gesammelten Fraktion der korrespondierenden Kammer gegeben. Die Fraktionen wurden anschließend in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert.

2.2.8 Auftrennung der iTRAQ-Proben über RP-UPLC mit anschließender online ESI-MS/MS-Analyse

Nach der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurden die 24 lyophilisierten Proben in 30 μ l 0,1 % (v/v) Ameisensäure aufgenommen und auf einem Elektrospray-Ionisations-Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (ESI-Quadrupole Time Of Flight; ESI-QTOF) mit vorgeschalteter Umkehrphasenchromatographie (Reversed-Phase Chromatographie; RP-Chromatographie) unter Verwendung einer NanoAcquity Ultra-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (Ultra High-Performance Liquid Chromatography; UPLC) im positiven Ionenmodus gemessen.

Die Proben wurden mit einem Autosampler bei 98 % Lösungsmittel A (0,1 % (v/v) Ameisensäure in HPLC-Wasser) und 2 % Lösungsmittel B (0,1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril) in das UPLC-System injiziert. Die Peptide wurden zunächst 10 Minuten (min) auf einer Vorsäule (180 μ m x 20 μ m, Partikelgröße 5 μ m) bei einer Flussrate von 5 μ l/min gesammelt. Die Trennung erfolgte auf einer Trennsäule (100 μ m x 100 mm, Partikelgröße 1,7 μ m) bei einer Flussrate von 0,5 μ l/min. Beide Säulen waren mit C18-Material gefüllt. Die Temperatur der analytischen Säule betrug 45 °C. Es wurde der in Abbildung 9 dargestellte Gradient für die Elution verwendet.

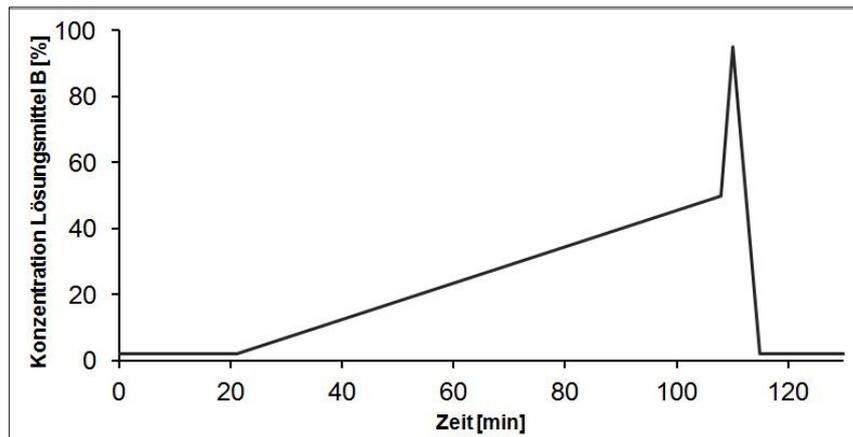


Abbildung 9: Gradient zur Elution der iTRAQ-markierten Peptide für die LC ESI-QTOF-Messung.

Zwischen Minute 0 und 21 wurde die Konzentration an Lösungsmittel B auf 2 % gehalten, um nichtbindende Moleküle zu entfernen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten aus steigender Konzentration an Lösungsmittel B. In den Minuten 21 bis 108 stieg die Konzentration an Lösungsmittel B linear von 2 % auf 50 % und von Minute 108 bis 110 auf 95 % Lösungsmittel B. Von Minute 110 bis 115 wurde die Konzentration auf die Ausgangskonzentration von 2 % Lösungsmittel B heruntergefahren und das System so bis Minute 130 äquilibriert.

Nach erfolgter Trennung wurde die Probe direkt über eine Fused-Silica-Kapillare in die Ionenquelle des Massenspektrometers überführt. Die angelegte Spannung an der Kapillare betrug 1900 V. Ein Stickstoff-Fluss von 450 l/h und eine Temperatur von 250 °C wurden angelegt, um die Moleküle zu desolvieren. Eine Kalibrierung wurde mit dem Referenzpeptid [Glu1]-Fibrino-peptid B *human-Peptid* (GluFib; Aminosäuresequenz EGVNDNEEGFFSAR) in einer Konzentration von 1 pmol durchgeführt. Die Messung des Glu-Fib-Peptids erfolgte alle 10 Sekunden auf MS/MS-Ebene. Die Scanzeit betrug 1 Sekunde. Die Kollisionsenergie für den Referenzkanal betrug 20 eV. Die Spannung am Konus betrug 40 V.

Die Messung erfolgte im datenabhängigen Aufnahmemodus (Data Dependent Acquisition; DDA). Im MS-Modus wurde zunächst ein Übersichtsscan im Bereich des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) 400 - 1500 Da durchgeführt. Im MS/MS-Modus wurde über einen m/z -Bereich von 100 - 1500 Da gescannt. Die folgenden Parameter gelten sowohl für den MS- als auch den MS/MS-Modus. Es wurde mit einer Scan-Zeit von 0,6 Sekunden und einer Inter-Scan-Zeit von 0,05 Sekunden gearbeitet. Nach 0,65 Sekunden wurde ein neuer Scan-Zyklus gestartet.

Es wurden drei Vorläuferionen zur Fragmentierung ausgewählt. Bevorzugte Ladungszustände waren hierbei zwei-, drei- und vierfach geladene Peptide. Waren Peptide bereits für die Fragmentierung ausgewählt worden, wurden anschließend deren m/z -Werte mit einer Toleranz von $\pm 1,5$ Da für 60 Sekunden vom Fragmentierungsprozess ausgeschlossen. Für die Fragmentierung wurde eine Kollisionsrampe von 20 bis 40 eV

verwendet. Nachdem die Signalintensität im MS/MS-Modus unter den Schwellenwert von 5,0 Counts gefallen war, wechselte das System zurück in den MS-Modus. Umgekehrt wechselte das System vom MS-Modus in den MS/MS-Modus, wenn die Signalintensität den Schwellenwert von 2,0 Counts pro Sekunde überstieg.

2.2.9 Prozessierung der Rohdaten aus der LC ESI-MS/MS-Messung

Rohdaten wurden mit der Software ProteinLynx Global Server Version 2.5.2 (PLGS) prozessiert. Die folgenden Angaben für die Datenprozessierung beziehen sich sowohl auf die MS- als auch die MS/MS-Ebene. Das Hintergrundrauschen wurde subtrahiert (Polynomische Funktion 5. Ordnung, 35 % unter der Kurve). Die Spektren wurden unter Verwendung des Savitzky-Golay Algorithmus geglättet (Glättungsnummer 2, Glättungsfenster 3) [92]. Im Anschluss wurden die Spektren zentriert (Berechnung des Schwerpunktes bei 80 % der Peakhöhe, minimale Peakbreite bei halber Peakhöhe mit vier Datenpunkten). Die Intensität des Peaks entsprach nach dem Zentrieren der Fläche unter dem geglätteten Peak. Für eine möglichst hohe Massengenauigkeit wurden die Spektren mithilfe der GluFib-Referenzspektren nachkalibriert. Für die Kalibrierung wurde das Vorläuferion-Signal bei 785,8427 Da $[M+2H]^{2+}$ sowie das Fragmentensignal (y_6) bei 684,3469 Da $[M+H]^{1+}$ verwendet. Für die Kalibrierung wurden drei Scans ($t= 10$ Sekunden) mit einer Toleranz von $\pm 0,1$ Da verwendet. Mit PLGS wurden Peaklisten im mzML-Dateiformat generiert und exportiert.

Diese in PLGS automatisch in einer Operation durchgeführten Prozessierungsschritte konnten einzeln mit der Software MassLynx nachgestellt werden, was bei der Kontrolle der Prozessierung der Rohspektren eingesetzt wurde (vgl. Kapitel 3.3.1.1).

2.2.10 Identifizierung und Quantifizierung der Daten aus der LC ESI-MS/MS-Analyse

Die Identifizierung und Quantifizierung der Daten aus der LC ESI-MS/MS-Analyse erfolgte mit dem Auswertungsprogramm OpenMS unter Verwendung von TOPP (The OpenMS Proteomics Pipeline) und dessen graphischer Benutzeroberfläche TOPPAS (The OpenMS Proteomics Pipeline ASsistant) [28, 30, 93]. Die Eingabedateien mit Peaklisten aus 24 LC ESI-QTOF-Messungen lagen im mzML-Format vor, die zuvor in PLGS generiert worden waren (vgl. Kapitel 2.2.9).

Die Identifizierung erfolgte mit den Suchmaschinen OMSSA [94] Version 2.1.7 und X!Tandem Version 2010.12.01.1 [95]. Als variable Modifizierungen wurde die

Carbamidomethylierung des Cysteins, die Oxidation des Methionins, eine Deamidierung am Glutamin und Asparagin sowie ein 8-plex iTRAQ-Label am Tyrosin berücksichtigt. Als fixe Modifizierungen wurde ein 8-plex iTRAQ-Label am Lysin sowie N-Terminus des Peptides berücksichtigt. Die Suche für die Identifizierung erfolgte gegen die humane Uniprot/Swissprot-Datenbank (Stand April 2012) mit einem q-Wert von 0,05. Für die identifizierten Peptide wurde ein Peptid-Score berechnet, der die Wahrscheinlichkeit der richtigen Identifizierung angibt. Der Score kann einen Zahlenwert von größer gleich (\geq) 0 betragen. Je kleiner der Score, desto wahrscheinlicher ist die richtige Identifizierung des Peptids.

Für die Quantifizierung wurde der iTRAQ-Analyzer Version 1.10.0 (Entwicklungsversion) eingesetzt, der die Auswertung des 8-plex iTRAQ-Ansatzes ermöglichte [93]. In Tabelle 1 sind die exakten Massen der Reporterionen aufgeführt, die mit einem Toleranzbereich von plus/minus (\pm) 0,014 Da vom iTRAQ-Analyzer berücksichtigt wurden. Das bedeutet zum Beispiel für das Reporterion 113, dass alle Signale, die in dem m/z-Bereich $113,1078 \pm 0,014$ Da des MS/MS-Spektrums detektiert wurden, als das vom Reporterion 113 stammende Signal gewertet und summiert wurden. Eine Berücksichtigung möglicher Verunreinigungen durch falsche Zusammensetzung der Isotopen in den iTRAQ-Reagenzien erfolgte durch Standard-Korrekturfaktoren, die vom Hersteller AB Sciex bereitgestellt wurden. Die 24 fertig prozessierten Dateien wurden von TOPP im kommagetrennten CSV-Format (Comma-Separated Values) ausgegeben. Abbildung 10 zeigt die Pipeline mit den einzelnen Tools, die für die Auswertung der iTRAQ-Daten aus dem LC ESI-MS/MS-Experiment konstruiert und getestet wurde. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Funktion der eingesetzten Tools.

Tabelle 1: Die exakten Massen der Reporterionen laut des Herstellers AB Sciex. Der iTRAQ-Analyzer sucht im MS/MS-Spektrum nach diesen Massen, wobei der Anwender einen Toleranzbereich für die Detektion definieren kann. Alle in diesem Toleranzbereich auftretenden Signale werden vom iTRAQ-Analyzer als Signale des jeweiligen Reporterions gewertet und summiert.

Im Text verwendeter Name des Reporterions (gerundeter Wert)	Exakte Masse des Reporterions [Da]
113	113,1078
114	114,1112
115	115,1082
116	116,1116
117	117,1149
118	118,1120
119	119,1153
121	121,1220

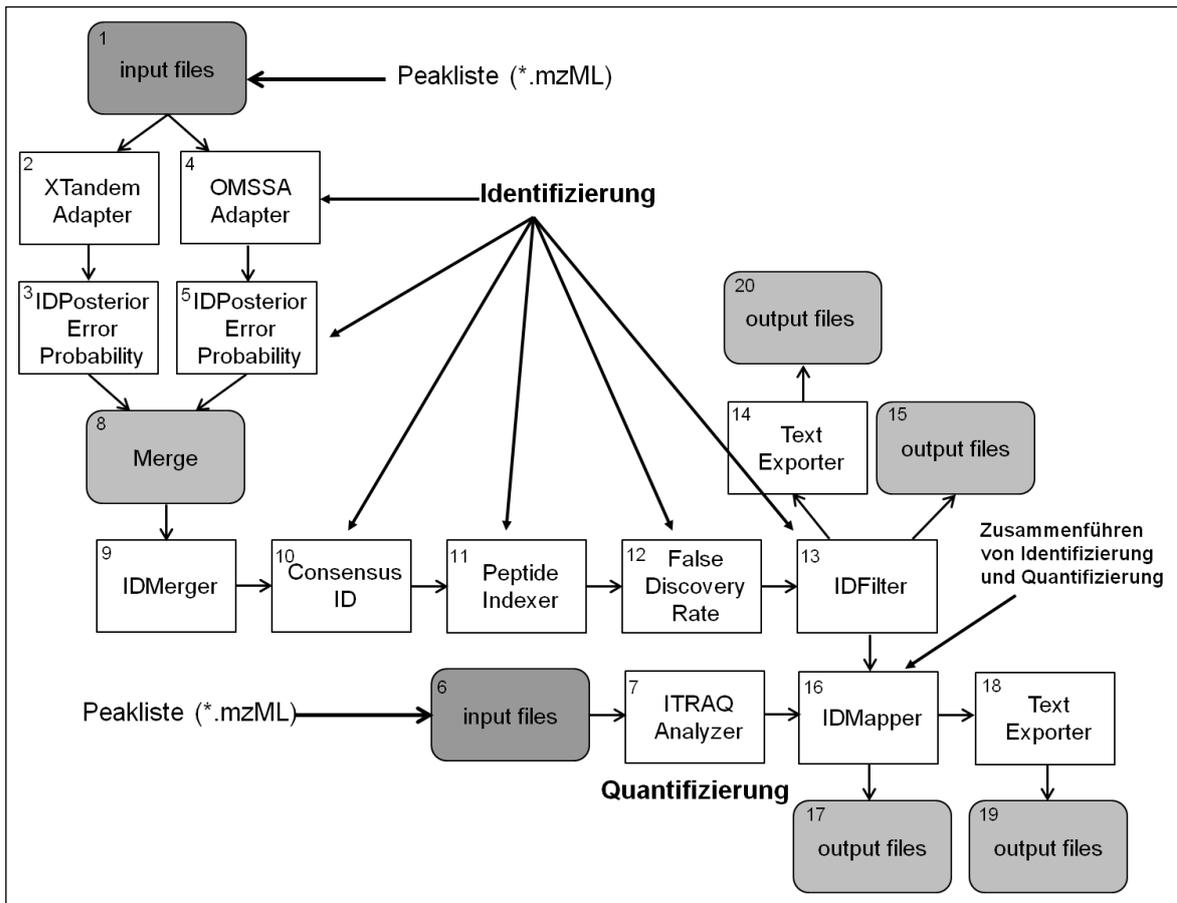


Abbildung 10: TOPP-Pipeline für die Identifizierung und Quantifizierung der iTRAQ-Daten aus den LC ESI-MS/MS-Messungen. Die mit PLGS generierten Peaklisten im mzML-Format wurden in die Identifizierungs- und Quantifizierungs-Pipeline geladen (input files). Die Dateien wurden im CSV-Format ausgegeben (output files). Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Tools.

Tabelle 2: Erklärung zu den Tools der TOPP-Pipeline. Für die Auswertung der iTRAQ-Daten aus den LC ESI-MS/MS-Messungen wurde eine Pipeline unter Verwendung der aufgeführten Tools entwickelt (vgl. Abbildung 10).

TOPP-Tool	Beschreibung nach [96]
Input File	Eingabe der Peaklisten im mzML-Dateiformat, die mit PLGS 2.5.2 generiert wurden.
XTandem Adapter	Identifizierung durch die externe Suchmaschine X!Tandem [95] gegen die humane Uniprot-Datenbank.
OMSSA Adapter	Identifizierung durch die externe Suchmaschine OMSSA [94] gegen die humane Uniprot-Datenbank.
ID Posterior Error Probability	Beurteilung der Wahrscheinlichkeit für eine falsche Peptidzuordnung mithilfe einer Mischverteilung.
Merge	Zusammenführen von zwei oder mehreren Prozessierpfaden.
ID Merger	Zusammenführen von mehreren Dateien aus der Peptid-beziehungsweise Proteinidentifizierung zu einer Datei.
Consensus ID	Berechnung einer Konsensus-Identifizierung aus den Peptididentifizierungen verschiedener Suchmaschinen (hier X!Tandem [95] und OMSSA [94]).
Peptide Indexer	Aktualisierung der Proteinreferenz für alle Peptide. Peptidsequenzen werden entweder einem Protein in der Zieldatenbank zugeordnet oder in einer Decoy-Datenbank oder beidem.
False Discovery Rate	Berechnung der False Discovery Rate (FDR) auf Peptid- und Proteinebene. Die False Discovery Rate ist definiert als Quotient aus Anzahl an falsch positiven Zuordnungen aus der Decoy-Datenbank und der Anzahl an richtig positiven plus falsch positiven Zuordnungen aus der realen Ziel- beziehungsweise der Decoy-Datenbank. Die Decoy-Datenbank besteht aus zufällig generierten oder umgedrehten Aminosäuresequenzen [97]. Die FDR ist somit ein Maß für falsch positive Treffer aus der realen Zieldatenbank. $FDR = \frac{n_{\text{falsch positive Zuordnungen}}}{(n_{\text{richtig positive Zuordnungen}} + n_{\text{falsch positive Zuordnungen}})}$
ID Filter	Filtern der Ergebnisse abhängig von den definierten Kriterien, zum Beispiel durch Vorgaben von Signifikanzgrenzen, berechneten Retentionszeiten oder Peptid- und Protein-Scores.
ID Mapper	Einteilung der Peptid- und Proteinidentifizierung in Feature- oder Konsensus-Feature. Auf diese Weise werden Informationen aus der Identifizierungs- und Quantifizierungs-Pipeline zusammengeführt. Die Zusammenführung basiert auf Retentionszeiten und m/z-Werten.
Text Exporter	Konvertieren der OpenMS XML-Formate (*.featureXML, *.consensusXML und *.ldXML) zu Textdateien.
iTRAQ-Analyzer	Extraktion und Normalisierung von iTRAQ-Daten.
Output Files	Ausgabe fertig prozessierter Dateien in verschiedenen Datei-Formaten, zum Beispiel *.csv, *.ldXML oder *.mzML

2.2.11 Prozessierung der Daten aus dem LC ESI-MS/MS-Experiment in Mathematica

Die 24 in TOPP generierten Dateien im kommagetrennten Textformat CSV wurden im nächsten Schritt mit einem hausintern geschriebenen Skript in Mathematica prozessiert [98].

2.2.11.1 Filtern der Daten

Zunächst wurden Filterkriterien definiert. Es wurden alle Peptide ausgeschlossen, deren Aminosäuresequenz aufgrund von Sequenzhomologien mehr als einem Protein in der Datenbank zugeordnet werden konnte (keine eindeutigen Peptide). Insgesamt gab es acht Versuchskanäle, benannt nach den Massen der iTRAQ-Reporterionen: 113 - 119 und 121 (vgl. Abbildung 11). Da in der Literatur für iTRAQ-Experimente beschrieben ist, dass Signale niedriger Intensität eine höhere Varianz aufweisen, wurden zusätzlich Signale von Peptiden mit einer Reporterionen-Signalintensität kleiner ($<$) 20 aussortiert und bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt [99 - 102].

2.2.11.2 Berechnen der Peptid-Ratios

In Mathematica wurden ebenfalls die Peptid-Ratios berechnet, die für die Quantifizierung benötigt wurden. Eine Ratio ist in diesem Experiment definiert als der Quotient aus der Signalintensität des Reporterion-Signals der behandelten Probe und der Signalintensität des Reporterion-Signals der jeweiligen Kontrolle. Mithilfe der Ratios waren Aussagen über Konzentrationänderungen in Bezug auf die Kontrolle möglich.

Der Kanal 113 repräsentierte die Kontrolle für die Inkubationszeit von 1 h. HPMECs wurden 1 h mit PBS, der Trägerlösung von Bortezomib, behandelt. Danach erfolgte erneut der Zusatz von PBS, der Trägerlösung von TNF- α , und es erfolgte eine 4-stündige Inkubation. Auf den Kanal 113 bezogen sich die Kanäle 115 (TNF- α -Stimulation), 117 (Bortezomib-Behandlung) und 119 (Bortezomib-Behandlung plus TNF- α -Stimulation).

Der Kanal 114 repräsentierte die Kontrolle für die Inkubationszeit von 24 h. HPMECs wurden zunächst 24 h mit PBS inkubiert. Danach erfolgten erneut der Zusatz von PBS und eine 4-stündige Inkubation. Auf den Kanal 114 bezogen sich die Kanäle 116 (TNF- α -Stimulation), 118 (Bortezomib-Behandlung) und 121 (Bortezomib-Behandlung plus TNF- α -Stimulation). Abbildung 11 zeigt die acht Kanäle aus dem Inkubationsversuch und die entsprechend berechneten Ratios.

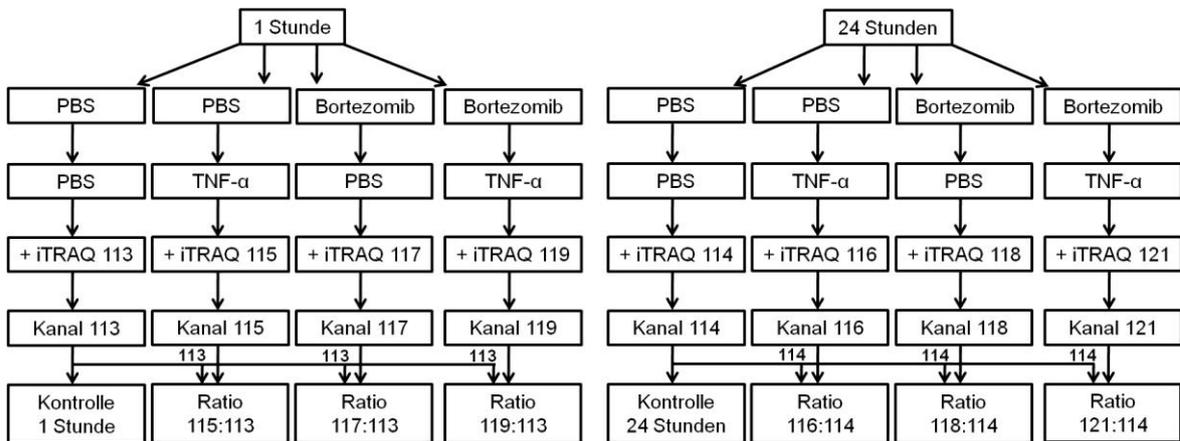


Abbildung 11: Schema der Ratio-Bildung für die relative Quantifizierung. Die zwei Zweige „1 Stunde“ und „24 Stunden“ ergeben sich durch die zwei gewählten Zeiträume, über die HPMECs mit Bortezomib beziehungsweise der Trägerlösung PBS als Kontrolle behandelt wurden. Im Anschluss wurden HPMECs mit TNF- α oder der Trägerlösung PBS (Kontrolle) für 4 h behandelt. Nach der tryptischen Proteolyse wurden die Peptide aus einem Ansatz mit einem der acht iTRAQ-Reagenzien 113 - 119 und 121 markiert und analysiert. Die Ratios ergeben sich aus dem Quotient der behandelten Proben 115, 117, 119 nach 1 h beziehungsweise 116, 118, 121 nach 24 h und den jeweiligen unbehandelten Kontrollen 113 nach 1 h beziehungsweise 114 nach 24 h.

2.2.11.3 Normalisieren der Daten

Die Peptid-Ratios wurden mittels Median-Korrektur normalisiert, um mögliche systematische Fehler auszugleichen. Tabelle 3 zeigt die berechneten Normalisierungsdivisoren, die für die Median-Normalisierung eingesetzt wurden. Alle Peptid-Ratios, die den zuvor beschriebenen Filterkriterien standhielten, wurden mithilfe dieser Divisoren normalisiert.

Tabelle 3: Normalisierungsdivisoren für die Korrektur der Peptid-Ratios. Für jede Ratio wurde der Median aller Werte bestimmt und dieser wurde als Normalisierungsdivisor für die Korrektur der einzelnen Peptid-Ratios verwendet.

Ratio	115:113	117:113	119:113	116:114	118:114	121:114
Normalisierungsdivisor	0,984	0,810	0,631	0,939	0,604	0,693

2.2.11.4 Berechnen der Protein-Ratios

iTRAQ-Experimente basieren auf einem Bottom-up Ansatz, bei dem die proteolytischen Peptide massenspektrometrisch analysiert werden. Das bedeutet, dass die Peptide stellvertretend für die Proteine identifiziert beziehungsweise quantifiziert werden. Im Anschluss werden die Peptid-Informationen auf die Proteinebene übertragen.

Für die Quantifizierung in diesem iTRAQ-Experiment wurden aus den Peptid-Ratios die Protein-Ratios wie folgt berechnet. Wurde ein Protein lediglich mit einem Peptid identifiziert, entsprach die Peptid-Ratio der Protein-Ratio. Wurde aber ein Protein mit mehr als einem Peptid identifiziert, musste aus den Peptid-Ratios die Protein-Ratio berechnet werden. Hierfür wurde der arithmetische Mittelwert bestimmt, der linear gewichtet wurde nach den Signalintensitäten der Reporterionen-Signale der betrachteten Kanäle. Das bedeutet, dass eine Peptid-Ratio, die aus zwei Reporterionen-Signalen hoher Signalintensität berechnet wurde, bei der Berechnung der Protein-Ratio stärker berücksichtigt wurde als eine Peptid-Ratio, die aus zwei Reporterionen-Signalen niedriger Signalintensität gebildet wurde. Die Berechnung der gewichteten Standardabweichung erfolgte anhand von Gleichung 1.

Gleichung 1: Formel zur Berechnung der gewichteten Protein-Ratios. Bei Zuordnung von mehr als einem Peptid pro Protein, wurde aus den Peptid-Ratios der arithmetische Mittelwert berechnet und linear mit dem Durchschnitt der Signalintensität der Reporterionen-Signale von den zwei entsprechenden Kanälen gewichtet.

$$\overline{ratio} = \frac{\sum_{i=1}^n (ratio_i \cdot (int_{i,1} + int_{i,2}))}{\sum (int_1 + int_2)}$$

Mit:

\overline{ratio} : gewichteter Mittelwert (entspricht der Protein-Ratio)

int_1 : Signalintensität des Reporterion-Signals aus dem ersten betrachteten Kanal (Zähler)

int_2 : Signalintensität des Reporterion-Signals aus dem zweiten betrachteten Kanal (Nenner)

$ratio$: Zahlenwert einer berücksichtigten Peptid-Ratio

2.2.11.5 Berechnen der gewichteten Standardabweichung

Um einen Überblick über das Maß der Streuung der Peptid-Ratios eines Proteins zu bekommen, wurde die gewichtete Standardabweichung mit Bessel-Korrektur berechnet für Proteine, die mit mehr als einem Peptid identifiziert wurden. Die Berechnung der gewichteten Standardabweichung wurde anhand von Gleichung 2 durchgeführt.

Gleichung 2: Formel zur Berechnung der gewichteten Standardabweichung. Bei Zuordnung von mehr als einem Peptid pro Protein, wurde aus den Peptid-Ratios die gewichtete Standardabweichung berechnet. Zum Korrigieren möglicher Verzerrungen wurde eine Bessel-Korrektur durchgeführt.

$$\sigma_{ratio} = \sqrt{\frac{n}{(n-1)} \cdot \frac{1}{\sum_{i=1}^n (int_{i,1} + int_{i,2})} \cdot \sum_{i=1}^n [(ratio_i - \overline{ratio})^2 \cdot (int_{i,1} + int_{i,2})]}$$

Mit:

σ_{ratio} : gewichtete Standardabweichung

$\frac{n}{(n-1)}$: Bessel-Korrektur mit n für die Anzahl an Gewichten

int_1 : Signalintensität des Reporterion-Signals aus dem ersten betrachteten Kanal (Zähler)

int_2 : Signalintensität des Reporterion-Signals aus dem zweiten betrachteten Kanal (Nenner)

$ratio$: Zahlenwert einer berücksichtigten Peptid-Ratio

\overline{ratio} : gewichteter Mittelwert der berücksichtigten Ratios (entspricht der Protein-Ratio)

2.2.11.6 Zusammenstellen der Daten mit Mathematica

Nach dem Filtern und Normalisieren der Daten wurden alle relevanten Informationen der 24 einzelnen Dateien aus der TOPP-Identifizierungs- und Quantifizierungs-Pipeline in einem Tabellenblatt zusammengefasst. Die so generierte Tabelle enthielt Informationen über alle identifizierten Proteine mit den dazugehörigen Peptiden: die Aminosäuresequenz, den Identifizierungsscore, die Retentionszeit, den m/z-Wert, den Ladungszustand (z) und Informationen, ob eine Peptidsequenz eindeutig einem einzigen Protein zugeordnet wurde (eindeutige Peptide). Des Weiteren war die Datenquelle der MS-Messung angegeben, so dass nachvollzogen werden konnte, in welcher Probe ein Peptid detektiert wurde und somit ein manueller Abgleich der Daten mit den korrespondierenden MS- oder MS/MS-Spektren möglich war.

2.2.12 Analyse der iTRAQ-markierten tryptischen Peptide mittels LC MALDI-MS/MS

Einige Fraktionen aus der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurden zusätzlich zur LC ESI-MS/MS-Messung mittels LC Matrix-assistierter Laser Desorption/Ionisation- (MALDI-) MS/MS analysiert. Ziel war die Validierung der Daten aus der LC ESI-MS/MS-Messung. Es wurden Fraktionen ausgewählt, in denen bereits mittels LC ESI-MS/MS mögliche Proteinkandidaten detektiert wurden, bei denen eine Konzentrationsänderung unter Bortezomib oder TNF- α beobachtet worden war.

2.2.12.1 Auftrennung der iTRAQ-Proben mittels RP-HPLC mit anschließender MALDI MS/MS-Analyse

Ausgewählte Fraktionen aus der isoelektrischen Fokussierung wurden in der zweiten Dimension mittels RP-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) aufgetrennt, auf einen MALDI-Probenteller aufgebracht und anschließend mit MALDI-MS/MS analysiert.

10 μ l der Probe, ein Aliquot der iTRAQ-markierten, tryptischen Peptide aus der IEF, wurden für die LC MALDI-Messungen eingesetzt (vgl. Kapitel 2.2.8). Das HPLC-System im RP-Modus war eine nanoHPLC-Anlage 1200 Series (Agilent Technologies). Als Vorsäule wurde eine Zorbax C18-Säule (0,3 x 5 mm, SB-C18, Partikelgröße 5 μ m) und als Trennsäule wurde ebenfalls eine Zorbax C18-Säule (0,1 x 155 mm, 300 SB-C18 USP L1, Partikelgröße 3,5 μ m) eingesetzt. Die Proben wurden mit einem Autosampler und einer Kapillarpumpe bei 98 % Lösungsmittel A (0,2 % (v/v) Ameisensäure in HPLC-Wasser) und 2 % Lösungsmittel B (100 % Acetonitril) in das HPLC-System injiziert und mit einer Flussrate von 3,5 μ l/min auf die Vorsäule aufgetragen. Die Zeit für den Probenauftrag und das Waschen bei 2 % Lösungsmittel B betrug 5 Minuten, so dass nichtbindende Moleküle entfernt wurden. Nach 5 Minuten wurde das Pumpenventil der HPLC umgeschaltet, so dass die Vorsäule mit der Trennsäule gekoppelt war und eluierende Moleküle auf die Trennsäule geleitet wurden. Die Elution erfolgte mit steigendem Acetonitril-Gehalt bei einer Flussrate von 0,3 μ l/min. Es wurde der in Abbildung 12 dargestellte Gradient für die Elution verwendet.

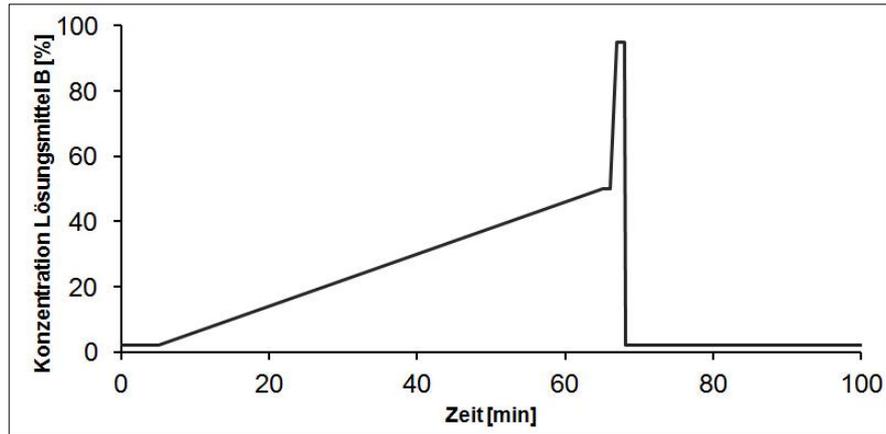


Abbildung 12: Gradient zur Elution der iTRAQ-markierten Peptide für die MALDI-MS/MS-Messung.

Zwischen Minute 0 und 5 wurde die Konzentration an Lösungsmittel B auf 2 % gehalten, um nichtbindende Moleküle zu entfernen. Der lineare Acetonitril-Gradient verlief von 2 % auf 50 % Lösungsmittel B von Minute 5 bis 65. Der Anteil an Lösungsmittel B wurde für 1 Minute auf 50 % gehalten, und von Minute 66 - 67 auf 95 % angehoben und von Minute 67 - 68 gehalten. Dann wurde das Lösungsmittel B auf die Ausgangskonzentration von 2 % gesenkt und bis Minute 100 gehalten.

Das HPLC-System war verbunden mit einem Dispensierroboter, der die Fraktionen der HPLC auf einen MALDI-Probenteller auftrug (MTP Anchor Chip 800/384). Der Dispensierroboter startete den Probenauftrag mit einer Verzögerungszeit von 20 Minuten. Die Verzögerungszeit berücksichtigte das Totvolumen des HPLC-Systems. Eine Fraktion wurde für 20 Sekunden gesammelt, wobei der Dispensierroboter pro Fraktion viermal alle 5 Sekunden einen Tropfen auf den MALDI-Probenteller gespottet hat. Die Fraktionen wurden mithilfe von 50 % (v/v) Acetonitril in HPLC-Wasser aus der Kapillare, die von der Trennsäule zum Dispensierroboter führte, auf den MALDI-Probenteller abgetropft. Nach erfolgtem Probenauftrag wurde die MALDI-Matrix HCCA (2 mg α -Cyano-4-hydroxycimtsäure in 0,2 % (v/v) Ameisensäure und 60 % (v/v) Acetonitril in HPLC-Wasser) mit dem Dispensierroboter auf die Probenspots aufgetragen. Ein MALDI-Peptidstandard (1:225 verdünnt in HCCA-Matrix) wurde im Anschluss mit dem Dispensierroboter auf die Kalibrantenspots auf den MALDI-Probenteller pipettiert.

Die Proben wurden mittels MALDI-Tandem-TOF-Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF-MS) analysiert. Gemessen wurde im positiven Ionenmodus. Die Laserintensität wurde in Abhängigkeit der Spektrenqualität individuell an die Probe angepasst und lag bei 42 - 46 %. Die Anzahl der Laserschüsse war minimiert auf 3000 Schüsse pro Spot. Der Messbereich umfasste einen m/z-Bereich von 900 - 3500 Da im MS-Modus. Die Software WarpLC 1.3 wurde für die Akquisition von Spektren und die automatische Selektion von Peptidsignalen für die anschließende MS/MS-Analyse verwendet. In WarpLC wurde eine Methode für ein stabiles Isotopen Label Experiment (SILE) aufgesetzt. Detektierte Signale im MS-Spektrum wurden als Hintergrundrauschen beziehungsweise als Störsignal von

Verunreinigungen gewertet, wenn diese in mehr als 70 % aller Spots detektiert wurden. Für die MS/MS-Messungen wurden ein Schwellenwert von 10 für das Signal-zu-Rauschen Verhältnis, ein Mindestabstand von 2 Da zu koelueierenden Massen von höherer Signalintensität und eine maximale Anzahl von 20 MS/MS-Spektren pro Fraktion gewählt. Die Informationen für die Auswertung der relativen Quantifizierung, das heißt, welche Massen zueinander in ein Verhältnis gesetzt werden sollten (Ratios: behandelte Probe bezogen auf Kontrolle), wurden in der WarpLC-Methode hinterlegt, so dass die Berechnung der Protein- und Peptid-Ratios automatisch von der Software durchgeführt werden konnte. Als Basis für die Quantifizierung wurden die Signalintensitäten der Reporterionen-Signale verwendet und eine Massentoleranz für die Detektion der Reporterionen-Signale von m/z 0,2 Da berücksichtigt.

2.2.12.2 Prozessierung der Rohdaten aus der LC MALDI-MS/MS-Messung

Die Prozessierung der Rohdaten und die Generierung der Peaklisten erfolgten über die Software flexAnalysis 3.3. Es wurde eine Basislinien-Korrektur mit einem Top Hat Filter durchgeführt. Die Peaks wurden mit dem Savitzky-Golay Algorithmus geglättet (Weite m/z 0,2 Da, Zyklen 1) [92]. Die Parameter für die Peakdetektion waren wie folgt: Snap-Algorithmus (Peak Picking), SNAP averagine (Generierung der monoisotopischen Massen), minimales Signal-zu-Rausch Verhältnis von 3, maximale Anzahl an Peaks 150, Schwellenwert des Qualitätsfaktors 30. Akquirierte MS- und MS/MS-Spektren sowie die generierten Peaklisten wurden automatisch von WarpLC in die Software ProteinScape 3.0 exportiert.

2.2.12.3 Identifizierung und Quantifizierung der Daten aus der MALDI MS/MS-Analyse

Die generierten Peaklisten wurden über die Suchmaschine Mascot Version 2.3.02 [103] gegen die humane Uniprot-Datenbank (Stand März 2013) abgeglichen. Folgende Parameter wurden bei der Suche genutzt: Trypsin als proteolytisches Enzym, Carbamidomethylierung, sowie ein 8-plex iTRAQ-Label am N-Terminus und an Lysin-Seitenketten als fixe Modifizierung; ein 8-plex iTRAQ-Label an der Aminosäure Tyrosin und Oxidation am Methionin als variable Modifizierung. Signale wurden mit einer Toleranz von 30 ppm auf der MS-Ebene und mit einer Toleranz von $\pm 0,5$ Da auf der MS/MS-Ebene gesucht. Des Weiteren wurde eine potentiell fehlende Trypsin-Spaltstelle toleriert.

2.3 Analyse ubiquitinylierter Proteine in HPMECs nach Bortezomib-Behandlung

2.3.1 Inkubation der HPMECs mit Bortezomib

HPMECs wurden unter den in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Bedingungen in sechs sterilen Zellkulturflächen kultiviert. Bei einer Konfluenz von 90 - 95 % wurde das Medium entfernt und mit vorgewärmtem, frischem Medium ersetzt, das 20 nM Bortezomib enthielt. HPMECs wurden 0, 1, 2, 6, 12 und 24 h bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst, in eiskaltem PBS-Puffer resuspendiert und in ein sauberes 25 ml Gefäß überführt. Die gesammelten Zellsuspensionen wurden 2 Minuten bei 4 °C und 1000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets wurden in Lysepuffer A (20 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 10 mM Kaliumchlorid, 10 % (v/v) Glycerol, 5 mg/ml N-Ethylmaleimid, 2 % (w/v) SDS, 0,1 mM PMSF, 50 mM Natriumfluorid) resuspendiert. Nach 10 Minuten auf Eis wurden die Zellsuspensionen 30 Minuten bei 4 °C und 7000 g zentrifugiert. Daraufhin wurden die Überstände in saubere 1,5 ml Gefäße überführt. Die Pellets wurden mit Lysepuffer B (20 mM HEPES, 10 mM Kaliumchlorid, 420 mM Natriumchlorid, 10 % (v/v) Glycerol, 5 mg/ml NEM, 2 % (w/v) SDS, 0,1 mM PMSF, 50 mM Natriumfluorid) resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden 30 Minuten auf Eis geschüttelt und anschließend für 30 Minuten bei 4 °C und 7000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden mit dem jeweiligen Überstand aus der Zelllyse mit Lysepuffer A vereint. Die Pellets wurden verworfen. Die Zelllysate wurden anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV-Absorption bei 280 nm

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben, die für den Western Blot eingesetzt wurden, erfolgte durch Messen der Absorption von ultraviolettem (UV) Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einem NanoDrop™ ND-1000 Photometer. Die Probe wurde für die Messung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Jede Verdünnung wurde im Duplikat hergestellt und die Messung erfolgte im Triplikat.

2.3.3 Nachweis ubiquitinylierter Proteine mittels PAGE und Western-Blot

Es wurden 40 µg Protein pro Probe auf ein 10 % Bis-Tris-Gel aufgetragen. Die Probenvorbereitung erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Als Laufpuffer wurde ein XT-MES Puffer (2-Morpholinoethansulfonsäure, Natriumlaurylsulfat) verwendet. Die Trennung der Proteine erfolgte mit einer konstanten Spannung von 200 V für 60 Minuten.

Nach der Auftrennung mittels PAGE wurden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF) Membran geblotet. Die Membran wurde zunächst in Methanol aktiviert und anschließend wie das Gel in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3) äquilibriert. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte in Transferpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA für 100 Minuten. Nach dem Transfer wurden die freien Bindungsstellen der Membranoberfläche durch eine Inkubation über Nacht mit einer 2 % (w/v) BSA-Lösung in TBS mit 0,1% (w/v) Tween 20 (TBS-T) blockiert. Es folgte ein Zyklus aus dreimaligem Waschen mit TBS-T für je 10 Minuten.

Die PVDF-Membran wurde für den getrennten Nachweis von ubiquitinylierten Proteinen und β -Actin zerschnitten. Der Membranabschnitt mit Proteinen mit einem Molekulargewicht von 35 - 47 kDa wurden für den Nachweis der Ladekontrolle β -Actin eingesetzt. Die zwei anderen Membranabschnitte mit Proteinen mit einem Molekulargewicht von 5 - 37 kDa und 47 - 280 kDa wurden für den Nachweis von ubiquitinylierten Proteinen verwendet. Jeder Membranabschnitt wurde 4 h bei 4 °C mit dem jeweiligen Erstantikörper verdünnt in TBS-T inkubiert (siehe Tabelle 4). Die Membran wurde im Anschluss dreimal mit TBS-T für je 10 Minuten gewaschen. Daraufhin wurde jeder Membranabschnitt separat 2 h bei Raumtemperatur mit dem passenden Zweitantikörper verdünnt in TBS-T inkubiert (siehe Tabelle 4). Es folgte erneut ein Zyklus aus dreimaligem Waschen mit TBS-T. Die Antikörperbindung wurde über eine Farbreaktion mit dem Alkaline Phosphate Conjugate Substrate Kit nach Angaben des Herstellers detektiert.

Tabelle 4: Übersicht der für die Western-Blot-Analysen eingesetzten Antikörperverdünnungen.

Antigen des Erstantikörpers	Verdünnung des Erstantikörpers	Zweitantikörper	Verdünnung des Zweitantikörpers
Mono- und polyubiquitinylierte Proteine	1:1000	Anti-Maus IgG	1:2000
β -Actin	1:1000	Anti-Kaninchen IgG	1:10000

2.4 Material

2.4.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ameisensäure	Fluka (Steinheim, Deutschland)
Ammoniumhydroxid	Fluka (Steinheim, Deutschland)
AP Conjugate Substrate Kit	Biorad (Hercules, USA)
α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Dithiothreitol	Sigma (Steinheim Deutschland)
D-PBS	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
Glycerol	Sigma (Steinheim Deutschland)
Harnstoff	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	Sigma (Steinheim Deutschland)
HPLC-Wasser	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Iodacetamid	Sigma (Steinheim Deutschland)
IPG-Puffer	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
iTRAQ® Reagenz 8-plex Kit	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumfluorid	Sigma (Steinheim Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
N-Ethylmaleimid	SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Rehyrierungs- und Probenpuffer für Offgel-Fraktionierung	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
SDS	Biorad (Hercules, USA)
Silberfärbung FireSilver Staining Kit	Proteome Factory (Berlin, Deutschland)
TEAB-Lösung 1 M	Fluka (Steinheim, Deutschland)
Trypsin-Resuspensionspuffer	Promega (Madison, USA)
Velcade® Bortezomib 3,5 mg	Geschenk von Prof. Schumacher; Hersteller: Janssen-Cilag (Neuss, Deutschland)

Chemikalie	Hersteller
Western Blot Transfer Puffer	Biorad (Hercules, USA)
XT MES Laufpuffer 20x	Biorad (Hercules, USA)
XT Probenpuffer 4x	Biorad (Hercules, USA)
XT reduzierendes Agens 20x	Biorad (Hercules, USA)
Zellkulturmedium für mikrovaskuläre Endothelzellen MV	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)

2.4.2 Biomaterialien

Material	Hersteller
0,05% Trypsin-EDTA 1x	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
Antikörper FK2 gegen mono- und polyubiquitinylierte Proteine aus der Maus	Enzo Life Sciences GmbH (Lörrach, Deutschland)
AP-konjugierter Antikörper gegen Kaninchen aus Ziege ab6722	Abcam (Cambridge, UK)
AP-konjugierter Antikörper gegen Maus aus Ziege ADI-SAB-101-J	Enzo Life Sciences GmbH (Lörrach, Deutschland)
β -Actin-Antikörper 13E5 aus Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvars, USA)
BSA-Standard Stammlösung 2 mg/ml	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
FCS, inaktiviert durch Hitze	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
GluFib-Standard	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Lungenendothelzellen HPMEC	Promocell (Heidelberg, Deutschland)
MALDI-Peptidstandard	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin liquid	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
Proteaseinhibitor Mischung (Protease Inhibitor Mix M) bestehend aus AEBSF, Aprotinin, Bestatin, E-64, Leupeptin und Pepstatin A	SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Proteinmarker für SDS-PAGE (Kaleidoscope Prestained Standard)	Biorad (Hercules, USA)

Material	Hersteller
Supplement-Mischung nach Zugabe zum Medium bestehend aus:	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)
- 0,05 ml/ml fetalem Kälberserum	
- 0,004 ml/ml Wachstumszusatz für Endothelzellen	
- 10 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor	
- 90 µg/ml Heparin	
- 1 µg/ml Hydrocortison	
TNF-α	PeptoTech (Rocky Hill, USA)
Trypsin	Promega (Madison, USA)

2.4.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Eppendorf-Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kühlzentrifuge Universal 3212	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Laufkammer SDS-PAGE Criterion Gelsystem	Biorad (Hercules, USA)
MALDI Dispensierroboter	M2 Automation (Berlin, Deutschland)
MALDI-Probenteller MTP Anchor Chip 800/384	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer Ultraflextreme	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Minishaker MS 1	IKA®-Werke (Staufen, Deutschland)
MTP Anchor Chip 800/384,	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
NanoAcquity UHPLC	Waters (Manchester, UK)
NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Neubauer Zählkammer	Superior (Marienfeld, Deutschland)
Offgel-Fraktionierer 3100	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
Photometer Mikrotiterplatten-Lesegerät Max 002 (eingesetzt für XTT-Tests)	Dynex Technologies (Denkendorf, Deutschland)
Photometer Mikrotiterplattenlesegerät Genios (eingesetzt für BCA-Test)	Tecan (Männedorf, Schweiz)
QTOF-Massenspektrometer Premier, Micromass	Waters (Manchester, UK)
Spannungsquelle für Gelelektrophoresen	Biorad (Hercules, USA)

Gerät	Hersteller
Vakuumentrifuge mit Kühlfalle RCF 10 Wasserbad GFL	Thermo Scientific (Waltham, USA) Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)
Western Blot Kammer Criterion Blotter Zellkulturschränke HeraCell	Biorad (Hercules, USA) Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)

2.4.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
96er Mikrotiterplatten	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
C18-Säulen (ESI-Messung)	Waters (Manchester, UK)
Criterion Precast XT Bis-Tris Gele	Biorad (Hercules, USA)
Fused-Silica-Kapillare PicoTip Emitter	New Objective (Woburn, USA)
IPG-Strip pH 3-10	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
Oasis HLB Plus Short Kartuschen	Waters (Eschborn, Deutschland)
pH-Indikatorpapier pH 1-14	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
PVDF-Membran	Biorad (Hercules, USA)
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Sarstedt (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)
Reaktionsgefäße safe lock 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Spritzen 1 ml und 3 ml	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
sterile Pipettenspitzen 5 ml, 10 ml, 25 ml	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
Zellkulturflaschen 75 und 175 cm ²	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
Zellschaber	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
Zorbax C18-Säulen (MALDI-Messung)	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)

2.4.5 Software

Software	Hersteller
Flex Control 3.3	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
flexAnalysis 3.3	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
GraphPad Prism 4	GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA)
iTwo start	M2 Automation (Berlin, Deutschland)
Mascot In-house Server Version 2.3.02	Matrix Science (Boston, USA) [103]
MassLynx Version 4.1	Waters (Manchester, UK)
Microsoft Office Professional Edition 2007	Microsoft (USA)
	Die statistische Auswertung für den Vergleich von zwei Versuchsansätzen wurde mit einem zweiseitigen T-Test in Excel durchgeführt. Bei normierten Werten wurde von einer Normalverteilung ausgegangen. Der p-Wert für statistische Signifikanz war 0,05.
nanoHPLC: MassHunter Aquisition (Version B.02.01)	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Open Mass Spectrometry Search Algorithm OMSSA (Version 2.1.7)	entwickelt am NCBI [94]
Open MS Version 1.10 (Entwicklungsversion) mit TOPP und TOPPAS	Open-Source-Software - Internetseite des Projektes: http://open-ms.sourceforge.net/ [28,30]
ProteinLynx Global Server (PLGS) Version 2.5.2 und 2.3	Waters (Manchester, UK)
ProteinScape 3.0	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
Uniprot/Swissprot Datenbank	Uniprot Consortium [104,105]
WarpLC 1.3	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)
Mathematica Version 8.0.4.0.	Wolfram Research, Inc. (Champaign, USA) [98]
X!Tandem (Version 2010.12.01.1)	The Global Proteome Machine Organization [95]

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Wirkung von Bortezomib auf die Proliferation von HPMECs mit dem XTT-Reagenz

Bevor die Inkubation mit Bortezomib für die proteomanalytischen Experimente erfolgen konnte, musste eine adäquate Dosis Bortezomib gefunden werden. Die Dosis sollte so gewählt werden, dass ein Effekt auf HPMECs sichtbar war, die Viabilität unter Bortezomib aber nur bedingt eingeschränkt war. Die Dosisfindung erfolgte mit dem XTT-Reagenz.

Nur viable Zellen können das Tetrazoliumsalz XTT durch enzymatische Spaltung umsetzen. Durch den mitochondrialen Stoffwechsel aktiver Zellen findet eine Reduktion von dem gelben XTT-Salz zu dem orangefarbenen, wasserlöslichen Formazan-Salz statt [106]. Die Änderung der Absorption des Lichts bei einer Wellenlänge von 490 nm wird photometrisch gemessen und korreliert mit der Zellzahl und der Aktivität der Zellen [107]. Viele aktive Zellen setzen viel XTT-Reagenz zum orangefarbenen Formazan-Salz um, so dass in Anwesenheit vieler proliferierender Zellen im Gegensatz zu der Anwesenheit wenig proliferierender Zellen eine höhere Absorption gemessen wird.

Der XTT-Test wird für Zytotoxizitätstests in Zellkulturen eingesetzt und dient der Dosisfindung von Substanzen, mit denen die Zellen behandelt wurden. Die Zellen werden mit steigenden Konzentrationen der Substanz für den gewünschten Zeitraum inkubiert. Anschließend wird das XTT-Reagenz hinzugefügt und es erfolgt eine 4-stündige Inkubation, so dass viable Zellen das XTT-Reagenz metabolisch umsetzen können. Mit der Information über die Absorption können im Anschluss Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt werden.

Zunächst musste die optimale Anzahl an HPMECs bestimmt werden, die für den Proliferationstest unter steigenden Bortezomib-Konzentrationen geeignet war. Dafür wurden die Zellen in unterschiedlicher Dichte in einer 96er Mikrotiterplatte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h mit PBS, der Trägerlösung von Bortezomib, inkubiert. Die Inkubationsdauer von 24 h entsprach der maximalen Inkubationszeit des proteomanalytischen Versuchs unter Verwendung der iTRAQ-Reagenzien. Nach Zusatz des XTT-Reagenzes erfolgten eine 4-stündige Inkubation und die photometrische Bestimmung der Absorption. Abbildung 13 zeigt die Kurve zur Bestimmung der Zellzahl, für die die gemessene Absorption gegen die eingesetzte Zellzahl aufgetragen wurde. Die Zellzahl für den anschließenden Proliferationsversuch mit steigenden Bortezomib-Konzentrationen wurde so gewählt, dass sich die Zellen bei ungehindertem,

exponentiellem Wachstum befanden. Es wurde mit 32500 Zellen pro ml ein mittlerer Wert des exponentiellen Bereiches gewählt (siehe Abbildung 13).

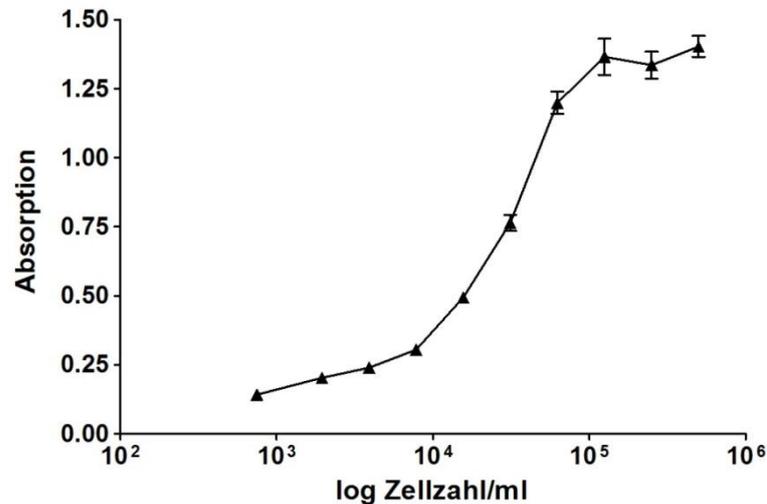


Abbildung 13: Kurve zur Bestimmung der Zellzahl. HPMECs wurden in unterschiedlicher Zellzahl in einer 96er Mikrotiterplatte ausgesät. Nachdem die Zellen adhärent waren, wurden sie 24 h mit der Kontrolllösung PBS, der Trägerlösung von Bortezomib, inkubiert. Gemessen wurde die Änderung der Absorption 4 h nach Zugabe des XTT-Reagenzes. Die abgebildeten Werte beinhalten die Standardabweichung von sechs unabhängigen Messungen.

Für die Bestimmung einer geeigneten Bortezomib-Dosis wurden HPMECs 24 h mit unterschiedlichen Bortezomib-Verdünnungen inkubiert. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mittels XTT-Reagenz. Die gemessene Absorption der Kontrolle (Inkubation mit der Trägerlösung PBS) wurde einer Viabilität von 100 % gleichgesetzt. Die gemessenen Absorptionen der mit den Bortezomib-Verdünnungen behandelten HPMECs wurden in Relation zu der Kontrolle gesetzt, um die jeweiligen Viabilitäten zu berechnen. Abbildung 14 zeigt die auf diese Weise berechnete Dosis-Wirkungs-Kurve von Bortezomib. Es war festzustellen, dass die niedrigen Bortezomib-Konzentrationen im Picomolbereich die Viabilität erhöhten. In der Literatur sind ähnliche Beobachtungen über eine erhöhte Viabilität unter niedrigen Dosen des Proteasominhibitors MG132 im Vergleich zu Kontrollen in humanen Endothelzellen gewonnen aus einer Nabelschnur (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs) beschrieben worden [108].

Die sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve erreichte ab 1 μ M Bortezomib ein Plateau. Höhere Bortezomib-Konzentrationen bewirkten keine weitere Reduktion der Viabilität, so dass $52,3 \pm 3,3$ % der HPMEC-Zellen trotz hoher Bortezomib-Konzentrationen von 100 μ M weiterhin proliferierten. Für die folgenden proteomanalytischen Versuche wurde eine Bortezomib-Konzentration von 20 nM gewählt. Hier waren 75 % der HPMECs metabolisch

aktiv und eine Konzentration von 20 nM wird zudem in vivo während der Therapie mit Bortezomib erreicht [78, 109].

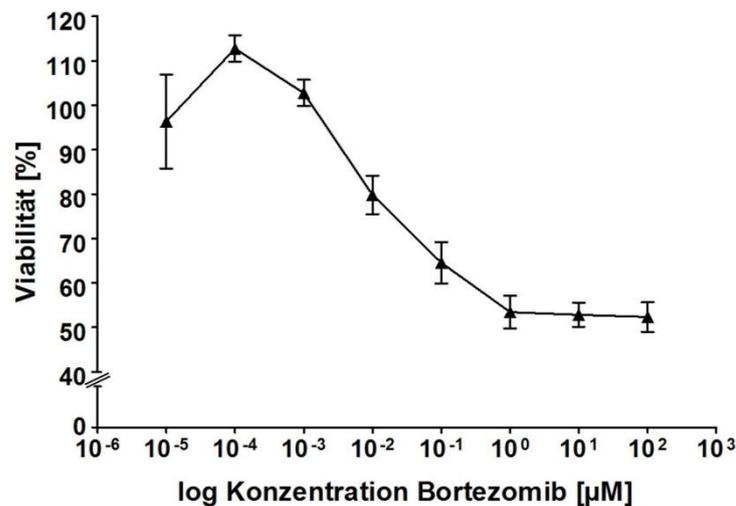


Abbildung 14: Viabilität von HPMECs unter Zusatz steigender Bortezomib-Konzentrationen. Die Zellen wurden 24 h mit unterschiedlichen Bortezomib-Verdünnungen inkubiert. Gemessen wurde die Änderung der Absorption 4 h nach Zugabe des XTT-Reagenzes. Die abgebildeten Werte beinhalten die Standardabweichungen von fünf unabhängigen Messungen.

3.2 Auftrennung der iTRAQ-markierten Peptide mittels RP-Chromatographie

Um eine effektive Identifizierung und Quantifizierung mittels MS/MS zu gewährleisten, wurden die iTRAQ-markierten Peptide in einem ersten Schritt mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) und in einem zweiten Schritt mittels RP-Chromatographie aufgetrennt. Mithilfe der IEF wurden die Peptide nach ihren isoelektrischen Punkten in 24 Fraktionen aufgetrennt, die anschließend in 24 LC MS/MS-Läufen analysiert wurden. Über die RP-Chromatographie vor der MS/MS-Messung wurden nichtbindende Substanzen wie Salze entfernt. Zusätzlich diente dieser Schritt vor allem der weiteren Auftrennung der Peptide, um möglichst viele Peptide massenspektrometrisch detektieren zu können. Oft werden Signale von niedrig abundanten Ionen durch Signale abundanter Ionen maskiert oder supprimiert. Dabei sind gerade niedrig abundante Proteine interessant bei proteomanalytischen Studien [110]. Oft übernehmen niedrig abundante Proteine regulatorische Aufgaben in der Zelle und besitzen Schlüsselfunktionen bei essentiellen Signalwegen oder der inter- und intrazellulären Kommunikation [111]. Die Identifizierung und Charakterisierung niedrig abundanter Proteine gilt als wichtige Quelle für neue

Biomarker, die die Diagnose von Krankheiten und deren individualisierte Therapie ermöglichen können [112].

Eine Reduktion der Probenkomplexität durch effiziente Trennmethode führt dazu, dass sowohl Maskierungs- als auch Supprimierungseffekte reduziert werden, wodurch wiederum die Effizienz der massenspektrometrischen Analyse erhöht wird. Die Anzahl an Aufreinigungsschritten ist jedoch begrenzt durch den Probeverlust, der gewöhnlich bei jedem Schritt zu verzeichnen ist.

In Abbildung 15 sind zwei typische Chromatogramme aus der LC ESI-MS/MS-Analyse dargestellt. Abbildung 15 A zeigt das Basispeak-Chromatogramm (BPC), welches auf das jeweils abundanteste Signal im Spektrum normiert wurde. In Abbildung 15 B ist das Chromatogramm des Totalionenstroms (Total Ion Current; TIC) zu sehen, das die Summe der Ströme darstellt, die von den Ionen aller m/z -Werte im Spektrum erzeugt wurde. Das BPC enthält weniger Signale und ist damit weniger komplex als das TIC. Das Hintergrundrauschen ist im BPC minimiert, weil Signale von niedrig abundanten Ionen herausgefiltert worden sind [113].

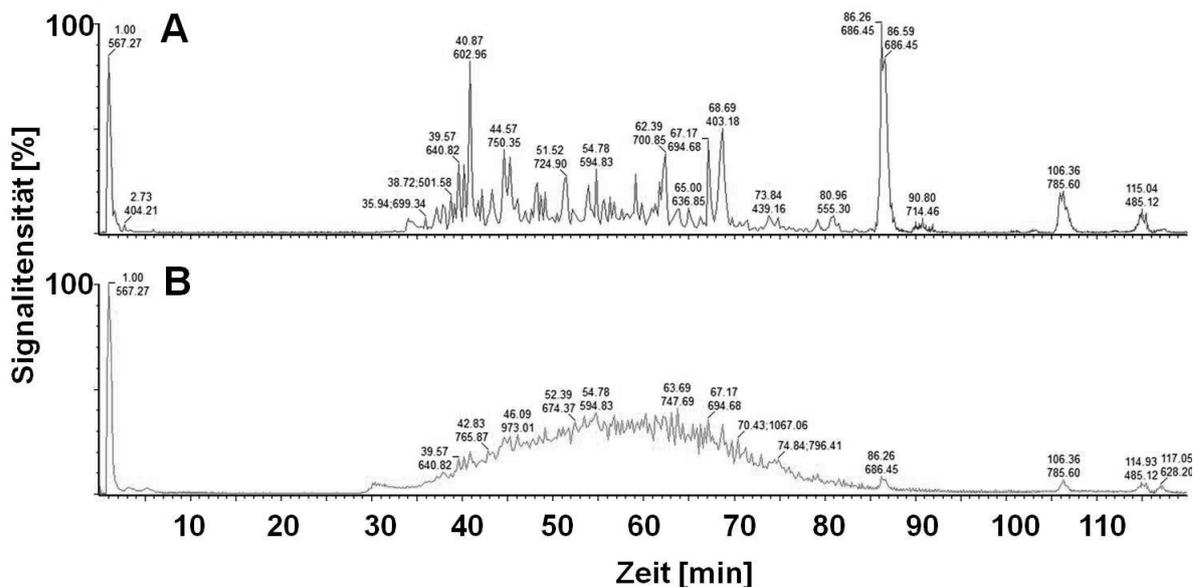


Abbildung 15: Typische Chromatogramme eines LC MS-Laufs mit den iTRAQ-markierten Peptidproben.

Vor der ESI-MS/MS-Messung wurden alle Proben mittels RP-Chromatographie aufgetrennt. Dargestellt ist in [A] ein typisches BPC und in [B] das dazugehörige TIC. Der Hauptteil der Peptide eluierte zwischen Minute 30 und 90. Der Peak bei Minute 1 - 2 wurde durch die Polyampholyte des IPG-Puffers hervorgerufen, der während der isoelektrischen Fokussierung eingesetzt wurde.

Die massenspektrometrische Messung wurde im datenabhängigen Aufnahmemodus (Data Dependent Acquisition; DDA) durchgeführt. Dieser Modus beinhaltet, dass in einem Übersichtsscan (Fullscan) zunächst die m/z -Werte aller anwesenden Vorläuferionen bestimmt wurden. Dann wurden die drei intensivsten Signale mithilfe eines Algorithmus für

die kollisionsinduzierte Fragmentierung (Collision-Induced Dissociation; CID) ausgewählt, um MS/MS-Spektren zu generieren. Die m/z -Werte der bereits für die Fragmentierung selektierten Vorläuferionen wurden für die folgenden 60 Sekunden für eine erneute Selektion gesperrt, um eine wiederholte Analyse bereits fragmentierter Peptide zu verhindern. Damit wurde die Aufzeichnung redundanter Daten weitestgehend unterbunden. Zudem ermöglichte der 60-sekündige Ausschluss die Analyse unterschiedlicher Vorläuferionen und damit die Erfassung einer größeren Zahl an Peptiden. Dennoch werden im DDA-Modus gerade bei der Analyse von komplexen Proben nicht alle Peptide als Vorläuferionen ausgewählt und dementsprechend nicht in Form von Fragmentspektren auf der MS/MS-Ebene erfasst. Dies betrifft allen voran Peptide mit einer geringen Signalintensität im Fullscanspektrum. Die Reduktion der Probenkomplexität vor der massenspektrometrischen Detektion über hochauflösende Trenntechniken ist deshalb essentiell, um zum einen möglichst viele Peptide im DDA-Modus zu erfassen. Zum anderen sind derartige Trenntechniken gerade dann von großer Bedeutung, wenn es darum geht, niedrig abundante Analyten in einem komplexen Gemisch zu detektieren.

3.3 Datenprozessierung der iTRAQ-Daten aus der LC ESI-MS/MS-Analyse

Ein Ziel der Datenprozessierung ist die Reduktion großer Datenmengen zu überschaubaren Daten, die interpretiert werden können [114]. Typische Arbeitsschritte bei der Prozessierung von LC ESI-MS/MS-Daten beinhalten das Glätten (data smoothing) von den Rohdaten sowie das darauffolgende Peak Picking.

Mithilfe von Glättungsfunktionen werden Signale des Hintergrundrauschens minimiert und die Form realer Analytensignale für die weitere Prozessierung optimiert. Beim Peak Picking kommt es zu einer Reduzierung des Datensatzvolumens. Die einzelnen Isotope eines Analyten haben im Idealfall die Form einer Gaußkurve, welche sich aus einer Vielzahl einzelner Datenpunkte zusammensetzt. Unter Verwendung eines Peak-Picking Algorithmus wird die Anzahl der Datenpunkte reduziert und das ursprüngliche Isotopensignal, welches die Form einer Gaußkurve besaß, als ein zentrierter Datenpunkt dargestellt (Strichspektrum), dessen Höhe der Fläche unter der Gaußkurve entspricht. Aus den zentrierten Strichspektren werden anschließend Peaklisten generiert, die die Information über die Massen, die Ladungen und die Signalintensitäten der detektierten Signale enthalten.

Die Rohdaten der iTRAQ-Analyse, die mittels LC ESI-QTOF generiert worden waren, wurden mit der Software ProteinLynx Global Server (PLGS) prozessiert. In Abbildung 16

sind beispielhaft die einzelnen Schritte der Prozessierung eines MS/MS-Spektrums vom Rohspektrum bis zum geglätteten, zentrierten Spektrum mit minimiertem Hintergrundrauschen dargestellt. Ausgehend von den prozessierten Spektren wurden mit der Software PLGS Peaklisten im mzML-Dateiformat generiert. Diese wurden in die Software TOPP importiert und mithilfe der entwickelten Identifizierungs- und Quantifizierungs-Pipeline analysiert (vgl. Kapitel 2.2.9 und 2.2.10).

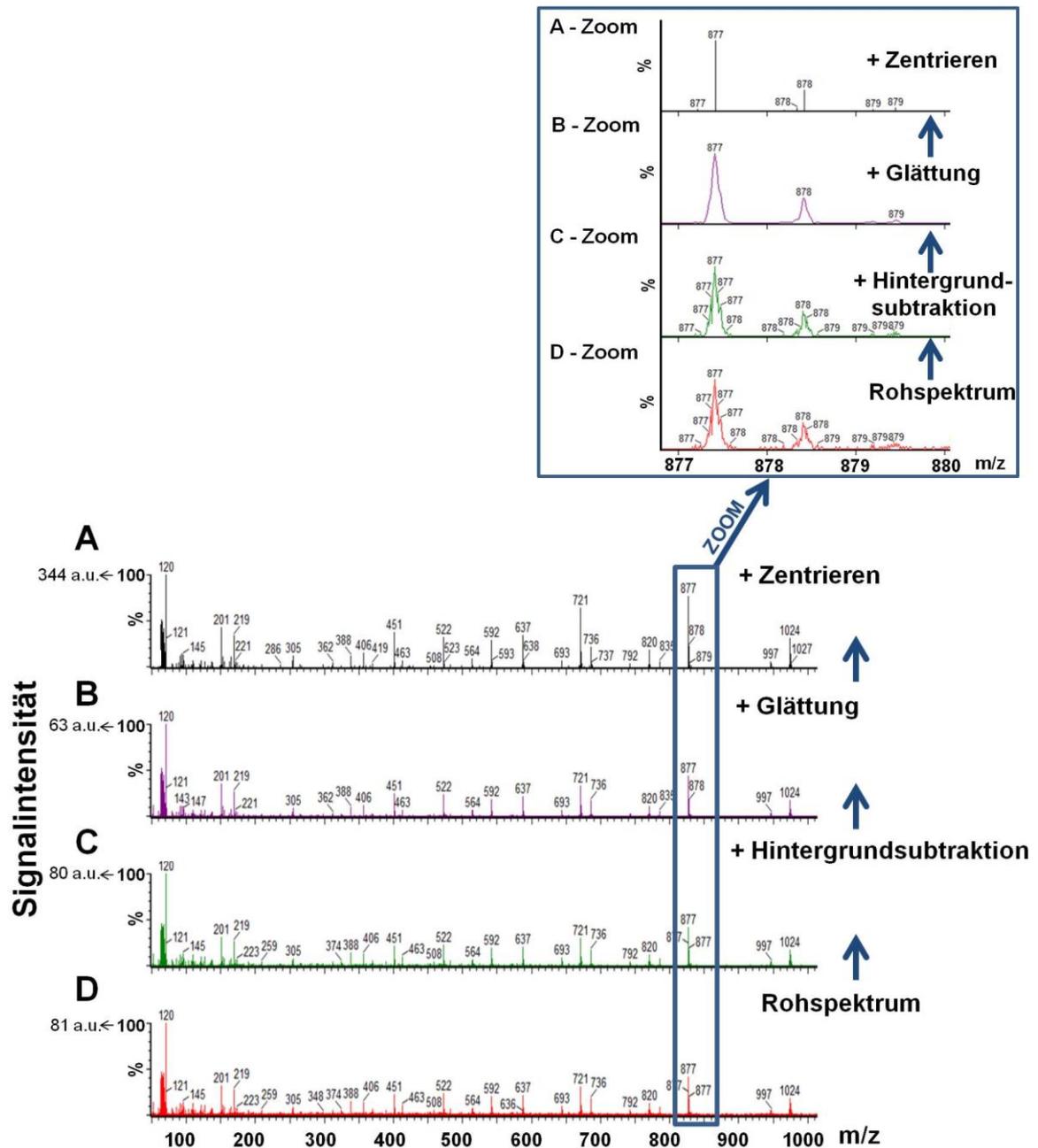


Abbildung 16: Beispiel für die Prozessierung eines MS/MS-Spektrums aus der ESI-Messung. Die Prozessierung ist beispielhaft anhand des Peptids mit der Aminosäuresequenz TGEEVGFVVDK vom Protein Filamin B dargestellt. Im ersten Schritt wurde in den [D] Rohspektren [C] das Rauschen im Hintergrund subtrahiert; in den nächsten Schritten wurden [B] die Peaks geglättet und anschließend [A] zentriert. Dargestellt sind die Gesamtspektren sowie eine Vergrößerung (Zoom) für das Signal des monoisotopischen Peaks mit dem m/z-Wert 877,4 Da.

3.3.1 Überprüfung der Datenprozessierung

Die Rohdaten wurden mithilfe von verschiedenen Algorithmen prozessiert und bearbeitet, bevor sie in einem für die biologische Interpretation geeigneten Format vorlagen. Für die iTRAQ-basierte Quantifizierung ist es essentiell, dass die Signalintensitäten der Reporterionen-Signale vom Rohspektrum ausgehend bis zu der finalen Auswertung mithilfe der Algorithmen korrekt übersetzt werden. Die Nutzung eines Algorithmus birgt die Gefahr, unbemerkt einen Fehler in die Auswertung einzubringen. Das Importieren beziehungsweise Exportieren von Daten ist ebenfalls fehleranfällig [29]. Um eine fehlerfreie Übersetzung der Prozessierung mithilfe der Algorithmen zu gewährleisten, wurden die Signalintensitäten der Reporterionen-Signale nach jedem Prozessierungsschritt durch einen Abgleich mit den korrespondierenden Rohspektren kontrolliert. Die aus den Signalintensitäten in dem Programm Mathematica kalkulierten Peptid-Ratios wurden ebenfalls überprüft, indem die von Mathematica exportierten Peptid-Ratios mit den prozessierten Spektren verglichen wurden. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

3.3.1.1 Prozessierung der Rohspektren

Die Rohspektren wurden mit der Software MassLynx geöffnet und schrittweise mit den Parametern für die Subtraktion des Hintergrundes, des Glättens und des Zentrierens prozessiert (vgl. Kapitel 2.2.9). In Abbildung 16 sind die Prozessierungsschritte beispielhaft anhand eines MS/MS-Spektrums mit den Signalen der Reporterionen dargestellt. Beim Vergleich der Rohspektren mit den prozessierten Spektren konnte festgestellt werden, dass die relativen Signalintensitäten der Reporterionen-Signale aus den Rohspektren korrekt in die prozessierten Spektren übernommen worden waren. Es war somit gewährleistet, dass keiner der Prozessierungsschritte die Signalintensitäten verfälschte.

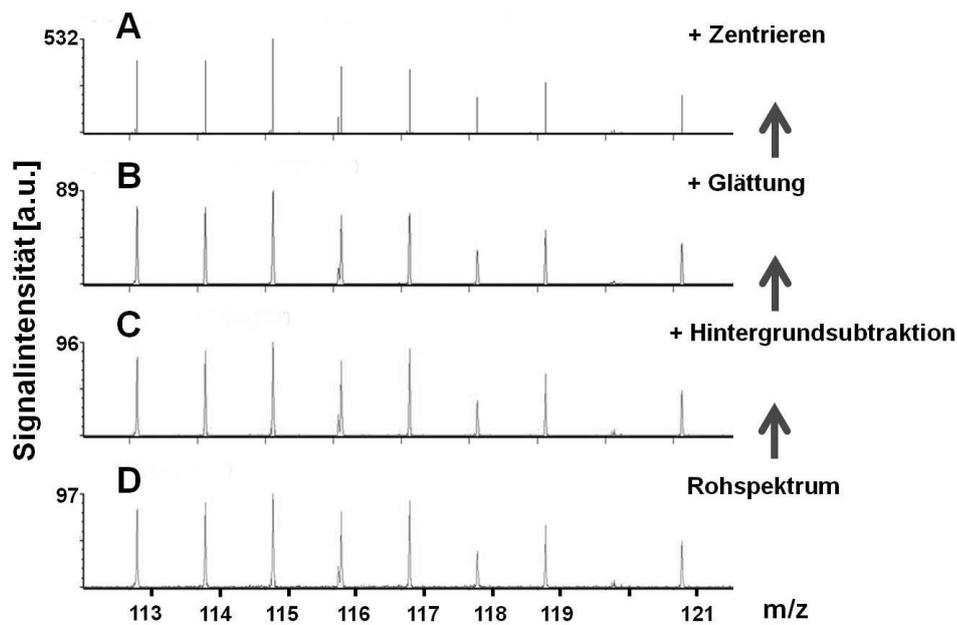


Abbildung 17: Überprüfung der Prozessierung der Reporterionen-Signale. Dargestellt ist die Prozessierung vom [D] Rohspektrum, über [C] das Spektrum mit subtrahiertem Hintergrund und [B] das Spektrum mit geglätteten Peaks mit Hintergrundsubtraktion bis zum [A] geglätteten, zentrierten Strichspektrum mit Hintergrundsubtraktion. Beispielhaft ist der m/z -Bereich gezeigt, in dem die Signale der Reporterionen 113 - 119 und 121 des Peptids mit dem Index 664 aus der Fraktion 5 der isoelektrischen Fokussierung zu sehen sind.

3.3.1.2 Prozessierung mit dem iTRAQ-Analyzer

Für die Identifizierung und die Quantifizierung der iTRAQ-Daten wurde die Software TOPP des OpenMS-Systems verwendet [28, 30]. Mit dem Programm TOPP können Algorithmen individuell vom Anwender kombiniert werden, was die Auswertung individueller LC MS-Experimente ermöglicht (vgl. Kapitel 2.2.10). Mit dem TOPP-Tool iTRAQ-Analyzer können sowohl iTRAQ-Experimente mit den 4-plex- als auch den 8-plex-Reagenzien ausgewertet werden. Der Algorithmus des iTRAQ-Analyzers extrahiert die Signalintensitäten der Reporterionen-Signale aus den MS/MS-Spektren, anhand derer die Quantifizierung durchgeführt wird. Die Ergebnisse aus der Quantifizierungs-Pipeline werden anschließend in dem OpenMS-Dateiformat ConsensusXML gespeichert (vgl. Tabelle 2) [115].

Informationen des iTRAQ-Analyzers können durch das Tool IDMapper mit den Informationen aus der Identifizierungs-Pipeline im Dateiformat idXML zusammengeführt werden. Das Format idXML wurde speziell für OpenMS entwickelt, da hierfür keine allgemeinen Standardformate existieren [28]. Es enthält Identifizierungsinformationen aus mehreren Identifizierungsläufen, zum Beispiel durch die Nutzung von mehr als einer Suchmaschine. In dieser Arbeit wurde mit den Suchmaschinen OMSSA [94] und X!Tandem [95] gesucht. Eine Suchmaschine gleicht die experimentell bestimmten m/z -Werte eines Spektrums (Peakliste) mit theoretisch kalkulierten Modellspektren von

Fragmentationen ab, die in Sequenz-Datenbanken wie zum Beispiel SwissProt hinterlegt sind. Durch individuelle Algorithmen werden Scores berechnet, die die Wahrscheinlichkeit einer richtigen Identifizierung wiedergeben. Die Suchmaschinen X!Tandem und OMSSA sind beide frei erhältlich und ermöglichen es, große Datensätze aus MS/MS-Experimenten gegen Datenbanken wie Uniprot abzugleichen. Da sich die Algorithmen einzelner Suchmaschinen unterscheiden, ist es der Fall, dass der eine Suchalgorithmus in der Lage ist Peptide zu identifizieren, die bei der Verwendung eines anderen Algorithmus beziehungsweise einer anderen Suchmaschine, nicht identifiziert werden konnten. Die Anwendung von mehr als einer Suchmaschine erhöht damit die Ausbeute identifizierter Peptide.

Über das TOPP-Tool TextExporter wurden die idXML- und die ConsensusXML-Dateien anschließend in CSV-Textdateien umgewandelt, welche mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel geöffnet werden konnten.

Die Datenprozessierung durch den iTRAQ-Analyzer wurde ebenfalls eingehend überprüft. Dafür erfolgte ein Vergleich der Signalintensitäten der Reporterionen-Signale, die vom iTRAQ-Analyzer aus den prozessierten MS/MS-Spektren extrahiert und in Form von CSV-Dateien ausgegeben worden waren, mit den Signalintensitäten der Reporterionen-Signale in den prozessierten MS/MS-Spektren. Für die prozessierten MS/MS-Spektren war im Vorfeld sichergestellt worden, dass die Signalintensitäten der Reporterionen-Signale von den Algorithmen korrekt aus den Rohspektren umgesetzt worden waren (vgl. Kapitel 3.3.1.1).

Bei dem Vergleich fiel auf, dass der überwiegende Anteil der Signalintensitäten korrekt vom iTRAQ-Analyzer extrahiert und korrekt in die Textdatei übersetzt worden war. Es wurden jedoch Signalintensitäten gefunden, die nicht mit den Signalintensitäten der Reporterionen-Signale in den prozessierten MS/MS-Spektren übereinstimmten. Diese Abweichungen mussten näher untersucht werden, weil sonst falsche Ergebnisse in der Quantifizierung generiert worden wären.

Für die Auswertung der Daten mithilfe der TOPP-Pipeline waren zunächst die Standard-Voreinstellungen des iTRAQ-Analyzers beibehalten worden, was einen Toleranzbereich von $\pm 0,1$ Da für die Detektion der Reporterionen-Signale beinhaltete. Der Toleranzbereich der Reporterionen definiert den m/z-Bereich, in dem alle auftretenden Signale als Reporterion-Signal gewertet werden. Diese Signale werden vom iTRAQ-Analyzer summiert. Bei der Messung kommt es zu Massenabweichungen, die bei der Wahl des m/z-Bereiches berücksichtigt werden müssen. Damit die realen Signale der Reporterionen vom iTRAQ-Analyzer erkannt werden, darf der m/z-Bereich nicht zu klein gewählt werden. Das Fenster des Toleranzbereiches darf auch nicht zu groß gewählt werden, damit nur die Signale realer Reporterionen erkannt werden und keine anderen in diesem Massenfenster

auftretenden Signale berücksichtigt werden. Durch einen zu groß gewählten m/z-Bereich würden Nebenpeaks vom iTRAQ-Analyzer berücksichtigt und deren Signalintensität zu der Signalintensität des jeweiligen realen Reporterion-Signals addiert werden. Das würde die Quantifizierung verfälschen. Neben den Signalen der realen Reporterionen werden in dem m/z-Bereich von 113 - 121 Da Signale von isotopen Verunreinigungen der iTRAQ-Reagenzien und Signale von Immonium-Ionen detektiert. Eine Verunreinigung durch Isotopen der iTRAQ-Reagenzien entsteht hauptsächlich bei der Herstellung [110]. Bei der kollisionsinduzierten Dissoziation können zudem Immonium-Ionen einzelner Aminosäuren entstehen [116 - 121]. Die m/z-Werte von unmodifizierten Immonium-Ionen liegen im m/z-Bereich von 30 - 159 Da. Das Signal vom Immonium-Ion des Phenylalanins wird mit hohen Signalintensitäten bei einem m/z-Wert von 120,08 Da detektiert [120]. Aus diesem Grund gibt es kein iTRAQ-Reagenz mit dem m/z-Wert von 120 Da. Evans *et al.* haben sechs weitere Massen beschrieben, die potentiell mit den Reporterionen 114, 115, 116 und 118 interferieren [110].

Der manuelle Abgleich der Signalintensitäten der Reporterionen-Signale in den prozessierten MS/MS-Spektren mit den Signalintensitäten der Reporterionen-Signale, die vom iTRAQ-Analyzer exportiert worden waren, ergab, dass der Toleranzbereich von $\pm 0,1$ Da für die Detektion der Reporterionen zu groß gewählt war, denn Signale von Nebenpeaks wurden als Reporterionen-Signale gewertet. Die Signale der Nebenpeaks waren der Grund für die oben beschriebenen Abweichungen, die zwischen den vom iTRAQ-Analyzer exportierten Reporterionen-Signalintensitäten und den Reporterionen-Signalintensitäten in den MS/MS-Spektren beobachtet worden waren. Nebenpeaks geringer Signalintensität verfälschen die Quantifizierung unter Umständen nicht signifikant. Jedoch resultieren Nebenpeaks hoher Signalintensität in einem falschen Ergebnis. Für das in Abbildung 18 A dargestellte Beispiel haben die Reporterionen-Signale (RI) 114, 115, 116 und 119 Nebenpeaks (NP) von hoher Signalintensität. Abbildung 18 B zeigt beispielsweise einen typischen Wert für den Abstand (Δ m/z) des Signals von realem Reporterion zum Signal eines Nebenpeaks von 0,046 Da, der häufig beobachtet wurde. Aber auch kleinere Differenzen von 0,016 Da wurden gefunden, wie in Abbildung 18 D dargestellt.

Durch schrittweises Anpassen und ausführliches Prüfen der MS/MS-Spektren wurde der Toleranzbereich für die Detektion der Reporterionen (RI) auf $\pm 0,014$ Da festgelegt. Ein Beispiel für die sukzessive Anpassung des Toleranzbereiches ist in Tabelle 5 widergegeben. Obwohl die Differenz des Signals des realen Reporterions 115 zu dem Signal des Nebenpeaks 0,017 Da betrug (siehe Abbildung 18 C), wurde das Signal des Nebenpeaks (NP) erst bei einem Toleranzbereich von $\pm 0,014$ Da nicht mehr vom iTRAQ-Analyzer als das Signal des Reporterions 115 gewertet.

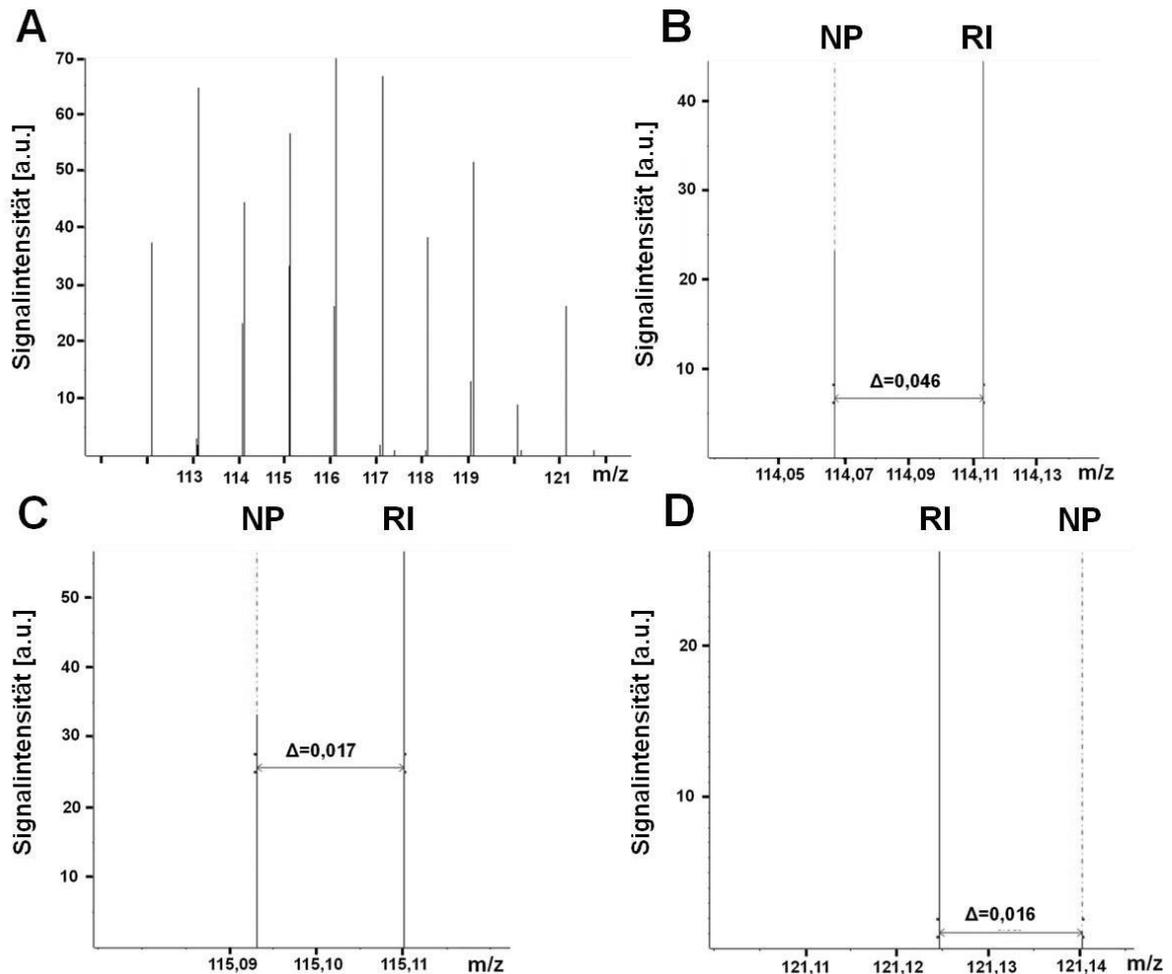


Abbildung 18: Bestimmung des vom iTRAQ-Analyser berücksichtigten Toleranzbereiches für die Detektion der Reporterionen-Signale. Beispielhaft ist die Vorgehensweise anhand des Peptids mit dem Index 601 aus der IEF-Fraktion 2 aufgezeigt. Dargestellt sind [A] die gesamte Reporterionen-Region 113 - 121 Da, [B] das Reporterion-Signal 114 und ein Nebenpeak in einer Differenz von $\Delta = 0,046$ Da, [C] das Reporterion-Signal 115 und ein Nebenpeak in einer Differenz von $\Delta = 0,017$ Da, [D] das Reporterion-Signal 121 und ein Nebenpeak in einem Abstand von $\Delta = 0,016$ Da. Mithilfe der Überprüfung wurde ein Toleranzbereich des iTRAQ-Analyzers von $\pm 0,014$ Da bestimmt. Abkürzungen: RI für Reporterion und NP für Nebenpeak.

Die vom iTRAQ-Analyser extrahierten Signalintensitäten mit einem Toleranzbereich von $\pm 0,014$ Da für die Detektion von Reporterionen-Signalen wurden in zahlreichen Stichproben intensiv überprüft und stimmten in jedem überprüften Fall mit den Signalintensitäten der MS/MS-Spektren überein. Mit diesem Toleranzbereich konnte die Quantifizierung unter Verwendung des iTRAQ-Analyzers durchgeführt werden.

Das Beispiel verdeutlicht, dass der Toleranzbereich für die Detektion der Reporterionen individuell an die jeweiligen Messbedingungen, zum Beispiel den Typ des Massenanalysators, angepasst werden muss. Die hohe Auflösung auch im niedrigen Massenbereich eines QTOF-Analyzers ermöglichte die Diskriminierung von realen

Reporterionen-Signalen und Signalen benachbarter Nebenpeaks und erforderte einen eng gesetzten tolerierten Massenbereich für die Detektion der Reporterionen-Signale.

Tabelle 5: Darstellung des schrittweisen Vorgehens während der Bestimmung des vom iTRAQ-Analyzer berücksichtigten Toleranzbereiches für die Detektion der Reporterionen-Signale. Beispielhaft ist das Signal des Reporterions 115 des Peptids mit dem Index 601 aus der IEF-Fraktion 2 dargestellt, welches auch in Abbildung 18 C gezeigt ist. Bei dem Signal des realen Reporterions mit dem experimentellen m/z-Wert von 115,1101 Da befindet sich ein Nebenpeak in dem Abstand $\Delta m/z=0,017$ Da. Sukzessive wurde das m/z-Fenster des Toleranzbereiches verkleinert, bis die vom iTRAQ-Analyzer ausgegebene Signalintensität mit der Signalintensität im Spektrum übereinstimmte. Bei einem m/z-Fenster von $\pm 0,014$ Da entsprach die vom iTRAQ-Analyzer ausgegebene Signalintensität von 55,95 a.u. der Signalintensität des realen Reporterion-Signals im MS/MS-Spektrum.

Tolerierter m/z-Bereich für die Detektion der Reporterionen-Signale [Da]	Vom iTRAQ-Analyzer ausgegebene Signalintensität [a.u.]
$\pm 0,04$	91,95
$\pm 0,02$	91,95
$\pm 0,015$	91,95
$\pm 0,014$	55,95

3.3.2 Prozessierung der Daten in Mathematica

Nachdem sichergestellt war, dass die gewählten Prozessierungsparameter korrekt übersetzt worden waren, wurden die Daten aller massenspektrometrisch vermessenen Fraktionen aus TOPP mit dem Programm Mathematica bearbeitet [98]. Für jede MS-Messung wurde von TOPP eine CSV-Datei ausgegeben. Somit waren 24 Dateien entsprechend den 24 Fraktionen der isoelektrischen Fokussierung, die mittels LC ESI-MS/MS analysiert worden waren, entstanden. Für die Zusammenführung der 24 einzelnen CSV-Dateien wurde ein Skript in Mathematica geschrieben, dessen Ausgabedatei die Grundlage für die biologische Interpretation bilden sollte. Neben der Zusammenführung wurden weitere bioinformatische Prozessierungsschritte durchgeführt.

Für die Quantifizierung mit den iTRAQ-Reagenzien ist beschrieben, dass die Streuung der Ergebnisse der Quantifizierung von der Signalintensität der Reporterionen-Signale abhängt. Je niedriger die Signalintensitäten, desto stärker streuen auch die Werte [99, 101, 102, 122]. Aus diesem Grund wurde ein Filter in das Mathematica-Skript integriert, durch den Signale von Reporterionen mit einer Signalintensität kleiner als ($<$) 20 aussortiert und von der Quantifizierung ausgeschlossen wurden. Ebenfalls in Mathematica herausgefiltert wurden Peptide, die aufgrund von Sequenzhomologien mehr als einem Protein zugeordnet werden konnten und somit nicht eindeutig für ein Protein waren. Denn

die Zuordnung eines Peptids zu zwei Proteinen kann die Quantifizierung verzerren, wenn die Proteine in Wirklichkeit unterschiedlich reguliert sind [123].

Des Weiteren wurden für jedes Peptid die für die relative Quantifizierung benötigten Ratios (Quotient Probe zu Kontrolle) mittels Mathematica-Skript berechnet. Da die Peptide stellvertretend für die Proteine quantifiziert wurden, musste aus den Peptid-Ratios im Anschluss die Protein-Ratios berechnet werden, um Änderungen der Proteinkonzentration in An- oder Abwesenheit von Bortezomib oder TNF- α feststellen zu können.

Bei der Bildung der Protein-Ratios aus Peptid-Ratios müssen verschiedene Aspekte berücksichtigt werden. Ein Aspekt ist der Umgang mit dem in iTRAQ-Experimenten oft dominierenden Effekt, dass ein Protein aufgrund eines Peptides identifiziert worden ist. Die Identifizierung eines Proteins aufgrund eines einzigen Peptids birgt ein größeres Risiko einer falsch positiven Identifizierung im Vergleich zu einer Identifizierung aufgrund mehrerer Peptide [124]. Um die Gefahr potentiell falsch positiver Proteine zu minimieren, wäre eine Möglichkeit, die Proteine mit einem zugeordneten Peptid herauszufiltern und bei der weiteren Auswertung des Experimentes nicht weiter zu berücksichtigen. Diese Vorgehensweise würde jedoch einen restriktiven Blick auf das Proteom bedeuten, weil wichtige Information verloren geht [110]. In dieser Arbeit wurden deshalb auch Proteine für die Quantifizierung berücksichtigt, die mit einem einzigen Peptid identifiziert worden sind. In diesen Fällen wurde die berechnete Peptid-Ratio gleich der Protein-Ratio gesetzt.

Ein zweiter Aspekt ist der Umgang mit Proteinen, die mit mehr als einem Peptid identifiziert wurden. Die Peptide eines Proteins können in die gleiche Richtung reguliert sein. Zum Beispiel liegen alle Peptide eines Proteins in einer höheren Konzentration vor als die Peptide aus dem Kontrollansatz. Die Peptid-Ratios sind dann alle gleich gerichtet, wie in diesem Beispiel größer als ($>$) 1. In solch einem Fall kann eine Zusammenfassung der Peptid-Ratios zu einer Protein-Ratio beispielsweise durch die Berechnung des arithmetischen oder gewichteten Mittelwertes oder des Medians erfolgen [125]. Schwieriger ist es, wenn die Peptide eines Proteins keine gleich gerichteten Peptid-Ratios aufweisen: ein Peptid aus der behandelten Probe liegt in einer höheren Konzentration vor im Vergleich zu seinem Pendant aus der Kontrollprobe, während ein anderes Peptid desselben Proteins aus der behandelten Probe in einer niedrigeren Konzentration vorliegt als sein Pendant aus der Kontrollprobe. Somit würden für dasselbe Protein eine Peptid-Ratio kleiner als ($<$) 1 und eine Peptid-Ratio größer als ($>$) 1 berechnet werden. Aufgrund von Messfehlern oder biologischen Phänomenen, beispielsweise posttranslationalen Modifikationen (PTMs), können solche konträren Regulationen auftreten. Gerade die Koexistenz von Proteinspezies, die zum Beispiel aufgrund von unterschiedlichen PTMs auftreten, können ein Grund für eine entgegengesetzte Regulation sein [126].

In dieser Arbeit wurden lediglich Proteine bei der biologischen Interpretation des Experimentes berücksichtigt, die gleich gerichtete Peptid-Ratios aufwiesen. Proteine mit entgegengesetzt gerichteten Peptid-Ratios wurden nicht berücksichtigt.

Zur Berechnung von Protein-Ratios, die mit zwei oder mehr gleich gerichteten Peptiden identifiziert wurden, wurde ein Verfahren gewählt, bei dem die Peptid-Ratios nach der Signalintensität gewichtet wurden [100, 127]. Die Gewichtung der Peptid-Ratios, basierend auf den für deren Berechnung betrachteten Signalintensitäten der Reporterionen-Signale, bewirkte, dass Ratios von Peptiden mit hohen Signalintensitäten der Reporterionen-Signale stärker berücksichtigt wurden bei der Berechnung der Protein-Ratio als die Ratios von Peptiden, die mit niedrigen Signalintensitäten der Reporterionen-Signale detektiert worden waren. Dadurch sollten Verfälschung durch das Hintergrundrauschen, welches in Spektren niedriger Signalintensität stärker ins Gewicht fällt, minimiert werden. Des Weiteren berücksichtigt die mathematische Operation die in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass besonders Ratios streuen, die aus Reporterionen-Signalen niedriger Signalintensität berechnet worden sind, was eine höhere Varianz bedeutet [128, 129]. Diese Beobachtung wurde auch in iTRAQ-Experimenten gemacht [100], weshalb in dieser Arbeit neben dem Filtern von Peptiden mit einer Reporterionen-Signalintensität < 20 die Protein-Ratios zusätzlich gewichtet wurden nach den Signalintensitäten der Reporterionen-Signale.

In Abbildung 19 ist beispielhaft anhand des Proteins β -Tubulin (Genname TUBB) die Bildung der gewichteten Protein-Ratio 115:113 gezeigt (vgl. Gleichung 1). Für die Berechnung der Ratio 115:113 wurde der Versuchsansatz, bei dem die HPMECs 1 h mit Bortezomib behandelt und anschließend mit TNF- α stimuliert wurden (iTRAQ-Reagenz 115) auf die Kontrolle des Versuchszweigs „1 h“ (iTRAQ-Reagenz 113) bezogen. Abbildung 19 A stellt die summierten Signalintensitäten der Reporterionen 115 und 113 dar aufgetragen gegen die Peptid-Ratios von den sechs Peptiden, mit denen das Protein β -Tubulin identifiziert und quantifiziert wurde. Die gleichen Peptidsequenzen wurden zwar mehrfach detektiert, da diese aber in unterschiedlichen Fraktionen (F) der isoelektrischen Fokussierung oder in unterschiedlichen Ladungszuständen detektiert worden waren, wurden diese als eigenständige Peptide angesehen. Abbildung 19 B zeigt die gewichtete Protein-Ratio 115:113 von β -Tubulin, die aus den sechs berücksichtigten Peptid-Ratios berechnet wurde. Die summierten Signalintensitäten der Reporterionen 115 und 113 lagen zwischen 135 und 353. Das Peptid mit der Aminosäuresequenz ISVYYNEATGGK aus Fraktion 10 (F10) wurde mit der niedrigsten summierten Signalintensität von 135 der zwei Reporterionen-Signale 115 und 113 detektiert und aufgrund der Gewichtung trug dessen Peptid-Ratio von 0,74 zu dem kleinsten Anteil zur finalen Protein-Ratio bei. Die Ratio von 1,10 des Peptids mit der gleichen Sequenz aus Fraktion 11 (F11) und einer summierten

Signalintensität von 353 trug zu dem größten Anteil bei der Bildung der Protein-Ratio bei. Die finale, gewichtete Protein-Ratio 115:113 für β -Tubulin betrug 0,95.

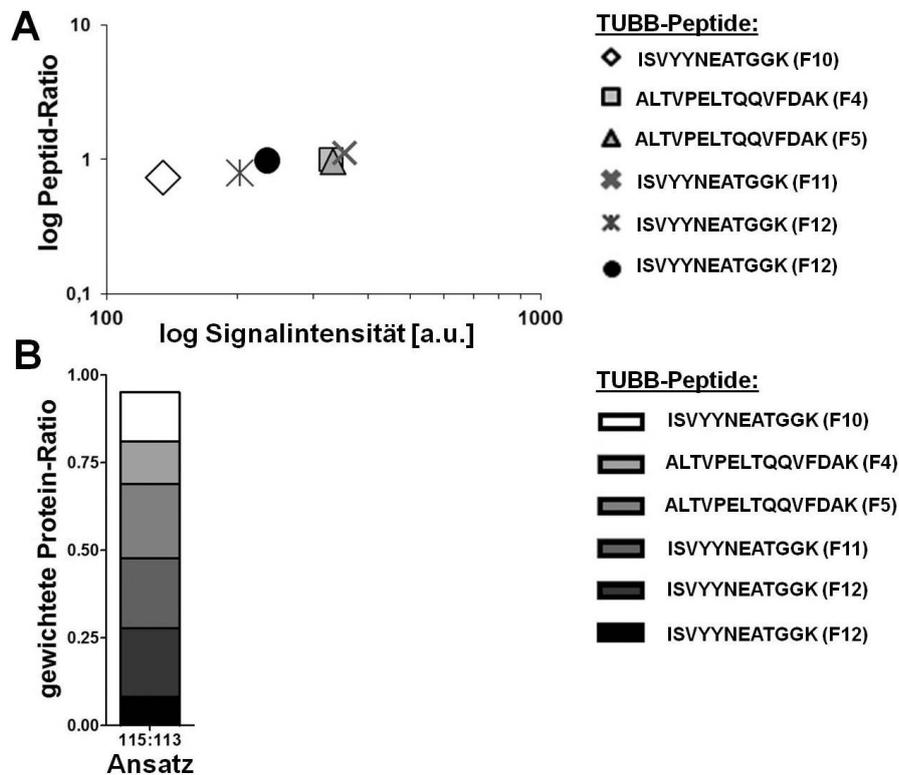


Abbildung 19: Beispiel für die Bildung der gewichteten Protein-Ratio 115:113 anhand des Proteins β -Tubulin (Genname TUBB). Peptide mit gleichen Aminosäuresequenzen wurden als eigenständiges Peptid gewertet, wenn diese in unterschiedlichen Fraktionen der isoelektrischen Fokussierung (IEF) identifiziert wurden oder unterschiedliche Ladungszustände aufwiesen. In welcher Fraktion (F) der IEF die jeweiligen Peptide identifiziert wurden, ist in der Legende hinter den Peptiden in runden Klammern angegeben. [A] Die Signalintensität wurde aufgetragen gegen die Peptid-Ratio, wobei die Signalintensität die Summe der zwei Signalintensitäten der Reporterionen-Signale ist, aus denen die Peptid-Ratio berechnet wurde (115 + 113). [B] Die gewichtete Protein-Ratio wurde berechnet aus den Peptid-Ratios und den berücksichtigten Signalintensitäten nach Gleichung 1.

3.4 Betrachtung der Effizienz der Markierung von tryptischen Peptiden mit den iTRAQ- Reagenzien

Ein wichtiger Schritt bei der Durchführung eines iTRAQ-Experimentes ist die Markierung der tryptischen Peptide mit den iTRAQ-Reagenzien. Für eine verlässliche relative Quantifizierung muss dieser Schritt in allen Proben gleich effizient ablaufen [130]. Das TOPP-Tool iTRAQ-Analyser hat einen Algorithmus implementiert, der die theoretische Effizienz der Markierung der Peptide mit einem iTRAQ-Reagenz berechnet. Jedes Reagenz (113 - 119, 121) wird dabei einzeln betrachtet. Die Effizienz ist der Quotient aus

der Anzahl an detektierten Reporterionen und der Gesamtzahl an aufgenommenen Spektren. Die vom iTRAQ-Analyser berechnete Effizienz vermittelt ein theoretisches Bild über die Ausbeute der Markierungsreaktion.

Zunächst wurden mit dem TOPP-Tool FileFilter Dateien generiert, die überwiegend reale Peptidspektren eines MS-Laufs enthielten, indem das Fenster der Retentionszeit auf das Elutionsfenster der Peptide eingestellt wurde. Denn nicht während der gesamten MS-Messung wurden Peptide detektiert. Die Mehrzahl der Peptide eluierte zwischen Minute 35 und 90, was einer Acetonitril-Konzentration (Eluent) von 8 bis 38 % entsprach (siehe Abbildung 15). Bei Berücksichtigung aller Spektren, inklusive der Spektren, die aufgenommen wurden, als keine Peptide eluierten, würde mit hoher Wahrscheinlichkeit vom iTRAQ-Analyser eine zu niedrige Markierungseffizienz berechnet werden. Dennoch kann die eigentliche Markierungsreaktion effizient abgelaufen sein. Deshalb wurde für die Auswertung ein Retentionszeitfenster von 10 Minuten betrachtet, in dem in allen MS-Läufen Peptide eluierten. Das gewählte Fenster lag zwischen Minute 50 und 60 bei einem Acetonitril-Anteil von 16 bis 21,5 %.

Für die Ermittlung der Markierungseffizienz wurden die aus jeder MS-Messung generierten Dateien einzeln mit der Quantifizierungs-Pipeline von TOPP analysiert. So wurde für jede Probe, die mittels LC ESI-MS/MS gemessen wurde, die Effizienz der iTRAQ-Markierung für jedes Reagenz 113 - 119 und 121 ermittelt. Abbildung 20 zeigt die Auswertung in einem Box-Whisker-Plot. In allen Proben betrug die theoretische Markierungseffizienz > 85 %. Die Mediane bestimmt aus allen MS-Messungen betragen für die iTRAQ-Reagenzien 114, 116 und 119 96 % und für die iTRAQ-Reagenzien 113, 115, 117, 118 und 121 97 %. Bei 75 % der aufgenommenen Spektren betrug die Effizienz > 93 %.

In der Fraktion 21 aus der isoelektrischen Fokussierung wurde im Vergleich zu den anderen Fraktionen die niedrigsten Markierungseffizienzen von 86 bis 88 % gemessen. Eine Kontrolle zeigte, dass bei 45 % der Spektren die Signalintensitäten aller im Spektrum enthaltenen Signale < 10 waren. Damit waren die detektierten Signalintensitäten in Fraktion 21 insgesamt als niedrig zu bezeichnen. Zwar war die Effizienz von allen Fraktionen in Fraktion 21 am niedrigsten, dennoch ergab ein Vergleich der Markierungseffizienz der iTRAQ-Reagenzien 113 - 119 und 121 untereinander, dass in Fraktion 21 eine vergleichbare Effizienz vorlag. Die Markierungsreaktion war daher mit allen Peptiden aus der Fraktion 21 einheitlich und stabil abgelaufen. Für die anderen Fraktionen ergab der Vergleich der Markierungseffizienz der iTRAQ-Reagenzien 113 - 119 und 121 untereinander ebenfalls, dass die theoretisch ermittelten Markierungseffizienzen einheitlich waren. Damit war die Markierungseffizienz in den einzelnen Versuchsansätzen vergleichbar und die Markierungsreaktion der acht iTRAQ-Reagenzien mit den tryptischen

Peptiden war offenbar einheitlich effizient abgelaufen. Insgesamt konnte somit von einer robusten Datenlage ausgegangen werden.

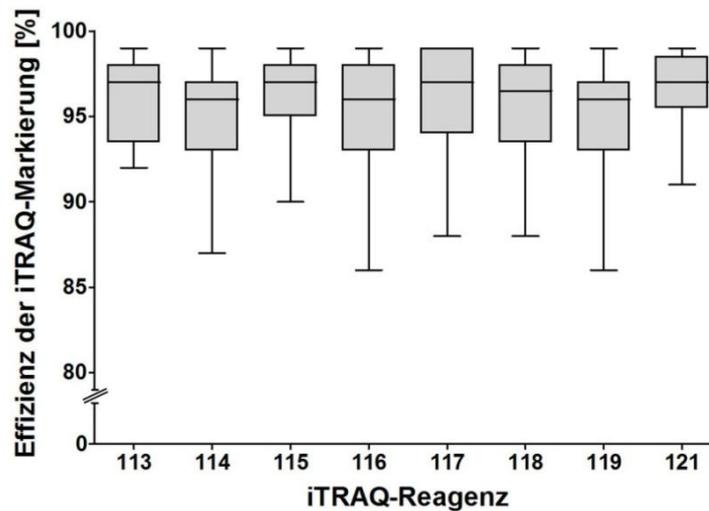


Abbildung 20: Darstellung der Effizienz der iTRAQ-Markierungsreaktion. Mit dem iTRAQ-Analyzer wurde die theoretische Effizienz der Markierungsreaktion berechnet. Dabei wurde jedes iTRAQ-Reagenz (113 - 119, 121) einzeln betrachtet.

3.5 LC MALDI-MS/MS-Analyse der iTRAQ-markierten Peptide

Nachdem die iTRAQ-markierten Peptide mittels LC ESI-MS/MS gemessen worden waren, wurden ausgewählte Proben zusätzlich mit LC MALDI-MS/MS analysiert. Für die zusätzliche Analyse mit MALDI-MS/MS wurden iTRAQ-markierte Proben nach der isoelektrischen Fokussierung ausgewählt, die laut ESI-Messung interessante Proteinkandidaten enthielten, bei denen in Anwesenheit von Bortezomib oder TNF- α eine Konzentrationsänderung festgestellt worden war. Die MALDI-Messung diente in erster Linie der Validierung der ESI-Daten.

MALDI gilt ebenso wie ESI als sanfte Ionisationstechnik, bei der intakte Moleküle, auch thermisch-labile Proteine, ionisiert werden können. MALDI-MS/MS liefert neben analogen auch komplementäre Daten zu ESI-MS/MS im Hinblick auf die Identifizierung und Quantifizierung [131 - 135]. Durch den kombinierten Einsatz beider Ionisationsmethoden kann die Anzahl an identifizierten Peptiden beziehungsweise Proteinen in proteomanalytischen Experimenten erhöht werden [136].

Sowohl ESI- als auch MALDI-MS/MS können für die Quantifizierung von iTRAQ-markierten Peptiden eingesetzt werden. In mehreren Publikationen wurde bereits demonstriert, dass unter Verwendung der iTRAQ-Reagenzien eine verlässliche und

akkurate Quantifizierung verschieden komplexer Proteinmischungen mit ESI und MALDI über zwei Größenordnungen möglich ist [137 - 139].

Vorbereitend für die Analyse mittels MALDI-MS/MS erfolgte die Fraktionierung der iTRAQ-markierten Proben wie bei den ESI-QTOF-Messungen über eine RP-Chromatographie. Nach erfolgter Trennung wurden die eluierten Peptide automatisch mit einem Dispensierroboter auf einen MALDI-Probenteller aufgetragen. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem MALDI-TOF/TOF-Gerät. Für die Auswertung der MALDI-Daten wurde ein kommerzielles Softwarepaket der Firma Bruker bestehend aus WarpLC, FlexAnalysis und ProteinScope verwendet, mit dem die komplette Auswertung der iTRAQ-Daten möglich war. Es erfolgte die Prozessierung der Rohdaten, das Erstellen der Peaklisten, sowie die Identifizierung und Quantifizierung mithilfe dieses Softwarepaketes.

Wie erwartet wurden mit MALDI und ESI analoge, aber auch komplementäre Peptide detektiert. In drei Proben wurden beispielsweise mittels MALDI-Messung vier Peptide des 78 kDa glucose-regulierten Proteins identifiziert, wobei alle Peptide die für MALDI typische einfache ($z=1$) Ladung trugen. In denselben Proben wurden mittels ESI-Messung sechs Peptide identifiziert, wobei Peptide auch als eigenständig gewertet wurden, wenn sie zwar die gleiche Aminosäuresequenz aufwiesen, aber in unterschiedlichen Ladungszuständen detektiert wurden. So wurde ein Peptid in zwei Ladungszuständen detektiert, nämlich mit einer zweifachen ($z=2$) und dreifachen ($z=3$) Ladung. Das Peptid, das in der ESI-Messung in zwei Ladungszuständen detektiert wurde, wurde ebenfalls mittels MALDI-Messung identifiziert, während die anderen drei Peptide aus der MALDI-Messung nicht mittels ESI-Messung identifiziert wurden. Umgekehrt wurden vier Peptide nur in der ESI-Messung detektiert.

Für die Validierung der ESI-Daten hinsichtlich der Quantifizierung wurden die prozessierten MS/MS-Spektren aus den MALDI- und ESI-Messungen miteinander verglichen. Der Vergleich ergab, dass ESI und MALDI bezüglich der Quantifizierung die gleiche Tendenz im Hinblick auf eine Konzentrationsänderung aufwiesen. Das Beispiel des 78 kDa glucose-regulierten Proteins spiegelt auch die Vergleichbarkeit der ESI- mit den MALDI-Daten im Hinblick auf die Quantifizierung wider. Abbildung 21 zeigt beispielhaft die m/z -Region der acht Reporterionen-Signale im MS/MS-Spektrum von zwei unterschiedlichen Peptiden, von denen das Peptid mit der Aminosäuresequenz VLEDSDLKK mittels ESI (siehe Abbildung 21 A) und das Peptid mit der Aminosäuresequenz KSDIDEIVLVGGSTR mittels MALDI (siehe Abbildung 21 B) detektiert worden waren.

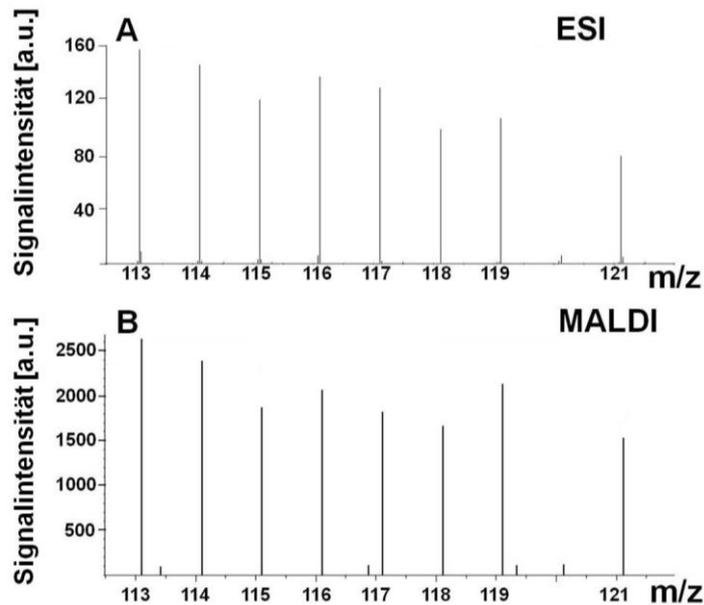


Abbildung 21: Signalintensitäten der Reporterionen von zwei komplementären Peptiden aus der ESI- und der MALDI-Analyse. Verglichen wurden beispielhaft die Signale der Reporterionen aus [A] dem ESI-MS/MS-Spektrum des Peptids mit der Aminosäuresequenz VLESDLKK und [B] dem MALDI-MS/MS-Spektrum des Peptids mit der Aminosäuresequenz KSDIDEIVLVGGSTR des 78 kDa glucose-regulierten Proteins.

Das 78 kDa glucose-regulierte Protein ist ein Beispiel dafür, dass MALDI als komplementäre Methode zu ESI geeignet ist im Hinblick auf die Quantifizierung von iTRAQ-basierten proteomanalytischen Experimenten. Ein zweites Beispiel ist das Hitzeschockprotein 70 kDa 1A/B, für das ebenfalls gleiche Tendenzen bezüglich der Peptid-Ratios aus ESI- und MALDI-Messungen bestimmt wurden. Sowohl die MALDI- als auch ESI-Messung ergab, dass die Proteinkonzentration nach 24-stündiger Proteasominhibition erhöht war im Vergleich zu der Kontrolle (vgl. Kapitel 3.7.2.1). Ein drittes Beispiel für die Vergleichbarkeit der ESI- und MALDI-Messung ist das Protein Vimentin, von dem ein detaillierter Vergleich der Quantifizierung mittels ESI- und MALDI-MS/MS in Kapitel 3.7.3.2.1 aufgeführt ist.

3.6 Ergebnisse der Identifizierungs- und Quantifizierungs-Pipeline der LC ESI-MS/MS-Analyse

Es wurden insgesamt 925 Proteine mit einem q-Wert $< 0,05$ in dem iTRAQ-Experiment mittels LC ESI-MS/MS identifiziert. Durch die Definition von Filterkriterien wurden weitere Proteine aussortiert und bei der Quantifizierung nicht berücksichtigt (vgl. Kapitel 2.2.11.1). Abhängig vom Versuchsansatz wurden letztendlich 352 bis 405 Proteine pro Ansatz quantifiziert (vgl. Kapitel 3.6.1.1). Aus den quantifizierten Proteinen sollten zum einen interessante Proteinkandidaten herausgearbeitet werden, bei denen eine Konzentrationsänderung unter Bortezomib beziehungsweise TNF- α beobachtet worden war. Zum anderen war es wichtig zu überprüfen, ob sich aus den Daten der iTRAQ-Analyse glaubhafte Ergebnisse erschließen ließen, um die Eignung des iTRAQ-basierten Quantifizierungsverfahrens zur Identifizierung zellulärer Mechanismen des Einflusses von Proteasominhibitoren auf die Metastasierung zu evaluieren.

Um eine effektive Interpretation der Daten zu ermöglichen, wurden die Daten nach einem Ordnungsprinzip strukturiert, indem die Proteine aufgrund ihrer gewichteten Protein-Ratio in Gruppen eingeteilt wurden (vgl. Kapitel 3.6.1). In einem nächsten Schritt wurden die Daten durch einen Vergleich mit der Literatur auf Zuverlässigkeit der Ergebnisse kontrolliert (vgl. Kapitel 3.7.1). Der finale Schritt war die Auswahl von Proteinkandidaten, bei denen in An- oder Abwesenheit von Bortezomib und TNF- α Konzentrationsänderungen auftraten, die möglicherweise eine Rolle bei der Metastasierung spielen (vgl. Kapitel 3.7.3).

3.6.1 Klassifizierung der Proteine nach ihren Protein-Ratios

Um die Daten zu strukturieren, wurden die Proteine zunächst aufgrund ihrer gewichteten Protein-Ratio in sieben Bereiche eingeteilt, welche in Tabelle 6 aufgezeigt sind. Die Einteilung erfolgte für jeden Ansatz einzeln und unabhängig vom biologischen Hintergrund des Experimentes. Es wurde ein Prinzip gewählt, bei dem Ober- und Untergrenzen definiert wurden. Dieses Verfahren wurde bereits bei früheren proteomanalytischen Experimenten angewendet. In einer Publikation definierte Seshi Proteine mit Ratios $> 1,25$ beziehungsweise $< 0,8$ als signifikant reguliert [140]. Salim *et al.* betrachteten Proteine als reguliert, wenn die Protein-Ratios einen Wert $> 1,20$ oder $< 0,83$ aufwiesen [141]. In dieser Arbeit wurde Proteinen mit einer Ratio $\geq 1,80$ ein starker Konzentrationsanstieg und Proteinen mit einer Ratio $\leq 0,50$ ein starker Konzentrationsabfall zugeteilt. Der gewählte Bereich für Proteine mit konstanter zellulärer Konzentration war vergleichbar zu den

erwähnten Publikationen und wurde festgelegt auf 0,85 - 1,20. Zusätzlich wurden vier weitere Bereiche definiert. Protein-Ratios zwischen 1,50 und 1,79 beziehungsweise zwischen 0,51 und 0,7 wurde ein mittelstarker Konzentrationsabfall beziehungsweise -anstieg zugesprochen, während Proteine mit Ratios zwischen 1,21 und 1,49 beziehungsweise zwischen 0,71 und 0,84 in die Gruppe eines schwachen Konzentrationsabfalls beziehungsweise -anstiegs eingeteilt wurden.

Abhängig vom betrachteten Versuchsansatz wiesen zwischen 1,3 % und 9,8 % der Proteine eine Ratio von $\geq 1,80$ oder $\leq 0,50$ und damit einen starken Konzentrationsanstieg beziehungsweise -abfall auf. Diese Daten wurden mit hoher Priorität bei der biologischen Interpretation berücksichtigt. Die Definition dieser strengen Grenzen führte somit zu einer starken Reduktion der Datenkomplexität. Zugleich konnte die Information über die Proteine, die in die Zwischenbereiche eingeteilt wurden, für eine zweite (Gruppe 4 und 5) beziehungsweise dritte (Gruppe 6 und 7) Dateninterpretation mit herabgestufter Priorität verwendet werden. Das angewandte Ordnungsprinzip ermöglichte die effektive Bestimmung interessanter Proteinkandidaten und diente als Basis für die Interpretation unter Berücksichtigung biologischer Aspekte.

Tabelle 6: Einteilung der Proteine aufgrund ihrer Protein-Ratios. Zum Ordnen der Daten wurden Ober- und Untergrenzen definiert. Das angewandte Ordnungsprinzip diente als Basis für die biologische Interpretation der Daten.

Gruppe	Definition	Protein-Ratio
1	keine Konzentrationsänderung	0,85 - 1,2
2	starker Konzentrationsabfall (↓)	$\leq 0,5$
3	starker Konzentrationsanstieg (↑)	$\geq 1,8$
4	mittelstarker Konzentrationsabfall (↓)	0,51 - 0,7
5	mittelstarker Konzentrationsanstieg (↑)	1,5 - 1,79
6	schwacher Konzentrationsabfall (↓)	0,71 - 0,84
7	schwacher Konzentrationsanstieg (↑)	1,21 - 1,49

3.6.1.1 Einzelbetrachtung der Protein-Ratios

Alle Proteine wurden aufgrund ihrer Protein-Ratio in die in Tabelle 6 vorgestellten Gruppen eingeteilt. Eine Übersicht über die Einteilung aller bei der Quantifizierung berücksichtigten Proteine ist in Tabelle 7 zu finden. Die Gesamtzahl an Proteinen unterscheidet sich zwischen den Versuchsansätzen aufgrund der in Kapitel 2.2.11.1 beschriebenen Filterkriterien.

Tabelle 7: Einteilung der Proteine aus den Versuchsansätzen. Alle bei der Quantifizierung berücksichtigten Proteine wurden aufgrund ihrer Protein-Ratios in die in Tabelle 6 vorgestellten Gruppen sortiert. Das angewandte Ordnungsprinzip ermöglichte die effektive Bestimmung interessanter Proteinkandidaten.

Ansatz	Anzahl zugeordneter Proteine							Gesamtzahl
	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6	Gruppe 7	
	keine Konzentrationsänderung	starker Konzentrationsabfall (↓)	starker Konzentrationsanstieg (↑)	mittelstarker Konzentrationsabfall (↓)	mittelstarker Konzentrationsanstieg (↑)	schwacher Konzentrationsabfall (↓)	schwacher Konzentrationsanstieg (↑)	
115:113	215	8	4	26	21	52	79	405
117:113	246	2	3	13	20	39	73	396
119:113	156	12	11	51	23	43	56	352
116:114	205	3	9	34	19	91	42	403
118:114	188	7	11	33	20	53	51	363
121:114	162	14	24	38	26	53	72	389

3.7 Identifizierte und quantifizierte Proteine der iTRAQ-Analyse

In diesem Kapitel werden ausgewählte Proteine aus dem iTRAQ-Experiment vorgestellt. Zunächst werden Proteine aufgezeigt, die für eine Validierung des iTRAQ-Experimentes herangezogen wurden, indem in der Literatur nach Ergebnissen gesucht wurde aus in vitro und in vivo Experimenten mit Proteasominhibitoren beziehungsweise dem Zytokin TNF- α . Ein Vergleich der Ergebnisse aus der Literatur mit den Ergebnissen des iTRAQ-Experimentes diente der Kontrolle der Zuverlässigkeit der Ergebnisse und damit der Eignung des durchgeführten iTRAQ-Experimentes. Die ausgewählten Proteine waren in der Literatur als nicht reguliert (Kapitel 3.7.1) oder als reguliert (Kapitel 3.7.2) unter Bortezomib beziehungsweise TNF- α beschrieben worden. Im Anschluss werden in Kapitel 3.7.3 Proteinkandidaten vorgestellt, bei denen in den Versuchsansätzen des iTRAQ-

Experimentes erhöhte beziehungsweise erniedrigte Protein-Ratios berechnet wurden, was eine Konzentrationsänderungen in Bezug auf die Kontrolle bedeutete. Die vorgestellten Proteinkandidaten sind entweder in der Literatur noch nicht im Zusammenhang mit Proteasominhibition beziehungsweise TNF- α beschrieben worden oder waren besonders interessant im Hinblick auf eine Beteiligung bei Metastasierungsprozessen.

Tabelle 8 ist die Legende für die in den Kapiteln 3.7.1.2 - 3.7.3.5 verwendeten Abkürzungen, die in den Abbildungen zur Darstellung der Protein-Ratios in Form von Säulendiagrammen wiedergefunden werden können.

Tabelle 8: Legende für die in den Säulendiagrammen in den Kapiteln 3.7.1 - 3.7.3 verwendeten Abkürzungen.

Protein-Ratio	Abkürzung	Beschreibung des Ansatzes
115:113	K 1 h+TNF	HPMECs wurden 1 h mit Kontrolllösung behandelt und anschließend mit TNF- α stimuliert
117:113	B 1 h	HPMECs wurden 1 h mit Bortezomib behandelt
119:113	B 1 h+TNF	HPMECs wurden 1 h mit Bortezomib behandelt und anschließend mit TNF- α stimuliert
116:114	K 24 h+TNF	HPMECs wurden 24 h mit Kontrolllösung behandelt und anschließend mit TNF- α stimuliert
118:114	B 24 h	HPMECs wurden 24 h mit Bortezomib behandelt
121:114	B 24 h+TNF	HPMECs wurden 24 h mit Bortezomib behandelt und anschließend mit TNF- α stimuliert

3.7.1 Vergleich der experimentellen Daten aus der iTRAQ-Analyse mit der Literatur

3.7.1.1 Proteine konstanter zellulärer Konzentration unter Bortezomib oder TNF- α

Die Bestimmung der relativen Genexpression und Proteinsynthese wird experimentell oft durch einen Vergleich von Signalen einer Probe in Bezug auf Signale einer internen Referenz oder Kontrolle durchgeführt. Typischerweise werden als Referenzproteine Strukturproteine oder Enzyme eingesetzt, die beteiligt sind an der Aufrechterhaltung grundlegender Zellfunktionen, wie zum Beispiel des Glukose-Stoffwechsels. Ubiquitär und konstitutiv exprimierte Gene kodieren häufig solche Strukturproteine oder Enzyme. Beispiele sind die Proteine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), β -Actin und β -Tubulin. Bei der Verwendung dieser Proteine als interne Referenzproteine wird davon ausgegangen, dass sie in konstanter Konzentration in unterschiedlichen Proteinproben vorhanden sind. Ihre Konzentration ist unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen. Referenzproteine werden beispielsweise routinemäßig als

Ladekontrolle in Western Blots eingesetzt. Auf das Signal des Referenzproteins wird das Signal des Zielproteins normalisiert. So werden durch die Normalisierung technische Unterschiede aufgehoben. Beim Western Blot können zum Beispiel Unterschiede auftreten durch eine ungleichmäßige Beladung der Gele oder durch einen inhomogenen Transfer der Proteine vom Gel auf die Blot-Membran.

Bei der Auswertung der iTRAQ-Analyse dienten unter anderem solche Referenzproteine der Validierung der experimentellen Daten. Es erfolgte eine gezielte Literaturrecherche nach experimentellen Arbeiten, bei denen kultivierte Zellen mit TNF- α oder einem Proteasominhibitor behandelt worden waren und bei denen im Anschluss eine (semi-) quantitative Auswertung der Proteinkonzentrationen erfolgt war.

Es existieren zahlreiche Publikationen, in denen Zellen mit Bortezomib oder TNF- α behandelt worden waren und in denen die Zelllysate anschließend mittels Western Blot untersucht wurden [142 - 154]. In diesen Arbeiten wurden häufig Ladekontrollen durch den Nachweis von konstitutiv synthetisierten Proteinen wie β -Actin durchgeführt. β -Actin wies dabei konstante zelluläre Konzentrationen auf, was zeigt, dass β -Actin unter den jeweiligen Versuchsbedingungen weder unter Bortezomib noch unter TNF- α reguliert war.

Im iTRAQ-Experiment wurde β -Actin zwar mit 84 Peptiden identifiziert, allerdings war davon keines eindeutig für β -Actin. Stattdessen konnten die Peptidsequenzen neben β -Actin auch anderen Proteinspezies des Actins zugeordnet werden. Die Superfamilie der Actine, zu der auch die actin-verwandten Proteine gezählt werden, weist eine hohe Sequenzhomologie auf und die verschiedenen Actin-Spezies unterscheiden sich hauptsächlich in der Aminosäuresequenz am N-Terminus [155 - 157]. Werden bei immunanalytischen Detektionsverfahren spezifische Antikörper eingesetzt, können die Actin-Spezies unterschieden werden. Bei MS-basierten Methoden muss das nicht der Fall sein: werden lediglich Peptide identifiziert, die nicht eindeutig sind und die demnach nicht einer einzigen Proteinspezies zugeordnet werden können, ist keine eindeutige Identifizierung möglich. Aus diesem Grund wurde β -Actin nicht für die Validierung der Ergebnisse aus dem iTRAQ-Experiment eingesetzt, wohl aber als Ladekontrolle bei Western Blots (vgl. Kapitel 3.8).

In den Daten aus dem iTRAQ-Experiment wurde daraufhin gezielt nach weiteren Referenzproteinen gesucht, die in der Literatur unter ähnlichen Versuchsbedingungen in Anwesenheit eines Proteasominhibitors oder TNF- α als invariant beschrieben worden waren, um die Eignung des iTRAQ-basierten Quantifizierungsverfahrens zu untersuchen.

3.7.1.2 β -Tubulin

Das Protein β -Tubulin ist das Hauptprotein der Mikrotubuli. Es ist damit ein Strukturprotein des Zytoskeletts. Es wurde bereits eingesetzt als Ladekontrolle für Western Blots in Experimenten, in denen kultivierte Zellen mit Bortezomib [142 - 144] oder TNF- α [145 - 148] behandelt wurden. In den in der Literatur publizierten Ergebnissen aus den Western Blots wurden für β -Tubulin weder unter Bortezomib noch unter TNF- α Konzentrationsänderungen festgestellt.

In dem iTRAQ-Experiment wurde β -Tubulin mit sechs eindeutigen Peptiden identifiziert. Abbildung 22 zeigt die gewichteten Protein-Ratios mit den gewichteten Standardabweichungen für die sechs Versuchsansätze. In den Versuchsansätzen der Inkubationszeit „1 h“ wurde für β -Tubulin keine Konzentrationsänderung in Bezug auf die Kontrolle festgestellt, weder nach TNF- α -Stimulation, Bortezomib-Behandlung, noch der Kombination aus Bortezomib mit anschließender TNF- α -Stimulation. Ähnlich sah es in den Versuchsansätzen der Inkubationszeit „24 h“ aus. Hier waren die Protein-Ratios in allen drei Versuchsansätzen etwas erniedrigt im Vergleich zu der Inkubationsdauer von 1 h. Der Vergleich untereinander zeigte aber, dass alle eine Protein-Ratio um 0,83 aufwiesen, weshalb ihnen insgesamt keine Konzentrationsänderung zugesprochen wurde. Damit war in keinem Versuchsansatz eine Konzentrationsänderung festgestellt worden. Diese Beobachtung korrespondiert mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen und ist ein Beispiel für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse des iTRAQ-Experimentes.

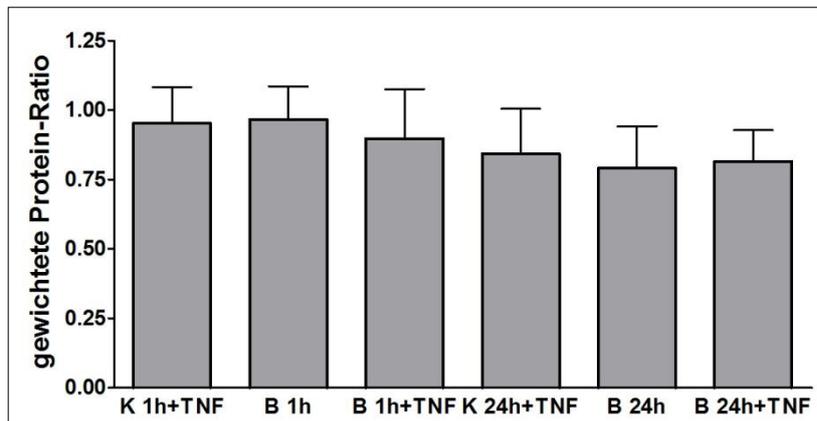


Abbildung 22: Relative Proteinkonzentrationen von β -Tubulin. Dargestellt sind die gewichteten Protein-Ratios und die gewichteten Standardabweichungen berechnet aus sechs Peptiden. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 8 erklärt.

3.7.1.3 GAPDH

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wird in seiner Funktion als Enzym der Glykolyse als Ladekontrolle in Western Blots eingesetzt. Es ist bereits verwendet worden in Western Blots mit Lysaten von kultivierten Zellen, die mit Bortezomib [149 - 151] oder TNF- α [152 - 154] behandelt worden waren. GAPDH war in diesen Experimenten weder unter Bortezomib noch unter TNF- α reguliert und lag stets in konstanten zellulären Konzentrationen vor. GAPDH eignete sich somit als Protein für einen Vergleich der experimentellen Daten aus dem iTRAQ-Experiment und Daten aus der Literatur, bei dem folglich in keinem Versuchsansatz des iTRAQ-Experimentes eine Konzentrationsänderung beobachtet werden dürfte.

GAPDH wurde in dem iTRAQ-Versuch mit 16 eindeutigen Peptiden identifiziert, wobei Peptide auch als eigenständig gezählt wurden, wenn sie zwar eine identische Peptidsequenz aufwiesen, aber in unterschiedlichen Ladungszuständen vorlagen oder in unterschiedlichen Fraktionen aus der isoelektrischen Fokussierung detektiert wurden. Wie Abbildung 23 zeigt, war weder unter Bortezomib, TNF- α oder der Kombination aus beiden Substanzen eine Konzentrationsänderung im Vergleich zu der Kontrolle beobachtet worden. Das galt sowohl für die Inkubationszeit „1 h“ als auch für die Inkubationszeit „24 h“. Das korrespondiert mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen und demonstriert die Plausibilität des durchgeführten iTRAQ-Experimentes.

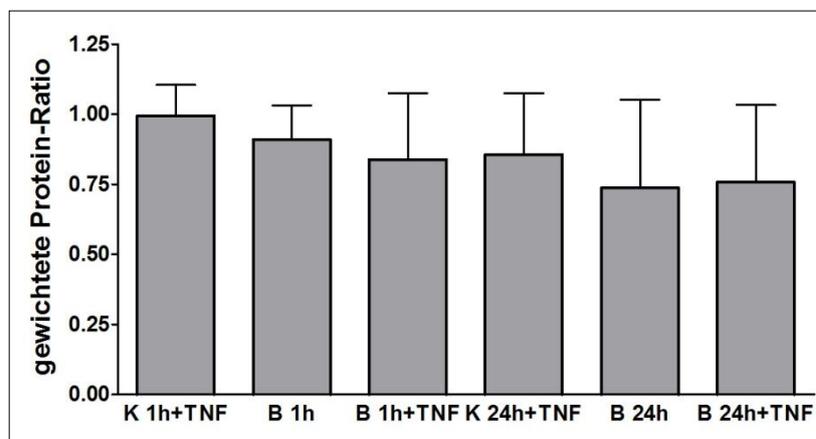


Abbildung 23: Relative Proteinkonzentrationen des Enzyms GAPDH. Dargestellt sind die gewichteten Protein-Ratios und die gewichteten Standardabweichungen berechnet aus 16 Peptiden für K 1h+TNF und B 1h, beziehungsweise berechnet aus 15 Peptiden für die übrigen Ansätze. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 8 erklärt.

3.7.1.4 Hitzeschockproteine 90 kDa

Das Hitzeschockprotein 90-alpha (HSP90-alpha) wurde in dem iTRAQ-Experiment mit elf Peptiden identifiziert, von denen fünf bei der Quantifizierung berücksichtigt wurden. Weder nach 1-stündiger noch nach 24-stündiger Behandlung mit Bortezomib oder der Trägerlösung PBS mit und ohne TNF- α -Stimulation wurde eine Konzentrationsänderung von HSP90-alpha gemessen (siehe Abbildung 24). Gleiches wurde für das Hitzeschockprotein HSP90-beta beobachtet, das ebenfalls unter den jeweiligen Versuchsbedingungen des iTRAQ-Experimentes in konstanter zellulärer Konzentration vorlag.

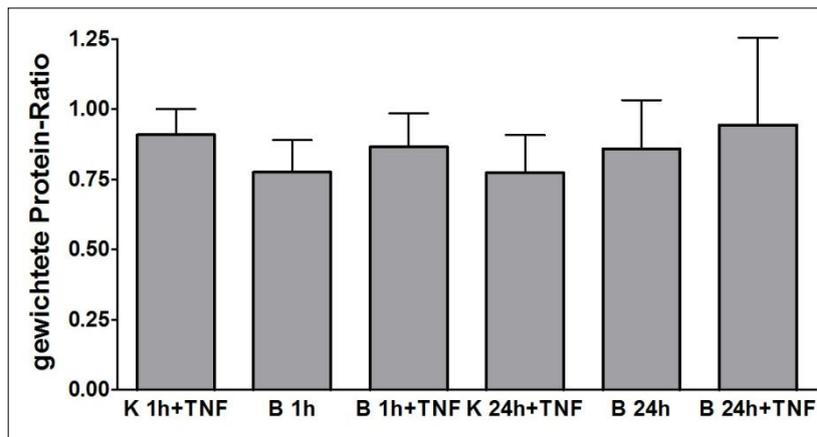


Abbildung 24: Relative Konzentrationen des Hitzeschockproteins HSP 90-alpha. Dargestellt sind die gewichteten Protein-Ratios und die gewichteten Standardabweichungen berechnet aus fünf Peptiden. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 8 erklärt.

Diese Beobachtung ist ebenfalls in der Literatur beschrieben [158, 159]. Die Induktion von Hitzeschockproteinen scheint jedoch abhängig zu sein von der Zelllinie. In einigen Studien induzierte eine Proteasominhibition die Expression von diversen Hitzeschockproteinen [160, 161]. Kawazoe *et al.* beobachteten einen Anstieg von HSP90, HSP70A, HSP70B, HSP40 und HSP25 in der kultivierten Erythroblastenzelllinie HD6 vom Huhn, nachdem die Zellen 6 h mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt worden waren [162]. HSP70- und HSP90-Proteinlevel waren ebenfalls nach 2- und 6-stündiger MG132-Behandlung deutlich erhöht in Zellen der humanen, akuten myelozytischen Leukämie-Zelllinie K563 [163]. In der humanen Leberkarzinomzelllinie Hep G2 wurde unter dem Proteasominhibitor *N*-Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal (ALLN) hingegen nach 4 h keine Veränderung der Proteinkonzentration von HSP90 verzeichnet [158]. Stangl *et al.* haben ebenfalls keine Veränderung der HSP90-Proteinkonzentration detektiert in Western Blots mit Lysaten von kultivierten Endothelzellen aus Rinderlungenarterien, die 24 h mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt worden waren [159]. Die Endothelzellen der Rinderlungenarterien dürften den HPMECs morphologisch am ähnlichsten sein von den in der Literatur

eingesetzten Zelllinien, in denen die Konzentration von HSP90 unter Proteasominhibition untersucht wurde [164]. Die Beobachtung bezüglich HSP90-alpha und HSP90-beta von Stangl *et al.* stimmten mit den Ergebnissen des iTRAQ-Experimentes überein, was ein weiteres Beispiel für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse der iTRAQ-Analyse darstellt.

3.7.2 Proteine mit veränderter Konzentration unter Bortezomib oder TNF- α

3.7.2.1 Hitzeschockproteine 70 kDa

Das Hitzeschockprotein 70 kDa 1A/B wurde in der iTRAQ-Analyse mit zwei eindeutigen Peptiden identifiziert, von denen eines für die Quantifizierung berücksichtigt wurde.

Die Konzentration des Hitzeschockproteins 70 kDa 1A/B war nach 1-stündiger Bortezomib-Behandlung mit anschließender TNF- α -Stimulation schwach erhöht im Vergleich zu der Kontrolle. Unter alleiniger Bortezomib-Behandlung beziehungsweise TNF- α -Stimulation wurde keine Veränderung der Konzentration in Bezug auf die Kontrolle beobachtet. Die 24-stündige Behandlung der HPMECs mit der Kontrolllösung PBS und anschließender TNF- α -Stimulation bewirkte ebenfalls keine Konzentrationsänderung. Nach 24-stündiger Inkubation mit Bortezomib mit und ohne TNF- α -Stimulation war die Konzentration des Hitzeschockprotein 70 kDa 1A/B hingegen um das 4,1-fache beziehungsweise um das 3,6-fache erhöht in Bezug auf die Kontrolle (siehe Abbildung 25).

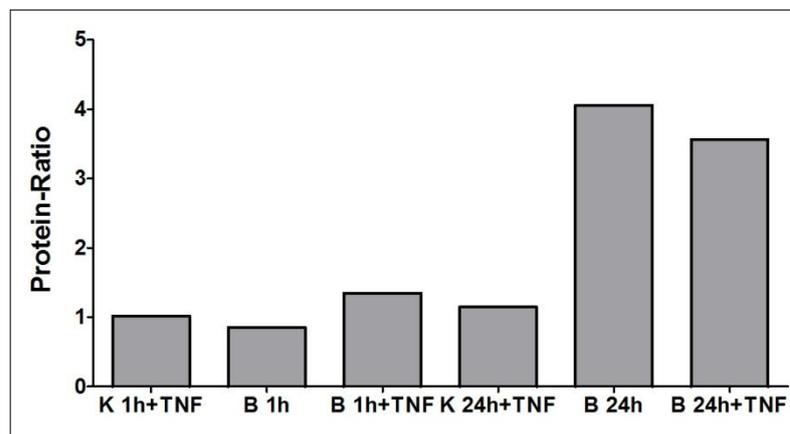


Abbildung 25: Relative Konzentrationen des Hitzeschockproteins 70 kDa 1A/B. Dargestellt sind die Protein-Ratios für das Hitzeschockprotein 70 kDa 1A/B, das mit einem Peptid quantifiziert wurde. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 8 erklärt.

Die Ergebnisse der MALDI-Messung ergaben die gleiche Tendenz, denn es ist ebenfalls beobachtet worden, dass die Konzentration nach 24-stündiger Proteasominhibition mit und ohne TNF- α -Stimulation erhöht war im Vergleich zu der Kontrolle und der alleinigen

TNF- α -Stimulation. Ähnliche Protein-Ratios wurden mittels ESI-Messung auch für das 1-ähnliche Hitzeschockprotein 70 kDa beobachtet, dessen Konzentration nach der 24-stündigen Bortezomib-Inkubation mit und ohne TNF- α -Stimulation ebenfalls stark erhöht war im Vergleich zu der alleinigen TNF- α -Stimulation.

HSP70-Proteine sind Chaperonproteine, die an einer Vielzahl von Faltungsprozessen beteiligt sind, zum Beispiel der Faltung von neu synthetisierten Proteinen oder der erneuten Faltung von fehlgefalteten sowie aggregierten Proteinen [165 - 169]. HSP70-Proteine nehmen eine Kontrollfunktion ein, indem sie die Qualität von Proteinen durch Korrekturlesen der Proteinstruktur prüfen und gegebenenfalls dessen Reparatur vornehmen [170].

Es ist bekannt, dass eine Proteasominhibition eine erhöhte zelluläre Konzentration von HSP70-Proteinen verursacht. Bush *et al.* haben eine gesteigerte mRNA-Expression unter Proteasominhibition nach 2 h gemessen [160]. Zhou *et al.* haben eine erhöhte HSP70-Konzentration sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene in der humanen Leberkarzinomzelllinie Hep G2 und in mikrovaskulären Endothelzellen nach 4-stündiger Proteasominhibition beobachtet [158]. Meiners *et al.* haben ebenfalls eine erhöhte Konzentration an HSP70-mRNA nach Behandlung von primären vaskulären, glatten Muskelzellen der Ratte mit dem Proteasominhibitor MG132 beschrieben [171]. Die Steigerung war zeit- und dosisabhängig. In Anwesenheit von 0,1 μ M MG132 wurde ein Anstieg der HSP70-mRNA nach 4 h verzeichnet. Die höchste Konzentration wurde nach 6 h und einer Dosis von 0,5 μ M oder 1 μ M MG132 verzeichnet. Bei einer niedrigen Dosis von 50 nM MG132 wurde eine erste Zunahme der HSP70-mRNA nach 12 h gemessen, die im Vergleich zu den höheren Dosen niedriger ausfiel. Der Anstieg von HSP70 wurde mittels Western Blot auch auf Proteinebene nachgewiesen unter der Verwendung von Lysaten von Zellen, die 8 h mit den Proteasominhibitoren MG132 oder c-Lactacystin behandelt worden waren [171].

Wie im iTRAQ-Experiment wurde nach einer 1-stündigen Proteasominhibition in keiner Publikation ein Anstieg der HSP70-Proteine verzeichnet, wohingegen der im iTRAQ-Experiment dokumentierte Anstieg des Hitzeschockproteins 70 kDa 1A/B nach 24-stündiger Bortezomib-Behandlung mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen übereinstimmt. Damit sind das Hitzeschockprotein 70 kDa 1A/B und das 1-ähnliche Hitzeschockprotein 70 kDa weitere Beispiele, die die Zuverlässigkeit der Ergebnisse des iTRAQ-Experimentes demonstrieren.

3.7.2.2 Proteasom-Untereinheiten

Das Proteasom ist aus mindestens 32 Untereinheiten aufgebaut [172 - 174]. In Abbildung 26 ist ein 26S Proteasom schematisch dargestellt, das aus einer 20S-Einheit und zwei regulatorischen 19S-Einheiten aufgebaut ist. Die 20S-Einheit und die 19S-Einheiten sind nochmals unterteilt in die Untereinheiten α und β der 20S-Einheit beziehungsweise Rpn (regulatory particle non-ATPase) und Rpt (regulatory particle triple-ATPase) der 19S-Einheit. Im LC ESI-MS/MS-Experiment wurden 13 Proteasom-Untereinheiten identifiziert, die in Abbildung 26 durch eine dicke Umrandung hervorgehoben sind. Es wurden sowohl Proteasom-Untereinheiten der 19S-regulatorischen Einheit als auch der 20S-Einheit identifiziert. Im Anhang sind zusätzliche Informationen zu den 13 identifizierten Untereinheiten aufgelistet, unter anderem soweit bekannt die Eigenschaften und Funktionen der jeweiligen Untereinheit (siehe Kapitel 6.1).

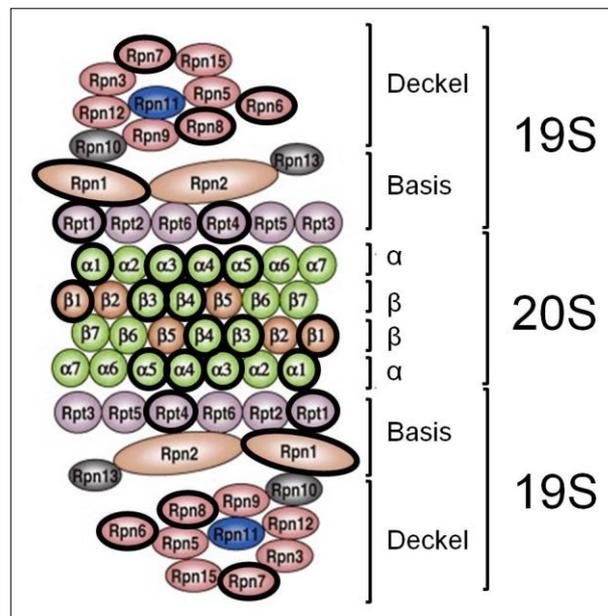


Abbildung 26: Schematische Darstellung des 26S Proteasoms und seinen Untereinheiten. Zwei 19S-Einheiten können jeweils unten und oben an die 20S-Einheit andocken und bilden so das 26S Proteasom. Die 19S regulatorische Einheit besteht aus einem Deckel- und Basis-Modul, die aufgebaut sind aus Rpn- und Rpt-Untereinheiten. Die α - und β -Untereinheiten des 20S-Proteasoms bilden zusammen einen röhrenförmigen Komplex, den katalytischen Kern des Proteasoms. Die im iTRAQ-Experiment mittels LC ESI-MS/MS identifizierte Untereinheiten sind durch eine dicke Umrandung gekennzeichnet. Modifiziert nach [175].

Die Signale der Reporterionen der meisten Peptide von den identifizierten Proteasom-Untereinheiten wurden im iTRAQ-Experiment mit sehr niedrigen Signalintensitäten detektiert. Die Signalintensitäten der Reporterionen-Signale lagen oft < 20 , weshalb diese Peptide und damit die Proteine von der Quantifizierung ausgeschlossen wurden. Die Proteasom-Untereinheiten α_1 , α_3 und α_4 haben hingegen den Filterkriterien standgehalten und wurden bei der Quantifizierung berücksichtigt (vgl. Kapitel 2.2.11.1).

Die Konzentration der Proteasom-Untereinheit $\alpha 3$ war nach 1-stündiger Behandlung mit der Kontrolllösung PBS und anschließender Stimulation mit TNF- α mittelstark erniedrigt und bei vorangegangener 1-stündiger Bortezomib-Behandlung mit einer Protein-Ratio von 0,50 stark erniedrigt. Nach alleiniger 1-stündiger Bortezomib-Behandlung wurde keine Konzentrationsänderung der $\alpha 3$ -Untereinheit beobachtet. Nach 24-stündiger Inkubation mit der Trägerlösung PBS und anschließender Stimulation mit TNF- α wurde für die $\alpha 3$ -Untereinheit ein mittelstarker Konzentrationsabfall mit einer Protein-Ratio von 0,64 registriert im Vergleich zu der Kontrolle. Hingegen war die Konzentration der $\alpha 3$ -Untereinheit nach der 24-stündigen Bortezomib-Behandlung mit und ohne TNF- α -Stimulation mit einer Protein-Ratio von 1,69 beziehungsweise 1,72 mittelstark erhöht (Abbildung 27 A).

In den drei Versuchsansätzen der Inkubationszeit „1 h“ wurde für die Proteasom-Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 4$ keine Konzentrationsänderung im Vergleich zu der Kontrolle festgestellt. Nach 24-stündiger Inkubation mit der Trägerlösung PBS und anschließender Stimulation mit TNF- α war die Konzentration der $\alpha 1$ -Untereinheit schwach erniedrigt und die Konzentration der $\alpha 4$ -Untereinheit konstant in Bezug auf die Kontrolle. Hingegen wurde für die $\alpha 1$ -Untereinheit nach 24-stündiger Bortezomib-Behandlung ohne TNF- α -Stimulation mit einer Protein-Ratio von 1,6 und nach 24-stündiger Bortezomib-Behandlung plus TNF- α -Stimulation mit einer Protein-Ratio von 1,78 eine mittelstarke Konzentrationserhöhung registriert. Die Konzentration der Proteasom-Untereinheit $\alpha 4$ war unter diesen Versuchsbedingungen stark erhöht: nach 24-stündiger Inkubation der HPMECs mit Bortezomib betrug die Protein-Ratio ohne TNF- α -Stimulation 2,4 und mit TNF- α -Stimulation 2,7 (siehe Abbildung 27 B und C).

In der Literatur ist beschrieben, dass unter Proteasominhibition die Genexpression von Proteasom-Untereinheiten hochreguliert ist, was mit einer Zunahme der Proteasom-Untereinheiten auf Proteinebene einhergeht. Meiners *et al.* haben primäre vaskuläre, glatte Muskelzellen aus der Ratte mit den Proteasominhibitoren MG132 oder c-Lactacystin behandelt [171]. Die Inhibition der proteolytischen Aktivität und die Hochregulation der Untereinheiten des Proteasoms auf RNA-Ebene waren abhängig von der Konzentration des Proteasominhibitors und der Dauer der Inkubation. Nach 12 h wurde bei hohen Konzentrationen des Proteasominhibitors c-Lactacystin die höchste Hemmung der proteolytischen Aktivität gemessen. Nach 24 h Inkubation mit c-Lactacystin war die proteolytische Aktivität höher im Vergleich zu der 12 h Inkubation, war aber nach 24 h immer noch um circa 50 % reduziert im Vergleich zur Kontrolle. Damit korrelierte die Zunahme der Hemmung der proteolytischen Aktivität mit dem Anstieg der gemessenen mRNA-Konzentrationen der Proteasom-Untereinheiten. In weiterführenden Experimenten haben Meiners *et al.* nachgewiesen, dass unter den Proteasominhibitoren neben der Gen-

Expression auch die de novo Proteinsynthese von den meisten Proteasom-Untereinheiten gesteigert war [171]. Die in der Literatur beschriebene Zunahme der Proteasom-Untereinheiten auf Proteinebene ist ebenfalls für die drei Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$ im iTRAQ-Experiment nach 24-stündiger Proteasominhibition beobachtet worden und ist somit ein weiteres Beispiel für die Plausibilität der Daten aus dem iTRAQ-Experiment.

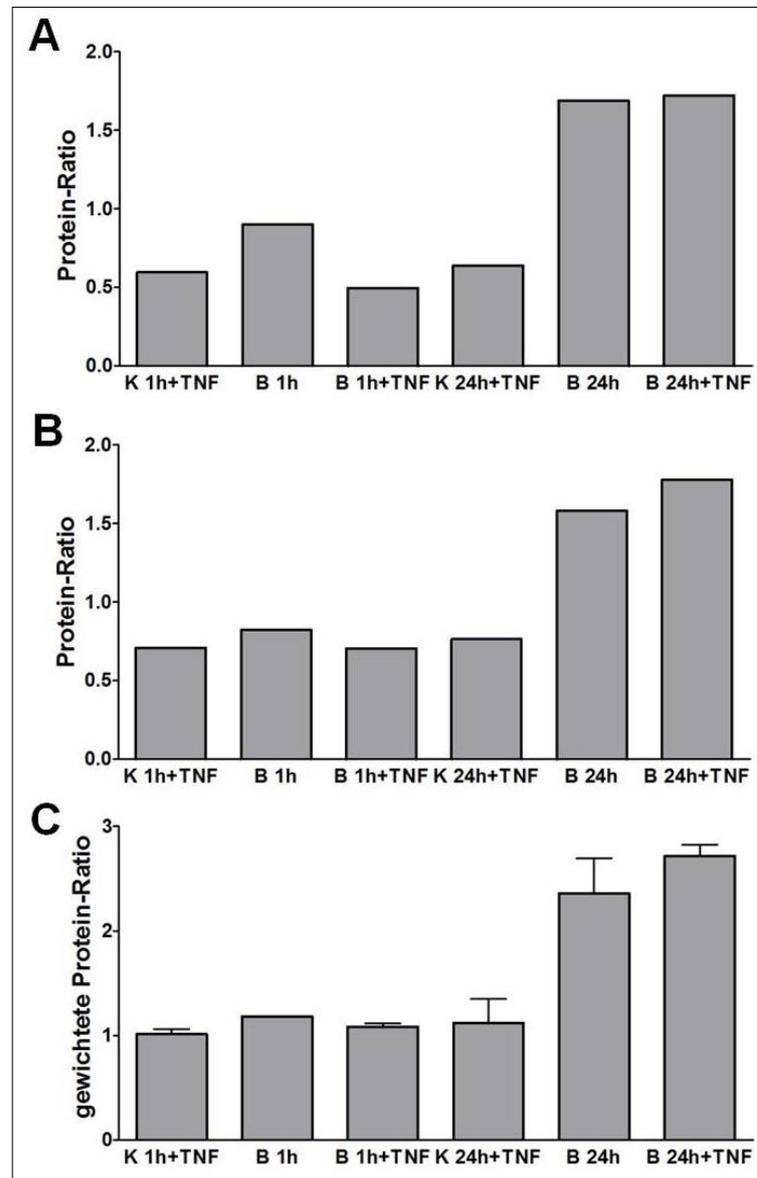


Abbildung 27: Relative Proteinkonzentrationen der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$ des 20S-Proteasoms. [A] Die Proteasom-Untereinheit $\alpha 3$ wurde mit einem Peptid identifiziert. [B] Die Proteasom-Untereinheit $\alpha 1$ wurde ebenfalls mit einem Peptid identifiziert. [C] Die Proteasom-Untereinheit $\alpha 4$ wurde mit zwei Peptiden identifiziert, mit deren Peptid-Ratios die gewichtete Protein-Ratio und die gewichtete Standardabweichung berechnet wurde. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 8 erklärt.

3.7.2.3 Ubiquitin

Die posttranslationale Modifizierung von Proteinen mit Ubiquitin spielt eine essentielle Rolle bei einer Vielzahl an zellulären Prozessen (siehe Review [54]). Eine wichtige Funktion von Ubiquitin ist zum Beispiel die Markierung von Proteinen für die proteasomale Degradation. Ubiquitin wird in Säugetieren als Vorläuferform exprimiert, welche von vier Genen kodiert wird. Zwei Gene kodieren das Polyubiquitin B und das Polyubiquitin C. Die anderen zwei Gene kodieren Ubiquitin, das mit dem 40S ribosomalen Protein 27a oder mit dem 60S ribosomalen Protein L40 fusioniert vorliegen kann [176]. Die Ubiquitin-Vorläuferformen werden von DUBs zu identischen, funktionellen Ubiquitin-Monomeren gespalten [177]. Weil identische Ubiquitin-Monomere aus den Vorläuferformen entstehen, wurden die im iTRAQ-Experiment detektierten Ubiquitin-Peptide bei der weiteren Auswertung berücksichtigt, obwohl sie aufgrund ihrer Aminosäuresequenz jedem der vier bekannten Gene UBB, UBC, UBA52 und RPS27A zugeordnet werden konnten und deshalb nicht eindeutig einem Gen zugewiesen werden konnten.

Im iTRAQ-Experiment wurde Ubiquitin mit fünf Peptiden identifiziert und quantifiziert. Nach der Inkubationsdauer von 1 h war die Ubiquitin-Konzentration weder unter alleiniger TNF- α -Stimulation, alleiniger Bortezomib-Behandlung noch unter Bortezomib-Behandlung plus TNF- α -Stimulation verändert in Bezug auf die Kontrolle. Nach der 24-stündigen Behandlung mit der Kontrolllösung PBS und anschließender TNF- α -Stimulation war die Ubiquitin-Konzentration im Vergleich zu der Kontrolle ebenfalls konstant in Bezug auf die Kontrolle. Hingegen war die Ubiquitin-Konzentration nach 24-stündiger Behandlung mit Bortezomib mit und ohne TNF- α -Stimulation signifikant erhöht im Vergleich zu den nicht mit Bortezomib behandelten Zellen ($p < 0,05$, siehe Abbildung 28).

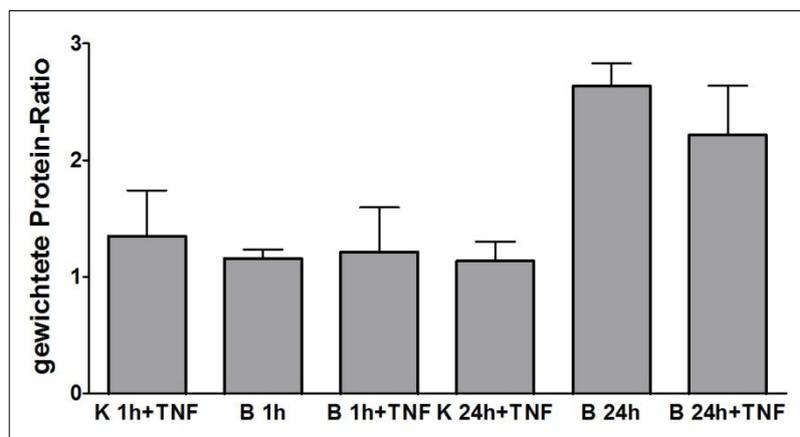


Abbildung 28: Relative Proteinkonzentrationen von Ubiquitin. Dargestellt sind die gewichteten Protein-Ratios und die gewichteten Standardabweichungen berechnet aus fünf Peptiden. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 8 erklärt.

Bush *et al.* haben gezeigt, dass in der epithelialen Zelllinie Madin-Darby aus der Hundeniere (MDCK) neben der mRNA-Expression von HSP70 auch die die mRNA-Expression von Polyubiquitin unter Proteasominhibition deutlich zunimmt. Die Gesamtproteinsynthese veränderte sich hingegen innerhalb des getesteten Zeitraumes von 18 h nicht, was allerdings unspezifisch bestimmt wurde über den Einbau von ³⁵S-markiertem Methionin [160]. Ebenfalls erhöht war die Genexpression nach Proteasominhibition in der murinen, embryonalen Fibroblastenzelllinie MEF [178]. Kaiser *et al.* haben den Anstieg an Gesamt-Ubiquitin in MEF nach Proteasominhibition auch auf Proteinebene nachgewiesen. Jedoch wurde in der gleichen Studie kein Anstieg an Gesamt-Ubiquitin in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HK293 beobachtet, weshalb die Antwort auf eine Proteasominhibition bezüglich der Ubiquitin-Pools abhängig zu sein scheint von der kultivierten Zelllinie [179].

Es werden zwei Ubiquitin-Pools in der Zelle unterschieden: zum einen ein Pool bestehend aus freien Ubiquitin-Molekülen und zum anderen ein Pool bestehend aus Ubiquitin-Substrat-Konjugaten (ubiquitinylierte Proteine), die über das Enzymsystem aus E1, E2, E3 und DUBs im Gleichgewicht gehalten werden. Die Akkumulation von ubiquitinylierten Proteinen ist eine bekannte Antwort auf eine Proteasominhibition. Die Degradation der ubiquitinylierten Proteine durch das Proteasom ist unter Proteasominhibition nicht möglich, weshalb es zu einem Anstieg an ubiquitinylierten Proteinen in der Zelle kommt [171, 180, 181].

Die iTRAQ-Technologie unter Verwendung des Bottom-up Ansatzes erlaubte die Quantifizierung des gesamten Ubiquitin-Pools, der sowohl das freie als auch das konjugierte Ubiquitin einschloss. Während des tryptischen Verdauens wurden aus dem gebundenen und freien Ubiquitin identische tryptische Peptide generiert, weshalb eine Diskriminierung der zwei Ubiquitin-Pools im iTRAQ-Experiment nicht möglich war.

Nach 1-stündiger Proteasominhibition wurde in dem iTRAQ-Experiment keine Änderung der Ubiquitin-Konzentration festgestellt, während die 24-stündige Proteasominhibition einen Anstieg der Ubiquitin-Konzentration bewirkte. Mittels Western Blot wurde gezeigt, dass in HPMECs unter Bortezomib die Konzentration an ubiquitinylierten Proteinen mit der Dauer der Inkubation zunimmt (vgl. Kapitel 3.8). Übereinstimmend mit dem iTRAQ-Experiment ergab der Nachweis ubiquitinylierter Proteine mittels Western Blot lediglich einen vernachlässigbaren Anstieg der Konzentration an ubiquitinylierten Proteinen nach 1-stündiger Proteasominhibition, während ein deutlicher Konzentrationsanstieg an ubiquitinylierten Proteinen nach 24 h Proteasominhibition verzeichnet wurde (siehe Abbildung 36). Die Zunahme ubiquitinylierter Proteine könnte den in der iTRAQ-Analyse beobachteten Konzentrationsanstieg von Ubiquitin nach Proteasominhibition verursacht haben.

Für eine Zunahme von freiem Ubiquitin unter Proteasominhibition spricht des Weiteren, dass Ubiquitin neben dem lysosomalen Weg zum großen Teil selbst durch Proteasomen abgebaut wird [182 - 184]. Neben der Akkumulation ubiquitinylierter Substrate unter Proteasominhibition wäre damit die Akkumulation von Ubiquitin selbst denkbar, was den im iTRAQ-Experiment beobachteten Anstieg der Ubiquitin-Konzentration nach 24-stündiger Proteasominhibition erklären würde.

3.7.3 Proteinkandidaten mit veränderter Konzentration unter Bortezomib oder TNF- α

In diesem Kapitel werden Proteinkandidaten vorgestellt, bei denen im iTRAQ-Experiment unter Bortezomib oder TNF- α erhöhte beziehungsweise erniedrigte Protein-Ratios beobachtet wurden, was eine potentielle Regulation durch Proteasominhibition oder TNF- α bedeutet. Die ausgewählten Proteinkandidaten liefern Hinweise auf mögliche neue Mechanismen, die eine Metastasierung unter Proteasominhibition verhindern. Eine Interpretation der in diesem Kapitel vorgestellten Proteinkandidaten unter Berücksichtigung des biologischen Hintergrundes und möglicher zellulärer Mechanismen erfolgt in Kapitel 4.

3.7.3.1 Caveolin-1

Caveolin-1 wurde in der LC ESI-MS/MS-Messung mit einem Peptid identifiziert und quantifiziert. Nach 1-stündiger Behandlung mit der Kontrolllösung PBS plus anschließender TNF- α -Stimulation war die Konzentration von Caveolin-1 um den Faktor 0,68 mittelstark erniedrigt. Alleinige Behandlung mit 20 nM Bortezomib für 1 h ohne anschließende TNF- α -Stimulation hatte keinen Einfluss auf die Caveolin-1-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle, während die 1-stündige Behandlung mit Bortezomib mit anschließender TNF- α -Stimulation zu einem schwachen Anstieg der Caveolin-1-Konzentration um den Faktor 1,38 führte. Wurden HPMECs 24 h mit der Kontrolllösung PBS behandelt und im Anschluss mit TNF- α stimuliert, war die Caveolin-1-Konzentration um den Faktor 2,3 erhöht. Die 24-stündige Inkubation mit Bortezomib ohne TNF- α -Stimulation führte zu einer mittelstark erniedrigten Caveolin-1-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle mit einer Ratio von 0,65, während die 24-stündige Behandlung mit Bortezomib mit folgender TNF- α Stimulation in einer Protein-Ratio von 0,94 resultierte, was keiner Konzentrationsänderung entsprach (siehe Abbildung 29).

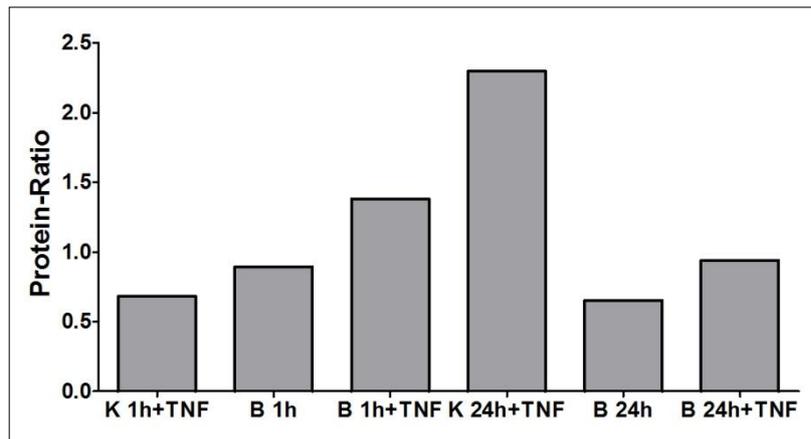


Abbildung 29: Relative Proteinkonzentrationen von Caveolin-1. Dargestellt sind die Protein-Ratios berechnet aus einem Peptid. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 8 erklärt.

3.7.3.2 Vimentin

Im iTRAQ-Experiment wurde Vimentin in der LC ESI-MS/MS-Messung mit 21 Peptiden identifiziert. Davon waren 16 Peptidsequenzen eindeutig für Vimentin. Aufgrund niedriger Signalintensitäten der Reporterionen-Signale von < 20 wurden zusätzliche Peptide aussortiert und nicht quantifiziert (vgl. Kapitel 2.2.11.1). Infolgedessen wurden für die Ratio 116:114 neun Peptide, für die Ratios 115:113 und 117:113 sieben Peptide, für die Ratio 119:113 sechs Peptide und für die Ratio 118:114 und 121:114 fünf Peptide bei der Quantifizierung berücksichtigt.

Die gewichteten Protein-Ratios mit den gewichteten Standardabweichungen sind für jeden Versuchsansatz in Abbildung 30 dargestellt. Nach der 1-stündigen Inkubation von HPMECs mit Bortezomib oder der Kontrolllösung PBS mit und ohne TNF- α -Stimulation war die Vimentin-Konzentration nicht verändert in Bezug auf die Kontrolle. Das Gleiche galt für die 24-stündige Behandlung mit Bortezomib mit und ohne TNF- α -Stimulation. Nach der 24-stündigen Inkubation mit der Kontrolllösung PBS und anschließender Stimulation mit TNF- α war die Vimentin-Konzentration hingegen mit einer gewichteten Protein Ratio von 16,8 signifikant erhöht im Vergleich zu der Kontrolle und den zwei Ansätzen, bei denen die Zellen 24 h mit Bortezomib behandelt worden waren ($p < 0,05$).

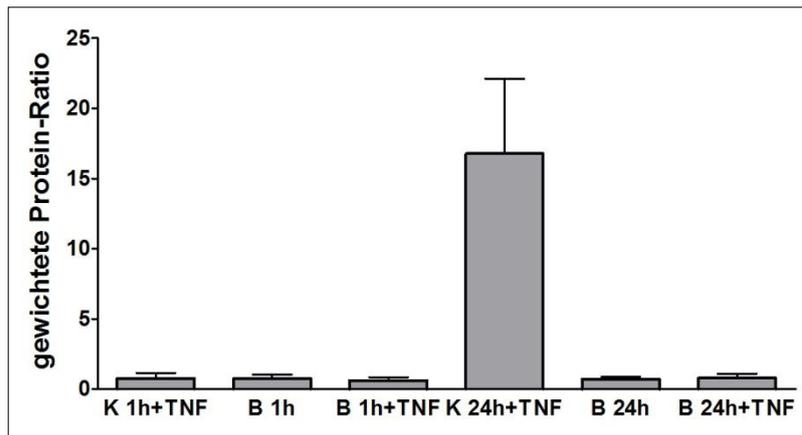


Abbildung 30: Relative Proteinkonzentrationen von Vimentin. Dargestellt sind die gewichteten Protein-Ratios und gewichteten Standardabweichungen berechnet aus neun (K 24h+TNF), sieben (K 1h+TNF, B 1h), sechs (B 1h+TNF) und fünf (B 24h, B24h+TNF) Peptiden. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 8 erklärt.

3.7.3.2.1 Vergleich der ESI-basierten und MALDI-basierten massenspektrometrischen Quantifizierung am Beispiel des Proteins Vimentin

Mittels LC ESI-MS/MS-Messung wurde Vimentin als potentiell unter TNF- α reguliertes Protein identifiziert. Die 24-stündige Behandlung mit Bortezomib konnte den durch TNF- α getriggerten Konzentrationsanstieg von Vimentin verhindern. Dieses Ergebnis aus der ESI-Messung wurde durch die Messung mittels LC MALDI-MS/MS bestätigt. In Abbildung 31 werden die Ergebnisse der beiden Methoden verglichen, was beispielhaft dargestellt ist anhand von drei Vimentin-Peptiden, die sowohl mittels LC ESI- als auch mittels LC MALDI-MS/MS detektiert wurden. Wie für andere Peptide beobachtet, korrelierten die Ergebnisse der ESI-Messung mit den Ergebnissen der MALDI-Messung (vgl. Kapitel 3.5).

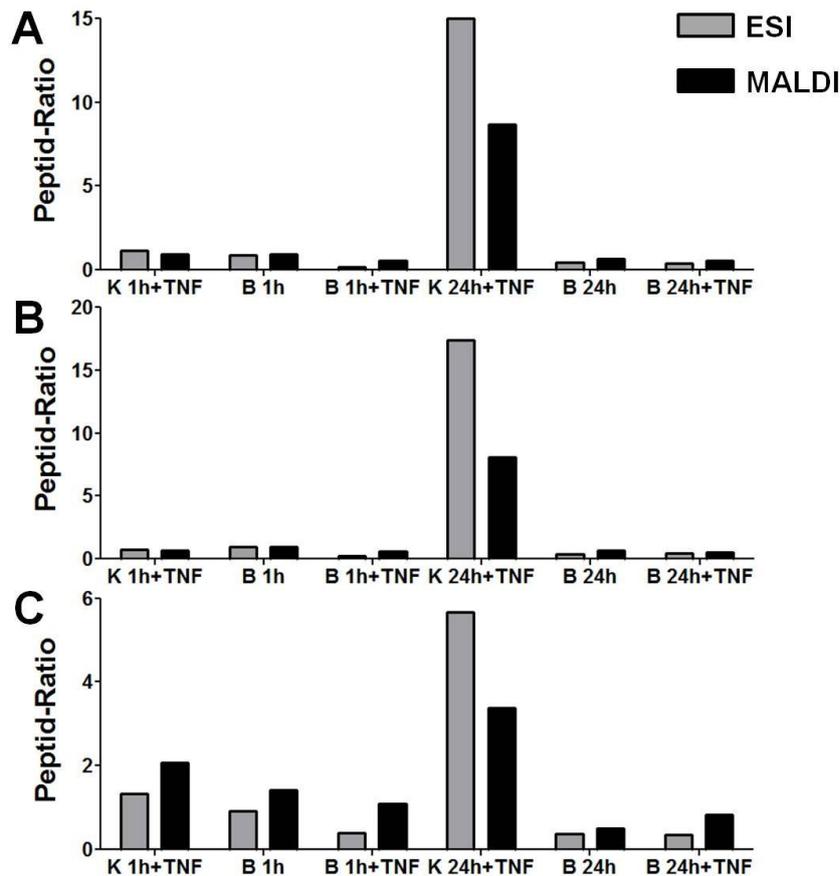


Abbildung 31: Vergleich der ESI-basierten und MALDI-basierten massenspektrometrischen Quantifizierung am Beispiel von drei Vimentin-Peptiden. Dargestellt sind die Ratios der Peptide mit den Aminosäuresequenzen [A] ISLPLPNFSSLNR, [B] ILLAELEQLK und [C] FADLSSEAANR. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 8 erklärt.

3.7.3.3 Fibronectin

Das Protein Fibronectin wurde im iTRAQ-Experiment mittels LC ESI-MS/MS mit einem Peptid identifiziert und quantifiziert. In den drei Versuchsansätzen der Inkubationszeit „1 h“ war die Konzentration von Fibronectin weder unter alleiniger TNF- α -Stimulation, alleiniger Bortezomib-Behandlung noch unter Bortezomib-Behandlung plus TNF- α -Stimulation verändert im Vergleich zu der Kontrolle. Nach 24-stündiger Bortezomib-Behandlung ohne TNF- α -Stimulation war die Fibronectin-Konzentration mit einer Protein-Ratio von 1,2 ebenfalls nicht verändert in Bezug auf die Kontrolle. Die 24-stündige Bortezomib-Behandlung mit anschließender TNF- α -Stimulation bewirkte mit einer Protein-Ratio von 1,4 einen schwachen Anstieg der Fibronectin-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Die Stimulation mit TNF- α nach 24 h ohne vorangegangene Proteasominhibition resultierte in einem Anstieg der Fibronectin-Konzentration um das doppelte im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 32).

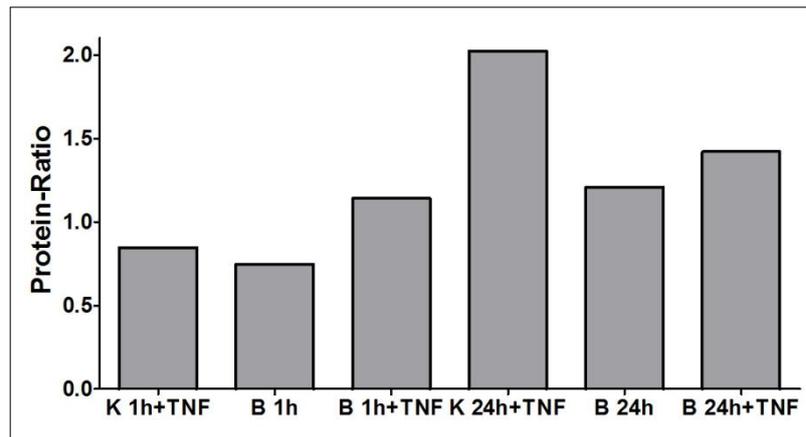


Abbildung 32: Relative Proteinkonzentrationen von Fibronectin. Dargestellt sind die Protein-Ratios berechnet aus einem Peptid. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 8 erklärt.

3.7.3.4 Cortactin

Cortactin wurde in dem iTRAQ-Experiment mittels ESI-MS/MS mit einem Peptid identifiziert und quantifiziert (siehe Abbildung 33).

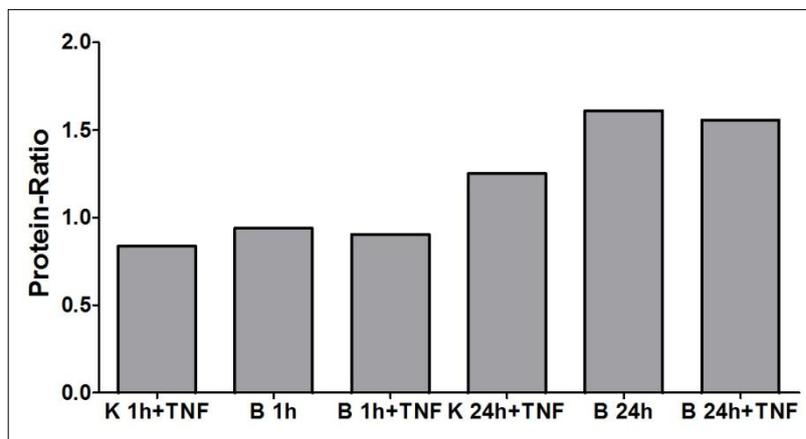


Abbildung 33: Relative Proteinkonzentrationen von Cortactin. Dargestellt sind die Protein-Ratios von Cortactin, das mit einem Peptid identifiziert und quantifiziert wurde. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 8 erklärt.

Die Cortactin-Konzentration war in allen drei Versuchsansätzen der 1-stündigen Inkubation leicht erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle, aber mit Protein-Ratios um 0,85 insgesamt als nicht reguliert zu bezeichnen. Nach der 24-stündigen Inkubation mit der Kontrolllösung PBS und nachfolgender Stimulation mit TNF- α war die Konzentration an Cortactin mit einer Protein-Ratio von 1,25 leicht erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Wurden HPMECs 24 h mit Bortezomib behandelt ohne anschließende TNF- α Stimulation, war die Konzentration an Cortactin mit einer Protein-Ratio von 1,61 mittelstark erhöht. In dem Versuchsansatz, in dem HPMECs 24 h mit Bortezomib behandelt wurden plus TNF- α

Stimulation, betrug die Protein-Ratio 1,56, was ebenfalls einem mittelstarken Konzentrationsanstieg entsprach.

3.7.3.5 Rab7a

Das Ras-verwandte Protein Rab7a wurde in dem iTRAQ-Versuch mittels ESI-MS/MS aufgrund von zwei Peptiden identifiziert. Ein Peptid wurde aufgrund niedriger Signalintensitäten bei der Quantifizierung nicht berücksichtigt (vgl. Kapitel 2.2.11.1).

Die Konzentration von Rab7a war in den drei Versuchsansätzen der 1-stündigen Inkubation nicht verändert im Vergleich zu der Kontrolle. Die alleinige TNF- α -Stimulation nach 24 h resultierte in einem schwachen Anstieg um den Faktor 1,35 im Vergleich zur Kontrolle. Nach der 24-stündigen Behandlung mit Bortezomib war die Rab7a-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 2,4 erhöht. Die 24-stündige Bortezomib-Behandlung plus TNF- α -Stimulation bewirkte einen starken Anstieg der Rab7a-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle um einen Faktor von 1,8 (siehe Abbildung 34).

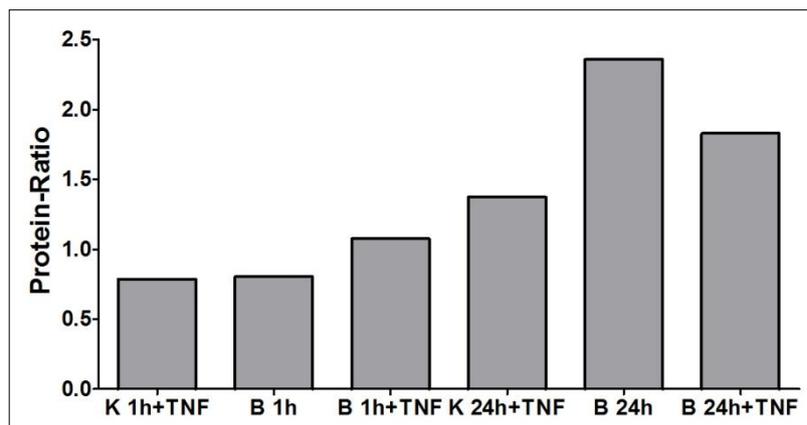


Abbildung 34: Relative Proteinkonzentrationen von Rab7a. Rab7a wurde mit zwei Peptiden identifiziert und mit einem Peptid quantifiziert. Dargestellt sind die Protein-Ratios. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 8 erklärt.

3.7.3.6 Wnt-6

In der LC ESI-MS/MS-Messung wurde Wnt-6 mit einem Peptid identifiziert und quantifiziert. Nach 1-stündiger Inkubation der HPMECs mit der Kontrolllösung PBS und anschließender TNF- α -Stimulation war die Konzentration von Wnt-6 mit einer Protein-Ratio von 0,83 schwach erniedrigt. Die 1-stündige Behandlung mit Bortezomib beziehungsweise Bortezomib plus TNF- α -Stimulation resultierte in einem mittelstarken und starken Abfall der Wnt-6-Konzentration. Nach der 24-stündigen Inkubation mit der Kontrolllösung PBS und folgender Stimulation mit TNF- α wurde keine Veränderung der

Wnt-6-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle festgestellt, während die Konzentration nach der 24-stündigen Bortezomib-Behandlung mit und ohne TNF- α -Stimulation mittelstark erniedrigt war (siehe Abbildung 35).

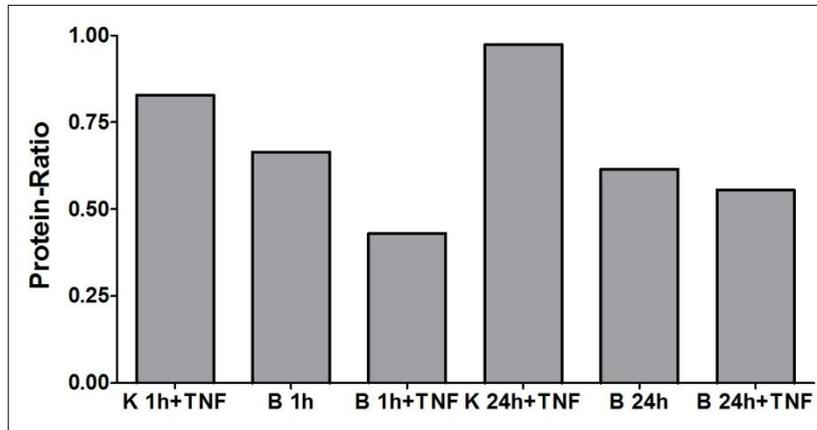


Abbildung 35: Relative Proteinkonzentrationen von Wnt-6. Wnt-6 wurde aufgrund eines Peptides identifiziert und quantifiziert. Dargestellt sind die Protein-Ratios der sechs Versuchsansätze. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 8 erklärt.

3.8 Untersuchung ubiquitinylierter Proteine in HPMECs nach Bortezomib-Behandlung

Die Wirkung von 20 nM Bortezomib auf ubiquitinylierte Proteine in HPMECs sollte untersucht werden. Bei einem ausreichend inhibitorischen Effekt von Bortezomib sollten ubiquitinylierte Proteine akkumulieren, da diese nicht mehr durch das Proteasom abgebaut werden können [171, 181].

HPMECs wurden mit 20 nM Bortezomib für die Dauer von $t= 0, 1, 2, 6, 12$ und 24 h inkubiert. Um die Aktivitäten von DUBs zu inhibieren und eine Deubiquitinylierung während der Probenvorbereitung zu verhindern, wurde dem Lysepuffer der Deubiquitinase-Inhibitor N-Ethylmaleimid zugesetzt. Mittels Western Blot wurden anschließend in den Zelllysaten mono- und polyubiquitinylierte Proteine nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente das Protein β -Actin. Das Ergebnis ist in Abbildung 36 dargestellt. In der Kontrolle ($t= 0$ h) wurden wie erwartet wenige ubiquitinylierte Proteine nachgewiesen. Nach 1 h beziehungsweise 2 h war die Konzentration an ubiquitinylierten Proteinen minimal erhöht im Vergleich zu der Kontrolle. Nach 6 h und 12 h Inkubation mit Bortezomib stieg die Konzentration weiter an. Die höchste Konzentration wurde nach 24-stündiger Proteasominhibition festgestellt.

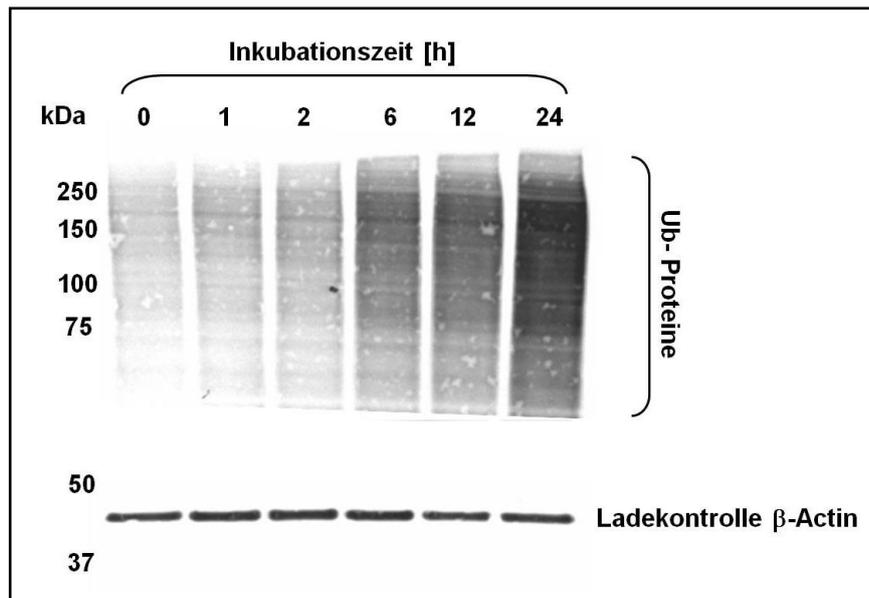


Abbildung 36: Nachweis ubiquitinylierter Proteine in HPMECs nach Inkubation mit Bortezomib. Western Blot mit dem Antikörper FK2, der gegen mono- und polyubiquitinylierte Proteine gerichtet ist. HPMECs wurden mit 20 nM Bortezomib für die Zeitdauer von $t = 0, 1, 2, 6, 12$ und 24 h behandelt und anschließend lysiert. Es wurden 40 μg Protein pro Probe aufgetragen. Als Ladekontrolle diente das Protein β -Actin.

Nach einer Inkubationsdauer von 1 h wurde kein bemerkenswerter Unterschied zu der Kontrolle von $t = 0$ h festgestellt, was bedeutet, dass eine Inkubationszeit von 1 h bei einer Bortezomib-Konzentration von 20 nM zu kurz war, um auf Proteinebene deutliche Unterschiede im Vergleich zu der Kontrolle zu detektieren. Hingegen wurde eine deutliche zelluläre Antwort nach 24 h registriert, da es zu einem sichtbaren Anstieg an ubiquitinylierten Proteinen kam. Mit diesem Versuch wurde gezeigt, dass eine 24-stündige Inhibition mit 20 nM Bortezomib effektiv und damit geeignet war, um zelluläre Konzentrationsänderungen in HPMECs auf Proteinebene zu untersuchen.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob mithilfe der iTRAQ-Technologie Hinweise auf zelluläre Mechanismen gesammelt werden können, die bei der Behandlung mit Proteasominhibitoren eine Metastasierung verhindern. Als Modellsystem dienten kultivierte Endothelzellen, um die Veränderung der Proteinzusammensetzung nach der Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib und dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür ein Protokoll für die 8-plex iTRAQ-Reagenzien etabliert, inklusive Probenvorbereitung, massenspektrometrischer Analyse, bioinformatischer Datenprozessierung und -auswertung.

In massenspektrometrie-basierten, proteomanalytischen Experimenten werden oft große Mengen an komplexen Daten generiert. Mittlerweile ist es gängig, dass die Datenmenge mehrere Gigabytes umfasst [27]. Häufig wird nicht nur eine Probe analysiert, oft werden mindestens zwei Proben untersucht, zum Beispiel bei differentiellen Vergleichen zwischen Proben von gesunden und kranken Probanden oder bei der Untersuchung von zeitlichen Verläufen. Die Auswertung solcher Daten ist eine große Herausforderung und wäre ohne bioinformatische Hilfsmittel nicht möglich. Bei der Planung und Durchführung eines proteomanalytischen Experimentes muss neben der Probengenerierung, Probenvorbereitung und massenspektrometrischen Messung daher auch die anschließende bioinformatische Prozessierung und Interpretation der Daten berücksichtigt werden. Die Bewältigung der bioinformatischen Analyse zählt dabei als eine der größten Hürden [28].

Für proteomanalytische Experimente werden verschiedene Massenspektrometer eingesetzt, die sich untereinander in vielen Punkten unterscheiden können. Dazu gehören unter anderem die Datenakquisition und -speicherung [185]. Dementsprechend gibt es eine große Auswahl an kommerziell oder frei erhältlichen Softwareprogrammen für die Datenprozessierung. Hersteller von Massenspektrometern bieten oft eine Software an, die speziell für das eigene Gerät entwickelt worden ist. Dazu zählt neben der Software zur Steuerung des Gerätes, auch eine separate Software für die Datenprozessierung und -auswertung. Häufig bieten die kommerziell erhältlichen Softwares keine Flexibilität, weil sie oft für bestimmte Anwendungen entwickelt und optimiert worden sind. Die Software ProteinLynx Global Server (PLGS) eignet sich zum Beispiel besonders für die Auswertung von MS^E-Messungen, die eine relative markierungsfreie Quantifizierung von Proteinen erlauben. Zudem sind zwar viele der kommerziellen Programme anwenderfreundlich, jedoch für den Anwender häufig wenig transparent. Die Algorithmen und deren Quellcodes sind für den Operator meist nicht einzusehen und selten publiziert. Dadurch gibt es für den

Operator im Prinzip keine Möglichkeit die Funktionsweise der einzelnen Prozessierungsschritte innerhalb der Auswertungs-Pipeline vollständig zu verstehen und die Prozessierung der Rohdaten stellt zunehmend eine Art Blackbox dar [29]. Des Weiteren wird zum Teil innerhalb der kommerziellen Softwares ein patentrechtlich geschütztes Dateiformat verwendet. Das erschwert oder verhindert das Exportieren beziehungsweise Konvertieren der Rohdaten in Open-Source-Formate wie beispielsweise *.mzML oder *.mzXML, wodurch die Nutzung herstellerunabhängiger Prozessierungsprogramme wie OpenMS unterbunden werden soll [28].

Frei erhältliche Software-Pakete im Proteomics-Bereich haben das Ziel, für jeden zugänglich zu sein und somit jedem die bioinformatische Auswertung und Interpretation komplexer Daten zu ermöglichen. Die Dateiformate sind üblicherweise allgemein verwendete Standardformate und die implementierten Algorithmen sind publiziert. OpenMS ist eine solche Open-Source-Software, die einen flexiblen Rahmen für die Entwicklung und Integration von verschiedenen Softwares bietet, wie beispielsweise TOPP für die Auswertung von LC MS-Experimenten [28, 30]. Mit OpenMS lassen sich neben iTRAQ diverse MS-basierte Quantifizierungen auswerten, zum Beispiel markierungsfreie Quantifizierung, SILAC (Stable Isotope Labelling with Amino Acids in Cell Culture), SRM (Selected Reaction Monitoring) oder TMT (Tandem Mass Tag). Damit bietet OpenMS dem Anwender Flexibilität und Transparenz.

Seit 2012 ist mit dem iTRAQ-Analyser neben der Auswertung des 4-plex auch die Auswertung eines 8-plex iTRAQ-Experiments möglich geworden [93]. Mithilfe von TOPP und dem iTRAQ-Analyser war damit die Möglichkeit gegeben, die Quantifizierung des in dieser Arbeit generierten Datensatzes aus dem Inkubationsversuch mit Bortezomib durchzuführen. Unter Nutzung verschiedener Tools wurde eine Identifizierungs- und Quantifizierungs-Pipeline in TOPP entwickelt, deren Funktion anschließend eingehend geprüft wurde (vgl. Kapitel 2.2.10).

Vor der Nutzung der entwickelten Pipeline mussten die Rohdaten prozessiert und Peaklisten erstellt werden. Die Prozessierung der Rohdaten wurde mit PLGS durchgeführt, deren Ausgabedateien als *.mzML-Dateien exportiert wurden. Danach erfolgte die Analyse mit TOPP. Die TOPP-Pipeline lieferte Listen mit identifizierten Peptiden und Proteinen sowie die dazugehörigen Signalintensitäten der acht Reporterionen-Signale, anhand derer die Quantifizierung durchgeführt wurde. Die Berechnung der Protein-Ratios für die relative Quantifizierung wurde mithilfe des kommerziellen Softwarepakets Mathematica durchgeführt [98]. In Mathematica wurden die Daten zusätzlich weiter bearbeitet, unter anderem durch Anlegen von Filterkriterien und Durchführung einer Median-Normalisierung (vgl. Kapitel 2.2.11.3).

Für die Prozessierung und Auswertung der iTRAQ-Daten aus dem LC ESI-MS/MS-Experiment wurden somit drei Softwares von drei verschiedenen Anbietern eingesetzt. Dabei war nachteilig, dass die Daten von einer Software exportiert und in die nächste Software importiert werden mussten. Das bedeutete einen Zeitverlust gegenüber einem Softwarepaket, mit dem alle Schritte kombiniert durchgeführt werden können. Des Weiteren sind solche zusätzlichen Export- beziehungsweise Importschritte fehleranfällig [29]. Auf der anderen Seite konnte in dieser Arbeit jeder Schritt der bioinformatischen Prozessierung geprüft und nachvollzogen werden. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die Daten durch keinen Algorithmus oder durch Exportieren und Importieren der Dateien von einer Software in die nächste in eine falsche Richtung manipuliert wurden. Damit war eine transparente Datenauswertung gewährleistet und eine korrekte Umsetzung der Quantifizierung basierend auf den Rohspektren sichergestellt.

Neben der ESI-Messung wurden zusätzlich Proben mittels LC MALDI-MS/MS analysiert. Die MALDI-Messung diente vornehmlich der Validierung der ESI-Daten und stellte somit neben dem Literaturvergleich den zweiten Prüfstein für die Ergebnisse der iTRAQ-Analyse dar. Für die MALDI-Messung konnte mit WarpLC kombiniert mit FlexAnalysis und ProteinScape ein kommerzielles Software-Paket genutzt werden, das neben der Identifizierung auch die Quantifizierung der iTRAQ-markierten Peptide ermöglichte. Mit diesem Software-Paket konnten sowohl die Rohdaten bearbeitet werden als auch die für die Identifizierung benötigte Peakliste erstellt werden. Im Anschluss wurden automatisch von ProteinScape Listen der identifizierten Proteine und Peptide erstellt. Ebenfalls automatisch wurden die Peptid- und Protein-Ratios berechnet, da die dafür benötigten Informationen in der Methode hinterlegt werden konnten. Auch eine Normalisierung und das Filtern von Daten ist in ProteinScape möglich [186]. Die Kombination der drei Softwares bot eine komfortable und schnelle Möglichkeit, das iTRAQ-Experiment auszuwerten.

Im Gegensatz zu den ESI-Daten erfolgte keine Überprüfung der einzelnen in WarpLC, ProteinScape und FlexAnalysis durchgeführten Prozessierungsschritte durch einen Abgleich mit den MALDI-Rohspektren. Stattdessen erfolgte im Rahmen der Validierung ein Vergleich der prozessierten MS/MS-Spektren aus der ESI-Messung mit den prozessierten MS/MS-Spektren aus der MALDI-Messung. Für zukünftige Experimente unter Verwendung des Software-Pakets aus WarpLC, ProteinScape und FlexAnalysis ist eine detaillierte Überprüfung empfehlenswert, um eine korrekte Prozessierung durch die verwendeten Algorithmen zu garantieren.

Ein intensiv diskutierter Aspekt bei der Quantifizierung mit den iTRAQ-Reagenzien ist die Richtigkeit [99, 110, 187]. Die Richtigkeit beschreibt die Übereinstimmung eines experimentellen Messwertes beziehungsweise des Mittelwertes einer Messreihe mit dem

wahren Wert. Sie wird beeinflusst von systematischen Fehlern, die in iTRAQ-Experimenten zu Verzerrungen der Signalintensitäten von Reporterionen-Signalen führen. Die Peptid-Ratios beziehungsweise Protein-Ratios würden aufgrund eines systematischen Fehlers einheitlich in eine Richtung verzerrt sein. Die Ursachen systematischer Fehler in einem iTRAQ-Experiment sind aufgrund der vielen Arbeitsschritte bei der Probenvorbereitung vielfältig. Die Effizienz der Markierung mit den iTRAQ-Reagenzien ist ein wichtiger Punkt [100]. Dieser Schritt sollte in allen Proben mit allen acht Reagenzien gleich effizient ablaufen, um robuste Daten zu generieren [130]. Ebenso entscheidend bei der Probenvorbereitung ist die Effizienz der tryptischen Proteolyse [100, 188]. Jede Probe wird einzeln verdaut und auch wenn jede Probe exakt gleich behandelt wird, kann die Effizienz des tryptischen Verdaus unterschiedlich sein, zum Beispiel durch Unterschiede in der Proteinzusammensetzung. Eine weitere Quelle für systematische Fehler ist die Messung der Proteinkonzentration zu Beginn des iTRAQ-Experimentes, da auch diese in jeder Probe einzeln und damit unabhängig bestimmt wurde. Der Einsatz gleicher absoluter Proteinmengen pro Probe ist für die Richtigkeit unerlässlich. Neben der experimentellen Prozedur kann auch die Verunreinigung der iTRAQ-Reagenzien durch Isotopen zu systematischen Fehlern führen [100]. Mithilfe von Korrekturfaktoren können die Fehler durch Isotopen-Verunreinigungen bei der bioinformatischen Auswertung der Daten jedoch ausgeglichen werden [189].

Eine Möglichkeit systematische Fehler zu korrigieren, ist die Normalisierung der Daten. Eine Normalisierung von iTRAQ-Daten komplexer Proben wird in den meisten Fällen routinemäßig beim Etablieren eines iTRAQ-Protokolls berücksichtigt. Hierbei werden die Daten nach der Durchführung der experimentellen Arbeit bioinformatisch bearbeitet. Gängige Normalisierungsmethoden verwenden externe Standards als Referenz oder invariante Referenzproteine [100]. Auch mathematische Operationen können eingesetzt werden zum Beispiel basierend auf dem Mittelwert oder durch Regression, wie die Lowess-Glättung [190 - 192]. Eine weitere Option ist die Median-Normalisierung, die auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde [123]. Bei der Median-Normalisierung wird davon ausgegangen, dass die meisten Peptid-Ratios den Wert „1“ aufweisen, weil die Expression und Synthese von Proteinen in den Zellen größtenteils gleich sein sollte zwischen zwei oder mehreren Zellzuständen. Das bedeutet, dass der überwiegende Anteil der Peptid-Ratios einer Normalverteilung entsprechen sollte [100]. In Anwesenheit von Bortezomib sollte die Mehrzahl der Proteinkonzentrationen unverändert sein, also eine Protein-Ratio von „1“ aufweisen. Würde das nicht der Fall sein, wären die Zellen nicht überlebensfähig, da zum Beispiel Prozesse des Zellzyklus oder essentielle Signalwege nicht mehr funktionieren könnten. Der Zytotoxizitätstest mit dem XTT-Reagenz zeigte aber, dass noch 75 % der HPMECs unter 20 nM Bortezomib nach 24 h metabolisch aktiv waren. Zudem

wurden auch in anderen Arbeiten kultivierte Zellen, darunter auch Endothelzellen, mit vergleichbaren Bortezomib- beziehungsweise TNF- α -Konzentrationen über vergleichbare Zeiträume behandelt [109, 193, 194]. Für das iTRAQ-Experiment wurde deshalb davon ausgegangen, dass die Konzentrationen der Mehrzahl der Proteine sich konstant verhielten.

Wie in Kapitel 3.7.1 und 3.7.2 gezeigt, wurden durch die verwendete Normalisierung, basierend auf den Medianen jedes Versuchsansatzes, Ergebnisse erzielt, die mit bereits publizierten Ergebnissen übereinstimmten. Der Vergleich der iTRAQ-Ergebnisse mit Daten aus der Literatur demonstrierte die Eignung des iTRAQ-basierten Quantifizierungsverfahrens und speziell des entwickelten Protokolls für die Datenprozessierung.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Quantifizierung mit iTRAQ ist die Streuung der Peptid-Ratios [99]. Die Streuung beziehungsweise Varianz ist ein Maß für die Präzision und wird häufig mit der Standardabweichung beschrieben.

Mit den meisten MS-basierten, proteomanalytischen Quantifizierungsmethoden werden Peptide stellvertretend für die Proteine analysiert (Bottom-up Ansatz). Die Informationen, die auf Peptidebene gesammelt werden, müssen dann auf die Proteinebene übertragen werden. War in der iTRAQ-Analyse ein Protein mit einem Peptid identifiziert worden, war dieser Schritt einfach, denn dann wurde die Peptid-Ratio gleich der Protein-Ratio gesetzt. War ein Protein mit zwei oder mehr Peptiden identifiziert worden, wurde die Protein-Ratio berechnet aus den nach Signalintensitäten der Reporterionen-Signale gewichteten Peptid-Ratios (vgl. Kapitel 2.2.11.4 und 3.3.2). Bei der näheren Betrachtung der Peptid-Ratio eines Proteins wurde jedoch beobachtet, dass nicht alle Peptide synchron reguliert waren. In einzelnen Fällen war die Konzentration eines Peptids erniedrigt, während die Konzentration eines zweiten Peptids erhöht war im Vergleich zur Kontrolle, was zu hohen Standardabweichungen führte. Dieses Phänomen ist ebenfalls in der Literatur beschrieben. Evans *et al.* schreiben in ihrem Review, dass es durchaus möglich ist, dass Peptide eines Proteins entgegengesetzt reguliert sein können [110]. Zudem ist eine konstante Varianz in komplexen, biologischen Proben vermutlich nicht zu erwarten, spekulieren Hultin-Rosenberg *et al.* [187]. Mögliche Methoden, die Streuung zu verbessern, beinhalten das Entfernen von Ausreißern [195 - 197], das Anlegen von Filtern [100, 101], die Berechnung gewichteter Protein-Ratios [100, 127, 198, 199] und die Stabilisierung der Varianz durch mathematische Modelle [200]. Das Aussortieren von Ausreißern birgt die Gefahr, wichtige Informationen zu verlieren. Gleiches gilt für das Filtern von Peptiden, die mit niedrigen Signalintensitäten detektiert wurden. Denn die interessantesten Proteinkandidaten gehören meistens zu den niedrig abundanten Proteinspezies, die regulatorische Aufgaben in der Zelle innehaben und

Schlüsselfunktionen bei essentiellen Signalwegen oder der interzellulären Kommunikation einnehmen [110, 111]. Es wurde allerdings gezeigt, dass Peptid-Ratios stärker streuen, wenn sie aus Reporterionen-Signalen niedriger Signalintensität berechnet wurden [99, 101, 102, 122]. Für die Auswertung des iTRAQ-Experimentes wurde deshalb ein Kompromiss gewählt, indem das Filtern von Signalen von Peptiden mit einer Reporterionen-Signalintensität < 20 und die Berechnung der gewichteten Protein-Ratio kombiniert wurden. Durch das Setzen eines Filters mit einem relativ niedrigen Schwellenwert für das Aussortieren von Reporterionen-Signalintensitäten sollte die Varianz verbessert werden, zugleich aber der Verlust wichtiger Informationen und damit an Sensitivität vermieden werden. Für eine zusätzliche Stabilisierung der Varianz wurde die nach den berücksichtigten Reporterionen-Signalintensitäten gewichtete Protein-Ratio berechnet.

Trotz dieser Operationen wurden für einige Proteine hohe Standardabweichungen beobachtet: 24 Proteine wiesen in einem der sechs Versuchsansätze eine Standardabweichung $> 0,5$ auf. Ein Grund für diese Streuungen können Proteinspezies sein. Der Begriff Proteinspezies bezieht sich auf die exakte chemische Beschreibung eines Proteins und berücksichtigt Isoformen, alternative Spleißprodukte und posttranslationale Modifikationen (PTMs) [2, 201]. Streuungen der Peptid-Ratios eines Proteins aufgrund von PTMs sind in der Literatur beschrieben worden [110]. Durch PTMs werden verschiedene Prozesse in der Zelle kontrolliert. Je nach biologischer Situation existieren unterschiedliche Proteinspezies, die aber das Produkt eines Gens repräsentieren. Die Analyse von PTMs ist eine Herausforderung [202, 203]. Die Herausforderung ist zum einen die Vielfalt: es sind mehr als 200 PTMs in der Literatur beschrieben [204]. Des Weiteren sind PTMs vorwiegend in substöchiometrischen Konzentrationen in der Zelle vertreten, was bedeutet, dass sie nur an einigen Proteinspezies, aber nicht an allen Proteinspezies zu finden sind. Zudem ist die PTM ein dynamischer und temporärer Prozess [205].

Eine spezielle Herausforderung bei iTRAQ-Experimenten stellt beispielsweise die Identifizierung von phosphorylierten Peptiden dar. Die Derivatisierung von phosphorylierten Peptiden mit einem iTRAQ-Reagenz resultiert in höheren Ladungszuständen während der Elektrospray-Ionisation im Vergleich zu unphosphorylierten Peptiden. Die höheren Ladungszustände können dazu führen, dass weniger Peptide identifiziert werden [206]. Die Identifizierung aller mit iTRAQ plus PTM derivatisierten Peptide unabhängig von der Art der PTM wird zusätzlich erschwert, durch die iTRAQ-Reagenzien selbst, da diese nicht absolut isobar sind, was zu einer geringfügigen Massenabweichung bei der massenspektrometrischen Messung führt. Das schmälert die Massengenauigkeit, was ebenfalls bedeuten kann, dass die Suchmaschine weniger Peptidsequenzen zuordnen kann [207].

Die Ubiquitylierung ist in Experimenten, bei denen Proteasominhibitoren eingesetzt werden, eine interessante PTM: unter Proteasominhibition akkumulieren ubiquitylierte Proteine, da diese nicht mehr vom Proteasom abgebaut werden können [171, 180, 181]. In den HPMECs wurde ebenfalls eine Akkumulation ubiquitylierter Proteine unter Zusatz von 20 nM Bortezomib vor allem nach 24 h mittels Western Blot nachgewiesen (vgl. Kapitel 3.8). Ubiquitylierte Proteine können auch massenspektrometrisch detektiert werden. Durch eine tryptische Proteolyse wird Ubiquitin bis auf die zwei C-terminalen Glycine vom Substratprotein abgetrennt. Der verbleibende Diglycin-Rest bewirkt eine Erhöhung der isotopischen Masse vom tryptischen Peptid um 114,043 Da, was massenspektrometrisch nachgewiesen werden kann [208 - 210]. In den iTRAQ-Daten wurde neben den Modifikationen, die standardmäßig von der Suchmaschine berücksichtigt wurden (vgl. Kapitel 2.2.10), auch nach der Ubiquitylierung als variable Modifikation gesucht. Es wurde jedoch kein ubiquityliertes Peptid identifiziert. Vermutlich war unter diesen Versuchsbedingungen die Konzentration an ubiquitylierten Proteinen trotz Akkumulation durch Proteasominhibition zu gering, um massenspektrometrisch detektiert zu werden. Routinemäßig wird vor einer massenspektrometrischen Analyse von ubiquitylierten Proteinen ein Anreicherungsschritt durchgeführt, zum Beispiel mittels Affinitätschromatographie, da sonst die Konzentrationen ubiquitylierter Proteine in der Regel unter der Detektionsgrenze liegen [211]. Auch nach Nutzung von Proteasominhibitoren werden routinemäßig Methoden zur Anreicherung von ubiquitylierten Proteinen eingesetzt [180, 212, 213]. In iTRAQ-Experimenten werden üblicherweise dynamische Bereiche von zwei Größenordnungen abgedeckt [189, 214]. Vermutlich lag die Konzentration an ubiquitylierten Proteinen in den iTRAQ-markierten Proben unter der Detektionsgrenze, weshalb diese nicht erfasst wurden. Eine Analyse der ubiquitylierten Proteinspezies ist sicherlich ein interessanter Aspekt, der in zukünftigen proteomanalytischen Experimenten mit HPMECs und Bortezomib berücksichtigt werden sollte.

Interessanterweise scheinen in der Literatur zwei Lager zu existieren, die ein iTRAQ-basiertes Experiment von unterschiedlichen Perspektiven betrachten. Der eine Teil beschäftigt sich mit bioinformatischen, einschließlich statistischen und instrumentellen Aspekten, während sich der andere Teil auf die biologische Anwendung konzentriert. Evans *et al.* haben das in einem Review aufgegriffen und festgestellt, dass die meisten Anwender, die iTRAQ-Reagenzien zur Analyse biologischer Hintergründe nutzen, dabei nur in wenigen Fällen bioinformatische Problematiken berücksichtigen [110]. Ein Konsens aus beidem ist aber wichtig, um präzise und genaue Daten zu generieren. Einer der oft akzentuierten Vorteile der iTRAQ-basierten Quantifizierungsstrategie ist die einfache

Implementierung und die schnelle Durchführung [110]. Das mag zutreffen, wenn kommerzielle Software-Programme wie das Paket aus WarpLC, ProteinScape und FlexAnalysis genutzt werden, mit denen sich schnell Listen mit regulierten Proteinen generieren lassen. Diese Arbeit zeigt, wie zeitintensiv die Etablierung eines iTRAQ-Experimentes sein kann. Es wurde ein Protokoll entwickelt, das die Auswertung von iTRAQ-Experimenten prinzipiell ohne kommerzielle Softwarepakete ermöglicht. Es wurde zwar das kommerzielle Programm Mathematica verwendet. Allerdings kann ein vergleichbares Skript ohne weiteres mit der freien Software R geschrieben werden, die ebenfalls die statistische Datenanalyse und graphischen Darstellungen ermöglicht [215, 216]. Das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll bietet Flexibilität, weil auch iTRAQ-Daten ausgewertet werden können, die mit anderen Instrumenten als dem verwendeten QTOF generiert wurden. Des Weiteren ist der für die Auswertung entwickelte Weg transparent. Es wurde jeder der durchgeführten Prozessierungsschritte durch den Abgleich mit dem Rohspektrum überprüft. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die Daten durch keinen Algorithmus in eine falsche Richtung manipuliert wurden, was eine korrekte Datenprozessierung und -auswertung gewährleistet. Im Zuge der Dateninterpretation folgte nach der bioinformatischen Bearbeitung eine weitere Kontrolle der Ergebnisse mithilfe einer biologischen Interpretation. Die Ergebnisse aus dem iTRAQ-Experiment wurden mit Beobachtungen aus der Literatur verglichen, was neben der MALDI-Messung als Prüfstein des Experimentes diente. Hier konnte eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der iTRAQ-Analyse und Ergebnissen aus der Literatur festgestellt werden für die Abundanz der Proteine nach Behandlung mit Bortezomib beziehungsweise TNF- α .

In dieser Arbeit wurden somit bioinformatische Gesichtspunkte in Kombination mit einer biologischen Fragestellung bearbeitet. Es wurde ein Protokoll entwickelt, das aufbauend auf bioinformatischen Aspekten die biologische Interpretation erlaubt. Es konnte unter Verwendung des OpenMS-Systems eine Identifizierungs- und Quantifizierungs-Pipeline entwickelt und optimiert werden und insbesondere die Eignung des neuen iTRAQ-Analyzers für die Auswertung von 8-plex iTRAQ-Experimenten gezeigt werden. Trotz der intensiven Kontrollen einzelner Schritte der Datenprozessierung ist eine weitere Validierung der potentiellen Proteinkandidaten unerlässlich. Neben biologischen Replikaten sollte eine Validierung über orthogonale Methoden erfolgen. In dieser Arbeit ist ein iTRAQ-Protokoll etabliert worden und es ist noch keine Validierung der vorgestellten Kandidaten über orthogonale proteomanalytische Verfahren erfolgt. Hierfür können zukünftig zum Beispiel immunanalytische Verfahren [217] oder alternative massenspektrometrie-basierte Quantifizierungsmethoden, wie SRM [218], eingesetzt werden.

Nachdem die bioinformatische Prozessierung der Daten erfolgt war, konnte eine Interpretation basierend auf biologischen Aspekten durchgeführt werden.

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das bei verschiedenen biologischen Prozessen eine zentrale Rolle spielt. Einer der wichtigsten von TNF- α aktivierten Signalwege ist der des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Nach der Aktivierung durch TNF- α induziert NF- κ B die Transkription von diversen Genen, die unter anderem involviert sind in der Zellproliferation, dem Zelltod, dem Immunsystem oder bei inflammatorischen Prozessen [219]. Eine Möglichkeit der TNF- α getriggerten Aktivierung von NF- κ B erfolgt über den Komplex von NF- κ B mit dem Inhibitor I- κ B. Ohne vorherige Aktivierung liegt NF- κ B im Zytosol im Komplex mit seinem Inhibitor I- κ B vor und ist damit inaktiv. Die Bindung von TNF- α an seine Rezeptoren initiiert zunächst die Phosphorylierung und anschließend die Ubiquitylierung von I- κ B. Die Ubiquitylierung markiert I- κ B, so dass I- κ B durch das Proteasom abgebaut wird. NF- κ B liegt dann frei und somit aktiviert im Zytosol vor, von wo aus NF- κ B in den Nukleus wandert und die Transkription von Zielgenen induziert. Eine Inhibition des Proteasoms verhindert den Abbau von I- κ B und damit die Aktivierung von NF- κ B (siehe Review [220]).

Davon ausgehend sind in dem iTRAQ-Experiment folgende Beobachtungen in Bezug auf die Konzentrationsänderung denkbar: Zum einen ist zu erwarten, dass weder unter TNF- α , noch unter Bortezomib oder einer Kombination aus beiden eine Konzentrationsänderung verzeichnet wird, da nicht alle Proteine auch Zielproteine von NF- κ B sind und nicht alle Proteine über das Proteasom abgebaut werden. Nach der Inkubation mit TNF- α ist auch ein Anstieg der zellulären Konzentration von Proteinen vorstellbar, die Zielproteine von NF- κ B darstellen. Nach der Behandlung mit dem Proteasominhibitor Bortezomib ist zu erwarten, dass sowohl ein Abfall als auch ein Anstieg der Konzentration bestimmter Proteine zu beobachten ist. Ein Konzentrationsabfall ist zu erwarten, weil aufgrund der fehlenden Aktivierung die von NF- κ B induzierte Synthese bestimmter Proteine nicht stattfindet. Ein Konzentrationsanstieg von Proteinen unter Bortezomib ist ebenfalls zu erwarten, weil Proteine aufgrund der Inhibition des Proteasoms nicht mehr abgebaut werden und somit im Zytosol akkumulieren [171, 181].

Mithilfe einer Klassifizierung basierend auf der Protein-Ratio wurden die Daten des iTRAQ-Experimentes nach der Datenprozessierung zunächst strukturiert und auf diese Weise für die biologische Interpretation vorbereitet. Danach erfolgten ein Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur und die biologische Interpretation. Die Ergebnisse der iTRAQ-Analyse führten basierend auf beobachteten Konzentrationsänderungen in An- beziehungsweise Abwesenheit von Bortezomib und TNF- α zu der Identifizierung von Proteinen, die bereits in anderen (semi-) quantitativen, proteomanalytischen Studien untersucht worden waren.

Dieser Vergleich mit der Literatur diente der Überprüfung der Ergebnisse aus der iTRAQ-Analyse auf Plausibilität. Die Proteine β -Tubulin, GAPDH, HSP-90, HSP-70 und die Proteasom-Untereinheiten α 1, α 3 und α 4 wurden für einen Vergleich der experimentellen Quantifizierungsergebnisse des iTRAQ-Experimentes mit Ergebnissen aus der Literatur herangezogen. Es wurde festgestellt, dass die beobachteten konstanten zellulären Konzentrationen beziehungsweise Konzentrationsänderungen der betrachteten Proteine mit Ergebnissen aus der Literatur übereinstimmten [158, 160, 171].

Mithilfe der biologischen Interpretation konnten neben den bereits in der Literatur erwähnten Proteinen weitere Proteine beschrieben werden, die neue Hinweise auf zelluläre Mechanismen liefern, die eine mögliche Rolle bei der Inhibition der Metastasierung unter Proteasominhibition spielen. Es konnten sowohl Proteinkandidaten aufgezeigt werden, bei denen ein Konzentrationsabfall oder -anstieg unter Bortezomib beobachtet wurde oder bei denen Bortezomib einer TNF- α vermittelten Konzentrationsänderung entgegenwirkte. Dabei wurden die Proteine Cortactin, Caveolin-1, Vimentin, Fibronectin, Rab7a und Wnt-6 als interessante Proteinkandidaten identifiziert (siehe Abbildung 37). Unter besonderer Berücksichtigung von Zusammenhängen, die in Verbindung mit Krebs- und Metastasierungsprozessen stehen, werden im Folgenden die Funktionen der Proteinkandidaten und mögliche zelluläre Mechanismen vorgestellt und diskutiert.

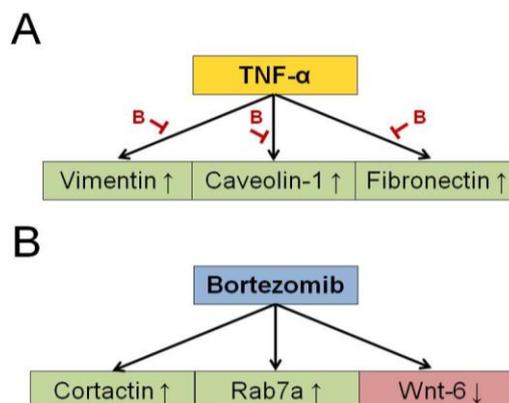


Abbildung 37: Proteinkandidaten des iTRAQ-Experimentes. Es wurden sowohl Proteinkandidaten aufgezeigt, [A] deren zelluläre Konzentration nach TNF- α -Stimulation erhöht war und bei denen Bortezomib einer Regulation durch TNF- α entgegenwirken konnte (Hemmung durch Bortezomib dargestellt als: \vdash B), als auch [B] Proteinkandidaten, bei denen ein Konzentrationsabfall (\downarrow) oder -anstieg (\uparrow) in Anwesenheit von Bortezomib beobachtet wurde.

Ein Beispiel für ein Protein, dessen Konzentration nach TNF- α -Stimulation erhöht war, ist Caveolin-1. Caveolin-1 ist ein wichtiges Strukturprotein der Caveolae, cholesterol- und sphingolipidreichen Einstülpungen der Plasmamembran mit einem Durchmesser von etwa 50 - 100 nm [221]. Caveolae sind in vielen Zellarten zu finden, in Endothelzellen und

Adipozyten sind sie in hoher Anzahl vertreten [222]. Neben den Caveolae ist Caveolin-1 in anderen Zellkompartimenten lokalisiert wie dem endoplasmatischen Retikulum, Golgi-Apparat, den Mitochondrien oder Endosomen [223 - 225]. Caveolae sind beteiligt an Prozessen wie Endozytose, Transzytose, Genregulation und Signaltransduktion [223, 226 - 230].

Die Rolle von Caveolin-1 ist kontrovers und wird auch im Hinblick auf Krebs zwiespältig diskutiert [231]. Sowohl Genmutationen, gesteigerte und verminderte Expression von Caveolin-1-RNA oder -Protein wurden in verschiedenen Krebszellen beobachtet [221]. Sunaga *et al.* schilderten, dass die Caveolin-1-Expression reduziert ist in Zellen, die Patienten mit kleinzelligen Lungenkarzinomen entnommen wurden, wohingegen sie in Zellen erhöht war, die von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen stammten [232]. Ho *et al.* demonstrierten, dass die Proteinkonzentration von Caveolin-1 vermindert war in Zellen einer niedrig-invasiven Lungenkrebszelllinie. In zwei Lungenkrebszelllinien mit hohem Invasivitätspotential war dessen Konzentration hingegen erhöht. Wurde die Caveolin-1-Expression in der Zelllinie mit niedrigem Invasivitätspotential stimuliert, resultierte das in einer um mindestens 150 % gesteigerten Invasivität [233]. In einer weiteren Studie ist gezeigt worden, dass Caveolin-1 die Migration von Tumorzellen und die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika begünstigte, was mit einer schlechten Prognose korrelierte [234]. In anderen Studien wurde Caveolin-1 hingegen als Tumorsuppressor beschrieben, weil es eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum von Tumoren und auf Signalwege hatte, die an der Zellproliferation und -viabilität beteiligt sind [234 - 236]. Shao *et al.* haben vor Kurzem gezeigt, dass reduzierte Caveolin-1-Spiegel die Barrierefunktion von Endothelzellen verbessern und eine durch TNF- α induzierte, gestörte Barrierefunktion attenuieren können [237]. Drei weitere Studien haben zudem gezeigt, dass Leukozyten bevorzugt transzellulär migrieren an Stellen, wo Caveolin-1 angereichert war [238 - 240], wobei das in einer anderen Studie nicht beobachtet wurde [241].

Podar *et al.* beschreiben Caveolin-1 als molekulares Zielprotein von Bortezomib in HUVECs und MM-Zellen. Bortezomib unterdrückte nach 6 h die Transkription von Caveolin-1 in MM-Zellen und führte zu erniedrigten Caveolin-1-Spiegeln auf Proteinebene [242]. In HUVECs inhibierte Bortezomib die vom vaskulären, endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) getriggerte Phosphorylierung der Tyrosin-Reste von Caveolin-1. Unter Proteasominhibition scheinen die Konzentrationen an unphosphoryliertem Caveolin-1 in Endothelzellen konstant zu bleiben [159]. Bei einer Abnahme an phosphoryliertem Caveolin-1 bei konstanten Spiegeln an unmodifiziertem Caveolin-1 würde das eine Abnahme der Gesamtkonzentration an Caveolin-1 bedeuten.

Wang *et al.* haben nachgewiesen, dass die Proteinkonzentration an Caveolin-1 in Anwesenheit von TNF- α in Endothelzellen aus Lungenarterien des Schweins ansteigen

[243]. Deregowski *et al.* haben zusätzlich gezeigt, dass die Caveolin-1-Expression in Zellen eines Eierstock- und eines Brustadenokarzinoms durch NF- κ B induziert wird und durch TNF- α stimuliert werden kann [244]. Ein Anstieg der Caveolin-1-Proteinkonzentration in Makrophagen der Maus nach 4-stündiger Stimulation mit 10 ng/ml TNF- α wurde von Lei *et al.* beobachtet [245].

Im iTRAQ-Experiment war die Konzentration an Caveolin-1 nach 1-stündiger Behandlung der Zellen mit der Kontrolllösung PBS und anschließender TNF- α -Stimulation mit einer Protein-Ratio von 0,7 mittelstark erniedrigt, während die Konzentration nach der 24-stündigen Behandlung mit der Kontrolllösung PBS und anschließender TNF- α -Stimulation mit einer Protein-Ratio von 2,3 stark erhöht war. Bei beiden Ansätzen wurden HPMECs 4 h mit TNF- α inkubiert, aber die relative Konzentration an Caveolin-1 in Bezug auf die Kontrolle war in den Ansätzen mit einer Ratio von 0,7 beziehungsweise 2,3 unterschiedlich gerichtet. Nur die Ergebnisse der 24-stündigen Inkubation entsprachen den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, dass die Caveolin-1-Konzentration unter TNF- α ansteigt [243, 245]. Diese diskrepanz erscheinende Beobachtung zwischen der Literatur und den Ergebnissen der 1-stündigen Inkubation wurde auch für andere Proteine als Caveolin-1 registriert, während die Ergebnisse der 24-stündigen Inkubationszeit mit den in der Literatur vorgestellten Ergebnissen korrelierten. Durch den Wechsel des Zellkulturmediums waren die HPMECs möglicherweise Stress ausgesetzt und befanden sich nach 1 h noch in der Adaptionsphase. Kim *et al.* haben den Einfluss intermittierender Wechsel des Zellkulturmediums auf die Genexpression von neuronalen Vorläuferzellen untersucht und haben gezeigt, dass die Expression von Genen unterbrochen sein kann, die an Differenzierungsprozessen der Zellen beteiligt sind [246]. Die Effekte, die normalerweise durch TNF- α erwartet werden, wurden in dem Versuchsansatz der 1-stündigen Inkubationsdauer möglicherweise nicht beobachtet, weil zunächst die Adaption an die Umwelt Priorität hatte. Die Proteinsynthese schien zudem nach 1 h in den Zellen verstärkt zu sein, da in den drei Versuchsansätzen der 1-stündigen Inkubationszeit hauptsächlich Proteine hochreguliert waren, die an der Proteinsynthese beteiligt sind, wie zum Beispiel die Untereinheit C des eukaryotischen translations-initiiierenden Faktors 3 oder das heterogene nukleäre Ribonucleoprotein Q. Das Protein Nucleophosmin war in den drei Versuchsansätzen ebenfalls mittelstark erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Nucleophosmin wird überexprimiert in proliferierenden Zellen und erhöht zum Beispiel in hämatopoetischen Stammzellen die Überlebensrate während Stresssituationen [247].

Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Protein-Ratios einiger Proteine nach 1-stündiger und 24-stündiger Bortezomib-Behandlung ebenfalls nicht gleich gerichtet waren. Ein möglicher Grund ist, dass die Effekte der Proteasominhibition durch 20 nM Bortezomib

nach 1 h auf Proteinebene noch nicht detektierbar waren. Stattdessen scheint eine Proteasominhibition für einen längeren Zeitraum als 1 h nötig zu sein, um Effekte detektieren zu können. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Analyse ubiquitinylierter Proteine nach Behandlung mit 20 nM Bortezomib unterstützt, wo nach 1-stündiger Behandlung im Vergleich zu der 24-stündigen Behandlung kein bemerkenswerter Unterschied bezüglich der Konzentration an ubiquitinylierten Proteinen bezogen auf die unbehandelte Probe festgestellt werden konnte (vgl. Kapitel 3.8).

Die Ergebnisse der 24-stündigen Inkubation korrelierten hingegen gut mit der in der Literatur beschriebenen Datenlage. Die Zellen schienen sich an das umgebende Medium gewöhnt zu haben, so dass sie die durch TNF- α und Bortezomib getriggerten Prozesse und Signalwege durchführen konnten. So ist der in der Literatur beschriebene Anstieg von Caveolin-1 unter TNF- α beobachtet worden. Nach Inkubation mit Bortezomib mit anschließender TNF- α -Stimulation wurde für Caveolin-1 im iTRAQ-Experiment keine Konzentrationsänderung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Damit konnte Bortezomib nach 24 h den durch TNF- α getriggerten Konzentrationsanstieg von Caveolin-1 verhindern, weshalb Caveolin-1 als interessanter Proteinkandidat ausgewählt wurde.

Das Protein Vimentin ist zusammen mit Caveolin-1 ein weiteres Beispiel, bei dem in dem Versuchsansatz der 24-stündigen Inkubationszeit ein Anstieg der Konzentration nach TNF- α -Stimulation beobachtet wurde. In dem Versuchsansatz der 1-stündigen Inkubation hingegen war die Vimentin-Konzentration nach TNF- α -Stimulation ebenfalls nicht erhöht. Die für Caveolin-1 aufgeführte Erklärung dafür, dass die Konzentration nach der TNF- α -Stimulation in dem Versuchsansatz der 1-stündigen Inkubationszeit nicht wie in dem Versuchsansatz der 24-stündigen Inkubationszeit erhöht war, gilt entsprechend für Vimentin.

Nach der 24-stündigen Inkubation mit Bortezomib sowohl mit als auch ohne anschließende TNF- α -Stimulation war die Vimentin-Konzentration nicht verändert, während die TNF- α -Stimulation ohne vorangegangene Proteasominhibition nach 24 h einen signifikanten Anstieg der Vimentin-Konzentration im Vergleich zu der Kontrolle bewirkte. Der Proteasominhibitor Bortezomib konnte somit wie bei Caveolin-1 einen TNF- α vermittelten Konzentrationsanstieg von Vimentin in HPMECs verhindern.

Das Zytoskelett von Endothelzellen ist aus drei Hauptelementen aufgebaut: den Actin-Mikrofilamenten, den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten. Vimentin gehört zu den Typ III-Intermediärfilamenten. Neben dem Zytoskelett ist Vimentin aber zusätzlich auch in nukleären und extrazellulären Kompartimenten gefunden worden [248 - 253]. Vimentin wird in einer Vielzahl von Zellen exprimiert, zum Beispiel von Makrophagen, Endothelzellen oder Fibroblasten [254].

In mehreren Schritten der metastatischen Kaskade spielt Vimentin eine direkt oder indirekt regulierende Rolle. Zu diesen Schritten gehören die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), der Bruch der Basalmembran, das Ablösen der malignen Zellen vom Primärtumor, die Invasion und das Ansiedeln von Tumorzellen in sekundären Geweben [255]. In vitro scheint Vimentin eine Rolle als Tumorpromoter zu spielen [256]. Zudem wurde eine erhöhte Expression von Vimentin bei verschiedenen Tumorzelllinien und Tumorgeweben beobachtet, beispielsweise bei Brustkrebszellen [17] und Prostatakrebszellen [257]. Erhöhte Vimentinspiegel korrelieren hier mit beschleunigtem Tumorwachstum, verstärkter Invasion und einer schlechten Prognose [258]. Bei Lungenkrebs wird Vimentin als diagnostischer Marker herangezogen, um die Progression von lokalen Läsionen zu invasiven, metastasierenden Tumorzellen zu beurteilen [255]. Vimentin ist damit ein wichtiges Protein, das in krebs-relevanten Prozessen eine essentielle Rolle zu spielen scheint.

Jeder Schritt der Tumorentwicklung wird begleitet von einem ständigen Austausch zwischen Tumorzellen und Immunzellen, der über die wechselseitige Sekretion von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen stattfindet. Häufig kann dabei beobachtet werden, wie sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem derart umgepolt werden, dass beide nicht mehr gegen den Tumor gerichtet sind, sondern ein für den Tumor günstiges Mikromilieu schaffen [259]. Die Umgebung des Tumors wird dadurch so verändert, dass das Tumorwachstum und die Metastasierung ermöglicht werden, indem zum Beispiel neue Gefäße gebildet werden, die Basalmembran proteolytisch aufgelöst wird oder die extrazelluläre Matrix verändert wird [39, 260]. Eine Vielzahl tumor-infiltrierender Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen oder Lymphozyten, können proinflammatorische Zytokine und Chemokine sekretieren, die unter anderem die EMT begünstigen [39, 253]. Vimentin wird klassischerweise als Marker der EMT verwendet. Die EMT beschreibt den Übergang von Epithelzellen zu Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp. Die Zellen verändern dabei ihre Form und entwickeln eine erhöhte Motilität (siehe Review [261]). Die EMT wird unlängst als ein wichtiger Prozess bei der Tumorprogression angesehen [262]. Es gibt zunehmend Hinweise, dass die EMT ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Metastasierung einnimmt. Maligne Zellen an den äußeren Grenzen des Tumors entwickeln durch die EMT invasive, mesenchymale Eigenschaften, die das Herauslösen einzelner Tumorzellen vom Primärtumor ermöglichen und zu deren Migration führen können [261]. Während der EMT ist die Expression von epithelialen Markern wie E-Cadherin oder Keratinen stark erniedrigt, während die Expression von mesenchymalen Markern wie Fibronectin oder Vimentin erhöht ist. Der damit einhergehende Verlust von Zell-Zell-Kontakten führt dann zu der erhöhten Motilität von Zellen [258, 262, 263].

Es wurde bereits gezeigt, dass die EMT durch verschiedene Signalwege initiiert werden kann, zum Beispiel durch Signalwege von TNF- α , NF- κ B und Wnt [264, 265]. Der Signalweg über NF- κ B scheint dabei einer der stärksten Induktoren der EMT zu sein [39, 266]. Bekannt ist zudem, dass NF- κ B die Expression von dem mesenchymalen Marker Vimentin induziert [267].

Neben der EMT gibt es eine endothelial-mesenchymale Transition (EndMT), die oft als Spezialform der EMT eingestuft wird [268]. Auch die EndMT ist ein komplexer Prozess, dessen molekularen Mechanismen allerdings im Vergleich zur EMT weitestgehend unbekannt sind [269]. Die Endothelzellen verlieren während der EndMT endotheliale Marker, wie beispielsweise PECAM-1, und weisen dafür ebenfalls vermehrt mesenchymale Marker wie Fibronectin oder Vimentin auf [270 - 272]. Wie bei der EMT weisen Zellen, die aus der EndMT hervorgegangen sind, aufgrund des Verlustes von Zell-Zell-Kontakten eine erhöhte Migrationsfähigkeit auf.

Die EndMT ist als erstes bei der embryonalen Entwicklung der Herzklappen beschrieben worden, worauf seitdem der Schwerpunkt der Erforschung der EndMT lag [268]. Seit kurzem werden jedoch verstärkt Beobachtungen publiziert, bei denen die EndMT wie die EMT eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression einnimmt [269, 273]. Eine begünstigte Tumorprogression ist vor allem zurückzuführen auf die Vermittlung von invasiven Eigenschaften während der EndMT, welche essentiell sind für den Prozess der Metastasierung [271].

Rodríguez *et al.* demonstrierten in einem proteomanalytischen Experiment, dass die Vimentin-Konzentration erniedrigt war in HUVECs und Melanomzellen, die mit einem Inhibitor der Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) behandelt worden waren, was mit der Umkehr der EndMT und damit der Rückbildung des mesenchymalen Phänotyps verbunden war [274]. Unter PARP-Inhibition war die EndMT in den HUVECs unterdrückt. Im Mausmodell konnten Rodríguez *et al.* zeigen, dass Melanomzellen in Mäusen, die mit einem PARP-Inhibitor behandelt worden waren, deutlich weniger Lungenmetastasen bildeten als in den unbehandelten Kontrollmäusen [274]. Ebenfalls in einem Tumor-Mausmodell zeigten Beijnum *et al.*, dass die Angiogenese unterbunden wurde durch eine gezielte Therapie mit Antikörpern, die spezifisch gegen das Vimentin der Tumorendothelzellen gerichtet waren [275]. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in Anwesenheit von Bortezomib ebenfalls in einem Mausmodell eine reduzierte Metastasierung von Neuroblastomzellen in die Lunge beobachtet worden ist [87].

Denkbar ist vor diesem Hintergrund, dass während der EndMT das Endothel umstrukturiert wird, was eine erhöhte Permeabilität des Endothels bedingt. Das wiederum könnte die Intra- beziehungsweise Extravasation von Tumorzellen begünstigen. Dieser Prozess könnte durch Proteasominhibitoren unterbunden werden. Ein möglicher Ablauf

der TNF- α -vermittelten Umstrukturierung des Endothels und dessen Unterbindung durch Proteasominhibition unter Beteiligung von Vimentin und Fibronectin ist in Abbildung 38 dargestellt.

Fibronectin ist zusammen mit Vimentin und Caveolin-1 ein drittes Beispiel für ein Protein, bei dem eine erhöhte zelluläre Konzentration nach der 24-stündigen Behandlung mit der Kontrolllösung und anschließender Stimulation mit TNF- α beobachtet wurde. Obwohl HPMECs nach 1-stündiger und 24-stündiger Inkubation mit der Kontrolllösung PBS 4 h mit TNF- α behandelt worden waren, war die Fibronectin-Konzentration nur in dem Versuchsansatz der 24-stündigen Inkubation erhöht, nicht aber in dem Versuchsansatz der 1-stündigen Inkubation. Ähnliches wurde auch bei den Proteinen Vimentin und Caveolin-1 beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlich erscheinende Beobachtung wurde für das Protein Caveolin-1 diskutiert und gilt entsprechend für Vimentin und Fibronectin.

In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass TNF- α in vitro die Synthese von Fibronectin stimulieren kann. O'Blenes *et al.* haben glatte Muskelzellen aus einer Koronararterie eines Schweins mit TNF- α behandelt und haben einen Anstieg der Fibronectin-Konzentration mittels Western Blot festgestellt [276]. Eine Hochregulation der Fibronectin-mRNA nach TNF- α -Stimulation in humanen, glatten Muskelzellen einer Arterie wurde in einer anderen Studie von Zhang und Wang beschrieben [277]. In Myofibroblasten des Pankreas aktivierte TNF- α ebenfalls die Sekretion von Fibronectin und erhöhte dadurch die zellulären Fibronectin-Proteinlevel [278].

Zytokine wie TNF- α oder Interleukin-6 (IL-6), die vergleichbar mit einer Entzündung von einem Tumor sekretiert werden, tragen zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsproteinen wie dem interzellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), dem vaskulären Adhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) oder Fibronectin auf Endothelzellen bei [39]. Adhäsionsmoleküle erleichtern Zell-Zell-Kontakte zwischen Tumor- und Endothelzellen und ermöglichen auf diese Weise den Tumorzellen während der metastatischen Kaskade das Verweilen und die Extravasation [279].

Tan *et al.* beobachteten, dass der Proteasominhibitor MG132 in humanen Epithelzellen aus Nierentubuli einem von dem Zytokin transformierender Wachstumsfaktor TGF- β 1 (Transforming Growth Factor) vermittelten Konzentrationsanstieg von Fibronectin auf mRNA- und Proteinebene entgegenwirkte. Die Fibronectin-Level waren unter Proteasominhibition trotz TGF- β 1-Stimulation im Vergleich zu der Kontrolle unverändert [280]. Nach der 24-stündigen Bortezomib-Behandlung mit anschließender TNF- α -Stimulation ergab die iTRAQ-Analyse, dass die Fibronectin-Konzentration lediglich

schwach erhöht war. Das zeigt, dass Bortezomib einen TNF- α -vermittelten Anstieg der Fibronectin-Konzentration in HPMECs attenuieren konnte.

Fibronectin ist ein ubiquitäres Glycoprotein der extrazellulären Matrix (ECM). Es wird unterschieden zwischen Plasma-Fibronectin und zellulärem Fibronectin. Das Plasma-Fibronectin wird in Hepatozyten gebildet, von denen es als lösliches Protein ins Blut sekretiert wird. Es zirkuliert im Blutkreislauf, wo es eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung und frühen Wundheilung spielt [281]. Zelluläres Fibronectin wird von vielen Zellen gebildet, zum Beispiel Fibroblasten, Myozyten und Endothelzellen [282]. Zelluläres Fibronectin wird manchmal als die weniger lösliche Form bezeichnet und ist beteiligt an Prozessen wie der Embryogenese, Wundheilung, Entzündung und Tumorprogression [283, 284]. Zum zellulären Fibronectin wird eine heterogene Gruppe an Proteinspezies gezählt, die zell-spezifisch und durch spezies-spezifische Spleißvarianten entstehen. Die Fibronectin-Spezies unterscheiden sich neben ihrer Löslichkeit unter anderem in ihren adhäsiven und liganden-bindenden Eigenschaften. Die Vielfalt an Fibronectin-Spezies ermöglicht einer Zelle eine individuelle Umstrukturierung der ECM, die zum Beispiel nötig ist für die Prozesse der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen, um umliegende Gefäße und Gewebe zu erobern [39, 284].

Fibronectin ist ein Ligand für diverse Integrine, einer Gruppe von transmembranären Zelladhäsions-Rezeptoren [285]. Integrine werden von multiplen Zellen an ihrer Oberfläche exprimiert, unter anderem von Fibroblasten, Endothelzellen und Tumorzellen [279, 286 - 290]. Über die Interaktion mit Intergrinen ist Fibronectin beteiligt an der Migration, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen [291].

Fibronectin ist wie Vimentin ein mesenchymaler Marker, der verstärkt exprimiert wird, wenn Zellen während der EMT den epithelialen beziehungsweise während der EndMT den endothelialen Charakter verlieren [270]. Zeisberg *et al.* haben in einem Mausmodell gezeigt, dass der Prozess der EndMT an der Entstehung von krebs-assoziierten Fibroblasten mitwirkt [271]. Neuere Ergebnisse ergaben, dass krebs-assoziierte Fibroblasten die Invasion von Tumorzellen begünstigen [39]. Kaplan *et al.* haben herausgefunden, dass eine tumorbedingte Zunahme der Fibronectin-Konzentration an der Zelloberfläche von Fibroblasten in der Lunge zu Metastasen führen kann, indem vermutlich die Adhäsion von zirkulierenden Tumorzellen an das Lungengewebe verstärkt wird [292].

In dem iTRAQ-Experiment war die Konzentration von Fibronectin wie die von Vimentin unter TNF- α erhöht, während die Konzentration unter dem Proteasominhibitor Bortezomib unverändert war. Der TNF- α -vermittelten Anstieg der Vimentin- und Fibronectin-Konzentrationen trat nach einer vorangegangenen 24-stündigen Proteasominhibition nicht ein. Denkbar ist, dass Bortezomib einer TNF- α -vermittelten EndMT und damit einer

Cortactin Einfluss auf Zell-Zell-Verbindungen und damit auf die Metastasierung. Eine Überexpression von Cortactin in Tumorzellen kann einhergehen mit erhöhter Invasion und Migration [299, 300]. In der Literatur ist des Weiteren beschrieben, dass eine Abnahme der Cortactin-Konzentration eine erhöhte Permeabilität von Lungenendothelzellen sowohl in vitro [301, 302] als auch in vivo [303] bewirkt und dass Cortactin wichtig ist für die Stabilität und Aufrechterhaltung der Barrierefunktion von Endothelzellen [293]. Denkbar ist, dass die im iTRAQ-Experiment beobachtete erhöhte Cortactin-Konzentration nach Proteasominhibition eine gestärkte Barrierefunktion bedeutet, eventuell unter Beteiligung der Umstrukturierung des Actin-Gerüsts.

Wie für Cortactin wurde für das ras-verwandte Protein Rab7a in der iTRAQ-Analyse eine Konzentrationserhöhung nach 24-stündiger Proteasominhibition beobachtet.

Rab7a gehört zu der Familie der Rab-Guanintriophosphatasen (GTPasen), die beteiligt sind an der Regulation des Membrantransports. Rab7a kontrolliert dabei den vesikulären Transport von frühen zu späten Endosomen und ist wichtig bei der Reifung von Phagosomen und autophagischen Vakuolen [304]. Durch den Prozess der Autophagozytose können Zellen Proteine und Organellen abbauen, was für die normale Entwicklung von Zellen essentiell ist. Die Autophagozytose wird zunehmend in einen Zusammenhang mit Krebs gebracht [305]. Sie kann in fünf Hauptschritte gegliedert werden: Induktion, anfängliche Vesikelbildung (Nukleation), Verschluss sowie Expansion des Vesikels und Bildung des sogenannten Autolysosoms. Im letzten Schritt fusionieren ein Autophagosom und ein Lysosom, woraufhin der Inhalt des entstandenen Autolysosoms durch Hydrolasen abgebaut wird.

Es ist bekannt, dass eine Proteasominhibition zu einer erhöhten Autophagozytose führen kann [306 - 308]. Eine verstärkte Autophagozytose könnte mit einem erhöhten Bedarf an Rab7a einhergehen, das beteiligt ist an der Entwicklung von Autolysosomen. Das würde den im iTRAQ-Experiment beobachteten Konzentrationsanstieg von Rab7a unter Bortezomib erklären.

Des Weiteren ist bekannt, dass Rab7a involviert ist in den Abbau von Proteinen aus interzellulären Adhäsionskontakten [309]. Der Transport von Integrinen wird ebenfalls von der Rab-Familie kontrolliert [310]. Rab25 kontrolliert beispielsweise die Regenerierung des Fibronectin-Rezeptors $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin und Rab21 vermittelt die Endozytose von Integrinen [311]. In einer vor Kurzem erschienenen Publikation zeigten Cogli *et al.*, dass Rab7a über eine direkte Interaktion mit Vimentin dessen Phosphorylierung und damit dessen Funktion und Struktur beeinflusst. Bei Überexpression von Rab7a in HeLa-Zellen, einer humanen Epithelzelllinie aus einem Zervixkarzinom, stieg der Anteil an löslichem Vimentin signifikant an [304]. Denkbar ist eine Beteiligung von Rab7a über die direkte Interaktion mit Vimentin

an der Umstrukturierung und damit einhergehend der Barrierefunktion des Endothels (siehe Abbildung 40 C).

Wnt-6 ist ein Beispiel für ein Protein, bei dem nach Proteasominhibition eine verminderte Proteinkonzentration beobachtet wurde, während nach alleiniger TNF- α -Stimulation keine Konzentrationsänderung im Vergleich zu der Kontrolle verzeichnet wurde. Aufgrund der Ergebnisse der iTRAQ-Analyse ist Wnt-6 nicht unbedingt ein interessanter Proteinkandidat auf den ersten Blick. Die Konzentration von Wnt-6 war nach 24-stündiger Bortezomib-Behandlung mit und ohne TNF- α -Stimulation in HPMECs lediglich mittelstark erniedrigt (Protein-Ratio 0,62 beziehungsweise 0,56), was keinem deutlichen Konzentrationsabfall unter Bortezomib entsprach. Zudem wurde Wnt-6 lediglich mit einem einzigen Peptid identifiziert. Die biologische Interpretation zeigte jedoch, dass im Hinblick auf die vielfältigen Aufgaben, die Wnt-Proteine in Zellen übernehmen, und im Zusammenhang mit der Entwicklung von Krebs Wnt-6 durchaus interessant ist. Deshalb wurde Wnt-6 als potentieller Proteinkandidat ausgewählt, der eine Rolle bei der Behandlung von Patienten mit Bortezomib einnehmen könnte.

Wnt-6 ist eines von 19 Glycoproteinen der Wnt-Familie, die entscheidende regulatorische Aufgaben bei diversen zellulären Prozessen übernehmen. Es ist beschrieben, dass Wnt-Proteine entscheidend beteiligt sind an der Entwicklung von Krebs und dass sie unter anderem im Zusammenhang mit Vorgängen während der Zelldifferenzierung und Metastasierung stehen [312].

Wnt-Proteine aktivieren mindestens drei intrazelluläre Signalkaskaden. Zum einen ist das der kanonische β -Catenin-Weg, zum zweiten ist das ein nicht-kanonischer Weg und zum dritten ein nicht-kanonischer Weg über intrazelluläre Calcium-Level [313, 314]. Der kanonische Signalweg über β -Catenin ist hauptsächlich involviert bei der Stammzell-Erneuerung, Zellmigration und der Regulation der Zelldifferenzierung. Die nicht-kanonischen Wnt-Wege, die unabhängig von β -Catenin ablaufen, sind zuständig für morphologische Veränderungen wie die Polarität, den Gewebeaufbau und ebenfalls für die Zellmigration [312, 315]. In den meisten normalen Zellen scheinen die Wnt-Signalwege inaktiv und hauptsächlich aktiv während der Embryonalentwicklung von Säugetieren zu sein [316]. Goodwin *et al.* haben die Expression von Wnt-Proteinen in verschiedenen Endothelzelllinien untersucht und haben dabei festgestellt, dass Komponenten der Wnt-Signalwege durchaus aktiv sind in kultivierten Endothelzellen. Wnt-6 wurde zum Beispiel in frisch isolierten HUVECs und in humanen glatten Muskelzellen aus der Aorta exprimiert [317]. Andere Autoren berichteten ebenfalls, dass die Wnt-Signalwege beteiligt sind an der Differenzierung von vaskulären Endothelzellen und dementsprechend in Endothelzellen aktiv sind [318 - 320].

Der kanonische Signalweg ist von den drei Signalwegen am besten untersucht. Eine Hauptaufgabe der Wnt-Proteine stellt hier die Stabilisierung von β -Catenin dar. In Abwesenheit des Wnt-Signals wird β -Catenin zunächst phosphoryliert, daraufhin ubiquitinyliert und durch das Proteasom abgebaut. Dadurch sind die zytoplasmatischen Level an β -Catenin normalerweise gering. Wird hingegen der kanonische Wnt-Signalweg durch Bindung eines Wnt-Proteins an einen seiner Rezeptoren aktiviert, unterbleibt die proteasomale Degradation und β -Catenin akkumuliert im Zytoplasma, woraufhin es in den Nukleus wandert und als Co-Faktor die Transkription von Zielgenen aktiviert [321]. In Abwesenheit des Wnt-Signals ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg also inaktiv und die durch diesen Signalweg aktivierte Transkription der Zielgene von β -Catenin findet nicht statt.

Choi *et al.* haben beschrieben, dass die Inhibition der Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β), durch die β -Catenin vor der proteasomalen Degradation phosphoryliert wird, zu der Translokation von β -Catenin führt und anschließend in einer erhöhten Sekretion von pro-angiogenen Zytokinen wie VEGF und IL-8, einer verstärkten Proliferation und einem erhöhten Potential für die Angiogenese von endothelialen Vorläuferzellen resultierte [322]. Das zeigt, dass erhöhte Spiegel an β -Catenin eine wichtige Rolle spielen in der Angiogenese unter Beteiligung von Endothelzellen.

In Abbildung 39 ist eine mögliche Beteiligung der Proteasominhibition am Wnt/ β -Catenin-Signalweg aufgezeigt. Die Proteasominhibition hat im iTRAQ-Experiment einen Abfall der Wnt-6-Konzentration bewirkt, was möglicherweise eine verminderte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges bedeutet. Dadurch würde eine Akkumulation von β -Catenin unterbunden werden, was mit einer verminderten Expression von an der Differenzierung beteiligter Gene einhergehen würde [322, 323].

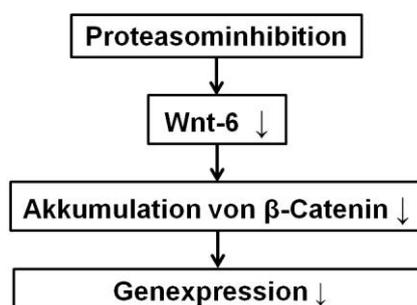


Abbildung 39: Möglicher Mechanismus der Proteasominhibition unter Beteiligung von Wnt-6. Die Proteasominhibition hat im iTRAQ-Experiment einen Abfall der Wnt-6-Konzentration bewirkt. Das wiederum könnte eine verminderte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges bedeuten. Dadurch würde eine Akkumulation von β -Catenin unterbunden werden, was eine verminderte Expression von an der Differenzierung beteiligter Gene bedeutet [322, 323].

Wnt-6 ist ein konservierter Faktor, der die Zelldifferenzierung, das Überleben und die EMT während der Embryonalentwicklung fördert [230, 323]. Erste Beobachtungen an

Hühnerembryos deuteten darauf hin, dass Wnt-6 an der EMT beteiligt ist, denn die Lokalisation von Wnt-6 stimmte genau mit den Orten überein, an denen die EMT und andere Umstrukturierungen des Epithels im Hühnerembryo beobachtet wurden [324]. Mittlerweile wurde auch in anderen Studien gezeigt, dass eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs bei der Induktion der EMT beteiligt ist [132].

β -Catenin übernimmt als Adapterprotein weitere Aufgaben, indem es Cadherine, eine Gruppe von Adhäsionsproteinen, mit dem Actin-Zytoskelett verbindet und Zell-Zell-Kontakte ermöglicht [325]. Durch einen Abfall der E-Cadherin-Konzentration, einem typischen Prozess während der EMT, wird die Bindung zwischen β -Catenin und E-Cadherin aufgehoben, so dass das freie β -Catenin in den Nukleus wandert, wo es wie nach der Aktivierung über den Wnt-Signalweg als Co-Faktor der Transkription fungiert [326]. Bekannt ist des Weiteren, dass Wnt-6 von einigen Krebszellen überexprimiert wird [327]. Antagonisten des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweges werden als potentielle Krebstherapeutika diskutiert [313]. Dazu zählt auch die Therapie des multiplen Myeloms [328 - 330]. Zudem wurde bereits gezeigt, dass Inhibitoren des Wnt-Signalweges Metastasen reduzieren können [331 - 333]. Das Ergebnis der iTRAQ-Analyse deutet darauf hin, dass Bortezomib eine inhibierende Wirkung auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg besitzen könnte.

Wie bereits erwähnt, besitzen einige der vorgestellten Proteinkandidaten ähnliche biologische Funktionen. Fibronectin und Vimentin sind beides Proteine, die vermehrt bei der EndMT exprimiert werden, wenn Zellen ihren endothelialen Charakter verlieren [270 - 272]. Die EndMT kann durch TNF- α induziert werden [334]. Die Konzentrationen sowohl von Fibronectin als auch von Vimentin waren im iTRAQ-Experiment in dem Versuchszweig „24 h“ unter TNF- α erhöht, während Bortezomib den TNF- α vermittelten Konzentrationsanstieg abmilderte beziehungsweise verhinderte. Diese Ergebnisse des iTRAQ-Experimentes könnten bedeuten, dass eine Proteasominhibition eine TNF- α getriggerte EndMT unterbindet (vgl. Abbildung 38 und Abbildung 40 C).

Endotheliales Vimentin kann über das plasmalemmale, vesikel-assoziierte Protein PV-1 gebunden an Caveolae vorliegen. Es wird vermutet, dass dieser Komplex an der transzellulären endothelialen Migration von Leukozyten beteiligt ist [335]. Caveolin-1 ist ein wichtiges Strukturprotein der Caveolae. Eine aktuelle Studie zeigte, dass reduzierte Caveolin-1-Spiegel die Barrierefunktion von Endothelzellen verbessern und eine TNF- α induzierte gestörte Barrierefunktion attenuieren können [237]. In der iTRAQ-Analyse war die Caveolin-1-Proteinkonzentration unter Bortezomib erniedrigt und unter Bortezomib mit zusätzlicher TNF- α -Stimulation nicht verändert, während sie unter alleiniger TNF- α -Stimulation erhöht war im Vergleich zur Kontrolle. Niedrige Caveolin-1-Konzentrationen

nach Proteasominhibition bedeuten eine Aktivierung der Rac1-GTPase, was wiederum mit einer Translokation von Cortactin und dem Schutz der endothelialen Barrierefunktion einhergeht (siehe Abbildung 40 B) [237, 243]. Cortactin kolokalisiert mit E-Cadherin und β -Catenin und ist innerhalb dieses Komplexes beteiligt an der Umstrukturierung des Actin-Zytoskeletts [300]. Des Weiteren ist Cortactin wichtig für die Stabilität und Aufrechterhaltung der Barrierefunktion von Endothelzellen [293]. In Anwesenheit von Bortezomib war die Cortactin-Konzentration im iTRAQ-Experiment nach 24 h erhöht. Denkbar wäre, dass unter Beteiligung von Cortactin eine durch Proteasominhibition verursachte gestärkte Barrierefunktion die Intra- beziehungsweise Extravasation von Tumorzellen verhindern könnte (siehe Abbildung 40 B).

Rab7a scheint direkt mit Vimentin zu interagieren, was eine Phosphorylierung von Vimentin bewirkt (siehe Abbildung 40 C). Über diese Interaktion ist Rab7a beteiligt an dem Aufbau der Vimentin-Filamente, da durch Phosphorylierung eine Umverteilung von Vimentin aus der unlöslichen in die lösliche Fraktion stattfindet [304]. Wie für Rab7a ist für Vimentin eine Beteiligung an der Autophagozytose beschrieben, denn niedrige Vimentin-Spiegel bewirken eine verstärkte Autophagozytose [341]. Bekannt ist, dass eine Proteasominhibition zu einer verstärkten Autophagozytose führt [306, 307]. Die erhöhte Rab7a-Konzentration unter Bortezomib, die im iTRAQ-Experiment beobachtet wurde, könnte zurückzuführen sein auf einen vermehrten Bedarf an Rab7a aufgrund einer gesteigerten Autophagozytose-Aktivität der Zelle.

Wnt-6 scheint eine Rolle bei der Regulation der EMT zu spielen [324]. Es wurde bereits gezeigt, dass Inhibitoren des Wnt-Signalweges Metastasen reduzieren können [331 - 333]. In Anwesenheit von Bortezomib wurde im iTRAQ-Experiment ein mittelstarker Konzentrationsabfall von Wnt-6 registriert, was eine verminderte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges bedeuten könnte. Reduzierte Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges geht einher mit niedrigen β -Catenin-Spiegeln, was die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten und eine Inhibition von EMT-ähnlichen Prozessen wie die EndMT bedeutet (siehe Abbildung 40 A) [312]. Das wiederum könnte mit einer Inhibition der Intra- beziehungsweise Extravasation von Tumorzellen einhergehen, was abschließend in einer verminderten Bildung von Metastasen resultieren könnte.

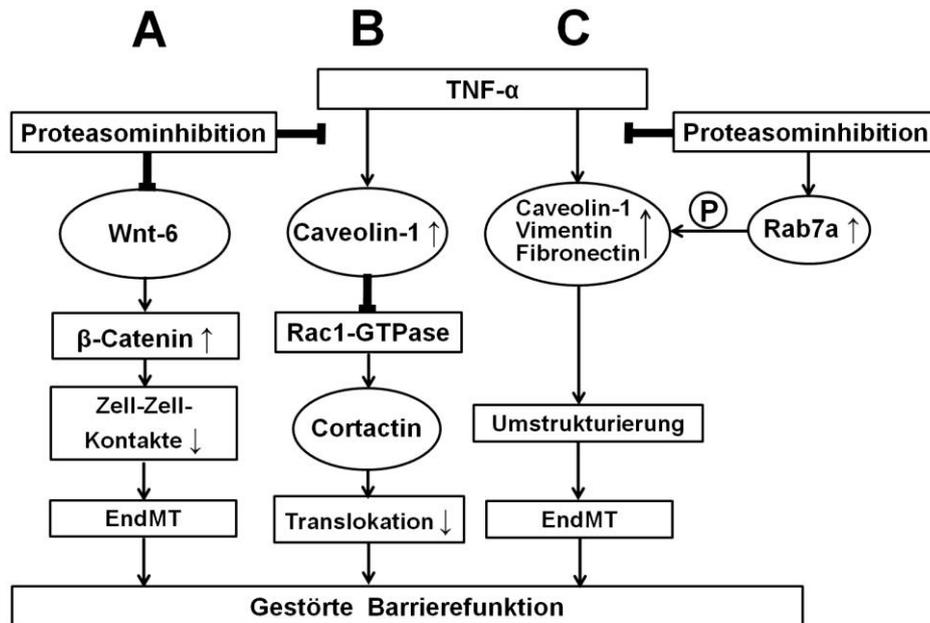


Abbildung 40: Mögliche zelluläre Mechanismen des Einflusses von Proteasominhibitoren auf die Metastasierung. [A]: Eine Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges bewirkt hohe β-Catenin-Spiegel, was einen Rückgang von Zell-Zell-Kontakten und eine Induktion von EMT-ähnlichen Prozessen bedeutet [312]. [B]: Erhöhte Caveolin-1-Konzentrationen nach TNF-α-Stimulation könnten eine verminderte Aktivität der Rac1-GTPase bedeuten, was wiederum mit einer verminderten Translokation von Cortactin einhergeht [237, 243, 301 - 303]. [C]: Erhöhte Konzentrationen an Caveolin-1, Vimentin und Fibronectin nach TNF-α-Stimulation könnten an einer Umstrukturierung des Endothels während der EndMT beteiligt sein. Rab7a reguliert über eine direkte Interaktion die Phosphorylierung (P) von Vimentin, was eine Umstrukturierung des Vimentin-Netzwerkes bewirkt [304]. Rab7a könnte damit neben der Autophagozytose auch einen Einfluss auf die Struktur des Endothels haben. Denkbar ist, dass die drei vorgestellten möglichen Mechanismen (A - C) die Barrierefunktion des Endothels beeinträchtigen und auf diese Weise die Intra- beziehungsweise Extravasation von Tumorzellen erleichtern. Diese Vorgänge wiederum könnten durch Proteasominhibitoren unterbunden werden. Zeichenerklärung: Inhibition ⊣, Konzentrationsabnahme ↓, Konzentrationszunahme ↑.

Es konnten in dieser Arbeit Proteine identifiziert werden, bei denen in An- oder Abwesenheit von Bortezomib und TNF-α eine Konzentrationsänderung beobachtet wurde und die unter Berücksichtigung von malignen beziehungsweise metastatischen Prozessen als potentielle Kandidaten beschrieben werden konnten. Es wurde gezeigt, dass eine Quantifizierung mit den iTRAQ-Reagenzien geeignet ist, differentielle Proteinkonzentrationen auf zellulärer Ebene aufzudecken. Die im iTRAQ-Experiment identifizierten Proteinkandidaten, bei denen in An- beziehungsweise Abwesenheit von Bortezomib eine veränderte Konzentration beobachtet wurde, sollten in zukünftigen Untersuchungen über unabhängige Methoden validiert und näher untersucht werden. Diese Arbeit legt die Basis für weitergehende Untersuchungen der vorgestellten Proteinkandidaten, was das Wissen über zelluläre und molekulare Mechanismen des Proteasominhibitors Bortezomib bedeutend erweitern würde. Weiterführende Erkenntnisse über Proteasominhibitoren versprechen eine Erweiterung der Indikation der

Wirkstoffklasse und die Entwicklung innovativer Therapiestrategien im Kampf gegen Krebs.

5 Literaturverzeichnis

1. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I: Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995; 16: 1090-1094.
2. Jungblut PR, Schlüter H: *Proteinbiochemie - Proteinanalyse - Proteomics*. BIOSpektrum 2008; 14: 37-40.
3. Aebersold R, Mann M: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207.
4. Paul D, Kumar A, Gajbhiye A, Santra MK, Srikanth R: Mass spectrometry-based proteomics in molecular diagnostics: discovery of cancer biomarkers using tissue culture. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 783131.
5. Purves RW, Gabryelski W, Li L: Investigation of the quantitative capabilities of an electrospray ionization ion trap/linear time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1998; 12: 695-700.
6. Mazur MT, Cardasis HL, Spellman DS, Liaw A, Yates NA, Hendrickson RC: Quantitative analysis of intact apolipoproteins in human HDL by top-down differential mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 7728-7733.
7. Chelius D, Bondarenko PV: Quantitative Profiling of Proteins in Complex Mixtures Using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research* 2002; 1: 317-323.
8. Becker CH, Bern M: Recent developments in quantitative proteomics. *Mutat Res* 2011; 722: 171-182.
9. Bondarenko PV, Chelius D, Shaler TA: Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2002; 74: 4741-4749.
10. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B: Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 2007; 389: 1017-1031.
11. Bateman KP, Castro-Perez J, Wrona M, Shockcor JP, Yu K, Oballa R, Nicoll-Griffith DA: MSE with mass defect filtering for in vitro and in vivo metabolite identification. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007; 21: 1485-1496.
12. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M: Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:376-386.
13. Krüger M, Mann M: SILAC. Präzise Methode zur MS-basierten quantitativen Proteomanalyse. *BIOSpektrum* 2006; 12: 378-390.
14. Mirgorodskaya OA, Kozmin YP, Titov MI, Korner R, Sonksen CP, Roepstorff P: Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using (18)O-labeled internal standards. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000; 14: 1226-1232.

15. Antonov VK, Ginodman LM, Rumsh LD, Kapitannikov YV, Barshevskaya TN, Yavashev LP, Gurova AG, Volkova LI: Studies on the mechanisms of action of proteolytic enzymes using heavy oxygen exchange. *Eur J Biochem* 1981; 117: 195-200.
16. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R: Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 994-999.
17. Thompson EW, Paik S, Brunner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, Shima TB, Torri J, Donahue S, Lippman ME, et al.: Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 1992; 150: 534-544.
18. McAlister GC, Huttlin EL, Haas W, Ting L, Jedrychowski MP, Rogers JC, Kuhn K, Pike I, Grothe RA, Blethrow JD, Gygi SP: Increasing the multiplexing capacity of TMTs using reporter ion isotopologues with isobaric masses. *Anal Chem* 2012; 84: 7469-7478.
19. Viner R, Bomgardner R, Blank M, Rogers J: Increasing the Multiplexing of Protein Quantitation from 6- to 10-Plex with Reporter Ion Isotopologues. In 61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. Minneapolis Convention Center, MN, USA, 2013.
20. Kettenbach AN, Rush J, Gerber SA: Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides. *Nat Protoc* 2011; 6: 175-186.
21. Elliott MH, Smith DS, Parker CE, Borchers C: Current trends in quantitative proteomics. *J Mass Spectrom* 2009; 44: 1637-1660.
22. Fuller HR, Morris GE: Quantitative Proteomics Using iTRAQ Labeling and Mass Spectrometry, Integrative Proteomics. InTech Europe, 2012; 347-362
23. Pichler P, Kocher T, Holzmann J, Mazanek M, Taus T, Ammerer G, Mechtler K: Peptide labeling with isobaric tags yields higher identification rates using iTRAQ 4-plex compared to TMT 6-plex and iTRAQ 8-plex on LTQ Orbitrap. *Anal Chem* 2010; 82: 6549-6558.
24. Pierce A, Unwin RD, Evans CA, Griffiths S, Carney L, Zhang L, Jaworska E, Lee CF, Blinco D, Okoniewski MJ, Miller CJ, Bitton DA, Spooncer E, Whetton AD: Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of six leukemogenic tyrosine kinases. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 853-863.
25. Shi M, Caudle WM, Zhang J: Biomarker discovery in neurodegenerative diseases: a proteomic approach. *Neurobiol Dis* 2009; 35: 157-164.
26. Roepstorff P, Fohlman J: Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* 1984; 11: 601.
27. Kumar C, Mann M: Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets. *FEBS Lett* 2009; 583: 1703-1712.
28. Sturm M, Bertsch A, Gropl C, Hildebrandt A, Hussong R, Lange E, Pfeifer N, Schulz-Trieglaff O, Zerck A, Reinert K, Kohlbacher O: OpenMS - an open-source software framework for mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 163.
29. Kiefer P, Schmitt U, Vorholt JA: eMZed: an open source framework in Python for rapid and interactive development of LC/MS data analysis workflows. *Bioinformatics* 2013; 29: 963-964.

30. Kohlbacher O, Reinert K, Gropl C, Lange E, Pfeifer N, Schulz-Trieglaff O, Sturm M: TOPP--the OpenMS proteomics pipeline. *Bioinformatics* 2007; 23: e191-197.
31. Cai Z, Chiu JF, He QY: Application of proteomics in the study of tumor metastasis. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2004; 2: 152-166.
32. Spano D, Heck C, De Antonellis P, Christofori G, Zollo M: Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Semin Cancer Biol* 2012; 22: 234-249.
33. Chaffer CL, Weinberg RA: A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2011; 331: 1559-1564.
34. Fidler IJ: The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 453-458.
35. Kraljevic Pavelic S, Sedic M, Bosnjak H, Spaventi S, Pavelic K: Metastasis: new perspectives on an old problem. *Mol Cancer* 2011; 10: 22.
36. Labelle M, Hynes RO: The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov* 2012; 2: 1091-1099.
37. Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB: Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L419-422.
38. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F: Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-444.
39. Smith HA, Kang Y: The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *J Mol Med (Berl)* 2013; 91: 411-429.
40. Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W: Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med* 1993; 177: 1277-1286.
41. Johrer K, Janke K, Krugmann J, Fiegl M, Greil R: Transendothelial migration of myeloma cells is increased by tumor necrosis factor (TNF)-alpha via TNF receptor 2 and autocrine up-regulation of MCP-1. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1901-1910.
42. Chen MB, Whisler JA, Jeon JS, Kamm RD: Mechanisms of tumor cell extravasation in an in vitro microvascular network platform. *Integr Biol (Camb)* 2013; 5: 1262-1271.
43. Wu Y, Zhou BP: TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 2010; 102: 639-644.
44. Carmeliet P, Jain RK: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
45. Steeg PS: Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 2006; 12: 895-904.
46. Nicolson GL: Metastatic tumor cell interactions with endothelium, basement membrane and tissue. *Curr Opin Cell Biol* 1989; 1: 1009-1019.
47. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA: Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 541-573.
48. Mierke CT: Role of the endothelium during tumor cell metastasis: is the endothelium a barrier or a promoter for cell invasion and metastasis? *J Biophys* 2008; 2008: 183516.

49. Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D: Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol* 2004; 167: 223-229.
50. Sandig M, Voura EB, Kalnins VI, Siu CH: Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997; 38: 351-364.
51. Tremblay PL, Auger FA, Huot J: Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases. *Oncogene* 2006; 25: 6563-6573.
52. van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W: Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2012; 728: 23-34.
53. Adams J: The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* 2004; 5: 417-421.
54. Spasser L, Brik A: Chemistry and biology of the ubiquitin signal. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012; 51: 6840-6862.
55. Fraile JM, Quesada V, Rodriguez D, Freije JM, Lopez-Otin C: Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene* 2012; 31: 2373-2388.
56. Hicke L: Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 195-201.
57. Shaeffer JR, Kania MA: Degradation of monoubiquitinated alpha-globin by 26S proteasomes. *Biochemistry* 1995; 34: 4015-4021.
58. Boutet SC, Disatnik MH, Chan LS, Iori K, Rando TA: Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors. *Cell* 2007; 130: 349-362.
59. Kravtsova-Ivantsiv Y, Cohen S, Ciechanover A: Modification by single ubiquitin moieties rather than polyubiquitination is sufficient for proteasomal processing of the p105 NF-kappaB precursor. *Mol Cell* 2009; 33: 496-504.
60. Huang TT, D'Andrea AD: Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 323-334.
61. Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I: Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 461-466.
62. Weissman AM, Shabek N, Ciechanover A: The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 605-620.
63. Adams J: The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 349-360.
64. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D: The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* 2006; 31: 137-155.
65. Tai HC, Schuman EM: Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 826-838.
66. Ravid T, Hochstrasser M: Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 679-690.
67. Lu S, Wang J: The resistance mechanisms of proteasome inhibitor bortezomib. *Biomarker Research* 2013; 1: 13.

68. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T: The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994; 78: 773-785.
69. Adams J: The proteasome as a novel target for the treatment of breast cancer. *Breast Dis* 2002; 15: 61-70.
70. FDA: Approved Drugs: Carfilzomib.
<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm312945.htm>
Stand: 2012.
71. Smith D, Yong K: Multiple myeloma. *Bmj* 2013; 346: f3863.
72. Ghobrial IM: Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood* 2012; 120: 20-30.
73. Moreau P, San Miguel J, Ludwig H, Schouten H, Mohty M, Dimopoulos M, Dreyling M: Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 Suppl 6: vi133-vi137.
74. Kortüm M, Einsele H, Driessen C, Gunsilius E, Ludwig H, Kröger N, Kropff M, Liebisch P, Naumann R, Peest D, Taverna C, Wörmann B, Goldschmidt H: Leitlinien Onkopedia Multiples Myelom. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e. V., Stand 2013.
75. Zeng Z, Lin J, Chen J: Bortezomib for patients with previously untreated multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Hematol* 2013; 92: 935-943.
76. Mahindra A, Laubach J, Raje N, Munshi N, Richardson PG, Anderson K: Latest advances and current challenges in the treatment of multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9: 135-143.
77. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Zeldenrust SR, Dingli D, Russell SJ, Lust JA, Greipp PR, Kyle RA, Gertz MA: Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008; 111: 2516-2520.
78. Fachinformation: VELCADE® 3,5 mg Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung. JANSSEN-CILAG INTERNATIONAL NV Stand: März 2013.
79. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoilova OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Delforge M, Jiang B, Mateos MV, Anderson KC, Esseltine DL, Liu K, Deraedt W, Cakana A, van de Velde H, Richardson PG: Persistent overall survival benefit and no increased risk of second malignancies with bortezomib-melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone in patients with previously untreated multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2013; 31: 448-455.
80. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC: The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 3071-3076.
81. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Ford RJ: Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Immunol* 2003; 171: 88-95.

82. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ: Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 1999; 59: 2615-2622.
83. Bold RJ, Virudachalam S, McConkey DJ: Chemosensitization of pancreatic cancer by inhibition of the 26S proteasome. *J Surg Res* 2001; 100: 11-17.
84. Frankel A, Man S, Elliott P, Adams J, Kerbel RS: Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3719-3728.
85. Ling YH, Liebes L, Jiang JD, Holland JF, Elliott PJ, Adams J, Muggia FM, Perez-Soler R: Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1145-1154.
86. Shah SA, Potter MW, McDade TP, Ricciardi R, Perugini RA, Elliott PJ, Adams J, Callery MP: 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 2001; 82: 110-122.
87. Valentiner U, Haane C, Nehmann N, Schumacher U: Effects of bortezomib on human neuroblastoma cells in vitro and in a metastatic xenograft model. *Anticancer Res* 2009; 29: 1219-1225.
88. Boccadoro M, Morgan G, Cavenagh J: Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell Int* 2005; 5: 18.
89. Petrocca F, Altschuler G, Tan SM, Mendillo ML, Yan H, Jerry DJ, Kung AL, Hide W, Ince TA, Lieberman J: A genome-wide siRNA screen identifies proteasome addiction as a vulnerability of basal-like triple-negative breast cancer cells. *Cancer Cell* 2013; 24: 182-196.
90. Ernoult E, Bourreau A, Gamelin E, Guette C: A proteomic approach for plasma biomarker discovery with iTRAQ labelling and OFFGEL fractionation. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 927917.
91. Ernoult E, Gamelin E, Guette C: Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation. *Proteome Sci* 2008; 6: 27.
92. Savitzky A, Golay MJE: Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry* 1964; 36: 1627-1639.
93. Junker J, Bielow C, Bertsch A, Sturm M, Reinert K, Kohlbacher O: TOPPAS: A Graphical Workflow Editor for the Analysis of High-Throughput Proteomics Data. *J Proteome Res* 2012; 11: 3914-3920.
94. Geer LY, Markey SP, Kowalak JA, Wagner L, Xu M, Maynard DM, Yang X, Shi W, Bryant SH: Open mass spectrometry search algorithm. *J Proteome Res* 2004; 3: 958-964.
95. Craig R, Beavis RC: TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* 2004; 20: 1466-1467.
96. TOPP-Dokumentation:
http://ftp.mi.fu-berlin.de/OpenMS/doc-1.9-official/html/TOPP_documentation.html.
Datum: 18.6.2013.
97. Elias JE, Haas W, Faherty BK, Gygi SP: Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. *Nat Methods* 2005; 2: 667-675.
98. Wolfram Research I: Mathematica Edition: Version 8.0.4.0. 2011;Champaign, Illinois.

99. Karp NA, Huber W, Sadowski PG, Charles PD, Hester SV, Lilley KS: Addressing accuracy and precision issues in iTRAQ quantitation. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 1885-1897.
100. Lin WT, Hung WN, Yian YH, Wu KP, Han CL, Chen YR, Chen YJ, Sung TY, Hsu WL: Multi-Q: a fully automated tool for multiplexed protein quantitation. *J Proteome Res* 2006; 5: 2328-2338.
101. Hu J, Qian J, Borisov O, Pan S, Li Y, Liu T, Deng L, Wannemacher K, Kurnellas M, Patterson C, Elkabes S, Li H: Optimized proteomic analysis of a mouse model of cerebellar dysfunction using amine-specific isobaric tags. *Proteomics* 2006; 6: 4321-4334.
102. Bantscheff M, Boesche M, Eberhard D, Matthieson T, Sweetman G, Kuster B: Robust and sensitive iTRAQ quantification on an LTQ Orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 1702-1713.
103. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS: Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999; 20: 3551-3567.
104. Jain E, Bairoch A, Duvaud S, Phan I, Redaschi N, Suzek BE, Martin MJ, McGarvey P, Gasteiger E: Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics* 2009; 10: 136.
105. Magrane M, Consortium U: UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database (Oxford)* 2011; 2011: bar009.
106. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR: Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; 48: 4827-4833.
107. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
108. Meiners S, Ludwig A, Lorenz M, Dreger H, Baumann G, Stangl V, Stangl K: Nontoxic proteasome inhibition activates a protective antioxidant defense response in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 2232-2241.
109. Veschini L, Belloni D, Foglieni C, Cangi MG, Ferrarini M, Caligaris-Cappio F, Ferrero E: Hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha determines sensitivity of endothelial cells to the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood* 2007; 109: 2565-2570.
110. Evans C, Noirel J, Ow SY, Salim M, Pereira-Medrano AG, Couto N, Pandhal J, Smith D, Pham TK, Karunakaran E, Zou X, Biggs CA, Wright PC: An insight into iTRAQ: where do we stand now? *Anal Bioanal Chem* 2012; 404: 1011-1027.
111. Beck M, Schmidt A, Malmstroem J, Claassen M, Ori A, Szymborska A, Herzog F, Rinner O, Ellenberg J, Aebersold R: The quantitative proteome of a human cell line. *Mol Syst Biol* 2011; 7: 549.
112. Millionsi R, Tolin S, Puricelli L, Sbrignadello S, Fadini GP, Tessari P, Arrigoni G: High abundance proteins depletion vs low abundance proteins enrichment: comparison of methods to reduce the plasma proteome complexity. *PLoS One* 2011; 6: e19603.
113. Kinter M, Sherman NE: Mass Spectrometric Analysis of Tryptic Digests. In *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc., 2005, 166-206.

114. Bauer C, Cramer R, Schuchhardt J: Evaluation of peak-picking algorithms for protein mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2011; 696: 341-352.
115. TOPP-Dokumentation:
http://ftp.mi.fu-berlin.de/OpenMS/doc-1.9-official/html/TOPP_ITRAQAnalyzer.html
Datum: 17.6.2013.
116. Johnson RS, Martin SA, Biemann K: Collision-induced fragmentation of (M + H)⁺ ions of peptides. Side chain specific sequence ions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 1988; 86: 137-154.
117. Renner D, Spiteller G: Mechanism of fragmentation reactions of [MH]⁺ ions obtained from peptides by liquid secondary ion mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry* 1986; 13: 405-410.
118. Johnson RS, Biemann K: Computer program (SEQPEP) to aid in the interpretation of high-energy collision tandem mass spectra of peptides. *Biomed Environ Mass Spectrom* 1989; 18: 945-957.
119. Madden T, Welham KJ, Baldwin MA: Factors affecting immonium ion intensities in the high-energy collision-induced decomposition spectra of peptides. *Organic Mass Spectrometry* 1991; 26: 443-446.
120. Falick AM, Hines WM, Medzihradzky KF, Baldwin MA, Gibson BW: Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 1993; 4: 882-893.
121. Papayannopoulos IA: The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrometry Reviews* 1995; 14: 49-73.
122. Mahoney DW, Therneau TM, Heppelmann CJ, Higgins L, Benson LM, Zenka RM, Jagtap P, Nelsestuen GL, Bergen HR, Oberg AL: Relative quantification: characterization of bias, variability and fold changes in mass spectrometry data from iTRAQ-labeled peptides. *J Proteome Res* 2011; 10: 4325-4333.
123. Boehm AM, Putz S, Altenhofer D, Sickmann A, Falk M: Precise protein quantification based on peptide quantification using iTRAQ. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 214.
124. Carr S, Aebersold R, Baldwin M, Burlingame A, Clauser K, Nesvizhskii A: The need for guidelines in publication of peptide and protein identification data: Working Group on Publication Guidelines for Peptide and Protein Identification Data. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 531-533.
125. Pappin D, Emery P: iTRAQ Tips and Tricks. In ASMS User Meeting 05/23/10. Salt Lake City, USA, Cold Spring Harbor Laboratory / Matrix Science Ltd., 2010.
126. Hundertmark C, Fischer R, Reinl T, May S, Klawonn F, Jansch L: MS-specific noise model reveals the potential of iTRAQ in quantitative proteomics. *Bioinformatics* 2009; 25: 1004-1011.
127. Gan CS, Chong PK, Pham TK, Wright PC: Technical, experimental, and biological variations in isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). *J Proteome Res* 2007; 6: 821-827.
128. MacCoss MJ, Toth MJ, Matthews DE: Evaluation and optimization of ion-current ratio measurements by selected-ion-monitoring mass spectrometry. *Anal Chem* 2001; 73: 2976-2984.

129. MacCoss MJ, Wu CC, Liu H, Sadygov R, Yates JR, 3rd: A correlation algorithm for the automated quantitative analysis of shotgun proteomics data. *Anal Chem* 2003; 75: 6912-6921.
130. Kim PD, Patel BB, Yeung AT: Isobaric labeling and data normalization without requiring protein quantitation. *J Biomol Tech* 2012; 23: 11-23.
131. Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT: Rapidly switchable matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for protein identification. *J Am Soc Mass Spectrom* 2000; 11: 493-504.
132. Wattenberg A, Organ AJ, Schneider K, Tyldesley R, Bordoli R, Bateman RH: Sequence dependent fragmentation of peptides generated by MALDI quadrupole time-of-flight (MALDI Q-TOF) mass spectrometry and its implications for protein identification. *J Am Soc Mass Spectrom* 2002; 13: 772-783.
133. Bienvenut WV, Deon C, Pasquarello C, Campbell JM, Sanchez JC, Vestal ML, Hochstrasser DF: Matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry with high resolution and sensitivity for identification and characterization of proteins. *Proteomics* 2002; 2: 868-876.
134. Burlingame AL, Hunang L, Williams K, Sihlbom C, Medzhiradsky K, Pallavicini M, Campbell JL, Juhasz P, Martin S, Vestal M, Baldwin M: Reliable Protein Identification from Stained or Unstained 2-D Gels Using a High Throughput MALDI/TOF/TOF. In *Proceedings of the 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. Chicago, IL, abstract no. A011465, June 2001.
135. Rejtar T, Hu P, Juhasz P, Campbell JM, Vestal ML, Preisler J, Karger BL: Off-line coupling of high-resolution capillary electrophoresis to MALDI-TOF and TOF/TOF MS. *J Proteome Res* 2002; 1: 171-179.
136. Bodnar WM, Blackburn RK, Krise JM, Moseley MA: Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage. *J Am Soc Mass Spectrom* 2003; 14: 971-979.
137. Yang Y, Zhang S, Howe K, Wilson DB, Moser F, Irwin D, Thannhauser TW: A comparison of nLC-ESI-MS/MS and nLC-MALDI-MS/MS for GeLC-based protein identification and iTRAQ-based shotgun quantitative proteomics. *J Biomol Tech* 2007; 18: 226-237.
138. Scheri RC, Lee J, Curtis LR, Barofsky DF: A comparison of relative quantification with isobaric tags on a subset of the murine hepatic proteome using electrospray ionization quadrupole time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22: 3137-3146.
139. Kuzyk MA, Ohlund LB, Elliott MH, Smith D, Qian H, Delaney A, Hunter CL, Borchers CH: A comparison of MS/MS-based, stable-isotope-labeled, quantitation performance on ESI-quadrupole TOF and MALDI-TOF/TOF mass spectrometers. *Proteomics* 2009; 9: 3328-3340.
140. Seshi B: An integrated approach to mapping the proteome of the human bone marrow stromal cell. *Proteomics* 2006; 6: 5169-5182.
141. Salim K, Kehoe L, Minkoff MS, Bilsland JG, Munoz-Sanjuan I, Guest PC: Identification of differentiating neural progenitor cell markers using shotgun isobaric tagging mass spectrometry. *Stem Cells Dev* 2006; 15: 461-470.

142. Pei XY, Dai Y, Grant S: The proteasome inhibitor bortezomib promotes mitochondrial injury and apoptosis induced by the small molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 in multiple myeloma cells. *Leukemia* 2003; 17: 2036-2045.
143. Codony-Servat J, Tapia MA, Bosch M, Oliva C, Domingo-Domenech J, Mellado B, Rolfe M, Ross JS, Gascon P, Rovira A, Albanell J: Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 665-675.
144. Albero MP, Vaquer JM, Andreu EJ, Villanueva JJ, Franch L, Ivorra C, Poch E, Agirre X, Prosper F, Perez-Roger I: Bortezomib decreases Rb phosphorylation and induces caspase-dependent apoptosis in Imatinib-sensitive and -resistant Bcr-Abl1-expressing cells. *Oncogene* 2010; 29: 3276-3286.
145. Theiss AL, Jenkins AK, Okoro NI, Klapproth JM, Merlin D, Sitaraman SV: Prohibitin inhibits tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor-kappa B nuclear translocation via the novel mechanism of decreasing importin alpha3 expression. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 4412-4423.
146. Kockar F, Yildirim H, Sagkan RI, Hagemann C, Soysal Y, Anacker J, Hamza AA, Vordermark D, Flentje M, Said HM: Hypoxia and cytokines regulate carbonic anhydrase 9 expression in hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World J Clin Oncol* 2012; 3: 82-91.
147. Borthwick LA, McIlroy EI, Gorowiec MR, Brodlie M, Johnson GE, Ward C, Lordan JL, Corris PA, Kirby JA, Fisher AJ: Inflammation and epithelial to mesenchymal transition in lung transplant recipients: role in dysregulated epithelial wound repair. *Am J Transplant* 2010; 10: 498-509.
148. Koga T, Kuwahara I, Lillehoj EP, Lu W, Miyata T, Isohama Y, Kim KC: TNF-alpha induces MUC1 gene transcription in lung epithelial cells: its signaling pathway and biological implication. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L693-701.
149. Kikuchi J, Wada T, Shimizu R, Izumi T, Akutsu M, Mitsunaga K, Noborio-Hatano K, Nobuyoshi M, Ozawa K, Kano Y, Furukawa Y: Histone deacetylases are critical targets of bortezomib-induced cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 2010; 116: 406-417.
150. Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, Mitsiades C, Munshi NC, Richardson PG, Carrasco RD, Anderson KC: Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood* 2009; 114: 1046-1052.
151. Nikrad M, Johnson T, Puthalalath H, Coultas L, Adams J, Kraft AS: The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 443-449.
152. Camara J, Jarai G: Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF-alpha. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010; 3: 2.
153. Cross A, Moots RJ, Edwards SW: The dual effects of TNFalpha on neutrophil apoptosis are mediated via differential effects on expression of Mcl-1 and Bfl-1. *Blood* 2008; 111: 878-884.

154. Ghavami S, Eshraghi M, Kadkhoda K, Mutawe MM, Maddika S, Bay GH, Wesselborg S, Halayko AJ, Klonisch T, Los M: Role of BNIP3 in TNF-induced cell death--TNF upregulates BNIP3 expression. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 546-560.
155. Muller J, Oma Y, Vallar L, Friederich E, Poch O, Winsor B: Sequence and comparative genomic analysis of actin-related proteins. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 5736-5748.
156. Lessard JL: Two monoclonal antibodies to actin: one muscle selective and one generally reactive. *Cell Motil Cytoskeleton* 1988; 10: 349-362.
157. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillessen D, Gabbiani G: A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986; 103: 2787-2796.
158. Zhou M, Wu X, Ginsberg HN: Evidence that a rapidly turning over protein, normally degraded by proteasomes, regulates hsp72 gene transcription in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 24769-24775.
159. Stangl V, Lorenz M, Meiners S, Ludwig A, Bartsch C, Moobed M, Vietzke A, Kinkel HT, Baumann G, Stangl K: Long-term up-regulation of eNOS and improvement of endothelial function by inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. *Faseb J* 2004; 18: 272-279.
160. Bush KT, Goldberg AL, Nigam SK: Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J Biol Chem* 1997; 272: 9086-9092.
161. Pritts TA, Hungness ES, Hershko DD, Robb BW, Sun X, Luo GJ, Fischer JE, Wong HR, Hasselgren PO: Proteasome inhibitors induce heat shock response and increase IL-6 expression in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282: R1016-1026.
162. Kawazoe Y, Nakai A, Tanabe M, Nagata K: Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock-factor family. *Eur J Biochem* 1998; 255: 356-362.
163. Mathew A, Mathur SK, Morimoto RI: Heat shock response and protein degradation: regulation of HSF2 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 5091-5098.
164. Ramirez-Romero R, Nevarez-Garza AM, Rodriguez-Tovar LE, Wong-Gonzalez A, Ledezma-Torres RA, Hernandez-Vidal G: Histopathological analogies in chronic pulmonary lesions between cattle and humans: basis for an alternative animal model. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012: 647403.
165. Bukau B, Deuerling E, Pfund C, Craig EA: Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 2000; 101: 119-122.
166. Hartl FU, Hayer-Hartl M: Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002; 295: 1852-1858.
167. Young JC, Barral JM, Ulrich Hartl F: More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 541-547.
168. Ryan MT, Pfanner N: Hsp70 proteins in protein translocation. *Adv Protein Chem* 2001; 59: 223-242.

169. Pratt WB, Toft DO: Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228: 111-133.
170. Mayer MP, Bukau B: Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 670-684.
171. Meiners S, Heyken D, Weller A, Ludwig A, Stangl K, Kloetzel PM, Kruger E: Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *J Biol Chem* 2003; 278: 21517-21525.
172. Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D: The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3149-3162.
173. Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, Finley D: A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 1062-1067.
174. Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A: Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* 2012; 482: 186-191.
175. Tanaka K: The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009; 85: 12-36.
176. Redman KL, Rechsteiner M: Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature* 1989; 338: 438-440.
177. Kimura Y, Tanaka K: Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J Biochem* 2010; 147: 793-798.
178. Ryu KY, Maehr R, Gilchrist CA, Long MA, Bouley DM, Mueller B, Ploegh HL, Kopito RR: The mouse polyubiquitin gene UbC is essential for fetal liver development, cell-cycle progression and stress tolerance. *Embo J* 2007; 26: 2693-2706.
179. Kaiser SE, Riley BE, Shaler TA, Trevino RS, Becker CH, Schulman H, Kopito RR: Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools. *Nat Methods* 2011; 8: 691-696.
180. Vasilescu J, Smith JC, Ethier M, Figeys D: Proteomic analysis of ubiquitinated proteins from human MCF-7 breast cancer cells by immunoaffinity purification and mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005; 4: 2192-2200.
181. Bersani F, Taulli R, Accornero P, Morotti A, Miretti S, Crepaldi T, Ponzetto C: Bortezomib-mediated proteasome inhibition as a potential strategy for the treatment of rhabdomyosarcoma. *European Journal of Cancer* 2008; 44: 876-884.
182. Shabek N, Iwai K, Ciechanover A: Ubiquitin is degraded by the ubiquitin system as a monomer and as part of its conjugated target. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 425-431.
183. Shabek N, Herman-Bachinsky Y, Ciechanover A: Ubiquitin degradation with its substrate, or as a monomer in a ubiquitination-independent mode, provides clues to proteasome regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 11907-11912.
184. Laszlo L, Doherty FJ, Osborn NU, Mayer RJ: Ubiquitinated protein conjugates are specifically enriched in the lysosomal system of fibroblasts. *FEBS Lett* 1990; 261: 365-368.

185. Pedrioli PG, Eng JK, Hubley R, Vogelzang M, Deutsch EW, Raught B, Pratt B, Nilsson E, Angeletti RH, Apweiler R, Cheung K, Costello CE, Hermjakob H, Huang S, Julian RK, Kapp E, McComb ME, Oliver SG, Omenn G, Paton NW, Simpson R, Smith R, Taylor CF, Zhu W, Aebersold R: A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1459-1466.
186. Thiele H, Jörg G, Peter H, Gerhard K, Martin B: Managing Proteomics Data: From Generation and Data Warehousing to Central Data Repository. *J Proteomics Bioinform* 2008; 1: 485-507.
187. Hultin-Rosenberg L, Forshed J, Branca RM, Lehtio J, Johansson HJ: Defining, comparing, and improving iTRAQ quantification in mass spectrometry proteomics data. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12: 2021-2031.
188. Leon IR, Schwammle V, Jensen ON, Sprenger RR: Quantitative Assessment of In-solution Digestion Efficiency Identifies Optimal Protocols for Unbiased Protein Analysis. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12: 2992-3005.
189. Ow SY, Salim M, Noirel J, Evans C, Rehman I, Wright PC: iTRAQ underestimation in simple and complex mixtures: "the good, the bad and the ugly". *J Proteome Res* 2009; 8: 5347-5355.
190. D'Ascenzo M, Choe L, Lee KH: iTRAQPak: an R based analysis and visualization package for 8-plex isobaric protein expression data. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2008; 7: 127-135.
191. Quackenbush J: Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 2002; 32 Suppl: 496-501.
192. Bauer C, Kleinjung F, Rutishauser D, Panse C, Chadt A, Dreja T, Al-Hasani H, Reinert K, Schlapbach R, Schuchhardt J: PPINGUIN: Peptide Profiling Guided Identification of Proteins improves quantitation of iTRAQ ratios. *BMC Bioinformatics* 2012; 13: 34.
193. Burke-Gaffney A, Hellewell PG: Tumour necrosis factor-alpha-induced ICAM-1 expression in human vascular endothelial and lung epithelial cells: modulation by tyrosine kinase inhibitors. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1149-1158.
194. Wright K, Nwariaku F, Halaihel N, Schulman C, Yin HL, Turnage RH: Burn-activated neutrophils and tumor necrosis factor-alpha alter endothelial cell actin cytoskeleton and enhance monolayer permeability. *Surgery* 2000; 128: 259-265.
195. Lacerda CM, Xin L, Rogers I, Reardon KF: Analysis of iTRAQ data using Mascot and Peaks quantification algorithms. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2008; 7: 119-126.
196. Srinivasan S, Thangavelu M, Zhang L, Green KB, Nichols KK: iTRAQ quantitative proteomics in the analysis of tears in dry eye patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 5052-5059.
197. Choe LH, Aggarwal K, Franck Z, Lee KH: A comparison of the consistency of proteome quantitation using two-dimensional electrophoresis and shotgun isobaric tagging in *Escherichia coli* cells. *Electrophoresis* 2005; 26: 2437-2449.
198. Li Z, Adams RM, Chourey K, Hurst GB, Hettich RL, Pan C: Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ Orbitrap Velos. *J Proteome Res* 2012; 11: 1582-1590.

199. Onsongo G, Stone MD, Van Riper SK, Chilton J, Wu B, Higgins L, Lund TC, Carlis JV, Griffin TJ: LTQ-iQuant: A freely available software pipeline for automated and accurate protein quantification of isobaric tagged peptide data from LTQ instruments. *Proteomics* 2010; 10: 3533-3538.
200. Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A, Vingron M: Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 2002; 18 Suppl 1: S96-104.
201. Jungblut P, Thiede B, Zimny-Arndt U, Muller EC, Scheler C, Wittmann-Liebold B, Otto A: Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels. *Electrophoresis* 1996; 17: 839-847.
202. Mann M, Jensen ON: Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 255-261.
203. Altelaar AF, Munoz J, Heck AJ: Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet* 2013; 14: 35-48.
204. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ, Jr.: Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* 2005; 44: 7342-7372.
205. Marx V: Making sure PTMs are not lost after translation. *Nat Meth* 2013; 10: 201-204.
206. Thingholm TE, Palmisano G, Kjeldsen F, Larsen MR: Undesirable charge-enhancement of isobaric tagged phosphopeptides leads to reduced identification efficiency. *J Proteome Res* 2010; 9: 4045-4052.
207. Przybylski C, Junger MA, Aubertin J, Radvanyi F, Aebersold R, Pflieger D: Quantitative analysis of protein complex constituents and their phosphorylation states on a LTQ-Orbitrap instrument. *J Proteome Res* 2010; 9: 5118-5132.
208. Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP: A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 921-926.
209. Marotti LA, Jr., Newitt R, Wang Y, Aebersold R, Dohlman HG: Direct identification of a G protein ubiquitination site by mass spectrometry. *Biochemistry* 2002; 41: 5067-5074.
210. Peng J, Gygi SP: Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 2001; 36: 1083-1091.
211. Peng J: Evaluation of proteomic strategies for analyzing ubiquitinated proteins. *BMB Rep* 2008; 41: 177-183.
212. Udeshi ND, Mani DR, Eisenhaure T, Mertins P, Jaffe JD, Clauser KR, Hacohen N, Carr SA: Methods for quantification of in vivo changes in protein ubiquitination following proteasome and deubiquitinase inhibition. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11: 148-159.
213. Meierhofer D, Wang X, Huang L, Kaiser P: Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry. *J Proteome Res* 2008; 7: 4566-4576.
214. Casado-Vela J, Martinez-Esteso MJ, Rodriguez E, Borrás E, Elortza F, Bru-Martinez R: iTRAQ-based quantitative analysis of protein mixtures with large fold change and dynamic range. *Proteomics* 2010; 10: 343-347.

215. R-Core-Team: R: A Language and Environment for Statistical Computing. In R Foundation for Statistical Computing, 2013.
216. Gatto L, Christoforou A: Using R and Bioconductor for proteomics data analysis. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1844: 42-51.
217. Ruppen I, Grau L, Orenes-Pinero E, Ashman K, Gil M, Algaba F, Bellmunt J, Sanchez-Carbayo M: Differential protein expression profiling by iTRAQ-two-dimensional LC-MS/MS of human bladder cancer EJ138 cells transfected with the metastasis suppressor KiSS-1 gene. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 2276-2291.
218. Kaur P, Rizk NM, Ibrahim S, Younes N, Uppal A, Dennis K, Karve T, Blakeslee K, Kwagyan J, Zirie M, Resson HW, Cheema AK: iTRAQ-based quantitative protein expression profiling and MRM verification of markers in type 2 diabetes. *J Proteome Res* 2012; 11: 5527-5539.
219. Li H, Lin X: Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation. *Cytokine* 2008; 41: 1-8.
220. Beg AA, Baldwin AS, Jr.: The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* 1993; 7: 2064-2070.
221. Jasmin JF, Frank PG, Lisanti MP: *Caveolins and Caveolae: Roles in Signaling and Disease Mechanisms - Preface*. New York, USA, Springer Science+Business Media, 2012.
222. Reeves VL, Thomas CM, Smart EJ: Lipid rafts, caveolae and GPI-linked proteins. *Adv Exp Med Biol* 2012; 729: 3-13.
223. Parton RG, Hanzal-Bayer M, Hancock JF: Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J Cell Sci* 2006; 119: 787-796.
224. Hayer A, Stoeber M, Ritz D, Engel S, Meyer HH, Helenius A: Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J Cell Biol* 2010; 191: 615-629.
225. Li WP, Liu P, Pilcher BK, Anderson RG: Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J Cell Sci* 2001; 114: 1397-1408.
226. Anderson RG: The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 199-225.
227. Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J: Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 1994; 127: 1217-1232.
228. Anderson RG, Jacobson K: A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 2002; 296: 1821-1825.
229. Williams TM, Lisanti MP: Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C494-506.
230. Yuan G, Regel I, Lian F, Friedrich T, Hitkova I, Hofheinz RD, Strobel P, Langer R, Keller G, Rocken C, Zimmermann W, Schmid RM, Ebert MP, Burgermeister E: WNT6 is a novel target gene of caveolin-1 promoting chemoresistance to epirubicin in human gastric cancer cells. *Oncogene* 2013; 32: 375-387.
231. Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR: Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 715-735.

232. Sunaga N, Miyajima K, Suzuki M, Sato M, White MA, Ramirez RD, Shay JW, Gazdar AF, Minna JD: Different roles for caveolin-1 in the development of non-small cell lung cancer versus small cell lung cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 4277-4285.
233. Ho CC, Huang PH, Huang HY, Chen YH, Yang PC, Hsu SM: Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation. *Am J Pathol* 2002; 161: 1647-1656.
234. Quest AF, Lobos-Gonzalez L, Nunez S, Sanhueza C, Fernandez JG, Aguirre A, Rodriguez D, Leyton L, Torres V: The caveolin-1 connection to cell death and survival. *Curr Mol Med* 2013; 13: 266-281.
235. Wiechen K, Diatchenko L, Agoulnik A, Scharff KM, Schober H, Arlt K, Zhumabayeva B, Siebert PD, Dietel M, Schafer R, Sers C: Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 2001; 159: 1635-1643.
236. Fiucci G, Ravid D, Reich R, Liscovitch M: Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 2002; 21 :2365-2375.
237. Shao M, Yue Y, Sun GY, You QH, Wang N, Zhang D: Caveolin-1 regulates Rac1 activation and rat pulmonary microvascular endothelial hyperpermeability induced by TNF-alpha. *PLoS One* 2013; 8: e55213.
238. Millan J, Hewlett L, Glyn M, Toomre D, Clark P, Ridley AJ: Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 113-123.
239. Keuschnigg J, Henttinen T, Auvinen K, Karikoski M, Salmi M, Jalkanen S: The prototype endothelial marker PAL-E is a leukocyte trafficking molecule. *Blood* 2009; 114: 478-484.
240. Carman CV, Springer TA: A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 2004; 167: 377-388.
241. Mamdouh Z, Mikhailov A, Muller WA: Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment. *J Exp Med* 2009; 206: 2795-2808.
242. Podar K, Shringarpure R, Tai YT, Simoncini M, Sattler M, Ishitsuka K, Richardson PG, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC: Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by bortezomib. *Cancer Res* 2004; 64: 7500-7506.
243. Wang L, Lim EJ, Toborek M, Hennig B: The role of fatty acids and caveolin-1 in tumor necrosis factor alpha-induced endothelial cell activation. *Metabolism* 2008; 57: 1328-1339.
244. Deregowski Vr, Delhalle S, Benoit Vr, Bours V, Merville M-P: Identification of cytokine-induced nuclear factor-kappaB target genes in ovarian and breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 2002; 64: 873-881.
245. Lei MG, Tan X, Qureshi N, Morrison DC: Regulation of cellular caveolin-1 protein expression in murine macrophages by microbial products. *Infect Immun* 2005; 73: 8136-8143.

246. Kim HY, Kim MJ, Yang JE, Kim BK, Han J, Lee YS, Kim JH: Effects of intermittent media replacement on the gene expression of differentiating neural progenitor cells. *Mol Biosyst* 2012; 8: 602-608.
247. Li J, Sejas DP, Rani R, Koretsky T, Bagby GC, Pang Q: Nucleophosmin regulates cell cycle progression and stress response in hematopoietic stem/progenitor cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 16536-16545.
248. Traub P, Shoeman RL: Intermediate filament proteins: cytoskeletal elements with gene-regulatory function? *Int Rev Cytol* 1994; 154: 1-103.
249. Hartig R, Shoeman RL, Janetzko A, Tolstonog G, Traub P: DNA-mediated transport of the intermediate filament protein vimentin into the nucleus of cultured cells. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 24): 3573-3584.
250. Georgatos SD, Blobel G: Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1987; 105: 117-125.
251. Mergui X, Puiffe ML, Valteau-Couanet D, Lipinski M, Benard J, Amor-Gueret M: p21Waf1 expression is regulated by nuclear intermediate filament vimentin in neuroblastoma. *BMC Cancer* 2010; 10: 473.
252. Ise H, Kobayashi S, Goto M, Sato T, Kawakubo M, Takahashi M, Ikeda U, Akaike T: Vimentin and desmin possess GlcNAc-binding lectin-like properties on cell surfaces. *Glycobiology* 2010; 20: 843-864.
253. Mor-Vaknin N, Punturieri A, Sitwala K, Markovitz DM: Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 59-63.
254. Evans RM: Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. *Bioessays* 1998; 20: 79-86.
255. Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM: The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; 50: 1-6.
256. Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE: Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res* 2007; 313: 2050-2062.
257. Zhao Y, Yan Q, Long X, Chen X, Wang Y: Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochem Funct* 2008; 26: 571-577.
258. Satelli A, Li S: Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 3033-3046.
259. Rabinovich GA, Gabilovich D, Sotomayor EM: Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 267-296.
260. Khong HT, Restifo NP: Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 2002; 3: 999-1005.
261. Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 442-454.
262. Mendez MG, Kojima S, Goldman RD: Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *Faseb J* 2010; 24: 1838-1851.
263. Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R: E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol* 2001; 154: 1185-1196.
264. Scheel C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, Weinberg RA: Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 2011; 145: 926-940.

265. Bates RC, Mercurio AM: Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 1790-1800.
266. Julien S, Puig I, Caretti E, Bonaventure J, Nelles L, van Roy F, Dargemont C, de Herreros AG, Bellacosa A, Larue L: Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene* 2007; 26: 7445-7456.
267. Min C, Eddy SF, Sherr DH, Sonenshein GE: NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *J Cell Biochem* 2008; 104: 733-744.
268. Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R: The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* 2008; 99: 1375-1379.
269. Saito A: EMT and EndMT: regulated in similar ways? *J Biochem* 2013; 153: 493-495.
270. Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR: Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1-8.
271. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R: Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 2007; 67: 10123-10128.
272. Gao H, Zhang J, Liu T, Shi W: Rapamycin prevents endothelial cell migration by inhibiting the endothelial-to-mesenchymal transition and matrix metalloproteinase-2 and -9: an in vitro study. *Mol Vis* 2011; 17: 3406-3414.
273. van Meeteren LA, ten Dijke P: Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 177-186.
274. Rodriguez MI, Peralta-Leal A, O'Valle F, Rodriguez-Vargas JM, Gonzalez-Flores A, Majuelos-Melguizo J, Lopez L, Serrano S, de Herreros AG, Rodriguez-Manzanique JC, Fernandez R, Del Moral RG, de Almodovar JM, Oliver FJ: PARP-1 regulates metastatic melanoma through modulation of vimentin-induced malignant transformation. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003531.
275. van Beijnum JR, Dings RP, van der Linden E, Zwaans BM, Ramaekers FC, Mayo KH, Griffioen AW: Gene expression of tumor angiogenesis dissected: specific targeting of colon cancer angiogenic vasculature. *Blood* 2006; 108: 2339-2348.
276. O'Blenes CA, Kinnear C, Rabinovitch M: Tumor necrosis factor-alpha induces fibronectin synthesis in coronary artery smooth muscle cells by a nitric oxide-dependent posttranscriptional mechanism. *Circ Res* 2001; 89: 26-32.
277. Zhang HS, Wang SQ: Notoginsenoside R1 inhibits TNF-alpha-induced fibronectin production in smooth muscle cells via the ROS/ERK pathway. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1664-1674.
278. Michalski CW, Gorbachevski A, Erkan M, Reiser C, Deucker S, Bergmann F, Giese T, Weigand M, Giese NA, Friess H, Kleeff J: Mononuclear cells modulate the activity of pancreatic stellate cells which in turn promote fibrosis and inflammation in chronic pancreatitis. *J Transl Med* 2007; 5: 63.
279. Bendas G, Borsig L: Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int J Cell Biol* 2012; 2012: 676731.
280. Tan R, Zhang J, Tan X, Zhang X, Yang J, Liu Y: Downregulation of SnoN expression in obstructive nephropathy is mediated by an enhanced ubiquitin-dependent degradation. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2781-2791.

281. To WS, Midwood KS: Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011; 4: 21.
282. Hynes RO: Fibronectins. *Sci Am* 1986; 254: 42-51.
283. Sun XJ, Fa PP, Cui ZW, Xia Y, Sun L, Li ZS, Tang AF, Gui YT, Cai ZM: The EDA-containing cellular fibronectin induces epithelial mesenchymal transition in lung cancer cells through integrin alpha9beta1-mediated activation of PI3-K /Akt and Erk1/2. *Carcinogenesis* 2014; 35: 184-191.
284. Pankov R, Yamada KM: Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 2002; 115: 3861-3863.
285. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW: Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 2000; 275: 21785-21788.
286. Albelda SM, Buck CA: Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J* 1990; 4: 2868-2880.
287. Dejana E, Needham L, Gordon J: Endothelial cell adhesive interactions: Mechanism and consequences. New York, NY, Plenum Press, 1992; 153-168.
288. Conforti G, Dominguez-Jimenez C, Zanetti A, Gimbrone MA, Jr., Cremona O, Marchisio PC, Dejana E: Human endothelial cells express integrin receptors on the luminal aspect of their membrane. *Blood* 1992; 80: 437-446.
289. Weis SM, Cheresh DA: alphaV integrins in angiogenesis and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; 1: a006478.
290. Desgrosellier JS, Cheresh DA: Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 9-22.
291. Chen SH, Lin CY, Lee LT, Chang GD, Lee PP, Hung CC, Kao WT, Tsai PH, Schally AV, Hwang JJ, Lee MT: Up-regulation of fibronectin and tissue transglutaminase promotes cell invasion involving increased association with integrin and MMP expression in A431 cells. *Anticancer Res* 2010; 30: 4177-4186.
292. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D: VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820-827.
293. Zhao J, Wei J, Mialki R, Zou C, Mallampalli RK, Zhao Y: Extracellular signal-regulated kinase (ERK) regulates cortactin ubiquitination and degradation in lung epithelial cells. *J Biol Chem* 2012; 287: 19105-19114.
294. Orth JD, McNiven MA: Get off my back! Rapid receptor internalization through circular dorsal ruffles. *Cancer Res* 2006; 66: 11094-11096.
295. Weaver AM: Cortactin in tumor invasiveness. *Cancer Lett* 2008; 265: 157-166.
296. Selbach M, Backert S: Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. *Trends Microbiol* 2005; 13: 181-189.
297. Ammer AG, Weed SA: Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton* 2008; 65: 687-707.
298. Weed SA, Parsons JT: Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* 2001; 20: 6418-6434.
299. Yamada S, Yanamoto S, Kawasaki G, Mizuno A, Nemoto TK: Overexpression of cortactin increases invasion potential in oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2010; 16: 523-531.

300. van Rossum AG, Moolenaar WH, Schuurin E: Cortactin affects cell migration by regulating intercellular adhesion and cell spreading. *Exp Cell Res* 2006; 312: 1658-1670.
301. Arce FT, Whitlock JL, Birukova AA, Birukov KG, Arnsdorf MF, Lal R, Garcia JG, Dudek SM: Regulation of the micromechanical properties of pulmonary endothelium by S1P and thrombin: role of cortactin. *Biophys J* 2008; 95: 886-894.
302. Jacobson JR, Dudek SM, Singleton PA, Kolosova IA, Verin AD, Garcia JG: Endothelial cell barrier enhancement by ATP is mediated by the small GTPase Rac and cortactin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291: L289-295.
303. Schnoor M, Lai FP, Zarbock A, Klaver R, Polaschegg C, Schulte D, Weich HA, Oelkers JM, Rottner K, Vestweber D: Cortactin deficiency is associated with reduced neutrophil recruitment but increased vascular permeability in vivo. *J Exp Med* 2011; 208: 1721-1735.
304. Cogli L, Progida C, Bramato R, Bucci C: Vimentin phosphorylation and assembly are regulated by the small GTPase Rab7a. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:1283-1293.
305. Levine B, Klionsky DJ: Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6: 463-477.
306. Hoang B, Benavides A, Shi Y, Frost P, Lichtenstein A: Effect of autophagy on multiple myeloma cell viability. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 1974-1984.
307. Kawaguchi T, Miyazawa K, Moriya S, Ohtomo T, Che XF, Naito M, Itoh M, Tomoda A: Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress. *Int J Oncol* 2011; 38: 643-654.
308. Lou Z, Ren T, Peng X, Sun Y, Jiao G, Lu Q, Zhang S, Lu X, Guo W: Bortezomib induces apoptosis and autophagy in osteosarcoma cells through mitogen-activated protein kinase pathway in vitro. *J Int Med Res* 2013; 41: 1505-1519.
309. BasuRay S, Agola J, Jim P, Seaman M, Wandinger-Ness A: Rab7a in Endocytosis and Signaling. in Choi S (ed): *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer New York, 2012, 1536-1547.
310. Chia WJ, Tang BL: Emerging roles for Rab family GTPases in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1795: 110-116.
311. Stenmark H: Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 513-525.
312. Anastas JN, Moon RT: WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 11-26.
313. Filipovich A, Gehrke I, Poll-Wolbeck SJ, Kreuzer KA: Physiological inhibitors of Wnt signaling. *Eur J Haematol* 2011; 86: 453-465.
314. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S: Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiol (Oxf)* 2011; 204: 17-33.
315. Benhaj K, Gur B, Bozkurt B, Yulug I, Akcali C, Ozturk M: Expression profiling of Wnt pathway genes in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2005; 7: P4.18.
316. Thanendrarajan S, Kim Y, Schmidt-Wolf IG: Understanding and Targeting the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway in Chronic Leukemia. *Leuk Res Treatment* 2011; 2011: 329572.

317. Goodwin AM, Sullivan KM, D'Amore PA: Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical Wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of Wnt signaling. *Dev Dyn* 2006; 235: 3110-3120.
318. Wright M, Aikawa M, Szeto W, Papkoff J: Identification of a Wnt-responsive signal transduction pathway in primary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 384-388.
319. Masckauchan TN, Shawber CJ, Funahashi Y, Li CM, Kitajewski J: Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis* 2005; 8: 43-51.
320. Cheng CW, Smith SK, Charnock-Jones DS: Wnt-1 signaling inhibits human umbilical vein endothelial cell proliferation and alters cell morphology. *Exp Cell Res* 2003; 291: 415-425.
321. Miller JR: The Wnts. *Genome Biol* 2002; 3: REVIEWS3001.
322. Choi JH, Hur J, Yoon CH, Kim JH, Lee CS, Youn SW, Oh IY, Skurk C, Murohara T, Park YB, Walsh K, Kim HS: Augmentation of therapeutic angiogenesis using genetically modified human endothelial progenitor cells with altered glycogen synthase kinase-3beta activity. *J Biol Chem* 2004; 279: 49430-49438.
323. Krawetz R, Kelly GM: Wnt6 induces the specification and epithelialization of F9 embryonal carcinoma cells to primitive endoderm. *Cell Signal* 2008; 20: 506-517.
324. Schubert FR, Mootoosamy RC, Walters EH, Graham A, Tumiotto L, Munsterberg AE, Lumsden A, Dietrich S: Wnt6 marks sites of epithelial transformations in the chick embryo. *Mech Dev* 2002; 114: 143-148.
325. Jamora C, Fuchs E: Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E101-108.
326. Thiery JP, Sleeman JP: Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 131-142.
327. Kirikoshi H, Sekihara H, Katoh M: WNT10A and WNT6, clustered in human chromosome 2q35 region with head-to-tail manner, are strongly coexpressed in SW480 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 798-805.
328. Kim Y, Reifenberger G, Lu D, Endo T, Carson DA, Gast SM, Meschenmoser K, Nowak M, Schmidt-Wolf IG: Influencing the Wnt signaling pathway in multiple myeloma. *Anticancer Res* 2011; 31: 725-730.
329. Narayanan BA, Doudican NA, Park J, Xu D, Narayanan NK, Dasgupta R, Mazumder A: Antagonistic effect of small-molecule inhibitors of Wnt/beta-catenin in multiple myeloma. *Anticancer Res* 2012; 32: 4697-4707.
330. Yao H, Ashihara E, Strovel JW, Nakagawa Y, Kuroda J, Nagao R, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi M, Hayashi Y, Shimazaki C, Taniwaki M, Strand K, Padia J, Hirai H, Kimura S, Maekawa T: AV-65, a novel Wnt/beta-catenin signal inhibitor, successfully suppresses progression of multiple myeloma in a mouse model. *Blood Cancer J* 2011; 1: e43.
331. Ring JE, Kolev VN, Padval MV, Keegan M, Vidal CM, Neill AA, Shapiro IM, Pachter JA, Xu Q: The Cancer Stem Cell-Targeting Wnt Inhibitor VS-507 Reduces Breast Cancer Growth and Metastasis In Thirty-Fifth Annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, TX, USA, American Association for Cancer Research, 2012.

332. DiMeo TA, Anderson K, Phadke P, Fan C, Perou CM, Naber S, Kuperwasser C: A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 5364-5373.
333. Rabbani SA, Valentino M-L, Chen G, Shukeir N, Goltzman D: Inhibition of Wnt-1 in human prostate cancer cells blocks prostate cancer cell proliferation, invasion, growth and skeletal metastasis in vitro and in vivo. *AACR Meeting Abstracts* 2006;2006:937-.
334. Mahler GJ, Farrar EJ, Butcher JT: Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 121-130.
335. Reglero-Real N, Marcos-Ramiro B, Millan J: Endothelial membrane reorganization during leukocyte extravasation. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 3079-3099.
336. Tanaka K: Molecular biology of the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 537-541.
337. Finley D: Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 477-513.
338. Groll M, Heinemeyer W, Jager S, Ullrich T, Bochtler M, Wolf DH, Huber R: The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 10976-10983.
339. Borissenko L, Groll M: 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev* 2007; 107: 687-717.
340. UNECE: <http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/pictograms.html>
In United Nations Economic Commission for Europe 2013.
341. Wang RC, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G, White M, Reichelt J, Levine B: Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* 2012; 338: 956-959

6 Anhang

6.1 Ergänzende Abbildungen und Tabellen

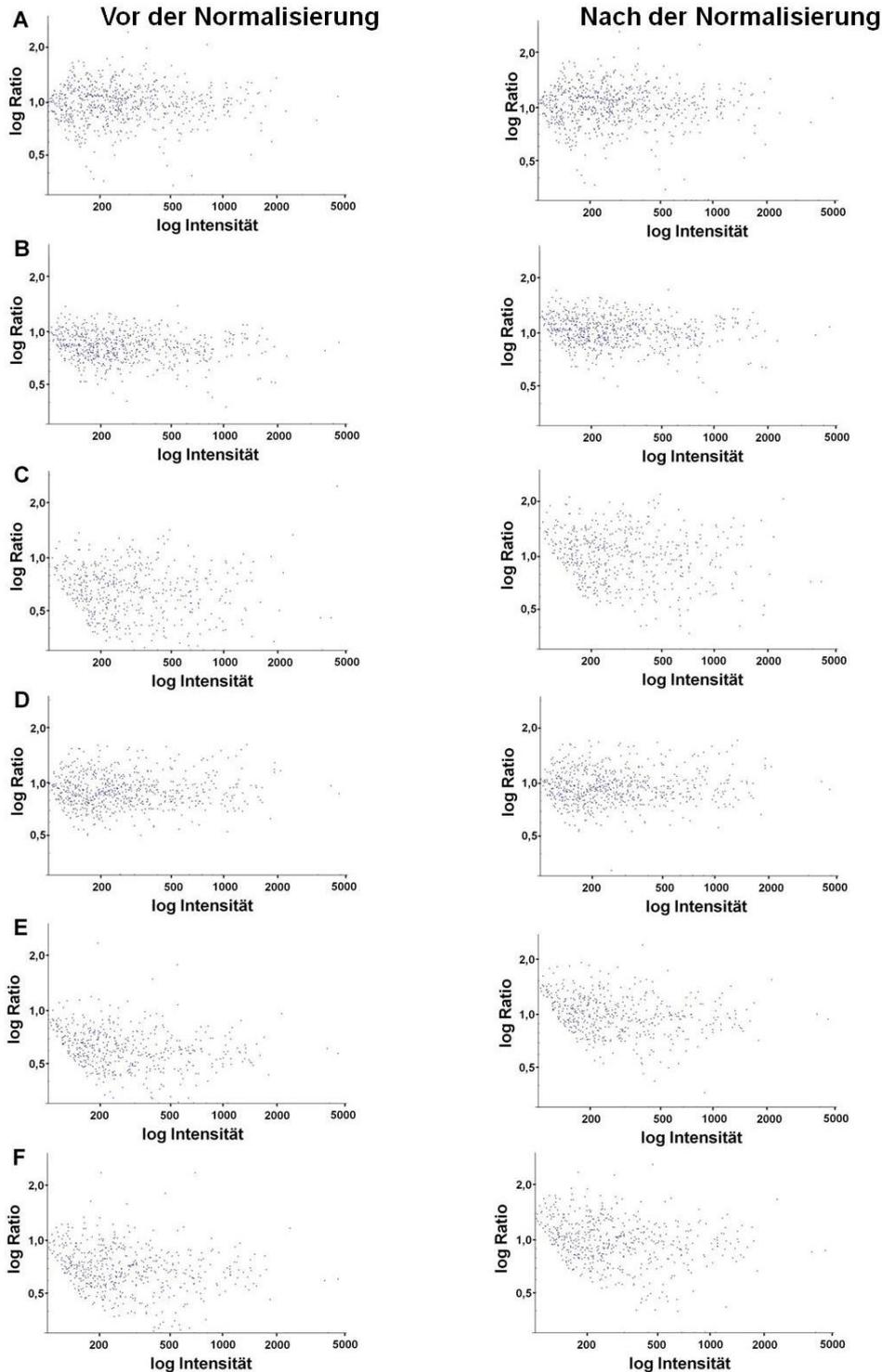


Abbildung 41: Log-log-Darstellung der Peptid-Ratio zu Signalintensität des Ansatzes [A] 115:113, [B] 117:113, [C] 119:113, [D] 116:114, [E] 118:114 und [F] 121:114. Links dargestellt sind die rohen, unbearbeiteten Peptid-Ratios und rechts die Peptid-Ratios nach Durchführung der Median-Normalisierung. Nur Peptid-Ratios von eindeutigen Peptiden („unique peptides“) sind dargestellt, bei denen die Signalintensitäten der Reporterionen ≥ 20 lagen.

Tabelle 9: Im iTRAQ-Experiment identifizierte Proteasom-Untereinheiten mit Beschreibung ihrer Lokalisation und soweit bekannt ihrer Eigenschaften sowie Funktionen. Tanaka bezeichnet den Gebrauch von Rpn-, Rpt-, α - und β -Untereinheiten als systematische Nomenklatur [175]. Zusätzlich ist die übliche Nomenklatur der humanen Genom-Organisation (Human Genome Organisation, HUGO) aufgezeigt.

HUGO	Systemat. Nomenklatur	Lokalisation	Eigenschaft und Funktion
PSMC2	Rpt4	19S (Basis)	Adenosintriphosphatasen (ATPasen) mit diversen zellulären Funktionen (AAA-ATPasen), die als molekularer Motor zusammen mit den anderen Untereinheit Rpt 2, 3, 5 und 6 fungieren und beteiligt sind am Erkennen, Binden und Entfalten des Substrats, sowie der Translokation des Substrats in den katalytischen 20S-Kern [174]. Außerdem liefern die Rpt-Untereinheiten die benötigte Energie in Form von ATP [336].
PSMC6	Rpt1	19S (Basis)	
PSMD2	Rpn1	19S (Basis)	Wird als Nicht-ATPase bezeichnet und ist als ein Gerüstprotein beschrieben [337]
PSMD6	Rpn7	19S (Deckel)	Wird als Nicht-ATPase bezeichnet und ist vermutlich ein Gerüstprotein, das für den Kontakt zwischen den Untereinheiten zuständig ist [337].
PSMD7	Rpn8	19S (Deckel)	Wird als Nicht-ATPase bezeichnet und besitzt eine katalytische Domäne für das essentielle Enzym DUB RPN11, Rpn8 scheint selbst keine Deubiquitinase-Eigenschaften zu besitzen [337].
PSMD1	Rpn6	19S (Deckel)	Wird als Nicht-ATPase bezeichnet und ist vermutlich ein Gerüstprotein, das für den Kontakt zwischen den Untereinheiten zuständig ist [337].
PSMA4	α 3	20S	Die α -Untereinheiten verbinden die 20S-Einheit mit der 19S-Einheit und bilden das Eingangstor in die 20S-Einheit [337].
PSMA5	α 5	20S	
PSMA6	α 1	20S	
PSMA7	α 4	20S	
PSMB2	β 4	20S	Ist proteolytisch inaktiv [338]
PSMB3	β 3	20S	Ist proteolytisch inaktiv [338]; ist mitverantwortlich für die Spezifität der Substratbindetasche S3 [339].
PSMB6	β 1	20S	Besitzt eine proteolytische Aktivität (vor allem caspase-ähnlich, bevorzugt an sauren Aminosäure-Resten) [339] und ist damit beteiligt an der Proteolyse von Substraten

6.2 Gefahrstoffinformation



Abbildung 42: GHS-Piktogramme nach [340].

6.2.1 Auflistung der verwendeten Chemikalien mit den entsprechenden Gefahr- und Sicherheitshinweisen nach dem Global harmonisierten System (GHS).

Chemikalie	CAS-Nr.	GHS	Gefahrenhinweis	Sicherheitshinweise
α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure	28166-41-8	GHS07	H315, H319, H335	P261, P280, P305+P351+P338, P321, P405, P501
Acetonitril	75-05-8	GHS02, GHS07	H225, H302+H312+H332, H319	P210, P305+P351+P338, P403+P235
Ameisensäure	64-18-6	GHS02, GHS05	H226, H314,	P280, P305+P351+P338, P310
Ammoniumhydroxid	1336-21-6	GHS05, GHS07, GHS09	H314, H335, H400	P261, P273, P280, P305+P351+P338, P310
AP Conjugate Substrate Kit	77-86-1, 68-12-2	GHS, 06, GHS08	H226, H312, H319, H332, H360D	P280, P315, P501
Dithiothreitol	3483-12-3	GHS07	H302, H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
Iodacetamid	144-48-9	GHS06, GHS08	H301, H317, H334, H413	P261, P280, P301+P310, P342+P311
iTRAQ [®] Reagenz 8-plex Kit	75-05-8, 107-13-1, 76-05-1	GHS02, GHS07	H225, H302, H312, H315, H319, H332	P301+P312, P303+ P361+P353, P304+ P340, P305+P351+P338, P332+P313, P312
Kaleidoscope Prestained Protein Standard	151-21-3	/	H311, H302, H315, H319	P501
Methanol	67-56-1	GHS02, GHS06, GHS08	H225, H301, H311, H331, H370	P210, P280, P233, P302+P352, P309+P310
Natriumfluorid	7681-49-4	GHS06	H301+H315, H319	P301+P310, P305+P351+P338

Chemikalie	CAS-Nr.	GHS	Gefahrenhinweis	Sicherheitshinweise
N-Ethylmaleimid	128-53-0	GHS05, GHS06, GHS07	H300, H311, H314, H317	P260, P280, P301+P310, P302+P352, P304+ P340, P305+P351+P338
Penicillin-Streptomycin liquid	3810-74-0, 69-57-8	GHS07, GHS08	H315, H317, H334, H335, H361	P304+P340, P305+P351+P338, P337+P313, P303+P361+P353, P332+P313, P264, P312
Phenylmethylsulfonyl- fluorid		GHS05, GHS06	H301, H314	P264, P280, P301+P310, P330+P331, P303+P361+P353, P305+P351+P338
SDS	151-21-3	GHS06	H311, H302, H315, H319	P280, P305+P351+P338, P361, P362, P405, P501
Trypsin	9002-07-7	GHS07, GHS08	H315, H319, H334, H335	P285, P261, P305+P351+P338, P321, P405, P501
XT MES Laufpuffer 20x	4432-31-9, 151-21-3	GHS05, GHS07	H302, H315, H319, H335	P501
XT Probenpuffer 4x	2044-56-6, 77-86-1	/	H302, H315, H319,	P501
XT reduzierendes Agens 20x	51805-45-9, 7647-14-5	/	H314	P501

6.2.2 Gefahrenhinweise nach GHS (H-Sätze)

H-Satz	Erklärung
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar
H301	Giftig bei Verschlucken
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken
H311	Giftig bei Hautkontakt
H312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden
H315	Verursacht Hautreizungen
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen
H319	Verursacht schwere Augenreizung
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen
H335	Kann die Atemwege reizen
H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen

H-Satz	Erklärung
H361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen
H400	Sehr giftig für Wasserorganismen
H413	Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung

6.2.3 Sicherheitshinweise nach GHS (P-Sätze)

P-Satz	Erklärung
P210	Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen
P233	Behälter dicht verschlossen halten
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden
P264	Nach Gebrauch gründlich waschen
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen
P285	Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen
P301 + P310	Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
P301 + P312	Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
P302 + P352	Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen
P303 + P361 + P353	Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
P304 + P340	Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert
P305 + P351 + P338	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen
P309+310	Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
P311	Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
P312	Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
P313	Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen
P315	Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen
P321	Besondere Behandlung (siehe ... auf dieser Kennzeichnungsetikett)
P330	Mund ausspülen
P331	Kein Erbrechen herbeiführen
P332 + P313	Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen
P337 + P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen
P342 + P311	Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
P362	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen
P403 + P235	Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren
P405	Unter Verschluss aufbewahren
P501	Entsorgung des Inhalts/des Behälters gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften

6.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
⊥	Inhibition
↑	Konzentrationsanstieg
↓	Konzentrationsabfall
%	Prozent
<	kleiner als
≤	kleiner gleich
>	größer als
≥	größer gleich
±	Plusminuszeichen
ALLN	N-Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal
ARG	aminoreaktive Gruppe
ATPasen	Adenosintriphosphatasen
a.u.	arbiträre Einheiten (arbitrary units)
B	Bortezomib
BPC	Basispeak-Chromatogramm
BSA	bovines Serumalbumin
C	Kohlenstoff
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation (Collision-Induced Dissociation)
c-Lactacystin	Clasto-Lactacystin-β-Lacton (Proteasominhibitor)
CSV	Dateiformat Komma-getrennte Werte (Comma-Separated Values)
DDA	datenabhängige Aufnahme (Data-Dependent Acquisition)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
DUBs	deubiquitylierende Enzyme
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIC	extrahiertes Ionenchromatogramm
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EndMT	Endothelial-mesenchymale Transition
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	und andere
F	Fraktion
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GHS	Global harmonisiertes System
GSK-3β	Glykogensynthase-Kinase-3β
GTPase	Guanintriphosphatase
h	Stunde/Stunden
H	Wasserstoff
HCCA	α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLB	hydrophile-lipophile Balance

Abkürzung	Bedeutung
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatographie)
HPMECs	Humane mikrovaskuläre Lungenendothelzellen (Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells)
HSP	Hitzeschockprotein
HUGO	humane Genom-Organisation (Human Genome Organisation)
HUVECs	humane Endothelzellen gewonnen aus einer Nabelschnur (Human Umbilical Vascular Endothelial Cells)
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
ICAT	Isotopen-kodierter Affinitätstag (Isotope-Coded Affinity Tag)
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPG	immobilisierter pH-Gradient
iTRAQ	Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation
K	Kontrolle
Lys	Lysin
m	Masse
MALDI	Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation
Mda	Megadalton
MDCK	epitheliale Zelllinie aus der Hundeniere (Madin-Darby Canine Kidney Cells)
min	Minute
mM	millimolar
MM	Multiplés Myelom
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
N	Stickstoff
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NP	Nebenpeak
O	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate-Buffered Saline)
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	Parts Per Million (10^{-6})
PTMs	posttranslationale Modifikationen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QTOF	Quadrupole-Time of Flight

Abkürzung	Bedeutung
RI	Reporterion
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase (Reversed Phase)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
Rpn	regulatory particle non-ATPase
Rpt	regulatory particle triple-ATPase
S	Svedberg-Einheit
³⁵ S	Isotop des Schwefels, das β -Strahlung niedriger Energie emittiert
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
SILAC	Markieren mit Aminosäuren mit stabilen Isotopen in Zellkultur (Stable Isotope Labelling with Amino Acids in Cell Culture)
SILE	stabiles Isotopen Label Experiment
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
SRM	Selected Reaction Monitoring
t	Zeit (time)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-Buffered Saline)
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,1 % Tween 20
TEAB	Triethylammonium Bicarbonat
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (Transforming Growth Factor)
TIC	Totalionenstrom (Total Ion Current)
TMT	Tandem Mass Tag
TNF- α / TNF	Tumornekrosefaktor- α
TOPP	The OpenMS Proteomics Pipeline
TOPPAS	The OpenMS Proteomics Pipeline Assistant
Ub	Ubiquitin
UPLC	Ultra-Hochleistungs-Flüssigchromatographie (Ultra high-Performance Liquid Chromatography)
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	ultraviolett
v	Volumenanteil
VCAM-1	vaskuläres Adhäsionsmolekül 1
VEGF	vaskulärer, endothelialer Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor)
w	Massenanteil
vgl.	vergleiche
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl] - 2H- tetrazolium hydroxid
z	Ladungszustand

6.3.1 Liste der Aminosäuren mit entsprechenden Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

7 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob mittels eines semiquantitativen, proteomanalytischen Ansatzes unter Anwendung einer Markierungsstrategie mit der Bezeichnung iTRAQ zelluläre Mechanismen identifiziert werden können, welche bei der Behandlung mit Proteasominhibitoren eine Metastasierung verhindern. Aus Studien ist bereits bekannt, dass unter dem Proteasominhibitor Bortezomib, der in Deutschland seit 2004 für die Behandlung des multiplen Myeloms zugelassen ist, die Bildung von Metastasen reduziert ist. Die hierfür verantwortlichen zellulären Mechanismen sind nur teilweise erforscht.

Als Modellsystem wurden kultivierte Endothelzellen verwendet, um die Veränderung der Proteinzusammensetzung nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α in An- oder Abwesenheit von Bortezomib zu untersuchen. Eine Metastasierung kann von Zytokinen wie TNF- α gefördert werden. Endothelzellen wurden verwendet, weil diese während der Metastasierung eine wichtige Rolle zum Beispiel bei der Extra- und Intravasation von Tumorzellen spielen.

Zunächst wurde ein Protokoll etabliert, mit dem die Identifizierung und Quantifizierung unter Verwendung der 8-plex iTRAQ-Reagenzien möglich war. Es konnte eine Pipeline für die bioinformatische Prozessierung von LC ESI-MS/MS-Daten unter Verwendung der Open-Source-Software OpenMS entwickelt und optimiert werden. Mithilfe der etablierten Pipeline war eine transparente Datenprozessierung gewährleistet, weil jeder einzelne Schritt der Prozessierung einsehbar war und kontrolliert werden konnte.

Eine anschließende biologische Interpretation der Ergebnisse aus der iTRAQ-Analyse in Bezug auf die Veränderung der Proteinkonzentration in An- beziehungsweise Abwesenheit von Bortezomib und TNF- α führte zu der Identifizierung von Proteinen, die bereits in anderen proteomanalytischen Studien beschrieben worden waren. Der Vergleich der experimentellen Ergebnisse aus der iTRAQ-Analyse mit Daten aus der Literatur zeigte, dass in der Literatur bereits vergleichbare Ergebnisse beschrieben worden waren, was die Eignung des iTRAQ-basierten Quantifizierungsverfahrens demonstrierte. Zudem wurden in dieser Arbeit die Proteine Vimentin, Caveolin-1, Fibronectin, Cortactin, Rab7a und Wnt-6 identifiziert, die Hinweise auf mögliche neue Mechanismen geben, die eine Metastasierung unter Proteasominhibition verhindern. Ergebnisse der LC ESI-MS/MS-Messungen konnten durch LC MALDI-MS/MS-Messungen bestätigt werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die iTRAQ-Technologie und das entwickelte Protokoll unter Verwendung des OpenMS-Systems geeignet sind, um Hinweise auf zelluläre Mechanismen zu sammeln. Diese Arbeit legt den Grundstein für eine weiterführende Untersuchung der vorgestellten Proteinkandidaten, was das Wissen über zelluläre Mechanismen des Proteasominhibitors Bortezomib bedeutend ausbauen würde. Weiterführende Erkenntnisse über Proteasominhibitoren versprechen eine Erweiterung der Indikation von Proteasominhibitoren und die Entwicklung neuer Therapiestrategien im Kampf gegen Krebs.

8 Summary

The aim of this work was to investigate if it was possible to identify novel cellular mechanisms which are involved in the inhibition of metastasis formation during the treatment with proteasome inhibitors by applying a semiquantitative proteomics approach with a labelling strategy called iTRAQ. Studies demonstrated that the proteasome inhibitor bortezomib which has been approved for patients with multiple myeloma in Germany since 2004 reduced the formation of metastases. To date, the cellular mechanisms for this effect are poorly understood.

A model with cultured endothelial cells was used in order to examine the alterations in protein composition in the cells after the stimulation with the proinflammatory cytokine TNF- α in the presence or absence of bortezomib. Cytokines like TNF- α may be responsible for increased dissemination of metastatic cancer cells. Endothelial cells were chosen because they play an important role during the metastatic processes of extravasation and intravasation of tumor cells.

Initially, a protocol was established which enabled the identification and quantification with the 8-plex iTRAQ reagents. It was possible to develop and optimize a pipeline for the bioinformatic analysis of the LC ESI-MS/MS data by using the open-source software OpenMS. The established pipeline provided transparency because it enabled the tracking and controlling of each single step of the data processing procedure.

A subsequent biological interpretation of the results of the iTRAQ-experiment based on concentration alterations in the presence or absence of bortezomib and TNF- α resulted in the identification of proteins which have already been described in other proteomics studies. The comparison of the experimental data of the iTRAQ-analysis and the literature showed that accordant results have been described in the literature before which demonstrated the plausibility of the iTRAQ labelling strategy. Furthermore, the protein candidates vimentin, caveolin-1, fibronectin, cortactin, Rab7a and Wnt-6 were identified in the iTRAQ-experiment which indicate new mechanisms responsible for the inhibition of metastasis formation under proteasome inhibition. Results of the LC ESI-MS/MS analysis were confirmed by LC MALDI-MS/MS analysis.

This work demonstrates that the iTRAQ-based technology and the developed workflow using the OpenMS system are capable of providing evidence for cellular mechanisms. Therefore, this work provides the basis for further investigations of the introduced protein candidates. Further knowledge about cellular mechanisms of the proteasome inhibitor bortezomib promises the extension of its indication and the advancement of novel therapeutic strategies.

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge

Cation exchange displacement batch chromatography of proteins guided by screening of protein purification parameters.

Kotasińska M, Richter V, Thiemann J, Schlüter H.

J Sep Sci. 35(22):3170-6, 2012.

Mass spectrometric analysis of protein species of biologics.

Richter V, Kwiatkowski M, Omid A, Robertson WD, Schlüter H.

Pharm Bioprocess 1 (4) 381-404, 2013. Review.

Buchbeitrag

Sample Displacement Batch chromatography of Proteins.

Kotasińska M, Richter V, Kwiatkowski M, Schlüter H.

Methods Mol Biol: Protein Downstream Processing, *im Druck*.

Posterpräsentationen

Application of trypsin immobilized on magnetic beads for the mass spectrometric identification of proteins.

Richter V, Rosenbaum T, Trusch M, Schlüter H.

44. Jahrestagung der Gesellschaft für Massenspektrometrie, 27.02-02.03.2011, Dortmund.

Development of a SRM assay for quantification of urinary proteins.

Richter V, Hildebrand D, Schlüter H.

Gemeinsame Jahrestagung der deutschen und polnischen Gesellschaften für Massenspektrometrie, 04-07.03.2012, Poznan (Polen).

Mass spectrometric investigation of the effect of proteasome inhibition on endothelial cells using iTRAQ.

Richter V, Kwiatkowski M, Wurlitzer M, Schröder C, Lange T, Schumacher U, Schlüter H.

46. Jahrestagung der Gesellschaft für Massenspektrometrie, 10-13.03.2013, Berlin.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Untersuchung der Eignung des iTRAQ-basierten, proteomanalytischen Quantifizierungsverfahrens zur Identifizierung zellulärer Mechanismen des Einflusses von Proteasominhibitoren auf die Metastasierung“

im Institut für Klinische Chemie, Abteilung Massenspektrometrische Proteomanalytik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorfs, unter der Leitung von Prof. Dr. Hartmut Schlüter und der Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Betzel für den Fachbereich Chemie selbstständig verfasst und nur mit den angegebenen Methoden und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher kein Gesuch um Zulassung zur Promotion an einer anderen Universität eingereicht habe und weder diese noch eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt habe.

Hamburg, 25. Januar 2014

Verena Richter

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Leuten bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt insbesondere Prof. Dr. Hartmut Schlüter, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit unter seiner Leitung anzufertigen. Dank ihm habe ich ein breites Spektrum an Methoden und Techniken gelernt.

Ganz herzlich möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Betzel für die Erstellung des Erstgutachtens und die Betreuung von Seiten der Universität Hamburg danken.

Im Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Udo Schumacher für das Bereitstellen von Bortezomib und der Zelllinie HPMEC sowie für die Möglichkeit, die zellbiologischen Experimente an seinem Institut durchzuführen. Ganz herzlich möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Dr. Christine Schröder, Prof. Dr. Tobias Lange und Renate Gehrcke bedanken, die mich bei allen Fragen rund um die Zellkultur unterstützt haben. Auch den übrigen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Experimentelle Morphologie gilt mein Dank für die stets herzliche Atmosphäre.

Dr. Maria Trusch danke ich für die herzliche und kompetente Unterstützung, die sie mir stets anbot, nicht nur bei den MALDI-Messungen. Mein Dank gilt auch Dr. Kai Bartkowiak für die praktischen und theoretischen Tipps bei der Durchführung der Western Blots. Jama Bradfield danke ich für ihren spontanen Einsatz beim Korrekturlesen.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Oliver Kohlbacher, Prof. Dr. Knut Reinert, Dr. Chris Bielow und dem übrigen OpenMS-Team danken für die Entwicklung des iTRAQ-Analyzers.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe der Klinischen Chemie für die wunderbare Zusammenarbeit und die schöne Zeit. Vor allem Marcel Kwiatkowski danke ich für seine Unterstützung bei allen Hindernissen rund um die Massenspektrometrie, bei der Auswertung mit OpenMS und das unermüdliche Korrekturlesen. Bei Marcus Wurlitzer bedanke ich mich für seinen Einsatz bei allen bioinformatischen Fragestellungen. Dr. Diana Hildebrand danke ich für das Korrekturlesen und die zahlreichen Tipps. Des Weiteren möchte ich PD Dr. Friedrich Buck danken für die Unterstützung rund um das QTOF.

Zu guter Letzt gilt meiner Familie ein ganz besonderer Dank, vor allem meiner Mutter Angelika Richter und meiner Schwester Kerstin Kohn, die immer für mich da sind und mich allzeit in jeder Situation stärken. Meinem Freund Henning Rathjen möchte ich an dieser Stelle für sein unendliches Verständnis und natürlich das fleißige Korrekturlesen danken.