

Aus der Medizinischen Klinik III
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Zabel
und
der Klinischen und Experimentellen Pathologie
des Forschungszentrums Borstel
Ltd. Arzt: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Dr. h. c. Ekkehard Vollmer

**Proteomweite Untersuchungen zur Identifizierung neuer
und Validierung bekannter Biomarker an HOPE-fixierten,
Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Daniel Kähler
aus
Paderborn

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Torsten Goldmann
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. phil. Jens Habermann
- Tag der mündlichen Prüfung: 16. April 2013
- Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16. April 2013
- Promotionskommission der Sektion Medizin

Meinen Eltern

„Der erste Trunk aus dem Becher der Naturwissenschaften macht atheistisch. Aber auf dem Grund des Bechers wartet Gott.“

Werner Heisenberg (*1901; †1976)
Dt. Physiker und Nobelpreisträger

Inhaltsverzeichnis	4
1. Einleitung	7
1.1 Lungenkrebs	7
1.2 Diagnostik von Lungenkrebs	9
1.3 Identifizierung und Validierung von Biomarkern	10
1.3.1 <u>T</u> rans <u>k</u> eto <u>l</u> ase-like Protein <u>1</u> (TKTL1)	12
1.3.2 <u>P</u> ulmonales <u>H</u> aptoglobin (pHp)	13
1.3.3 <u>A</u> nn <u>e</u> x <u>i</u> n <u>A</u> 8 (ANXA8)	14
1.3.4 <u>D</u> ou <u>b</u> le homeob <u>o</u> x protein <u>4</u> (DUX4)	15
1.3.5 Voraussetzungen fundierter Biomarkeruntersuchungen	16
1.4 <u>Z</u> weidimensionale Gele <u>l</u> ektrophorese (2DE) und <u>M</u> assens <u>s</u> pektrometrie (MS)	18
1.5 Zielsetzungen	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Gewebe	27
2.1.1 HOPE-Technik	27
2.1.2 Formalinfixierung	28
2.1.3 Gefriermaterial	28
2.1.4 Ethanolfixierung	28
2.2 Techniken zur Untersuchung von Biomarkern	29
2.2.1 Gewebeschnitte	29
2.2.2 <u>T</u> issue <u>M</u> icro <u>a</u> rrays (TMAs)	29
2.2.3 Herstellung von Proteinlysaten	30
2.2.4 <u>I</u> mmunpr <u>ä</u> zipitierung (IP)	31
2.2.5 RNA-Extraktion	32
2.2.6 H&E-Färbung von Gewebeschnitten	33
2.2.7 <u>I</u> mmun <u>h</u> isto <u>c</u> hemie (IHC)	34
2.2.7.1 Färbung formalinfixierter Schnitte	34
2.2.7.2 Färbung HOPE-fixierter Schnitte	34
2.2.8 Transkriptomanalysen	35
2.2.9 <u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>g</u> ele <u>l</u> ektrophorese (PAGE)	35
2.2.10 Western-Blot/2D-Western Blot	36

2.2.11 <i>in situ</i> Hybridisierung (ISH)	37
2.2.12 Short Term Stimulation of Tissues (STST)	38
2.3 Proteomuntersuchungen an HOPE-fixierten, Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen	39
2.3.1 Verwendete 2DE-Systeme (IPG/NEPHGE-Technik)	39
2.3.2 2DE	43
2.3.2.1 Entparaffinierung	43
2.3.2.2 Proteinextraktion	43
2.3.2.3 Rehydrierung/Probenvorbereitung	45
2.3.2.4 Fokussierungsbedingungen	50
2.3.2.5 Äquilibration fokussierter Gele	52
2.3.2.6 PAGE	53
2.3.2.7 Färbung von 2D-Gelen	53
2.3.3 2D-Western Blot	55
2.3.3.1 Blotten von 2D-Gelen	55
2.3.3.2 Detektion von Biomarkern mit Antikörpern	55
2.3.4 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)	56
2.4 Identifizierung und Validierung von Biomarkern	57
2.4.1 TKTL1	57
2.4.2 pHp	57
2.4.3 ANXA 8	58
2.4.4 DUX4	59
3. Ergebnisse	60
3.1 Etablierung von Proteomuntersuchungen an HOPE-fixierten, Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen	60
3.1.1 2DE – initiale Ergebnisse	60
3.1.1.1 2DE	60
3.1.1.2 2D-Western Blot und Massenspektrometrie	65
3.1.2 Optimierung von Proteomuntersuchungen an HOPE-fixierten, Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen	69
3.1.2.1 Entparaffinierung	69
3.1.2.2 Proteinextraktion	69

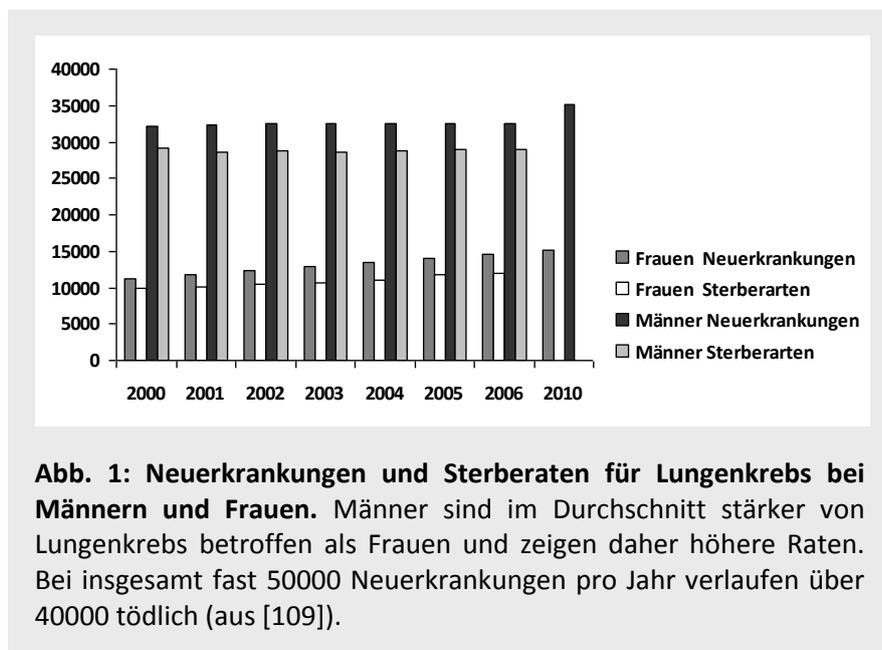
3.1.2.3 Rehydrierung/Probenvorbereitung	70
3.1.2.4 Fokussierungsbedingungen	76
3.1.2.5 Äquilibration	78
3.1.2.6 PAGE	80
3.1.2.7 Färbung von Gelen	80
3.1.3 2D-Western Blot	80
3.1.4 MALDI-TOF MS	80
3.2 Validierung von Biomarkern	82
3.2.1 TKTL1	82
3.2.2 pHp	83
3.2.3 ANXA8	86
3.2.4 DUX4	88
4. Diskussion	92
4.1 Etablierung von Proteomuntersuchungen an HOPE-fixierten, Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen	93
4.2 Validierung von Biomarkern	99
4.3 Fazit	104
5. Zusammenfassung	106
Literaturverzeichnis	107
Anhänge	
Glossar	119
Massenspektrometriedaten	123
Danksagungen	135
Lebenslauf	136
Publikationen	139
Erklärung	143

1. Einleitung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung neuer Vorgehensweisen bei der Suche, Beschreibung und Validierung von Biomarkern unter Verwendung HOPE-fixierter, in Paraffin eingebetteter Lungengewebe (S. 11). Speziell hierfür wurden die Parameter für Proteomuntersuchungen mittels 2DE und MALDI-TOF MS entwickelt und zur ergänzenden Beschreibung von Molekülen sowie zur Validierung angewendet. Nach Identifizierung von Kandidatengenomen über Transkriptomanalysen wurden diese durch eine methodisch vielfältige Charakterisierung unter Verwendung derselben archivierten Donorgewebe validiert und dabei mit den Proteomuntersuchungen verknüpft.

1.1 Lungenkrebs

Krebs fordert nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen weltweit die meisten Todesfälle, wobei Lungenkrebs die Krebserkrankung mit der höchsten Mortalität darstellt. Allein in der Bundesrepublik Deutschland beläuft sich die Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr auf über 50000, wovon eine große Anzahl tödlich verlaufen (Abb. 1). Unter 10% der Patienten mit einem Bronchialkarzinom überleben die 5-Jahres-Grenze nach der Diagnosestellung [109, 127].



Maligne Lungenerkrankungen lassen sich in zwei Hauptklassen einteilen. Während ein kleinerer Teil von ca. 20 % aus kleinzelligen, meist nicht operablen, aber durchaus chemotherapiesensiblen Karzinomen besteht (‘small cell lung cancer’, SCLC) und ca. 9 % aus undifferenzierten/großzelligen Karzinomen, machen einen Großteil der in der menschlichen Lunge vorkommenden Tumore die Adeno- und Plattenepithelkarzinome aus. Das Vorkommen dieser histologisch unterschiedlichen Nichtkleinzelligen Karzinome (‘non-small cell lung cancer’, NSCLC) unterscheidet sich bei Männern und Frauen, bei Männern setzen sie sich aus 44 % Plattenepithelkarzinomen und 28 % Adenokarzinomen zusammen; bei Frauen sind es 25 % Plattenepithelkarzinome und 42 % Adenokarzinome.

NSCLC wird wenn möglich über Lobektomie oder Pneumonektomie, ggf. mit anschließender Chemotherapie, behandelt. Aufgrund unterschiedlicher Morphologie und wegen voneinander abweichenden Veränderungen auf molekularer Ebene werden bei verschiedenen Lungentumoren zur effektiveren Behandlung zunehmend auch unterschiedliche Therapiestrategien verfolgt. Im Vorfeld jeder Therapie ist eine adäquate Diagnostik die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung. Möglichst in frühen Phasen der Krankheitsentwicklung sollte die Diagnosestellung mit Charakterisierung der Klasse und Subklasse von Lungenkarzinomen erfolgen, um noch erfolgreiche Behandlungen starten zu können [127].

Aufgrund verschiedener Veränderungen des genetischen Materials unterscheiden sich die Therapieverfahren bei den unterschiedlichen Lungenkrebsarten maßgeblich voneinander. Zu deren Untersuchung haben mittlerweile diverse molekulare Untersuchungsmethoden von Tumorgewebe Einzug in pathologische Verfahrensroutinen genommen. Fehlregulierte Proteine können neben histologischen Verfahren durch molekularbiologische und biochemische Techniken identifiziert, als Biomarker verwendet und in Geweben detektiert, lokalisiert und quantifiziert werden; sie liefern eine wichtige Grundlage für die tägliche pathologische Diagnostik von Lungenkrebs. Daneben gewinnen andere molekulare Untersuchungen wie Mutations- oder Amplifikationsanalysen aufgrund einer Vielzahl von molekulargenetischen Forschungsbefunden zunehmend an Bedeutung bei der Unterstützung von pathologischen Arbeitsweisen und sind wichtige Instrumente zum pathogenetischen Verständnis von Neoplasien und bei Therapieentscheidungen geworden [105].

1.2 Diagnostik von Lungenkrebs

Zur Unterscheidung, Charakterisierung und Therapiefindung bei verschiedenen Tumorarten in der menschlichen Lunge können zwei Untersuchungsansätze unterschieden werden. Zunächst stehen histo- und immunhistochemische Untersuchungen an formalinfixiertem oder frisch geschnittenem, schockgefrorenem Gewebe im Vordergrund. Durch Darstellung von morphologischen Strukturen mithilfe von Farbreaktionen (Hämatoxylin/Eosinfärbung) und der Identifizierung und Lokalisation von Proteinen im Gewebeschnitt durch antikörperbasierte Immundetektionen (‘immunohistochemistry’, IHC) werden Tumorklassen unterschieden und ihr Differenzierungsgrad bestimmt. Dabei ist oftmals eine Kombination von Molekülen zu untersuchen, um zu einer eindeutigen Diagnose zu gelangen. Wichtige IHC-Marker in der Lungenpathologie sind TTF-1 (‘thyroid transcription factor’), SP-A/B (‘surfactant protein A/B’), MAdL (Marker Adenokarzinome der Lunge), ferner z. B. Napsin und CEA (‘carcinoembryonic antigen’) [2, 16].

Neben den (immun)histochemischen, auf Mikroskopie basierenden Untersuchungen boten sich in den letzten Jahren molekularpathologische Verfahren für Anwendungen in der täglichen Praxis der Pathologie an, die mithilfe biotechnologischer Systeme und Methoden durchgeführt werden. Es werden nukleinsäurebasierte Untersuchungen im Rahmen von Mutations- oder Amplifikationsanalysen zu einer genaueren Charakterisierung des Tumors durchgeführt, um für einzelne Patienten eine individualisierte Therapie zu entwickeln. Mit der Gensequenzierung von Tumormaterial werden bereits standardmäßig potentielle Mutationen des ‘epidermal growth factor receptors’ (EGFR) in Exon 18, 19 und 21 bei Lungenkrebs nachgewiesen; oder auch die Amplifikation des Gens für den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (Her2/neu) bei Mammakarzinomen bestimmt [86, 90, 110]. Beide Verfahren geben jeweils Aufschluss über eine besondere Therapieoption (‘targeted therapy’; zielgerichtete Therapie). Bei beiden Therapieformen wird durch einen biotechnologisch generierten Antikörper direkt die Funktion eines Wachstumsfaktorrezeptors durch Neutralisation der Bindedomäne für den Wachstumsfaktor unterbunden, sodass die Weiterleitung von Wachstumssignalen in den Zellkern verhindert und das Tumorstadium gehemmt wird. Her2/neu ist ein Beispiel dafür, dass eine Kombination von Protein- und Nukleinsäuretechniken

zu einer abschließenden Diagnose führt, da nach immunhistochemischen Nachweisen einer Überexpression unter bestimmten Voraussetzungen zur Verifizierung ein Amplifikationsnachweis über Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) durchgeführt wird. Bei zusätzlich nachweislicher Amplifikation des Her2/neu kodierenden Gens über fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden und Fluoreszenzmikroskopie kann die zielgerichtete Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Herceptin (‘Trastuzumab’) eingeleitet werden, der die Bindedomäne von Her2/neu blockiert. Andere zielgerichtete Therapien verwenden kleinmolekulare Substanzen zur intrazellulären Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität von Wachstumsfaktorrezeptoren. Die Therapien mit ‘Erlotinib’, einem Tyrosinkinasehemmer zielgerichtet auf EGFR bei Darmkrebs oder ‘Gefitinib’ gegen EGFR bei Lungenkrebs sind mittlerweile ebenfalls etabliert. Bei letzterem wird über DNA-Sequenzierungen der Tumorgenome überprüft, ob Mutationen in Exon 18, 19 oder 21 vorliegen, die Voraussetzung für eine erfolgreiche zielgerichtete Therapie mit den oben genannten Medikamenten sind [25, 71].

Therapiestrategien dieser Art sind in den letzten Jahren zu einem wichtigen Teil in der Behandlung von Patienten geworden und erfordern eine solide, molekulare Analyse der betreffenden Gewebe. Für die Biomarkerforschung sind die Biowissenschaften und eine damit verbundene translationale Forschung in Zukunft zunehmend gefordert, krankheitsrelevante Moleküle zu identifizieren, zu charakterisieren und so neue Diagnose- und Therapieansätze zu ermöglichen. Grundvoraussetzungen dafür sind einerseits eine standardisierte Vorgehensweise bei der Kollektion, Fixierung und Archivierung der zur Untersuchung herangezogenen Gewebe, andererseits die Identifizierungsstrategien und die Möglichkeit der Verifikation und Validierung von Erkenntnissen über potentielle Biomarker.

1.3 Identifizierung und Validierung von Biomarkern

Als Biomarker verwendete Zielmoleküle erstrecken sich über ein breites Spektrum an Hormonen, Fetoproteinen, Zelloberflächenmolekülen, Enzymen, (angiogenetischen) Zytokinen und Nukleinsäuren (Genmutationen oder -amplifikationen). Bei Tumormarkern für Lungenkrebs sind besonders Serumbiomarker, Gewebebiomarker und Sputumbiomarker von Bedeutung [125].

Es liegt auf der Hand, dass bei der Auswahl des Untersuchungsmaterials für die Charakterisierung von krankheitsrelevanten Molekülen überwiegend frische und/oder eingefrorene Gewebe verwendet werden, um molekulare Degradation möglichst gering zu halten. Die retrospektive Biomarkerforschung ist allerdings einigen Limitierungen unterlegen, die mit den Eigenschaften archivierter Gewebe zusammenhängen. Die standardmäßige Formalinfixierung ist zur morphologischen und eingeschränkt zur immunochemischen Untersuchung von Geweben zwar gebräuchlich, für qualitativ hochwertige molekulare Analysen hingegen relativ schlecht geeignet. Daneben weist eingefrorenes Frischmaterial keine gute morphologische Konservierung auf und der molekulare Erhalt von Zielstrukturen nimmt nach längerer Lagerungszeit ebenfalls ab. Eine adäquate Fixierung von Geweben kann daher als wichtigste Grundvoraussetzung für molekulare Untersuchungen an archivierten Geweben angesehen werden und beeinflusst maßgeblich die Durchführbarkeit und den Erfolg von Untersuchungen zu Biomarkern [64, 123]. Deshalb wurden die Analysen in dieser Arbeit mit ‚Hepes-glutamic acid buffer mediated organic solvent protection effect‘ (HOPE)-fixierten Geweben durchgeführt. Diese Fixierungstechnik wurde seit den späten 90er Jahren in der Klinischen und Experimentellen Pathologie des Forschungszentrums Borstel angewendet, für ein großes Spektrum an molekularbiologischen und biochemischen Methoden etabliert und stellt mit bisher ca. 60 Publikationen weltweit das am besten untersuchte alternative Gewebefixativ dar [Auszug: 43-45, 64, 103, 116, 129, 130, 133]. Die HOPE-Technik eignet sich hervorragend für molekulare Untersuchungen an Archivmaterial, wie sie bei der Identifizierung und Validierung von Biomarkern durchzuführen sind. Sie beinhaltet eine Einbettung in reines, niedrigschmelzendes Paraffin und wird mit der Lagerung der Gewebe ohne bisher bekannte Zeiteinschränkung (in Analogie zur Formalinfixierung) abgeschlossen.

Die HOPE-Protektionslösung ist hyperosmolar und besteht hauptsächlich aus einem Gemisch aus Aminosäuren, Glukose und einem organischen, HEPES-basierten Puffersystem. HOPE diffundiert in Zellen und Gewebe, stabilisiert diese und konserviert in exzellenter Qualität die Morphologie und die molekularen Bestandteile der Zellen, was den maßgeblichen Vorteil der HOPE-Fixierung bei nukleinsäure- und proteinbasierten Analysen ausmacht. Auf Proteinebene findet nicht wie bei Formalin eine Quervernetzung statt (Abb. 3) und mit den

denaturierenden Eigenschaften einhergehend eine Veränderung oder Neutralisierung von Epitopen, deren Erhalt für die Nachweisbarkeit von Proteinen über monoklonale Antikörper unabdinglich ist. Die Eignung HOPE-fixierter Gewebe bei der Anwendung aller gängigen molekularen Techniken (IHC, RT-PCR, ISH, alle Blotting-Verfahren) ist im Rahmen detaillierter methodischer Arbeiten gezeigt worden [43-45, 103, 116, 129, 130, 133].

Zur Validierung von Informationen über Biomarker werden unterschiedliche molekulare Techniken kombiniert. Je höher dabei die methodische Vielfalt ist, desto genauer kann ein Molekül charakterisiert werden. Dabei ist von Vorteil, wenn verschiedene Ebenen (Morphologie, DNA, RNA, Protein) verglichen werden. Mit HOPE-fixierten Geweben bietet sich ein in der pathologischen Routinediagnostik verwendbares Paraffinmaterial, das zusätzlich für molekulare Analysen geeignet ist. Dieses Archivmaterial wurde hier zur Generierung von Transkriptomdaten (genomweite mRNA-Analysen) als initiale Informationsquelle über mögliche Biomarker benutzt, um daraufhin eine gezielte Untersuchung von Kandidaten anhand dieses Archivmaterials durchzuführen. An vier folgenden Beispielen soll die hier entwickelte Strategie veranschaulicht werden.

1.3.1 TKTL1

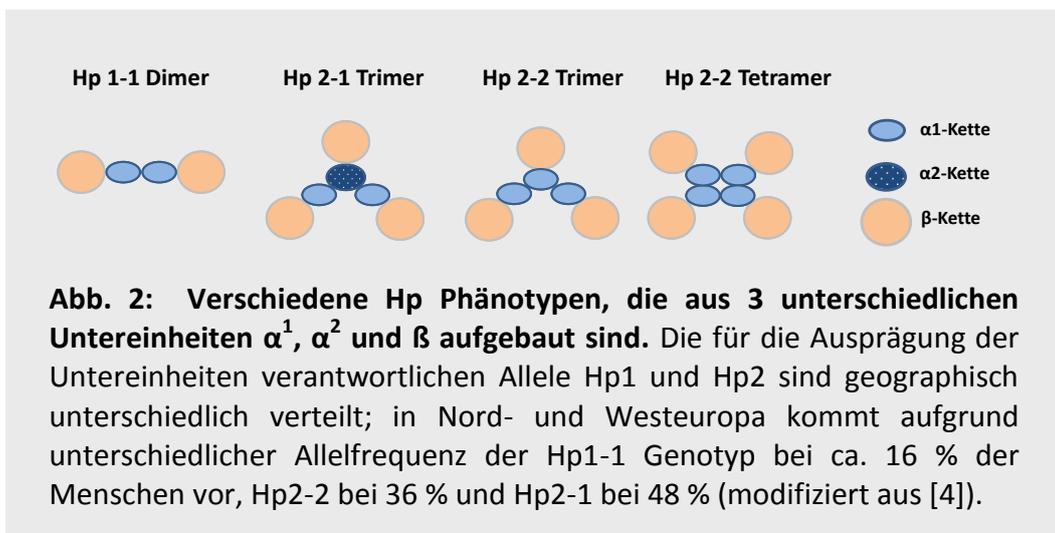
In den letzten Jahren wird zunehmend die Rolle von erhöhter Transketolase-Aktivität in Korrelation zu Tumorwachstum diskutiert. In einer Reihe von Studien wurde in diesem Zusammenhang die erhöhte Expression eines Proteins nachgewiesen, das wie die Transketolase im Pentosephosphatweg der anaeroben Glycolyse funktioniert. Aufgrund der Analogie zur Funktion der bekannten Transketolase erhielt dieses Molekül die Bezeichnung Transketolase-like Protein 1 (TKTL1) [62].

Neben der erfolgreichen Inhibierung der Proliferation von Tumoren in Kolorektalkarzinomen unter Verwendung von TKTL1-inhibierenden siRNAs [138] wurden auf Proteinebene Überexpressionen auch in anderen Karzinomarten nachgewiesen. Földi *et al.* zeigte bei Brustkrebs eine Korrelation zu Her2/neu Überexpression. Dort wurde in 89 % der untersuchten Fälle eine Expression und in 45 % eine starke Expression von TKTL1 festgestellt [36]. In Magenkarzinomen und Ovarialkarzinomen sowie in Nierenkarzinomen ist ebenfalls eine erhöhte Transketolaseaktivität durch stark erhöhte TKTL1-Aktivität gefunden worden [124].

Die Frage nach der therapeutischen Relevanz dieser Ergebnisse führte schnell zu dem Ansatz, möglicherweise durch bestimmte Diäten das Tumorwachstum beeinflussen zu können. Aufgrund bis dato fehlender Untersuchungen zur Expression von TKTL1 in Lungenkarzinomen und der zunehmenden Diskussionen über die Relevanz von TKTL1 in der Krebsentstehung und Krebsprogression wird das Molekül hier bei Lungenkarzinomen untersucht.

1.3.2 pHp

Haptoglobin (Hp) ist ein Akutphase-Glykoprotein, das in der Leber synthetisiert wird und im Blutplasma zirkuliert. Die Hauptfunktion besteht in der Bindung freien Hämoglobins zur Unterbindung von oxidativem Stress und zur Neutralisierung anderer sauerstoffreaktiver Substanzen [76]. Des Weiteren sind Funktionen von Hp in der Immunantwort, Angiogenese und Prostaglandinsynthese gezeigt worden, außerdem ist eine erhöhte Konzentration von Hp im Plasma mit verschiedenen Krebsformen assoziiert [7, 11, 14, 15, 31, 33, 93, 139]. Aufgrund der Multifunktionalität und der verschiedensten Phänotypen, in denen Hp vorgefunden wird, war das Molekül Gegenstand diverser Studien zur Hp-Genetik [29, 80, 111]. Es sind mittlerweile verschiedene Kombinationen dreier Hp-Untereinheiten α^1 , α^2 und β bekannt, die unterschiedliche Phänotypen von Hp-Proteinen bilden (Abb. 2).



Nach ersten Transkriptomdaten über die Expression von pulmonalem Hp (pHp) in der menschlichen Lunge in einem *ex vivo* Infektionsexperiment von Lungengewebe mit *Haemophilus influenzae* geriet pHp in den Fokus mehrerer

Studien, deren Ergebnisse auch in diese Arbeit einfließen und in der Dissertation von Dr. M. Abdullah ausführlich beschrieben werden [1-4]. Die Überexpression von pHp in Lungengeweben, Lungentumoren, bei der Infektion mit Lungenpathogenen (neben *Haemophilus influenzae* noch *Streptococcus pneumoniae* und *Chlamydia pneumoniae*) sowie in chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (‘chronic obstructive pulmonary disease’, COPD) und Sarkoidosegeweben bringt neue Aspekte, die durch die zusätzliche Untersuchung des Moleküls über in dieser Arbeit etablierte Proteomuntersuchungen erweitert werden.

1.3.3 ANXA8

Die bisher beschriebenen Annexine A1 bis A13 sind Ca^{2+} - und Phospholipide bindende Proteine einer evolutionär stark konservierten Genfamilie, die in Pflanzen und Tieren vorkommen. Strukturell bestehen sie aus einer dicht gepackten, C-terminalen, α -helikalen Kerndomäne mit einem Ca^{2+} -regulierten Modul zur Bindung negativ geladener Lipide auf Membranoberflächen. Der N-Terminus ist spezifisch für jede Annexinspezies und funktioniert auf verschiedene Weise bei der Membranorganisation, vor allem bei Ca^{2+} -Transporten. Mittlerweile sind intrazelluläre Funktionen beschrieben, darunter die Beteiligung an der Strukturgestaltung des Zytoskeletts. Extrazellulär ist die Inhibierung der Migration von Neutrophilen und die rezeptorartige Bindung von Serumproteasen an Endothelschichten nachgewiesen worden. Des Weiteren agieren Annexine bei der Blutkoagulation sowie beim Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und der Signaltransduktion [9, 41].

Tab. 1 gibt einen Überblick über bisherige Erkenntnisse zur Lokalisation von Annexinen und deutet die Multifunktionalität dieser Proteinfamilie an.

Tab. 1: Lokalisation der Annexine.		
Annexin	Lokalisation	Referenz
Annexin A1	Plasmamembran, frühe Endosomen; spätendosomales Kompartiment	[37]; [114]
Annexin A2	Plasmamembran, frühe Endosomen; Caveolae; sekretorische Vesikel	[32] ; [52]; [53]; [96]; [117]
Annexin A3	Plasmamembran, Membranen Intrazellulärer Granulae/Phagosomen	[81]
Annexin A4	basolaterale und/oder apikale Membran polarisierter Epithelzellen	[75]; [88]; [89]; [91]
Annexin A5	Plasmamembran, Endoplasmatisches Retikulum	[42]; [122]
Annexin A7	Membranen intrazellulärer Granulae (Nebennierenrinde); Plasmamembran (quergestreifte Muskulatur)	[77]; [115]
Annexin A8, A9, A10	Verteilungsmuster nicht exakt definiert	
Annexin A11	Nukleus	[94]; [95]
Annexin A13	apikaler Bürstensaum von Enterozyten	[132]

modifiziert aus [27]

Die Fehlregulierung von einzelnen Annexinen ist mit verschiedenen Krankheiten assoziiert worden, beispielsweise mit akuter promyeloischer Leukämie oder dem Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom. Trotzdem ist das komplette funktionelle Spektrum der Annexine noch unklar. Für ANXA8 steht eine genauere Charakterisierung noch aus [27]; Transkriptomanalysen deuten allerdings eine mögliche Relevanz bei der Tumorprogression in der menschlichen Lunge an, was in dieser Arbeit durch Proteomuntersuchungen näher untersucht wurde.

1.3.4 DUX4

DUX4 ist ein putatives Gen einer Homeobox, die evolutionär als stark konserviert gilt und mit der Embryonalentwicklung assoziiert wird. Innerhalb des menschlichen Genoms befinden sich zahlreiche ‚tandem repeat arrays‘ (hochrepetitive Basensequenzabschnitte), die dem DZ4Z Locus auf Chromosom 4q35

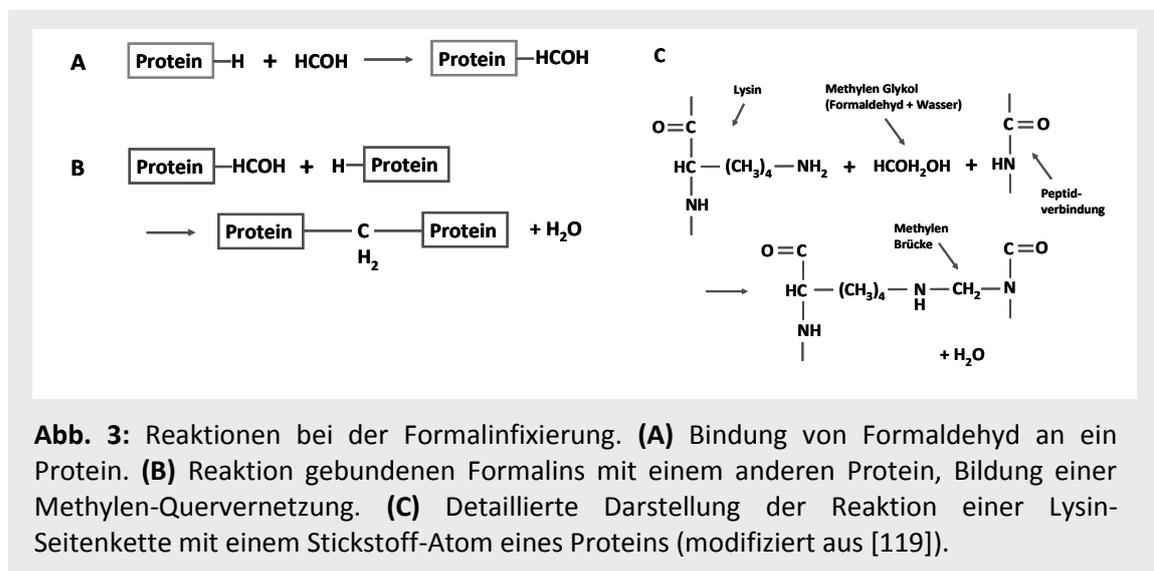
entsprechen. Obwohl diese Elemente im sogenannten ‚Junkbereich‘ der DNA, also in vermeintlich nichtcodierenden Bereichen liegen, ist ein offenes Leseraster (‚open reading frame‘, ORF) identifiziert worden, dessen Bedeutung in der Muskelerkrankung Fazioskapulohumerale Muskeldystrophie (‚facioscapulohumeral dystrophy‘, FSHD) in den letzten Jahren durch das Vorkommen von DUX4-Transkripten diskutiert wird. Obwohl die Transkription des ORF nachgewiesen wurde und mit dem Verlauf von FSHD in Verbindung gebracht wird, konnte bisher kein translatiertes Protein im menschlichen Organismus entdeckt werden. Jedoch war eine induzierte Expression in Transfektionsstudien nachweisbar, die DUX4 als zytotoxisch beschrieben haben. Außerdem ist eine Funktion als Transkriptionsfaktor und -aktivator beschrieben. Durch Hinweise aus Transkriptomdaten von Lungen- und Tumorgewebe, und da DUX4 (als Fusionsprotein DUX4-CIC) in der Krebsentstehung von ‚Ewing-like sarcomas‘ eine Rolle spielt, ist eine Relevanz von DUX4 bei der Krebsentwicklung auch in der menschlichen Lunge denkbar [22, 30, 38, 67, 68].

1.3.5 Voraussetzungen fundierter Biomarkeruntersuchungen

Ein hoher Anspruch in der Biomarkerforschung kann durch einen guten molekularen Erhalt in den untersuchten Geweben und eine zuverlässige Analytik mit möglichst vielen Methoden erreicht werden. Die Verwendung frischer oder eingefrorener Materialien bringt allerdings begrenzte Zugriffsmöglichkeiten auf derartige Gewebe mit sich, und ist bei standardisierten histologischen Untersuchungen in der Pathologie nur eingeschränkt möglich. Die HOPE-Technik vereint daher die Vorteile von eingefrorenem und formalinfixiertem Material, da eine exzellente Morphologie erhalten bleibt sowie ebenfalls eine ausgesprochen gute Konservierung von Nukleinsäuren und Proteinen gegeben ist.

Neben den für HOPE-fixierte Gewebe schon etablierten molekularen Techniken wie (RT-)PCR, ISH und den bekannten Blotting Verfahren stand bislang noch ein Gebiet aus, das in der Proteinanalytik eine Führungsrolle eingenommen hat. Die klassische ‚Proteomics‘ Methodik, 2DE und Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS), ist in ihrer hohen Auflösung und mit der Möglichkeit, visuell selektierbare Moleküle gezielt zu identifizieren, einzigartig in der Proteinanalytik. Obwohl mittlerweile in der Literatur Ansätze zur massenspektrometrischen Untersuchung von Proteinen unter Verwendung formalinfixierter Gewebe diskutiert werden und

erste Erfolge zu verzeichnen sind [57, 97], bleiben hier doch die proteindenaturierenden Eigenschaften von Formalin nicht ohne Bedeutung. Das gilt auch für die RNA-Integrität und ist nachteilig, wenn dasselbe Ausgangsgewebe für Nukleinsäuretechniken herangezogen werden soll. Die Integrität eines formalinfixierten Proteoms und Genoms ist verändert; selbst gut etablierte immunhistochemische Routinefärbungen sind häufig auf (überwiegend thermische) Vorbehandlungen angewiesen, indem die Proben gekocht, mit Säure behandelt oder mit Mikrowellen bestrahlt werden. Abb. 3 veranschaulicht die Quervernetzung von Proteinen durch Formalin.



Die Tatsache, dass die Aldehydgruppe des Formalins an Stickstoffatome oder auch andere Atome in Proteinen bindet, dadurch Methylenebrücken (-CH₂-) entstehen und Proteinstrukturen so kovalent verknüpft werden, begründen die notwendigen (thermischen) Maßnahmen zum Lösen dieser Bindung. Dies verbessert die Qualität einer nachfolgenden molekularen Untersuchung allerdings sicher nicht. Solche Quervernetzungen sind durch thermische Behandlung, Säurebehandlung oder andere sogenannter ‚Retrievalmaßnahmen‘ (‚antigen-retrieval‘=Antigen-Rückgewinnung) teilweise kompensierbar, sodass Epitope ‚zurückgewonnen‘ und die Quervernetzungen gelöst werden können [130, 119]. Ähnlich gestaltet sich bei Formalinmaterial die Probenaufbereitung für 2DE, wo oft ebenfalls renaturierende Maßnahmen in Form thermischer Vorbehandlung vorgeschaltet werden. Für ausgedehnte molekulare Forschung an den umfangreichen Paraffinarchiven in Pathologien fehlt aus den o. g. Gründen leider

bislang ein breiter methodischer Handlungsspielraum, der in dieser Arbeit geschaffen werden soll.

Unter den Methoden der Biomarkerforschung bietet 2DE im Gegensatz zu gelfreien Techniken die Möglichkeit, vor der Analyse von Proteinen einen Teil des Proteoms (mehrere tausend Proteine) durch Anfärben sichtbar zu machen. Veränderungen der Expression einzelner Proteine oder Änderungen der posttranslationalen Modifikation wie Phosphorylierung, Acetylierung und Glycosylierung können teilweise durch Veränderungen des Spotmusters im Gel beobachtet werden und dann gezielt ausgewählte Moleküle über Massenspektrometrie identifiziert werden.

1.4 2DE und MS

Die erste Verwendung einer Polyacrylamidmatrix zur Separation von Proteinen wurde bereits 1959 von Raymond und Weintraub beschrieben [107], fünf Jahre später gelangten Raymond die ersten zweidimensionalen Trennverfahren unter Verwendung einer PAGE [108]. Bis zu diesem Zeitpunkt erfolgten zweidimensionale Separationstechniken von Proteinen über Kombinationen anderer eindimensionaler Trennverfahren, beispielsweise Filterpapier und Stärkegele oder Agarosegele und Diffusion gegen Antisera [49, 120].

Die Einführung der Trennung von Proteinen in ‚sodium dodecyl sulfate‘ (SDS)-Gelen in den 1970er Jahren bedeutete zwar einen Meilenstein für die Untersuchungsmöglichkeiten von Proteinextrakten, jedoch kristallisierte sich schnell der Bedarf an höher auflösenden Techniken heraus. Der Ansatz von Raymond, Smithies und Grabar, zwei unterschiedliche Separationsmethoden zu kombinieren, wurde schließlich durch eine Reihe von Arbeiten aufgegriffen, wobei Kenrick und Margolis 1970 erstmalig die Trennung von Proteinen nach Ladung und im Folgenden nach Molekulargewicht realisierten [69]. Die Anzahl an zweidimensional separierten Proteinen aus Serumproben betrug hier allerdings wie bei Raymond und Kollegen nach wie vor ca. 20. Nach Anpassungen eines für basische und ribosomale Proteine entwickelten 2DE-Protokolls [65] durch verschiedene Gruppen gewann die Technik schließlich etwas mehr an Bedeutung in proteinbiochemischen Anwendungen [10, 13, 20, 24, 35, 56, 58, 82, 87, 92].

Nach frühen Berichten über eine zweidimensionale Gelelektrophorese mit vorgeschalteter IEF [26, 84, 85] lieferten Patrick O'Farrell und Joachim Klose 1975 erstmalig unabhängig voneinander detaillierte Protokolle [74, 100]. Diese Veröffentlichungen weckten erst das allgemeine Interesse der wissenschaftlichen Gemeinschaft an 2DE durch den Sprung von hunderten zu tausenden trennbarer und visualisierbarer Proteine, daher zählen diese Arbeiten zu den wichtigsten initialen Publikationen auf diesem Gebiet (bei O'Farrell mehr als 1500 Zitationen zwischen 1976 und 1980) [39]. Die ersten erfolgreichen klinischen und biologischen Anwendungen der Technik waren schließlich zu Beginn der 80er Jahre veröffentlicht, wo differentielle Proteinexpressionen von Blutplasmaproteinen bzw. in HeLa-Zellen (Zervixkarzinomzelllinie) über 2DE beschrieben wurden. Bereits zu dieser Zeit wurden auch die Grundsteine für das ‚human proteome project‘ über die Erstellung eines Humanen Protein Index gelegt [8, 19, 39]. Diese und noch folgende neue Untersuchungsmöglichkeiten komplexer Proteingemische prägten später den Begriff ‚Proteomics‘ und bezeichnen Studien des ‚gesamten Proteinkomplements eines Genoms‘ (Proteom), die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen eingeschlossen [131].

Die ursprüngliche Methode von O'Farrell basierte auf IEF der Proteine in dünnen, selbstgegossenen Kapillargelen (i. d. R. 4 % Acrylamid) von wenigen Millimetern Durchmesser, bei denen durch die Verwendung von Carrierampholytmischungen ein pH-Gradient von ca. pH 4 bis pH 7 in die Gelmatrix integriert wurde. Carrierampholyte sind Mischungen aus hunderten verschiedener Homologe amphoterischer Puffer, die durch ihren unterschiedlichen isoelektrischen Punkt (pI) einen pH-Gradienten generieren und nahe ihres pI's eine hohe Pufferkapazität aufweisen. Beim Anlegen einer Spannung beginnen die Ampholyte je nach ihrer Ladung zu einer Elektrode zu wandern und bilden so einen stabilen pH-Gradienten. Das Protokoll erschien 1977 in überarbeiteter Version und präsentierte die verbesserte ‚non-equilibrium pH gradient electrophoresis‘ (NEPHGE)-Technik, bei der Proteine in einem Gradienten von pH 3-10 hochauflösend dargestellt werden konnten. Hier wurden im Gegensatz zu vorher die Proben an der anodischen (sauren) Seite des Gels aufgetragen und die Elektrophorese vor dem Auswandern der basischen Proteine und dem Erreichen des Equilibriums gestoppt. Mit dieser Technik gelang der Durchbruch für groß angelegte Proteomstudien, die die in Eukaryoten vermehrt vorkommenden

basischen Proteine (Membranproteine, nukleäre Proteine etc.) und damit einen bisher verborgenen Teil des Proteoms mit einbeziehen konnten. Die NEPHGE-Technik in ihrer heutigen Anwendung, mit einigen Modifikationen durch Klose und Kobalz, repräsentiert die 2DE-Technik mit der höchstmöglichen Auflösung von 500-10000 individuellen Proteinspots, je nach Art der Probe, Vorbehandlung und der verwendeten Visualisierungstechnik [72, 101].

Obwohl mittlerweile gut standardisierte Apparaturen und Reagenzien von Anbietern für IEF-Systeme erhältlich sind, ist das Handling der selbst zu gießenden Kapillargele (kleinere Längenunterschiede, pH-Wert Verschiebungen bei verschiedenen Ampholytchargen) schwieriger, das Probenvolumen begrenzt und der pH-Gradient kann bei verschiedenen Chargen der Reagenzien leichten Schwankungen unterliegen. Diesen Problemen wurde durch die Entwicklung von immobilisierten pH Gradienten (IPG) [40] und durch die Festigung der IPG-Gelmatrix durch einen Plastikrücken (IPG-Streifen) entgegengewirkt [18]. Die Technik der IPG-Streifen wurde überwiegend an der TU München in der Gruppe um Angelika Görg eingeführt und weiterentwickelt [48]. Aufgrund der Standardisierung und einfacheren sowie preisgünstigeren Anwendung hat sich die IPG-Technik bei einem Großteil der 2DE anwendenden Studien durchgesetzt und ist mittlerweile am weitesten verbreitet. In den letzten Jahren wurden IPG-Streifen verschiedener Länge und pH-Bereiche entwickelt, mit denen schnell bestimmte Proteingruppen fokussiert und visualisiert werden können. Die Kombination von IPG-Streifen mit unterschiedlichen Längen und pH-Gradienten konnte dabei die niedrigere Auflösung im Vergleich zur NEPHGE-Technik teilweise kompensieren, bedarf allerdings auch höherer Mengen wertvollen Probenmaterials und der Durchführung mehrerer 2DE's von einer Probe parallel.

Ein vereinfachtes Schema der prinzipiellen Abläufe von 2DE mit IPG-Streifen bzw. NEPHGE-Kapillargelen ist in Abb. 4 dargestellt.

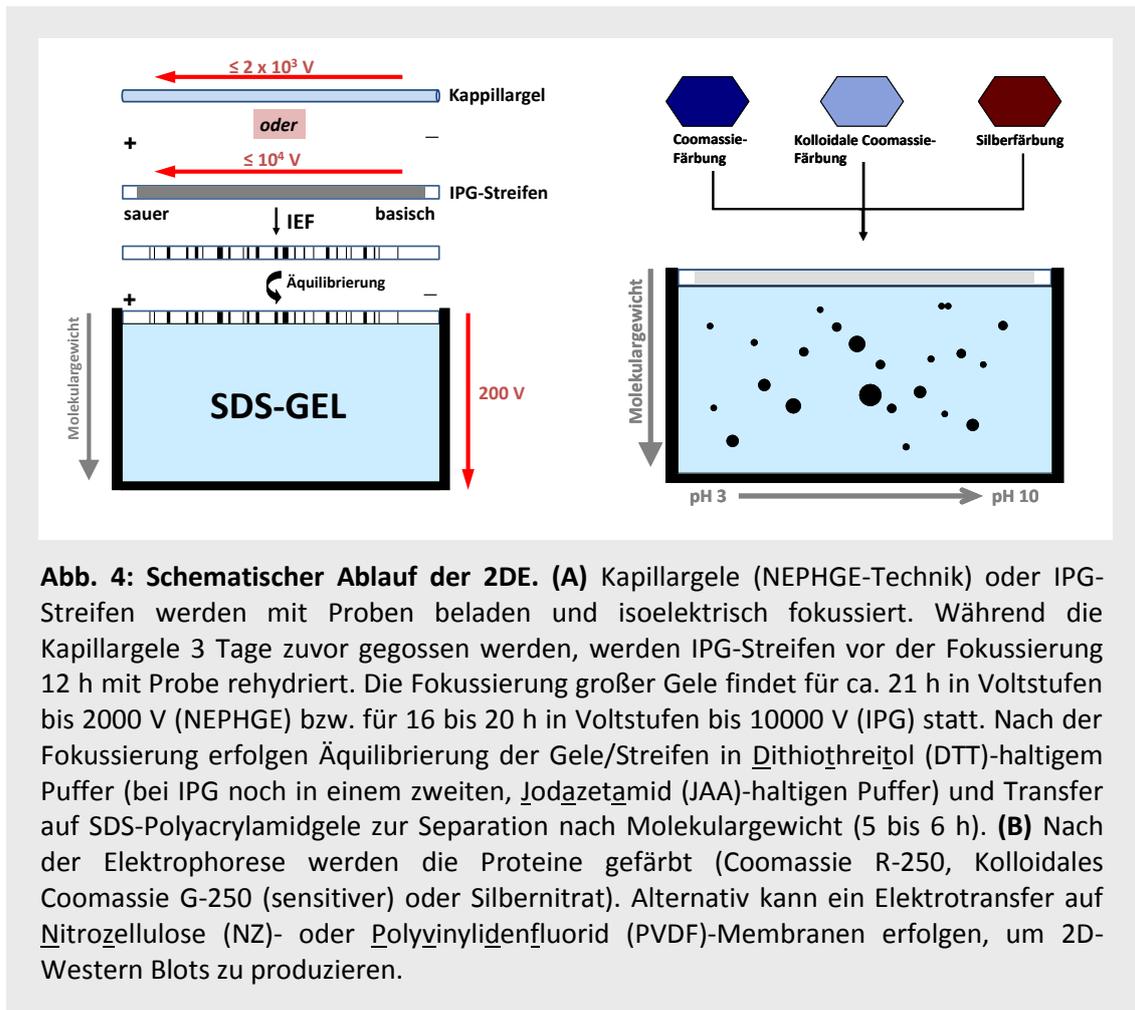
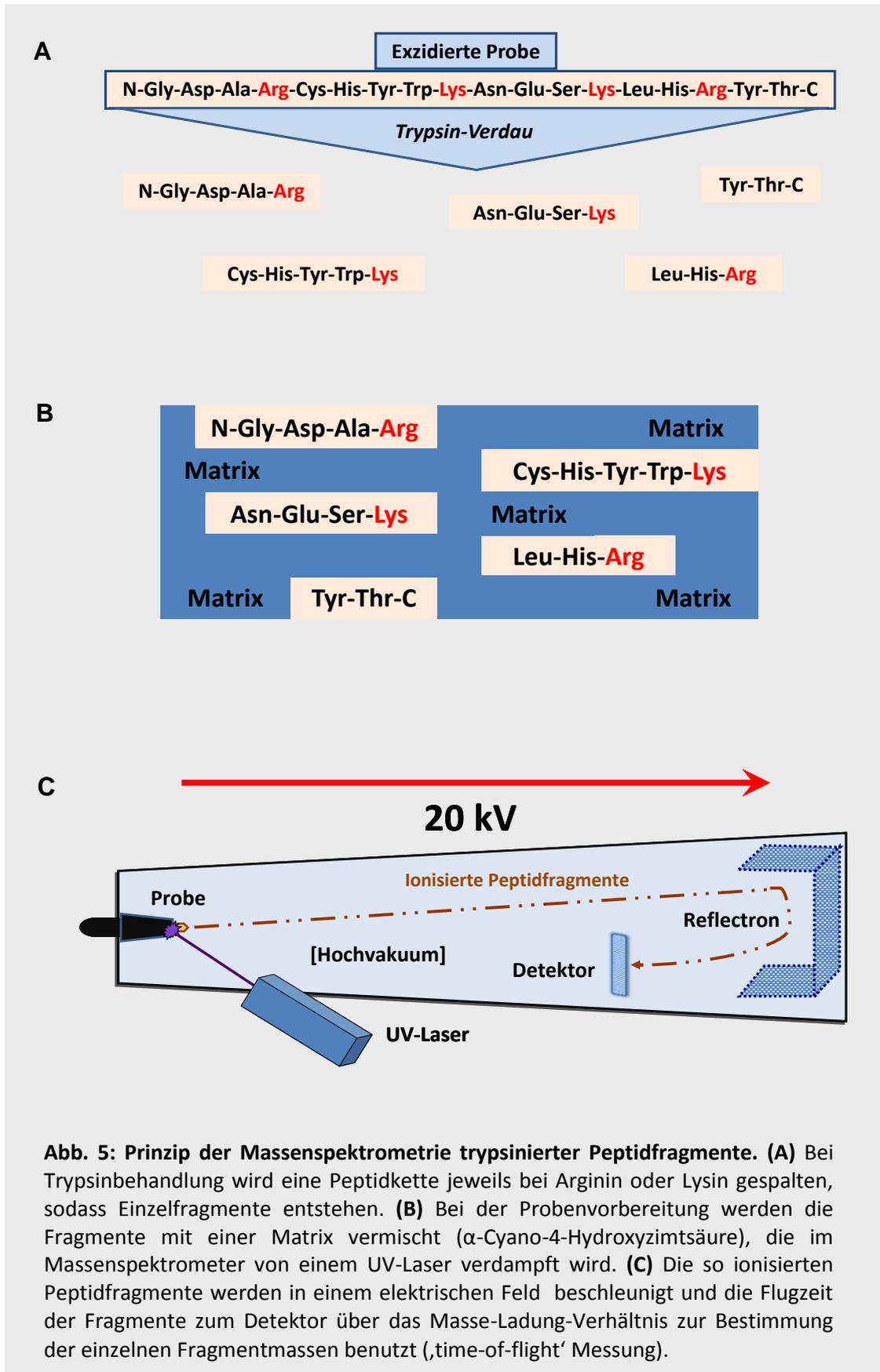


Abb. 4: Schematischer Ablauf der 2DE. (A) Kapillargele (NEPHGE-Technik) oder IPG-Streifen werden mit Proben beladen und isoelektrisch fokussiert. Während die Kapillargele 3 Tage zuvor gegossen werden, werden IPG-Streifen vor der Fokussierung 12 h mit Probe rehydriert. Die Fokussierung großer Gele findet für ca. 21 h in Voltstufen bis 2000 V (NEPHGE) bzw. für 16 bis 20 h in Voltstufen bis 10000 V (IPG) statt. Nach der Fokussierung erfolgen Äquilibration der Gele/Streifen in Dithiothreitol (DTT)-haltigem Puffer (bei IPG noch in einem zweiten, Jodazetamid (JAA)-haltigen Puffer) und Transfer auf SDS-Polyacrylamidgele zur Separation nach Molekulargewicht (5 bis 6 h). **(B)** Nach der Elektrophorese werden die Proteine gefärbt (Coomassie R-250, Kolloidales Coomassie G-250 (sensitiver) oder Silbernitrat). Alternativ kann ein Elektrotransfer auf Nitrozellulose (NZ)- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen erfolgen, um 2D-Western Blots zu produzieren.

Im Anschluss an zweidimensional aufgetrennte Proteingemische und nach sorgfältiger Auswahl von Proteinspezies differentieller Expression, z. B. bei gesunden und kranken Geweben, kann eine gezielte Identifikation mithilfe von Massenspektrometrie vorgenommen werden. Der dafür heute bekannte Ausdruck MALDI wurde 1985 von Karas *et al.* geprägt [66]. Beim ‚peptide mass fingerprinting (PMF)‘ werden die Fragmentmassen trypsinierter Proteine aus ein- oder zweidimensionalen Gelen bestimmt. Dafür werden die Peptidfragmente mit einer Matrix (z. B. α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure) vermischt, mit einem Laser verdampft (ionisiert) und in einem starken elektrischen Feld beschleunigt. Die Zeit der Beschleunigung bis zum Detektor ist von der Ladung (z) und Masse (m) des beschleunigten Fragmentes abhängig. Die unterschiedliche Flugzeit der einzelnen ionisierten Peptide zum Detektor wird mithilfe des Masse-Ladung-Verhältnisses (m/z) bestimmt, was als ‚time-of-flight‘ (TOF)-Messung bezeichnet wird. Für jede

Probe werden letztlich Massenspektren der Peptidfragmente generiert und mit Massenlisten aus humanen Proteomdatenbanken verglichen (z. B. MASCOT search, www.matrixscience.com). Das Fragmentmassenspektrum dient dabei als ‚Fingerabdruck‘ eines bestimmten Proteins. Seitdem MALDI-TOF MS zu Beginn der 90er Jahre die Möglichkeit bot, nach einzelnen Molekülen auch Peptide aus 2D-Gelen zu analysieren, hat sich die Technik schnell verbreitet und stellt aufgrund der hohen Genauigkeit und Sensitivität bei der Massenbestimmung von Peptidfragmenten trypsinverdauter Proteine eine vorherrschende Technik in der Proteinanalytik dar (Abb. 5) [73, 135].



Prinzipiell gibt es zwei Arten der Anwendung von Massenspektrometrie in der Proteinanalytik. Dies ist auf der einen Seite die sogenannte ‚bottom-up‘ Strategie, die auch als ‚shotgun proteomics‘ bekannt ist. Dabei wird 2DE mit PMF kombiniert und Proteine vor der MS enzymatisch oder chemisch in Peptide gespalten, deren Massen nach dem oben beschriebenen Prinzip bestimmt werden. Beim ‚top-down‘ Verfahren hingegen werden ganze Proteine analysiert [51]. In den letzten Jahren ist Massenspektrometrie durch ihre vielfältige Weiterentwicklung und Kombination verschiedenster Analysetechniken zu einer Kernmethode in der Proteinanalytik geworden und hat die jahrzehntelang angewendete Edmansequenzierung weitgehend abgelöst.

Für die Proteomforschung ist diese Entwicklung von unschätzbare Bedeutung geworden, da das Proteom mit seiner Dynamik im Vergleich zum Genom zellspezifische und anormale Zustände widerspiegelt und als umfangreicher Informationspool für solche Moleküle dient, die aus der relativ statischen Information der DNA lebende Organismen steuern. Dabei ist von besonderem Interesse, fehlregulierte Proteinsysteme zu entdecken und so Krankheiten oder Einflüsse äußerer Faktoren verstehen zu können (Abb. 6).

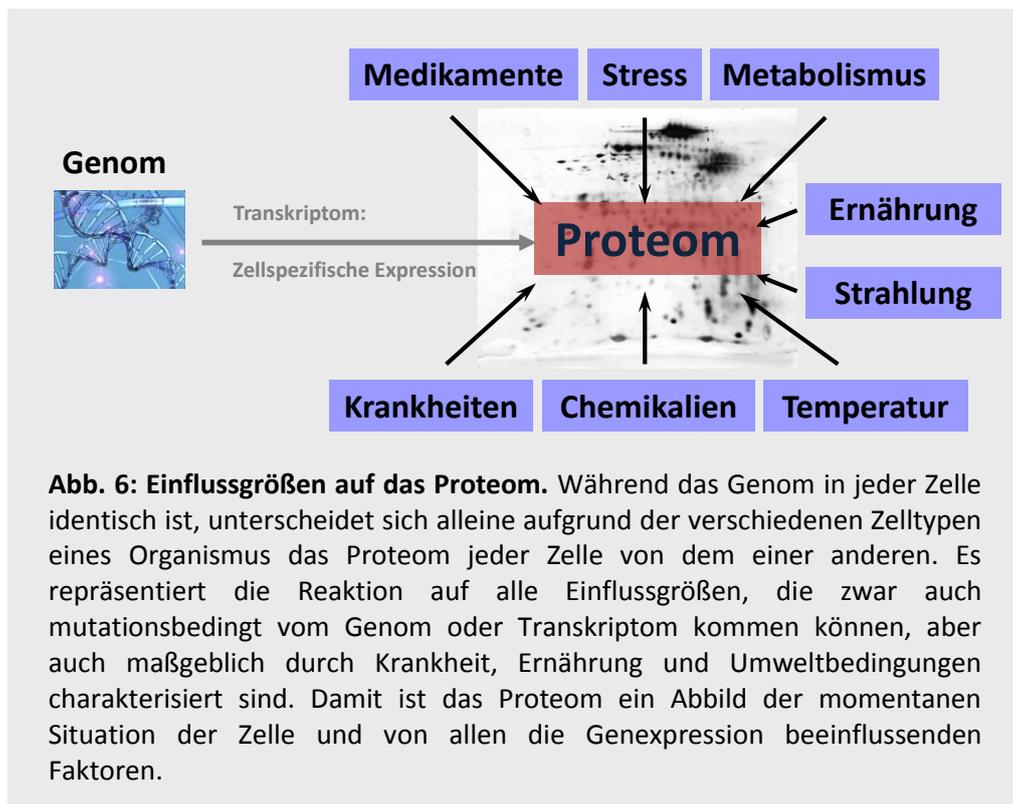


Abb. 6: Einflussgrößen auf das Proteom. Während das Genom in jeder Zelle identisch ist, unterscheidet sich alleine aufgrund der verschiedenen Zelltypen eines Organismus das Proteom jeder Zelle von dem einer anderen. Es repräsentiert die Reaktion auf alle Einflussgrößen, die zwar auch mutationsbedingt vom Genom oder Transkriptom kommen können, aber auch maßgeblich durch Krankheit, Ernährung und Umweltbedingungen charakterisiert sind. Damit ist das Proteom ein Abbild der momentanen Situation der Zelle und von allen die Genexpression beeinflussenden Faktoren.

Proteomstudien werden in der Regel mit frischen oder eingefrorenen Geweben durchgeführt, was die Zugriffsmöglichkeiten auf Untersuchungsmaterialien limitiert. Die Benutzung von herkömmlichen Paraffinarchiven ist auf der anderen Seite durch die proteinverändernden Eigenschaften des Formalins ungünstig. Auch Gefriermaterial ist von molekularer Degeneration nach längerer Lagerungszeit betroffen [123]. Die Kombination von 2DE und Massenspektrometrie unter Verwendung von bisherigen Gewebearchiven ist daher aus verschiedenen Gründen problembehaftet. In dieser Arbeit wird daher bei allen angewendeten Methoden auf ein HOPE Paraffinarchiv zugegriffen und die Vorteile dieser Fixierungstechnik bei molekularen Untersuchungen und vor allem bei der ‚Proteomics‘ Methodik genutzt.

1.5 Zielsetzungen

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung aller notwendigen Parameter für hochauflösende Proteomuntersuchungen mittels verschiedener 2DE-Systeme und massenspektrometrischer Identifikation (MALDI-TOF MS) von ausgewählten Proteinspezies aus zweidimensionalen Gelen unter Verwendung HOPE-fixierter, in Paraffin archivierter Lungen(karzinom)gewebe. Dabei soll sowohl für die IPG- und die NEPHGE-Technik die Verwendbarkeit bewertet werden. Daran anknüpfend besteht das Hauptziel darin, eine neue Strategie für die Entdeckung und Verifizierung von neuen Biomarkern zu präsentieren, bei der vielfältige molekularbiologische und biochemische Methoden, aber auch umfangreiche Standardmethoden aus der pathologischen Routinediagnostik an demselben archivierten Material durchgeführt werden. Es werden neue Vorgehensweisen zur Entdeckung und Validierung krankheitsrelevanter Proteine über die Identifizierung von Kandidatengenen durch Transkriptomarrays, deren Validierung durch molekularbiologische Verfahren und unter Anwendung der etablierten Proteomuntersuchungen dargestellt. Durch die Verwendung HOPE-fixierter, in Paraffin archivierter (Lungen)Gewebebeobproben sollen besonders unter dem Aspekt der immer mehr Bedeutung erlangenden molekularpathologischen Untersuchungsmethoden neue Möglichkeiten in der Proteomforschung an Paraffinmaterial geschaffen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Gewebe

Das in dieser Arbeit mit 2DE untersuchte Kollektiv besteht aus NSCLC- und Lungengewebe von 81 Patienten (Referenznummer 3/158 bei der Ethikkommission der Universität zu Lübeck). Für die Studien zu Biomarkern wurden eigene Kollektive untersucht (2.4). Das gesamte 2DE Untersuchungsgut wurde durch Keilresektion oder Lob- bzw. Pneumonektomie chirurgisch im Krankenhaus Großhansdorf, Zentrum für Pneumologie und Thoraxchirurgie (Wöhrendamm 80, 22927 Großhansdorf) entnommen, unmittelbar in die Pathologie gebracht und wie folgt weiterverarbeitet. Zunächst wurden Teile jedes Tumors einer Begutachtung durch histopathologische Routinediagnostik unterzogen. Die Typisierungen ergaben 35 Adenokarzinome, 41 Plattenepithelkarzinome, 2 adenosquamöse Karzinome, 1 Karzinoid und 1 bronchoalveoläres Karzinom (1 Mammakarzinom wurde ebenfalls untersucht). Von allen Geweben liegen formalinfixierte und HOPE-fixierte Gewebestücke sowie H&E-gefärbte Schnitte vor. Bei einigen Fragestellungen wurde zusätzlich Gefriermaterial bzw. ethanolfixiertes Material verwendet. Des Weiteren wurden bei den pHp-Studien Zellkulturen untersucht. Zu diesem Zweck wurden alveolare Epithelzellen Typ 2 („Alveolar epithelial cells type 2“, AEC II) und von Monozyten abstammende Makrophagen in der Medizinischen Klinik Borstel isoliert, um sie diversen Stimulationsexperimenten zu unterziehen (2.4.2).

2.1.1 HOPE-Technik

Direkt nach Resektion und Zuschneiden von 0,5 g Tumorgewebe wurden diese in HOPE-Lösung (DCS Innovative Diagnostics, Hamburg, Deutschland) gegeben und über Nacht (12 bis 18 h) bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde bei derselben Temperatur eine mehrstufige Azetonentwässerung durchgeführt, indem das Gewebe 6 mal für eine Stunde in frischem Azeton gehalten wurde. Nach Dehydratisierung wurden die Proben in Paraffin mit niedrigem Schmelzpunkt (52 bis 54°C) und ohne Zusatzstoffe über Nacht gelassen, dann eingebettet und abgekühlt. Es resultierten die Gewebe enthaltene Paraffinblöckchen.

2.1.2 Formalinfixierung

Nach dem Zuschnitt wurden die Gewebe über Nacht in kleinen Plastikkapseln in einen Fixierungsautomaten (Shandon Pathcentre, Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland) gegeben und folgendes Standardprogramm durchlaufen:

Tab. 2: Programmablauf zur Formalinfixierung und Paraffineinbettung.			
Inkubation in	Zeit	Zeit	Temperatur
Formalin	1:30 h	0:30 h	52°C
70% Alkohol	1:30 h	0:30 h	RT (22°C)
80% Alkohol	1:00 h	0:30 h	RT
96% Alkohol	1:00 h	0:30 h	RT
96% Alkohol	1:00 h	0:30 h	RT
100% Alkohol	1:00 h	0:30 h	RT
100% Alkohol	1:00 h	0:30 h	RT
100% Alkohol	1:00 h	0:30 h	RT
Xylolersatz	1:00 h	0:30 h	RT
Xylolersatz	1:00 h	0:30 h	RT
Paraffin	1:30 h	0:30 h	60°C
Paraffin	2:00 h	0:30 h	60°C

Am nächsten Tag erfolgte eine Einbettung in Paraffinblöckchen mithilfe einer Gießstation (Leica EG 1160, Wetzlar, Deutschland). Die Gewebe wurden anschließend in einem Archiv bei RT gelagert.

2.1.3 Gefriermaterial

Zum Einfrieren wurden jeweils 1-2 g frisches Gewebe in Kryoröhrchen 10 min in flüssigen Stickstoff getaucht und bei -80°C gelagert.

2.1.4 Ethanolfixierung

Nach der Resektion wurden je 0,5 g Gewebe über Nacht bei RT in 70 % Ethanol fixiert und am Folgetag eine Einbettung in das gleiche Paraffin vorgenommen, das auch für die Formalinfixierung verwendet wurde (2.1.2).

2.2 Techniken zur Untersuchung von Biomarkern

2.2.1 Gewebeschnitte

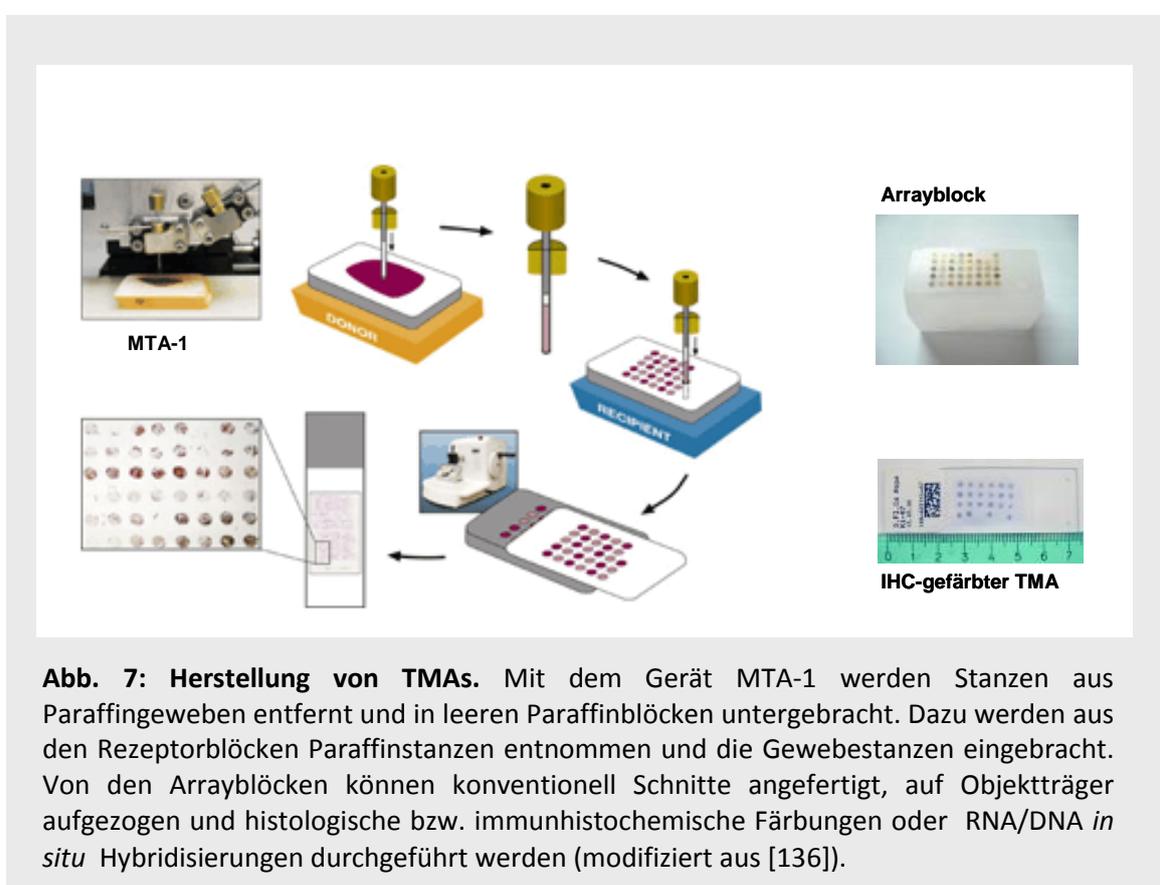
Zur Herstellung von Schnitten aus HOPE-fixierten Geweben (Dicke: 1-5 μm) wurden die Paraffinblöcke in ein Mikrotom (Leica SM 2000R, Wetzlar, Deutschland) eingespannt und die Schnittfläche justiert. Die Schnitte wurden vor dem Aufziehen auf Superfrost Plus Objektträgern (Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) in einem 37°C Wasserbad gestreckt und nach dem Aufziehen auf einer Streckbank bei 37°C getrocknet. Vor der weiteren Bearbeitung wurden die Gewebe entparaffiniert, wobei sich dieser Schritt bei HOPE und den anderen Fixierungstechniken unterscheidet. HOPE-fixiertes Material wurde mithilfe 60°C warmen Isopropanols entparaffiniert (Wiederholung für 2 min mit frischem Isopropanol), dann 10 min in Azeton getränkt und bei RT in A. dest. rehydriert. Bei formalin- und ethanolfixierten Schnitten wurde das für Formalin gebräuchliche Standardprotokoll zur Entparaffinierung durchlaufen (Tab. 3).

Tab. 3: Entparaffinierung formalinfixierter Schnitte.	
Inkubation in	Dauer (min)
Xylol	10
Ethanol 100 %	2 x 2
Ethanol 96 %	2 x 2
Ethanol 90 %	2
Ethanol 80 %	2
Ethanol 70 %	2
A. dest.	2 x 2

2.2.2 TMAs

Mithilfe des Gerätes MTA-1 (Beecher Instruments, Sun Prairie, USA; Abb. 7) wurden zylinderförmige Gewebestangen (Biopsien) aus unterschiedlichen Paraffinblöcken entnommen und diese nebeneinander geordnet in leeren Paraffinblöcken (Blankoblöcken) untergebracht. Zuvor wurden entsprechende Paraffinstangen mit einer zweiten Stanznadel dort aus den Blankoblöcken entnommen, wo das nächste Gewebe eingebracht werden sollte. Es sind Stanzen

von 0,7 bis 2 mm Durchmesser erhältlich; verwendet wurden 2 mm Stanzen. Um diesen Vorgang elektronisch steuerbar zu machen, ist ein Zusatzelement für den MTA-1 erhältlich, das die Arraypositionen automatisch abfährt und eine automatische Speichereinheit besitzt, die für einfache Datentransfers über eine USB-Schnittstelle direkt an einen PC angeschlossen wird. Dort ist eine Software des MTA-1 installiert und verwaltet die Arraydaten. Die elektronische Steuereinheit (MTA-Booster, Beecher Instruments, Sun Prairie, USA) setzt die Gewebeproben mikrometergenau in die neuen Blankoblöcke; es können so bis zu 1000 Gewebe in einem Paraffinblock untergebracht werden (Abb. 7).



2.2.3 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Gewinnung von für Proteomuntersuchungen geeigneten Proteinlysaten wurden verschiedene Proteinextraktionspuffer (EP) getestet und auf Proteingehalt untersucht. Für den am besten geeigneten EP (aufgrund der höchsten resultierenden Proteinmengen) wurde des Weiteren ein Vergleich verschiedener Extraktionszeiten vorgenommen. Dafür wurden dieselben Gewebe 1, 2, 3, 4 und 5

h in EP inkubiert und stündlich die Proteinmengen der Extrakte bestimmt. Außerdem wurden über PAGE-Gele (2.2.9) Bandenmuster verglichen, die bei den verschiedenen Extraktionszeiten resultierten. Die verschiedenen getesteten EP sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4. Zusammensetzung der untersuchten EP.	
Puffer	Zusammensetzung
Extraktionspuffer EP1	Tris-HCl pH 7,4
Extraktionspuffer EP2	8 M Harnstoff, 100 mM DTT, 4 % CHAPS, 25 mM Tris
Extraktionspuffer EP 3	7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 100 mM DTT, 4 % CHAPS, 1 % Triton-X 100, 40 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 5 mM PMSF, 2 % IGEPAL
Extraktionspuffer EP4	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 % IGEPAL, 25 µg/ml Leupeptin
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS; einstellen auf pH 7,6 mit HCl; dann 1 % Triton-X 100

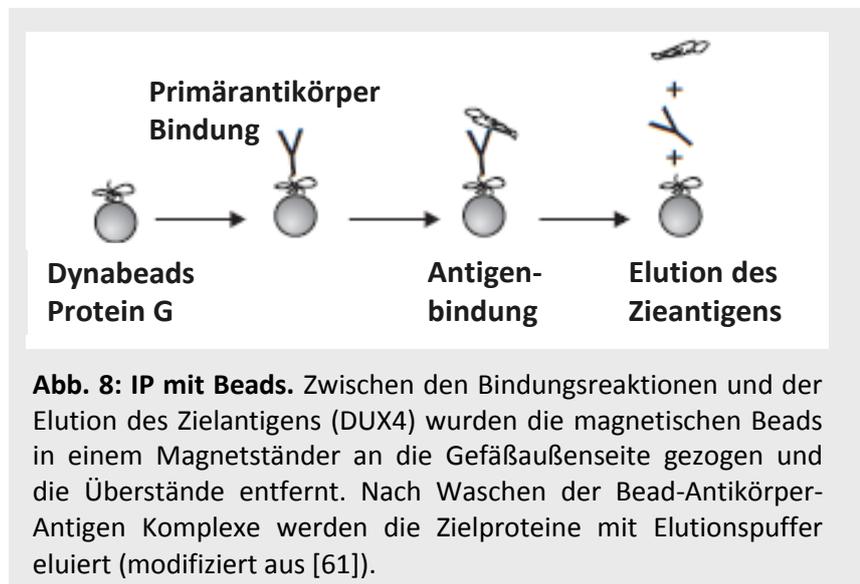
Als zusätzliche Methode der Proteinextraktion wurden außerdem Extraktionen direkt in Rehydrierungspuffer (RehyP) bei der IPG-Technik (RehyP-Extrakte) bzw. in Fokussierungspuffer bei der NEPHGE-Technik (AP-HaT Extrakte) vorgenommen und Proteinmengen sowie Gele verglichen (3.1.2).

2.2.4 IP

Bei dem verwendeten System handelt sich um superparamagnetische Beads mit einem Durchmesser von 2,8 µm, die mit rekombinantem Protein G gekoppelt sind und Primärantikörper binden können.

Zur IP von DUX4 wurden zunächst Proteinlysate mit RIPA-EP hergestellt. Dann wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers magnetische Beads (Dyna Beads G; Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) mit Primärantikörper (in diesem Fall anti-DUX4, Klon H-204, sc-67385; Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) beladen und mit den Proteinlysaten inkubiert. Die Beads wurden mit einem Magnetständer an die Außenwand der Reaktionsgefäße

gezogen und so jeweils die Überstände entfernt. Nach der Inkubation mit Lysaten wurden die Beads gewaschen und die Zielproteine in frische Gefäße eluiert (Abb. 8).



2.2.5 RNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA der untersuchten Gewebe wurde nach der Entparaffinierung unter Verwendung des RNEasy mini kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Extrahierte RNA kann bei -80°C eingefroren werden, sollte aber besser zeitnah weiter verwendet werden (oder vorher in cDNA umgeschrieben werden). Der Ablauf ist Abb. 9 zu entnehmen.

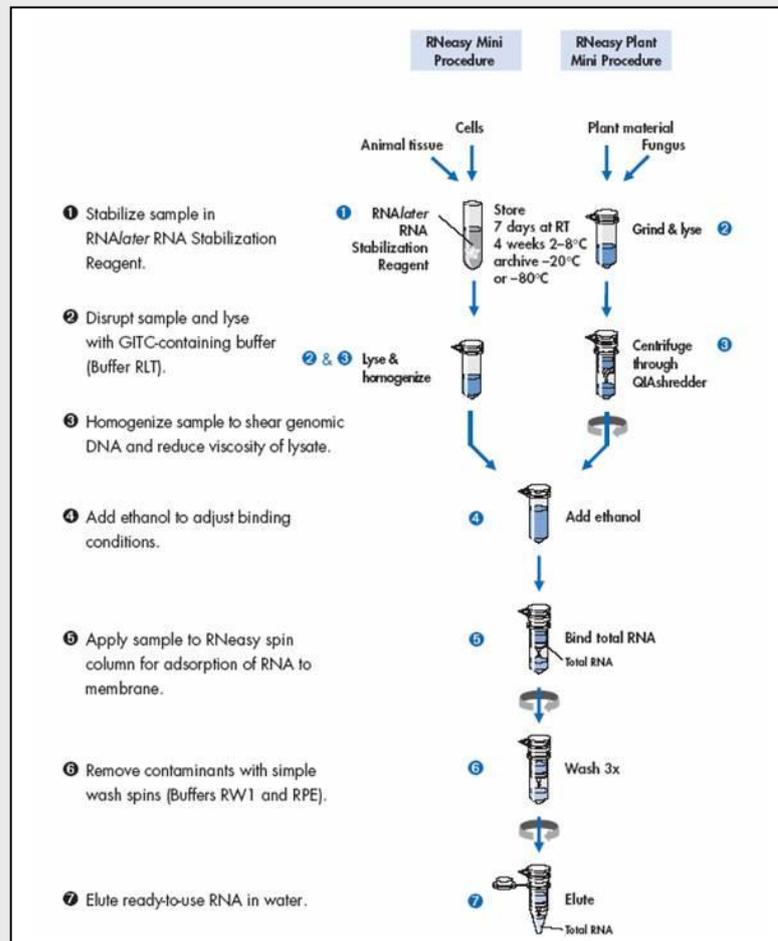


Abb. 9: RNA-Extraktion mit RNeasy Mini Kit. In speziellen Reaktionsgefäßen wurden die in Homogenaten befindlichen RNAs an Silikatmembranen gebunden und die restlichen Bestandteile abzentrifugiert (9000 x g). Durch Zentrifugation mit Waschpuffern bzw. Wasser wurden die RNAs gewaschen und schließlich von den Membranen gelöst. Die Eluate wurden direkt verwendet oder eingefroren (aus [106]).

2.2.6 H&E-Färbung von Gewebeschnitten

Nach Entparaffinierung wurden die Schnitte für 5 min in Mayer's Hämalunlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) getaucht. Nach gründlichem Abspülen mit A. dest. wurde zum Bläuen in Kaliumazetat geschwenkt. Nach Abspülen in A. dest. wurde 3 min in Eosinlösung (0,2 %) und nach wiederholtem Abspülen mit A. dest. in einer aufsteigenden Ethanolreihe bei 70 %, 80 %, 96 % und absolutem Ethanol

jeweils 2 min inkubiert, danach 5 min bei RT in Xylol gespült und mit Deckgläschen eingedeckt. HOPE- und Formalinschnitte wurden analog prozessiert.

2.2.7 IHC

2.2.7.1 Färbung formalinfixierter Schnitte

Nach Entparaffinierung (Tab. 3) wurden die Gewebe mit Tris-Puffer (pH 7,5) gewaschen und nach Vorbehandlung (Tab. 5) der Primärantikörper, entsprechend in Antikörperlösung (Antibody Diluent, Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) verdünnt, für 1 h inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit Tris-Puffer wurde der Sekundärantikörper inkubiert (1 h). Dieser ist kovalent an ein Dextranpolymer (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) gekoppelt, an das mehrere Peroxidasemoleküle geknüpft sind. Im Vergleich zu Streptavidin/Biotin Detektionssystemen liefert das Polymersystem kräftigere Färbungen und produziert weniger Hintergrund, da hier endogenes Biotin nicht stört. Permanentes Aminoethylcarbazol (AEC; Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) diene als Substrat/Chromogen.

Tab. 5: Vorbehandlungen/ Primärantikörperkonzentrationen bei formalinfixierten Schnitten.

Antikörper	Klon	Konzentration	Vorbehandlung	Studie
TKTL1	JFC12T10	1:100	30 min Kochen in Zitratpuffer	[113]
	*Zytomed Systems, Deutschland		pH6	
Hp	HG-36	1:100	30 min Kochen in Zitratpuffer	[3]
	Abcam, USA		pH6 2 min Fast Enzyme*	[2]

2.2.7.2 Färbung HOPE-fixierter Schnitte

HOPE-fixierte Schnitte wurden wie in 2.2.1 beschrieben entparaffiniert und bei Raumtemperatur weiterverarbeitet. Die Primärantikörpermenge kann bei HOPE-Färbungen auf ca. 1/3 reduziert werden und es ist keine Vorbehandlung

notwendig. Die zu formalinfixierten Geweben weitgehend analogen Schritte sind in Tab. 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Immunhistochemische Färbung HOPE-fixierter Gewebeschnitte.		
Schritt	Zeit	Reagens/Antikörper
Blockierung von Peroxidase	10 min	3 % H ₂ O ₂
Waschen	2 x 5 s	A. dest.
Waschen	5 s	Tris-Puffer pH 7,6
Blockierung unspez. Antigene	5 s	Schweineserum (1:30 in TRIS-Puffer)
Inkubation Primärantikörper	1 h	ANXA8 (1:400); Klon LS-B2459 DUX4 (1:500); Klon H-204, sc-67385
Spülen	3 x 5 s	Tris-Puffer
Dextranpolymer	1 h	Zytochem HRP Polymer kit
Farbreaktion	3-5 min	AEC
Stoppreaktion	2 x 5 s	A. dest.
Spülen	5 s	0,05 % NH ₃
Eindecken	permanent	Permanentes AEC

2.2.8 Transkriptomanalysen

Um ein Bild der Genexpression von Geweben, in diesem Falle von NSCLC, und eine Quantifizierung der Transkripte zum Fixierungszeitpunkt zu erstellen, wurden RNA-Extrakte hergestellt (2.2.5), diese von der Firma Imagenes (Berlin, Deutschland) aufbereitet und auf 44k Transkriptomarrays analysiert. Die Chips enthalten 44000 cDNA-Moleküle komplementär zum gesamten menschlichen Transkriptom und binden proportional zur mengenmäßigen Expression jede mRNA auf den Chip-Objektträgern. Durch Fluoreszenzdetektion wurde dann bestimmt, ob und wie stark Gene exprimiert wurden, und diese Informationen wurden in einer relativen Zahleneinheit angegeben.

2.2.9 PAGE

Zur Größenaufftrennung komplexerer Proteingemische wurden nach Entparaffinierung der Gewebe Proteinlysate unter Verwendung von EP3 hergestellt. Nach geeigneter Verdünnung der Lysate (1:10 bis 1:20) wurden

Proteinbestimmungen nach modifiziertem Bradford Verfahren (Pierce 660 nm Protein Assay Reagent; Pierce, Rockford, USA) durchgeführt und die Proben mit vorbereitetem 4 x Probenpuffer (PP) verdünnt, sodass Proteinmengen von 20 µg in 20-30 µl resultierten. Diese 20 µg wurden in die Taschen der Polyacrylamidgele pipettiert. Ein bis zwei Taschen wurden für 6 µl Marker (Invitrogen Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard bzw. Fermentas Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Es wurden 12,5 %ige große bzw. 15 %ige kleine Gele nach Angaben des Herstellers der Acrylamidlösungen (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter Verwendung von Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösungen (37,5:1) gegossen bzw. für das ZOOM-System (2.3.1) fertige ZOOM BisTris Gele (4-12 % Gradientengele) verwendet. Der reduzierende 4 x Probenpuffer bestand aus 400 mM Tris/HCl pH 8,8, 40 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 4 % (v/v) SDS, 2 % (w/v) DTT und einer Spatelspitze Bromphenolblau.

Unter standardisierten Laufbedingungen wurden nun Elektrophoresen durchgeführt. Die entscheidenden Parameter sind Temperatur (20 °C), Pufferzusammensetzung und angesetzte Voltzahl (50 V für 20 min, 200 V bis die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreicht hat). Nach der PAGE wurden die Gele direkt weiterverarbeitet (Färbungen mit Silbernitrat und Coomassielösungen oder Western Blots).

2.2.10 Western Blot / 2D-Western Blot

Die in PAGE- oder 2D-Gelen aufgetrennten Proteine können mithilfe eines Elektrotransfers („Blotten“) auf PVDF- oder NZ-Membranen übertragen werden (in dieser Arbeit wurden NZ-Membranen benutzt). Dafür stehen unterschiedliche Geräte zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden die Western- und 2D-Western Blots mit dem iBlot-System von Invitrogen hergestellt, welches die Proteine innerhalb von 7 min auf NZ-Membranen transferiert. Im Anschluss wurden die Membranen 1 h in Blockierungslösung (DIG Wash and Block Buffer Set, Roche, Mannheim, Deutschland) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Membranen wurden nun getrocknet und gelagert oder direkt mithilfe von Antikörpersystemen spezifisch auf Proteine untersucht. Dazu wurden zuerst die Primärantikörper in denselben Verdünnungen, die auch bei der IHC verwendet wurden (2.2.7), für 1 h bei RT in 50 ml Reaktionsgefäßen auf einem Rollschüttler

inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit Tris-gepufferter Saline mit Tween-20 (Tris-Buffered Saline Tween-20, TBS-T) wurden die Sekundärantikörper (Ziegenanti-Maus-Alkalische Phosphatase, AP) in einer Verdünnung von 1:10000 für 45 min inkubiert. Nach Waschen mit TBS-T und Umpuffern in alkalisches Milieu mittels DIG-Detektionspuffer (DIG Wash and Block Buffer Set; Roche) wurden die spezifischen Färbungen der Zielproteine mit NBT/BCIP durchgeführt.

2.2.11 ISH

Zur Detektion von pHp-mRNA in Gewebeschnitten wurden PCR-Produkte von Hp zur Generierung von Hp-komplementären cDNA-Sonden benutzt.

Primer Hp vorwärts: 5'-AGGCATTATGAAGGCAGCAC-3'

Primer Hp rückwärts: 5'-CGTTCTAAAGTCGGACCTTC-3'

Primer GAPDH vorwärts: 5'-AGAACGGGAAGCTTGTCATC-3'

Primer GAPDH rückwärts: 5'-GTCGGAGTTCTAGTAGTCGT-3'

Zuerst wurden jeweils 1 µg doppelsträngige PCR-Produkte in 6 µl RNase-freiem Wasser durch Kochen denaturiert. Unter Verwendung des DIG high-prime Kits (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) wurden die Sonden dann nach den Angaben des Herstellers mit DIG markiert. Zur Konzentrationsbestimmung der markierten Sonden wurden Vergleiche mit definierten Mengen DIG-markierter Kontroll-DNAs (10 ng bis 0,1 pg) durchgeführt, die wie Sondenaliquots auf positiv geladene Nylonmembranen gebracht wurden. Gewebeschnitte von 1 µm wurden auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen, wie in 2.2.1 beschrieben entparaffiniert und bei 40°C auf einer Streckbank getrocknet. Die Hybridisierungslösung für die Sonden bestand aus 2 ng/µl frisch denaturierter Sonde, 250 µg/ml Hefe tRNA, 0.1% SDS und 50% Formamid (Boehringer Mannheim). Hybridisiert wurde bei 46°C ü. N. in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Schnitte 2 mal 10 min bei RT mit 2 x saline sodium citrate (SSC) und 2 mal 30 min bei 50°C mit 0,2 x SSC gewaschen. Zur Detektion der Signale wurden die Schnitte schließlich mit Anti-DIG-AP Antikörper (1:7500) in 1 % Blockierungslösung wie vom Hersteller des Kits beschrieben behandelt. Die Farbumsetzung erfolgte über Neufuchsin [nach 45].

2.2.12 STST

In der Dissertation von Herrn Dr. Abdullah und in den pHp-Studien wurden 942 Lungengewebestücke von 81 Patienten in dem *ex vivo* Gewebekulturmodell STST kultiviert und mit den antimikrobiellen Stimulanzen LPS und Pam3 sowie IL-6 und Dexamethason (DEX) stimuliert [4]. Dazu wurden tumorfremes Gewebe (mindestens 5 cm vom Tumor entfernt) aus frisch operierten und maximal 30 min auf Eis gelagerten Lungenresektaten entnommen und direkt in 24-well-Platten überführt. Das verwendete RPMI 1640 Kulturmedium enthielt 10 % fötales Kälberserum (PAA, Pasching, Österreich), 2 % 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethanesulfonsäure, HEPES; Invitrogen), 10 mM Natriumpyruvat (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen). Die Gewebe wurden bis zu 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank inkubiert und danach HOPE-fixiert. Je nach Fragestellung wurde ein Stimulans oder pathogener Mikroorganismus direkt ins Kulturmedium gegeben und mitkultiviert. Die STST-Experimente werden im Kapitel zu den Studien über pHp genauer beschrieben (2.4.2).

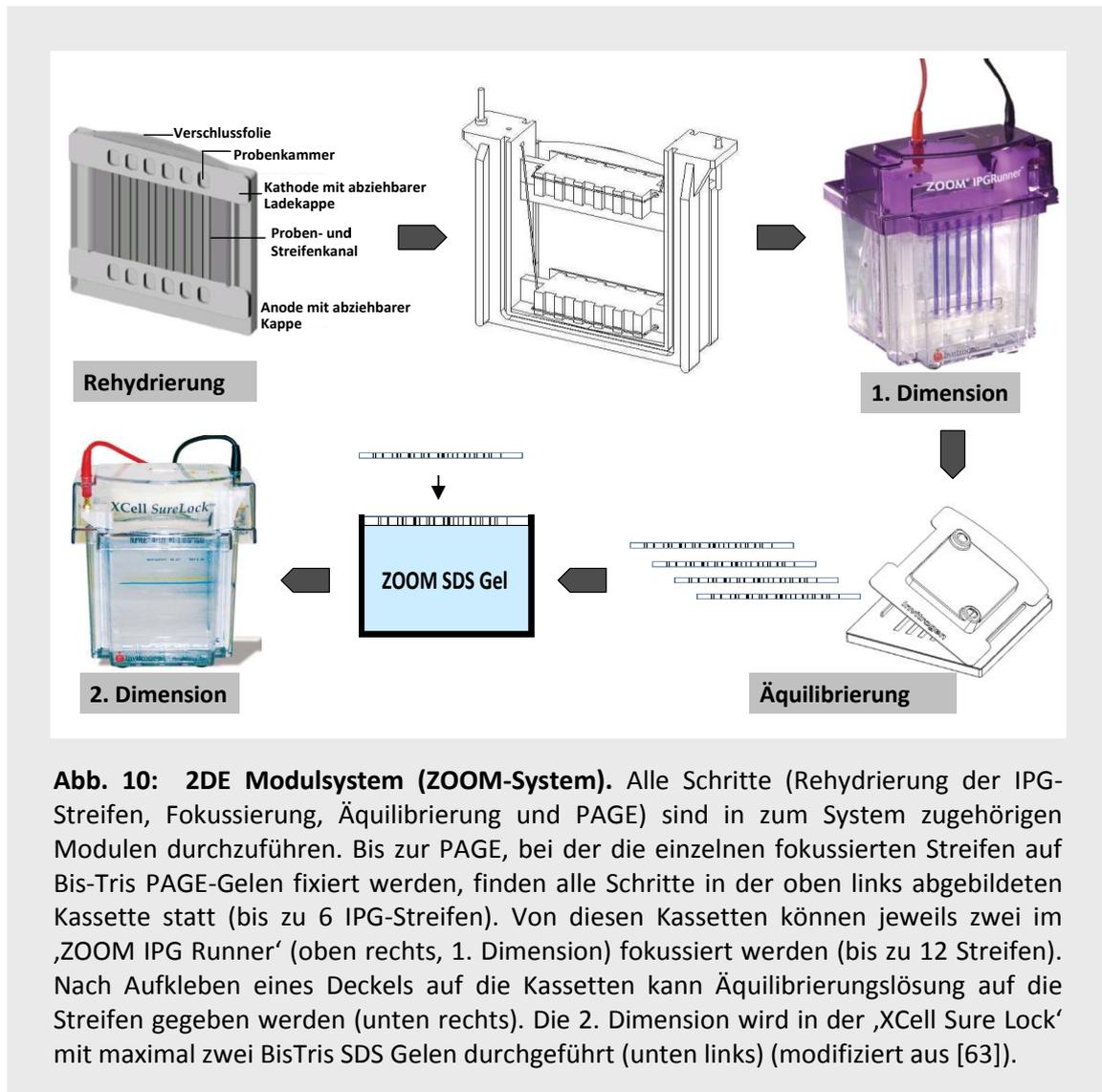
2.3 Proteomuntersuchungen an HOPE-fixierten, Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen

Zur Evaluierung der diagnostischen Möglichkeiten und zur Schaffung von Grundlagen für die Untersuchung von Biomarkern an HOPE-fixierten Archivgeweben mithilfe der Kerntechniken von ‚Proteomics‘, 2DE und Massenspektrometrie, wurden drei verschiedene 2DE-Systeme benutzt. Insgesamt wurden 100 2D-Gele mit diesen Systemen für die empirischen Ermittlungen der einzelnen Parameter produziert. Fakten zu den drei Systemen werden im Folgenden zusammengefasst.

2.3.1 Verwendete 2DE-Systeme (IPG/NEPHGE-Technik)

Invitrogen Modulsystem (ZOOM-System, IPG-Kleingelformat)

Beim ZOOM System (Invitrogen) handelt es sich um ein relativ einfach zu handhabendes Modulsystem für 7x5 cm große Gele. In vorgefertigte Kassetten (Abb. 10) wurden 2-6 Proben in RehyP pipettiert und 7 cm lange IPG-Streifen (pH 3-10 mit nichtlinearem pH-Gradienten) eingeschoben. Nach 6 bis 12 h Rehydrierungszeit (immer über Nacht) wurden bis zu zwei Kassetten mit je 6 rehydrierten Streifen in die ZOOM IPG Runner Elektrophoresekammer eingespannt und die Fokussierung innerhalb eingegrenzter Parameter durchgeführt. Die Kassetten wurden nach der Fokussierung aufgebrochen und die Deckel durch aufgeklebte Kappen mit Öffnungen für die Äquilibrierungslösungen (‚equilibration trays‘) ersetzt. Nach Äquilibrierung wurden die Streifen aus den Kassetten entfernt und eingefroren bzw. wird direkt mit der zweiten Dimension (PAGE) fortgefahren (2.2.9). Hierfür wurden vorgefertigte ZOOM Bis-Tris Gradientengele (4-12% Acrylamid) benutzt, die in derselben Kammer mit einem anderen Deckel gefahren wurden (maximal 2 Gele). Die Fertiggele können gefärbt oder wie in 2.2.10 beschrieben geblottet werden. Das System ist so konstruiert, dass die gesamte Prozedur nach Rehydrierung der Streifen an einem Tag durchführbar ist (Abb. 10).

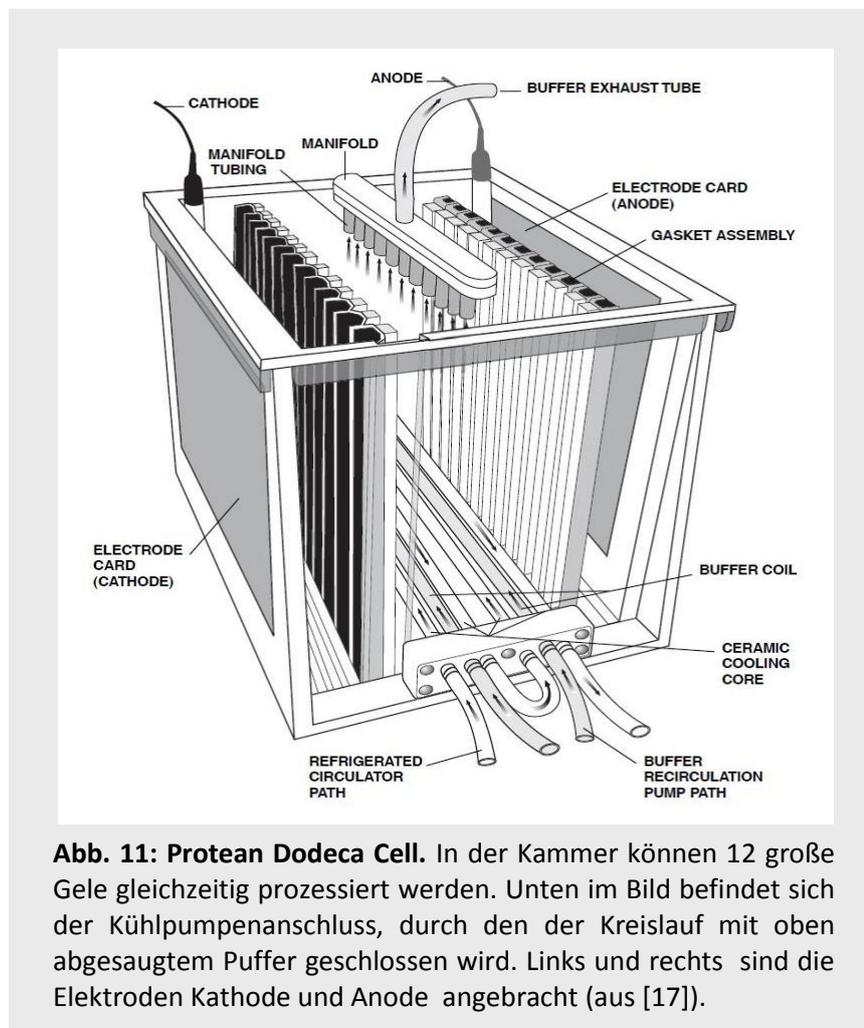


Biorad Hochdurchsatzsystem (Proteansystem, IPG-Großgelformat)

Das ProteanPlus System (Biorad, München, Deutschland) ermöglicht die gleichzeitige Prozessierung von 12 Gelen beim Gießen, bei der isoelektrischen Fokussierung und in der PAGE-Kammer (Protean Dodeca Cell, Biorad), die mit einem Volumen von ca. 26 Litern zur Auftrennung von Proteinen in 20x24 cm Gelen geeignet ist (Abb. 11). In einer speziellen Gießstation (‚Multigel Casting Chamber‘; Biorad) wurden 12 Gele simultan gegossen. Die ProteanPlus IEF Chamber ist ein Fokussierungssystem für IPG-Streifen, mit dem 12 bis zu 24 cm lange IPG-Streifen fokussiert werden können. Das Gerät ist mit vorprogrammierten linearen und nichtlinearen Programmen für den Spannungsanstieg zu betreiben oder ermöglicht die freie Programmierung von

Fokussierungsprogrammen bezüglich Voltmenge, Voltstunden, Fokussierungszeiten und Art des Spannungsanstiegs (langsam, schnell und linear). Mithilfe dieser Parameter wurden die Fokussierungsbedingungen für jede Probe empirisch ermittelt und so ein Protokoll für die besten Ergebnisse mit der IPG-Technik (Spotanzahl, Auflösung, Proteinmenge etc.) erstellt. Die Streifen wurden hier in Rehydrierungstrays 12 Stunden aufgequollen und in Fokussierungstrays übertragen, die in die IEF-Einheit zur Fokussierung eingeklemmt wurden.

Die im Rahmen dieser Arbeit evaluierten Fokussierungsparameter für 24 cm IPG-Streifen werden ab 2.3.2 ausführlich beschrieben.



Non-equilibrium pH gradient gel electrophoresis (NEPHGE-Kapillargele)

Bei diesem System (Abb. 12) werden in der ersten Dimension 0,9 mm dünne, selbst gegossene Kapillargele mit Carrierampholyten zur pH-Wert Generierung verwendet. In einem Gießstand wurden 6 Röhrchen (10 cm bzw. 15 cm Länge) durch Aufziehen mit einer oben aufgesetzten Spritze mit bei der WITA GmbH (Teltow, Deutschland) erhältlichen Gellösungen befüllt (Separationsgel und Kappengel). Nach einer halben Stunde wurden die Glaskapillaren in feuchten Tüchern im Dunkeln mindestens 3 Tage zur Auspolymerisation gelagert.

Vor dem Probenauftrag wurden die Kapillargele in die Anodenkammer eingespannt und mögliche Wasserauflagerungen vom Probenreservoir auf der anodischen Gelseite entfernt. Währenddessen wurde Agarose-AP-Puffer bei 68°C erwärmt und davon jeweils 1/5 jeder Probemenge in entsprechend vielen Reaktionsgefäßen vorgelegt. Die vorbereitete Probe (2.3.2.3) wurde mit dem vorgelegten Agarose-AP-Puffer vermischt und kurz bei 68°C gehalten. Mit vorgewärmten extralangen Pipettenspitzen wurde dann die Probenlösung oben in die Kapillaren gegeben, ohne dass Luftblasen eingebracht wurden. Nach dem Aushärten der Agarose in der Probe (ca. 5 min) wurde die Kapillare mit einer ‚Overlaylösung‘ aufgefüllt, sodass die Probe nicht mit dem Anodenpuffer in direkten Kontakt geriet. Die Gelröhrchen wurden entsprechend fixiert, beide Kammern mit Kathoden- bzw. Anodenpuffer befüllt und die Apparatur in die Fokussierungsvorrichtung gestellt. Nach Verbindung aller Anschlüsse und Versiegelung der Gerätetür wurden die Fokussierungen gestartet.

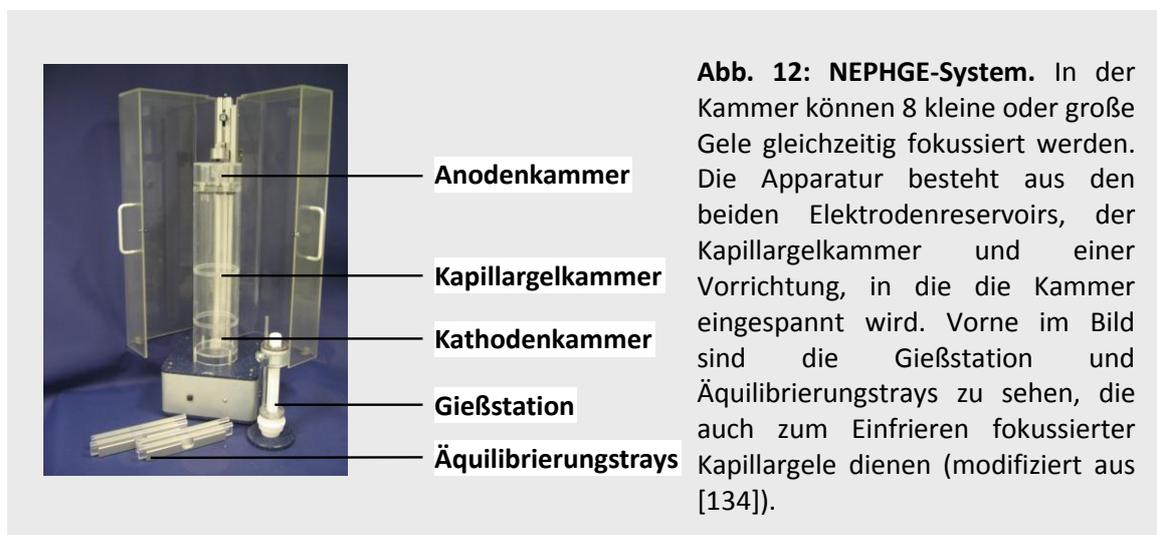


Abb. 12: NEPHGE-System. In der Kammer können 8 kleine oder große Gele gleichzeitig fokussiert werden. Die Apparatur besteht aus den beiden Elektrodenreservoirs, der Kapillargelkammer und einer Vorrichtung, in die die Kammer eingespannt wird. Vorne im Bild sind die Gießstation und Äquilibrationstrays zu sehen, die auch zum Einfrieren fokussierter Kapillargele dienen (modifiziert aus [134]).

2.3.2 2DE

2.3.2.1 Entparaffinierung

Die Entparaffinierung von Schnittröllchen aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Material (‘formalin-fixed and paraffin-embedded’, FFPE) erfolgte mithilfe von Xylol und Ethanol. Dafür wurden die Gewebe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und jeweils zweimal mit Xylol (zur Paraffinauflösung) und Ethanol (zur Entwässerung) in einem Rollinkubator gedreht. Nach jedem Schritt wurden die Gewebe bei 15000 x g abzentrifugiert, die Überstände verworfen und mit frischer bzw. der folgenden Lösung in einer Drehapparatur gedreht. Nach dem zweiten Ethanol Schritt wurden die entparaffinierten Gewebe in einer Vakuumzentrifuge (Savant SpeedVac 110; Thermo Scientific Corporation, Bonn, Deutschland) getrocknet. Danach wurde mit der Proteinextraktion fortgefahren.

Bei HOPE-Paraffinmaterial wurde, genau wie bei den histologischen Schnitten, die Entparaffinierung mit Isopropanol durchgeführt und anstatt mit Ethanol mit 70 %igem Azeton entwässert, was im gesamten Ablauf ein nichtdenaturierendes Umgebungsniveau schafft und bei Proteinanalysen von Bedeutung ist. Die Ausbeute an Gesamtprotein für 2DE wurde hier vergleichend für beide Entparaffinierungsmethoden an jeweils 10 mg HOPE-fixiertem Gewebe untersucht (3.1.2.1).

2.3.2.2 Proteinextraktion

A. HOPE-Material

Die Proteinextraktionen aus HOPE-fixierten Geweben wurden unter Verwendung von EP3 durchgeführt (2.2.3), und die Proteine aus diesem Puffer präzipitiert. Zur Evaluierung der geeigneten Extraktionszeit wurde eine Extraktion mit dem Volumen 1 ml EP3 über 5 h durchgeführt und stündlich nach 5 min Zentrifugation bei 15000 x g 20 µl Aliquots entnommen, wovon 5 µl für die Proteinbestimmungen und 15 µl zum Auftragen auf Polyacrylamidgele zum Vergleich der Bandenintensitäten nach Coomassiefärbung verwendet wurden (nach Mischen mit 4x Probenpuffer, 3.1.2.2).

Nach Extraktion wurden die Gewebe 15 min bei 15000 x g abzentrifugiert, Proteinbestimmungen mittels Coomassie Bradford Assays durchgeführt und die Überstände für die Präzipitierung mittels 2D-cleanup kit (ReadyPrep 2D-cleanup

kit; Biorad) verwendet. Nach Präzipitierung wurden die resultierenden Proteinpellets in dem entsprechenden RehyP bzw. Fokussierungspuffer resolubilisiert; zum Teil wurden Aliquots für PAGE-Gele verwendet.

Des Weiteren wurde eine optimierte Probenvorbereitung entwickelt, bei der die Proteinextraktion für 2 h direkt in den RehyP (IPG-Technik) bzw. Fokussierungspuffer (NEPHGE-Technik) erfolgte und Proteaseinhibitoren zugegeben wurden (WITA GmbH). Die Entfernung von Nukleinsäuren, Debris und Lipiden wurde dabei durch DNase/RNase Reaktion (Roche) und Zentrifugation (15000 x g) bzw. Ultrazentrifugation (UZ; 50000 x g) vorgenommen. Außerdem wurde 0,02 % Proteaseinhibitorcocktail (Roche) hinzugefügt. Bei dieser Methode wurde auf ein Ausfällen der Proteine verzichtet. Dazu wurden die Gewebe nach der Entparaffinierung mit dem entsprechenden Puffer für 2 h bei RT inkubiert und danach für 30 min ultrazentrifugiert (50000 x g). Die Konzentration an RNase A wurde auf 10 µg/ml eingestellt (Angaben des Herstellers, s. o.).

Pro 10 µl Proteinlösung wurde 1 µl ‚DNase I Reaction Buffer‘ und 1 µl DNase I (1 U/µl) 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl EDTA-Lösung (25 mM) 10 min Inkubation bei 65°C wurde DNase I inaktiviert.

B. Formalin-Material

Die Probenvorbereitung für 2DE mit formalinfixierten Geweben erforderte die Verwendung eines speziellen Kits (QProteome FFPE Tissue Extraktion Kit; Quiagen, Hilden, Deutschland). Hierbei wurden die Proben mit Hexan entparaffiniert; außerdem sind im System noch Chloroform und 2-stündiges Kochen bei 100°C zur Rückgewinnung der durch Formalin quervernetzten Proteine enthalten. Die Proteinextraktionen wurden nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

C. Gefriermaterial

Zur Gewinnung von Proteinlysaten aus Gefriermaterial wurden die Gewebe in einer Schale mit flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zu Pulver zerkleinert, direkt in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und EP3 hinzugegeben. Die Extraktionen wurden dann bei RT für 1 h durchgeführt.

D. Ethanol-Material

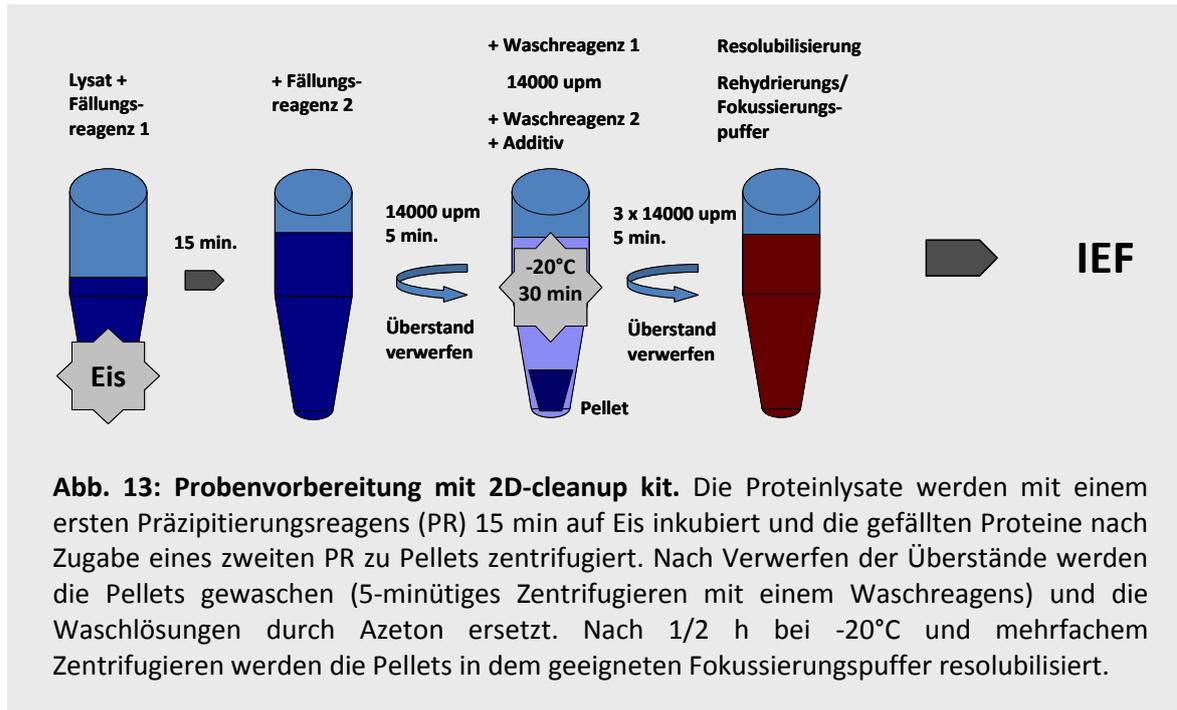
Die Proteinextraktionen aus ethanolfixierten Geweben erfolgten analog zu denen bei HOPE-fixierten Proben, um möglichst hohe Vergleichbarkeit zu gewährleisten (mittels 2D-cleanup kit, Biorad).

Im Anschluss an alle Proteinextraktionen erfolgten 15-minütige Zentrifugationen bei 15000 x g bzw. bei 50000 x g. Danach wurden Aliquots (5 µl) zur Proteinbestimmung mittels Coomassie Bradford Assays entnommen. Die proteinhaltigen Überstände wurden (ggf. in 50 bis 100 µl Aliquots) bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren oder direkt weiter verarbeitet.

2.3.2.3 Rehydrierung/Probenvorbereitung

A. HOPE-Material

Wie in der Literatur und den Produktinformationen empfohlen wurden Proteinlysate auf verschiedene Weise von Substanzen gereinigt, welche die isoelektrische Fokussierung stören [46]. Dazu zählen Zelldebris, Nukleinsäuren, Lipide und weitere makromolekulare Bestandteile der Zellen. Die zu diesem Zweck angewendeten Methoden basieren auf der Präzipitierung der Proteine mittels TCA, TCA/Azeton, Azeton oder Chloroform/Methanol-Fällung. Als kommerziell erhältliches Kit wurde des Weiteren das 2D-cleanup kit von Biorad benutzt. Die Proteine wurden ausgefällt, gewaschen und schließlich wieder in einem geeigneten RehyP (IPG-Technik) bzw. Fokussierungspuffer (NEPHGE-Technik) aufgenommen (Abb. 13).



Des Weiteren wurden vier verschiedene selbst angesetzte Fällungsreaktionen getestet.

1. TCA-Fällung mit 100 % TCA

Die Lysate wurden mit der 4-fachen Menge an eiskalter 100 % TCA-Lösung 30 min bis über Nacht bei -20°C inkubiert und die Proteine im Anschluss abzentrifugiert (15000 x g).

2. TCA/Azeton-Fällung

Die Lysate wurden mit dem 4fachen Volumen an 10% TCA in eiskaltem Azeton 30 min bis über Nacht bei -20°C inkubiert und die Proteine im Anschluss abzentrifugiert (15000 x g).

3. Azeton-Fällung

Die Lysate wurden mit der 4fachen Menge an eiskaltem Azeton 30 min bis über Nacht bei -20°C inkubiert und die Proteine im Anschluss abzentrifugiert (15000 x g).

4. Chloroform/Methanolfällung

Über 2-Phasenextraktionen wurden 100 µl Lysat erst mit 4-facher Menge Methanol gemischt und 10 s zentrifugiert (9000 x g), dann Chloroform in einem Verhältnis von 1:1 (Lysat:Chloroform) zugegeben und abzentrifugiert (9000 x g, 10 s). Durch Zugabe von 300 µl H₂O, Mischen und 1 min Zentrifugation (9000 x g) wurden die Phasen getrennt (Proteine sammeln sich jeweils an der Phasengrenze). Die oberen Phasen wurden verworfen, erneut 300 µl Methanol zugegeben, gemischt und die Proteine zu einem Pellet zentrifugiert (10 min, 15000 x g).

Bei Fokussierungen mit IPG-Streifen wurden die nach der Präzipitierung resultierenden Proteinpellets jeweils in 450 µl RehyP gelöst, womit dann die IPG-Streifen rehydriert wurden. Dabei wurden wiederum verschiedene Parameter variiert, um die Löslichkeit und Dauer der Solubilisierung von Proteinpellets zu verbessern. Die Maßnahmen beruhen auf Schütteln, Temperaturerhöhung, Ultraschall und der Verwendung eines elektrischen Pelletzerkleinerers („Pellet Pestle“; St. Gallen, Schweiz). Außerdem wurden verschiedene Zusammensetzungen und Inhaltsstoffe der RehyP's verglichen, die vor allem die Separation im basischen Bereich und für hydrophobe Moleküle wie Membranproteine verbessern sollten (Tab. 7).

Tab. 7: Zusammensetzung der verschiedenen RehyP's.

	Harnstoff	Thioharnstoff	CHAPS	DTT	HED	Ampholyte
RehyP1	7 M	/	2 %	50 mmol +/- 100 mmol		0,5 %
RehyP2	7 M	2 M	4 %	75 mmol +/- 100 mmol		0,5 %
RehyP3	7 M	2 M	2 %	75 mmol +/- 100 mmol		0,5 %
RehyP4	9 M	/	4 %	100 mmol +/- 100 mmol		0,5 %

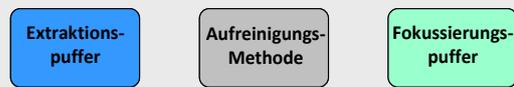
Während bei IPG-Streifen die Proteinpellets (je nach Streifenlänge und angestrebter Färbemethode der Gele 100 bis 2000 µg) in 450 µl RehyP (große Gele) bzw. 155 µl RehyP (kleine Gele) gelöst wurden, steht bei der NEPHGE-Technik ein Probenvolumen zwischen 10 und 60 µl zur Verfügung (50 bis 1000 µg für kleine und große IEF-Kapillargele). Es wurde mit 10 bis 200 mg

entparaffinierten und 10 min in einer Vakuumzentrifuge (Savant SpeedVac 110) getrockneten Geweben gearbeitet (Trocknungsrate: niedrig); die Trocknungszeiten und die jeweiligen Mengen der Puffer (50 bis 700 μ l) wurden je nach Gewebemenge variiert, um sie ungefähr den Mengen benötigter Lysate anzupassen. Nach den Extraktionen wurden die genauen Proteinmengen über Coomassie Bradford Assays bestimmt und auf die gewünschte Konzentration mit Fokussierungspuffer eingestellt (oder die unverdünnten Lysate aufgetragen).

IPG-Streifen wurden vor der Fokussierung in einem Fokussierungstray 12 h mit in RehyP gelösten Proben rehydriert, was bei der NEPHGE-Technik entfällt (allerdings sollten hier Kapillargele vorbereitet sein, die nur ca. 14 d lagerungsfähig sind und 3 d zum Auspolymerisieren benötigen).

Wie oben beschrieben wurde eine optimierte Methode der Probenvorbereitung in die Evaluierung mit einbezogen und versucht, so viele Schritte wie möglich bei der Probenvorbereitung einzusparen. Die verschiedenen Verfahrensweisen erhalten in Abb. 14 eine Symbolik, mit der die Gelbilder im Ergebnisteil zur besseren Übersicht versehen werden.

Probenvorbereitung



Beschreibung

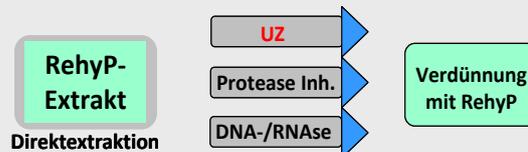
IPG-Technik



Nach 3-stündiger Extraktion mit EP3 wurden TCA/Azetonfällungen durchgeführt. Es resultierten Proteinpellets, die nach Auswaschen des TCA mit Azeton und Trocknung in RehyP gelöst wurden (ggf. unter Anwendung mechanischer bzw. thermischer Behandlung oder Ultraschall, siehe S. 50). Diese Lösungen dienen zur Rehydrierung der IPG-Streifen vor der IEF und sind daher mit dem Fokussierungspuffer identisch.



Ablauf wie oben, außer dass mit dem ReadyPrep 2D-cleanup kit anstatt mit eigenen TCA/Azetonfällungen gearbeitet wurde. Hier wurden noch zwei weitere Waschpuffer aus dem Kit verwendet. Es resultierten ebenfalls in entsprechenden Puffern und mit den notwendigen Maßnahmen zu resolubilisierende Pellets.

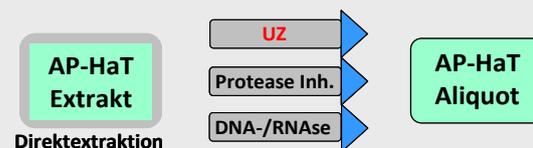


Die Proteinextraktionen erfolgten direkt in RehyP. Je nach Bedarf wurden diese zur besseren Extraktions- und Solubilisierungskraft unterschiedlich zusammengesetzt (Tab. 7). Außerdem wurden proteolytische Reaktionen geblockt und Nukleinsäuren durch DNase/RNase Behandlungen oder UZ entfernt. So wurden Fällungsreaktionen umgangen und dadurch entstehende Verluste eliminiert.

NEPHGE-Technik



Die Proteinextraktionen erfolgten mit EP3, die Proteine wurden mit dem Aufreinigungskit ausgefällt und gewaschen. Die Pellets wurden in dem für das System mitgelieferten Fokussierungspuffer AP-HaT (Harnstoff/Thioharnstoff) gelöst und dabei ggf. mechanische bzw. thermische Maßnahmen angewendet.



Die Proteinextraktionen fanden direkt in den NEPHGE-Fokussierungspuffer AP-HaT statt. Nach Modifizierungen des Puffers, UZ, Proteaseinhibition und Nukleinsäuredegradation wurden die Proteinmengen bestimmt und Aliquots der gewünschten Konzentration, ggf. mit AP-HaT auf ein höheres Volumen eingestellt, fokussiert.

Abb. 14: Symbolik für verschiedene Methoden der Probenvorbereitung . Sowohl für die IPG- als auch die NEPHGE-Technik sind alle in dieser Arbeit angewendeten Techniken zur Probenvorbereitung dargestellt und kurz erläutert. Mit dieser Symbolik werden die Gelbilder im Ergebnisteil zur besseren Übersicht illustriert.

Bei der Anwendung des Aufreinigungskits oder anderer Fällungsreaktionen wurden bei einigen Proben zusätzlich mechanische und/oder thermische Behandlungen durchgeführt, wenn die Proteinpellets schlecht in den entsprechenden Fokussierungspuffern löslich waren:

- Schütteln: Von 100 bis 1450 u/min, 10-120 min (Thermo Shake TS-100, Biosan, Lettland)
- Temperaturerhöhung: bis zu 68°C, 5-20 min (Thermo Shake, TS-100, Biosan, Lettland)
- Pellet-Zerkleinerer (Pellet Pestle): 15 s
- Ultraschall: 2-15 min

B. Formalin-Material

Bei formalinfixierten Geweben wurde das Retrieval-Kit (QProteome FFPE Tissue Extraction Kit; Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers benutzt. Im Anschluss an die Prozedur wurden die Pellets in einem geeigneten Volumen RehyP bzw. Fokussierungspuffer gelöst.

C. Gefriermaterial

Gefriermaterial wurde wie oben beschrieben behandelt und ebenfalls die o. g. Präzipitierungsverfahren angewendet. Wieder wurden die Proteinpellets in den benötigten Puffern (RehyP oder Fokussierungspuffer) aufgenommen und solubilisiert.

D. Ethanol-Material

Ethanolfixiertes Material wurde wieder analog zu der Behandlung HOPE-fixierter Gewebe unter Verwendung des Aufreinigungskits prozessiert.

2.3.2.4 Fokussierungsbedingungen

Die Fokussierungsbedingungen als Hauptparameter der isoelektrischen Fokussierung bei der IPG-Technik bedürfen einer empirischen Ermittlung für die jeweilige Probenart. Die hierbei zu ermittelnden Parameter sind die Zeiten der programmierten Voltstufen, die Art des Spannungsanstiegs (langsam, schnell oder linear) und die Fokussierungszeit. Nach Vergleich verschiedener Proteinmengen

(100 bis 2000 μg in 100 μg Intervallen, je nach Streifenlänge, angestrebter Färbung, etc.) bei linearem Voltanstieg bis 10000 V mit dem vorprogrammierten Programm des Fokussierungsgerätes (limitierender Faktor: Voltstunden) wurde mit selbstprogrammierten Fokussierungsprogrammen der optimale Spannungsverlauf und die Voltstundenzahl ermittelt, bei der die höchste Auflösung und Spotanzahl erreicht wurde. Dazu wurden gleiche Proben jeweils unterschiedlich lange bei der höchsten Voltstufe fokussiert, also nach 60, 70, 80 oder 100 Vh jeweils ein Streifen entnommen und eingefroren. Das für HOPE-fixierte Gewebe entwickelte Fokussierungsprogramm wurde wie folgt aufgebaut:

100 V für 1 h; Anstieg auf 200 V in 1 h; 200 V für 1 h; Anstieg auf 400 V in 1 h; 400 V für 2 h; Anstieg auf 1000 V in 1 h; 1000 V für 1 h; Anstieg auf 8000 V in 2 h; 8000 V für 1 h; 10000 V bis gewünschte Vh erreicht sind.

Bei der NEPHGE-Technik sind die Fokussierungsparameter von der WITA GmbH entwickelt worden und durch die Länge der Kapillargele definiert. Die Programme für kleine (7 cm) und große (25 cm) Gele unterscheiden sich in der Dauer der einzelnen Voltstufen.

7 cm Gele: 100 V für 1 h 15 min; 200 V für 1 h 15 min; 400 V für 1 h 15 min; 600 V für 1 h 15 min; 800 V für 10 min und 1000 V für 5 min

25 cm Gele: 100 V für 1 h 15 min; 200 V für 1 h 15 min; 400 V für 1 h 15 min; 600 V für 21 h 15 min; 800 V für 15 min; 1000 V für 10 min; 200 V für 5 min

IPG-Streifen wurden nach Rehydrierung von Rehydrierungs- in Fokussierungstrays überführt. Zuvor wurden auf die Elektroden des Fokussierungstrays kleine, in A. dest. getränkte Filterpapierstreifen gelegt und die IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten und mit entsprechender Polung auf diese Papiere aufgelegt. Nach Schließen mit einem Deckel wurden die Trays in die Protean IEF Apparatur eingespannt, die Fokussierung programmiert oder ein vorprogrammiertes Programm gestartet.

Bei der NEPHGE-Technik wurden Kapillargele in die Fokussierungskammer (Abb. 12) eingespannt und durch Schraubmuttern befestigt. Nach Absaugen von Wasserüberstand aus den Probenreservoirs wurden die Proben 1:5 mit auf 68°C erwärmtem Agarose-AP-Puffer (WITA GmbH) gemischt und bei 68°C gehalten. Mit ebenfalls vorgewärmten langen Pipettenspitzen wurden die Proben nun nacheinander luftblasenfrei in die oberen freien Enden der Kapillaren gegeben und mit Overlaylösung aufgefüllt, sodass die Proben später nicht in Kontakt mit dem Anodenpuffer traten. Die Kapillaren wurden bis in die untere Kathodenkammer geschoben, der Kathodenpuffer eingefüllt und die Schraubmuttern festgezogen, durch welche die Kapillargele mit der Probenauftragsseite in die obere Anodenkammer reichen. Diese wurde mit Anodenpuffer befüllt, der Kontaktdeckel geschlossen und die Fokussierungskammer in die Apparatur eingespannt (Abb.12).

Sowohl fokussierte IPG-Streifen als auch Kapillargele können bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren werden.

2.3.2.5 Äquilibration fokussierter Gele

A. 24 cm IPG-Streifen wurden nach dem Auftauen zuerst in einem DTT-haltigen und danach in einem JAA-haltigen Äquilibrationpuffer (6 M Harnstoff; 30 % Glycerin; 0,05 M Tris pH 8,8; SDS; DTT bzw. JAA) inkubiert, indem sie in Rehydrierungstrays auf einer Schüttelbank jeweils 15 min leicht geschwenkt wurden. Beim ZOOM-System wurden die Rehydrierungskassetten mit dichten Deckeln verklebt und auf einen Schüttler gelegt. Hier wurden die Äquilibrationen in 1 x LDS sample Buffer (Invitrogen) mit Zusatz von DTT bzw. JAA durchgeführt.

Bei den IPG-Streifen wurde eine Konzentration an DTT von 1 bis 5 %, an JAA von 1 bis 10 % und an SDS von 1 bis 10 % verglichen.

B. Die IEF-Kapillargele der NEPHGE-Technik wurden nach Fokussierung mit Luftdruck aus den Glaskapillaren auf Plastikschienen gebracht, wo sie vor dem Einfrieren 15 min mit Äquilibrationlösung inkubiert wurden (bei 3-maligem Wechseln der Lösung).

2.3.2.6 PAGE

Das ZOOM-System beinhaltet fertig gegossene BisTris-Gradientengele.

Die Proteangele wurden in einer speziellen Gießstation (Multicasting Chamber, Biorad) gegossen und die Station über Nacht mit feuchten Tüchern abgedeckt, bis die Polymerisation vollständig war. Es wurden 12,5% Acrylamidgele (Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1) für die zweite Dimension verwendet (Tab. 8).

Tab. 8: Zusammensetzung der Acrylamidlösung für 12 große Gele.	
A. dest.	414 ml
Rotiphorese Acrylamidlösung	486 ml
Trenngelpuffer (72 ml 1M HCl/54,6g Tris)	300 ml
SDS-Lösung, 10%	12,24 ml
TEMED	1,2 ml
APS-Lsg., 10%	7,5 ml

Bei allen drei Systemen wurden die fokussierten IPG-Streifen/Kapillargele auf SDS-PAGE Gelen positioniert und mit Agarose überschichtet; bei den Kapillargelen wurden diese noch mit Bromphenolblau angefärbt, da sie nicht wie die IPG-Streifen in bromphenolblauhaltiger Äquibrierungslösung inkubiert wurden. Die Elektrophorese der zweiten Dimension wurde mit 50 V für 20 min und 200 V für die restliche Zeit gefahren. Das Annähern der Bromphenolblaufront an die unteren Enden der Gele signalisierte das Ende der SDS-PAGE.

IPG-Technik: Das ZOOM-System wurde 20 min bei 50 V und ca. 75 min bei 200 V gefahren. Beim Proteansystem wird 50 V für 40 min und 200 V für 4 bis 5 h angesetzt.

Zum besseren Durchsatz wurde die NEPHGE-Technik für die Produktion von großen Gelen mit der Protean Dodeca Cell kombiniert, um bei der PAGE 12 große Gele gleichzeitig prozessieren zu können.

2.3.2.7 Färbung von 2D-Gelen

Nach der PAGE wurden die Gele direkt weiterverarbeitet. In dieser Arbeit kamen neben 2D-Western Blots drei wesentliche Färbemethoden zur Anwendung:

A. Silbernitrat-Färbung

Zur Färbung der Proteine mit Silbernitrat wurden die Gele in verschiedenen Lösungen geschwenkt (Tab. 9):

Tab 9: Färbeprotokoll für Silbernitratfärbung.		
Lösung/Dauer	Zusammensetzung	Volumen / 1000 ml
Fixierung	30 % Ethanol (100%)	300 ml
über Nacht	10 % Essigsäure (100 %)	100 ml
Inkubation	30 % Ethanol (100 %)	300 ml
2 h	0,5 M Natriumacetat	68 g
	Vor Gebrauch: 0,5 % Glutaraldehyd	20 ml
	0,2 % Natriumthiosulfat	3,14 g
Silbernitrat	0,1 % Silbernitrat	1 g
45 min	Vor Gebrauch: 0,02 % Formaldehyd (37 %)	540 µl
Entwickler	2,5 % Natriumcarbonat	25 g
nach Sicht	Vor Gebrauch: 0,01 % Formaldehyd (37 %)	270 µl
Stopplösung	50 mM EDTA	18,51 g

B. Coomassie-Färbung

Die Färbungen mit Coomassie Brilliant Blue R-250 erfolgten durch Schwenken für 12 h in folgender Lösung: 1 g Coomassie R-250, 30 % Methanol, ad. 1000 ml. Zur Entfärbung wurde jeweils reines A. dest. verwendet und solange geschwenkt, bis der Hintergrund klar war.

C. Kolloidale Coomassiefärbung

1 g Kolloidales Coomassie Brillant G-250 wurde in 20 ml A. dest. gelöst. 80 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurden parallel in 765,2 ml A. dest. gelöst, 18,8 ml 85 %ige Phosphorsäure hinzugegeben und davon 16 ml der Coomassielösung beigemischt. Die resultierende Färbelösung sollte nicht filtriert werden und ist für 3 Monate in braunen Glasflaschen lagerungsfähig. Vor Gebrauch wurde Methanol in einer Endkonzentration von 20 % (v/v) zugegeben. Die Gele wurden in dieser Lösung ü. N. geschwenkt. Zur Entfärbung wurde ebenfalls A. dest. verwendet, bis der Hintergrund klar und die Proteine scharf begrenzt waren [21].

2.3.3 2D-Western Blot

2.3.3.1 Blotten von 2D-Gelen

Neben Färbetechniken für zweidimensionale Gele bot sich zur Erweiterung der analytischen Möglichkeiten die Etablierung von Western Blots aus HOPE-fixierten Geweben an. Dazu wurden die Gele nach standardmäßigen Verfahren auf NZ-Membranen gebロットet; das dazu verwendete Gerät war das iBlot-System von Invitrogen. Die Prozedur wurde wie in der Anleitung beschrieben durchgeführt und das 2D-Blotting Verfahren zur Detektion der in dieser Arbeit beschriebenen Zielmoleküle TKTL1, pHp, ANXA8 und DUX4 benutzt. Die Experimente zu diesen Molekülen sind in 2.4 ausführlich beschrieben.

2.3.3.2 Detektion von Biomarkern mit Antikörpern

Die ausgewählten Zielmoleküle wurden mithilfe der 2D-Blot Technik identifiziert. Dazu wurden für jeden Biomarker die in Vorversuchen (Transkriptomarrays, IHC-Färbungen, Blots) positiv identifizierten Gewebe über 2D-Western Blots und korrespondierende coomassiegefärbte Zwillingsgele analysiert. Hier ist sowohl das IPG-Verfahren als auch die NEPHGE-Technik zur Anwendung gekommen. Die Zielmoleküle und ihre Detektionsparameter sind in Tab. 10 zusammengetragen.

Tab. 10: Antikörperdetektion von Biomarkern auf 2D-Western Blots.

Ziel-molekül	Primär-AK	Waschen	Sekundär-AK*	Waschen	Umpuffern	Detektion
TKTL1	1 h RT 1:250		45 min RT 1:10000			
pHp	1 h RT 1:500		45 min RT 1:10000		DIG-Detektions-Puffer	NBT/BCIP bei pH 9,5
ANXA8	1 h RT 1:250	3 x Tris-HCL	45 min RT 1:10000	1 x Tris-HCL	2 x pH 8,8	
DUX4	1 h RT 1:500		45 min RT 1:10000		1 x pH 9,5	

* anti-mouse bzw. anti-rabbit

Des Weiteren wurden von jeweils gleichen Proben Zwillingegele produziert und diese mit Kolloidaler Coomassiefärbung behandelt. Aus diesen Gelen wurden dann nach genauer Lokalisation die zu den Blotsignalen korrespondierenden Proteinspots entfernt und zu massenspektrometrischen Analysen weitergeleitet.

2.3.4 MALDI-TOF MS

Die Proteinspots wurden aus den Gelen entnommen, entfärbt und über Nacht mit Trypsin aus Rinderpankreas verdaut (Roche) [118]. Vor der MS wurden die extrahierten tryptischen Fragmente 1:1 (v/v) mit gesättigter Matrixlösung, in diesem Falle α -Cyano-4-Hydroxymizsäure, vermischt (Bruker Electronics, Bremen, Deutschland) und dann in einem Reflex III Spektrometer in ‚Reflector time-of-flight‘ Konfiguration analysiert. Dabei wurde die Beschleunigungsvoltzahl auf 20 kV eingestellt; die Massenspektren wurden mit ‚Biotools 3.2‘ von Bruker Daltronics (Bremen, Deutschland) verarbeitet und ein Massenlistenabgleich mit ‚MASCOT database search‘ vorgenommen (unter Verwendung eines Molecular Weight Search (MOWSE) [60].

2.4 Identifizierung und Validierung von Biomarkern

2.4.1 TKTL1

Zur Untersuchung von TKTL1 wurden zunächst 88 formalinfixierte NSCLC-Gewebe (39 Adenokarzinome, 49 Plattenepithelkarzinome) und 24 Mammakarzinome (21 invasiv-dukta; 1 tubulär; 1 lobulär; 1 muzinöses Karzinom) immunhistochemisch untersucht (2.2.7.1). Außerdem wurden 40 HOPE-fixierte NSCLC-Gewebe analysiert. In der Studie wurden auch die Korrelationen von TKTL1-Expression zu Alter, Geschlecht, TNM-Klassifikation und Tumorgrading sowie zu TTF-1 und SP-A Expression evaluiert (Schultz und Kähler *et al.* 2008) [113, Anhang].

Zur genaueren Charakterisierung der Daten wurden 2D-Gele aus TKTL1-positiven Geweben produziert und geblottet. Danach fand ein Antikörpernachweis des Moleküls statt. Der verwendete monoklonale Mausantikörper, anti-TKTL1 (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) wurde in einer Verdünnung von 1:250 in ‚Antibody Diluent‘ (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) inkubiert, die weiteren Versuchsparameter sind in 2.3.3 beschrieben. Des Weiteren wurden 2D-Western Blots produziert und mit anti-TKTL1 Antikörper behandelt.

2.4.2 pHp

Zur Beschreibung von pHp wurden in einer ersten Studie 115 tumoröse, formalinfixierte Lungengewebe auf TMAs immunhistochemisch untersucht. Des Weiteren wurden 37 HOPE-fixierte Proben (20 Lungengewebe und 17 tumoröse Lungengewebe) mit Hilfe von RNA-ISH untersucht (2.3). Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 65 Jahre (von 45 bis 85) und das Kollektiv bestand aus 61 Männern und 48 Frauen. Die pathologische Begutachtung ergab 47 Adenokarzinome, 42 Plattenepithelkarzinome, 13 Kleinzellige Karzinome und 13 tumorfreie Lungengewebe. Außerdem wurde exemplarisch eine Verifikation durch RT-PCR und Western Blots durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie sind in ‚Pathology Research and Practice‘ veröffentlicht worden [3]. Des Weiteren wurde pHp über 2DE und 2D-Western Blots identifiziert. Als Basis für die Untersuchung von pHp dienten erneut Daten aus den Transkriptomarrays.

Eine zweite Studie diente der weiteren Untersuchung von pHp und seinem ‚Scavengerrezeptor‘ CD163 im Hinblick auf Expression und Funktion im Falle von

ex vivo Stimulationen mit LPS, Pam3, IL-6 und DEX. Hierzu wurden von 81 Patienten 942 Gewebestücke und tumorfreie Gewebe unter STST-Bedingungen kultiviert und stimuliert bzw. infiziert (2.2.12). Effekte einer *ex vivo* Infektion mit den Mikroorganismen *Haemophilus Influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* und *Chlamydia pneumoniae* wurden bei jeweils 10 Proben ebenfalls untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss von pHp auf Entzündungsmediatoren und chemische Lockstoffe (TNF- α , IL-6, MCP-1, IL12p40 und RANTES) in Kultur von A549 Zellen und von Monozyten abstammenden Makrophagen über Cytometric Bead Arrays (CBA) und Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) ermittelt. Schließlich wurde in jeweils 11 Fällen die Expression von pHp und CD163 in Lungengewebe von COPD- und Sarkoidosepatienten untersucht.

Die Vorgehensweisen bei der Durchführung der einzelnen Methoden wurden bereits von Herrn Dr. Abdullah *et al.* in ‚Respiration‘ veröffentlicht und in seiner Dissertation beschrieben [1, 4, Anhang].

Die dritte Studie um pHp thematisiert die Verwendbarkeit von pHp als Marker für die Unterscheidung von Tumorentitäten in der menschlichen Lunge. Dafür wurden 119 formalinfixierte NSCLC-Gewebe immunhistochemisch gefärbt und die Expression für die beiden in der Lunge vorrangig vorkommenden Tumorarten (Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome) evaluiert. Die Ergebnisse wurden jeweils mit TTF-1-, SP-A-, SP-B- und Napsinexpression verglichen und in ‚Pathology‘ veröffentlicht) [2, Anhang].

pHp wurde für diese Arbeit mithilfe von Proteomuntersuchungen analysiert. Mithilfe von 2D-Western Blots und einer folgenden Antikörperdetektion wurde ein weiterer Nachweis des Moleküls angesetzt. Dabei wurde auch zur Evaluierung der diagnostischen Möglichkeiten mittels 2D-Western Blots aus Adeno- und Plattenepithelkarzinomen eine vergleichende Detektion unternommen (pHp gilt nach [2] als Marker für Adenokarzinome; 3.2.2).

2.4.3 ANXA8

Nach Informationen aus Transkriptomanalysen von Lungengeweben, die eine erhöhte Expression von ANXA8 gezeigt hatten, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt (2.2.7.2). Dafür wurden HOPE-fixierte NSCLC-Gewebe entparaffiniert und das Isopropanol/Azetonprotokoll (2.3.2.1) verwendet. Zur

Validierung wurden Proteomuntersuchungen an immunhistochemisch positiven Geweben vorgenommen.

2.4.4 DUX4

Die Expression von DUX4 in Lungengeweben und Lungenkarzinomen wurde nach Generierung der Transkriptomdaten auch auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden 20 NSCLC- und Lungengewebe immunhistochemisch mit dem polyklonalen Antikörper H-204, Klon sc-67385 (Santa Cruz, USA) gefärbt (2.2.7). Zusätzlich wurden Western Blots, 2D-Gele, 2D-Western Blots und Blots nach IP's zum Nachweis von DUX4 produziert. Im Gegensatz zu den anderen Western- und 2D-Western Blots wurden die Proteinlysate hier mit RIPA-EP hergestellt und neben Eluaten aus parallelen IP's von DUX4 auf PAGE-Gelen aufgetragen. Diese Gele wurden geblottet und Antikörpernachweise von DUX4 mit dem in der IHC verwendeten Antikörper (s. o.) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung von Proteomuntersuchungen an HOPE-fixierten, Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen

3.1.1 2DE – initiale Ergebnisse

Die in diesem Kapitel später einzeln aufgeführten Ergebnisse der Evaluierung verschiedener für 2DE entscheidender Versuchsparameter verdeutlichen eine gute Verwendbarkeit von HOPE-fixierten (Lungen)geweben für proteomweite Untersuchungen mittels 2DE mit Identifizierung einzelner Proteine über massenspektrometrische Analysen. Vorab werden die Ergebnisse der initialen Versuche mit der NEPHGE-Technik dargestellt. Diese haben bereits zu Beginn eindeutig die Verwendbarkeit von HOPE-fixierten Lungengewebe belegt (Kähler und Alexander *et al.* 2010) und dienen als Basis für eine Optimierung der Parameter und für die Etablierung der IPG-Technik [64]. In 3.1.2 werden die Erkenntnisse der empirischen Untersuchungsreihen zur Optimierung der 2DE-Parameter für die IPG-Technik ausführlich erläutert, die wiederum zur Etablierung der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungsstrategie zu Biomarkern notwendig waren und auch die Probenvorbereitung der NEPHGE-Technik betreffen.

3.1.1.1 2DE

Die initialen Ergebnisse mit der NEPHGE-Technik belegen, dass 2DE mit HOPE-fixierten Geweben in guter Qualität und Reproduzierbarkeit bezüglich der Hauptkriterien Spotanzahl, Spotschärfe (Auflösung) und Reproduzierbarkeit durchgeführt werden kann. In den folgenden Abbildungen sind Beispiele zu verschiedenen 2D-Gelen aus Tumorgewebe und Lungengewebe gezeigt, welche die Qualität der Ergebnisse verdeutlichen. Ein Vergleich zu formalinfixiertem, ethanolfixiertem und zu Gefriermaterial ist ebenfalls aufgeführt. Zu einigen Geweben werden H&E-Färbungen gezeigt, um einen Vergleich der Morphologie der unterschiedlich fixierten Gewebe vornehmen zu können.

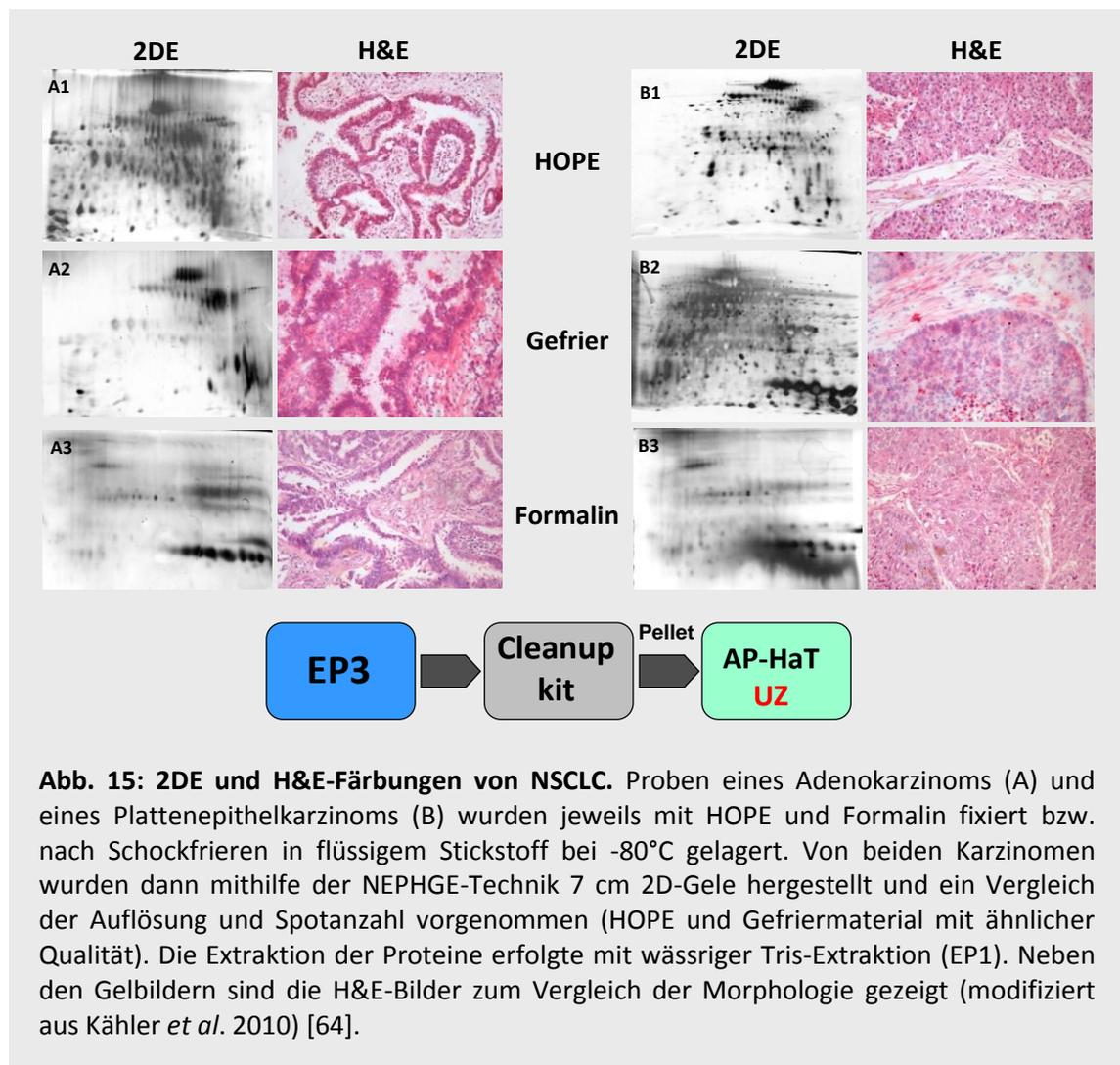


Abb. 15 zeigt die aufgetrennten Proteine wässriger Tris-Extrakte, mit denen wasserlösliche Proteine extrahiert wurden. Bereits bei dieser simplen Probenvorbereitung ließ sich ein bemerkenswertes Spektrum separierter Proteine erzeugen. Bei einer der wässrig extrahierten Proben ist die Auflösung (Spotanzahl und Schärfe der Spots) verglichen mit der eingefrorenen Probe höher und zeigt weniger Hintergrund; bei der zweiten gezeigten Probe ist dies umgekehrt. Die Aufarbeitung der formalinfixierten Proben mithilfe des Qiagen FFPE Kits lieferten bei keinem Versuch ausreichende Ergebnisse.

Bei komplexer Extraktion mit Substanzen, die auch hydrophobe, Kern- und Membranproteine in Lösung bringen, wurden ebenfalls gute Ergebnisse bei der Verwendung HOPE-fixierter Gewebe erzielt (Abb. 16).

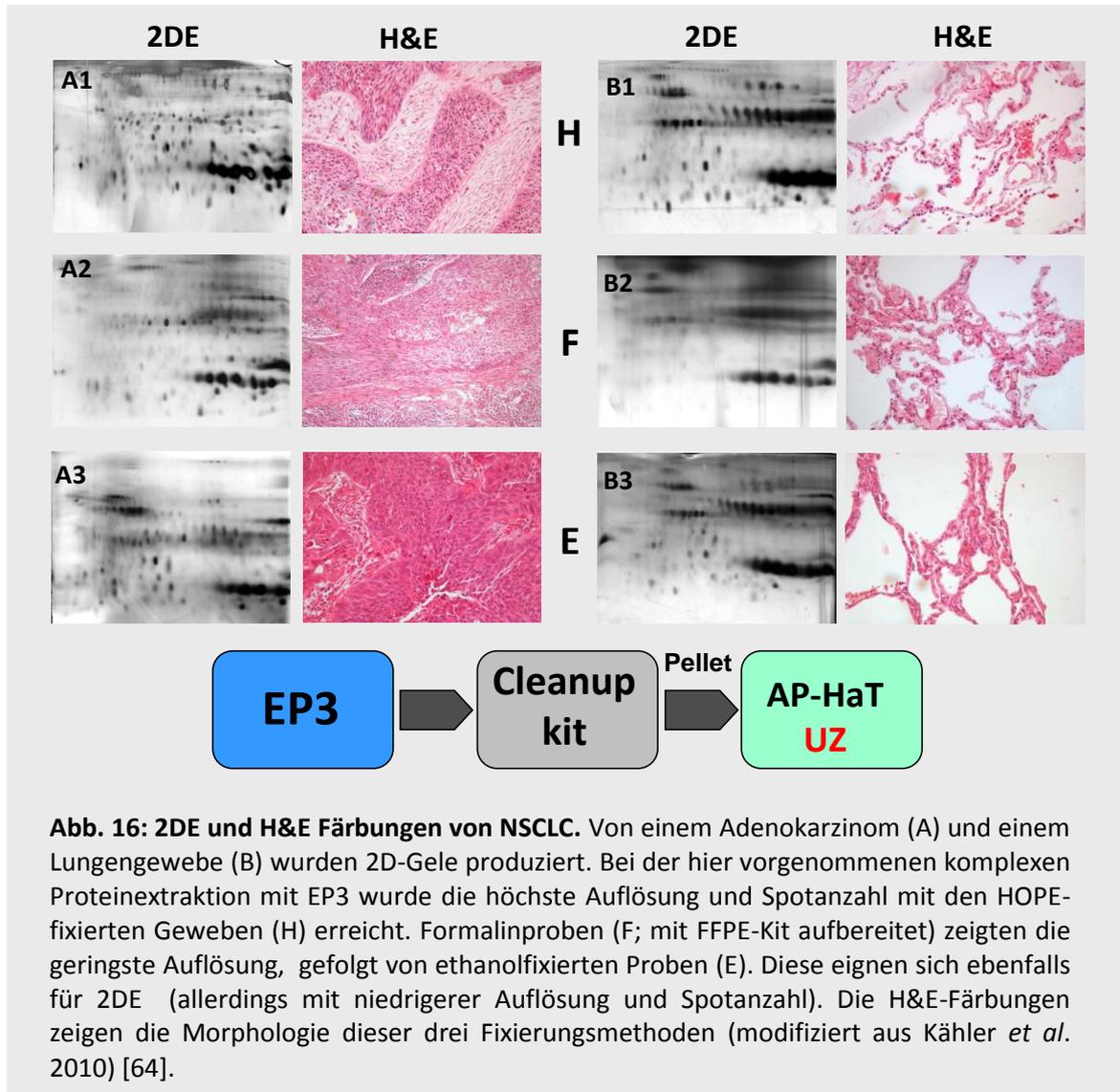
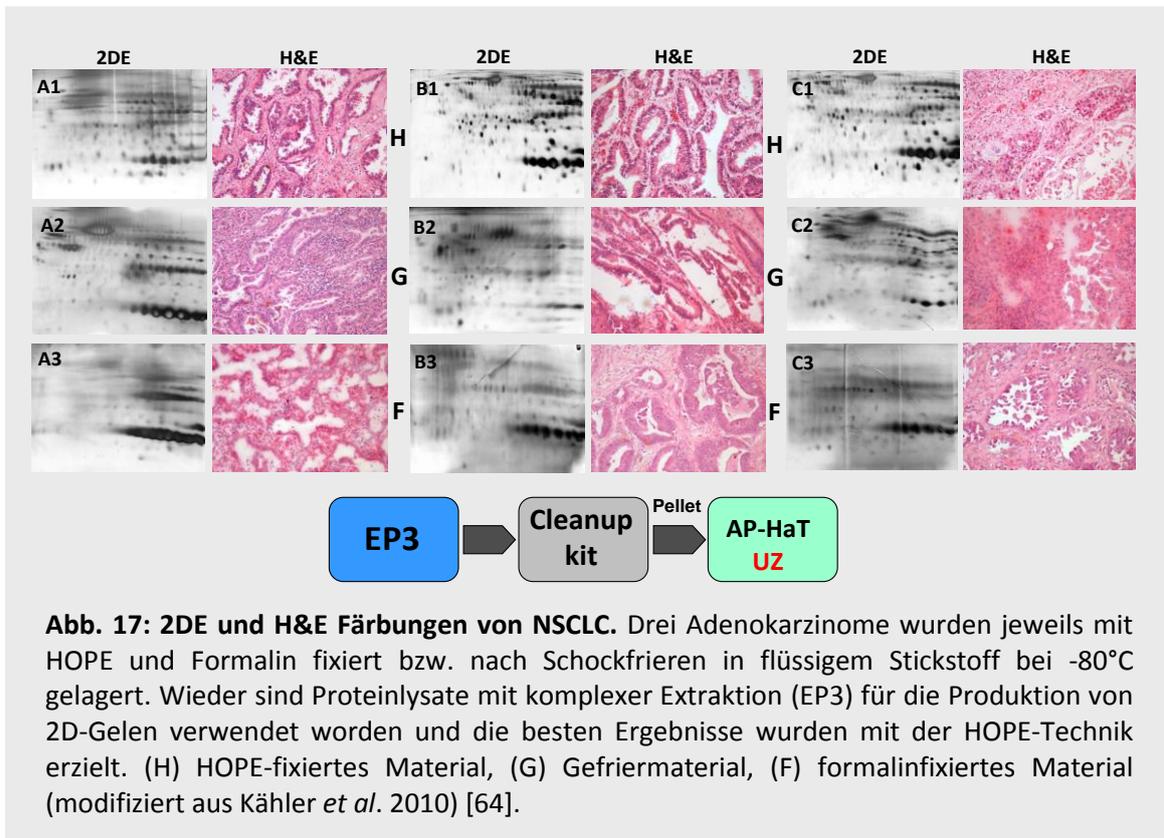


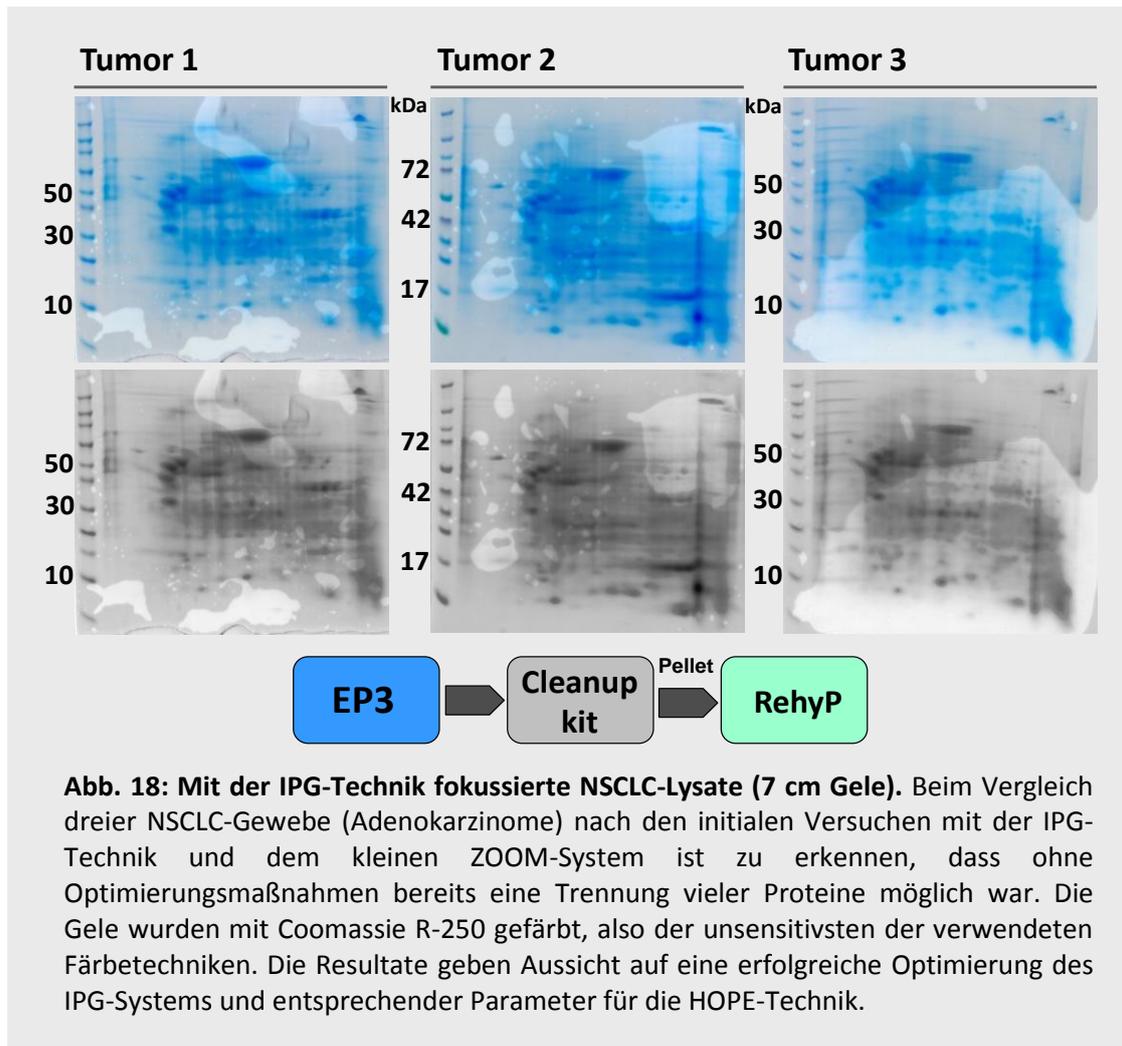
Abb. 16: 2DE und H&E Färbungen von NSCLC. Von einem Adenokarzinom (A) und einem Lungengewebe (B) wurden 2D-Gele produziert. Bei der hier vorgenommenen komplexen Proteinextraktion mit EP3 wurde die höchste Auflösung und Spotanzahl mit den HOPE-fixierten Geweben (H) erreicht. Formalinproben (F; mit FFPE-Kit aufbereitet) zeigten die geringste Auflösung, gefolgt von ethanolfixierten Proben (E). Diese eignen sich ebenfalls für 2DE (allerdings mit niedrigerer Auflösung und Spotanzahl). Die H&E-Färbungen zeigen die Morphologie dieser drei Fixierungsmethoden (modifiziert aus Kähler *et al.* 2010) [64].

Bei den komplexen Extrakten ist an den Gelen ersichtlich, dass die beste Auflösung und Spotanzahl in den Gelen aus HOPE-fixierten Proben erreicht wurde. Wieder können formalinfixierte Proben unter Anwendung des Qiagen FFPE Kits nicht als konkurrenzfähig eingestuft werden. Ethanolfixierte Proben ergaben ebenfalls gute Spotmuster, allerdings wird hier die Morphologie schlecht erhalten. Abb. 17 zeigt weitere Beispiele zum Vergleich komplexer Proteinextraktion mit EP3 anhand von 2DE-Gelen aus drei Adenokarzinomen; jeweils aus HOPE (H)-, Gefrier (G)- und Formalinmaterial (F) produziert.

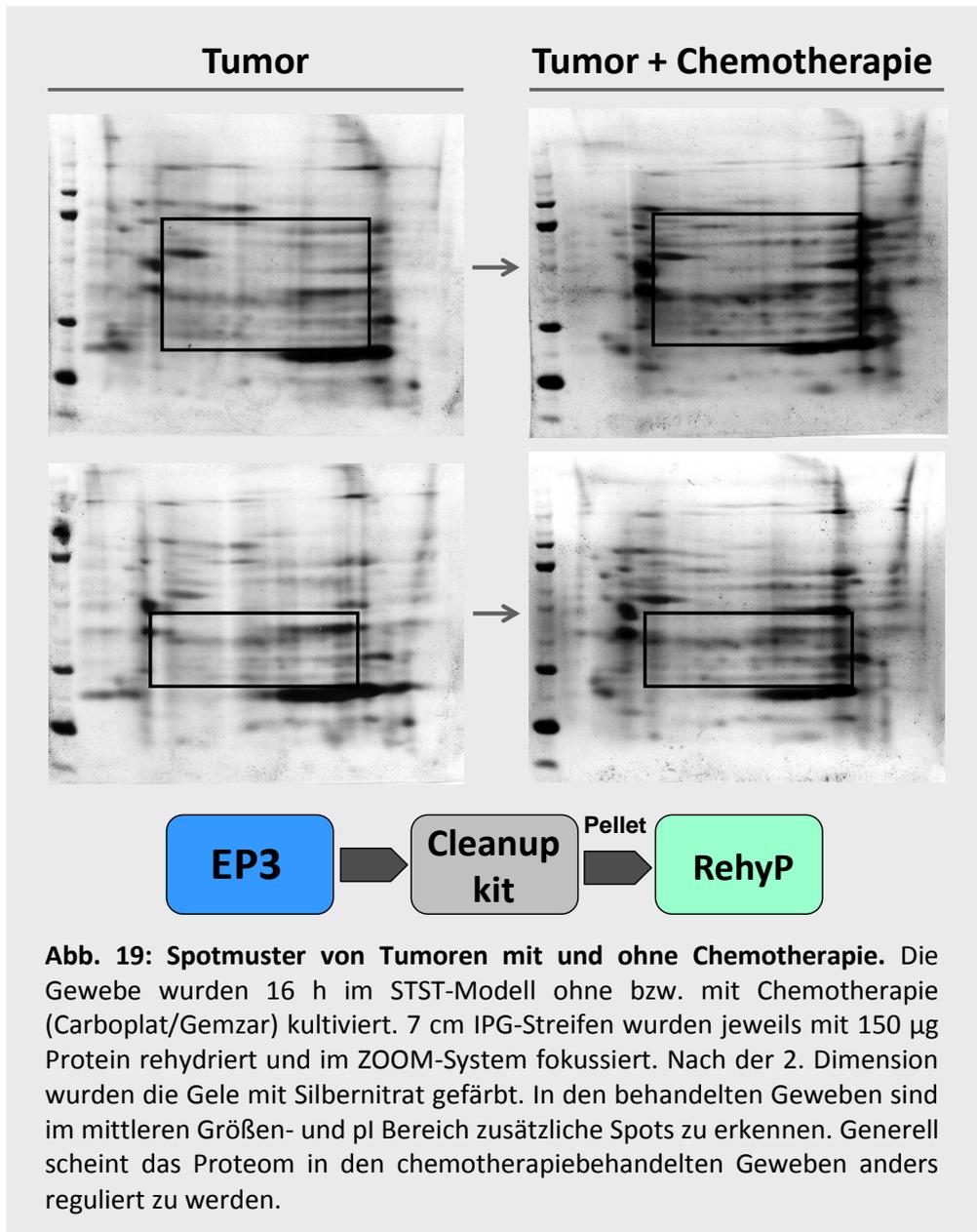


Die Qualität und Reproduzierbarkeit der Gele mit der HOPE-Technik überstieg in allen Fällen die der anderen Fixierungsmethoden. Ethanolfixierte Gewebe wurden mit einbezogen, da in früheren Proteomstudien die gute Verwendbarkeit von ethanolfixierten Proben gezeigt worden ist [6]. Auch hier zeigte die HOPE-Technik hoch aufgelöste und reproduzierbare Muster, die mit formalin- oder ethanolfixierten Geweben nicht erzielt wurden (Abb. 16).

Die initialen Ergebnisse wurden auf ein kleines IPG-System (ZOOM-System) übertragen. Erste Trennungen der Proteinlysate (unter Verwendung von EP3) verschiedener Tumorgewebe und *ex vivo* chemotherapiebehandelter Tumorgewebe zeigten ebenfalls Ergebnisse, die ein Arbeiten mit IPG-Streifen für größer angelegte Studien gut möglich erscheinen ließen (Abb. 18).



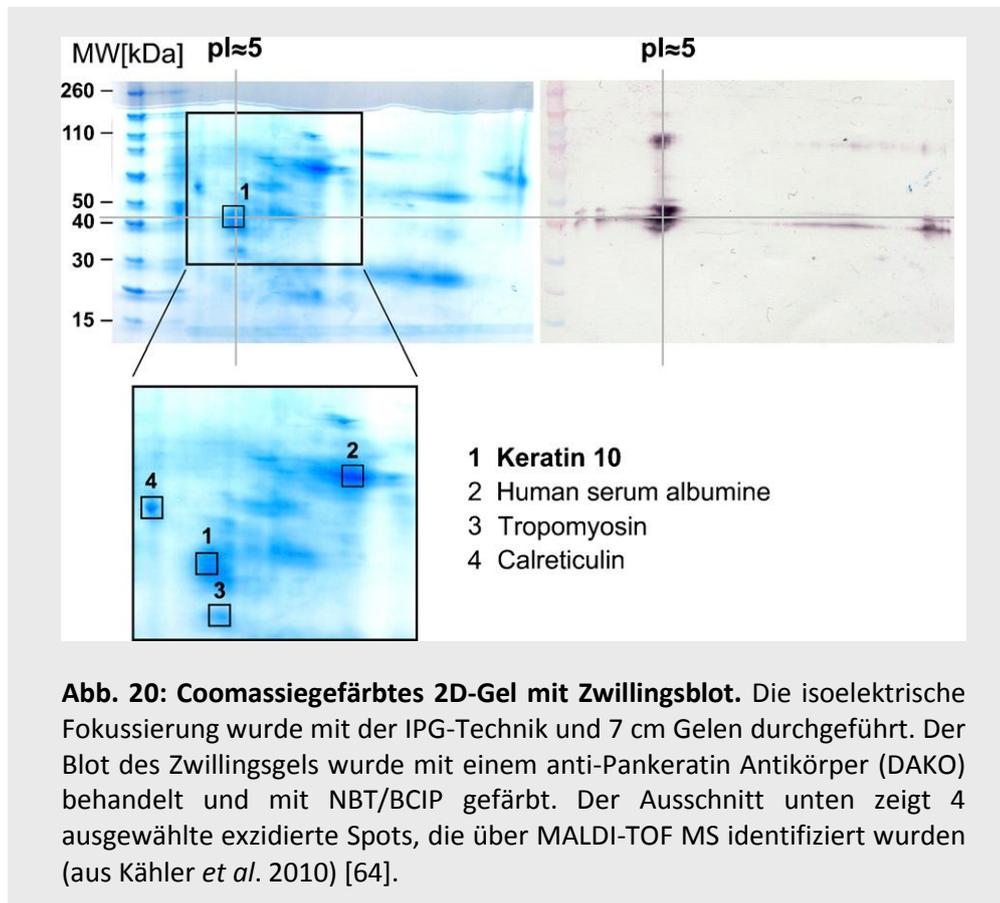
Durch Standardprozeduren ohne vorherige Optimierung waren bereits Unterschiede im Expressionsverhalten zwischen NSCLC-Geweben und chemotherapiebehandelten Geweben aufgefallen (Carboplat/Gemzar-Stimulation in *ex vivo* Gewebekultur), was nach Optimierung der Prozedur und intensiver Analyse von ausreichend 2DE-Daten wichtige Einblicke in mögliche Wirkmechanismen der Genregulation unter Einwirkung einer Chemotherapie eröffnen kann (Abb. 19). Diese Ergebnisse gaben den Anreiz dafür, auch die einfacher zu handhabende IPG-Technik einzubeziehen, sie für HOPE-fixierte Proben optimal auszusteuern und auf das Großgelformat zu übertragen.



3.1.1.2 2D-Western Blot und Massenspektrometrie

Nach Auftrennung und Visualisierung von Proteinen über 2DE sollte eine massenspektrometrische Identifizierung einzelner, aus den Gelen exzidierte Proteinspezies etabliert werden. Die dabei erzielten Ergebnisse bestätigen die Verwendbarkeit HOPE-fixierter NSCLC-Gewebe durch die mit hoher Signifikanz eindeutig identifizierten Moleküle Keratin 10, Humanes Serumalbumin, Tropomyosin und Calreticulin. Abb. 20 zeigt einen 2D-Western Blot, der mit dem

anti-Pankeratinantikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland) behandelt wurde, und das korrespondierende, coomassiegefärbte Zwillingsgel, welches für die massenspektrometrische Analyse herangezogen wurde sowie die Stellen 1 bis 4 im Gel, aus denen die einzelnen Proteinspots exzidiert wurden.



Auf Basis der Massenspektren wurde ein Abgleich mit der Mascot Datenbank (www.matrixscience.com) vorgenommen. Ein dabei generiertes Massenspektrum sowie die Signifikanzangaben der Datenbanksoftware sind in Abb. 21 und 22 zusammengestellt und zeigen für jeden analysierten Proteinspot signifikante Ergebnisse bei den identifizierten Massen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf $p < 0,05$ eingestellt.

Die Möglichkeit zur Identifizierung von Proteinen über MALDI-TOF MS ist somit anhand der vier unterschiedlichen Moleküle nachgewiesen worden. Die Abb. 21 und 22 zeigen das Massenspektrum von Keratin 10 und die Ergebnisse der Mascot Datenbank für verschiedene Proben. Die ausführlichen Daten zur Massenspektrometrie sind im Anhang zu finden.

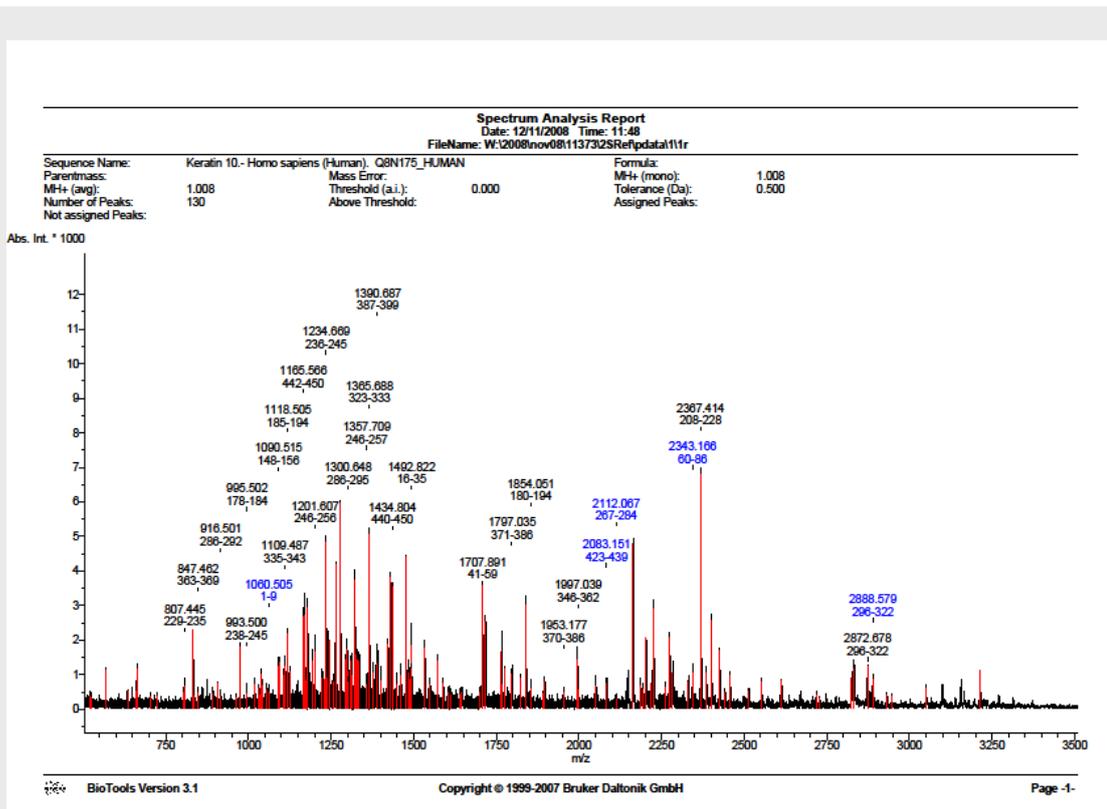


Abb. 21: Massenspektrum von Keratin 10. Der zum Pankeratinblot korrelierende Proteinspot wurde nach Trypsinierung mittels MALDI-TOF MS gemessen und lieferte zu Keratin 10 korrelierende Fragmentmassen (aus [64]).

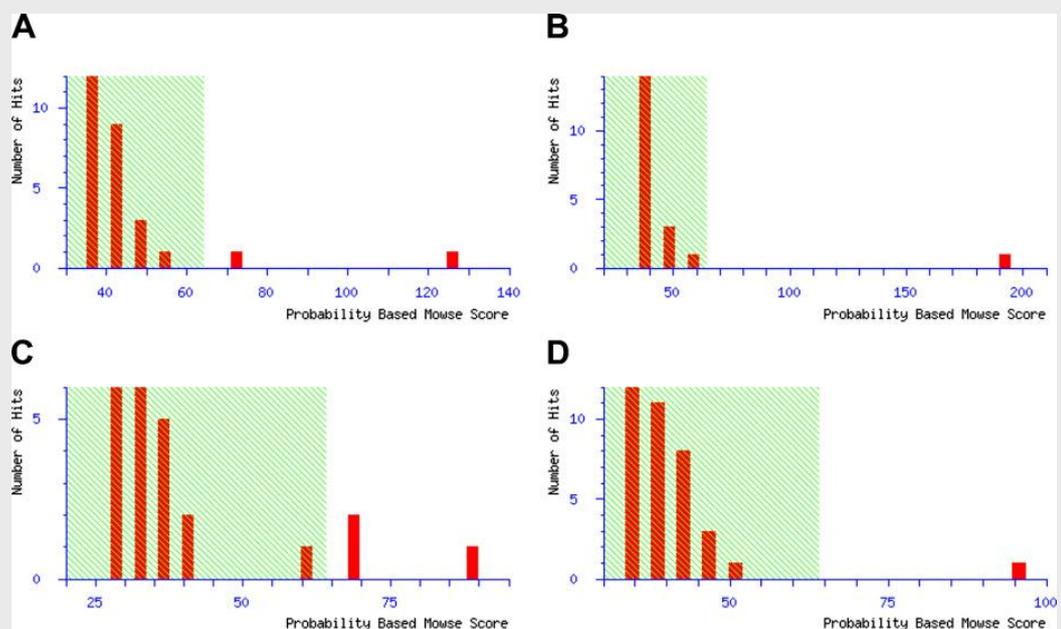


Abb. 22: MOWSE-Scores von MALDI-TOF MS. Für alle exziierten Moleküle war eine signifikante Wahrscheinlichkeitsangabe möglich („Probability-based MOWSE Score“), dass es sich bei den gemessenen Fragmentmassen um Keratin 10 (A), Humanes Serumalbumin (B), Tropomyosin (C) und Calreticulin (D) handelt (aus [64]).

Bei allen exzidierten Spots war eine eindeutige Identifikation möglich. Die Grafen A bis D (Abb. 22) zeigen die Proteinscores verschiedener Moleküle und untermauern die Aussage, dass es sich bei den Fragmentmassen um das jeweils angegebene Protein handelt. Außerhalb der grün schraffierten Fläche ist das Ergebnis signifikant; je weiter es nach rechts rückt und je höher der MOWSE Score Wert steigt, desto sicherer können die gemessenen Fragmentmassen einem Protein zugeordnet werden.

3.1.2 Optimierung von Proteomuntersuchungen an HOPE-fixierten, Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen

Die im Folgenden beschriebenen Etablierungsmaßnahmen beziehen sich auf die Verwendung HOPE-fixierter Gewebe. Der überwiegende Teil der Optimierungsmaßnahmen wurde mit dem Proteansystem durchgeführt und bei Bedarf auf das ZOOM-System übertragen.

3.1.2.1 Entparaffinierung

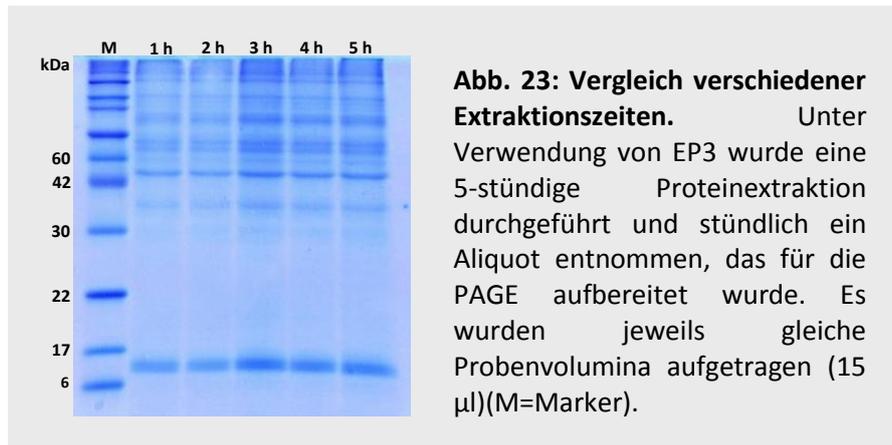
Bei HOPE-fixierten Proben wurden die Proteinausbeuten von Xylol/Ethanol- und Isopropanol/Azeton-Entparaffinierung untersucht (Tab.11). Sowohl die Proteinmengen als auch die Spotmuster, die nach Anwendung beider Methoden resultierten, wurden verglichen. Die Entparaffinierung bei HOPE-fixierten Geweben sollte mit Isopropanol und Azeton erfolgen, um denaturierende Einflüsse bei der Entparaffinierung zu vermeiden (Ethanol selbst ist ein präzipitierendes Agens). Die Spotmuster waren vergleichbar und zeigten bei den Isopropanol/Azeton-entparaffinierten Proben weniger Hintergrund.

Tab. 11: Vergleich der Proteinmengen nach unterschiedlicher Entparaffinierung.

Entparaffinierung	Tumor 1	Tumor 2	Tumor 3	Tumor 4
Xylol/Ethanol	396 µg/ml	434 µg/ml	412 µg/ml	576 µg/ml
Isopropanol/Azeton	418 µg/ml	527 µg/ml	376 µg/ml	603 µg/ml

3.1.2.2 Proteinextraktion

Die Extraktion von Proteinen wurde für 5 verschiedene Puffervarianten vergleichend untersucht (2.2.3). Die resultierenden Proteinkonzentrationen wurden verglichen und begründen die Auswahl von EP3 als Standard-EP, wenn eine Präzipitierung der Proteine vorgenommen wurde (im Vergleich zur Probenvorbereitung mit Extraktion direkt in RehyP bzw. Fokussierungspuffer, s. u.). Ein Vergleich der Proteinbanden nach 1 bis 5 h Extraktion bei Raumtemperatur unter Verwendung von EP3 wurde mittels PAGE untersucht (Abb. 23).

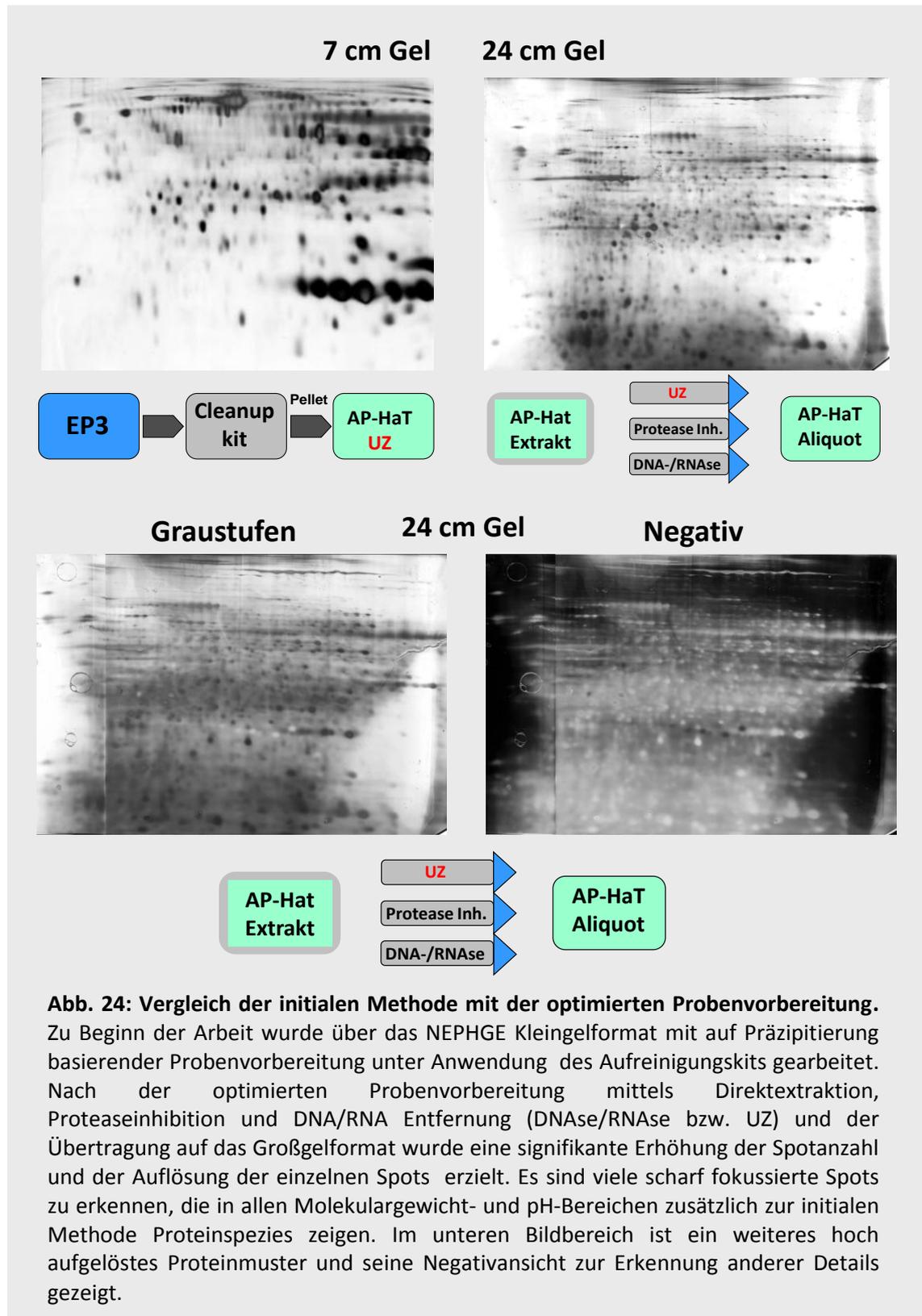


Wie an den Bandenintensitäten zu erkennen ist, erhöht sich die Proteinmenge bis 3 h Extraktionszeit und zeigt bei Coomassiefärbung auch nach längerer Extraktionszeit keine stärkeren Banden, sodass eine Extraktionszeit von 3 h bei RT als Standardprozedur festgelegt wurde.

3.1.2.3 Rehydrierung/Probenvorbereitung

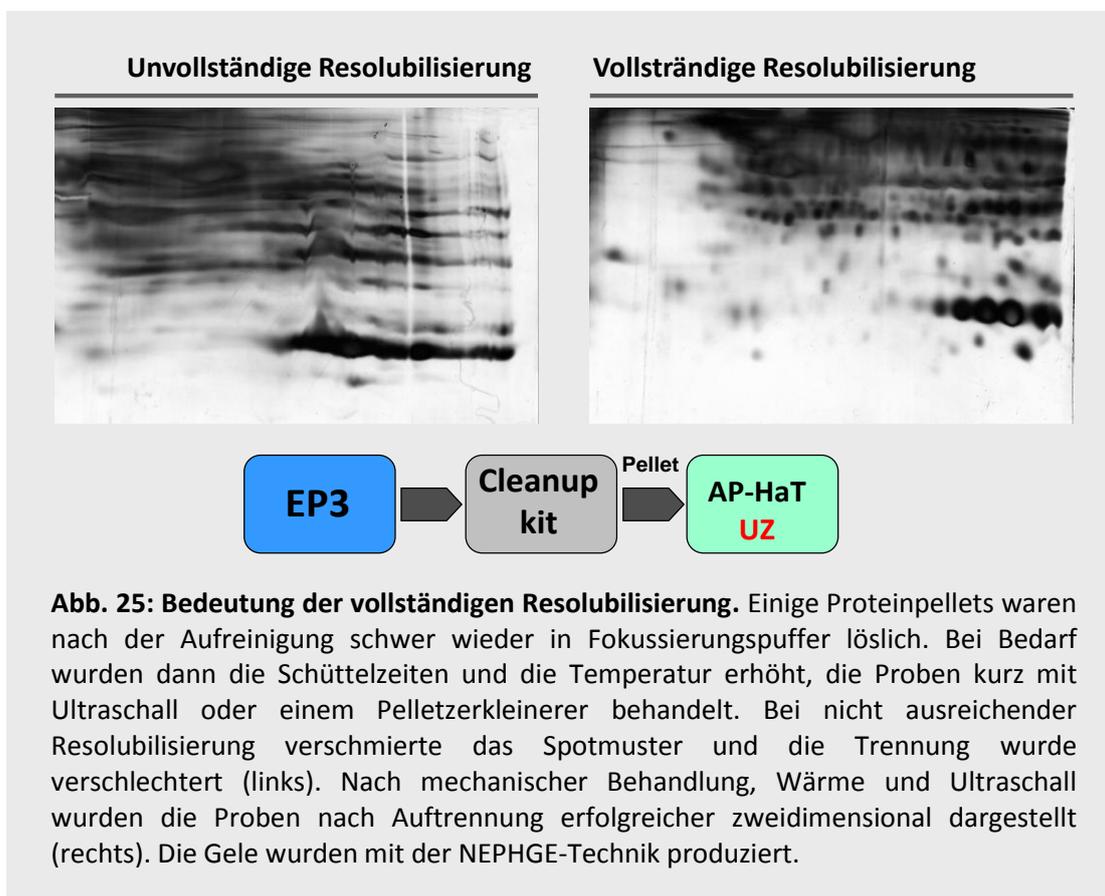
Nach Betrachtung der unterschiedlich produzierten Gele wurde die optimierte Probenvorbereitung mit Rehy-Extrakten bzw. AP-HaT Extraktion zur Basis eines Standardprotokolls. Die Vermeidung jeglicher Präzipitierung und Aufreinigung von Gesamtproteinextrakten und stattdessen eine Behandlung mit DNase, RNase oder UZ (30 min, 50000 x g) und Proteaseinhibitorbehandlung führten zur höchsten Auflösung mit vielfach erhöhter Spotanzahl. Generell war die Ausbeute bei allen selbst angesetzten Präzipitierungen gering; in einigen Fällen wurde auch bei längerer Inkubation keine oder nur eine partielle Fällung erreicht. Während bei der Anwendung des Aufreinigungskits stets ähnliche Proteinmengen resultierten, schwankten die Proteinmengen nach eigenen Fällungen auch bei gleichen Proben stark. Daher wurde für Präzipitierungen stets das Aufreinigungskit benutzt.

Über Direktextraktion ließen sich ausreichend hohe Proteinmengen für 2DE extrahieren. In den Spektren der gefärbten Proteome in den Gelen war des Weiteren zu erkennen, dass Proteine über den gesamten pH-Bereich und in allen Massenbereichen des Gels hochauflösend und reproduzierbar darstellbar sind (Abb. 24) und die Spotanzahl vervielfacht wurde. Bei formalinfixiertem Material war diese Art der Probenvorbereitung aufgrund der zu neutralisierenden Quervernetzung nicht möglich. Abb. 24 zeigt mit der NEPHGE-Technik aufgetrennte Proteine vor und nach der Optimierung.

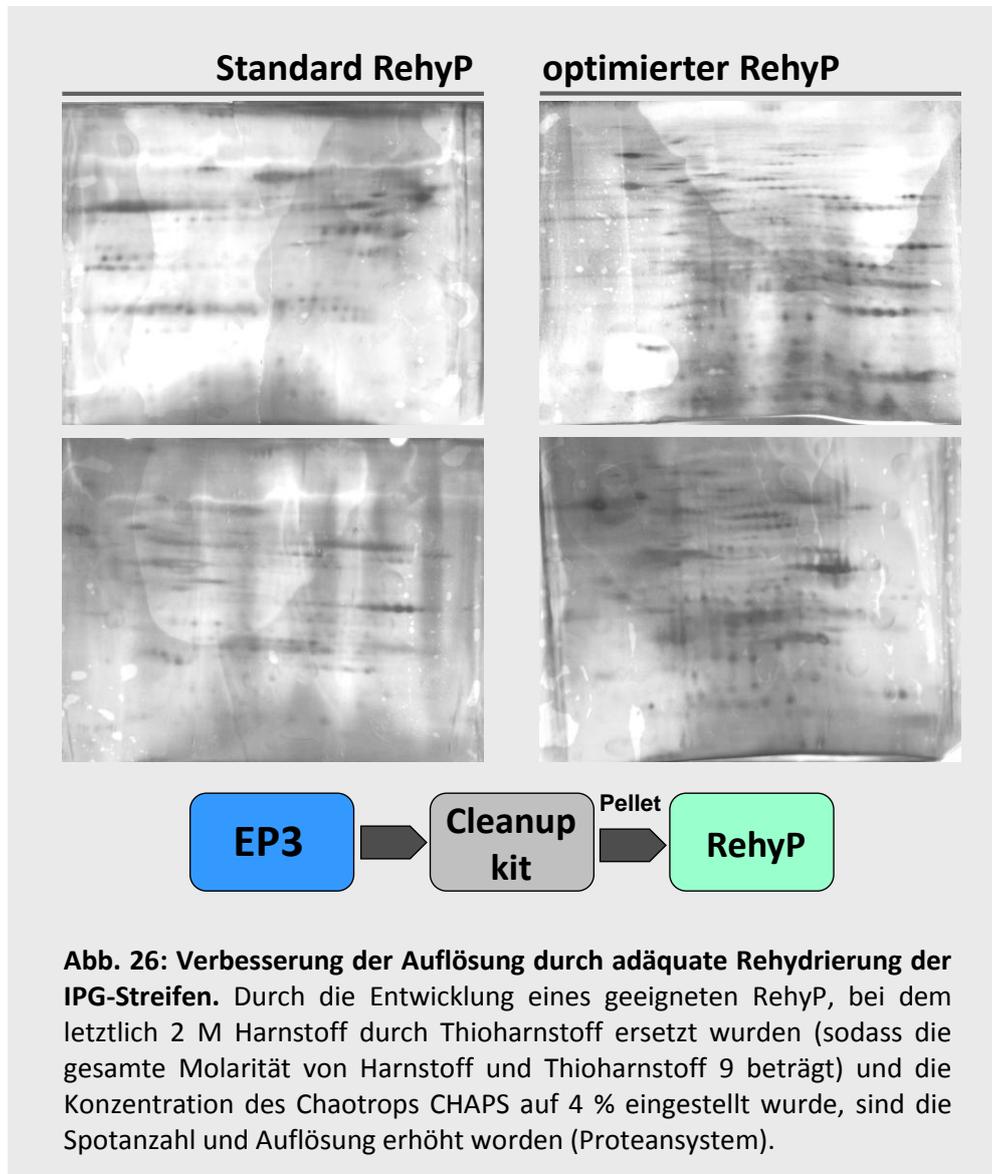


Nachdem durch selbst angesetzte Präzipitierungen mit TCA, TCA/Azeton, Azeton und Chloroform/Methanolfällung meist keine ausreichenden und vor allem häufig sehr unterschiedliche Proteinmengen gewonnen wurden (und daher eine

Standardisierung nicht möglich war), sind die Fällungsreaktionen ausschließlich mit dem Aufreinigungs-kit durchgeführt worden. Die Resolubilisierung von Pellets stellte sich als unterschiedlich aufwendig heraus und beinhaltete je nach Bedarf Schütteln, Erwärmen, Ultraschall oder einen Pellet-Zerkleinerer (2.3.2.3). In ca. 50 % der Fälle war ein Schütteln bei RT für 1 h ausreichend, in den anderen Fällen wurden die weiteren Maßnahmen nach und nach durchgeführt. Selbst bei Anwendung aller Maßnahmen wurde in einigen Fällen keine vollständige Resolubilisierung der Pellets erreicht, was zu einer geringeren Ausbeute separierter Proteine führte, die Trennung verschlechterte und viel Hintergrund in den Gelen produzierte (Abb. 25).



Der Vergleich verschiedener RehyP's (Tab. 7) lieferte die Information, dass die Verwendung von 2 M Thioharnstoff mit 7 M Harnstoff und eine Konzentration von 4 % CHAPS die beste Löslichkeit der Pellets bedingte und daher zu einer erhöhten Anzahl separierbarer Proteine führte. Außerdem wurde festgestellt, dass bei adäquater Rehydrierung (Pufferzusammensetzung und Rehydrierungszeit) der Hintergrund verringert und die Auflösung verbessert wurden (Abb. 26).



Obwohl die Auswahl eines geeigneten RehyP die Löslichkeit der Pellets verbesserte, lieferte die Präzipitierung insgesamt keine zufrieden stellenden Ergebnisse.

Zur Minimierung von Proteinverlusten wurde daher die Direktextraktion in modifizierte Fokussierungspuffer oder RehyP's entwickelt. Dabei wurden die IEF störenden Substanzen wie Zelldebris, Nukleinsäuren, Lipide etc. entfernt. Neben DNase und RNase kann die Entfernung von Nukleinsäuren mit UZ vorgenommen werden. Sie gehört sicherlich zu den wichtigsten Schritten im Standardprotokoll für 2DE; die Verbesserung der Auflösung von Proteinen im hochmolekularen Bereich

(siehe Ausschnitte) und der Sauberkeit der Gele bei der IPG-Technik zeigt Abb. 27.

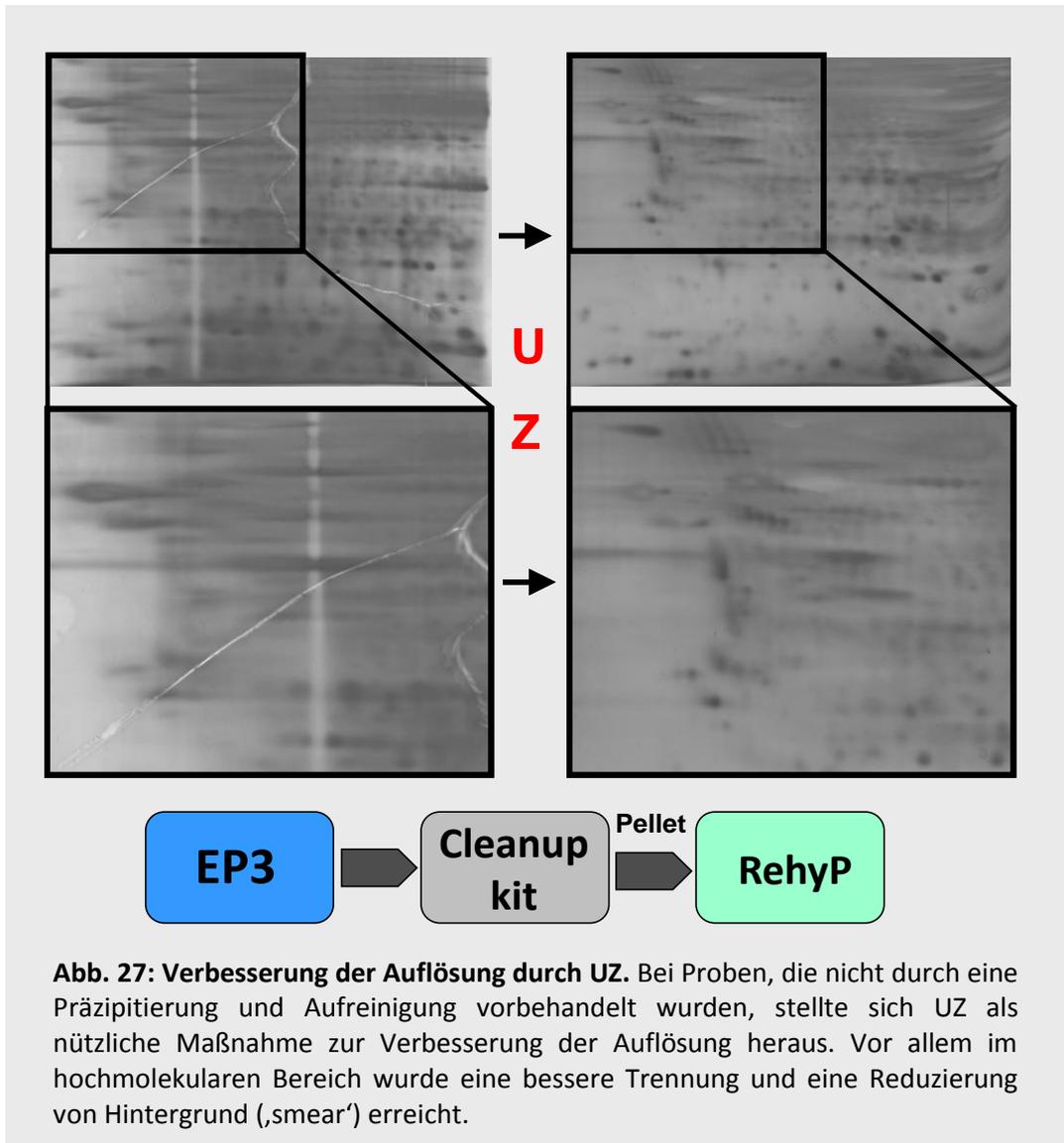
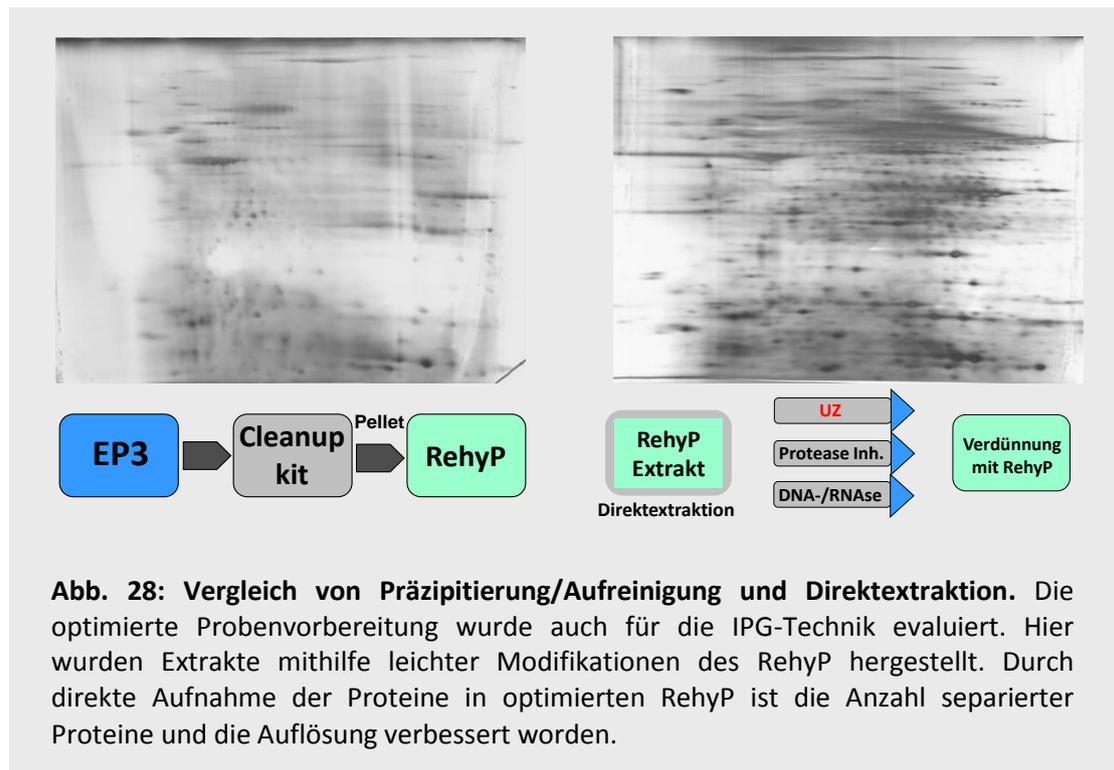
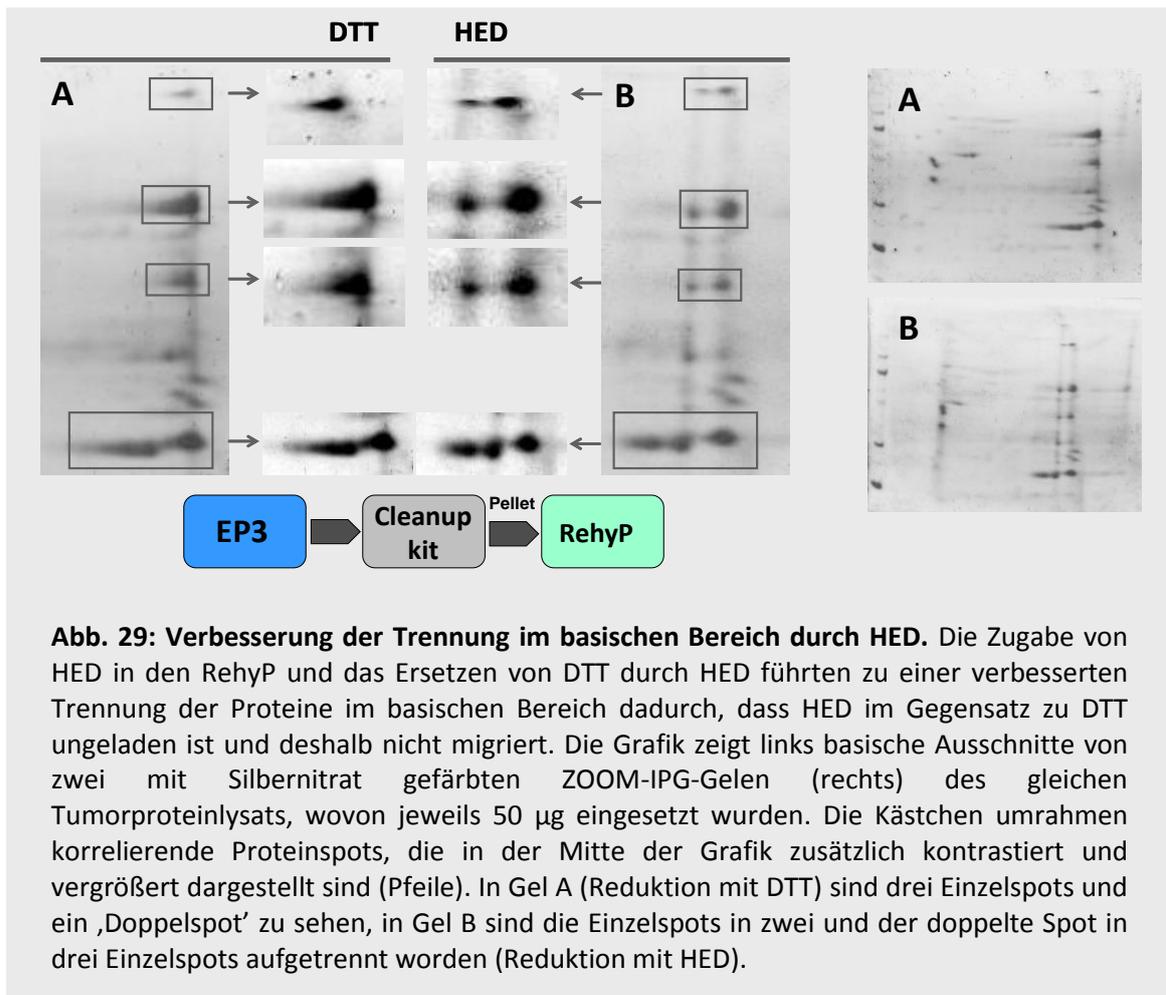


Abb. 27: Verbesserung der Auflösung durch UZ. Bei Proben, die nicht durch eine Präzipitierung und Aufreinigung vorbehandelt wurden, stellte sich UZ als nützliche Maßnahme zur Verbesserung der Auflösung heraus. Vor allem im hochmolekularen Bereich wurde eine bessere Trennung und eine Reduzierung von Hintergrund („smear“) erreicht.

HOPE-fixierte Gewebe können durch sorgfältige Aufbereitung der Lysate auch ohne Präzipitierung und Waschen von Proteinpellets gut für 2DE-Analysen aufbereitet werden. Dies wurde zuerst mit der NEPHGE-Technik evaluiert. Bei der Übertragung der Methode auf die IPG-Technik sind ähnliche, wenn auch nicht ganz so deutliche Effekte erzielt worden und die Auflösung wurde erhöht. Wie bei der NEPHGE-Technik sind ebenfalls stark erhöhte Anzahlen separierter Proteine erreicht worden (Abb. 28).



Die Zugabe von Hydroxyethyldisulfid (HED) und das Ersetzen von DTT durch HED im RehyP führten zu einer verbesserten Trennung der Proteine im basischen Bereich (Abb. 29). Bei gleichzeitiger Verwendung von DTT und HED wurde dieser Effekt ebenfalls beobachtet.

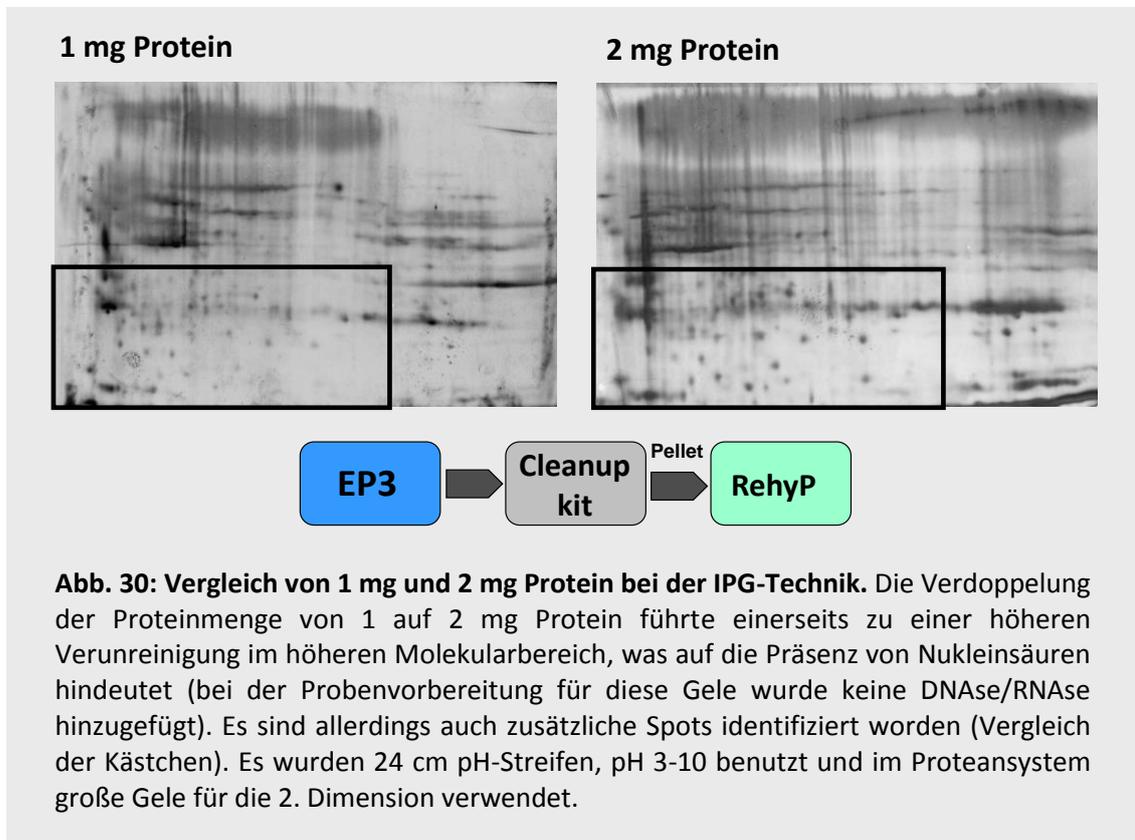


3.1.2.4 Fokussierungsbedingungen

Die Fokussierungsparameter bei der NEPHGE-Technik sind von der WITA GmbH determiniert und auf die verwendeten Reagenzien (Kathoden-/Anodenpuffer, Carrierampholytmischung, Gelmatrix) abgestimmt. Sie bedürfen daher keiner weiteren Optimierung (2.3.2.4).

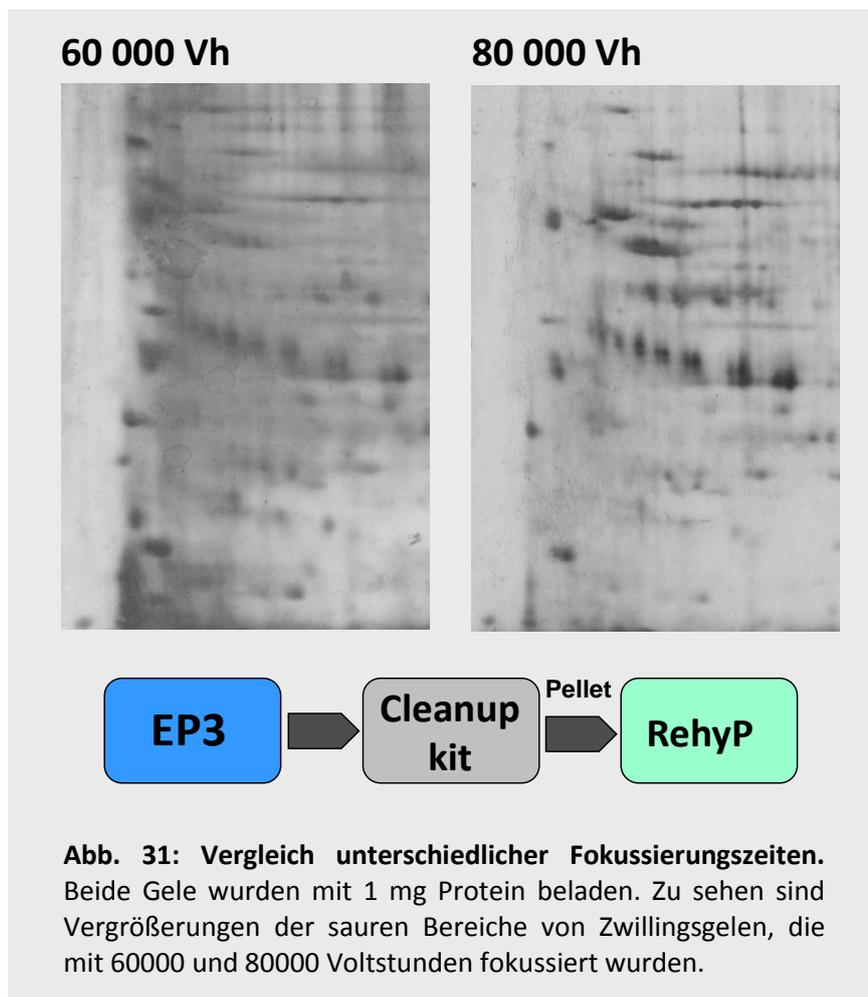
Bei der IPG-Technik sind nach ausgiebigen empirischen Ermittlungen verschiedene Fokussierungsparameter für die verwendeten Proben herausgearbeitet worden, die im Folgenden an einigen Beispielen erläutert werden. Beurteilt wurden die Spotanzahl und die Auflösung der gefärbten Proteine im Gel sowie die Hintergrundintensität. Die Proteinmenge stellte dabei einen Hauptparameter dar, auf dessen Basis die weiteren Parameter wie Spannungsverläufe und angelegte Voltstunden ermittelt wurden. Abb. 30 zeigt zwei Gele mit 1 bzw. 2 mg Protein, die unter Verwendung von 24 cm IPG-Streifen

mit dem selbst entwickelten Fokussierungsprogramm (2.3.2.4) fokussiert wurden (80 000 Voltstunden).



Wie aus Abb. 30 ersichtlich, erhöht sich bei doppelter Proteinmenge der Grad an Hintergrund im Gel („smear“). Die zu erkennenden Spots sind intensiver, und es konnten vor allem im niedermolekularen Bereich einige zusätzliche Spots identifiziert werden (Kästchen). Vorhandene Spots erscheinen zugleich intensiver.

Bei der Ermittlung der optimalen Voltstunden, die bei der IEF angelegt wurden, ist derjenige Wert zu ermitteln, bei dem alle Proteine ihren isoelektrischen Punkt (Nettoladung Null) erreicht haben und nicht weiter migrieren. In Abb. 31 sind zwei Ausschnitte des gleichen pH-Bereichs zweier 2D-Gele zu sehen, die den Effekt der Unterfokussierung durch Gegenüberstellung mit dem Ergebnis bei ausreichend langer Fokussierung verdeutlichen (Proteansystem).



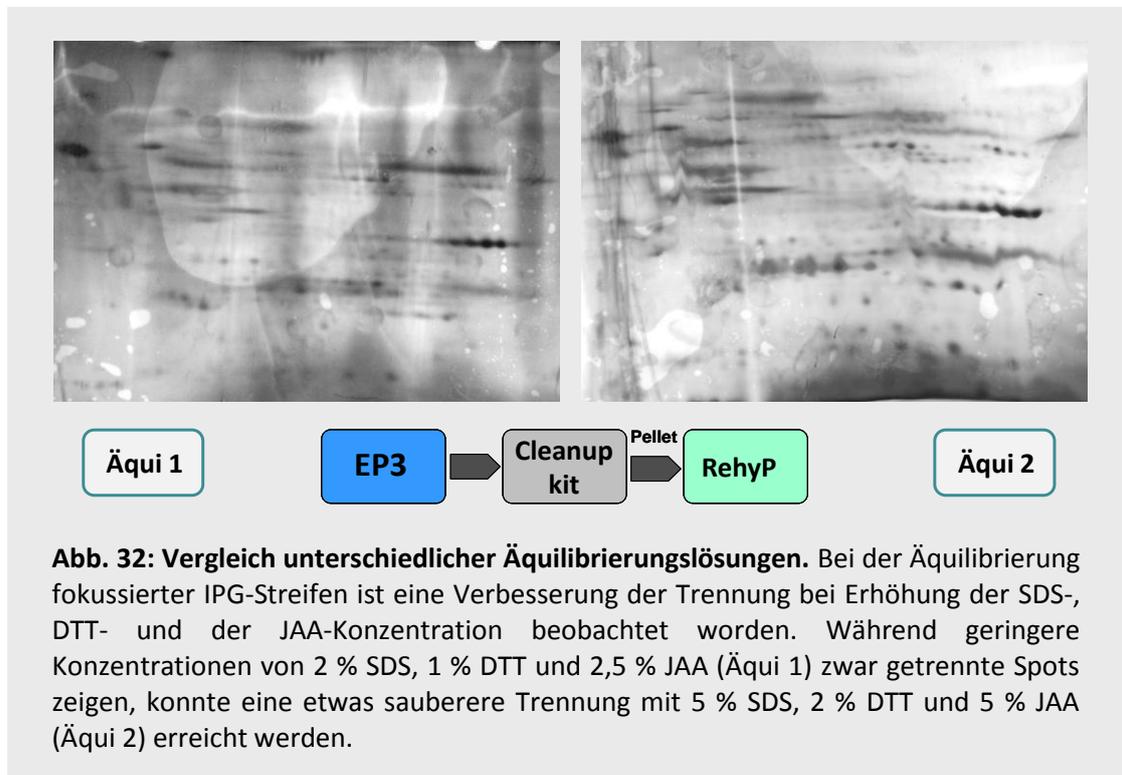
3.1.2.5 Äquilibration

Bei der NEPHGE-Technik ist die Zusammensetzung des Äquilibrationpuffers durch den Hersteller festgelegt, hier wurden die Kapillargele generell 15 min äquilibriert.

Bei der IPG-Technik wurden die Konzentrationen von DTT, JAA und SDS variiert (2.3.2.5). Die Ermittlungen der einzelnen Konzentrationen führten zur Verwendung von 2 % DTT bzw. 5 % JAA und 5 % SDS in 6 M Harnstoff und 30 % Glycerin. Es wurde jeweils 15 min mit DTT und darauf folgend 15 min mit JAA äquilibriert. Die Verlängerung der Äquilibrationzeiten auf 20 min veränderten die Ergebnisse nicht.

Die Äquilibration mit 1 % DTT, 2,5 % JAA und 2 % SDS und damit verglichen optimierte Werte von 2 % DTT, 2,5 % JAA und 5 % SDS jeweils in 6 M Harnstoff

und 30 % Glycerin wurden schließlich ins Standardprotokoll übernommen. Die Veränderung der Separation bei optimierter Äquilibration zeigt Abb. 32.



3.1.2.6 PAGE

Die Durchführung der zweiten Dimension sowohl mit der IPG- als auch mit der NEPHGE-Technik zeigte, dass jede Art fokussierter Gele auf beliebige PAGE-Gele passender Größe transferiert werden können und keine Unterschiede bei den Ergebnissen (Färbungen) zu erkennen waren.

3.1.2.7 Färbung von Gelen

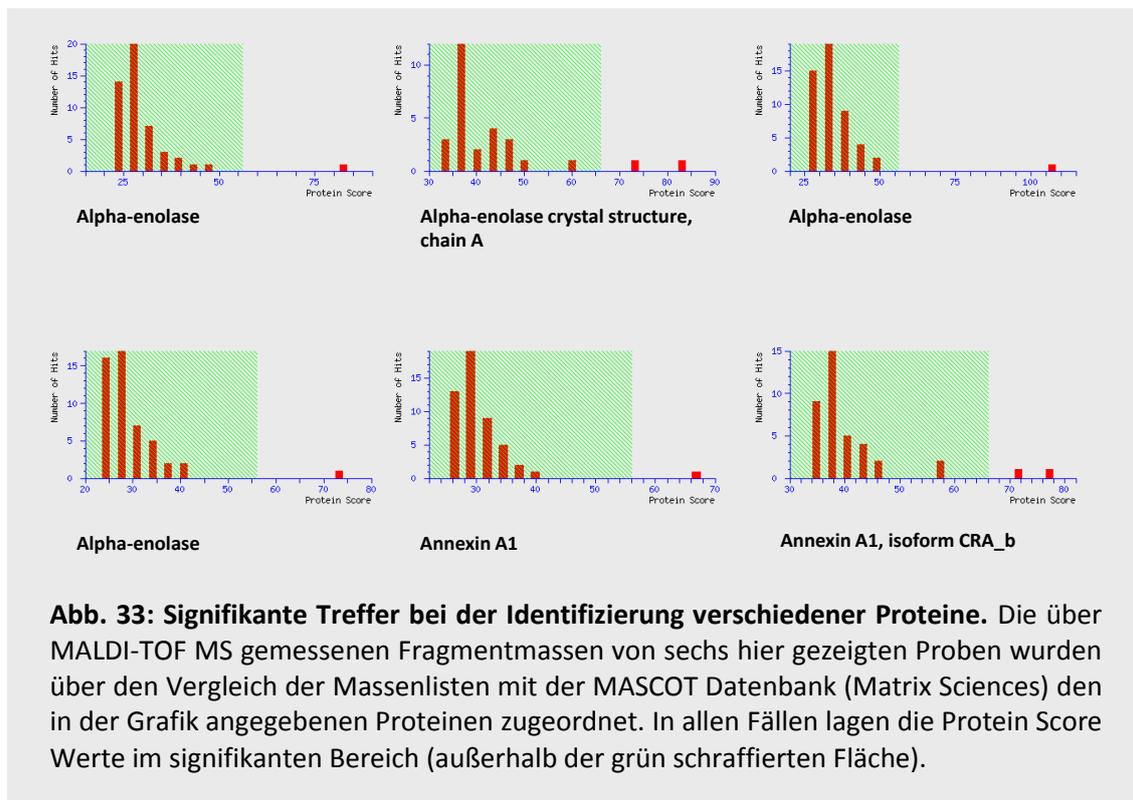
Aus HOPE-fixierten (Lungen)geweben abgeleitete 2D-Gele ließen sich mit jeder gängigen Färbemethode (Coomassie R-250, Kolloidales Coomassie G-250 und Silbernitrat) anfärben.

3.1.3 2D-Western Blot

Die Ergebnisse der 2D-Western Blot Pankeratinfärbung aus den initialen Untersuchungen belegten die Verwendbarkeit von HOPE-fixierten (Lungen)geweben für das Western Blot Verfahren (3.1.1.2). Weitere Ergebnisse, die mithilfe der 2D-Blot Technik erzielt wurden, sind in 3.2 beschrieben.

3.1.4 MALDI-TOF MS

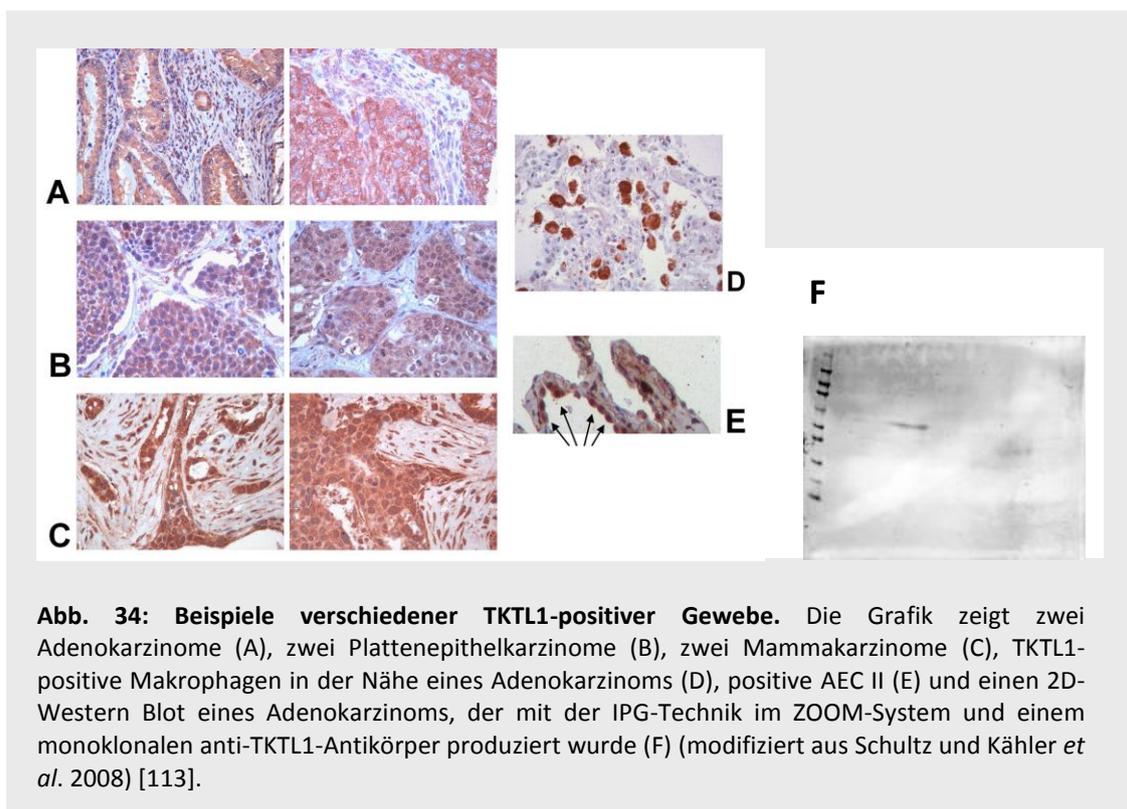
Die Verwendbarkeit HOPE-fixierter Gewebe für massenspektrometrische Analysen ist bereits zu Beginn der Studie gezeigt worden (Kähler und Alexander *et al.* 2010) [64]. Im Verlauf der Optimierung der 2D-Technik wurden weitere Moleküle über MALDI-TOF MS identifiziert. Durch Exzision zusätzlicher Spots aus IPG-Gelen und zur Evaluierung der Durchführbarkeit mit der NEPHGE-Technik wurden ebenfalls als signifikant identifizierte Proteine gefunden. Abb. 33 zeigt die Protein Scores für verschiedene analysierte Spots, die in allen Fällen im signifikanten Bereich liegen.



3.2 Validierung von Biomarkern

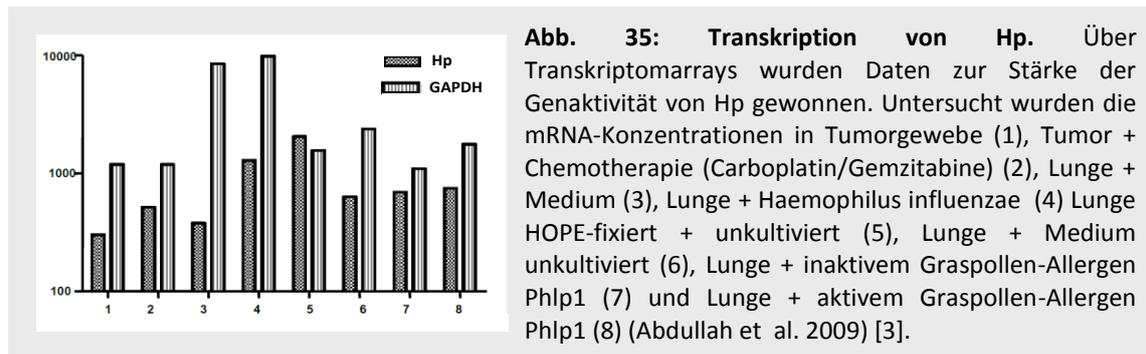
3.2.1 TKTL1

Die TKTL1-Expression in Lungenkarzinomgeweben wurde mit einem Scoringsystem von 1+ bis 3+ bewertet. 40,9 % der Tumoren exprimierten TKTL1 schwach (Score 1+), 28,6 % moderat (Score 2) und 17,1 % stark (Score 3). 3 Tumoren waren TKTL1-negativ (Score 0). Bei den Brustkrebsgeweben waren alle Gewebe TKTL1-positiv und wurden mit Score 1 (32 %), Score 2 (36 %) und Score 3 (32 %) bewertet. Sowohl in den Tumorzellen, als auch in Alveolarmakrophagen und AEC II ist eine Expression von TKTL1 nachgewiesen worden. Abb. 34 zeigt Beispiele der analysierten Zell- bzw. Gewebetypen mit positiven Signalen (rote AEC-Färbung) sowie einen 2D-Western Blot mit TKTL1-Signal.

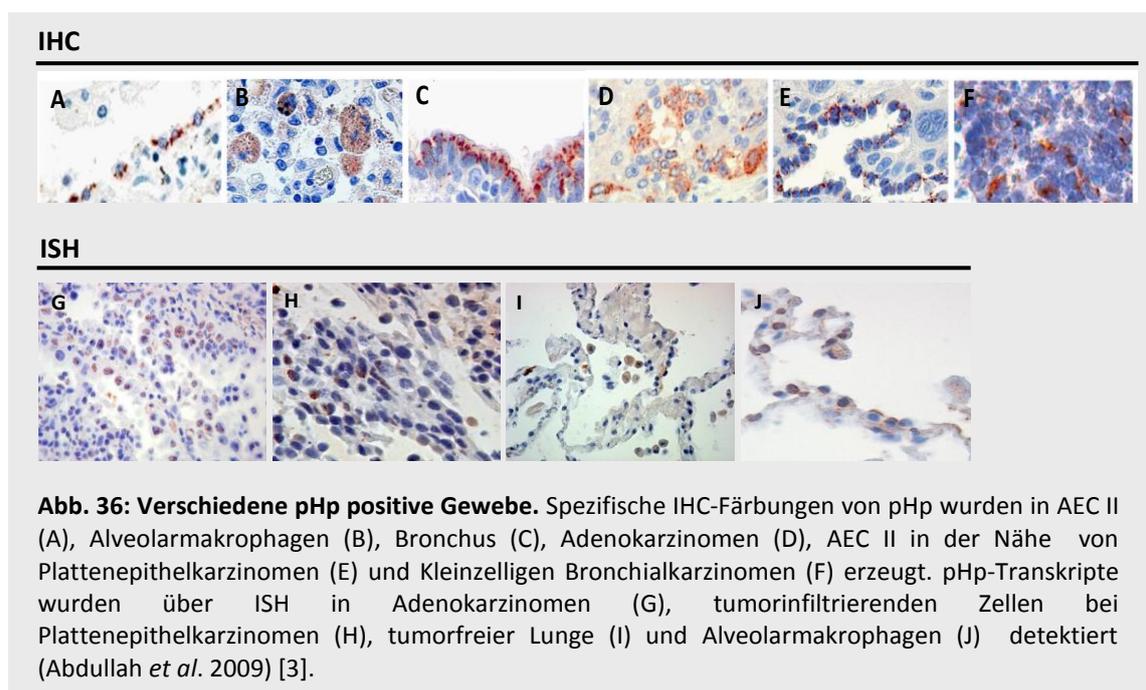


3.2.2 pHp

Transkriptomdaten aus verschiedenen stimulierten Lungen- und Tumorgeweben (Abb. 35) veranlassten genauere Untersuchungen von Hp auf Protein- und mRNA Ebene. Insgesamt drei veröffentlichte Studien von Dr. Abdullah *et al.* [1-3] beschreiben neue und wichtige Informationen über die Funktion und den Ursprung des entdeckten pHp in der menschlichen Lunge.

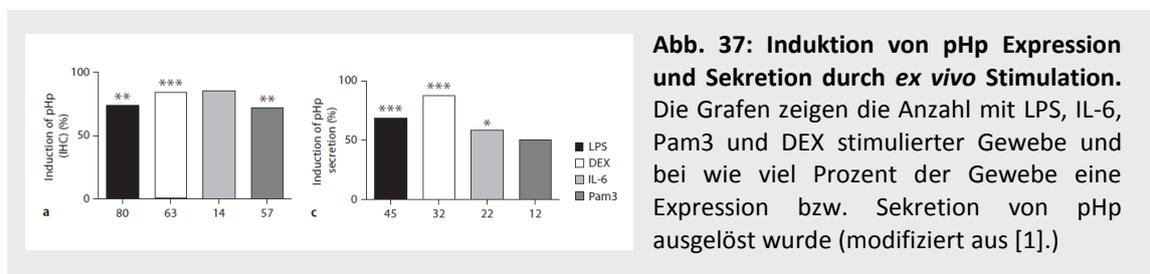


Die Ergebnisse der ersten Studie belegen eine erhöhte Expression von pHp in Adenokarzinomen (40,4 % von 88 Fällen) und in AEC II in der Umgebung von Plattenepithelkarzinomen (19 % der Fälle). Die 13 untersuchten Kleinzelligen Karzinome zeigten in zwei Fällen pHp Expression (15,4 %). Tumorfremie Lungengewebe hingegen zeigten eine rege Expression von pHp in Alveolarmakrophagen (100 %) und AEC II, Bronchuszellen zeigten seltener Färbungen (jeweils vier Fälle, Abb. 36).



Untersuchungen auf mRNA-Ebene, über ISH (Abb. 36) und RT-PCR (nicht gezeigt) belegten die pulmonale Transkription und somit eine Variante des Hp-Moleküls, das nicht in der Leber synthetisiert wird. Dies legt eine immunmodulatorische Funktion von pHp als Teil des Abwehrmechanismus der Lunge nahe [3, 4].

Die zweite Studie zu pHp beschreibt die immunologischen Funktionen des Moleküls in tumorfreien, menschlichen Lungengewebe, in denen intensiv die Expression von pHp und seinem Rezeptor CD163 in dem *ex vivo* Kulturmodell STST untersucht wurde. Es wurde eine induzierte Expression und eine Sekretion nach Stimulation mit verschiedenen Stimulanzen gezeigt (Abb. 37).



Bei der Stimulation von A549-Zellen mit Hp Protein und bei Kostimulation mit Hp und LPS ist eine erhöhte Expression der löslichen chemischen Lockstoffe MCP-1 und IL-8 gemessen worden. Des Weiteren wurden von Monozyten abstammende Makrophagen mit 10 µg/ml Hp Protein stimuliert und die Abgabe von TNF-α, IL-6 und MCP-1 ins Kulturmedium durch CBA-Analysen nachgewiesen.

Sowohl über ISH, als auch über RT-PCR und Real-Time PCR ist ein Nachweis von pHp Transkripten erbracht worden, nachdem die Gewebe mit den in Abb. 37 genannten Substanzen stimuliert wurden [1, 4].

Schließlich wurde in einer dritten Studie die Relevanz von pHp als krankheitsrelevanter Biomarker untersucht. Das Ergebnis immunhistochemischer Untersuchungen von 119 formalinfixierten NSCLC (72 Adenokarzinome, 47 Plattenepithelkarzinome) ergab pHp Expression in 48,6 % der Adenokarzinome. Beispiele positiver Adenokarzinome und ein Vergleich der Spezifität mit anderen wichtigen NSCLC-Markern zeigt Abb. 38.

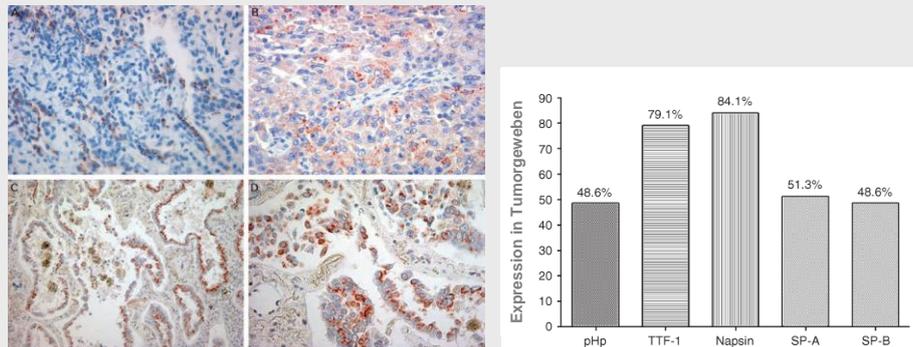
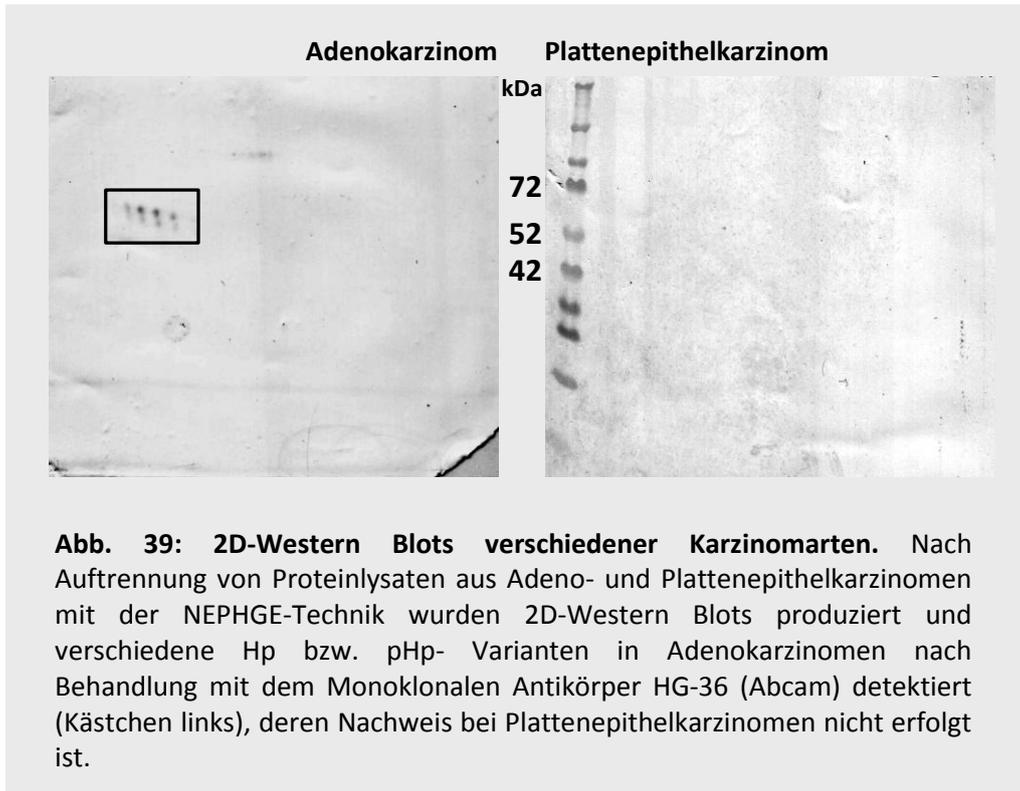


Abb. 38: Vergleich von pHp mit wichtigen Markern für Adenokarzinome.

Links sind vier pHp-positive Adenokarzinome abgebildet, rechts ist ein Vergleich der Expressionshäufigkeit von pHp in Tumorgewebe (48,6 %) mit den Markern TTF-1 (79,1 %), Napsin (84,1 %), SP-A (51,3 %) und SP-B (48,6 %) gezeigt. Aufgrund der hohen Spezifität ist pHp trotz geringerer Sensitivität als TTF-1 diagnostisch nützlich, die Sensitivität ist mit SP-A und SP-B vergleichbar. Die Ergebnisse der dritten pHp-Studie belegen eine zu den Markern SP-A und SP-B vergleichbare Sensitivität, beide gelten als hochspezifische Marker für Adenokarzinome, allerdings mit geringerer Sensitivität als TTF-1 – dasselbe gilt somit für pHp (modifiziert aus [2]).

Mithilfe von Proteomuntersuchungen zur Validierung der Daten über die Präsenz von pHp in Lungengewebe wurde über 2DE und 2D-Western Blots eine Detektion des Moleküls erbracht, die im diagnostischen Bereich bei der Verwendung von pHp als Marker ergänzend eingesetzt werden kann. Durch zweidimensionale Auftrennung von Proteinlysaten aus Adeno- und Plattenepithelkarzinomen und 2D-Western Blots ließen sich unterschiedliche Varianten von pHp in Adenokarzinomen nachweisen, deren Nachweis in Plattenepithelkarzinomen nicht möglich war (Abb. 39).



Bei Adenokarzinomen werden Signale im Bereich um 60 kDa sichtbar, die bei Plattenepithelkarzinomen ausbleiben. Die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der Varianten zwischen $pI=1$ und $pI=3$ deuten auf unterschiedliche posttranslationale Modifikationen hin. Ähnliches wurde bereits von Kawamura-Saito *et al.* bei Lungenkrebs beschrieben [68].

3.2.3 ANXA8

Die bisherigen Informationen zu ANXA8 in Lungenkrebs stammen aus den Transkriptomarrays (Abb. 40), immunhistochemischen Färbungen (Abb. 41) und 2D-Western Blots (Abb. 42). Es wurden so Hinweise auf eine Relevanz von ANXA8 in Lungenkrebs gefunden; die Bedeutung als Biomarker oder als anderweitig krankheitsrelevantes Molekül und die genauen Mechanismen der Überexpression werden derzeit in weiteren Studien untersucht (Diplomarbeit von Frau Leyla Ziga, Universität Wien, in Vorbereitung). An dieser Stelle sollen vorab einige Beispiele von immunhistochemischen Färbungen und die Ergebnisse von Proteomuntersuchungen gezeigt werden.

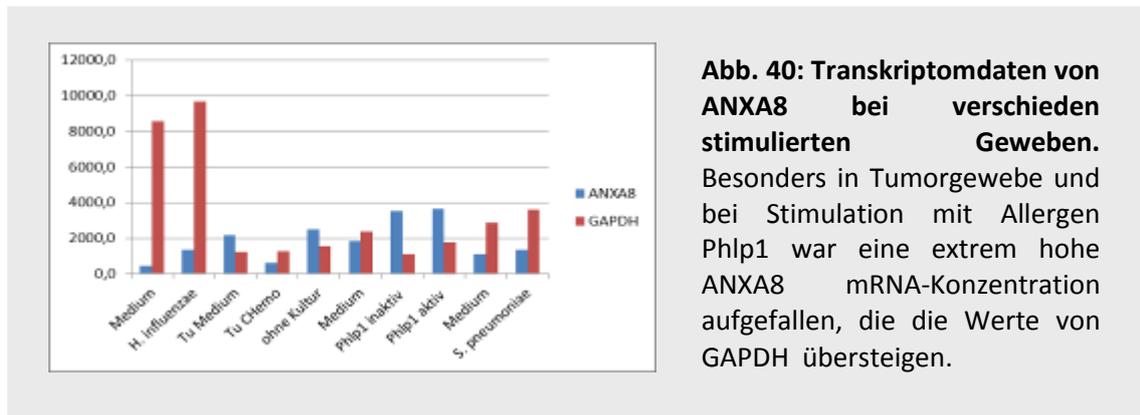
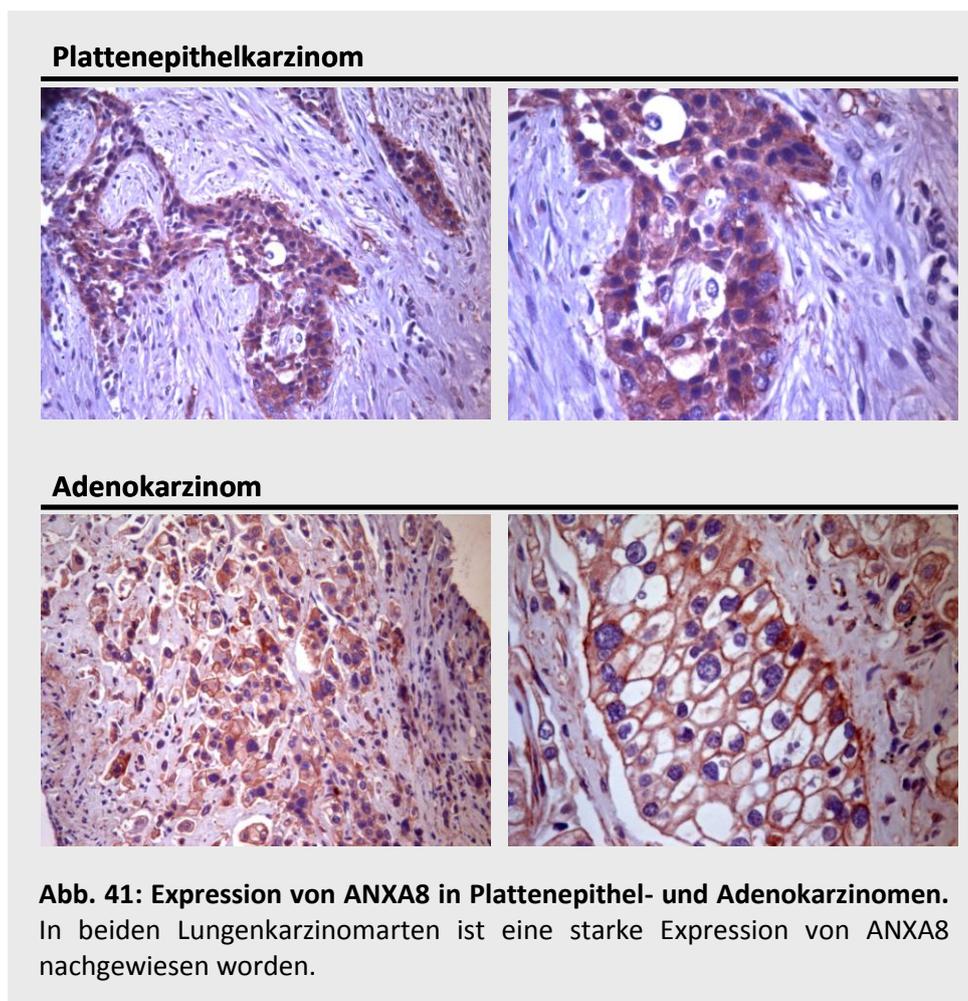


Abb. 40: Transkriptomdaten von ANXA8 bei verschiedenen stimulierten Geweben. Besonders in Tumorgewebe und bei Stimulation mit Allergen Phlp1 war eine extrem hohe ANXA8 mRNA-Konzentration aufgefallen, die die Werte von GAPDH übersteigen.

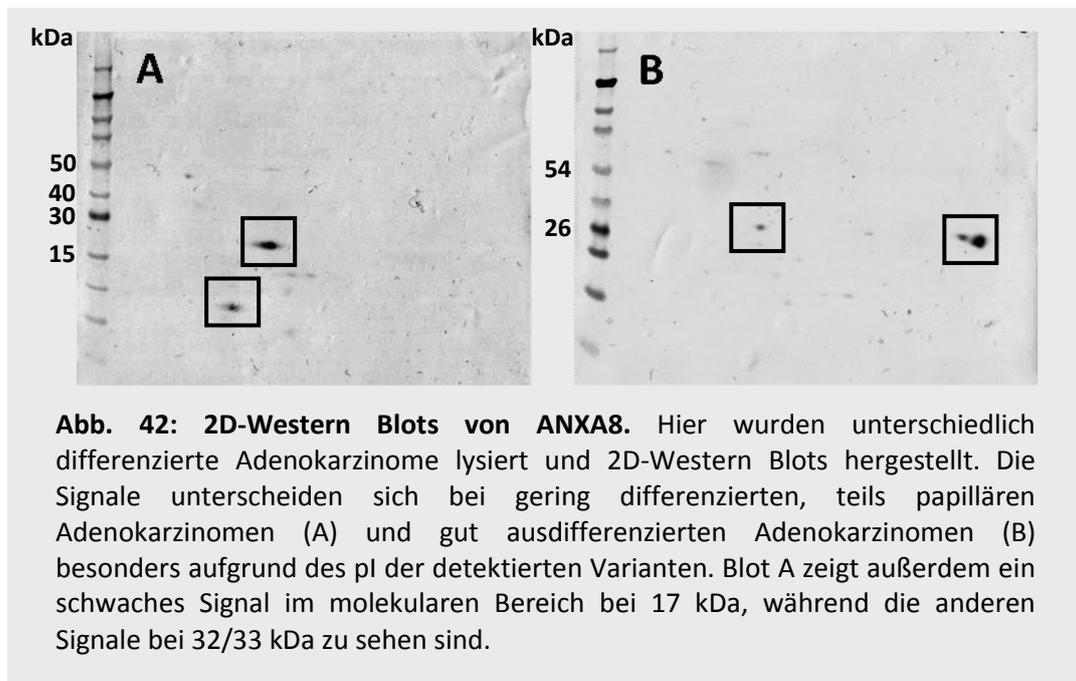
Nachfolgend durchgeführte immunhistochemische Färbungen von Adeno- und Plattenepithelkarzinomen zeigten dann direkt im Gewebe eine Überexpression von ANXA8 in Lungenkarzinomen (Abb. 41).



Bei der Verwendung HOPE-fixierter NSCLC-Gewebe für die Proteomuntersuchungen wurde auf 2D-Western Blots einen Nachweis von ANXA8

erbracht. Unter Verwendung des monoklonalen anti-ANXA8 Antikörpers LS-B2459 sind verschiedene Signale generiert worden, die auf unterschiedliche ANXA8-Varianten hinweisen. Abb. 42 zeigt unterschiedlich differenzierte Adenokarzinome, auf denen ANXA8 jeweils verschiedene isoelektrische Punkte aufweist. Blot A zeigt ein Signal bei einem Molekulargewicht um 17 kDa, die stärkeren Signale auf beiden Blots A und B befinden sich im Bereich von 32 bis 33 kDa.

Das Vorkommen der verschiedenen Annexine mit unterschiedlicher Lokalisation und Funktion (Tab. 1) ermöglicht bereits ein denkbar großes Spektrum an unterschiedlichen Molekulargewichten und posttranslationalen Modifikationsmöglichkeiten. Die Unterschiede im Vorkommen von ANXA8 in diesen Untersuchungen könnten allerdings auch auf krankheitsrelevanten Expressions- oder Modifikationsmustern beruhen.



Ob sich ANXA8 dazu eignet, die Progression von Adenokarzinomen zu charakterisieren oder als Marker zu dienen, wird derzeit näher untersucht.

3.2.4 DUX4

Die Untersuchungen von DUX4 als Biomarkerkandidat mit Sonderstellung ergaben, nachdem Transkriptomdaten stark hochregulierte mRNA-Expressionen gezeigt hatten, zunächst eine Reihe positiver histologischer Färbungen mit einem gegen DUX4 gerichteten Antikörper (2.4.4). In verschiedenen Geweben und

Zelltypen war eine teils nukleäre, teils zytoplasmatische, teils granuläre Färbung bei verschiedenen Zelltypen oder in deren Umgebung zu beobachten. Abb. 43 zeigt die Transkriptomdaten und einige Lungengewebe, in denen u. a. membranständig gefärbte Alveolarmakrophagen auffallen.

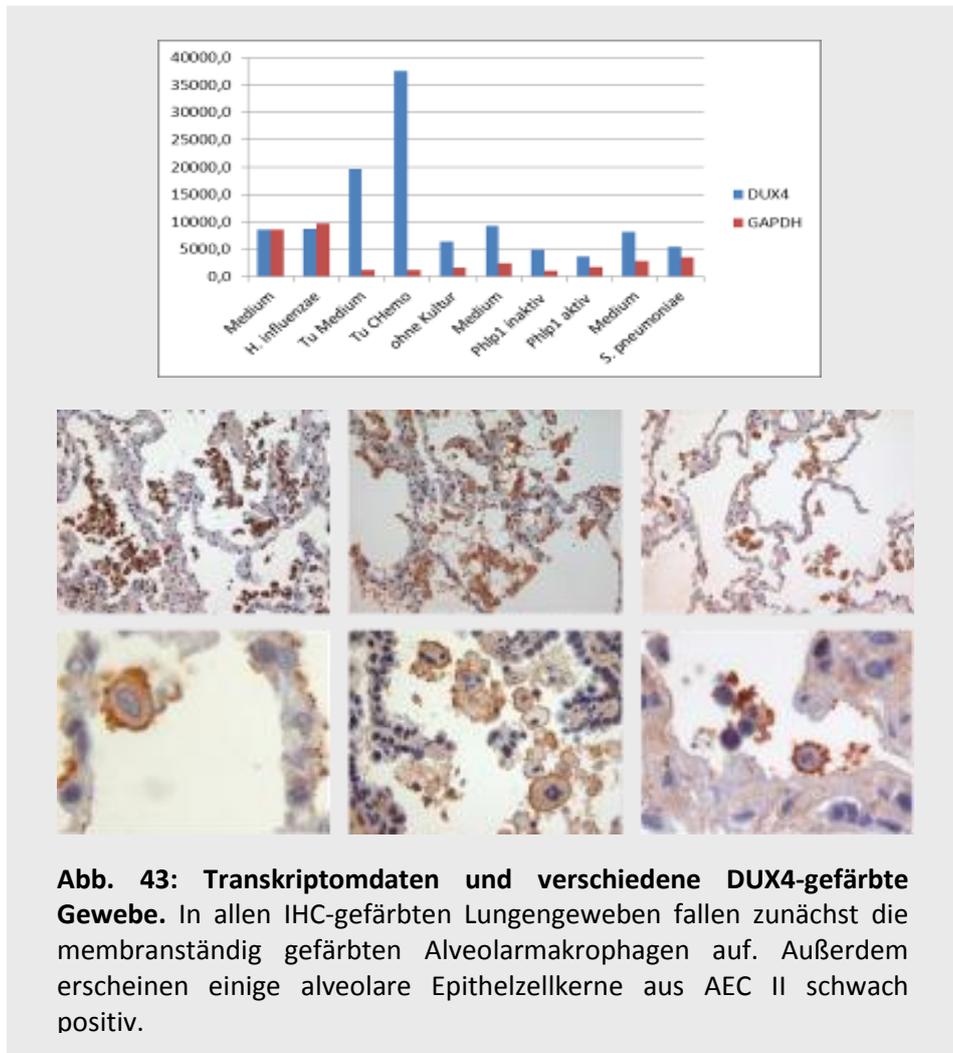
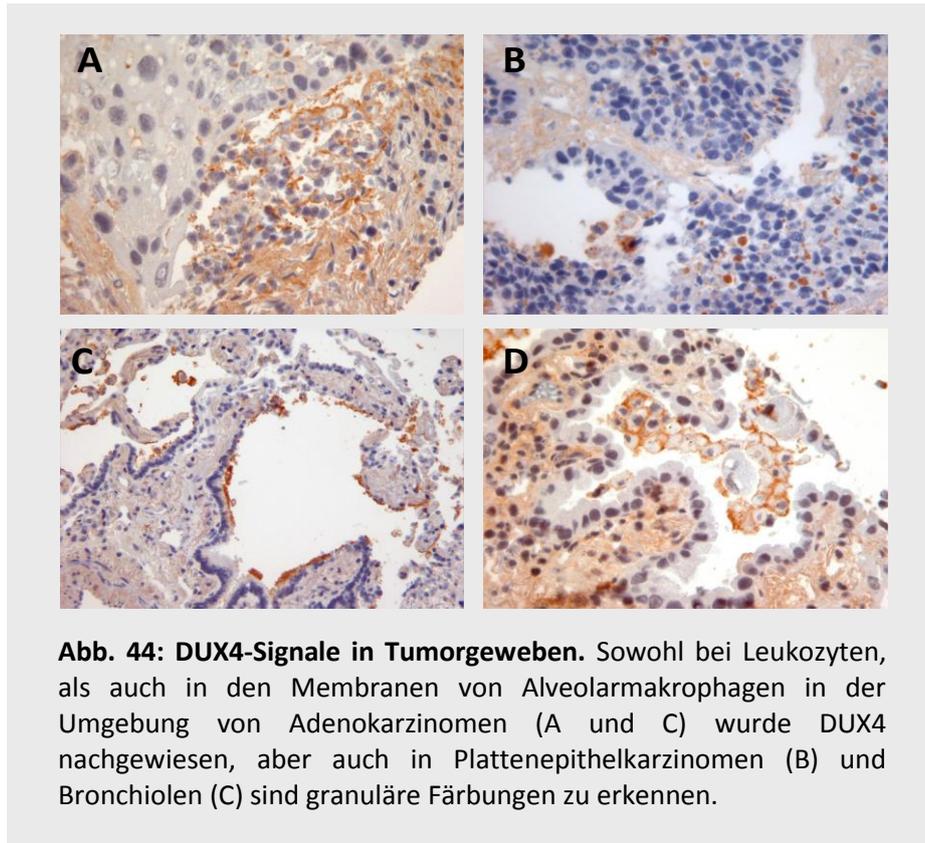
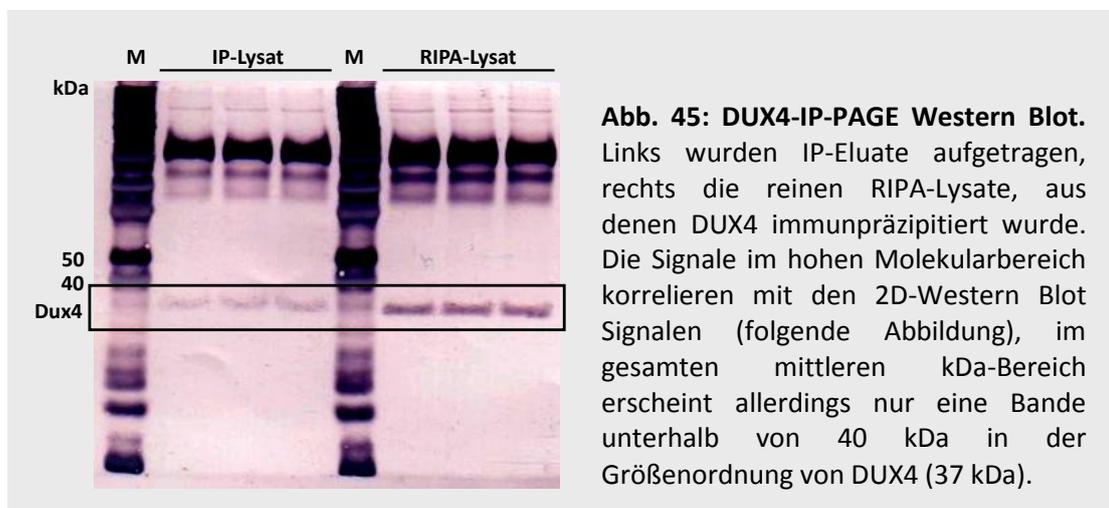


Abb. 43: Transkriptomdaten und verschiedene DUX4-gefärbte Gewebe. In allen IHC-gefärbten Lungengewebe fallen zunächst die membranständig gefärbten Alveolarmakrophagen auf. Außerdem erscheinen einige alveolare Epithelzellkerne aus AEC II schwach positiv.

Die Färbung von Makrophagenmembranen ist in allen untersuchten Lungengewebe reproduziert worden, was auf eine Präsenz des Proteins in der menschlichen Lunge hinweist. Ebenfalls stetig positive Färbungen sind in einigen tumorösen Gewebe und an Bronchiolen erzeugt worden, wobei die Lokalisation der Signale recht unterschiedlich ist. In Plattenepithelkarzinomen sind granuläre Färbungen im Zytoplasma generiert worden (Abb. 44).

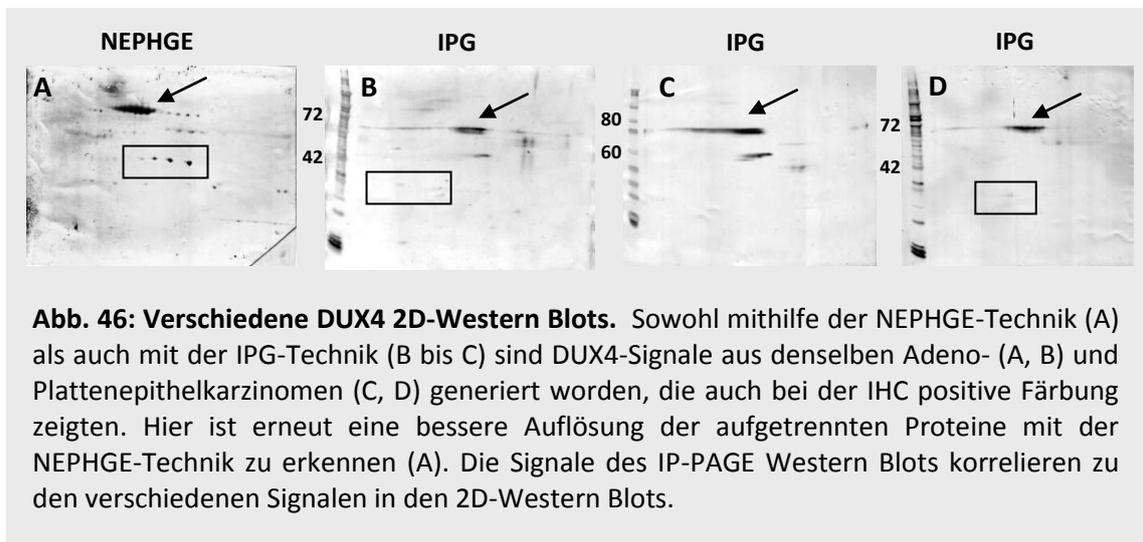


Zusätzlich zu den histologischen Färbungen wurden einige der Gewebe für Western Blots verwendet. Die verschiedenen Gewebe wurden entparaffiniert, mit RIPA-EP Proteinlysate hergestellt und über PAGE aufgetrennt. Parallel wurde immunpräzipitiertes DUX4 aus denselben RIPA-Extrakten aufgetrennt (2.2.4; 2.4.4). Der PAGE-Blot wurde mit demselben Antikörper behandelt wie die oben gezeigten histologischen Schnitte.



Der Blot zeigt zunächst Signale im hohen Molekularbereich (ca. 160 kDa). Allerdings distinkt und im sonst signalfreien mittleren Größenbereich fanden sich in den untersuchten Geweben Banden knapp unterhalb von 40 kDa, die sich im Größenbereich von DUX4 befinden (37 kDa). Die RIPA-Lysate enthielten unerwarteter Weise eine größere Menge des Proteins als die IP-Eluate.

Zweidimensional aufgetrennte und auf eine NC-Membran transferierte Proteinlysate aus DUX4-positiven Geweben zeigten ebenfalls Signale in verschiedenen Größenbereichen. Im Vorfeld des Elektrotransfers wurden sowohl die NEPHGE-Technik (A), als auch die IPG-Technik (ZOOM-System, B bis D) zur Separation verwendet. Abb. 46 zeigt vier verschiedene Blots aus 2 Plattenepithel- und 2 Adenokarzinomen.



Wie in den PAGE-Blots (Abb. 45) waren auch in den hohen Molekularbereichen der 2D-Western Blots Signale zu erkennen, die auf die Anwesenheit von Di- bzw. Trimeren oder Fusionsproteinen hindeuten könnten (4.2). Allerdings waren teilweise auch unterhalb der 40 kDa Markerbanden Moleküle mit unterschiedlichen pI's zu erkennen (Kästchen), was besonders durch die höhere Auflösung auf den NEPHGE-Blots ersichtlich wurde. Bei den Signalen um 70 kDa könnte es sich um DUX4 Dimere handeln (Pfeile).

4. Diskussion

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer neuen Strategie zur Entdeckung und Validierung von Biomarkern durch Proteomuntersuchungen vornehmlich an HOPE-fixierten Lungen(karzinom)geweben. Im Mittelpunkt stand dabei die Etablierung von 2DE mit der NEPHGE-Technik und eine Optimierung der Versuchsparameter sowie deren Übertragung auf und Anpassung an die IPG-Technik. Daraufhin wurde die Durchführbarkeit von Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) mit Proteinen untersucht, die aus 2D-Gelen von HOPE-fixierten Geweben entnommen wurden.

Die Etablierung von Proteomstudien mit der HOPE-Technik, und somit die Benutzung eines durch neuartige Konservierungsmechanismen optimierten Paraffinmaterials, sowohl für aktuell anstehende histologische und molekularpathologische Diagnosen, als auch für retrospektive Untersuchungen von Biomarkern erhöht die Flexibilität in der Pathologie. Neben der alltäglichen Diagnostik ist die HOPE-Technik für Untersuchungen des Genoms geeignet, die bei der Entwicklung personalisierter Therapien und bei der Analyse von Expressionsmustern und Mutationen für Diagnosezwecke zunehmend angewendet werden. Da mittlerweile auch die Analyse gesamter Tumorgenome durchgeführt und ganze Mutationsspektren abgebildet werden [78], besteht ein dringender Bedarf an mit diesen Entwicklungen kompatiblen Gewebearchiven. Die Krebsforschung tendiert u. a. zu der Entwicklung einer Vielzahl von unterschiedlichen spezialisierten Behandlungsformen, die dem Mutationsspektrum möglichst weit angepasst werden und so einen gezielten Angriff auf fehlregulierte Mechanismen möglich machen. Ansätze in diese Richtung werden bereits mit Erfolg bei der Neutralisation von Wachstumsfaktorrezeptoren verfolgt (1.2).

Über den Zugang zum ebenso gut konservierten Proteom durch die neu eingeführten Möglichkeiten der Proteomuntersuchungen bieten sich mit HOPE-Material auch neue Strategien auf Proteinebene an, um in Archivgeweben nach neuen Markermolekülen zu suchen. Aus denen wiederum können zahlreiche neue Kandidaten für weitere Therapieoptionen evaluiert werden. Da neben dem guten molekularen Erhalt in HOPE-fixierten Geweben auch die Morphologie konserviert wird (Abb. 15 bis 17), wäre eine bevorzugte oder parallele Installation von HOPE-

Paraffinarchiven daher in Zukunft nicht nur im Hinblick auf die Diskussionen um die Kanzerogenität von Formaldehyd denkbar [23, 59].

4.1 Etablierung von Proteomuntersuchungen an HOPE-fixierten, Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen

Die initialen Ergebnisse mit der NEPHGE-Technik zeigten, dass wässrige Tris-Extrakte und mit komplexeren EP's gewonnene Proteine aus HOPE-fixierten Geweben nach Standardverfahren zu gut aufgetrennten Proteinspektren verarbeitet werden können [64]. Somit bot sich ein umfangreiches Gewebearchiv für retrospektive, proteomweite Untersuchungen krankheitsrelevanter Proteine in menschlichen Lungengeweben an, deren optimale methodische Parameter ermittelt und zu einem Standardprotokoll zu formulieren waren. Die Anpassung der für 2DE maßgeblichen Parameter ist für jede Probenart empirisch zu ermitteln [46, 83], wobei die NEPHGE-Technik bei vielen Schritten mit gelieferten Reagenzien definierter Zusammensetzung durchgeführt wird. Hier sind Fokussierungspuffer (z. B. AP-HaT), Äquilibrierungslösung und Gellösungen vom Hersteller entwickelt worden (bzw. die Rezepte von O'Farrell und Klose optimiert worden) und die Zutaten teilweise nicht bekannt. Daher sind lediglich bei der Probenvorbereitung verschiedene Parameter variierbar. Auch die Fokussierungsbedingungen (Voltstufen und Zeiten) sind festgelegt, unterscheiden sich nur bei unterschiedlichen Längen verwendeter Kapillargele aufgrund längerer Migrationswege und sind auf den pH-Gradienten abgestimmt, der durch die spezielle Carrierampholytmischung aus Homologen mit unterschiedlichem pI generiert wird. Da die NEPHGE-Technik keine Endpunktmethode darstellt und die Proteine nicht wie bei der IPG-Technik an ihrem isoelektrischen Punkt bleiben (wodurch sie schneller ausfallen und mit anderen Proteinen aggregieren), hat das Einhalten der empfohlenen Voltstufen und Zeiten und somit auch der angelegten Voltstunden direkten Einfluss auf die Reproduzierbarkeit und die Korrelation des Proteinspektrums zum pH-Gradienten. Die größten Schwierigkeiten bei der Entwicklung der Technik durch O'Farrell und bei dem überarbeiteten Protokoll durch Klose *et al.* waren der Verlust von sehr sauren und/oder sehr alkalischen Proteinen, die Reproduzierbarkeit der Experimente aufgrund von ‚batch-to-batch‘-Unterschieden bei den Ampholytchargen (Instabilität des pH-Gradienten und

daraus resultierender ‚cathode drift‘, d. h. Verschiebung des pH-Gradienten zur Kathode), aber auch die Fragilität der Gele beim Herauspressen aus den Glaskapillaren und beim Transfer auf SDS-Gele [46]. Bis auf den letzten Punkt konnte die Technik allerdings soweit optimiert werden, dass pH-Gradienten von pH 3-10 generiert und Proteine in diesem Bereich gut dargestellt werden können [72]. Zusammengefasst erfordert die Fokussierung von Proteinen mit der NEPHGE-Technik zwar mehr Expertise bei der Handhabung der Probe (bis zum Start der Fokussierung) und beim Umgang mit den fragilen Kapillargelen, aber wichtige Parameter der eigentlichen Fokussierung sind festgelegt und dadurch nach variabler Aufbereitung und Auftragen der Probe recht gut standardisiert. Dies ist in der Qualität der Trennung auch wiederzufinden. Dabei ist allerdings das im Vergleich zu IPG-Streifen verringerte Probenvolumen zu beachten, welches die Produktion höher konzentrierter Direktlysate oder die Solubilisierung großer Pellets in kleinen Volumina erfordert. Dies stellt bei der klassischen Vorgehensweise über ein Ausfällen und Waschen der Proteine aufgrund der schwierig zu realisierenden vollständigen Resolubilisierung der Proteinpellets ein Hauptproblem aufgrund der Tatsache dar, dass 500 µg Protein oder mehr in 30-40 µl Fokussierungspuffer AP-HaT zu lösen sind (bzw. 50 µg oder mehr in 10-15 µl beim Kleingelformat). Dagegen steht für die Rehydrierung von 24 cm IPG-Streifen ein Volumen von 450 µl für 500 bis 2000 µg Protein zur Verfügung. Oftmals war es nicht möglich, eine komplette Resolubilisierung der Pellets zu erreichen, obwohl dabei die in 2.3.2.3 beschriebenen mechanischen und thermischen Maßnahmen unternommen wurden (Ultraschall, Schütteln, Pellet-Zerkleinerer). Dies hat einerseits Auswirkungen auf die wirklich fokussierte und nicht exakt bestimmbar Proteinmenge, andererseits ist die Unterscheidung letztlich fokussierter Proteinfractionen von den unlöslichen Fractionen nicht möglich. Aus diesen Gründen wurde die Extraktion und Probenvorbereitung, vorerst bei der NEPHGE-Technik, so modifiziert, dass Verluste beim Ausfällen und Waschen eliminiert und der Puffer auf andere Weise für die IEF aufbereitet wurde. Dabei konnte eine signifikante Verbesserung der Auftrennung und Vervielfachung der Menge aufgetrennter Proteine erreicht werden, indem die Extraktion direkt in modifizierten Fokussierungspuffer durchgeführt wurde. Eine anschließende Behandlung mit DNase/RNase oder UZ zur Beseitigung störender Substanzen (Nukleinsäuren, Zelldebris, Lipide,) sowie Unterbindung proteolytischer Aktivität wurde dabei

berücksichtigt (Vergleich der initialen Ergebnisse mit der optimierten Probenvorbereitung bzgl. der NEPHGE-Technik, Abb. 24). Diese Entwicklung könnte bei Hochskalierung auf noch größere Gelformate (z. B. 30 x 50 cm) auch bei HOPE-fixierten Geweben die in der Literatur beschriebenen maximalen Proteinmengen erreichen, wo aus Frischmaterial mit Kapillargelen in der ersten Dimension die Trennung von bis zu 10000 einzelnen Proteinspots erreicht wurde [137].

Zur einfacheren Handhabung und schnellen Durchführung von 2DE ist eine zusätzliche Etablierung der IPG-Technik sinnvoll. Erste Versuche mit 7 cm IPG-Streifen und dem ZOOM-System zur schnelleren Durchführung der kompletten 2DE zeigten, dass auch diese Art der Fokussierung mit der HOPE-Technik kompatibel ist (Abb. 18). Obwohl beim IPG-System seit jeher die Anzahl separierbarer Proteine, die Auflösung und der Hintergrund in den gefärbten Gelen die Hauptprobleme darstellen, ist die Technik durch ihre einfache Handhabung am weitesten verbreitet [46]. Allerdings ist hier Voraussetzung, dass optimale Parameter der Probenvorbereitung *und* Fokussierungsbedingungen ermittelt worden sind, was einerseits einen höheren Spielraum durch Variabilität schafft, andererseits die Etablierung der Technik zeitaufwendiger macht und mögliche negative Einflussquellen auf die Reproduzierbarkeit vervielfacht. Zur Etablierung der IPG-Technik waren ausgiebige Testreihen notwendig, um eine ausreichende Trennung und vor allem Ausbeute an zweidimensional aufgetrennten Proteinen zu erreichen. Da durch die Struktur der IPG-Gelmatrix schnell ein Verstopfen der Poren durch Verunreinigungen bzw. unvollständige Resolubilisierung und dadurch bedingte streifige Proteinmuster auftreten, sind Aufreinigung der Proben und vollständige Solubilisierung der Proteine von großer Bedeutung. Daher wird bei der IPG-Technik oft standardmäßig ein Kit zur Aufreinigung (meist TCA/Azeton-basiert) verwendet oder eine eigene Fällung und Reinigung mit TCA-Lösungen oder TCA/Azeton-Mischungen durchgeführt. Die wichtigsten Maßnahmen sind das Entfernen von Salzen und die Unterbindung proteolytischer Aktivität durch Proteaseinhibitoren wie PMSF (inhibiert Serinproteasen), Leupeptin (hemmt Cystein-, Serin- und Threoninpeptidasen) oder EDTA (gegen Metalloproteinaseaktivität), da ansonsten eine Reduktion hochmolekularer Proteine und durch deren Spaltung ‚artifizielle‘ Spots durch die Spaltprodukte

entstehen. Die ausgefällten Proteinmengen schwankten bei selbst angesetzten Fällungen stark und zeigten unterschiedliche Mengen im IEF-Puffer nach der Resolubilisierung; mit dem Aufreinigungskit wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Allerdings erweist es sich je nach Probe als schwierig, die mit dem Kit gut produzierbaren Proteinpellets wieder vollständig in Lösung zu bringen. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die Präzipitierung und Resolubilisierung einer bestimmten Proteinmenge zu Verlusten bei der Proteinausbeute führt [48].

Außer den industriell standardisiert hergestellten Streifen (deren Repertoire mittlerweile auch ein großes Sortiment an enger eingegrenzten pH-Bereichen umfasst, z. B. pH 5-7, pH 4,9 bis 5,1, 5,5 bis 5,6 etc.) sind die Zusammensetzungen aller weiteren zu verwendenden Lösungen für jeden Versuchsschritt auf unterschiedliche Weise zu kombinieren und die Konzentrationen zu variieren, um die beste Solubilisierung möglichst vieler Proteinspezies sowie eine optimale Fokussierung durch Ermittlung der geeigneten Voltstufen und Voltstunden zu erreichen. Dazu sind für die ungefähren Parameter bereits in der Literatur zu 2DE Hinweise gegeben, die Feinabstimmung aber findet immer mit der jeweiligen Probenart und im 2DE anwendenden Labor statt [46, 137]. Die wesentlichen Maßnahmen zur erfolgreichen Durchführung von 2DE mit IPG's sind die Proteinextraktion, Probenvorbereitung, Zusammensetzung des Rehydrierungs- und Fokussierungspuffers, der Äquilibrationslösung und die Ausarbeitung geeigneter Parameter für die Fokussierung (Voltstufen, Voltstunden, Dauer der einzelnen Perioden). Diese Maßnahmen dienen vornehmlich der Maximierung extrahierter Proteine und dem Versuch, so viele Proteine wie möglich in Lösung zu halten. Dies ist durch unterschiedliche Löslichkeitseigenschaften von hydrophoben Membranproteinen oder Kernproteinen und eher wasserlöslichen cytosolischen Proteinen eine der maßgeblichen Herausforderungen bei IEF (auch bei der NEPHGE-Technik). Durch die Verwendung hoher Konzentrationen an den Chaotropen Harnstoff (bis 9 M) und Thioharnstoff (bis 2 M in Kombination mit 6 bis 7 M Harnstoff) konnte die Löslichkeit von Proteinen erhöht werden. Harnstoff löst Wasserstoffbrückenbindungen und entfaltet bzw. denaturiert Proteine, Thioharnstoff erhöht die Löslichkeit von hydrophoben Proteinen – ist selbst aber aufgrund seiner eigenen schlechten Wasserlöslichkeit nur bei hoher Harnstoffkonzentration löslich. Des Weiteren werden zwitterionische oder

nichtionische Detergenzien wie CHAPS, NP-40 oder Triton X-100 verwendet. Jedoch zeigt sich auch eine Abhängigkeit der Löslichkeit von Proteinen vom Lipidgehalt der Probe, was wiederum bei zu hoher Konzentration die IEF und SDS-PAGE stört [48].

Ein weiterer zentraler Bestandteil von EP und auch RehyP's (IPG-Technik) und Fokussierungspuffern (NEPHGE) ist ein reduzierendes Agens wie DTT oder 1,4-Dithioerythritol (DTE). Die dadurch bezweckte Reduktion der Proteine und die Unterbindung erneuter Oxidationen ist ein wichtiger Schritt bei der Spaltung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken, sodass die Proteine vollständig entfaltet werden und auch bleiben. Meistens wird DTT verwendet, das allerdings bei der IEF aufgrund seiner leicht sauren Eigenschaft (pK-Wert um 9) zum Wandern Richtung Anode tendiert und so an der kathodischen Seite des IPG-Streifens eine ‚DTT-Armut‘ auftritt. Wie durch Acin *et al.* berichtet wurde, konnte dieser Effekt durch die Einführung von HED als Reduktionsmittel beseitigt und eine bessere Auflösung der Proteine im basischen Bereich erzielt werden, da HED ungeladen ist [5]. Die Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen in dieser Arbeit (Abb. 29), wo durch 100 mM HED eine bessere Trennung von basischen Proteinen beobachtet wurde. Ein letzter Bestandteil des RehyP's sind 0,2 bis 0,5 % Carrierampholyte, die im IPG-System zur besseren Löslichkeit der Proteine beitragen und als Cyanatfänger in harnstoffhaltigem Milieu funktionieren.

Die standardisierte Produktion und kommerzielle Vermarktung von pH-Streifen für die isoelektrische Fokussierung erhöhten die Reproduzierbarkeit der Versuche, zeigten allerdings eine niedrigere Auflösung als die NEPHGE-Technik. Die Spotmuster erschienen außerdem oft verzerrt und beinhalteten Schlieren (‚smear‘) oder Artefakte. Die IPG-Technik erfordert des Weiteren ein 12-stündiges Rehydrieren der Streifen vor der Fokussierung, möglichst mit der Probe, was zu Verlusten und Präzipitierung von Proteinen führt [47]. Bei der Fokussierung werden bis zu 10000 V angelegt, was zum Brennen der Streifen führen kann und eine Überschichtung mit Mineralöl erfordert. Mineralöl wird auch über die rehydrierenden Streifen geschichtet, um ein Austrocknen und Entweichen von Wasser aus dem Puffer (Ausfall von Harnstoff und Salzen) zu verhindern. Bei der Ermittlung der optimalen Fokussierungszeit und der Länge der einzelnen Voltstufen ist die Zahl der angelegten Voltstunden als zentraler Parameter herausgearbeitet worden. Während bei der stufenweise Erhöhung der Voltzahl

ähnlich der in der Literatur beschriebenen Protokolle ebenfalls mit verlängerten Zeiten der höheren Voltstufen gearbeitet wurde, zeigten sich für HOPE-Gewebelysate etwas verlängerte Zeiten bis zur vollständigen Fokussierung (mindestens 80 000 Vh, Abb. 31).

Nach der Fokussierung werden IPG-Streifen (analog zu den Kapillargelen) äquilibriert. Der Vorgang ist wichtig, um die IEF-Gele für die folgende PAGE umzupuffern und die Proteine linearisiert zu halten (durch DTT oder HED) und mit SDS zu beladen, sodass aufgrund der negativen Ladung von SDS eine negative Gesamtnettoladung der Proteine resultiert. Dies ist vor der Fokussierung zu vermeiden, da die Separation dort gerade nach unterschiedlicher Ladung im pH-Gradienten erfolgt – für die folgende Größenauftrennung der Proteine allerdings ist SDS unabdingbar und Kernbestandteil jeder PAGE. Die Äquilibration wird in zwei Schritten durchgeführt, wobei bei der zweiten Inkubation im gleichen Puffer DTT durch JAA ersetzt wird (je 15 min Inkubation). Damit wird freies DTT entfernt und die Proteine alkyliert, was ansonsten beim Migrieren durch das PAGE-Gel zu dem ‚point streaking‘-Phänomen führt und die Qualität der Auflösung reduziert [46]. Außerdem werden durch JAA auch Sulfhydrylgruppen alkyliert und diese so vor Reoxidation geschützt, was für nachfolgende Identifikation von Proteinen über MS dringend empfohlen wird. Beide Äquilibrationsschritte erfordern wie die Extraktion/Rehydrierung hohe Konzentrationen an Harnstoff (6 M) und 30 % Glycerin zur Vermeidung elektroosmotischer Effekte und zum verbesserten Transfer der Proteine in die zweite Dimension [47]. Verglichen mit der Konstitution empfohlener Zusammensetzungen des Puffers fiel bei HOPE-fixierten Proben auf, dass eine Erhöhung der SDS-Konzentration um 0,5 % auf 2,5 % und die Erhöhung der JAA-Konzentration auf 5 % zu saubereren Proteinmustern führten. Grund dafür könnte die Komplexität der verwendeten Proben sein, da strikt Gesamtzelllysate und keine vorfraktionierten Proteingemische verwendet wurden und daher ein höherer Bedarf an Reduktions- und Alkylierungsreagenzien benötigt wurde.

Zu den Optimierungsmaßnahmen der IPG- und der NEPHGE-Technik für HOPE-fixierte Lungengewebe kann abschließend gesagt werden, dass zur Produktion von den Ansprüchen der Biomarkerforschung gerecht werdenden 2D-Gelen die in dieser Arbeit entwickelte Probenvorbereitung durch Direktextraktion (in RehyP

bzw. AP-HaT Fokussierungspuffer) benutzt werden kann und bei zukünftigen Planungen von Paraffinarchiven eine vorteilhafte Alternative zu bisherigen Verfahrensweisen in der Proteinanalytik unter Verwendung von Archivmaterial darstellt.

4.2 Validierung von Biomarkern

Bei der Etablierung molekularer Methoden für HOPE-fixierte Gewebe ergaben sich besonders durch die exzellente RNA-Integrität neue Möglichkeiten, da nun durch Transkriptomanalysen von archivierten Paraffingeweben eine Identifizierung von Kandidatengenomen erfolgen und unter Verwendung desselben Gewebes mit umfangreicher Methodik (PCR, RT-PCR, IHC, ISH, Protein/DNA/RNA-Blots, 2DE, MALDI-TOF MS) eine Validierung durchgeführt werden konnte. Dieses Spektrum wurde nun durch die Möglichkeit von Proteomuntersuchungen mittels 2DE und MS erweitert. Im Anschluss an die Optimierung der Parameter für die IPG- und die NEPHGE-Technik wurden geeignete Methoden aus diesem Spektrum beispielhaft auf einige Lungenbiomarker angewendet. Die Auswahl der Moleküle fand dabei über vorige Beobachtungen des Transkriptionsverhaltens der betreffenden Gene in verschiedenen Geweben statt (pHp, ANXA8, DUX4) bzw. durch eine vorherrschende Diskussion über die Relevanz als Zielmolekül in Karzinomen (TKTL1). Bei der Beschreibung der genannten Moleküle wurde die Strategie zu Biomarkeruntersuchungen anschaulich gemacht und im Rahmen dieser Arbeit erstmalig mit Proteomuntersuchungen verknüpft. Es wurde gezeigt, wie aus HOPE-fixierten und archivierten Paraffingeweben mRNA-Daten zur Hypothesengenerierung und Auswahl von Kandidatengenomen gewonnen wurden und daraufhin eine gezielte Beschreibung der Moleküle durch Anwendung weiterer Methoden auf Protein- und RNA-Ebene erfolgte. Dabei wurden Proteomuntersuchungen eingeschlossen.

Die Vorgehensweise bei der Generierung der bisherigen Informationen über pHp kann im Hinblick auf die in dieser Arbeit beschriebene Strategie zur Untersuchung von Biomarkern mithilfe der HOPE-Technik als Pilotprojekt angesehen werden. Durch die in dieser Arbeit entwickelten Proteomuntersuchungen konnte erstmalig eine Validierung von mit anderen molekularen Methoden generierten Ergebnissen

zu pHp anhand desselben Paraffinmaterials durchgeführt werden. Diese Ergebnisse wurden – soweit nicht in der Dissertation von Dr. Abdullah dargestellt – gemeinsam in 3 Fachjournalen publiziert [1-3]. Die maßgebliche Entdeckung unter vorwiegend HOPE-Material zugänglicher Methodik (besonders auf mRNA-Ebene) war dabei die lokal-pulmonale Expression eines pHp-Moleküls in der menschlichen Lunge durch RT-PCR und ISH, was die in den Transkriptomarrays stark aufregulierte Hp-mRNA erklärt. Diese wurde teilweise in höheren Konzentrationen als die mRNA für das ‚Housekeeping‘-Gen GAPDH gemessen. Die Arraydaten wurden aus *ex vivo* kultivierten und nicht kultivierten (nativen) Tumor- und Lungengeweben generiert, die nach Stimulations- und Infektionsexperimenten HOPE-fixiert wurden. Im Hinblick auf bekannte immunmodulatorische Eigenschaften von Hp [102] und Diskussionen über die Verwendbarkeit als Tumormarker im Blutserum von Lungenkrebspatienten [12, 28, 34, 54, 55, 99] wurden die Untersuchungen zu pHp mit proinflammatorischen Substanzen zur Simulation von Infektionen (LPS, Pam3, IL-6) und mit dem Glukokortikoid DEX auf Versuche mit *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae* und *Streptococcus pneumoniae* ausgeweitet, was letztlich eine Beteiligung von pHp (und seinem Rezeptor CD163) auch an pulmonalen, immunregulatorischen Mechanismen bestätigte. Es sei an dieser Stelle auf die bedeutsamen Möglichkeiten hingewiesen, Informationen über das Transkriptionsverhalten nun auch mit dem Proteinexpressionsverhalten von unterschiedlich stimulierten Lungengeweben zu vergleichen. Durch groß angelegte Infektionsstudien mit ausgewählten Pathogenen nach Art des STST Modells und eine folgende HOPE-Fixierung könnten die in Transkriptomdaten auffälligen Gene mit nach und nach erstellten 2DE-Datenbanken verglichen werden und über MS gezielt Proteinmitglieder der Immunreaktionen oder von Entzündungsvorgängen identifiziert werden.

In der dritten Studie konnten die Eigenschaften von pHp als Tumormarker mit hoher Spezifität für Adenokarzinome durch umfangreiche immunhistochemische Färbungen gezeigt werden [2]. An diesem Punkt knüpft die Untersuchung von pHp über 2DE an. So war von Blutserumproben bereits eine prominente Glykoform von Hp identifiziert worden, die mit Lungenkrebs assoziiert worden ist [128]. Die zweidimensionale Auftrennung von Proteinextrakten aus Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen und ein folgender Elektrotransfer auf NC-Membranen

bieten sich daher als eine mögliche Ergänzung bei der Differenzierung von Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen an. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist mittels 2DE-Blots und einer Detektion durch Antikörper die Präsenz von verschiedenen pHp-Varianten mit ähnlichem Molekulargewicht, aber unterschiedlichem pI in Adenokarzinomen und die Abwesenheit dieser Moleküle in Plattenepithelkarzinomen gezeigt worden. Die Detektion dieser unterschiedlichen Varianten von pHp ist durch immunhistochemische Färbungen nicht möglich (da in histologischen Schnitten kein Unterschied der Masse oder des pI eines Proteins zu erkennen ist). Anhand dieser Untersuchung konnte ein Wert der IPG-Technik für diagnostische Anwendungen durch schnell durchzuführende Experimente ausgearbeitet werden. War doch das Potenzial zur Generierung komplexer, sauberer Spotmuster mit IPG-Streifen im Vergleich zu NEPHGE-Gelen geringer, zeigte sich ein Vorteil bei der Verwendung von IPG-2DE als diagnostisches Werkzeug. Bei der Anwendung des Western Blot Verfahrens ist nicht ein möglichst hoch aufgelöstes Proteinmuster zur Visualisierung möglichst vieler Proteine, sondern die spezifische Detektion und Visualisierung nur eines Moleküls (ggf. seiner Varianten) von Bedeutung. Es kann ohne die Gefahr einer Überladung (bezogen auf die Visualisierbarkeit des Proteoms) mehr Protein auf die Streifen geladen werden, was auch weniger stark exprimierte Proteine besser detektierbar macht und nicht auf Kosten der Qualität eines bei anderen Versuchsansätzen von 2DE gewünschten Proteinmusters durchgeführt werden muss. Außerdem steht nicht jedem Labor ein Massenspektrometer zur Verfügung, was die Anwendung des 2DE-Blots zur Identifizierung von Spots zu einer brauchbaren und kostengünstigen Alternative macht.

Bei ANXA8 dienten erneut Transkriptomdaten zur Erstellung der Hypothese, dass das Molekül eine Rolle bei NSCLC spielt und gaben Anreiz für Untersuchungen unter Zugriff auf das HOPE-Gewebearchiv und der damit zur Verfügung stehenden methodischen Möglichkeiten. Neben immunhistochemischen Färbungen wurde die 2D-Western Blot Technik zur Identifizierung von ANXA8-Varianten benutzt und ähnlich wie bei pHp erneut die Brauchbarkeit des IPG-ZOOM Systems für Antikörperdetektionen zweidimensional aufgetrennter Tumorslysate bestätigt. Hier konnte zusätzlich zu den Informationen zur Expression (über IHC) noch ein Hinweis auf verschieden modifizierte Varianten des Moleküls

mit ähnlichem Molekulargewicht in unterschiedlich differenzierten Adenokarzinomen hingewiesen werden, deren Validierung noch andauert. Da in der Literatur verschiedenste Varianten von Annexinen beschrieben sind (Tab. 1), könnte die 2DE-Technik hier als analytische Methode vorteilhaft sein. Das Resultat der durchgeführten 2DE-Blots dient für diese Arbeit vorerst als Bestätigung der Anwendbarkeit der Technik für diagnostische Zwecke und als Möglichkeit der Validierung (neuer) Biomarker.

DUX4 ist derzeit Gegenstand andauernder wissenschaftlicher Untersuchungen. Da alle in dieser Arbeit gesammelten Untersuchungen außer den initialen mRNA-Informationen durch Transkriptomarrays auf der Verwendung eines Antikörpers basieren (der polyklonale Antikörper H-204; sc-67385), ist auf Proteinebene eine Validierung der Daten notwendig. Jedoch sind in den Färbungen der histologischen Lungenschnitte und auch in Tumorgewebe deutlich Färbungen zu beobachten, die spezifisch zu sein scheinen (z. B. bei der Betrachtung der membranständigen Färbungen der Alveolarmakrophagen). Genauso sind allerdings auch Bindegewebsfärbungen und weitere schwer zu interpretierende granuläre Färbungen zu beobachten. Ähnlich schwierig gestaltet sich die Interpretation der Western Blots, die verschiedene Signale zeigen. Bei den 2D-Western Blots konnte in diesem Zusammenhang erneut die höhere Auflösung der NEPGHE-Technik gezeigt werden, da die einzelnen Signale schärfer und dadurch besser zu erkennen sind (Abb. 46). Auch auf den IPG-Blots konnten verschiedene Signale generiert werden, die allerdings nicht so hoch aufgelöst und daher als ‚Cluster‘ erscheinen. Vor allem im hochmolekularen Bereich zeigen sich sowohl in den 2D-Blots, als auch in der Western Blot Analyse der immunpräzipitierten Proben (Zielmolekül DUX4) Signale. In letzteren Versuchen ist allerdings auch eine Bande auf der Höhe von DUX4 (ca. 37 kDa) erzeugt worden, die im mittleren Größenbereich die einzige detektierte Bande darstellt (Abb. 45). Im Rahmen der bis dato zugänglichen Informationen über DUX4 ist auch die translokationsbedingte Fusion mit CIC, dem menschlichen Homolog eines *Drosophila capicua* Proteins, das einen HMG (‚high mobility group‘)-box Transkriptionsfaktor codiert, nachgewiesen worden [50]. Daher ist die Detektion von Signalen mit DUX4-Antikörpern in höheren molekularen Bereichen denkbar; außerdem können DUX4 Dimere auftreten. Zusammen betrachtet war die

Detektion von DUX4 nur mithilfe des einen verwendeten, polyklonalen Antikörpers möglich, dessen Spezifität über Positivkontrollen mit synthetisiertem DUX4-Peptid überprüft werden sollte. Da Transkriptionsfaktoren auch in der Krebsentstehung eine wichtige Rolle spielen, bieten sich umfangreiche Studien zur Klärung der DUX4-Funktion an, auch im Hinblick auf die bekannte Hypermethylierung der ‚3,3 kb Repeat Elements‘, die bei Zervixkarzinomen beobachtet wurde [67]. Die Abwesenheit oder Reduzierung von DUX4 mRNA in Normalgeweben verglichen mit Tumorgewebe konnte in dieser Studie gezeigt werden und passt zu den Transkriptomdaten. Die genaue Funktion der mRNA und eines möglichen Proteins aus dem DUX4 ORF sind momentan Gegenstand weiterführender Studien; hier soll hingegen die 2DE-Blot Technik als zusätzliche Methode in die wissenschaftliche Diskussion integriert werden.

Bei der Untersuchung der TKTL1-Expression war neben immunhistochemischen Nachweisen des Moleküls in NSCLC und Mammakarzinomen ebenfalls ein Nachweis über 2D-Western Blots und Antikörperdetektion möglich. Hier wurde wieder das ZOOM-System mit 7 cm IPG-Streifen zur isoelektrischen Fokussierung und SDS-PAGE benutzt und bestätigt erneut die Erkenntnisse der Verwendbarkeit der Technik zur Detektion von Zielproteinen. Der Fokus in dieser Studie war allerdings nicht die Evaluierung der Brauchbarkeit von TKTL1 als Marker. Hier sollte neben der erwiesenen Überexpression in Tumoren außerhalb der Lunge [36, 62, 79, 112, 124, 138] die Expression auch in NSCLC beschrieben werden; besonders betont wird dabei der Nachweis von TKTL1 in tumorfreien Lungengeweben (AEC II). Dadurch sollte ein Beitrag zu der andauernden Diskussion über Diäten zur Beeinflussung der TKTL1-Aktivität gegeben werden. Als zentrales Enzym bei der anaeroben Glukosevergärung wurde TKTL1 als maßgeblicher Einflussgeber der gesamten Transketolase-Aktivität postuliert und mit anormaler Proliferation auch in Gegenwart von Sauerstoff assoziiert. Mit dem erhöhten Gärungsstoffwechsel als angeblich zentralem Merkmal maligner Tumore soll daher das Tumorstadium durch eine glukosearme Ernährung reduziert werden. Wie auch aus einem zu diesem Thema erschienenen Merkblatt der Deutschen Krebsgesellschaft hervorgeht, fehlt die wissenschaftliche Grundlage für diese Therapie. Neben der ausstehenden Bestätigung von Tumorstadiumshemmung durch Glukosedienäten im menschlichen Organismus

gibt es noch zahlreiche andere Energiequellen, derer sich ein Tumor bedienen kann [104, 121]. Vorerst wäre also abzuklären, ob der Tumor eines Patienten auch tatsächlich seine Energie durch erhöhten Gährungsstoffwechsel gewinnt. Außerdem ist auch in normalen Geweben Transketolaseaktivität nachweisbar, weshalb vorerst der Einfluss auf diese Gewebe und die Beeinträchtigung des Organismus durch eine Diät zu untersuchen wäre.

4.3 Fazit

Die übergeordnete Betrachtung der angewandten bzw. erstellten Methodik und der Ergebnisse dieser Arbeit lässt erkennen, dass mit dem nun bereitstehenden Spektrum an Technologien neuartige Strategien für umfangreiche molekulare Gewebearanalysen an Paraffinmaterial entwickelt werden können. Dies ist an der Untersuchung von Proteinen durch 2DE und 2D-Western Blots mit anschließender Detektion durch Antikörper gezeigt worden, selbst wenn einfache (und einfach zu handhabende) 2DE-Systeme der IPG-Technik benutzt werden. Zur Erweiterung diagnostischer Möglichkeiten bietet das deutliche Vorteile, aber einen noch umfangreicheren Nutzen für retrospektive Untersuchungen solcher Krankheiten, deren Entwicklung bzw. Ausprägung von proteinassoziierten Mechanismen oder ihren Veränderungen in Geweben geprägt ist. Bei aufwändigerer Produktion von hochauflösenden 2DE-Spektren, vorzugsweise in der Art der vorgestellten Anwendung der NEPHGE-Technik und mit möglichst großen 2D-Gelen, bieten sich außerdem weiterführende Möglichkeiten im Bereich der MS nach Separation komplexer Gewebelysate über 2DE. Aufgrund der erfolgreichen Durchführung von MS zur Identifikation von Proteinen aus HOPE-2D-Gelen existiert nun auch die Grundlage für weitere massenspektrometrische Techniken an Paraffinmaterial, die in den letzten Jahren entwickelt wurden und mit der Messung der m/z Ratio von ionisierten Peptide/Matrix-Gemischen oder chromatografisch vorfraktionierten flüssigen Proben funktionieren. In diesem Bereich existieren mittlerweile viele unterschiedlich optimierte Methoden, die sich in der verwendeten Matrix, der Art der Peptidionisierung und durch die Kopplung einer Vorfraktionierung komplexer Gemische unterscheiden (,Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization MS', SELDI-MS; ,Electrospray-Ionization MS', ESI-MS; ,Liquid Chromatography MS', LC-MS). Außerdem steht eine große Auswahl verschiedener Massenspektrometer

mit unterschiedlichen Messeigenschaften zur Verfügung (‘time-of-flight‘ Messgeräte, TOF), lineare und quadrupole ‘ion traps’, ‘orbitraps’ und ‘Fourier-transform ion cyclotron resonance (FT-ICR)‘ Zellen [98]. Durch Kombination verschiedener MS-Techniken (‘Tandem MS’; ‘MS/MS’) ist ein breiter Spielraum für die Beantwortung der unterschiedlichsten Fragestellungen in der Proteinanalytik gegeben. Die Ausschöpfung der Möglichkeiten unter Kombination der verschiedenen Techniken bedarf weiterer Arbeiten und ist von der Etablierung dieser Techniken zugänglicher Gewebearchive abhängig. Eine Anpassung bei der Gestaltung von Gewebearchiven an die sich rasch weiterentwickelnden molekularen Analysemöglichkeiten in der Molekularpathologie könnte in Zukunft unabdingbar werden; hierzu zeigt die vorliegende Arbeit Perspektiven auf.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) und massenspektrometrische Proteinanalysen (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) für HOPE-fixierte Lungengewebe etabliert. Dabei wurden zwei IPG-Systeme mit Fokussierungsstreifen und ein komplexeres Kapillargelsystem benutzt und die jeweils optimalen Parameter für zukünftige Proteomuntersuchungen und retrospektive Analysen von archivierten Paraffingeweben zu Biomarkern ermittelt. Diese Untersuchungen wurden dann auf vier Moleküle angewendet, die parallel zu dieser Arbeit in einigen Fachpublikationen zu Biomarkern beschrieben werden. Dabei handelt es sich um Transketolase-like protein 1 (TKTL1), dessen Expression in Tumorgeweben der Lunge und Mamma untersucht wurde; pulmonales Haptoglobin (pHp), das sowohl an der Immunmodulation beteiligt ist als auch als Adenokarzinommarker identifiziert wurde; Annexin A8 (ANXA8), das eine potentielle Relevanz in Lungenkarzinomen hat und Double homeobox protein 4 (DUX4), einem in Lungenkrebs identifizierten Protein, von dem bisher lediglich nichttranslatierte mRNAs in gesunden, lebenden Organismen bzw. Fusionsprodukte in Sarkomen auftraten. Die Homeobox mit dem DUX4-Gen spielt außerdem bei Fazioskapulo-humerale Muskeldystrophie (FSHD) eine Rolle. Nach Informationen aus Transkriptomanalysen wurden diese Moleküle ausgewählt, mithilfe einer breit gefächerten Methodik auf Protein- und Nukleinsäureebene untersucht und validiert, wobei die etablierten Proteomuntersuchungen eingeschlossen wurden. Da für alle Untersuchungen die selben HOPE-fixierten Donorgewebe verwendet wurden, zeigt diese Arbeit beispielhaft neue Möglichkeiten an Paraffinmaterial auf, die sich neben der Verwendbarkeit in routinopathologischen Verfahrensweisen für Genom-, Transkriptom- und Proteomanalysen und deren Validierung durch andere molekulare Techniken ergeben.

Literaturverzeichnis

- [1] Abdullah M, Kähler D, Vock C, Reiling N, Kugler C, Drömann D, Rupp J, Hauber HP, Fehrenbach H, Zabel P, Vollmer E, Dalhoff K, Goldmann T: Pulmonary Haptoglobin and CD163 Are Functional Immunoregulatory Elements in the Human Lung. *Respiration* 83, 61-73 (2012)
- [2] Abdullah M, Marwitz S, Kähler D, Schultz H, Kugler C, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T: Pulmonary haptoglobin: a new marker for adenocarcinomas of the lung? *Pathology* 43, 70-72 (2011)
- [3] Abdullah M, Schultz H, Kähler D, Branscheid D, Dalhoff K, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T: Expression of the acute phase protein haptoglobin in human lung cancer and tumor-free lung tissues. *Pathol Res Pract* 205, 639-647 (2009)
- [4] Abdullah M: On the Role of Pulmonary Haptoglobin (pHp) and its Receptor (CD163) in the Human Lung. Diss. Lübeck (2010)
- [5] Acín P, Rayó J, Guerrero A, Quero C: Improved resolution in the acidic and basic region of 2-DE of insect antennae proteins using hydroxyethyl disulfide. *Electrophoresis* 30, 2613-2616 (2009)
- [6] Ahram M, Flaig MJ, Gillespie JW, Duray PH, Linehan WM, Ornstein DK, Niu S, Zhao Y, Petricoin EF 3rd, Emmert-Buck MR: Evaluation of ethanol-fixed, paraffin-embedded tissues for proteomic applications. *Proteomics* 3, 413–421 (2003)
- [7] An JY, Fan ZM, Zhuang ZH, Qin YR, Gao SS, Li JL, Wang LD: Proteomic analysis of blood level of proteins before and after operation in patients with esophageal squamous cell carcinoma at high-incidence area in Henan Province. *World J Gastroenterol* 10, 3365-3368 (2004)
- [8] Anderson L, Anderson NG: High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5421-5425 (1977)
- [9] Avila-Sakar AJ, Creutz CE, Kretsinger RH: Crystal structure of bovine annexin VI in a calcium-bound state. *Biochim Biophys Acta* 1387, 103-116 (1998)
- [10] Avital S, Elson D: A method for changing the pH of gel strips in the two-dimensional gel electrophoresis of ribosomal proteins. *Anal Biochem* 57, 287-289 (1974)
- [11] Awadallah SM, Atoum MF: Haptoglobin polymorphism in breast cancer patients from Jordan. *Clin Chim Acta* 341, 17-21 (2004)

- [12] Baharti A, Ma PC, Maulik G, Singh R, Khan E, Skarin AT, Salgia R: Haptoglobin alpha-subunit and hepatocyte growth factor can potentially serve as serum tumor biomarkers in small cell lung cancer. *Anticancer Res* 24, 1031–1038 (2004)
- [13] Barritault D, Expert-Bezançon A, Milet M, Hayes DH: Inexpensive and easily built small scale 2D electrophoresis equipment. *Anal Biochem* 70, 600-611 (1976)
- [14] Beckman G, Eklund A, Frohlander N, Stjernberg N: Haptoglobin groups and lung cancer. *Hum Hered* 36, 258-260 (1986)
- [15] Benkmann HG, Hanssen HP, Ovenbeck R, Goedde HW. Distribution of alpha-1-antitrypsin and haptoglobin phenotypes in bladder cancer patients. *Hum Hered* 37, 290-293 (1987)
- [16] Bharti A, Ma PC, Salgia R: Biomarker discovery in lung cancer - promises and challenges of clinical proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 26, 451-66 (2007)
- [17] Biorad manual, ProteanPlus Dodeca Cell Instruction manual, Katalog- Nr. 165-4150, 165-4151
- [18] Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W: Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 6, 317-339 (1982)
- [19] Bravo R, Celis JE: A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* 84, 795-802 (1980)
- [20] Brockmöller J, Kamp RM: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of ribosomal proteins in the nanogram range. *Biol Chem Hoppe Seyler* 366, 901-906 (1985)
- [21] Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG: Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25(9):1327-1333 (2004)
- [22] Clapp J, Mitchell LM, Bolland DJ, Fantes J, Corcoran AE, Scotting PJ, Armour JA, Hewitt JE: Evolutionary conservation of a coding function for D4Z4, the tandem DNA repeat mutated in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 81, 264-279 (2007)
- [23] Cogliano VJ, Grosse Y, Baan RA, Straif K, Secretan MB, El Ghissassi F: Meeting Report: Summary of IARC Monographs on Formaldehyde, 2-Butoxyethanol, and 1-tert-Butoxy-2-Propanol. *Environmental Health Perspectives* 113, 1205–1208 (2005)

- [24] Czempiel W, Klose J, Bass R: Mammalian mitochondrial ribosomes: characterization of ribosomal proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *FEBS Lett* 62, 259-262 (1976)
- [25] Dahabreh IJ, Linardou H, Kosmidis P, Bafaloukos D, Murray S: EGFR gene copy number as a predictive biomarker for patients receiving tyrosine kinase inhibitor treatment: a systematic review and meta-analysis in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 22, 545-552 (2011)
- [26] Dale G, Latner AL: Isoelectric focusing of serum proteins in acrylamide gels followed by electrophoresis. *Clin Chim Acta* 24, 61-8 (1969)
- [27] Dauterstadt P: Regulation der Bindung von Annexin 6 an endosomale Membranen. Dissertation aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie; Zentrum für Experimentelle Medizin des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf (2006)
- [28] Davenport L: Serum haptoglobin offers lung cancer detection hope. *Cancer* 110, 2260–2268 (2007)
- [29] Delanghe JR, Langlois MR: Haptoglobin polymorphism and body iron stores. *Clin Chem Lab Med* 40, 212-216 (2002)
- [30] Dixit M, Anseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, Sauvage S, Mattéotti C, van Acker AM, Leo O, Figlewicz D, Barro M, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppée F, Chen YW: DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 18157-18162 (2007)
- [31] Dunzendorfer U, Jung K, Ohlenschlager G: Transferrin, C3 complement, haptoglobin, plasminogen and alpha 2-microglobulin in patients with urogenital tumors. *Eur Urol* 6, 232-236 (1980)
- [32] Emans N, Gorvel JP, Walter C, Gerke V, Kellner R, Griffiths G, Gruenberg J: Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J Cell Biol* 120, 1357-1369 (1993)
- [33] Epelbaum R, Shalitin C, Segal R, Valansi C, Arselan I, Faraggi D, Leviov M, Ben-Shahar M, Haim N: Haptoglobin-related protein as a serum marker in malignant lymphoma. *Pathol Oncol Res* 4, 271-276 (1998)
- [34] Fedorovych IP, Tymochko MF, Fedevych IM, Fetsich TG, Korobov VM: Serum haptoglobin in lung cancer patients. *Ukr Biokhim Zh* 67, 103–105 (1995)

- [35] Ferro-Luzzi Ames G, Nikaido K: Phosphate-containing proteins of Salmonella typhimurium and Escherichia coli. Analysis by a new two-dimensional gel system. Eur J Biochem 115, 525-531 (1981)
- [36] Földi M, Stickeler E, Bau L, Kretz O, Watermann D, Gitsch G, Kayser G, Zur Hausen A, Coy JF: Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer. Oncol Rep 17, 841-845 (2007)
- [37] Futter CE, Felder S, Schlessinger J, Ullrich A, Hopkins CR: Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. J Cell Biol 120, 77-83 (1993)
- [38] Gabriëls J, Beckers MC, Ding H, De Vriese A, Plaisance S, van der Maarel SM, Padberg GW, Frants RR, Hewitt JE, Collen D, Belayew A: Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element. Gene 236, 25-32 (1999)
- [39] Garrels JI: Changes in protein synthesis during myogenesis in a clonal cell line. Dev Biol 73, 134-152 (1979)
- [40] Gasparic V, Bjellqvist B, Rosengarten A: schwedische Patent-Nr. 7514049-1 (1975)
- [41] Gerke V, Moss SE: Annexins: from structure to function. Physiol Rev. 82, 331-371 (2002)
- [42] Giambanco I, Verzini M, Donato R: Annexins V and VI in rat tissues during post-natal development: immunochemical measurements. Biochem Biophys Res Commun 196, 1221-6 (1993)
- [43] Goldmann T, Flohr AM, Escobar HM, Gerstmayer B, Janssen U, Bosio A, Loeschke S, Vollmer E, Bullderdiek J: The HOPE-technique permits Northern Blot and microarray analysis in paraffin-embedded tissues. Pathol Res Pract 200: 511-515 (2004)
- [44] Goldmann T, Vollmer E, Gerdes J: What's cooking? Detection of important biomarkers in HOPE-fixed paraffin embedded tissues eliminates the need for antigen retrieval. Am J Pathol 163, 2638-2640 (2003)
- [45] Goldmann T, Wiedern KH, Kühl H, Olert J, Branscheid D, Pechovsky D, Zissel G, Galle J, Müller-Quernheim J, Vollmer E: Assessment of transcriptional gene activity in-situ by application of HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. Pathol Res Pract 198, 91-95 (2002)

- [46] Görg A, Drews O, Lück C, Weiland F, Weiss W: 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* 30, 122-32 (2009)
- [47] Görg A, Postel W, Günther S: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546 (1988)
- [48] Görg A, Weiss W, Dunn MJ: Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* , 3665–3685 (2004)
- [49] Grabar P, Williams CA: [Method permitting the combined study of the electrophoretic and the immunochemical properties of protein mixtures; application to blood serum]. *Biochim Biophys Acta* 10, 193-194 (1953)
- [50] Graham C, Chilton-Macneill S, Zielenska M, Somers GR: The CIC-DUX4 fusion transcript is present in a subgroup of pediatric primitive round cell sarcomas. *Hum Pathol* Aug 1 [Epub ahead of print] (2011)
- [51] Han X, Aslanian A, Yates JR 3rd: Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol* 12, 483-490 (2008)
- [52] Harder T, Gerke V: The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin IIp11(2) complex. *J Cell Biol* 123, 1119-1132 (1993)
- [53] Harder T, Kellner R, Parton RG, Gruenberg J: Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 8, 533-545 (1997)
- [54] Heilmann E: Haptoglobin in various diseases. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* 104, 608–618 (1977)
- [55] Heo SH, Lee SJ, Ryoo HM, Park JY, Cho JY: Identification of putative serum glycoprotein biomarkers for human lung adenocarcinoma by multilectin affinity chromatography and LC-MS/MS. *Proteomics* 7, 292–302 (2007)
- [56] Hoffman WL, Ilan J: Complete solubilization of ribosomal proteins during the fractionation of mouse liver ribosomal proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Prep Biochem* 6, 13-26 (1976)
- [57] Hood BL, Conrads TP, Veenstra TD: Mass spectrometric analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue: unlocking the proteome within. *Proteomics* 6, 4106-4114 (2006)
- [58] Howard GA, Traut RR: Separation and radioautography of microgram quantities of ribosomal proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *FEBS Lett* 29, 177-180 (1973)
- [59] <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/vol88.php> (letzter Zugriff: 21.02.12)

- [60]http://www.matrixscience.com/help/scoring_help.html#PBM (letzter Zugriff: 21.02.12)
- [61]http://www.pdfdownload.org/pdf2html/view_online.php?url=http%3A%2F%2Fwww.siercheng.com%2FUploadFile%2F2008117125437693.pdf (letzter Zugriff: 21.02.12)
- [62]Hu LH, Yang JH, Zhang DT, Zhang S, Wang L, Cai PC, Zheng JF, Huang JS: The TKTL1 gene influences total transketolase activity and cell proliferation in human colon cancer LoVo cells. *Anticancer Drugs* 18, 427-433 (2007)
- [63]Invitrogen manual, ZOOM® IPGRunner™ System For isoelectric focusing of ZOOM® Strips, Katalog Nr. ZM0001, ZM0002, ZM0004 (2010)
- [64]Kähler D, Alexander C, Schultz H, Abdullah M, Branscheid D, Lindner B, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T: Proteomics out of the archive: Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry using HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem* 58, 221-228 (2010)
- [65]Kaltschmidt E, Wittmann HG: Ribosomal proteins. VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. *Anal Biochem* 36, 401-412 (1970)
- [66]Karas M, Hillenkamp F: Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60, 2299-2301 (1988)
- [67]Katargin AN, Pavlova LS, Kisseljov FL, Kisseljova NP: Hypermethylation of genomic 3.3-kb repeats is frequent event in HPV-positive cervical cancer. *BMC Med Genomics* 2, 30 (2009)
- [68]Kawamura-Saito M, Yamazaki Y, Kaneko K, Kawaguchi N, Kanda H, Mukai H, Gotoh T, Motoi T, Fukayama M, Aburatani H, Takizawa T, Nakamura T: Fusion between CIC and DUX4 up-regulates PEA3 family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation. *Hum Mol Genet* 15, 2125-2137 (2006)
- [69]Kenrick KG, Margolis J: Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. *Anal Biochem* 33, 204-207 (1970)
- [70]Kiernan JA: Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today* 00-1, 8-12 (2000)
- [71]Kim TE, Murren JR: Erlotinib OSI/Roche/Genentech. *Curr Opin Investig Drugs* 3, 1385-1395 (2002)

- [72] Klose J, Kobalz U: Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16, 1034-59 (1995)
- [73] Klose J: From 2D-Electrophoresis to Proteomics. *Electrophoresis* 30, 142–149 (2009)
- [74] Klose J: Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26, 231-243 (1975)
- [75] Kojima K, Utsumi H, Ogawa H, Matsumoto I: Highly polarized expression of carbohydrate-binding protein p33/41 (annexin IV) on the apical plasma membrane of epithelial cells in renal proximal tubules. *FEBS Lett* 342, 313-318 (1994)
- [76] Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK: Identification of the hemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409, 198-201 (2001)
- [77] Kuijpers GA, Lee G, Pollard HB: Immunolocalization of synexin (annexin VII) in adrenal chromaffin granules and chromaffin cells: evidence for a dynamic role in the secretory process. *Cell Tissue Res* 269, 323-330 (1992)
- [78] Kumar A, White TA, MacKenzie AP, Clegg N, Lee C, Dumpit RF, Coleman I, Ng SB, Salipante SJ, Rieder MJ, Nickerson DA, Corey E, Lange PH, Morrissey C, Vessella RL, Nelson PS, Shendure J: Exome sequencing identifies a spectrum of mutation frequencies in advanced and lethal prostate cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 17087-17092 (2011)
- [79] Langbein S, Frederiks WM, zur Hausen A, Popa J, Lehmann J, Weiss C, Alken P, Coy JF: Metastasis is promoted by a bioenergetic switch: new targets for progressive renal cell cancer. *Int J Cancer* 1, 2422-2428 (2008)
- [80] Langlois MR, Delanghe JR: Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 42, 1589-1600 (1996)
- [81] Le Cabec V, Maridonneau-Parini I: Annexin 3 is associated with cytoplasmic granules in neutrophils and monocytes and translocates to the plasma membrane in activated cells. *Biochem J* 303, 481-487 (1994)
- [82] Lin A, Collatz E, Wool IG: Micro-scale two-dimensional polyacrylamide gell electrophoresis of ribosomal proteins. *Mol Gen Genet* 44, 1-9 (1976)
- [83] López JL: Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 849, 190-202 (2007)

- [84] MacGillivray AJ, Rickwood D: The heterogeneity of mouse-chromatin nonhistone proteins as evidenced by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis and ion-exchange chromatography. *Eur J Biochem* 41, 181-190 (1974)
- [85] Macko V, Stegemann H: Mapping of potato proteins by combined electrofocusing and electrophoresis identification of varieties. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 350, 917-919 (1969)
- [86] Martínez-Navarro EM, Rebollo J, González-Manzano R, Sureda M, Evgenyeva E, Valenzuela B, Fernández FJ, Forteza J, Brugarolas A: Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in a series of non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients and response rate to EGFR-specific tyrosine kinase inhibitors (TKIs). *Clin Transl Oncol* 13, 812-818 (2011)
- [87] Martini OH, Gould HJ: Enumeration of rabbit reticulocyte ribosomal proteins. *J Mol Biol* 62, 403-405 (1971)
- [88] Massey D, Traverso V, Rigal A, Maroux S: Cellular and subcellular localization of annexin IV in rabbit intestinal epithelium, pancreas and liver. *Biol Cell* 73, 151-156 (1991)
- [89] Massey-Harroche D, Traverso V, Mayran N, Francou V, Vandewalle A, Maroux S: Changes in expression and subcellular localization of annexin IV in rabbit kidney proximal tubule cells during primary culture. *J Cell Physiol* 165, 313-322 (1995)
- [90] Masuda H, Battifora H, Yokota J, Meltzer S, Cline MJ: Specificity of protooncogene amplification in human malignant diseases. *Mol Biol Med* 4, 213-227 (1987)
- [91] Mayran N, Traverso V, Maroux S, Massey-Harroche D: Cellular and subcellular localizations of annexins I, IV, and VI in lung epithelia. *Am J Physiol* 270, 863-871 (1996)
- [92] Mets LJ, Bogorad L: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: an improved method for ribosomal proteins. *Anal Biochem* 57, 200-210 (1974)
- [93] Mitchell RJ, Carzino R, Janardhana V: Associations between the two serum proteins haptoglobin and transferrin and leukaemia. *Hum Hered* 38, 144-150 (1988)

- [94] Mizutani A, Usuda N, Tokumitsu H, Minami H, Yasui K, Kobayashi R, Hidaka H: CAP-50, a newly identified annexin, localizes in nuclei of cultured fibroblast 3Y1 cells. *J Biol Chem* 267, 13498-13504 (1992)
- [95] Mizutani A, Watanabe N, Kitao T, Tokumitsu H, Hidaka H: The long amino-terminal tail domain of annexin XI is necessary for its nuclear localization. *Arch Biochem Biophys* 318, 157-65 (1995)
- [96] Nakata T, Sobue K, Hirokawa N: Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 110, 13-25 (1990)
- [97] Nirmalan NJ, Hughes C, Peng J, McKenna T, Langridge J, Cairns DA, Harnden P, Selby PJ, Banks RE: Initial development and validation of a novel extraction method for quantitative mining of the formalin-fixed, paraffin-embedded tissue proteome for biomarker investigations. *J Proteome Res* 10, 896-906 (2011)
- [98] Ocak S, Chaurand P, Massion PP: Mass spectrometry-based proteomic profiling of lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 6, 159-170 (2009)
- [99] Ochmanski W: Haptoglobin system in lung cancer. *Folia Med Cracov* 21, 117-130 (1979)
- [100] O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021 (1975)
- [101] O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12, 1133-1141 (1977)
- [102] Oh SK, Pavlotsky N, Tauber AI: Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. *J Leukoc Biol* 47, 142-148 (1990)
- [103] Olert J, Wiedorn KH, Goldmann T, Köhl H, Mehraein Y, Scherthan H, Niketeghad F, Vollmer E, Müller AM, Müller-Navia J: HOPE-fixation: A novel fixing method and paraffin embedding technique for human soft tissues. *Pathol Res Pract* 197, 823-826 (2001)
- [104] Otto C, Kaemmerer U, Illert B, Muehling B, Pfetzer N, Wittig R, Voelker HU, Thiede A, Coy JF: Growth of human gastric cancer cells in nude mice is delayed by a ketogenic diet supplemented with omega-3 fatty acids and medium-chain triglycerides. *BMC Cancer* 8, 122 (2008)
- [105] Petersen I: The morphological and molecular diagnosis of lung cancer. *Dtsch Arztebl Int.* 108, 525-531, (2011)
- [106] Quiagen manual, RNeasy Mini Handbook 05/99

- [107] Raymond S, Weintraub L: Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* 130, 711 (1959)
- [108] Raymond S: Acrylamid Gel Electrophoresis. *Ann N Y Acad Sci* 121, 350-365 (1964)
- [109] Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) e. V. (eds): Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Edition, Berlin 2010
- [110] Robertson D: Genentech's anticancer Mab expected by November. *Nat Biotechnol* 16, 615 (1998)
- [111] Salvatore A, Cigliano L, Bucci EM, Corpillo D, Velasco S, Carlucci A, Pedone C, Abrescia P: Haptoglobin binding to apolipoprotein A-I prevents damage from hydroxyl radicals on its stimulatory activity of the enzyme lecithin-cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* 46, 11158-11168 (2007)
- [112] Schmidt M, Kammerer U, Segerer S, Cramer A, Kohrenhagen N, Dietl J, Voelker HU: Glucose metabolism and angiogenesis in granulosa cell tumors of the ovary: Activation of Akt, expression of M2PK, TKTL1 and VEGF. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 139, 72-78 (2008)
- [113] Schultz H, Kähler D, Branscheid D, Vollmer E, Zabel P, Goldmann T: TKTL1 is overexpressed in a large portion of non-small cell lung cancer specimens. *Diagn Pathol* 3, 35 (2008)
- [114] Seemann J, Weber K, Osborn M, Parton RG, Gerke V: The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca²⁺ and requires an intact N-terminal domain. *Mol Biol Cell*. 7, 1359-1374 (1996)
- [115] Selbert S, Fischer P, Pongratz D, Stewart M, Noegel AA: Expression and localization of annexin VII (synexin) in muscle cells. *J Cell Sci* 108, 85-95 (1995)
- [116] Sen Gupta R, Hillemann D, Kubica T, Zissel G, Muller-Quernheim J, Galle J, Vollmer E, Goldmann T: HOPE-fixation enables improved PCR-based detection and differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex in paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 199, 619-623 (2003)
- [117] Senda T, Okabe T, Matsuda M, Fujita H: Quick-freeze, deep-etch visualization of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localization and possible roles of actin and annexin II. *Cell Tissue Res* 277, 51-60 (1994)
- [118] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M: Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68:850–858 (1996)

- [119] Shi SR, Shi Y, Taylor CR: Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J Histochem Cytochem* 59, 13-32 (2011)
- [120] Smithies O, Poulik MD: Two-dimensional electrophoresis of serum proteins. *Nature* 177, 1033 (1956)
- [121] Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer CJ, Kennedy KM, Diepart C, Jordan BF, Kelley MJ, Gallez B, Wahl ML, Feron O, Dewhirst MW: Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 118, 3930-3942 (2008)
- [122] Spreca A, Rambotti MG, Giambanco I, Pula G, Bianchi R, Ceccarelli P, Donato R: Immunocytochemical localization of annexin V (CaBP33), a Ca(2+)-dependent phospholipid- and membrane-binding protein, in the rat nervous system and skeletal muscles and in the porcine heart. *J Cell Physiol* 152, 587-98 (1992)
- [123] Srinivasan M, Sedmark D, Jewel S: Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161, 1961-1971 (2002)
- [124] Staiger WI, Coy JF, Grobholz R, Hofheinz RD, Lukan N, Post S, Schwarzbach MH, Willeke F: Expression of the mutated transketolase TKTL1, a molecular marker in gastric cancer. *Oncol Rep* 6, 657-661 (2006)
- [125] Strauss GM, Skarin AT: Use of tumor markers in lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 8, 507-532 (1994)
- [126] Taylor J, Anderson NL, Scandora AE Jr, Willard KE, Anderson NG: Design and implementation of a prototype Human Protein Index. *Clin Chem* 28, 861-866 (1982)
- [127] Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink H K, Harris CC: Pathology & Genetics: Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. WHO Classification of Tumours, IARC Verlag (2004)
- [128] Tsai HY, Boonyapranai K, Sriyam S, Yu CJ, Wu SW, Khoo KH, Phutrakul S, Chen ST: Glycoproteomics analysis to identify a glycoform on haptoglobin associated with lung cancer. *Proteomics* 11, 2162-2170 (2011)
- [129] Uhlig U, Uhlig S, Brandscheid D, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T: HOPE-technique enables Western blot analysis from paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 200, 469-472 (2004)

- [130] Umland O, Ulmer AJ, Vollmer E, Goldmann T: In situ hybridization and immunohistochemistry using HOPE-fixed, cultured human cells on cytospin preparations. *J Histochem Cytochem* 51, 977-980 (2003)
- [131] 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* 16, 1090-1094 (1995)
- [132] Wice BM, Gordon JI: A strategy for isolation of cDNAs encoding proteins affecting human intestinal epithelial cell growth and differentiation: characterization of a novel gut-specific N-myristoylated annexin. *J Cell Biol* 116, 405-422 (1992)
- [133] Wiedorn KH, Olert J, Stacy R, Goldmann T, Kühl H, Matthus J, Vollmer E, Bosse A: Preservation of high molecular weight nucleic acids by application of the novel HOPE-fixative. *Pathol Res Pract* 198, 735-740 (2002)
- [134] WITA GmbH, 2D-Elektrophorese System NEPHGE, www.wita.de
- [135] Wittmann-Liebold B, Graack HR, Pohl T: Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics* 6, 4688-4703 (2006)
- [136] www.microarraystation.com (letzter Zugriff: 21.02.12)
- [137] Zabel C, Klose J: High-resolution large-gel 2DE. *Methods Mol Biol* 519, 311-338 (2009)
- [138] Zhang S, Yang JH, Guo CK, Cai PC: Gene silencing of TKTL1 by RNAi inhibits cell proliferation in human hepatoma cells. *Cancer Lett* 253, 108-114 (2007)
- [139] Zhao C, Annamalai L, Guo C, Kothandaraman N, Koh SC, Zhang H, Biswas A, Choolani M: Circulating haptoglobin is an independent prognostic factor in the sera of patients with epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 9,1-7 (2007)

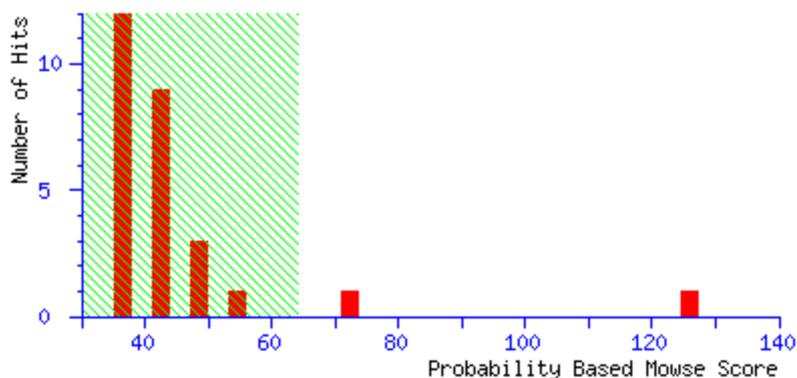
Keratin 10

Mascot Search Results

User : B.Lindner
 Email : blindner@fz-borstel.de
 Search title : Bande
 Database : MSDB 20060831 (3239079 sequences; 1079594700 residues)
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (148148 sequences)
 Timestamp : 11 Dec 2008 at 13:56:19 GMT
 Warning : **Specifying a protein mass disables query intensity in PMF-search**
 Warning : **Specifying a protein mass disables mixture mode in PMF-search**
 Top Score : 126 for **Q8N175_HUMAN**, Keratin 10.- Homo sapiens (Human).

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 64 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Search Parameters

Type of search : Peptide Mass Fingerprint
 Enzyme : Trypsin

Format As Concise Protein Summary [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 3

Re-Search All Search Unmatched

1. **Q8N175_HUMAN** Mass: 58792 Score: **126** Expect: 3.7e-08 Queries matched: 29
 Keratin 10.- Homo sapiens (Human).
KRHU0 Mass: 59492 Score: **115** Expect: 4.7e-07 Queries matched: 28
 keratin 10, type I, cytoskeletal - human
K1C10_HUMAN Mass: 59483 Score: **115** Expect: 4.7e-07 Queries matched: 28
 Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin-10) (CK-10) (Keratin-10) (K10).- Homo sapiens (Human).
AAA59199 Mass: 39718 Score: **95** Expect: 4.3e-05 Queries matched: 22
 HUMK10A NID: - Homo sapiens
A31994 Mass: 57213 Score: 56 Expect: 0.37 Queries matched: 19
 keratin 10, type I, epidermal - human
 2. **AAA59468** Mass: 46359 Score: **75** Expect: 0.0051 Queries matched: 20
 HUMKRT10A NID: - Homo sapiens
 3. **CAA08974** Mass: 62562 Score: 53 Expect: 0.74 Queries matched: 23
 AJ010046 NID: - Homo sapiens
Q5SQI5_HUMAN Mass: 67698 Score: 48 Expect: 2.3 Queries matched: 22
 Neuroepithelial cell transforming gene 1.- Homo sapiens (Human).
Q5SQI7_HUMAN Mass: 61846 Score: 46 Expect: 3.7 Queries matched: 21
 Neuroepithelial cell transforming gene 1.- Homo sapiens (Human).
Q59EF9_HUMAN Mass: 70576 Score: 45 Expect: 4.6 Queries matched: 22
 Neuroepithelial cell transforming gene 1 protein variant (Fragment).- Homo sapiens (Human).
G01210 Mass: 52821 Score: 41 Expect: 11 Queries matched: 20
 guanine nucleotide regulatory protein - human

Variable modifications : Carbamidomethyl (C),Oxidation (M)

Mass values : Monoisotopic

Protein Mass : 60 kDa

Peptide Mass Tolerance : ± 0.3 Da

Peptide Charge State : 1+

Max Missed Cleavages : 1

Number of queries : 130

Mascot Search Results

Protein View

Match to: **Q8N175_HUMAN** Score: 126 Expect: 3.7e-08

Keratin 10.- Homo sapiens (Human).

Nominal mass (Mr): **58792**; Calculated pI value: 5.09

NCBI BLAST search of **Q8N175_HUMAN** against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: **Homo sapiens**

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:

[AAH34697](#) from **Homo sapiens**

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **130**

Number of mass values matched: **29**

Sequence Coverage: **52%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

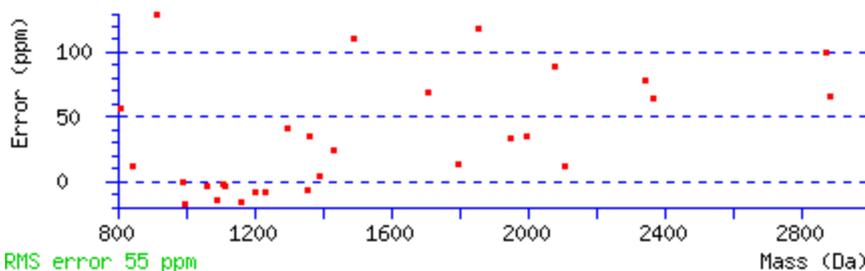
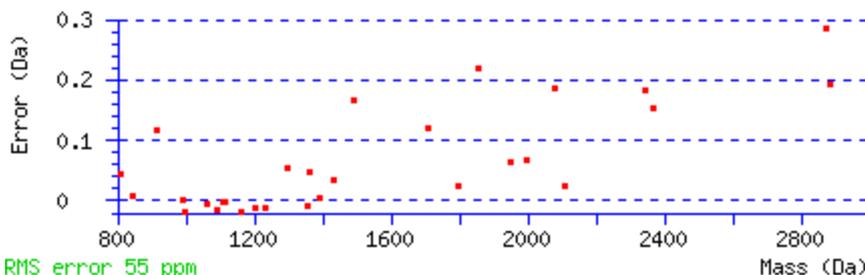
1 MSVRYSSSKH YSSSRSGGGG GGGGGGGGG VSSLRISSSK GSLGGFSSG
51 GFSGGFSFRG SSSGGCFGGG SGGYGLGGF GGSFRGSYG SSSFGGSYGG
101 SFGGGSFSGG SFGGGSFSGG GFGGGGFGG FGGFPGDGG LLSGNEKVTM
151 QNLNDRLASV LDKVRALEES NYELEGKIKE WYEKHNHQ GEPRDYKYY
201 KTIDDLKNQI LNLTTDNANI LLQIDNARLA ADDFRKLYEN EVALRQSVEA
251 DINGLRRVLD ELFLTKADLE MQIESLTEL AYLRKNHEEE MKDLRNVSTG
301 DVNVEMNAAP GVDLTQLNN MRSQYQLAE QNRKDAEAWF NEKSKELTTE
351 IDNNIEQISS YKSEITELRR NVQALEIELQ SQLALKQSLA ASLAETEGRY
401 CVQLSQIQAQ ISALEEQLOQ IRAETECQNT EYQQLLDIKI RLENEIQTYR
451 SLLEGGSSG GGRGGGSGF GYGGGSSGG GSSGGYGGG HGGSSGGYG
501 GSSGGSSG GYGGSSG GHGSSSGY GGSGGGGG GYGGSSGGG
551 SSSGGYGGG SSSGHKSSS SGVGESSK GPRY

Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Start - End Observed Mr (expt) Mr (calc) Delta Miss Sequence

1 - 9 1060.5051 1059.4978 1059.5019 -0.0041 1 -MSVRYSSSK.H Oxidation (M)
 16 - 35 1492.8220 1491.8147 1491.6485 0.1662 0 R.SGGGGGGGGGGGGVSSLR.I
 41 - 59 1707.8909 1706.8837 1706.7649 0.1188 0 K.GSLGGFSSGGFSGFSR.G
 60 - 86 2343.1665 2342.1592 2341.9771 0.1820 0 R.GSSGGGCFGGSSGGYGLGGFSGFSR.G Carbamidomethyl (C)
 148 - 156 1090.5152 1089.5080 1089.5237 -0.0157 0 K.VTMQNLNDR.L
 178 - 184 995.5025 994.4952 994.5123 -0.0172 1 K.IKEWYK.H
 180 - 194 1854.0513 1853.0441 1852.8241 0.2200 1 K.EWYKHNHQGEPR.D
 185 - 194 1118.5051 1117.4979 1117.5013 -0.0035 0 K.HGNSHQGEPR.D
 208 - 228 2367.4144 2366.4071 2366.2553 0.1518 0 K.NQILNLTNDNANILLQIDNAR.L
 229 - 235 807.4448 806.4376 806.3923 0.0453 0 R.LAADDR.L
 236 - 245 1234.6688 1233.6615 1233.6717 -0.0102 1 R.LKYNEVALR.Q
 238 - 245 993.5000 992.4927 992.4927 0.0000 0 K.YENEVALR.Q
 246 - 256 1201.6065 1200.5993 1200.6098 -0.0106 0 R.QSVEADINGLR.R
 246 - 257 1357.7094 1356.7021 1356.7110 -0.0089 1 R.QSVEADINGLR.V
 267 - 284 2112.0667 2111.0594 2111.0343 0.0251 0 K.ADLEMQTESLTELAYLK.K Oxidation (M)
 286 - 292 916.5013 915.4940 915.3756 0.1184 0 K.NHEEEMK.D
 286 - 295 1300.6478 1299.6405 1299.5877 0.0528 1 K.NHEEEMKDLR.N
 296 - 322 2872.6782 2871.6709 2871.3855 0.2854 0 R.NVSTGDVNVEMNAAPGVDLTQLNNMR.S
 296 - 322 2888.5795 2887.5722 2887.3804 0.1918 0 R.NVSTGDVNVEMNAAPGVDLTQLNNMR.S Oxidation (M)
 323 - 333 1365.6877 1364.6804 1364.6320 0.0484 0 R.SQYQLAEQNR.K
 335 - 343 1109.4869 1108.4796 1108.4825 -0.0029 0 K.DAEAWFNEK.S
 346 - 362 1997.0393 1996.0320 1995.9636 0.0684 0 K.ELTTEIDNNIEQISSYK.S
 363 - 369 847.4616 846.4543 846.4447 0.0096 0 K.SEITELR.R
 370 - 386 1953.1773 1952.1700 1952.1054 0.0646 1 R.NVQALEIELQSQLALK.Q
 371 - 386 1797.0354 1796.0281 1796.0043 0.0238 0 R.NVQALEIELQSQLALK.Q
 387 - 399 1390.6870 1389.6797 1389.6736 0.0062 0 K.QSLEASLAETEGR.Y
 423 - 439 2083.1515 2082.1442 2081.9575 0.1867 0 R.AETECQNTYQQLLDIK.I Carbamidomethyl (C)
 440 - 450 1434.8039 1433.7966 1433.7626 0.0340 1 K.IRLENEIQTYR.S
 442 - 450 1165.5657 1164.5585 1164.5775 -0.0190 0 R.LENEIQTYR.S

No match to: 522.2578, 524.1608, 568.1656, 634.2840, 659.3914, 662.3299, 702.4056, 722.3794, 805.4264, 832.4023, 836.3862, 889.5382, 891.4694, 905.4463



>P1;Q8N175_HUMAN
 Keratin 10.- Homo sapiens (Human).
 C:Species Q8N175_HUMAN: Homo sapiens (Human).
 C:Species AAH34697: Homo sapiens
 C:Family: Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Ho
 C:Accession: Q8N175;
 C:Gene name: Name=KRT10;
 C:Reference [1]
 C:NUCLEOTIDE SEQUENCE.
 C:TISSUE=Skin;
 C:MEDLINE=22388257; PubMed=12477932; DOI=10.1073/pnas.242603899;

R;Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., Derge J.G., Klausner R.D., Collins F.S., Wagner L., Shenmen C.M., Schuler G.D., Altschul S.F., Zeeberg B
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903(2002).
C;Reference [2]
C;NUCLEOTIDE SEQUENCE.
C;TISSUE=Skin;
R;Strausberg R.;
Submitted (JUL-2002) to the EMBL/GenBank/DBJ databases.
C;01-OCT-2002, integrated into UniProtKB/TrEMBL.
C;01-OCT-2002, sequence version 1.
C;13-JUN-2006, entry version 20.
C;- SIMILARITY: Belongs to the intermediate filament family.
C;-----
C;Copyrighted by the UniProt Consortium, see <http://www.uniprot.org/terms>
C;Distributed under the Creative Commons Attribution-NoDerivs License
C;-----
C;EMBL; BC034697; AAH34697.1; -; mRNA.
C;UniGene; Hs.99936; -.
Show predicted peptides also
Sort Peptides By

C;HSSP; P08670; 1GK7.
C;Ensembl; ENSG00000186395; Homo sapiens.
C;RZPD-ProtExp; D0026; -.
C;GO; GO:0005882; C:intermediate filament; IEA.
C;GO; GO:0005198; F:structural molecule activity; IEA.
C;InterPro; IPR011000; Apolp_III_like.
C;InterPro; IPR001664; IF.
C;InterPro; IPR002957; Keratin_I.
C;Pfam; PF00038; Filament; 1.
C;PRINTS; PR01248; TYPE1KERATIN.
C;PROSITE; PS00226; IF; 1.
C;Keywords: Intermediate filament; Keratin.
C;SRCD TREMBL
C;IDN_GENBANK AAH34697;

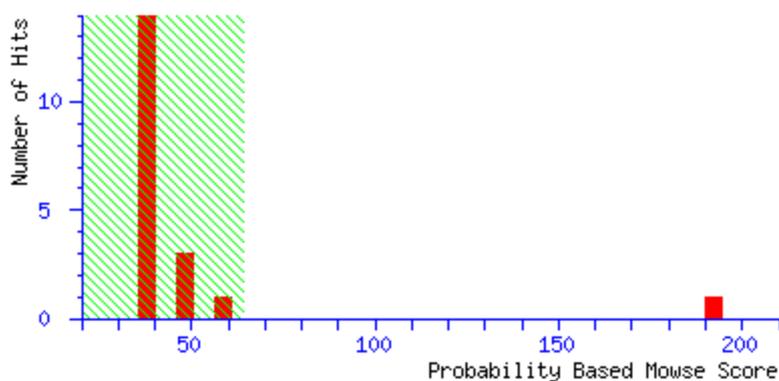
Humanes Serumalbumin

Mascot Search Results

User : B.Lindner
 Email : blindner@fz-borstel.de
 Search title : Bande
 Database : MSDB 20060831 (3239079 sequences; 1079594700 residues)
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (148148 sequences)
 Timestamp : 11 Dec 2008 at 14:32:04 GMT
 Top Score : 192 for **1A06A**, serum albumin, chain A - human

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 64 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As Concise Protein Summary [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 3

Re-Search All Search Unmatched

1. **1A06A** Mass: 65695 Score: **192** Expect: $9.3e-15$ Queries matched: 38
 serum albumin, chain A - human
1BJ5 Mass: 66130 Score: **189** Expect: $1.9e-14$ Queries matched: 38
 serum albumin - human
1UOR Mass: 65936 Score: **188** Expect: $2.3e-14$ Queries matched: 38
 serum albumin - human
1BKE Mass: 65993 Score: **187** Expect: $3e-14$ Queries matched: 38
 serum albumin - human
CAA01217 Mass: 66429 Score: **185** Expect: $4.7e-14$ Queries matched: 38
 MATURE HSA (FRAGMENT).- Homo sapiens (Human).
ABHUS Mass: 69321 Score: **169** Expect: $1.9e-12$ Queries matched: 38
 serum albumin precursor [validated] - human
CAA01491 Mass: 69321 Score: **161** Expect: $1.2e-11$ Queries matched: 38
 Serum albumin.- Homo sapiens (Human).
Q5D0D7_HUMAN Mass: 71658 Score: **159** Expect: $1.9e-11$ Queries matched: 38
 ALB protein.- Homo sapiens (Human).
CAA00298 Mass: 66592 Score: **170** Expect: $1.5e-12$ Queries matched: 37
 SERUM ALBUMIN.- Homo sapiens (Human).
E973181 Mass: 66358 Score: **165** Expect: $4.7e-12$ Queries matched: 36
 HUMAN ALPHA-FETOPROTEIN.- Homo sapiens (Human).
CAH18185 Mass: 69357 Score: **160** Expect: $1.5e-11$ Queries matched: 37

Search Parameters

Type of search : Peptide Mass Fingerprint
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.3 Da
 Peptide Charge State : 1+
 Max Missed Cleavages : 1
 Number of queries : 94
 CR749331 NID: - Homo sapiens

AAN17825 **Mass:** 69349 **Score:** 158 **Expect:** 2.3e-11 **Queries matched:** 37
AF542069 NID: - Homo sapiens
AAF01333 **Mass:** 69180 **Score:** 155 **Expect:** 4.7e-11 **Queries matched:** 36
AF190168 NID: - Homo sapiens
CAA23753 **Mass:** 69250 **Score:** 151 **Expect:** 1.2e-10 **Queries matched:** 36
HSALB1 NID: - Homo sapiens
AAA98798 **Mass:** 69181 **Score:** 150 **Expect:** 1.5e-10 **Queries matched:** 36
HUMALBGC NID: - Homo sapiens
Q56G89_HUMAN **Mass:** 69039 **Score:** 149 **Expect:** 1.9e-10 **Queries matched:** 36
Serum albumin.- Homo sapiens (Human).
AAA64922 **Mass:** 52048 **Score:** 147 **Expect:** 3e-10 **Queries matched:** 31
HSU22961 NID: - Homo sapiens
AAG35503 **Mass:** 56745 **Score:** 144 **Expect:** 5.9e-10 **Queries matched:** 33
AF130077 NID: - Homo sapiens
Q86YG0_HUMAN **Mass:** 47330 **Score:** 111 **Expect:** 1.2e-06 **Queries matched:** 25
ALB protein (Growth-inhibiting protein 20).- Homo sapiens (Human).
Q8IU7_HUMAN **Mass:** 45130 **Score:** 93 **Expect:** 6.9e-05 **Queries matched:** 23
ALB protein.- Homo sapiens (Human).
AAF22034 **Mass:** 29229 **Score:** 72 **Expect:** 0.01 **Queries matched:** 17
AF118090 NID: - Homo sapiens
AAF69644 **Mass:** 32553 **Score:** 70 **Expect:** 0.014 **Queries matched:** 17
AF119890 NID: - Homo sapiens
AAF71067 **Mass:** 32150 **Score:** 60 **Expect:** 0.14 **Queries matched:** 16
AF116645 NID: - Homo sapiens
AAH14308 **Mass:** 22638 **Score:** 46 **Expect:** 3.4 **Queries matched:** 11
BC014308 NID: - Homo sapiens
AAQ89947 **Mass:** 19331 **Score:** 41 **Expect:** 13 **Queries matched:** 10
AY358313 NID: - Homo sapiens
2. CAI93196 **Mass:** 24256 **Score:** 55 **Expect:** 0.51 **Queries matched:** 12
CS070272 NID: - Homo sapiens
3. AAH69585 **Mass:** 53466 **Score:** 49 **Expect:** 1.8 **Queries matched:** 19
BC069585 NID: - Homo sapiens
Q9NSB0_HUMAN **Mass:** 12851 **Score:** 38 **Expect:** 22 **Queries matched:** 9
Type II hair keratin 6 (Fragment).- Homo sapiens (Human).

Mascot Search Results

Protein View

Match to: **1A06A** Score: **154** Expect: **5.9e-11**

serum albumin, chain A - human

Nominal mass (Mr): **65695**; Calculated pI value: **5.63**

NCBI BLAST search of **1A06A** against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: **Homo sapiens**

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:

[1A06B](#) from **Homo sapiens**

[1BMOA](#) from **Homo sapiens**

[1BMOB](#) from **Homo sapiens**

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **94**

Number of mass values matched: **38**

Sequence Coverage: **65%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

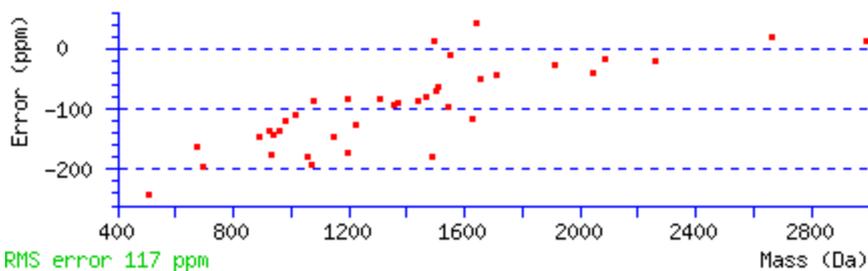
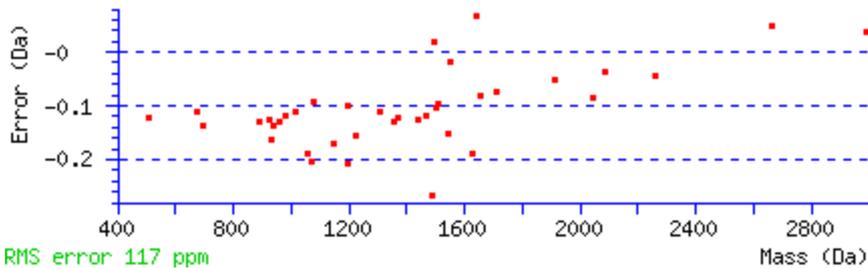
1 SEVAHRFKDL GEEFNKALVL IAFAYLQQC PFEDHVKLVN EVTEFAKTCV
51 ADESAENCDK SLHFLFGDKL CTVATLRETY GEMADCCAKQ EPERNECFIQ
101 HKDDNPNLPR LVRPEVDVMC TAFHDNEETF LKYLVEIAR RHPYFYAPEL
151 LFFAKRYKAA FTECCQAADK AACLLPKLDE LRDEGKASSA KQRLKCSLQ
201 KFGERAFKAW AVARLSQRFF KAEFAEVSKL VTDLTKVHTE CCHGDLLECA
251 DDRADLAKYI CENQDSISSK LKECCEKPLL EKSHCIAEVE NDEMPADLPS
301 LAADFVESKD VCKNYAEAKD VFLGMFLYEV ARRHPDYSVV LLLRLAKTYE
351 TTLEKCCAAA DPHECYAKVF DEFKPLVEEP ONLIKQNCLE FEQLGEYKFO
401 NALLVRYTKK VPQVSTPTLV EVSRNLGKVG SKCCKHPEAK RMPCAEDYLS
451 VVLNQLCVLH EKTPVSDRVT KCCTESLVNR RPFCSALEVD ETVYVPKFN
501 ETTFTHADIC TLSEKERQIK QQTALVELVK HKPKATKQL KAVMDDFAAF
551 VEKCKADDK ETCFAEEGK LVAASQAA

Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Start - End Observed Mr(expt) Mr(calcd) Delta Miss Sequence

1 - 6 698.2222 697.2150 697.3507 -0.1358 0 -.SEVAHR.F
 7 - 16 1226.4506 1225.4433 1225.5979 -0.1546 1 R.FKDLGEEFNK.A
 38 - 47 1149.4461 1148.4388 1148.6077 -0.1689 0 K.LVNEVTEFAK.T
 61 - 69 1017.4261 1016.4188 1016.5291 -0.1103 0 K.SLHFLFGDK.L
 70 - 77 933.3547 932.3474 932.5113 -0.1639 0 K.LCTVATLR.E Carbamidomethyl (C)
 90 - 102 1714.7227 1713.7154 1713.7893 -0.0738 1 K.QEPERNECFIQH.K Carbamidomethyl (C)
 95 - 102 1075.4057 1074.3984 1074.4917 -0.0932 0 R.NECLFQHK.D Carbamidomethyl (C)
 103 - 110 940.3126 939.3053 939.4410 -0.1357 0 K.DDDNPNLPR.L
 111 - 132 2666.3090 2665.3017 2665.2516 0.0501 0 R.LVRPEVDVMCTAFHDNEETF.LK Carbamidomethyl (C); Oxidation (M)
 133 - 140 1055.4001 1054.3929 1054.5811 -0.1882 1 K.KYLVEIAR.R
 134 - 140 927.3682 926.3610 926.4861 -0.1252 0 K.YLVEIAR.R
 159 - 170 1371.4444 1370.4371 1370.5595 -0.1224 0 K.AAFTECCQAADK.A 2 Carbamidomethyl (C)
 178 - 186 1074.3375 1073.3303 1073.5353 -0.2050 1 K.LDELRLDEGK.A
 183 - 191 892.3075 891.3002 891.4297 -0.1295 1 R.DEGKASSA.Q
 196 - 205 1195.3812 1194.3739 1194.5815 -0.2076 1 K.CASLQKFGER.A Carbamidomethyl (C)
 202 - 205 508.1281 507.1209 507.2441 -0.1233 0 K.FGER.A
 209 - 214 673.2677 672.2605 672.3707 -0.1103 0 K.AWAVAR.L
 237 - 253 2086.8018 2085.7945 2085.8303 -0.0357 0 K.VHTECCCHGDLLECAADR.A 3 Carbamidomethyl (C)
 259 - 270 1443.5166 1442.5094 1442.6347 -0.1254 0 K.YICENQDSISSK.L Carbamidomethyl (C)
 259 - 272 1627.6122 1626.6050 1626.7923 -0.1873 1 K.YICENQDSISSK.L.E
 271 - 282 1546.6462 1545.6390 1545.7894 -0.1505 1 K.LKECCEKPLLEK.S 2 Carbamidomethyl (C)
 283 - 309 2990.3754 2989.3681 2989.3321 0.0360 0 K.SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK.D Carbamidomethyl (C); Oxidation (M)
 320 - 332 1639.8500 1638.8427 1638.7752 0.0675 0 K.DVFLGMFLYEVYAR.R Oxidation (M)
 333 - 344 1467.7244 1466.7172 1466.8358 -0.1186 1 R.RHPDYSVVLRL.L
 334 - 344 1311.6318 1310.6245 1310.7347 -0.1102 0 R.RHPDYSVVLRL.L
 348 - 355 984.3696 983.3623 983.4811 -0.1188 0 K.TYETLEK.C
 356 - 368 1495.5963 1494.5890 1494.5690 0.0200 0 K.CCAAADPHECYAK.V 2 Carbamidomethyl (C)
 356 - 368 1552.5807 1551.5734 1551.5905 -0.0170 0 K.CCAAADPHECYAK.V 3 Carbamidomethyl (C)
 369 - 385 2045.0114 2044.0041 2044.0881 -0.0840 0 K.VDEFKPLVEEPQNLK.Q
 386 - 398 1657.6708 1656.6635 1656.7453 -0.0818 0 K.QNCLFEQLGEYK.F Carbamidomethyl (C)
 399 - 406 960.4321 959.4248 959.5552 -0.1304 0 K.FQNALLVR.Y
 411 - 424 1511.7480 1510.7407 1510.8355 -0.0948 0 K.VPQVSTPTLVEVSR.N
 481 - 496 1910.8788 1909.8715 1909.9244 -0.0529 0 R.RPCFSALEVDVTVPK.E Carbamidomethyl (C)
 497 - 515 2259.9773 2258.9700 2259.0154 -0.0454 0 K.EFNAETFTFHADICTLSEK.E Carbamidomethyl (C)
 522 - 534 1490.6366 1489.6293 1489.8980 -0.2687 1 K.QTALVELVKHKPK.A
 542 - 553 1358.5013 1357.4940 1357.6224 -0.1284 0 K.AVMDDFAAFVEK.C Oxidation (M)
 557 - 569 1499.5284 1498.5212 1498.6246 -0.1034 1 K.ADDKETCFAEEGK.K Carbamidomethyl (C)
 561 - 570 1198.4391 1197.4319 1197.5336 -0.1017 1 K.ETCFAEEGK.L Carbamidomethyl (C)

No match to: 522.0421, 524.0298, 526.0386, 531.1954, 550.0121, 563.1199, 568.0444, 572.1834, 629.1801, 659.2488, 662.2015, 755.2486, 805.2887, 813.3056



>P1:1A06A
 serum albumin, chain A - human
 N:PDB title: crystal structure of human serum albumin

C:Species 1A06A: Homo sapiens (man)
C:Species 1A06B: Homo sapiens (man)
C:Species 1BMOA: Homo sapiens (man)
C:Species 1BMOB: Homo sapiens (man)
A:Note: plasma
R:Sugio, S.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kashima, A.
submitted to the Protein Data Bank, July 1997
A:Reference number: A76327; PDB:1A06
R:Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K.
Protein Eng. 12, 439, 1999
A:Title: Crystal structure of human serum albumin at 2.5 angstrom resolution.
A:Reference number: TN077487
R:Carter, D.C.; Ho, J.X.
Adv. Protein Chem. 45, 153, 1994
A:Title: Structure of serum albumin.
Show predicted peptides also
Sort Peptides By
A:Reference number: TN077488
R:Carter, D.C.; Chang, B.; Ho, J.X.; Keeling, K.; Krishnasami, Z.
Eur. J. Biochem. 226, 1049, 1994
A:Title: Preliminary crystallographic studies of four crystal forms of serum albumin.
A:Reference number: TN077489
R:He, X.M.; Carter, D.C.
Nature 364, 362, 1993
A:Title: Erratum. atomic structure and chemistry of human serum albumin.
A:Reference number: TN077490
R:He, X.M.; Carter, D.C.
Nature 358, 209, 1992
A:Title: Atomic structure and chemistry of human serum albumin.
A:Reference number: TN077491
R:Carter, D.C.; He, X.M.
Science 249, 302, 1990
A:Title: Structure of human serum albumin.
A:Reference number: TN077492
R:Carter, D.C.; He, X.M.; Munson, S.H.; Twigg, P.D.; Gernert, K.M.; Broom, M.B.; Miller, T.Y.
Science 244, 1195, 1989
A:Title: Three-dimensional structure of human serum albumin.
A:Reference number: TN077493
C:Resolution: 2.50 angstroms
C:Determination: X-ray diffraction
C:R-value: 0.218
C:Keywords: carrier protein; albumin
F:1-9/Region: helix (right hand alpha)
F:12-27/Region: helix (right hand alpha)
F:31-52/Region: helix (right hand alpha)
F:61-72/Region: helix (right hand alpha)
F:84-88/Region: helix (right hand alpha)
F:91-101/Region: helix (right hand alpha)
F:115-124/Region: helix (right hand alpha)
F:127-142/Region: helix (right hand alpha)
F:146-166/Region: helix (right hand alpha)
F:169-191/Region: helix (right hand alpha) (b4a is fused with cla.)
F:192-201/Region: helix (right hand alpha)
F:204-219/Region: helix (right hand alpha)
F:223-243/Region: helix (right hand alpha)
F:246-264/Region: helix (right hand alpha)
F:271-276/Region: helix (right hand alpha)
F:279-288/Region: helix (right hand alpha)
F:310-317/Region: helix (right hand alpha)
F:320-334/Region: helix (right hand alpha)
F:338-358/Region: helix (right hand alpha)
F:361-379/Region: helix (right hand alpha) (d4a is fused with ela.)
F:380-394/Region: helix (right hand alpha)
F:397-411/Region: helix (right hand alpha)
F:415-434/Region: helix (right hand alpha)
F:440-463/Region: helix (right hand alpha)
F:466-475/Region: helix (right hand alpha)
F:479-487/Region: helix (right hand alpha)
F:506-511/Region: helix (right hand alpha)
F:514-532/Region: helix (right hand alpha)
F:538-556/Region: helix (right hand alpha)
F:561-578/Region: helix (right hand alpha)
F:49-58/Disulfide bonds:
F:71-87/Disulfide bonds:
F:86-97/Disulfide bonds:
F:120-165/Disulfide bonds:
F:164-173/Disulfide bonds:
F:196-242/Disulfide bonds:
F:241-249/Disulfide bonds:
F:261-275/Disulfide bonds:
F:274-285/Disulfide bonds:
F:312-357/Disulfide bonds:
F:356-365/Disulfide bonds:
F:388-434/Disulfide bonds:
F:433-444/Disulfide bonds:
F:457-473/Disulfide bonds:
F:472-483/Disulfide bonds:
F:510-555/Disulfide bonds:
F:554-563/Disulfide bonds:
C:IDN_NRL_3D 1A06B; 1BMOA; 1BMOB;
C:SRCDB_NRL_3D

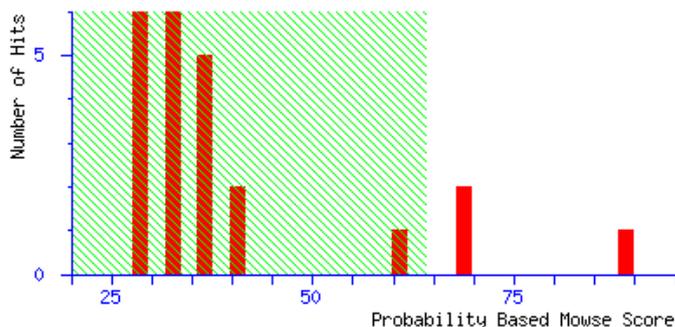
Tropomyosin

Mascot Search Results

User : B.Lindner
 Email : blindner@fz-borstel.de
 Search title : Bande
 Database : MSDB 20060831 (3239079 sequences; 1079594700 residues)
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (148148 sequences)
 Timestamp : 11 Dec 2008 at 14:48:55 GMT
 Top Score : 89 for **Q5R4B9_PONPY**, Hypothetical protein DKFZp459L1711.- Pongo pygmaeus (Orangutan).

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 64 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As Concise Protein Summary [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 3

Re-Search All Search Unmatched

1. **Q5R4B9_PONPY** Mass: 28743 Score: 89 Expect: 0.0002 Queries matched: 13
 Hypothetical protein DKFZp459L1711.- Pongo pygmaeus (Orangutan).
Q5VU58_HUMAN Mass: 28905 Score: 82 Expect: 0.00083 Queries matched: 13
 Tropomyosin 3.- Homo sapiens (Human).
Q5HYB6_HUMAN Mass: 27159 Score: 80 Expect: 0.0014 Queries matched: 13
 Hypothetical protein DKFZp686J1372.- Homo sapiens (Human).
Q5VU72_HUMAN Mass: 28776 Score: 76 Expect: 0.0038 Queries matched: 12
 Tropomyosin 3.- Homo sapiens (Human).
Q8TCG3_HUMAN Mass: 28792 Score: 70 Expect: 0.013 Queries matched: 12
 TPMsk3 (Fragment).- Homo sapiens (Human).
Q5VU66_HUMAN Mass: 28853 Score: 70 Expect: 0.014 Queries matched: 12
 Tropomyosin 3.- Homo sapiens (Human).
AAF87083 Mass: 28938 Score: 70 Expect: 0.014 Queries matched: 12
 AY004867 NID: - Homo sapiens
Q5VU59_HUMAN Mass: 27158 Score: 68 Expect: 0.022 Queries matched: 12
 Tropomyosin 3.- Homo sapiens (Human).
A25530 Mass: 29015 Score: 65 Expect: 0.048 Queries matched: 12
 tropomyosin, fibroblast - human
Q6P5R0_HUMAN Mass: 18481 Score: 39 Expect: 19 Queries matched: 7
 TPM3 protein (Tropomyosin 3).- Homo sapiens (Human).
Q8NAG3_HUMAN Mass: 21517 Score: 38 Expect: 23 Queries matched: 8
 CDNA FLJ35393 fis, clone SKNSH2000971, highly similar to TROPOMYOSIN, CYTOSKELETAL TYPE.- Homo sapiens (Human).
Q5VU61_HUMAN Mass: 26265 Score: 33 Expect: 74 Queries matched: 8
 Tropomyosin 3.- Homo sapiens (Human).
Q511H8_CVHNL Mass: 4647 Score: 29 Expect: 1.7e+02 Queries matched: 3
 Replicase polyprotein 1A (Fragment).- Human coronavirus (strain NL63) (HCoV-NL63).
 2. **TPM4_HUMAN** Mass: 28373 Score: 69 Expect: 0.017 Queries matched: 13
 Tropomyosin alpha-4 chain (Tropomyosin-4) (TM30p1).- Homo sapiens (Human).
S07282 Mass: 28504 Score: 68 Expect: 0.026 Queries matched: 13
 tropomyosin TM30-pl, fibroblast - human
AAK17926 Mass: 36565 Score: 52 Expect: 0.98 Queries matched: 13
 Tropomyosin 4-anaplastic lymphoma kinase fusion protein (Fragment).- Homo sapiens (Human).
AAH02827 Mass: 28552 Score: 41 Expect: 13 Queries matched: 10
 BC002827 NID: - Homo sapiens
 3. **AAG17014** Mass: 27513 Score: 67 Expect: 0.028 Queries matched: 14
 TPM4-ALK fusion oncoprotein type 2 (Fragment).- Homo sapiens (Human).

Search Parameters

Type of search : Peptide Mass Fingerprint
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 0.4 Da
 Peptide Charge State : 1+
 Max Missed Cleavages : 1
 Number of queries : 52
 Selected for scoring : 47

Mascot Search Results

Protein View

Match to: Q5VU58_HUMAN Score: 82 Expect: 0.00083

Tropomyosin 3.- Homo sapiens (Human).

Nominal mass (Mr): 28905; Calculated pI value: 4.72

NCBI BLAST search of Q5VU58_HUMAN against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:

[CAD34783](#) from [Homo sapiens](#)

[CAH71266](#) from [Homo sapiens](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: 52

Number of mass values matched: 13

Sequence Coverage: 40%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MAGITTIEAV KR**KIQVLQQQ** **ADDAEER**AER LQREVEGERR **AREQAQAEVA**

51 **SLNRRRIQLVE** **EELDRAQERL** ATALQKLEEA EKADESERG MKVIENRALK

101 DEEK**MELQEI** **QLKEAKHIAE** **EADRK**YEEVA RKLVIIEGDL ERTEERAEAL

151 ESRCREMDEQ IRLMDQNLKC LSAAEKYSQ KEDKYEEIHK ILTDKLEAE

201 TRAEFAERSV AKLEKTIDDL EDELYAQKLK **YKAISEELDH** **ALNDMTSI**

Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Start - End Observed Mr(expt) Mr(calc) Delta Miss Sequence

13 - 27 1770.9380 1769.9307 1769.8908 0.0399 1 R.KIQVLQQQADDAEER.A

14 - 27 1642.8237 1641.8164 1641.7958 0.0206 0 K.IQVLQQQADDAEER.A

41 - 54 1543.7743 1542.7670 1542.7750 -0.0080 1 R.AREQAQAEVASLNR.R

55 - 65 1399.7121 1398.7049 1398.7467 -0.0418 1 R.RIQLVEEELDR.A

56 - 65 1243.6436 1242.6363 1242.6456 -0.0092 0 R.IQLVEEELDR.A

56 - 69 1727.8646 1726.8573 1726.8849 -0.0276 1 R.IQLVEEELDRAQER.L

105 - 116 1475.7327 1474.7255 1474.7701 -0.0446 1 K.MELQEIQLKEAK.H Oxidation (M)

117 - 124 940.4456 939.4383 939.4410 -0.0027 0 K.HIAEADR.K

126 - 132 894.5892 893.5819 893.4606 0.1213 1 K.YEEVARK.L

132 - 142 1284.6918 1283.6845 1283.7449 -0.0603 1 R.KLVIIEGDLER.T

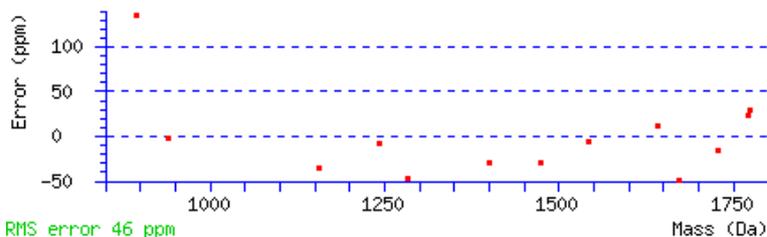
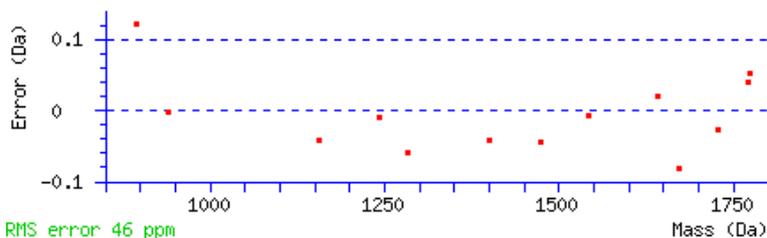
133 - 142 1156.6166 1155.6093 1155.6499 -0.0406 0 R.LVIIEGDLER.T

133 - 146 1671.8097 1670.8024 1670.8839 -0.0815 1 K.LVIIEGDLERTEER.A

233 - 248 1774.8688 1773.8615 1773.8091 0.0525 0 K.AISELDHALNDMTSI.- Oxidation (M)

No match to: 568.1053, 650.0018, 656.0136, 665.9770, 671.9889, 681.9201, 687.9558, 854.9935, 861.0215, 877.0039, 883.4343, 892.9482,

951.4755, 1065.935



>P1;Q5VU58_HUMAN

Tropomyosin 3.- Homo sapiens (Human).

C:Species Q5VU58_HUMAN: Homo sapiens (Human).

C:Species CAD34783: Homo sapiens (Human).

C:Species CAD34783: Homo sapiens

C:Species CAH71266: Homo sapiens

C:Family: Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates;

Haplorrhini; Catarrhini; Ho

C:Accession: Q5VU58;

C:Gene name: Name=TPM3; ORFNames=RP11-205M9.1-006;

C:Reference [1]

C:NUCLEOTIDE SEQUENCE.

R:Chapman J.;

Submitted (MAY-2005) to the EMBL/GenBank/DBJ databases.

C:07-DEC-2004, integrated into UniProtKB/TrEMBL.

C:07-DEC-2004, sequence version 1.

C:13-JUN-2006, entry version 11.

C:-----

C:Copyrighted by the UniProt Consortium, see <http://www.uniprot.org/terms>

C:Distributed under the Creative Commons Attribution-NoDerivs License

C:-----

C:EMBL; AL590431; CAH71266.1; -; Genomic_DNA.

C:SMR; Q5VU58; 9-248.

C:Ensembl; ENSG00000143549; Homo sapiens.

C:RZPD-ProtExp; D0474; -.

C:RZPD-ProtExp; IOH4696; -.

C:RZPD-ProtExp; IOH7438; -.

C:InterPro; IPR011072; PKN_effector.

C:InterPro; IPR009053; PreFoldin.

C:InterPro; IPR000533; Tropomyosin.

C:Pfam; PF00261; Tropomyosin; 1.

C:PRINTS; PR00194; TROPOMYOSIN.

C:PROSITE; PS00326; TROPOMYOSIN; 1.

C:Keywords:

C:SRCDB TREMBL

C:IDN_REMTREMBL CAD34783;

C:IDN_GENBANK CAD34783; CAH71266;

Calreticulin

Mascot Search Results

User : B.Lindner

Email : blindner@fz-borstel.de

Search title : Bande

Database : MSDB 20060831 (3239079 sequences; 1079594700 residues)

Taxonomy : Homo sapiens (human) (148148 sequences)

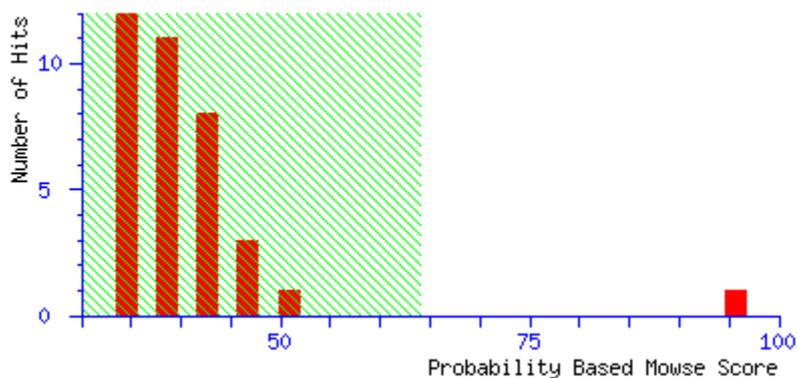
Timestamp : 11 Dec 2008 at 14:00:23 GMT

Top Score : 96 for **Q53G71_HUMAN**, Calreticulin variant (Fragment).- Homo sapiens (Human).

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 64 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Search Parameters

Type of search : Peptide Mass Fingerprint

Enzyme : Trypsin

Variable modifications : Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Mass values : Monoisotopic

Protein Mass : Unrestricted

Peptide Mass Tolerance : ± 0.3 Da

Peptide Charge State : 1+

Max Missed Cleavages : 1

Number of queries : 110

Format As Concise Protein Summary [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 3

Re-Search All Search Unmatched

1. **Q53G71_HUMAN** Mass: 46890 Score: **96** Expect: $4e-05$ Queries matched: 20

Calreticulin variant (Fragment).- Homo sapiens (Human).

A37047 Mass: 48112 Score: **94** Expect: $6.2e-05$ Queries matched: 20

calreticulin precursor - human

2. **CAC32414** Mass: 119805 Score: 49 Expect: 1.8 Queries matched: 24

Sequence 1 from Patent W00107614.- Homo sapiens (Human).

CAC32415 Mass: 120955 Score: 43 Expect: 7.4 Queries matched: 22

Sequence 3 from Patent W00107614.- Homo sapiens (Human).

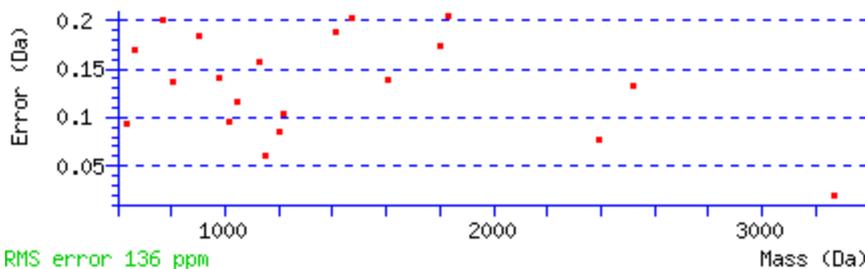
3. **AAN38707** Mass: 143269 Score: 47 Expect: 3.1 Queries matched: 30

AF401638 NID: - Homo sapiens

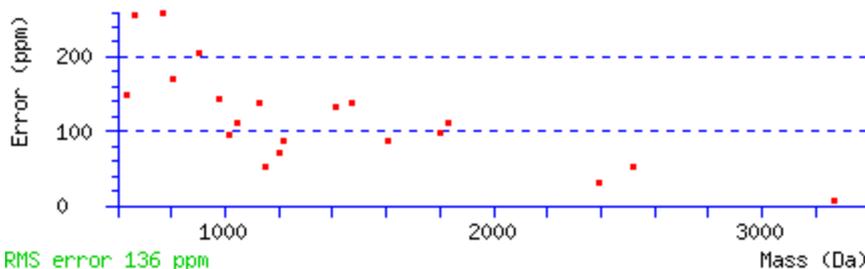
Mascot Search Results

Protein View

Match to: **Q53G71_HUMAN** Score: 71 Expect: 0.013
Calreticulin variant (Fragment).- Homo sapiens (Human).
 Nominal mass (Mr): **46890**; Calculated pI value: **4.30**
 NCBI BLAST search of **Q53G71_HUMAN** against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications
 Taxonomy: [Homo sapiens](#)
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:
[BAD96780](#) from [Homo sapiens](#)
 Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Number of mass values searched: **110**
 Number of mass values matched: **20**
 Sequence Coverage: **49%**
 Matched peptides shown in **Bold Red**
1 LGLAVAEPAV YFK**EQFLDGD** GWTSRWIESK HKSDFGKFVL SSGK**FGDDEE**
51 **KDRKGLQTSQD ARFYALSASF EFPNSRNGQTL VVQFTVKHEQ NIDCGGGYVK**
101 LFPNSLDQTD MHGDSEYNIM FGPDICGPGT **KKVHVFVFNK** GKNVLINK**DI**
151 **RCKDDEFTHL YTLIVRPDNT YEVKIDNSQV EGSLEDDWD FLPFKIKDP**
201 **DASKPEDWDE RAKIDDDPTD** KPEDWDKPEH IPDPDAKPE DWDEEMDGEW
251 EPPVIQNPEY **KGEWKPRQID** NPDKYGTWVH PEIDNPEYSP DPSIYAYDNF
301 GVGLGLDLWQV **KSGTIFDNFL ITNDEAYAE** FGNETWGVTK **AAEKQMKDKQ**
351 **DEEQRLEKEE EDKRRKEEEE AEDKGDDEDK DEDEEDEDK EDEEEDVPG**
401 **QAKDEL**
 Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass
Start - End Observed Mr(expt) Mr(calcd) Delta Miss Sequence
14 - 25 1410.8173 1409.8100 1409.6212 0.1888 0 K.EQFLDGDGWTSR.W
26 - 30 662.5207 661.5134 661.3435 0.1699 0 R.WIESK.H
45 - 53 1130.6574 1129.6501 1129.4928 0.1573 1 K.FYGDEEKDK.G
54 - 62 975.6258 974.6186 974.4781 0.1404 0 K.GLQTSQDAR.F
63 - 76 1607.9119 1606.9046 1606.7667 0.1379 0 R.FYALSASFEPFSNK.G
77 - 87 1219.8092 1218.8020 1218.6972 0.1047 0 K.GQTLVVQFTVK.H
88 - 100 1476.8563 1475.8490 1475.6463 0.2027 0 K.HEQNIDCGGGYVK.L Carbamidomethyl (C)
132 - 140 1147.7224 1146.7152 1146.6550 0.0602 1 K.KVHVFVFNK.G
133 - 140 1019.6632 1018.6559 1018.5600 0.0959 0 K.VHVFVFNK.G
133 - 142 1204.7684 1203.7611 1203.6764 0.0847 1 K.VHVFVFNK.GK.N
149 - 153 634.4277 633.4204 633.3268 0.0936 1 K.DIRCK.D
175 - 195 2391.1747 2390.1675 2390.0914 0.0761 0 K.IDNSQVESGSLEDDWDFLPPK.K
175 - 196 2519.3266 2518.3193 2518.1864 0.1330 1 K.IDNSQVESGSLEDDWDFLPPK.I
197 - 211 1801.0137 1800.0064 1799.8326 0.1738 1 K.IKDPDASKPEDWDER.A
262 - 267 772.6104 771.6031 771.4028 0.2004 0 K.GEWKPR.Q
312 - 340 3268.5153 3267.5081 3267.4884 0.0196 0 K.SGTIFDNFLITNDEAYAEFNETWGVTK.A
341 - 347 805.5604 804.5531 804.4163 0.1368 1 K.AAEKQMK.D
348 - 355 1047.5862 1046.5790 1046.4628 0.1161 1 K.DKQDEEQR.L
358 - 364 906.5896 905.5824 905.3978 0.1846 1 K.EEEEDKK.R
391 - 406 1831.9760 1830.9687 1830.7643 0.2044 1 K.EDEEEDVPGQAKDEL.-
 No match to: 522.3754, 524.3109, 550.2756, 568.3102, 656.2920, 659.5422, 666.3954, 672.2761, 716.5835, 766.5298, 829.6397, 832.5526, 835.5861, 853.5970



RMS error 136 ppm



RMS error 136 ppm

>P1:Q53G71_HUMAN
 Calreticulin variant (Fragment).- Homo sapiens (Human).
 C:Species Q53G71_HUMAN: Homo sapiens (Human).
 C:Species BAD96780: Homo sapiens
 C:Family: Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates;
 Haplorrhini; Catarrhini; Ho
 C:Accession: Q53G71;
 C:Reference [1]
 C:NUCLEOTIDE SEQUENCE.
 C:TISSUE=Thyroid;
 C:MEDLINE=94171032; PubMed=8125298; DOI=10.1016/0378-1119(94)90802-8;
 R:Maruyama K., Sugano S.;
 Gene 138:171-174(1994).
 C:Reference [2]
 C:NUCLEOTIDE SEQUENCE.
 C:TISSUE=Thyroid;
 C:MEDLINE=98038986; PubMed=9373149; DOI=10.1016/S0378-1119(97)00411-3;
 R:Suzuki Y., Yoshitomo K., Maruyama K., Suyama A., Sugano S.;
 Gene 200:149-156(1997).
 C:Reference [3]
 C:NUCLEOTIDE SEQUENCE.
 C:TISSUE=Thyroid;
 R:Suzuki Y., Sugano S., Totoki Y., Toyoda A., Takeda T., Sakaki Y., Tanaka A., Yokoyama S.;
 Submitted (APR-2005) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

C;24-MAY-2005, integrated into UniProtKB/TrEMBL.
C;24-MAY-2005, sequence version 1.
C;13-JUN-2006, entry version 9.
C;-!- FUNCTION: Molecular calcium binding chaperone promoting folding, C;oligomeric assembly and quality control in the ER via the C;calreticulin/calnexin cycle. This lectin interacts transiently C;with almost all of the monoglucosylated glycoproteins that are C;synthesized in the ER. Interacts with the DNA-binding domain of C;NR3C1 and mediates its nuclear export (By similarity).
C;-!- SUBUNIT: Monomer. Interacts with GRP58 (ERp57) and with NR3C1 (By C;similarity).
C;-!- DOMAIN: Associates with ERp57 through the tip of the extended arm C;formed by the P-domain (By similarity).
C;-----
C;Copyrighted by the UniProt Consortium, see <http://www.uniprot.org/terms>
C;Distributed under the Creative Commons Attribution-NoDerivs License
C;-----

Show predicted peptides also**Sort Peptides By**

C;EMBL; AK223060; BAD96780.1; -; mRNA.
C;SMR; Q53G71; 195-294.
C;Ensembl; ENSG00000179218; Homo sapiens.
C;RZPD-ProtExp; G0032; -.
C;RZPD-ProtExp; RZPD0834G0511; -.
C;GO; GO:0005509; F:calcium ion binding; IEA.
C;InterPro; IPR001580; Calret/calnex.
C;InterPro; IPR008985; ConA_like_lectin_glycocalyx.
C;InterPro; IPR013320; ConA_like_subgroup.
C;InterPro; IPR000886; ER_target_S.
C;PANTHER; PTHR11073; Calret/calnex; 1.
C;Pfam; PF00262; Calreticulin; 1.
C;PRINTS; PR00626; CALRETICULIN.
C;ProDom; PD001866; Calret/calnex; 1.
C;PROSITE; PS00803; CALRETICULIN_1; 1.
C;PROSITE; PS00804; CALRETICULIN_2; 1.
C;PROSITE; PS00805; CALRETICULIN_REPEAT; 3.
C;PROSITE; PS00014; ER_TARGET; UNKNOWN_1.
C;NON_TER 1 1
C;Keywords:
C;SRCD B TREMBL
C;IDN_GENBANK BAD96780;

Glossar

2DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
A. dest	Aqua destillata (lat.: Destilliertes Wasser)
AEC	Aminoethylcarbazol
AEC II	Alveolare Epithelzellen Typ 2
Ala	Alanin
ANXA8	Annexin A8
AP	Alkalische Phosphatase
AP-HaT	Fokussierungspuffer NEPHGE (Harnstoff/Thioharnstoff)
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
CBA	Cytometric bead array
CD163	Haptoglobin-Hämoglobin scavenger rezeptor
cDNA	Complementary DNA
CEA	Carcinoembryonic antigen
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propanesulfonat
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
Cys	Cystein
DEX	Dexamethason
DIG	Digoxigenin
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
DUX4	Double homeobox protein 4
DZ4Z	Spezieller Chromosomenloкус auf Chromosom 4q35
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EP	Extraktionspuffer
ESI-MS	Electrospray Ionenfallen Massenspektrometrie
FFPE	Formalin-fixed and paraffin-embedded
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FSHD	Fazioskapulohumorale Muskeldystrophie

FT-ICR	Fourier-transform ion cyclotron resonance
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
H&E	Hämatoxilin & Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HED	Hydroxyethyldisulfid
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
Her2/neu	Human epithelial receptor 2
His	Histidin
HMG	High mobility group
HOPE	Hepes-glutamic acid buffer mediated organic solvent protection effect
Hp	Haptoglobin
IHC	Immunhistochemie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IL12p40	Interleukin 12p40
IL-6	Interleukin 6
IP	Immunpräzipitation
IPG	Immobilisierter pH Gradient
ISH	<i>In situ</i> Hybridisierung
JAA	Jodazetamid
kDa	Kilodalton
LC-MS	Liquid-chromatography mass spectrometry
LDS	Invitrogen Probenpuffer (für PAGE)
Leu	Leupeptin
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
MAdL	Marker Adenokarzinome der Lunge
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MASCOT	Proteindatenbank
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1

MOWSE	Molecular weight search
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
Napsin	Novel aspartic proteinase of the pepsin family
NBT/BCIP	Nitro blue tetrazolium/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
NEPHGE	non-equilibrium pH gradient electrophoresis
NH ₃	Ammoniak
NP-40	nonyl-phenoxypolyethoxylethanol
NSCLC	Non-small cell lung cancer
NZ	Nitrozellulose
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pam3	Stimulans zur Infektionssimulation
Phlp1	Phosducin-like protein 1
pHp	Pulmonary haptoglobin
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	Peptide mass fingerprint
PP	Probenpuffer
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANTES	Chemokinname
RehyP	Rehydrierungspuffer
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SCLC	Small cell lung cancer
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SELDI-MS	Surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry
Ser	Serin
SP-A	Surfactant Protein A
SP-B	Surfactant Protein B
SSC	Saline Sodium Citrate
STST	Short term stimulation of tissues
TBS-T	Tris-buffered saline Tween-20
TCA	Trichloric acid

TEMED	Tetramethyldiamin
Thr	Threonin
TKTL1	Transketolase-like protein 1
TMA	Tissue Microarray
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TNM	Tumor-node-metastasis
Tris-HCl	Pufferlösung
Trp	Tryptophan
TTF-1	Thyroid transcription factor 1
Tyr	Tyrosin
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vh	Voltstunden

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Peter Zabel für die Finanzierung meiner Promotionsstelle sowie meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. Torsten Goldmann und dem Leiter der Pathologie Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. Ekkehard Vollmer für die Möglichkeit, eine so lange Zeit in der Pathologie zu arbeiten. Dabei möchte ich mich auch besonders bei den Pathologen Dr. Holger Schultz, Dr. Bernhard Schmitt und Dr. Florian Stellmacher sowie Dr. Dagmar Lang und den technischen Assistenten und Laboranten des Forschungsbereichs bedanken, die mich bei Bedarf immer tatkräftig unterstützt haben (Jasmin Tiebach, Stefanie Fox, Nina Grohmann, Niklas Bauer, Maria Lammers). Dies gilt besonders für meine Mitdoktoranden M. Sc. Sebastian Marwitz und Dr. Mahdi Abdullah aus der Pathologie sowie Dipl.-Ing. (FH) Yani Kaconis, Dr. Lena Heinbockel, Dr. Kolja Schaale, M. Sc. Carlotta Ober-Bloebaum, Dipl.-Biol. Julius Brandenburg und Dipl.-Biol. Susanne Keese, die mir alle die Promotionszeit als Freunde und Nachbarn versüßt haben. Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern des Eingangslabors. Meinen Eltern, der gesamten Familie und vor allem meiner Verlobten Melanie gilt besonderer Dank für die private Unterstützung während der schwierigen Phasen und in Prüfungszeiten sowie für das Verständnis an den Tagen, an denen ich nicht viel Zeit für sie aufbringen konnte.

Persönliche Daten

Name: Daniel Kähler, Dipl.-Ing. (FH), Biotechnologie
Email: danielkaehler@gmx.de
Geburtsdatum/-ort: 3. November 1977, Paderborn, Deutschland

Diplomarbeit und Promotion**Klinische & Experimentelle Pathologie,
Forschungszentrum Borstel (FZB)****04 / 2006 – 05 / 2008**

Diplomarbeit: Hochdurchsatzanalysen molekularer Biomarker an NSCLC; Erlangung des Titels „Dipl.-Ing. (FH)“; Forschungsprojekte

10 / 2008 – 04 / 2013

Promotion: Etablierung von Proteomuntersuchungen zur Identifizierung neuer und Validierung bekannter Biomarker an HOPE-fixierten, Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen; Forschungsprojekte
02/09 bis 07/09 chirurgische Behandlung und Rehabilitation (Bandscheibenvorfall)

Akademischer Werdegang**09 / 1998 – 07 / 2000**

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg (HAW); Grundstudium Biotechnologie: Ingenieurwissenschaftliche Grundlagen

07 / 2000 – 07 / 2002

Molekulare Zellbiologie, Universität Hamburg, Prof. F. Hölzel; Freiwillige Assistenz in der Krebsforschung: Dissertation Herr Dr. R. Gawens

09 / 2002 – 07 / 2005

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg; Hauptstudium Biotechnologie: Angewandte Mikro- und Molekularbiologie, Zellkulturtechnik, Aufarbeitungs- und Reinigungsverfahren für Proteine

Schulische Ausbildung

08 / 1984 – 05 / 1988	Grundschule (Kirchschule Hövelhof)
08 / 1988 – 05 / 1997	Gymnasium Verl; Allgemeine Hochschulreife
06 / 1997 – 07 / 1998	Westfälisches Zentrum für Psychiatrie und Psychotherapie, Paderborn; Zivildienst

Weitere Kenntnisse

Molekulare Techniken	Proteinanalytik: 2D-Elektrophorese, SDS-PAGE, (2D) Western Blot, Immunpräzipitation, Immunhistochemie, MADLI-TOF MS Nukleinsäureanalytik: Gelelektrophorese, (RT/Real Time)-PCR, Fluoreszenz- sowie DNA/RNA <i>in situ</i> Hybridisierung, Southern Blot, Northern Blot, Mutationsanalysen, Transkriptomarrays
Sprachen	Englisch: fließend in Wort und Schrift Kurs-Zertifikat: „Scientific English“ (FZB) Französisch: Grundkenntnisse Latein: (ehemals) großes Latinum
Software	Microsoft Windows / Office GraphPad Prism Alphelys Spot Browser® Grundkenntnisse C++ NCBI-Datenbank Bildbearbeitung (Fix Foto) WordPress, DE Edition
Softskills	Team- und Kommunikationsfähigkeit Eigenständiges Arbeiten Motivationsstrategien (Seminar Personalführung)

Akademisches Engagement und Hobbies

03 – 07 / 2000	Studentisches Mitglied im Berufungsausschuss der HAW Hamburg zur Besetzung einer C2-Professur (Molekularbiologie und Zellkulturtechnik)
01 / 2010 – 01 / 2011	Doktorandensprecher im FZB, Mitglied des Beirats der Borstel Biomedical Research School (BBRS)
2008	Organisation und Durchführung des V. Borsteler Herbstseminars für Pathologie und Biomedizin 2008: „Innovative Strategien in Diagnostik und Therapie“
2009	Mitglied im Organisationskomitee der „Tagung der Norddeutschen Immunologen“, FZB Organisation und Durchführung der DAAD-finanzierten Summerschool „Cancer and Diagnostics“ (FZB)
2010	Organisation und Durchführung der DAAD-finanzierten Summerschool „Infection and Inflammation“ (FZB)
Hobbies	Musik: Keyboard/Gesang Literatur: Biologie, Astronomie, Archäologie



Unterschrift

Publikationen (Originalartikel)

Kähler D, Schultz H, Lang DS, Löschke S, Branscheid D, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T (2007) Automatisierte Auswertung molekularer Hochdurchsatzanalysen an Tissue Microarrays. Focus MUL 24 (1):16-21

Schultz H, Kähler D, Branscheid D, Vollmer P, Zabel P, Goldmann T (2008) TKTL1 is overexpressed in a large portion of Non-Small Cell Lung Cancer specimens. Diagn Pathol 2008 Aug 12;3:35

Goldmann T, Kähler D, Schultz H, Abdullah M, Lang DS, Stellmacher F, Vollmer E. (2009) On the significance of Surfactant Protein-A within the human lungs. Diagn Pathol 2009 Mar 12;4:8

Abdullah M, Schultz H, Kähler D, Branscheid D, Dalhoff K, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T. (2009) Expression of the acute phase protein haptoglobin in human lung cancer and tumor-free lung tissues. Pathol Res Pract 2009;205(9):639-47

Marwitz S, Zeiser T, Schultz H, Kähler D, Abdullah M, Hauber HP, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T (2009) The human placenta releases substances that drive lung cancer into apoptosis. Diagn Pathol 2009 Aug 21;4:27

Kähler D, Alexander C, Schultz H, Abdullah M, Branscheid D, Lindner B, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T (2010) Proteomics out of the archive: Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry using HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. J Histochem Cytochem. 2010 Mar; 58(3):221-8

Vollmer E, Schultz H, Stellmacher F, Kähler D, Abdullah M, Galle J, Lang DS, Goldmann T (2010) Tumors in the lung - morphologic features and the challenge of integrating biomarker signatures into diagnostics. Rom J Morphol Embryol 2010;51(4):607-14

Abdullah M, Marwitz S, Kähler D, Schultz H, Kugler C, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T (2010) Pulmonary haptoglobin (pHp): a new marker for adenocarcinomas of the lung? Pathology 2011 Jan;43(1):70-2

Abdullah M, Kähler D, Vock C, Reiling N, Kugler C, Drömann D, Rupp J, Hauber HP, Fehrenbach H, Zabel P, Vollmer E, Dalhoff K, Goldmann T (2011) Pulmonary Haptoglobin and CD163 Are Functional Immunoregulatory Elements in the Human Lung. Respiration 2012;83(1):61-73. Epub 2011 Aug 22

Goldmann T, Kähler D, Vollmer E (2012) Proteomics? Arch Pathol Lab Med 136, 236-7

Abstracts (Poster / Vorträge)

[Poster] Kähler D, Schultz H, Lang D, Loeschke S, Branscheid D, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T (2008) High throughput analyses of relevant biomarkers in human paraffin-embedded lung cancer tissues. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Mainz, Poster No. 3.6, Book of Abstracts S. 285

[Poster] Kähler D, Branscheid D, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T (2008) Die HOPE-Technik ermöglicht verbesserte Nachweise von EGF-R bei nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen. Der Pathologe 2008, Suppl.1; Poster Lunge Fr.-128, S. 7; 92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V.

[Poster] Kähler D, Branscheid D, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T (2009) Proteomuntersuchungen an HOPE-fixierten Lungengeweben. Universität zu Lübeck, Doktorandentagung 09

[Poster] Schultz H, Kähler D, Branscheid D, Abdullah M, Vollmer E, Zabel P, Goldmann T (2009) Analysis of the expression of Transketolase-like enzyme 1 (TKTL1) in Non Small Cell Lung Cancer tissues and tumor free lung specimens. Der Pathologe 2010, Suppl.1; Poster Pneumopathologie Sa-035, S. 71; 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V.

[Abstract] Kähler D, Branscheid D, Abdullah M, Vollmer E, Alexander C, Goldmann T (2009) 2D-electrophoresis and molecular investigations using HOPE-fixed tissues from Non Small Cell Lung Cancer. Der Pathologe 2009, Suppl.1; Sitzung AG Pneumopathologie So-024, S. 98; 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V.

[Vortrag] Kähler D, Alexander C, Schultz H, Branscheid D, Lindner B, Abdullah M, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T (2009) Proteomuntersuchungen und massenspektrometrische Proteinidentifikation unter Verwendung HOPE-fixierter, paraffin-eingebetteter Lungenkarzinome. Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2009, Forschungszentrum Borstel

[Vortrag] Kähler D (2009) High throughput in Experimental Pathology. Forschungszentrum Borstel, Borstel Biomedical Research School (BBRS) Seminar

[Vortrag] Kähler D (2009) Molekulare Hochdurchsatzanalysen an humanen Lungengeweben. Abteilungsseminar der Abteilung Klinische Pneumologie, Forschungszentrum Borstel

[Poster] Kähler D, Abdullah M, Branscheid D, Schultz H, Vollmer E, Alexander C, Lindner B, Zabel P, Goldmann T (2010) 2D-Elektrophorese und massenspektrometrische Proteinidentifikation unter Verwendung HOPE-fixierter, Nichtkleinzelliger Lungenkarzinome. Der Pathologe 2010, Suppl.1; Poster Pneumopathologie Sa-039, s. 102; 94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V.

[Vortrag] Kähler D, Vollmer E, Abdullah M, Lang DS, Schultz H, Goldmann T (2010) HOPE Fixative for Enhanced Digital Imaging (Part 1). Kongress der Libanesischen Gesellschaft für Pathologie 2010, Beirut, Libanon

[Vortrag] Vollmer E, Kähler D, Abdullah M, Lang DS, Schultz H, Goldmann T (2010) HOPE Fixative for Enhanced Digital Imaging (Part 2). Kongress der Libanesischen Gesellschaft für Pathologie 2010, Beirut, Libanon

[Vortrag] Vollmer E, Schultz H, Lang DS, Kähler D, Stellmacher F, Goldmann T (2010) Facilities of a novel tissue fixation method: the HOPE-technology. Diagn Pathol 2010, 5 (Suppl 1):S20; 22nd European Congress of Pathology, Florence; European Society of Pathology (ESP) Working Group: Information Technology (IT) in Pathology, Precongress Meeting

[Vortrag] Kähler D, Schultz H, Abdullah M, Vollmer E, Goldmann T (2010) Molecular high throughput analyses and automated detection systems. Diagn Pathol 2010, 5 (Suppl 1): S9; 22nd European Congress of Pathology, Florence; European Society of Pathology (ESP) Working Group: Information Technology (IT) in Pathology, Precongress Meeting

[Vortrag] Kähler D (2010) Archive-based biomarker discovery: The future of tissue fixation. Doktoranden-Retreat des Forschungszentrums Borstel, Ammersbek



Unterschrift

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Diese Arbeit wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat darüber hinaus noch keinen Prüfungszwecken gedient.

Daniel Kähler

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'D. Kähler', written in a cursive style.

Hamburg; Mai 2012