

**Rheumatoide Arthritis:
Proteomische Analyse von Serum
und synovialen Fibroblasten
zur Detektion von Biomarkern**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jan-Hendrik Streich
aus Oldenburg i.O.

Göttingen 2009

D7

Referent: Prof. Dr. Sigrid Hoyer-Fender

Korreferent: Prof. Dr. Uwe Groß

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2009

***Der Fortgang der wissenschaftlichen Entwicklung
ist im Endeffekt eine ständige Flucht vor dem Staunen.***

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	iv
2	Einleitung	1
2.1	Krankheiten des rheumatischen Formenkreises	1
2.2	Pathogenese der RA	2
2.3	Diagnose der RA	5
2.3.1	Diagnostik in der Klinik	5
2.3.2	Diagnostik im Labor	7
2.4	Therapiemöglichkeiten der RA	10
2.5	Biomarkersuche	11
2.5.1	Definition eines Biomarkers	11
2.5.2	Biomarkersuche durch 2D-SDS-Page	12
2.5.2.1	Depletionsmethoden	13
2.5.3	Weitere Methoden zur Biomarkersuche	14
3	Zielsetzung	17
4	Material	18
4.1	Verbrauchsmaterialien	18
4.2	Chemikalien	18
4.3	Lösungen	18
4.4	Geräte	20
4.5	Software	22
5	Methoden	23
5.1	Zellkultur	23
5.1.1	Isolierung synovialer Fibroblasten aus Synovia	23
5.1.2	Kultivierung synovialer Fibroblasten	23
5.1.3	Passagieren von Zellen	24
5.1.4	Zelllyse	24
5.2	Proteinbiochemische Methoden	24
5.2.1	Bradford Proteinbestimmung	24
5.2.2	Probenaufarbeitungsmethoden	25
5.2.2.1	Acetonfällung	25
5.2.2.2	Chloroform-Methanol-Fällung	26
5.2.2.3	Ankonzentrierung und Entsalzung mittels Vivaspin®-Konzentratoren	26
5.2.2.4	Ankonzentrierung mittels Agilent mpC18	26
5.3	Elektrophoretische Methoden	27
5.3.1	Isoelektrische Fokussierung	27
5.3.2	Proteinelektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel	28

5.4	Immunologische Methoden	30
5.4.1	Western Blot	30
5.4.2	Immunoblot: Citrullin Detektionskit	31
5.5	DIGE (Differentielle In-Gel Elektrophorese).....	32
5.5.1	Probenvorbereitung und Kopplung der Farbstoffe.....	33
5.5.2	Digitalisierung von DIGE-Gelen	33
5.5.3	Statistische Auswertung von DIGE-Gelen	35
5.6	Statistische Auswertung von Flamingo® Gelen	36
5.7	Gelfärbungsmethoden	38
5.7.1	Kolloidale Coomassiefärbung	38
5.7.2	Flamingo® Färbung.....	38
5.8	Massenspektrometrie	39
5.8.1	Tryptischer Verdau von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel.....	41
5.8.2	Spotten	42
5.8.3	Akquirierung der Spektren	42
5.8.4	Datenbankabgleich	43
5.9	Chromatographische Methoden	45
5.9.1	Funktionsprinzip der Immunodepletion	45
5.9.2	Agilent Human 6 Depletionssäule.....	45
5.9.3	Beckman-Coulter Proteome Lab IgY-12 LC2 Depletionssäule.....	46
5.9.4	Entsalzungs- und Fraktionierungsmethoden	47
5.9.4.1	Entsalzung	47
5.9.4.2	Fraktionierung durch eine Gradiententrennung	47
5.9.4.3	Fraktionierung durch einen Stufengradienten.....	48
6	Ergebnisse	49
6.1	Patientenproben	49
6.1.1	Synoviale Fibroblasten	49
6.1.2	Serum	49
6.2	Synoviale Fibroblasten	50
6.2.1	Kultivierung synovialer Fibroblasten	50
6.2.2	Gelelektrophoretische Analyse der synovialen Fibroblasten	51
6.2.3	Validierung der Expressionsunterschiede durch Western Blot.....	54
6.2.4	Nachweis citrullierter Proteine in Zelllysaten synovialer Fibroblasten	55
6.3	Serumanalytik.....	56
6.3.1	Elektrophoretische Auftrennung von Serumproteinen	56
6.3.2	Optimierung der depletierten Serumproben für die 2D-SDS-PAGE	59
6.3.3	Vergleich der Depletionssäulen	62

6.3.4	Identifizierungen im humanen depletierten Serum	64
6.3.5	Fraktionierung von depletiertem Serum.....	66
6.3.5.1	Fraktionierung durch eine Gradiententrennung	66
6.3.5.2	Fraktionierung durch eine Stufenelution	69
6.3.6	DIGE-Vergleich der depletierten Seren	74
6.3.7	Nachweis von citrullierten Proteinen im humanen Serum	78
7	Diskussion	79
7.1	Synoviale Fibroblasten	79
7.1.1	Methodische Einflüsse auf die Analysen	79
7.1.2	Diskussion der Expressionsunterschiede von HSPB1 und Destrin in RASF ..	80
7.1.3	Vimentinfragmente als spezifische Gewebemarker der RA	81
7.1.4	Die Bedeutung von Vimentin bei Apoptose der RASF	83
7.1.4.1	Vimentin als anti-apoptotisches Protein.....	83
7.1.4.2	Vimentin als pro-apoptotisches Protein	85
7.2	Detektion citrullierter Proteine	87
7.3	Ergebnisteil Serumanalytik	89
7.3.1	Akquirierung der Seren.....	89
7.3.2	Methodenoptimierung	90
7.3.3	Identifizierungen der Proteine im depletierten Serum und deren Rolle in der Pathogenese der RA	91
7.3.4	Untersuchung des depletierten und fraktionierten Serums.....	92
7.3.5	Untersuchungen der DIGE-Gele.....	93
8	Zusammenfassung.....	96
9	Literaturverzeichnis	97
10	Anhang	106
11	Abstract.....	121
12	Danksagung	122
13	Lebenslauf.....	123

1 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril	MCV	Mutiertes citrulliertes Vimentin
ACPA	Anti-citrulliertes Protein/Peptid Antikörper	MALDI	Matrix-unterstützte-Laser- Desorption/Ionisation
ad	auf	MS	Massenspektrometrie
AK	Antikörper	MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
APS	Ammoniumsulfat	OA	Osteoarthritis
BSA	Bovines Serum Albumin	OASF	Synovialer Fibroblast OA
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit	PAD	Peptidylarginindeiminase
CCP	Cyclisch citrulliertes Peptid	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CRP	C-reaktives Protein	pI	Isoelektrischer Punkt
Da	Dalton	PMF	Peptide Mass Fingerprint
DHB	Dihydroxybenzoesäure	PVDF	Polyvinylidenfluorid
DIGE	Differentielle In-Gel-Elektrophorese	RA	rheumatoide Arthritis
DTT	1,4-Dithiothreitol	RASF	Synovialer Fibroblast RA
ECM	Extrazelluläre Matrix	Ratio	Relativer Expressionsunterschied
ESI	Elektrospray-Ionisation	RF	Rheumafaktor
FFE	Free Flow Electrophoresis	RP	Umkehrphase
g	Erdbeschleunigung	SC	Sequenzabdeckung
GES	gesund	SD	Standardabweichung
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie	SDS	Natriumdodecylsulfat
IEF	Isoelektrische Fokussierung	SELDI	Surface enhanced laser desorption ionisation
IEX	Ionenaustauscher	TEMED	Tetramethylethylendiamin
IFN	Interferon	TFA	Trifluoressigsäure
IL	Interleukin	TNF	Tumornekrosefaktor
IPG	Immobilisierter pH-Gradient	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
kDa	Kilodalton	v/v	Volumen pro Volumen
LC	Liquid Chromatography	w/v	Gewicht pro Volumen
m	Masse	z	Ladung

In dieser Arbeit wurden die gebräuchlichen SI-Einheiten verwendet.

2 Einleitung

2.1 Krankheiten des rheumatischen Formenkreises

„Was man nicht erklären kann, das sieht man gern als Rheuma an.“ Dieses volkstümliche Sprichwort verdeutlicht die Problematik der Definition von Rheuma, denn zu den Krankheiten des rheumatischen Formenkreises gehören alle chronisch schmerzhaften und mit dauerhaften Bewegungseinschränkungen verbundenen Störungen des Stütz- und Bewegungsapparates. Die Internationale Klassifikation der Krankheiten (ICD, *International Classification of Diseases*) unterscheidet mittlerweile 450 verschiedene Erkrankungen des Muskel-Skelett-Systems und des Bindegewebes, welche sich in Beschwerdebild, Verlauf und Prognose sehr unterscheiden. Eine kurze schematische Übersicht der Systematik rheumatischer Erkrankungen, die vorrangig die Gelenke betreffen, ist in Abbildung 1 dargestellt. Laut Angaben des DRFZ (*Deutsches Rheuma Forschungszentrum*) begeben sich schätzungsweise 15 % der Bevölkerung mindestens ein Mal im Jahr in ärztliche Behandlung wegen rheumatischer Beschwerden. Überdies verursachen Erkrankungen von Skelett, Muskeln und Bindegewebe ca. 15 % aller verlorenen Erwerbsjahre.

Somit haben die Krankheiten des rheumatischen Formenkreises nicht nur eine sozialmedizinische Bedeutung, sondern stellen wegen der ätiologischen, pathogenetischen und klinischen Heterogenität eine Herausforderung für die Diagnostik dar.

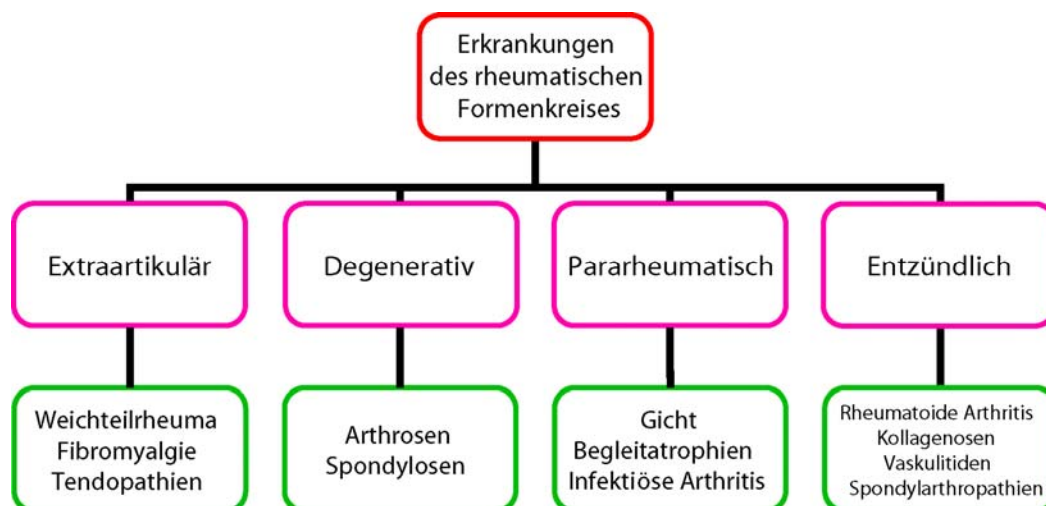


Abbildung 1: Systematik rheumatischer Erkrankungen.

Doch gerade wegen der Diversität rheumatischer Erkrankungen wird eine Frühdiagnose selten rechtzeitig gestellt. Laut Angaben der Deutschen Rheuma-Liga (Stand 2001) vergehen bei Morbus Bechterew durchschnittlich sieben Jahre vom Auftreten der ersten Symptome bis zur Diagnosestellung, bei der Fibromyalgie bis zu zehn und beim Lupus erythemato-

des (SLE) zwei Jahre. Nur durch eine exakte Artdiagnose des Rheumas kann eine gezielte Therapie erfolgen und Folgeschäden vermindert werden.

Unter den entzündlich rheumatischen Erkrankungen ist die rheumatoide Arthritis (RA), die auch als chronische Polyarthritis (cP) bezeichnet wird, die häufigste systematische Autoimmunkrankheit, deren Krankheitsbild am häufigsten mit dem einer rheumatischen Erkrankung in Verbindung gebracht wird. Sie beginnt in der Regel mit einem Befall der Gelenke, jedoch zeigen sich im Verlauf der Krankheit auch pathologische Veränderungen anderer Organe. Ihre Prävalenz liegt bei 1 % der Bevölkerung und die Inzidenz in Deutschland bei 2000 neuen Fällen pro Jahr. Dabei ist die Inzidenz bei Personen im Alter von 30 bis 55 am höchsten und betrifft Frauen fast drei Mal häufiger als Männer (Quelle: Deutsche Rheumaliga, Stand 2001).

Weitere entzündlich-rheumatische Erkrankungen sind Spondylarthropathien wie z.B. Morbus Bechterew und reaktive Arthritiden, die neben peripheren Gelenken hauptsächlich entzündliche Erkrankungen der Wirbelsäule darstellen. Die Prävalenz dieser Spondylarthropathien beträgt 1 % und hat im Fall des Morbus Bechterew ein Manifestationsalter von 20 - 35 Jahren.

Kollagenosen, wie z.B. Lupus erythematoses oder das Sjögren-Syndrom, sind entzündliche Erkrankungen des Bindegewebes und haben eine Prävalenz von 0,2 %. Sie zählen neben den Immunvaskulitiden (entzündliche Erkrankungen der Blutgefäße) ebenfalls zu den entzündlich rheumatischen Erkrankungen.

Bei den degenerativen rheumatischen Erkrankungen handelt es sich um Arthrosen (Osteoarthrose, OA, Verschleißrheuma), die auch mit einem Abbau von Knorpelgewebe einhergehen. Als Ursache werden neben einem erhöhten Lebensalter, Gelenküberlastungen durch Fehlstellungen, körperliche Überlastungen, Verletzungen und Übergewicht auch Hypermobilität angegeben. Mit einer Prävalenz von ca. 5 Millionen Betroffenen ist es die häufigste Gelenkkrankheit in Deutschland überhaupt. Genau wie bei allen anderen Arten rheumatischer Erkrankungen kann der Verlauf schleichend sein und sich die Krankheit über Jahre langsam entwickeln. Die häufige Prävalenz und die Chronifizierung schaffen eine klare Abgrenzung gegenüber den entzündlich rheumatischen Erkrankungen meist schwierig und erfordern eine genaue Differentialdiagnose und Labordiagnostik.

2.2 Pathogenese der RA

Die gängige Arbeitshypothese geht davon aus, dass ein unbekanntes Antigen mit einem Topismus für Gelenke auf dem Blutweg in die Synovialis gelangt oder direkt dort entsteht. Durch Antigen präsentierende Zellen (APC) wird das Antigen aufgenommen und mit Hilfe des HLA-Systems den T-Lymphozyten präsentiert. Die Struktur des HLA-Systems scheint hierbei für die Entstehung und Ausprägung der RA eine Rolle zu spielen. Die Allele HLA-

DRB1*0401 und HLA-DRB1*0404 sind bei Kaukasiern mit dem Auftreten der Krankheit assoziiert (Gonzalez-Gay *et al.* 2002; Roudier 2006). Die Allele ähneln sich sehr in ihren Aminosäuresequenzen, weswegen von einem *shared epitope* gesprochen wird (Khani-Hanjani *et al.* 2002).

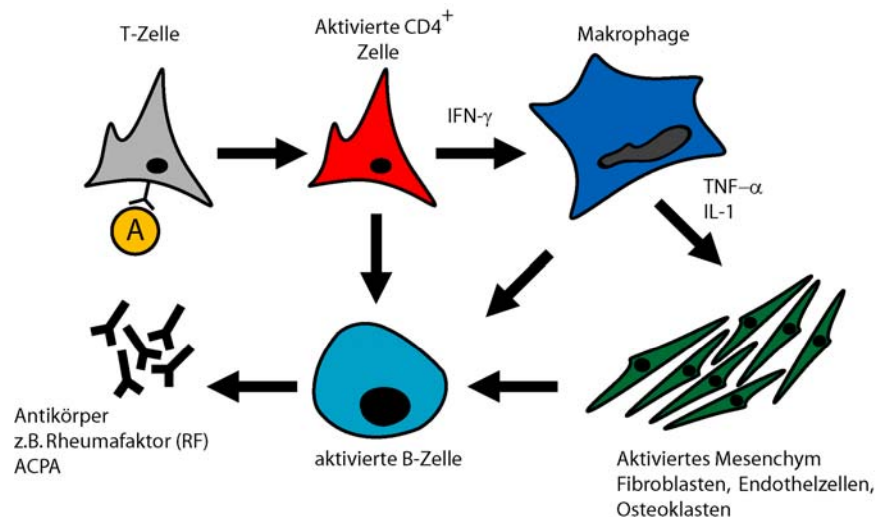


Abbildung 2: Zelluläre Interaktionen der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (Bernhard 2001). Durch ein bisher unbekanntes Antigen wird über die Ausschüttung von Zytokinen (vorrangig TNF- α , Interleukin-1 und Interferon- γ) ein Entzündungsprozess in Gang gesetzt, der neben der Autoantikörperproduktion die Aktivierung des mesenchymalen Gewebes bewirkt.

Als Folge dieser Antigenpräsentation kommt es zur Aktivierung von Immunzellen und zur Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Zytokine (vorrangig IL-1 und TNF α) und zur Infiltration des betroffenen Gewebes durch aktivierte Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten. Durch die Infiltration und dem vermehrten Blutfluss in das Gewebe kommt es zu einer Verdickung der Synovia, was im Allgemeinen als Ausbildung eines Pannus bezeichnet wird. Die lokal frei gesetzten Mediatoren führen nicht nur zur Infiltration des Gewebes, sondern stimulieren darüber hinaus andere mesenchymale Zellen, wie Synovialzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Osteoklasten, die im Allgemeinen als Pannozyten zusammengefasst werden. Dies bewirkt eine Sezernierung so genannter Matrix-Metalloproteasen (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13), die maßgeblich zur Zerstörung des Gelenk umgebenden Gewebes beitragen (Fernandes *et al.* 2002; Burrage *et al.* 2006). Im Insertionsbereich des Gelenks kommt es durch invasiv-destruktives Wachstum der Pannozyten zu Knochenerosionen. Die gleichzeitige Aktivierung von Chondrozyten im hyalinen Knorpel resultiert in einer Hemmung der Kollagen- und Proteoglykansynthese und bewirkt letztendlich den Knochen- und Knorpelabbau. In Abbildung 3 sind neben dem gesunden Zustand eines Gelenks schematisch das frühe und späte Stadium der RA dargestellt. Im frühen, entzündlichen Stadium der RA kommt es im Rahmen der Entzündungsreaktion zu einer massiven Verdickung der Synovia, die eine Verschmälerung des Gelenkspalts

bewirkt. Des Weiteren kommt es aufgrund der erhöhten Osteoklastenaktivität zur Knochendemineralisation. Im späten Stadium ist die Bewegungsfähigkeit des Gelenks stark beeinträchtigt, die Synovia aufgrund persistierender entzündlicher Prozesse nahezu vollständig abgebaut und der Insertionsbereich des Gelenks stark verschmälert und knöchern deformiert. Diese destruktiven progressiven Gelenkveränderungen lassen sich radiologisch erkennen und werden in fünf LDE-Stadien unterteilt.

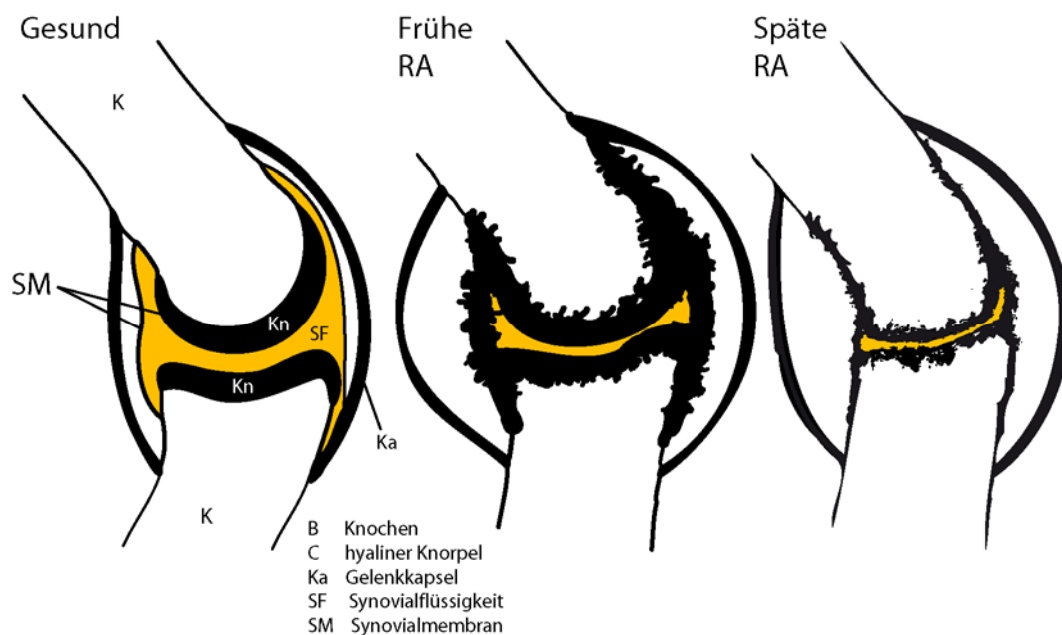


Abbildung 3: Gelenkveränderungen im Verlauf einer rheumatoiden Arthritis. Im frühen Stadium kommt es im Rahmen einer Entzündungsreaktion zu einer starken Verdickung der Synovia (Pannusbildung). Durch Chronifizierung und Aktivierung des mesenchymalen Gewebes kommt es im späten Stadium zu starken Knochenerosionen und nahezu vollständigem Verlust der Synovia sowie der Bewegungsfähigkeit des Gelenks. Radiologisch werden die verschiedenen Zustände in die LDE-Stadien eins bis fünf eingeteilt.

Die Frage, warum es jedoch bei der RA im Vergleich zur OA zu solch einem aggressiven und chronischen Verlauf kommt, ist bis heute unklar. Das Antigen könnte persistent vorliegen, was die Zahl an T-Lymphozyten in der Synovialmembran, die vermehrte HLA-DR-Expression und die Aktivierung Antikörper produzierender B-Lymphozyten erklären würde (Muller-Ladner *et al.* 2000; Ospelt *et al.* 2008). Des Weiteren wird der Einfluss eines viralen Infektes auf die RA diskutiert, der eine Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen auch auf nicht Antigen präsentierenden Zellen induzieren könnte. (Depper *et al.* 1981; Fox *et al.* 1985; Bonneville *et al.* 1998). Dadurch wären diese Zellen ihrerseits ebenfalls Zielobjekte der Immunantwort und beim Epitop könnte es sich um ein zelleigenes Protein handeln, das bis zu diesem Punkt nicht in Erscheinung getreten ist (*hidden epitope*). Dieser Prozess würde ebenfalls die Infiltration von T-Zellen in das Gelenk und die damit verbundenen Entzündungsvorgänge erklären.

2.3 Diagnose der RA

Das typische Erscheinungsbild der RA ist polyartikulär mit Schmerzen, Steifheit und Schwellungen. Der Ausbruch der Krankheit ist nur schwer auszumachen, da sich die Schwellungen und Schmerzen über Wochen bis Monate entwickeln. Typische Begleiterscheinungen sind Anorexie, Schwäche und Müdigkeit.

Neben den Gelenken zeigen sich Anzeichen einer rheumatischen Erkrankung auch in anderen Organen. Diese so genannten extraartikulären Manifestationen betreffen das Auge (Skleritis, Episkleritis, Trockenheit, Sjögren Syndrom), die Lunge (Pleuritis, Pleuraerguss, Interstitielle Lungenfibrose, Subpleurale Rheumaknoten), die Haut (Rheumaknoten, Hautulcera, Neutrophile Dermatitis), die Muskeln (Synovitis, Myositis, Vaskulitis), das Skelett (Osteopenie), die Niere (sekundäre Amyloidose, Medikamenten-Toxizität), die Milz (Spleno-megalie) und das Herz (Perikarditis, Myokarditis). Des Weiteren sind eine Reihe hämatologischer Veränderungen (Anämie, Leukozytose, Trombozytose) möglich.

Die Krankheitsaktivität und Progredienz der RA werden unter anderem durch den DAS 28 und radiologische Veränderungen in der Klinik bestimmt und durch die Erfassung spezifischer Laborparameter (CRP, BSG, Rheumafaktor, Anti-CCP, Anti-MCV, siehe Abschnitt 2.3.2) bekräftigt.

2.3.1 Diagnostik in der Klinik

Für die Feststellung der Krankheitsaktivität eines RA-Patienten kommt in der Klinik der so genannte DAS 28 (*disease activity score*) zum Einsatz. Der DAS 28 wurde empirisch anhand der Daten von RA-Patienten 1983 in der Abteilung für Rheumatologie des *University Medical Centre* in Nijmegen entwickelt und wird auch bei der Beurteilung der Wirksamkeit einer Therapie angewendet. Wie aus Formel 1 ersichtlich ist, handelt es sich um einen numerischen Wert, der sich aus der Betrachtung und Klassifikation von 28 definierten Gelenken in Hinblick auf Schwellungen und Schmerzen errechnet und Werte von 0 bis 10 annehmen kann. Da insbesondere die Gelenke der Finger und des Handgelenks bei der RA betroffen sind, werden diesen besondere Betrachtung zugemessen (vgl. Abbildung 4).

Neben der Klassifikation der Gelenke, wird des Weiteren die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG, allgemeiner Marker für Entzündungsreaktionen) und der subjektive gesamte Gesundheitszustand (GH, *general health*) des Patienten in der Formel mit eingerechnet.

$$DAS28 = 0,56 \cdot \sqrt{\text{Gelenke SCHMERZ}} + 0,28 \cdot \sqrt{\text{Gelenke SCHWELLUNG}} + 0,70 \text{ BSG} + 0,014 \text{ GH}$$

Formel 1: Berechnung des DAS 28.

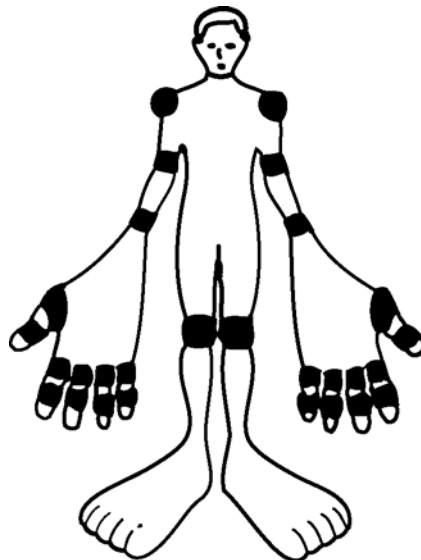


Abbildung 4: Die 28 Gelenke, die zur Erstellung des DAS 28 untersucht und klassifiziert werden.

Ein DAS von 0 bis 3.2 gibt eine geringe, ein DAS von 3.2 und 5.1 eine mittlere und Werte von 5.1 bis 10 eine hohe Krankheitsaktivität an.

Neben der Krankheitseinstufung mittels DAS werden radiologische Veränderungen, die sich im Krankheitsverlauf abzeichnen, in sechs Abstufungen (*LDE-Stadien*) aufgeteilt. Stadium 0 beschreibt die normalen gesunden Gelenkverhältnisse und Stadium 5 einen vollkommen aufgebrauchten Gelenkspalt mit einer knöchernen Deformität (vgl. Abbildung 3).

Weitere Kriterien zur Sicherung der Diagnose der RA wurden durch die Europäische Rheuma-Liga (EULAR, *european league against rheumatism*) vorgegeben und sind in Tabelle 1 dargestellt. Dabei stellt die Betrachtung der Gelenkveränderungen und deren Verteilung ein Hauptkriterium bei der Beurteilung des Krankheitszustands dar. Von den insgesamt sieben vorgegebenen Kriterien müssen vier erfüllt sein, um die Diagnose der RA zu bekräftigen.

Tabelle 1: Diagnosekriterien der EULAR für die rheumatoide Arthritis (Arnett *et al.* 1988). Mindestens vier Kriterien müssen für die Diagnose der RA erfüllt sein.

Diagnosekriterien der rheumatoiden Arthritis	
1	Morgensteifigkeit der Gelenke von mehr als einer Stunde
2	Arthritis an 3 oder mehr Gelenkarealen (Hand-, Fuß- und Fingergelenke, Ellenbogen, Knie, Sprunggelenk)
3	Arthritis an den Gelenken der Finger und des Handgelenks
4	Symmetrische Verteilung der betroffenen Gelenke
5	Subkutane Rheumaknoten
6	Positiver Rheumafaktor
7	Radiologische Veränderungen (Finger- oder Handgelenk)

Die Diagnostik der Klinik wird durch eine umfangreiche Analytik im Labor assistiert. Dabei werden neben den reinen Entzündungsparametern Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und

C-Reaktives Protein (CRP, diagnostisch wichtigstes Akutphase Protein der Leber) auch spezifische Tests auf die RA durchgeführt. Diese werden im Abschnitt 2.3.2 vorgestellt.

2.3.2 Diagnostik im Labor

Die Labordiagnostik bietet eine Reihe hochspezifischer Parameter zur Erkennung einer RA. Viele dieser Faktoren haben einen geschichtlichen Hintergrund und fanden erst Jahrzehnte nach ihrer Entdeckung und Modifizierung als Biomarker ihren Weg in die klinische Routineanalytik.

Die Qualität dieser Marker wird durch ihre Sensitivität und Spezifität bestimmt. Dabei gibt die Sensitivität den prozentualen Anteil an Patienten wieder, bei dem eine entzündliche Gelenkerkrankung mit Hilfe der Marker zu messen war. Die Spezifität beschreibt hingegen nur den Anteil der RA-Patienten, bei dem der Marker zu detektieren war.

Der erste rheumatologische Biomarker war der Rheumafaktor (*rheumatoid factor*, RF). Der RF geht in seinen Ursprüngen auf das Jahr 1937 zurück. Erik Waaler vermischte menschliches Blut mit dem von Schafen, die vorher mit humanem Immunglobulinen immunisiert wurden. Es konnte eine Hämagglutinationsreaktion beobachtet werden, die spezifisch bei Blut von Patienten mit Krankheiten des rheumatischen Formenkreises eintrat (Waaler 2007). Gleiche Beobachtungen wurden 1948 von den Amerikanern Charles Regan und Harry Rose gemacht (Rose *et al.* 1948). Diese Experimente prägten den bis heute gebräuchlichen Namen des RF.

Mit der Weiterentwicklung immunologischer Techniken konnte gezeigt werden, dass es sich beim RF um Autoantikörper der Subklassen IgM, IgG und IgA handelt, die gegen die Epitope des F_c-Teils von polyklonalem IgG gerichtet sind (Torrighiani *et al.* 1967; Bennett 1973; Silvestris *et al.* 1985; Kleveland *et al.* 1988; Teitsson 1988).

Ein positiver RF ist aufgrund der großen Anzahl verschiedener Subklassen der Autoantikörper und des ubiquitären Epitops bei einer Vielzahl rheumatischer und nicht-rheumatischer Erkrankungen zu detektieren, die in Tabelle 2 aufgelistet sind.

Tabelle 2: Rheumatische und nicht-rheumatische Krankheiten, die einen seropositiven Rheumafaktor verursachen können, sowie deren prozentualer Anteil (Shmerling *et al.* 1991).

Ursachen seropositiven Rheumafaktors	
Rheumatische Erkrankungen	RF %
Rheumatoide Arthritis	26 - 90
Sjögrens Syndrom	75 - 95
Kollagenosen	50 - 60
Kryoglobulinämie	40- 100
Lupus erythematodes (SLE)	15 - 35
Polymyositis/Dermatomyositis	5 - 10

gesunder Personen nicht erkannt wurde (Ordeig *et al.* 1984; Hajiroussou *et al.* 1985). Die klinische Anwendbarkeit dieser Tests war jedoch wegen der Übertragbarkeit des Immunfluoreszenzprofils eingeschränkt und fand daher nur wenig Anwendung.

1995 wurde nachgewiesen, dass sowohl der APF als auch der AKA citrulliertes Filaggrin als Epitop erkannten (Sebbag *et al.* 1995; Youinou *et al.* 1995). Durch diese genauere Spezifikation war es möglich, die Analysen mittels Immunoblot und ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) auf Basis eines Anti-Filaggrin-Antikörpers durchzuführen (Nogueira *et al.* 2001; Vincent *et al.* 2002). Im Gegensatz zur bisher durchgeführten Detektion auf Basis von Immunfluoreszenz bietet ein Testsystem auf Basis eines ELISAs deutliche Vorteile in der Quantifizierung und Reproduzierbarkeit. In den Analysen wurde eine Sensitivität von 52 % und eine Spezifität von 95-100 % festgestellt. Es konnte somit erstmalig in einer großen Studie belegt werden, dass die Präsenz von Citrullin für die Antigenität bei der RA verantwortlich ist.

1998 wurden die Versuche mit einem spezifischen Fragment des Filaggrin ausgeweitet. Es wurde ein synthetisch hergestelltes, citrulliertes Peptid generiert, welches mit einer Sensitivität von ca. 50 % und in einer Spezifität von 97 % ausschließlich von Antikörpern in Seren von RA-Patienten erkannt wurde (Schellekens *et al.* 1998).

In einem weiteren Schritt wurde die Peptidsequenz des Filaggrins zyklisiert (*cyclic citrullinated peptide*), um die Struktur des Antigens weiter zu optimieren. Dies war der erste erhältliche ELISA CCP-Kit (CCP1) und resultierte in Sensitivitäten von 41 - 68 % und Spezifitäten von 98 % (Schellekens *et al.* 2000). In den letzten Jahren konnte durch Änderungen der Aminosäuresequenz der Peptide und Mischen der synthetischen Peptide die Sensitivität und Spezifität erhöht werden. Dieser so genannte CCP-ELISA der zweiten Generation wird als CCP2 bezeichnet. In weiteren Studien konnten Sensitivitäten von 80 % und Spezifitäten von 98 - 99 % für den CCP2 erreicht werden (Fernandez-Suarez *et al.* 2005; van Gaalen *et al.* 2005).

Obwohl Studien zeigten, dass die ermittelten CCP-Titer eine spezifische Korrelation mit dem Krankheitsverlauf zeigen und sogar einen Ausbruch einer RA in gesunden Personen vorausagen können (Rantapaa-Dahlqvist *et al.* 2003; Vencovsky *et al.* 2003; Agrawal *et al.* 2007), bleibt dieser Punkt umstritten. Serdaroglu *et al.* konnten keine Korrelation zwischen der Progredienz und dem Anti-CCP-Titer nachweisen (Serdaroglu *et al.* 2008).

Sehr aktuell und ebenfalls zur Gruppe der ACPA gehörend wurde in den letzten Jahren der Anti-MCV-Antikörper (*anti-modified citrullinated vimentin*) zur Frühdiagnostik eingeführt. Auch in diesem Fall hat die Identifizierung des Epitops einen geschichtlichen Hintergrund.

1994 wurde in Gewebeextrakten von humaner Plazenta und Milz durch Western Blot mit Serum von Patienten mit RA ein spezifisches Doppelbandenmuster bei ca. 50 kDa entdeckt (Despres *et al.* 1994), das als SA-Antigen bezeichnet wurde. Die Identität des Antigens war

zu jenem Zeitpunkt unklar, jedoch konnte eine hohe Sensitivität von 51 - 92 % und Spezifität von bis zu 98 % nachgewiesen werden (Hayem *et al.* 1999; Hueber *et al.* 1999). 2004 wurde dieses Antigen als citrulliertes Vimentin beschrieben (Vossenaar *et al.* 2004). In der Gegenüberstellung mit CCP1 und CCP2 zeigte dieser Autoantikörper eine nahezu vergleichbare Sensitivität und Spezifität (Keskin *et al.* 2008; Sghiri *et al.* 2008). Der Anti-MCV-Test zeigte jedoch in einer Studie von Mathsson *et al.* eine deutlich bessere Korrelierung des radiologischen Krankheitsbildes im Vergleich zum CCP (Mathsson *et al.* 2008). Der Anti-MCV findet neben dem CCP1 und CCP2 Anwendung in der klinischen Routineanalytik.

Trotz der hohen Spezifitäten der vorgestellten Tests bleibt die genaue Definition des Epitops unklar. Beide Tests erkennen spezifisch modifizierte Formen von Intermediärelementen des Zytoskeletts (Vimentin und Filaggrin). Ungeklärt bleibt jedoch, ob und wenn ja, warum eine Modifikation durch die PAD stattfindet und an welchen Stellen die Proteine des Zytoskeletts modifiziert werden. Ferner bleibt unklar, welche Rolle diese modifizierten Formen in der Pathogenese der RA haben.

Die Diagnose der RA ist zur Zeit durch die Anwendung klinischer Tests (radiologische Befunde, DAS 28) und der unterstützenden Labordiagnostik (RF, CCP, anti-SA, anti-MCV) recht zuverlässig und durch viele Studien hinreichend validiert. Dennoch bleibt die RA eine systematische Autoimmunerkrankung, die meist spät erkannt wird. Aus diesem Grund ist die Suche nach neuen Biomarkern für die Frühdiagnose, entweder allein oder in Kombination mit den bereits bestehenden Markern, ein hoch aktuelles Forschungsgebiet.

2.4 Therapiemöglichkeiten der RA

Bei der Therapie der RA kommen viele verschiedene Ansätze zum Tragen. Es soll im folgenden Absatz ein kurzer Überblick über die medikamentöse Therapie der RA gegeben werden.

Grundsätzlich kommen nichtsteroidale analgetische Antirheumatika (NSARDs, *non steroidal antirheumatic drugs*) zum Einsatz, wie z.B. Paracetamol und Diclofenac, die oral oder topisch gegeben werden. Diese Medikamente wirken schmerzlindernd, ändern jedoch nicht den Verlauf der Krankheit.

RA-Patienten sollten so schnell wie möglich nach der Diagnose mit so genannten DMARDs (*disease-modifying antirheumatic drugs*) behandelt werden (Newsome 2002). Zu dieser Gruppe gehören z. B. Methotrexat und Chloroquin. Diese Medikamente haben im Gegensatz zu den NSARDs eine modulierende Wirkung auf den Krankheitsverlauf.

Des Weiteren kommen bei der Behandlung so genannte TNF-Antagonisten zum Einsatz (Adalimumab, Infliximab, Etanercept). Hierbei handelt es sich um Moleküle biologischen Ursprungs, die in die Freisetzung und Wirkung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α eingreifen. Zum einen kommen Fragmente von rekombinanten humanisierten monoklonalen

Antikörpern (Adalimumab, Infliximab) oder Rezeptorantagonisten (Etanercept) auf Basis von rekombinanten Proteinen zum Einsatz, die durch kompetitive Bindungen mit dem jeweiligen Liganden (TNF- α -Rezeptor oder TNF- α) gezielt den TNF α -Spiegel im Serum senken. Diese so genannten Biologika kommen bei schwerer progressiver RA und anderen chronisch-entzündlichen Krankheiten zum Einsatz. Ein weiteres Biologikum ist das Anakinra, bei dem es sich um einen Interleukin-1 Rezeptorantagonisten handelt, der die proinflammatorische Wirkung des Interleukin-1 hemmt.

Zur Zeit erscheint die Therapie mit einer Kombination von beiden Arten von Biologika als sehr aussichtsreich (Mertens *et al.* 2009). Die Therapiemöglichkeiten der RA und deren Nebenwirkungen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Pharmaka, die bei der Behandlung der RA zum Einsatz kommen sowie deren unerwünschte Nebenwirkungen (vgl. Deutsches Ärzteblatt, Jg 1003;1-2; Jan. 2006).

Pharmakon	Nebenwirkungen
Methotrexat (MTX)	Knochenmarkssuppression, Leberfibrose, Zirrhose, Alopezie, Pneumonie, Aleolitis, Stomatitis, hämatologische Malignome
Hydroxychloroquin	Makulaschädigung, Diarrhö, Katarakt
Sulfasalazin	Knochenmarkssuppression
Lelunomid	Diarrhö, Alopezie, Exanthem, Immunsuppression
Biologika	
Etanercept®	Immunsuppression (Infektion)
Infliximab®	Nur in Kombination mit MTX , daher siehe MTX. Immunsuppression, Lymphome
Adalimumab®	Immunsuppression (Infektion)
Anakinra®	Immunsuppression

Trotz der hier kurz vorgestellten Therapiemöglichkeiten ist bisher nur eine Verlangsamung der Krankheit erreicht worden. Obwohl gerade die Biologika große Hoffnungen auf eine verlängerte Beschwerdefreiheit geben, ist eine direkte Heilung und natürliche Rückbildung der Gelenkerosionen nur eingeschränkt gegeben. Insbesondere durch die massiven Nebenwirkungen der Therapien einerseits und den guten Erfolgsaussichten bei frühzeitiger Behandlung andererseits ist damit der Druck auf eine möglichst frühzeitige und sichere Diagnostik nochmals verstärkt.

2.5 Biomarkersuche

2.5.1 Definition eines Biomarkers

Ein biologischer Marker, der auch in der Klinik Anwendung finden soll, muss neben einem robusten und spezifischen Testsystem auch Proben verarbeiten, die von einem Patienten ohne große Umstände abgenommen werden können und einfach zu verarbeiten sind. Obwohl die meisten Krankheiten von einem Organ ausgehen, ist die Abnahme einer Probe

mittels Biopsie mit großem Aufwand und Risiken verbunden. Aus diesem Grund erscheint die Analyse einer Körperflüssigkeit (Blut, Urin, Speichel) deutlich attraktiver für die routinierte Analytik zu sein. Die klinische Routinediagnostik greift bereits seit Jahrzehnten auf dieses Medium zurück und es werden die unterschiedlichsten Tests im Rahmen einer Behandlung durchgeführt.

Die gewählten Parameter einer Blutanalytik sind jeweils auf die Faktoren ausgerichtet, die entweder einen Einfluss haben könnten, oder sich stark verändern. Im Fall der RA werden eine Reihe entzündungsspezifischer Parameter (BSG, CRP, RF, CCP) ermittelt und deren Verlauf über Jahre dokumentiert, um so die Progression der Krankheit verfolgen und darauf reagieren zu können. Es handelt sich also um messbare Produkte oder Indikatoren von pathologischen Veränderungen. Diese Indikatoren werden als Biomarker bezeichnet. Im Zentrum der Biomarkerforschung stehen zur Zeit Biomarker auf Proteinbasis und deren frühzeitiger Nachweis in Plasma, Serum oder Urin.

Wie schon im Abschnitt 2.3.2 gezeigt, sind bei der Früherkennung der RA einige Marker beschrieben, die aufgrund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität für die Diagnostizierung ein unverzichtbares Mittel darstellen. Durch das Finden neuer Marker sowie einer Kombination mit bestehenden könnte die Diagnostik so weit vorangetrieben werden, dass weiterführende Aussagen über den Verlauf oder die Frühentstehung dieser Krankheit getroffen werden können.

Durch den enormen Wissenszuwachs und die schnelle Entwicklung im Bereich der Massenspektrometrie ist die Biomarkerfindung mittlerweile eines der Hauptaufgabengebiete der klinischen Proteomics geworden. Dabei stellt die Analyse des Proteoms von humanen Körperflüssigkeiten (HBFP *human body fluid proteome*) einen der aussichtsreichsten Ansätze in der Entdeckung neuer, Protein basierender Biomarker dar (Aebersold *et al.* 2003; Yates 2004; Veenstra *et al.* 2005).

2.5.2 Biomarkersuche durch 2D-SDS-Page

Methodisch gibt es mittlerweile viele Ansätze zur Auffindung von Biomarkern durch Proteomics. Klassische 2D-SDS-PAGE mit anschließendem tryptischen Verdau der Proteine und Identifizierung mittels PMF MALDI-TOF-MS, so wie es auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam (vgl. Abschnitt 5.8, Seite 39), wird häufig bei der Auffindung von Proteinmarkern eingesetzt. Es konnte beispielsweise die Phosphoglycerinkinase 1 als serologischer Marker beim Lungenkarzinom ermittelt werden (Chen *et al.* 2003), ein Fragment vom Komplement Faktor C3 und eine Isoform des Apolipoproteins A1 für das Leberkarzinom (Steel *et al.* 2003), das Hitzeschockprotein 27 (HSPB1) als Frühmarker beim Mammakarzinom (Rui *et al.* 2003) und Haptoglobin und Serum Amyloid A Protein beim Magenkarzinom (Juan *et al.* 2004).

Die Auftrennung humanen Serums mittels elektrophoretischer Methoden erweist sich allerdings als ein umfangreiches Unterfangen mit mehreren Arbeitsschritten. Das Blut übernimmt neben der Versorgung der Organe mit Sauerstoff auch den Transport von Nährstoffen und enthält daher Lipide, Salze und freie Aminosäuren. Es birgt somit neben den zu untersuchenden Proteinen eine Vielzahl geladener und ungeladener Moleküle, die mit der elektrophoretischen Auftrennung interferieren. Erst durch die Abreicherung dieser Substanzen durch Dialyse oder Fällung ist es möglich, das Proteom zu untersuchen. Doch neben der Abreicherung dieser Substanzen stellt Serum an sich ein sehr schwierig zu analysierendes Gemisch an Proteinen dar. Serum enthält eine sehr große Anzahl von Proteinen, die sich in ihren Konzentrationsbereichen um 6-9 Potenzen unterscheiden. Albumin, die Immunglobuline G und A, Transferrin, Antitrypsin und Haptoglobin machen fast 75 % der sich im Serum befindlichen Proteine aus (Anderson *et al.* 2002) und ihre Konzentrationen liegen im Bereich von Milligramm pro Milliliter Serum (10^{-3} g/ml). Neben diesen so genannten *high abundant* Proteinen enthält das Serum auch Proteine, die sich nur in Spuren nachweisen lassen. Diese so genannten *low abundant* Proteine, wie z.B. Zytokine liegen im Konzentrationsbereich von 10^{-9} - 10^{-12} mg/ml vor und können an *high abundant* Proteine gebunden sein (Anderson 2005). Durch die Entfernung dieser Proteine (Depletion) konnte gezeigt werden, dass eine deutliche Verbesserung der Detektion von *low abundant* Proteinen möglich ist (Georgiou *et al.* 2001; Ahmed *et al.* 2003; Greenough *et al.* 2004; Bjorhall *et al.* 2005).

2.5.2.1 Depletionsmethoden

In der Literatur sind unterschiedliche Methoden zur Entfernung der *high abundant* Proteine beschrieben, von denen im Folgenden einige vorgestellt werden.

Ahmed *et al.* konnten durch den Farbstoff Cibacon Blue den Anteil an Albumin in humanen Seren spezifisch verringern (Ahmed *et al.* 2003). Des Weiteren wurde eine Abreicherung der Immunglobuline mittels Protein A oder G beschrieben (Fu *et al.* 2005). Durch diese Methoden werden jedoch nur wenige Proteine abgereichert. Den aussichtsreichsten Ansatz stellen daher die MARCs (*multi affinity removal columns*) dar (Pieper *et al.* 2003; Echan *et al.* 2005). Die Funktionsweise einer MARC ist in Abschnitt 5.9.1 exemplarisch dargestellt.

MARCs werden von vielen kommerziellen Herstellern angeboten und unterscheiden sich in der Beladung mit verschiedenen polyklonalen Antikörpern, die die Abreicherung der *high abundant* Proteine vermitteln. Neben Agilent (Human 6, Human 7, Human 14), Beckman Coulter (Proteome Lab[®] IgY12) und Sigma Aldrich (ProteoPrep[®] 20) gibt es eine Vielzahl von Kits zum Entfernen von *high abundant* Proteinen, deren Vergleich untereinander unter anderem Gegenstand heutiger Forschung ist (Bjorhall *et al.* 2005). Dabei ist die Depletion von humanen Proteinen durch die Funktionalisierung des Säulenmaterials mit polyklonalen

Antikörpern, deren Immunisierung im Huhn erfolgte (IgY), besonders spezifisch (Hinerfeld *et al.* 2004).

Da jedoch alle MARCs eine Restunklarheit darüber lassen, welche Epitope speziell erkannt werden, besteht bei der Depletion stets die Gefahr der Abreicherung von potentiellen Biomarkern. Es gibt daher proteomische Untersuchungen nur derer Proteine, die an *high abundant* Proteine wie das Albumin binden. Dieser Forschungsansatz wird in dem Begriff *Albuminome* beschrieben (Gundry *et al.* 2007).

Des Weiteren ist die Arbeit mit Immunaффinitätssäulen mit dem Risiko verbunden, dass bei mehrmaliger Benutzung ein Kapazitätsverlust durch Verlust der Affinitätspartner (Antikörper) eintritt (*bleeding*). Dies könnte sich, neben der Verunreinigung der Probe mit den Antikörpern der Säule, bei der Betrachtung des Serumproteoms in einem geänderten Spotpattern auf einem 2D-Gel niederschlagen.

Diese Probleme sind bei der Verwendung von Peptiden anstelle von Antikörpern als Ligationspartner deutlich verringert. Beim ProteomeMiner[®] (Biorad) wurde das Säulenmaterial mit einer Vielzahl kombinatorisch erzeugter Hexapeptide funktionalisiert (CPLL, *combinatorial peptide ligand libraries*). Diese Permutation unterschiedlichster Liganden weist ähnliche Eigenschaften wie eine Depletion mittels Immunoaffinität auf (Boschetti *et al.* 2008; Boschetti *et al.* 2008; Righetti *et al.* 2008). Die Leistungsfähigkeit dieser Depletionstechnik wurde bei den Untersuchungen von Cerebrospinalflüssigkeit (Shores *et al.* 2008) und Urin (Castagna *et al.* 2005) unter Beweis gestellt. Die Methode fokussiert sich dabei hauptsächlich auf die Proteine im unteren Molekulargewichtsbereich (Mr 600 - 8000 Da) (Boschetti *et al.* 2007).

2.5.3 Weitere Methoden zur Biomarkersuche

Neben der 2D-SDS-PAGE mit anschließender Identifizierung regulierter Proteine gibt es eine Reihe anderer Methoden, die zur Zeit im Bereich der Biomarkerforschung Anwendung finden und durch die rasanten Fortschritte im Bereich der Massenspektrometrie begünstigt werden. Der Aufbau dieser *multiplexed proteomics platforms* besteht aus einer Vorfraktionierung, einer multidimensionalen Trennungsmethode und der Proteinidentifizierung mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS-Technik) und wird unter dem Begriff *shotgun proteomics* zusammengefasst. Bei der Vorfraktionierung kommen neben der Depletion diverse Trenntechniken zum Tragen: Umkehrphasenchromatographie (*reversed phase liquid chromatography, RP-LC*) (Martosella *et al.* 2005), Ionenaustauschchromatographie (*strong cation exchange chromatography, SCX oder anion-exchange-chromatography, AEC*) (Pieper *et al.* 2003), Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography, SEC*) (Horn *et al.* 2006), FFE (free flow electrophoresis) (Cho *et al.* 2005) und das Ausschneiden von Banden aus einem 1D-Gel (Thulasiraman *et al.* 2005). Die Fraktionen aus den jeweiligen Trenntechniken können auch aus der Kombination der verschiedenen Trenntechniken

resultieren. Letztendlich werden die Proteine der Fraktionen anschließend mittels Trypsin verdaut und die resultierenden Peptide chromatographisch separiert (RP-LC). Es erfolgt eine Analyse ihrer Größe durch Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) und Identifizierung des ursprünglichen Proteins durch bioinformatische Suchalgorithmen (*datamining*).

Das PPP (*plasma proteome project*) der HUPO (*human proteome organization*) hat die Ergebnisse dieser Studien zusammengefasst. Es wurden durch die verschiedenen *multiple-xed proteomics plattformen* 9504 Proteine im humanen Plasma nachgewiesen, die mit einem oder mehreren Peptiden identifiziert wurden. 3020 Proteine wurden mit mehr als zwei Peptiden identifiziert, wovon nach einem spezifischen Datenbankabgleich mit codierenden Gensequenzen insgesamt 889 Proteine mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 % nachgewiesen wurden (States *et al.* 2006). Die Separationsleistung dieser Plattformen liegt damit weit höher als die Möglichkeiten der Trennung mittels 2D-SDS-PAGE. Jedoch ist die Standardisierung der Suchalgorithmen und die Quantifizierbarkeit noch Gegenstand momentaner Optimierungsarbeiten. Dieser so genannte Ansatz der *gel free proteomics* und deren Einfluss auf die Entdeckung neuer Biomarker wird in den kommenden Jahren immer mehr an Einfluss gewinnen (Baggerman *et al.* 2005). Eine schematische Übersicht der hier behandelten Strategien der Proteomanalyse ist in Abbildung 6 dargestellt.

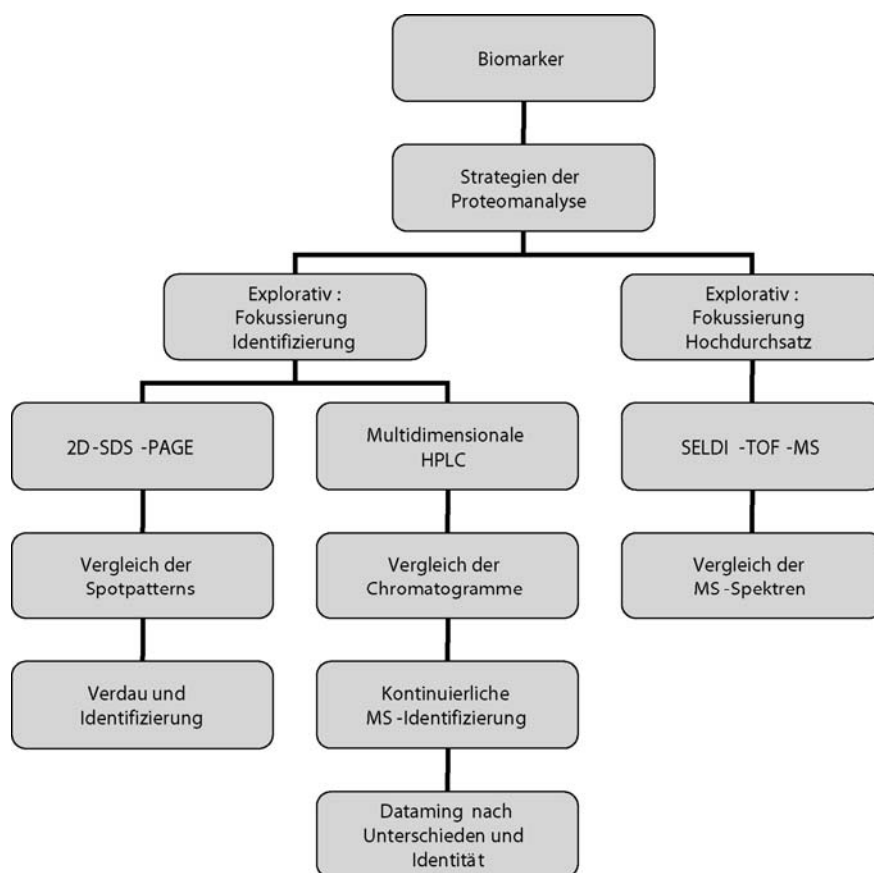


Abbildung 6: Strategien der Proteomanalyse bei der Biomarkersuche.

Unter den gelbren Systemen der Biomarkerforschung ist SELDI (*Surface enhanced laser desorption/ionization*) ebenfalls eine bedeutende Technik, die in den letzten Jahren ihre gute Anwendbarkeit bei Studien mit hohen Patientenzahlen unter Beweis gestellt hat. Es handelt sich um eine Variation von MALDI, bei dem die Oberfläche des Targets durch verschiedene Liganden funktionalisiert wurde. Gebräuchliche Oberflächen sind schwache und starke Anionen- und Kationenaustauscher, hydrophobe reverse-phased Liganden (Phenyl, C18) oder die Möglichkeit, spezifische Antikörper auf der Oberfläche zu koppeln. Nach Auftragen der Probe (Urin, Serum, Plasma) und spezifischen Waschschritten wird die gebundene Probe mit einer Matrix (Sinapinsäure) versetzt und durch Akquirierung eines MS-Spektrums ein spezifisches Peakmuster generiert. Diese Methode ist für den Hochdurchsatz konzipiert. In Biomarkerstudien, die durch SELDI durchgeführt wurden, sind daher nur die m/z-Werte als spezifische Marker angegeben. Es bedarf dann anderer Methoden zur Identifizierung der Proteinidentität.

Trotz der hier genannten Vorzüge der klinischen Proteomics gibt es Kritikpunkte gegenüber den aktuellen Arbeiten. Gegenüber den groß angelegten Studien, die auf Messwerte der Routineanalytik zurückgreifen, sind die bisher in proteomischen Studien untersuchten Kollektive sehr klein.

Ein weiteres großes Problem ist die Standardisierung der Analysemethoden. Im Fall der 2D-SDS-PAGE konnte durch die Einführung von DIGE (*differential in gel electrophoresis*) ein großer Schritt in Richtung Standardisierung getan werden. Im Bereich der multidimensionalen HPLC mit anschließender Identifizierung durch Tandem-Massenspektrometrie wird durch die Einführung von labelfreien Quantifizierungsmethoden versucht, die Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Quantifizierung zu verbessern (America *et al.* 2008; Negishi *et al.* 2008).

3 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist das Auffinden eines Biomarkers, der die Früherkennung der rheumatoiden Arthritis ermöglichen könnte. Es werden bei der Ausführung des Projektes zwei unterschiedliche Strategien verfolgt.

Im ersten Ansatz erfolgt eine proteomische Betrachtung der Zellen, die im Gelenk als Initiatoren der Entzündungsreaktion vermutet werden. Es handelt sich hierbei um die fibroblastenähnlichen Zellen der *Membrana Synovialis* (RASF = *rheumatoid arthritis synovial fibroblast*, OASF = *osteoarthritis synovial fibroblast*). Die Fibroblasten der Patientenkollektive RA und OA sollen auf Basis der 2D-SDS-PAGE untersucht werden. Unterschiedlich exprimierte Proteine werden identifiziert und hinsichtlich ihrer Funktion klassifiziert, um Informationen über die Pathogenese auf molekularer Ebene zu gewinnen. Des Weiteren soll das Vorkommen citrullierter Proteine untersucht werden und somit geklärt werden, ob pathogene Veränderungen der synovialen Fibroblasten der Grund für die Produktion der Autoantikörper (ACPA) sind.

Ferner wird im zweiten Ansatz dieser Arbeit auf Basis der 2D-SDS-PAGE eine Serumanalytik etabliert. Zur Visualisierung von *low abundant* Proteinen werden die *high abundant* Proteine des humanen Serums der Patientenkollektive mittels Immunaффinitätschromatographie (Agilent Human 6 und Beckman Coulter Proteome Lab IgY12 LC2, Abschnitt 5.9.1, Seite 45) spezifisch abgereichert. Nach dieser Vorbereitung der Serumproben werden die Patientenpools auf Basis der DIGE-Technologie analysiert. Im Idealfall lassen sich die auffälligen Proteine der Analyse der RASF nachweisen.

Methodisch wird des Weiteren erörtert, ob eine Fraktionierung des depletierten humanen Serums mittels RP-Chromatographie die Separationsleistung von 2D-Gelen erhöhen kann.

Durch den Vergleich der Proteinspottpatterns des Serum von Patienten mit RA und OA mit gesunden Spendern soll ein serologischer Marker identifiziert werden, der zusammen mit den bestehenden Markern (Rheumafaktor, Anti-CCP, Anti-MCV) zur Frühdiagnostizierung eingesetzt werden kann.

4 Material

4.1 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden aufgrund der Sicherstellung von Sterilität, Kontaminationsgefahr oder Reinheit als Einwegartikel verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurden sie vorher bei einem Wasserdampfdruck von 2 bar bei 121 °C für 1 h in einem Autoklaven sterilisiert.

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Nunc, Sarstedt, Greiner Bio-One, Biozym, Heraeus, Biorad, Carl Roth, Sigma-Aldrich, B.Braun, BD, Mettler-Toledo, Sartorius, Applied Biosystems, Sigma und Eppendorf verwendet.

4.2 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Roche AG (Mannheim), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim), Bio-Rad GmbH (München), Serva GmbH (Heidelberg) und Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) bezogen und hatten den -Reiheitsgrad p.a. oder reinst. 96 %, vergällt mit 1 % (v/v) MEK Ethanol wurde aus der Klinikumsapotheke bezogen. Reinstwasser (Milli-Q) wurde aus einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore (Billerica, USA) bezogen und hatte eine Leitfähigkeit von mehr als 18 MΩ cm.

4.3 Lösungen

Zellkultur

DMEM „high Glucose“	Invitrogen, Karlsruhe
FCS (hitzeinaktiviert)	Invitrogen, Karlsruhe
Glutamin 200 mM (100 x)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100 x)	PAA Laboratorien, Pasching
MEM-Vitamins (100 x)	PAA Laboratorien, Pasching
Trypsin / EDTA (1:250)	PAA Laboratorien, Pasching
Kollagenase (lyophilisiert)	Invitrogen, Karlsruhe
E.C. Nummer 3.4.2.4.3.	
Dispase (lyophilisiert)	Invitrogen, Karlsruhe
E.C. Nummer 3.4.24.2	
PBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	8,0 g/l Natriumchlorid (NaCl) 0,2 g/l Kaliumchlorid (KCl) 1,44 g/l Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) 0,24 g/l Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) Auf pH 7,4 eingestellt 20 Minuten 121 °C autoklaviert
Kollagenase Dispase Verdaupuffer	0,05 % (w/v) Kollagenase 0,05 % (w/v) Dispase in PBS
Lysepuffer	9,5 M Urea, 4 % (w/v) CHAPS, 50 mM DTT Proteaseinhibitoren Complete [®] EDTA Free (Roche)

Proteinbiochemische Methoden

Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
BSA-Standard	1 mg /ml in Milli-Q
Rehydratationspuffer	6,0 M Urea, 2 % (w/v) CHAPS, 25 mM DTT, 0,2 % Ampholyte, 0,001 % Bromphenolblau
Equilibrierungspuffer I (DTT)	6 M Urea, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 2 % (w/v) SDS, 20 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) DTT , 0,001 % Bromphenolblau
Equilibrierungspuffer II (IAA)	6 M Urea, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 2,5 % (w/v) Iodacetamid , 0,001 % Bromphenolblau
Ampholyte-Stammlösung	Bio-Lyte® pH 3-10, Bio-Rad, München Bio-Lyte® pH 5-8, Bio-Rad, München
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	181,71 g/l Tris-HCl mit rauchender Salzsäure auf pH 8,8 einstellen
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	60,57 g/l Tris-HCl Mit rauchender Salzsäure auf pH 6,8 einstellen
Rotiphorese Gel 30 (37,5 :1)	Carl Roth, Karlsruhe
Reinstwasser	Ampuwa®, Wasser für Injektionszwecke
APS-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
5 x Tris-Glycin Elektrophoresepuffer	125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 0,5 % (w/v) SDS
20 x MOPS-Puffer	Bio-Rad, München
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, 186 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
TBS	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl Mit rauchender Salzsäure auf pH 7,4 einstellen
TBS-T	TBS + 0,02 % Tween-20
ECL-Reagenz	Perkin Elmer, Waltham
Western Lighning® Plus ECL	
Fixierlösung	40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie Färbelösung	Roti®-Blue (5x Konzentrat)
Lysepuffer	9,5 M Urea, 4 % (w/v) CHAPS, 50 mM DTT Proteaseinhibitoren Complete® EDTA Free (Roche)

Antikörper

Name	Host	Hersteller
Anti-HSP27	Kaninchen	R&D, Wiesbaden
Katalog-Nr. AF 1580		
Anti-Citrullin	Kaninchen	Biomol AG, Hamburg
Katalog-Nr. C5806		
Anti-Citrullin Detection KIT	Kaninchen	Biomol AG, Hamburg
Katalog-Nr. C5806-03		
Anti-Vimentin	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Steinheim
Katalog Nr. HPA001762		
Anti-Dextrin	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Steinheim
Katalog-Nr. D8940		
Anti-Rabbit HRP-konjugiert	Maus	GE Healthcare

Marker

Marker 1 (Immunoblot)	Bio-Rad, München	Precision Plus Protein <i>Kaleidoscope</i> Standard
Marker 2 (Elektrophorese)	Fermentas Vilnius	Page Ruler™ Unstained Protein Ladder

Chromatographie

Depletionspuffer A (10 x)	100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1,5 M NaCl
Depletionspuffer B (10 x)	1 M Glycine HCl, pH 2,5
Neutralisationspuffer C (10 x)	1 M Tris-HCl, pH 8,0
RP Laufmittel A	H ₂ O + 0,05 (v/v) TFA
RP Laufmittel B	ACN + 0,05 (v/v) TFA
Lysepuffer	9,5 M Urea, 4 % (w/v) CHAPS, 50 mM DTT Proteaseinhibitoren Complete® EDTA Free (Roche)

Massenspektrometrie

Procines modifiziertes Trypsin	Promega, Mannheim
Trypsinpuffer	1 mM HCl
Verdaupuffer	10 % ACN (v/v) in 10 mM NH ₄ HCO ₃
Entfärbelösung	50 % (v/v) ACN in H ₂ O
Entwässerung	100 % ACN
Extraktionslösung	60 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA in H ₂ O
Matrix	Gesättigte 2,5-Dihydroxybenzoesäurelösung Sigma-Aldrich, Steinheim

4.4 Geräte**Zellkultur**

Zellkulturflasche	Nunc, Langenselbold	Nunclon™ Surface 75 cm ²
Zellkulturflasche	BD, Heidelberg	BD Falcon™ 75 cm ²
Zellsieb	BD, Heidelberg	BD Zellsieb 100 µm
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnbrecht	2, 5, 10, 25 ml
Kühlzentrifugen	Sigma, Osterode	Sigma 3-18K
Brutbegasungsschrank	Heraeus, Hanau	Heraeus BB6220
Sterilwerkbank	Clean Air, Woerden	Typ CA/R
pH-Meter	Sartorius, Göttingen	Basic pH Meter pB-11
Wasserbad	GFL, Burgwedel	GFL 1083
Mikroskop	Carl Zeiss, Göttingen	Axiovert 40

Proteinbiochemische Methoden

Küvetten	Sarstedt, Nürnbrecht	Halb-Mikroküvetten
Photometer	Perkin Elmer, Waltham	Lambda 25
Kühlbare Tischzentrifuge	Sigma, Osterode	Sigma 1-15PK Rotor 12132-H
Ultrafiltrationskonzentratoren	Sartorius Stedim, Göttingen	Vivaspin 15 5000 MWCO Vivaspin 4 5000 MWCO
Isoelektrisches Fokussiersystem	Bio-Rad, München	Protean IEF Cell
IPG-Streifen	Bio-Rad, München	Ready Strip™ IPG-Streifen 11 cm & 17 cm pH 3-10, pH 3-10 NL, pH 5-8, pH 4-7

Elektrophoresesystem 20 cm x 20 cm 13 cm x 8 cm 8 cm x 6 cm Fertiggele Criterion®	Bio-Rad, München Bio-Rad, München Bio-Rad, München Bio-Rad, München Bio-Rad, München	Protean II® Criterion® Mini-Protean® 12 % Bis-Tris IPG 10 % Bis-Tris IPG 12 % Bis-Tris 18-well
Immunoblotsystem Immunblotmembran Filterpapier	Bio-Rad, München Millipore GE Healthcare, München	Mini Trans Blot Cell Immobilon-P ^{5Q} Membran Whatman, Standard
Temperiereinheit Spannungsquellen	Uniequip, Meadowpine Bio-Rad, München Gibco, Karlsruhe LBB, Uppsala Pharmacia, Uppsala	Unijet 2 Power-Pack 1000 Power Supply PS3002 2301 Macrodrive 1 ECPS 2000/300
Gelfärbeschalen	Nalgene, Rochester Nalgene, Rochester Roth, Karlsruhe GFL, Burgwedel	22,5 x 22,5 cm 12,5 x 12,5 cm 14,3 x 10 cm GFL 3005
Rotationsschüttler Ungekühlte Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg	Centrifuge 5415D Rotor 14198
Kühlbare Tischzentrifuge	Sigma, Osterode	Sigma 1-15PK Rotor 12132-H
Geldokumentationssystem pH-Meter	Fujifilm, Düsseldorf Sartorius, Göttingen	Fuji FLA 5100 Basic pH Meter pB-11

Chromatographie

HPLC-System 1 Äkta Purifier	GE Healthcare, München	A-900 P-900 UV-900 Frac-950 LpH/C-900
HPLC-System 2 Shimadzu LC-10-Serie	Shimadzu, Duisburg	LC-10 AS SIL-10 A FRC-10A CTO-10A CBM-10A SPD-MC10A
Depletionssäule 1	Agilent, Böblingen	Agilent Human 6 HC 4,6 x 10 mm
Entsalzungs- und Fraktionierungssäule	Agilent, Böblingen	Agilent mpCP HI-Recovery Protein Column 4,6 x 50 mm
Depletionssäule 2	Beckman-Coulter, Krefeld	Proteome Lab IgY-12 LC2 6,4 x 63 mm
Ultrafiltrationskonzentratoren	Sartorius Stedim, Göttingen	Vivaspin 15 5000 MWCO Vivaspin 4 5000 MWCO
Lyophilisator Ultraschallbad	Heraeus-Christ, Hanau Bradelin, Berlin	Christ Alpha 1-4 Sonorex Super

5 Methoden

5.1 Zellkultur

5.1.1 Isolierung synovialer Fibroblasten aus Synovia

Die extrazelluläre Matrix in Geweben ist eine komplexe Mischung aus Kollagenen und anderen extrazellulären Matrixproteinen (Glykoproteine, Proteoglykane). Für die Isolierung synovialer Fibroblasten muss die Matrix schonend aufgelöst werden, während die zellulären Strukturen nicht beschädigt werden dürfen. Für die Gewebedisaggregation wird daher eine Kombination aus proteolytischen Enzymen benötigt. Neben der reinen kollagenolytischen Eigenschaften wird durch die milde Wirkung der Dispase eine proteolytische Komponente hinzugefügt.

Das Gewebe, aus denen die synovialen Fibroblasten gewonnen wurde, stammt aus Synovektomien der Knie-, Hüft-, Sprunggelenks- und Schultergelenke von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) oder Osteoarthritispatienten (OA). Die Operationen wurden unter Reiraumbedingungen in den Orthopädischen Kliniken Kassel gGmbH von Herrn Dr. B. Mai durchgeführt. Direkt nach Entnahme wurde das erkrankte Gewebe bis zu weiteren Bearbeitungsschritten in ein Gefäß mit sterilen PBS überführt und bei 4 °C gelagert.

Nach Erhalt wurde das Gewebe zunächst intensiv mit PBS gewaschen bis keine Blutbestandteile mehr in der Waschlösung und im Gewebe auszumachen waren. Anschließend wurde das Gewebe makroskopisch untersucht und mit einem Skalpell die pathologisch durch Zottenbildung verdickte *Membrana Synovialis* von der *Membrana Fibrosa* getrennt. Nach erneutem Waschen des herauspräparierten Gewebes wurde es mit 35 ml Kollagenase-Dispase-Verdauung versetzt und unter leichtem Schütteln für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Verdauungsansatz mittels eines 100 µm Zellsiebs gefiltert, um unverdaute Gewebestücke zu entfernen. Der Durchlauf wurde aufgefangen und zwei Mal mit 25 ml PBS gewaschen. Zwischen den Waschschrritten fand eine Zentrifugation bei 400 g und 4 °C statt. Das resultierende Zellpellet wurde in 20 ml Zellkulturmedium aufgenommen und gleichmäßig auf zwei 75 cm² Zellkulturflaschen verteilt.

5.1.2 Kultivierung synovialer Fibroblasten

Die Kultivierung erfolgte anhand der von Doyle et. al. beschriebenen Grundlagen der Zellkulturtechnik (Doyle *et al.* 1996). Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit einer Glucosekonzentration von 4,5 g/l unter Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS) sowie von 1 % (v/v) 200 mM Glutaminlösung und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO₂ kultiviert.

Nach 12 h, 24 h, 48 h und 72 h wurde ein Mediumswechsel durchgeführt. Zuvor wurden die Gewebekulturflaschen mit 25 ml PBS gespült, um nicht adhärente Zellen, Gewebe- und Zelldebris, tote Zellen und Zellen des peripheren Blutsystems (vorzugsweise Monozyten) zu entfernen. In den anschließenden Wochen der Kultivierung wurde alle 72 h ein Mediumswechsel durchgeführt und die Zellpopulation mikroskopisch auf Kontaminationen und Dichte untersucht. Bei ca. 80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert.

5.1.3 Passagieren von Zellen

Zum Passagieren wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch verfolgt und nach zwei Minuten wurden die Zellen durch Abklopfen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 18 ml Zellkulturmedium. Anschließend wurde die Zellsuspension auf zwei neue 75 cm² Zellkulturflaschen verteilt.

5.1.4 Zellyse

Die Analyse der synovialen Fibroblasten erfolgte stets nach der dritten Passage. Anfänglich wurden die adhärent wachsenden Zellen durch Abschaben abgelöst. Jedoch resultierte diese Methode in einer sehr geringen Proteinausbeute. Das Ablösen der Zellen durch einen Zellschaber zerstörte ein Großteil der Zellen, so dass beim Waschen die zytosolischen Proteine weggewaschen wurden. Aus diesem Grund wurden die Zellen abtrypsiniert.

Vor der Zugabe der Trypsin-EDTA-Lösung wurde die Grundfläche der Zellkulturflasche gründlich mit sterilen PBS gespült. Nach dem Abtrypsinieren wurden die Zellen in sterilem PBS aufgefangen und zwei Mal mit 25 ml PBS gewaschen. Zwischen den Waschschrritten fand eine Zentrifugation mit 400 g bei 4 °C statt. Das Zellpellet wurde anschließend mit Lysepuffer (50 µl pro eingesetzter 75 cm² Zellkulturflasche) bis zur vollständigen Klärung des Lysates auf Eis gelagert und alle 10 Minuten leicht durchmischt.

Nach vollständiger Klärung wurde das Zellysate mit 21.000 g 30 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in Aliquots bei -25 °C eingefroren. Die Proteinbestimmung fand stets nach einmaligem Einfrieren statt.

5.2 Proteinbiochemische Methoden

5.2.1 Bradford Proteinbestimmung

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 bildet in saurer Lösung mit den kationischen, nichtpolaren und hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren der Proteine

Komplexe. Durch die Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffes von 470 nm zu 595 nm (Bradford 1976).

Durch die Korrelation der Zunahme der Absorption des Protein-Farbstoffgemisches mittels eines Standardproteins bekannter Konzentration kann eine Kalibrierungskurve erstellt werden. Diese Kalibrierungskurve ist nur in großer Verdünnung linear ansteigend und von Protein zu Protein verschieden. Je nach Anwendungszweck können Standardproteine wie Chymotrypsin, Lysozym, IgG oder BSA zum Einsatz kommen.

Der Test wurde in Küvettenform durchgeführt. Nach Verdünnung des Bradford-Reagenzes im Verhältnis 1:5 wurde jeweils 1 ml in die Halb-Mikroküvetten vorgelegt und 2, 4, 6, 8, 10 µl einer 1 mg / ml BSA-Stammlösung zugegeben. Aus der Auftragung der Absorptionswerte gegen die BSA-Konzentration wurde eine Kalibrierungskurve erstellt. Anhand der Steigung, der Verdünnung der Probe, dem Probenvolumen und dem Leerwert des Probenpuffers errechnete sich die Konzentration.

5.2.2 Probenaufarbeitungsmethoden

5.2.2.1 Acetonfällung

Die Löslichkeit eines Proteins in wässrigen Lösungen hängt von der Zusammensetzung der Aminosäureseitenketten des jeweiligen Proteins ab. Handelt es sich bei den Seitenketten vorrangig um hydrophobe, unpolare Residuen, ist die Löslichkeit in wässrigen Lösungen eher schwach. Bei polaren, hydrophilen Residuen ist sie hingegen gut.

Bei der Zugabe eines kurzkettigen organischen Lösungsmittels (Methanol, Ethanol, Aceton, Acetonitril u. a.) wird die Hydratationskraft der Lösung herabgesetzt und die Proteine können aufgrund ihrer freigelegten Seitenketten über Van-der-Waals- oder elektrostatische Kräfte miteinander interagieren und aggregieren. Diese Aggregate können durch Zentrifugation getrennt werden.

Bei der Acetonfällung wird die zu fällende Probe im Verhältnis von 1:3 mit eiskaltem Aceton vermischt und bei -20 °C über Nacht inkubiert. Der anschließende Zentrifugationsschritt richtet sich nach dem Probenvolumen. Bei Proben mit einem Volumen über 2 ml wurde bei 5000 g und 4 °C für 60 Minuten, bei einem Volumen bis 2 ml wurde bei 21.000 g bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert

Nach Sedimentation wird der Überstand dekantiert und die Probe bei Raumtemperatur für 30 Minuten getrocknet. Das Pellet wird anschließend in Lysepuffer aufgenommen und bis zur späteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

5.2.2.2 Chloroform-Methanol-Fällung

Die Extraktion wurde gemäß dem Protokoll von Wessel *et al.* durchgeführt (Wessel *et al.* 1984). Sie ist nur für Proben bis zu einem Gesamtvolumen von 100 µl anwendbar.

100 µl einer Proteinprobe werden mit 400 µl eiskaltem Methanol vermischt. Anschließend werden 100 µl Chloroform hinzugegeben und erneut vermischt. Nach der Zugabe von 300 µl Milli-Q und Durchmischung erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 g mit 4 °C für eine Minute. Es bildet sich ein 2-Phasensystem aus, bei dem sich das präzipitierte Protein zwischen den beiden Phasen befindet. Die obere wässrige Phase wird abgenommen und verworfen. Es werden 600 µl Methanol zugegeben und gut durchmischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 14.000 g mit 4 °C für eine Minute wird der Überstand verworfen und das erhaltene Zellpellet nach Trocknung mittels Stickstoff in Lysepuffer aufgenommen und bis zur späteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

5.2.2.3 Ankonzentrierung und Entsalzung mittels Vivaspin®-Konzentratoren

Bei der Konzentration durch Vivaspin 15 bzw. Vivaspin 4 Konzentratoren handelt es sich um eine Ultrafiltration mit einer 5000 Da MWCO-Membran im Kleinmaßstab. Mit den Vivaspin-15 können Probenvolumen bis zu 20 ml eingeengt werden, bei den Vivaspin 4 bis zu 5 ml. Durch Zentrifugalkräfte wird die Probe durch die Membran gepresst und man erhält ein Retentat, in dem sich mit einer hohen Wiederfindungsrate alle Proteine befinden sollen, die größer als 5000 Da sein. Durch sukzessives Addieren eines Puffers kann die Probe entsalzt und ankonzentriert werden.

In dieser Arbeit wurden Proben unterschiedlicher Volumina mit 4000 g bei 4 °C so weit wie möglich eingeengt. Je nach Probenbeschaffenheit und Proteinkonzentration dauerte die Zentrifugation bis zu 4 h.

5.2.2.4 Ankonzentrierung mittels Agilent mpC18

Die Methode ist aufgrund ihrer Zugehörigkeit zum chromatographischen Methodenteil unter Abschnitt 5.9.4.1 (Seite 47) ausführlich in beschrieben.

5.3 Elektrophoretische Methoden

5.3.1 Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine aus der zu untersuchenden Probe gemäß ihrer Nettoladung aufgetrennt. Die Nettoladung eines Proteins setzt sich dabei aus dem relativen Gehalt saurer und basischer Aminosäureseitenketten und dem umgebenden pH-Wert zusammen. An einem definierten pH-Wert heben sich die Ladungen eines Proteins auf, so dass sich das Molekül nach außen hin ladungsneutral verhält. Dieser Zustand, bei dem die Nettoladung eines Proteins gleich null ist, bezeichnet man als isoelektrischen Punkt eines Proteins (Westermeier 2004).

Im dem hier benutzten System der Firma Bio-Rad erfolgte die Trennung über einen gelbasierten, immobilisierten pH-Gradienten. Der pH-Gradient wird durch amphotere Substanzen (bifunktionelle Immobilene) erzeugt, die kovalent an die Gelmatrix gebunden sind (Westermeier *et al.* 1983). Die Gelmatrix ist auf eine Trägerfolie aufpolymerisiert und wird im getrockneten und gefrorenen Zustand geliefert (IPG-Streifen).

Das aufzutrennende Proteingemisch wird zum Auftragen direkt in die Fokussierungswanne gegeben, in der es von den IPG-Streifen aufgenommen wird. Nach 30 Minuten wird der IPG-Streifen mit Öl überschichtet, um das Austrocknen der Streifen zu verhindern. Dieser Vorgang (Rehydratation) wird in der Regel mit 12 Stunden bei einer Temperatur von 20 °C angegeben.

Je nach Länge des IPG-Streifens werden zur Fokussierung unterschiedliche Spannungen angelegt, die man aus den Tabellen 4 und 5 entnehmen kann.

Tabelle 4: Fokussierungsprogramm IPG-Streifen 17 cm für Protean II®-Kammer

Schritt	Voltstärke [V]	Gradient	Zeit [h]	Funktion
1	500	Rapid	1	Proteineintritt
2	1000	Rapid	1	Proteineintritt
3	1000-10000	Linear	4	Fokussierung
4	10000	Rapid	50.000 Vh	Fokussierung
5	500	Rapid	12	Step and Hold

Tabelle 5: Fokussierungsprogramm IPG-Streifen 11 cm für Criterion®-Kammer

Schritt	Voltstärke [V]	Gradient	Zeit [h]	Funktion
1	500 V	Rapid	1	Proteineintritt
2	1000V	Rapid	1	Proteineintritt
3	1000-8000V	Linear	4	Fokussierung
4	10000 V	Rapid	30.000 Vh	Fokussierung
5	500 V	Rapid	12	Step and Hold

Die Proteinmengen sind je nach Probentyp und der anschließenden Färbemethode zu wählen und sind in der Tabelle 6 aufgeführt:

Tabelle 6: Maximale Proteinmengen für die isoelektrische Fokussierung je nach Färbungstechnik

IPG-Streifen	Flamingo [®]	Coomassie
17 cm Protean II [®]	150 µg	500 µg
11 cm Criterion [®]	100 µg	150 µg

Das maximale Rehydratationsvolumen (Probe + Rehapuffer) beträgt bei den 17 cm IPG-Streifen 300 µl, bei den 11 cm IPG-Streifen 215 µl.

Nach erfolgreicher isoelektrischer Fokussierung werden die Streifen aus der Fokussierwanne genommen und vom Öl befreit. Anschließend werden sie für jeweils 20 Minuten in Equilibrierpuffer I & II inkubiert. Während der Inkubation mit DTT werden die Cysteine der Proteine reduziert und anschließend im zweiten Equilibrierschritt mittels Iodacetamid carbamidomethyliert. Dies ist erforderlich, damit sich reduzierte Disulfidbrücken während der 2. Dimension (SDS-PAGE) nicht wieder verbinden. Allerdings werden die Cysteine während dieses Schrittes irreversibel modifiziert, wodurch es zu einem Masseschift von 57,034 Da (monoisotopische Masse) kommt. Dieser Masseschift muss bei der Identifizierung der Proteine berücksichtigt werden.

5.3.2 Proteinelektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (kurz: SDS-PAGE für engl. *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine Methode zum Auftrennen von Proteinen nach ihrer Größe im elektrischen Feld. Dabei bindet das anionische Detergenz SDS an die Proteine und überdeckt die Eigenladung der Proteine. Die Trennung im elektrischen Feld erfolgt daher ausschließlich nach der Größe des Proteins (Laemmli 1970). Durch Zugabe eines reduzierenden Agens (DTT; TCEP, Mercaptoethanol) werden die Disulfidbrücken aufgespalten und die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins aufgebrochen.

Zur Auftrennung werden die denaturierten Proben auf ein Gel aus Polyacrylamid aufgetragen, an das eine Spannung angelegt wird. Das Gel fungiert dabei wie ein Sieb. Kleine Proteine wandern schnell durch die Matrixstruktur des Gels, während große Proteine deutlich länger benötigen. Die Siebwirkung des Gels hängt dabei maßgeblich von der Konzentration des Acrylamids und dessen Quervernetzung ab.

Als Elektrolyt werden in dieser Arbeit zwei verschiedene Puffersysteme verwendet. Bei großen Gele der Protean II[®]-Kammer kommt das Tris-Glycin-Puffersystem zum Einsatz. Die Gele haben pH 8,8, was zu einer Deaminierung, Alkylierung und Reoxidierung der Disul-

fidbrücken von Proteinen führt, da die Proteine im elektrischen Feld vom reduzierenden Agens getrennt werden.

Dieser Nachteil ist bei den kommerziell verfügbaren Neutralgelen (Criterion®) mit Bis-Tris-Puffersystem verbessert worden. Da diese Gele über ein gelinternes Reduktionsmittel verfügen und unter neutralen Bedingungen gegossen werden (pH 6,5 - pH 6,8) fördert dies die Protonierung der Cysteinresiduen und verhindert so eine Reoxidierung (Graham *et al.* 2005).

Die beiden Gelsysteme unterscheiden sich in ihrer Größe. Die Protean II®-Gele sind mit 22,5 cm x 22,5 cm im Vergleich zu den Criterion®-Gelen mit 13 cm x 8 cm doppelt so groß. Die Laufzeit ist mit ca. 6 h (15 Minuten bei konstant 100 V; 5,5 h bei konstant 200 V) bei den Protean II®-Gelen im Vergleich zu Criterion®-Gelen (1-1,5 h bei konstant 200 V) deutlich länger. Es wurden in dieser Arbeit zur Optimierung der Methoden 12,5 % Protean II®-Gele mit einer Dicke von 1 mm verwendet, dessen Zusammensetzung der Tabelle 7 zu entnehmen ist.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Protean II^(R)-Gele

Protean II Gel	Konzentration			
	10 %	12 %	12,5 %	15 %
	[ml]			
Ampuwa	16.67	14.00	13.33	10.00
1,5 M Tris pH 8,8	10.00	10.00	10.00	10.00
Rothiphorese Gel 30	13.33	16.00	16.67	20.00
10 % APS-Lösung	0.20	0.20	0.20	0.20
TEMED	0.02	0.02	0.02	0.02

Für Western Blots kamen Mini-Protean®-Kammern zum Einsatz, dessen Bestandteile und Volumina in der Tabelle 8 abgebildet sind. Die Dicke der Gele betrug 1 mm.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Mini-Protean^(R)-Gele

Mini-Protean Gel	Konzentration			
	10 %	12 %	12,5 %	15 %
	[ml]			
Ampuwa	3.125	2.625	2.5	1.875
1,5 M Tris pH 8,8	1.875	1.875	1.875	1.875
Rothiphorese Gel 30	2.5	3	3.125	3.75
10 % APS-Lösung	0.075	0.075	0.075	0.075
TEMED	0.0375	0.0375	0.0375	0.0375

Bei den kleineren Criterion® Neutralgelen kamen die 10 % bzw. 12 % Bis-Tris-Gele mit Vertiefung für IPG-Streifen und Marker, sowie die 12 % Bis-Tris Gele mit 18 Spuren zum Einsatz. Auch hier beträgt die Dicke der Gele 1 mm.

Zum Molekulargewichtsabgleich wurde vorrangig der Marker 2 verwendet, da alle Banden mittels Flamingo[®] visualisiert werden konnten. Bei allen Western Blots kam der Marker 1 wegen seiner vorgefärbten Banden zum Einsatz.

5.4 Immunologische Methoden

5.4.1 Western Blot

Der Transferprozess von Proteinen auf eine Membran unter Beibehaltung der relativen Position und der Auflösung nennt man blotten. Dabei bezeichnet der Western Blot (auch Immunblot genannt) explizit den Transfer von Proteinen aus einer Gelmatrix auf eine Trägermembran (Towbin *et al.* 1979). Der schematische Ablauf eines Western Blots ist in Abbildung 7 dargestellt.

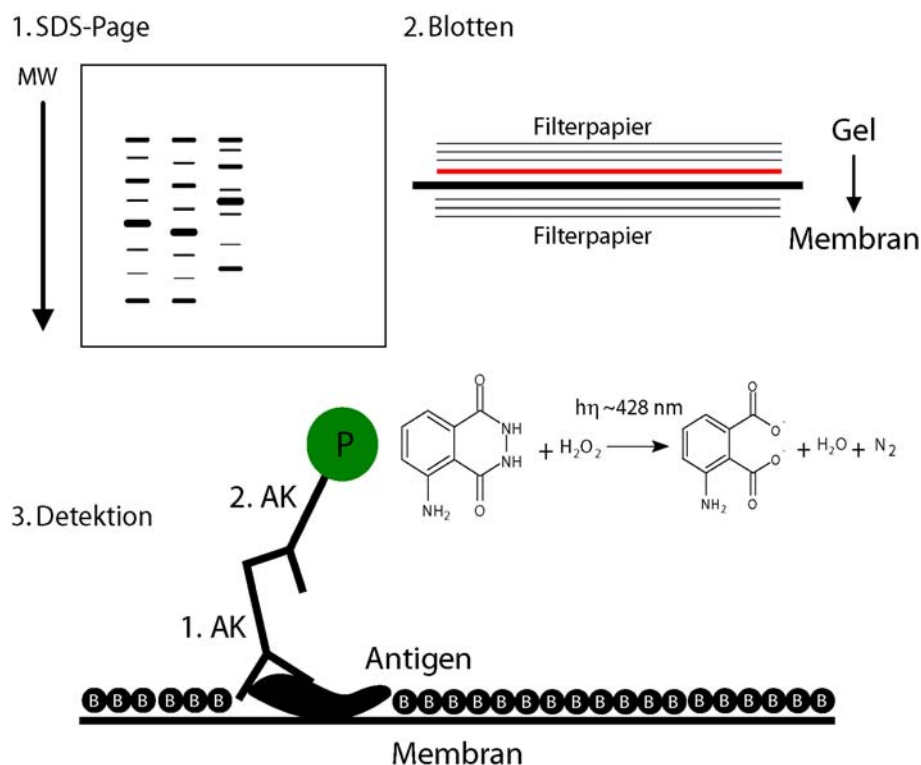


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Detektion eines Immunoblots. **(1)** Auftrennung der Proteine nach Größe durch SDS-PAGE **(2)** Elektrotransfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran **(3)** Nach dem Absättigen der Membran mit BSA (**B**) erfolgt die Detektion des spezifischen Erstantikörpers (**1.AK**) durch einen peroxidasegekoppelten (**P**) Sekundärantikörper (**2.AK**) und die Umsetzung von Luminol unter Freisetzung von Licht.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich ein Elektrotransfer nach einer SDS-PAGE durchgeführt. Zum Einsatz kam eine Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad, München), die den Transfer in einem Tank-System ermöglicht. Es wurde für den Transfer eine Polyvinylidenmembran (PVDF) mit einer Porengröße von 0,2 µm verwendet (Immobilon-P^{SQ}, Millipore), die vor Gebrauch 10 Sekunden in 100 % Methanol aktiviert, danach in Transferpuffer für 10 Minuten equilibriert und dann auf das Gel gelegt wurde (Gultekin *et al.* 1988). Gel und Membran wurden zwischen zwei Filterpapiere und zwei Schwämme gelegt, die mit Transferpuffer gesättigt waren. Das erhaltene Packet aus Gel, Membran, Filterpapier und Schwämmen wurde in die Mini-Trans-Blot Kammer eingesetzt, mit Transferpuffer aufgefüllt und bei maximal 100 V für 500 mAh geblottet. Nach dem Transfer wurde die Membran für 30 Minuten getrocknet. Dieser Schritt kann alternativ für die Absättigung der Membran mit BSA eingesetzt werden und ist für die Inaktivierung der Membran verantwortlich, um in kommenden Schritten unspezifische Proteinbindung zu vermeiden.

Es erfolgte eine Inkubation mit einem spezifischen Erstantikörper (1. AK) in geeigneter Verdünnung in TBS-T mit 1 % (w/v) BSA über Nacht im Kühlraum (ca. 8 °C) unter leichtem Schütteln. Nicht gebundener Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt (3 x 5 Minuten). Es erfolgte im Anschluss eine Inkubation mit einem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper (2. AK) für eine Stunde, der spezifisch an den F_C-Teil des Erstantikörpers bindet.

Durch Zugabe des durch H₂O₂-aktivierten ECL-Reagenzes kommt es zu einer Umsetzung des enthaltenen Luminols unter Freisetzung von Wasser und Licht (Chemoluminescence), das durch das Auflegen eines Films photosensitiv visualisiert wird. Das Filmmaterial mit dem spezifischen Bandenmuster kann nach Digitalisierung densitometrisch semi-quantitativ ausgewertet werden.

5.4.2 Immunoblot: Citrullin Detektionskit

Der Kit detektiert Citrullin-Residuen in einem dreistufigen Verfahren. Im ersten Schritt werden die Proteine nach dem Blocken durch 4 % Paraformaldehydlösung für 20 Minuten irreversibel auf der Membran immobilisiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Modifizierung der Citrullin-Residuen durch 2,3-butadione monoxim und Antipyrin in stark saurem Milieu. Dazu wird die Membran in einer 1:1-Mischung von Lösung A (0,5 % (w/v) 2,3-Butadione monoxime, 0,25 % (w/v) Antipyrine, 0,5 M Essigsäure) und Lösung B (0,025 % (w/v) FeCl₃; 55 % (v/v) Milli-Q, 25 % (v/v) 98 % H₂SO₄; 20 % (v/v) 85 % H₃PO₄) für mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert.

Nach mehrmaligem Waschen werden im dritten Schritt die modifizierten Citrullin-Residuen mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers spezifisch erkannt. Die Visualisierung erfolgte durch der in Abschnitt 5.4.1 beschriebenen Detektion.

5.5 DIGE (Differenzielle In-Gel Elektrophorese)

Durch die Differenzielle In-Gel Elektrophorese (DIGE) können die individuellen Zustände des Proteoms eines Systems durch den quantitativen Vergleich ihrer Spotmuster erörtert werden. Bei dieser Technik werden die Proteinproben vor der Elektrophorese mit spektral voneinander getrennten Fluoreszenzfarbstoffen (CyTM Dyes) gekoppelt. Anschließend werden die Proben vor der isoelektrischen Fokussierung zusammengemischt und auf einem einzelnen 2D-Gel aufgetrennt (Minden 2007; Westermeier *et al.* 2008). Die Strukturen der Fluoreszenzfarbstoffe und deren Fluoreszenzspektren sind in Abbildung 8 dargestellt.

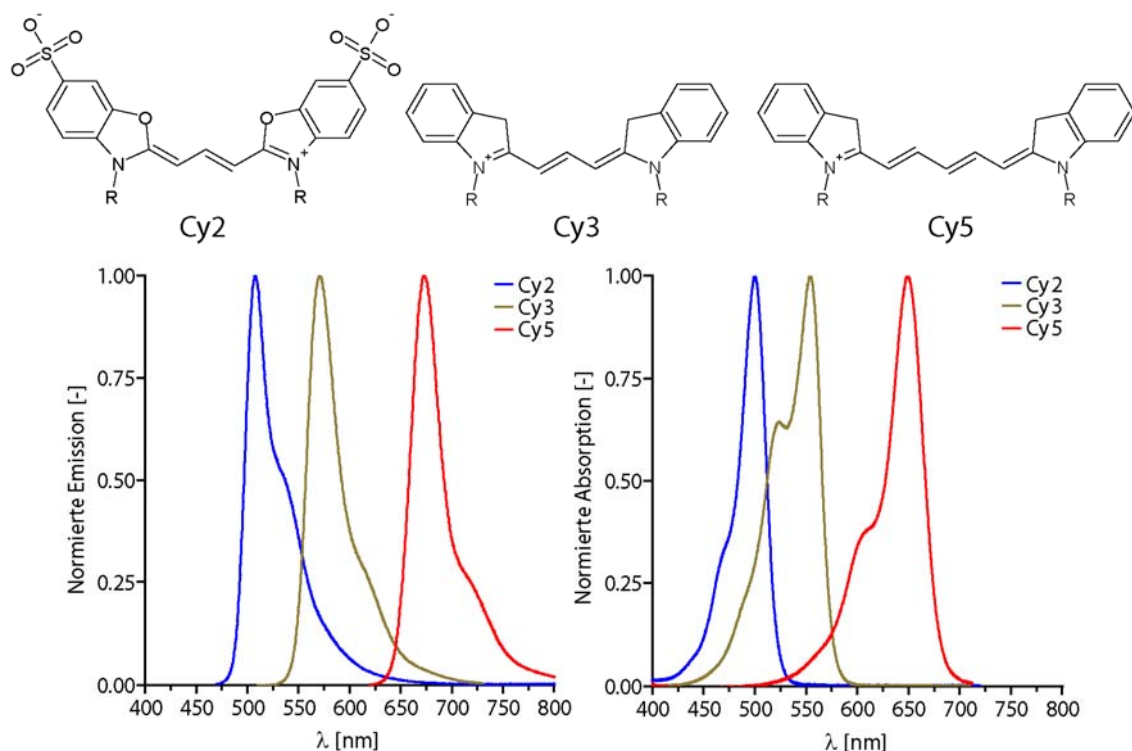


Abbildung 8: Strukturisomerie der Cy-Dyes und deren spektrale Eigenschaften.

Grundvoraussetzung für ein DIGE-Experiment ist, dass die Fluorophore strukturell ähnlich aufgebaut und spektral von einander getrennt sind, um drei distinktive Quantifizierungssignale zu erhalten. Während der elektrophoretischen Auftrennung dürfen sie des Weiteren das Laufverhalten der Proteine nicht zu beeinflussen.

Die Polarität der Farbstoffe spielt eine entscheidende Rolle. Bei der nukleophilen Substitution der ε-Aminogruppe eines Lysinrestes mit der NHS-Ester-Gruppe (R) der Farbstoffe kommt es unter Bildung eines Amides zu einer kovalenten Bindung des Fluorophores an das Protein und, im Falle einer fehlenden Polarität des Fluorophores, zum Wegfall einer positiven Partialladung. Dies würde in einer Änderung der elektrophoretischen Mobilität des Proteins während der isoelektrischen Fokussierung resultieren und das Proteinpattern verfälschen.

5.5.1 Probenvorbereitung und Kopplung der Farbstoffe

Durch DIGE wurden ausschließlich mit Hilfe von Aceton gefällte, depletierte Serumproben analysiert. Da für die Kopplungsreaktionen ein Maximalvolumen von 10 µl vorgeschrieben ist, sollte beim Lösen der Proteine das Volumen klein gehalten werden, damit die Proteinkonzentration der Proben mindestens 5 µg/µl ergibt.

Die Farbstoffe wurden zunächst in DMF gelöst auf eine Konzentration von 400 pmol/µl verdünnt. Die Kopplung erfolgte in einem Verhältnis von 400 pmol Farbstoff auf 50 µg Protein. Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von 1 µl 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 eingestellt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis im Dunkeln wurde 1 µl einer 10 mM Lysinlösung zum Abstoppen der Reaktion pro Kopplungsansatz zugegeben. Nach 10 Minuten wurde mit Rehydratationspuffer auf das Maximalrehydratationsvolumen (Abschnitt 5.3.1) aufgefüllt und die Proben vermischt. Die nachfolgenden Bearbeitungsschritte sind identisch zu denen einer regulären 2D-SDS-PAGE.

In einem Kopplungsansatz wurden jeweils die Proben für den Lauf von 4 DIGE-Gelen vorbereitet. Es wurde in das experimentelle Layout ein *dye-shift* integriert, der bei der Nutzung des Farbstoffes Cy2 als interner Standard unbedingt von Nöten ist. Die spektrale Trennung der Farbstoffe Cy2 und Cy3 ist nicht optimal. Bei der Akquisition der Bilddaten durch einen Laser der Wellenlänge 473 nm oder 532 nm kommt es zu Überschneidungen der Bilddaten. Durch den *dye-shift* werden diese Abweichungen der Spotintensitäten ausgeglichen.

Tabelle 9: Experimentelles Layout eines DIGE-Experiments mit *dye-shift*

Gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	Interner Standard (IS)	Probe A	Probe B
2	Interner Standard (IS)	Probe A	Probe B
3	Interner Standard (IS)	Probe B	Probe A
4	Interner Standard (IS)	Probe B	Probe A

5.5.2 Digitalisierung von DIGE-Gelen

Die Digitalisierung der Gele erfolgte mit einem Fuji FLA-5100 Fluoreszenz-Laser-Scanner. Dieses modular aufgebaute System ist mit vier Laserlinien (473 nm, 532 nm, 635 nm und 650 nm) und zwei Detektoren ausgestattet. Die Empfindlichkeit des Systems wird über die Spannung (250 V – 1000 V) der Photomultiplier (PMT 1 und PMT 2) variiert und nicht über die Abstrahlleistung der Laserlinien. Dabei besitzt der PMT des zweiten Kanals eine erhöhte Empfindlichkeit im langwelligeren, roten Bereich.

Die Akquisition der Bilddateien erfolgte bei DIGE-Experimenten im *2Laser2Image*-Modus. Dabei werden die drei Kanäle eines Gels (Probe, Kontrolle und interner Standard) in nur

zwei Lesezyklen ermittelt. Während eines Lesevorgangs können die Bilder von zwei unterschiedlichen Fluorophoren aufgenommen werden. Dies ist möglich durch den Einsatz eines dichroitischen Spiegels (530 DF 20 und 570 DF 20) möglich, der die Signale auf die unterschiedlichen Detektoren aufteilt (PMT1 und PMT2).

Die Einstellung der Spannung der PMTs richtete sich nach der Intensität der Gele. Dabei ist die Spannung so gering wie möglich zu wählen, um ein gutes Signal- zu Rauschverhältnis (S/N-Ratio) zu bekommen. Im Falle der Übersättigung des Signals werden die betroffenen Pixel in der Software rot eingefärbt und das resultierende Bild ist für eine quantitative Betrachtung nicht mehr verwendbar. In diesem Fall muss die Spannung herabgesetzt und der Lesevorgang wiederholt werden. In den Experimenten genügte eine Spannung von 400-500 V für beide Kanäle.

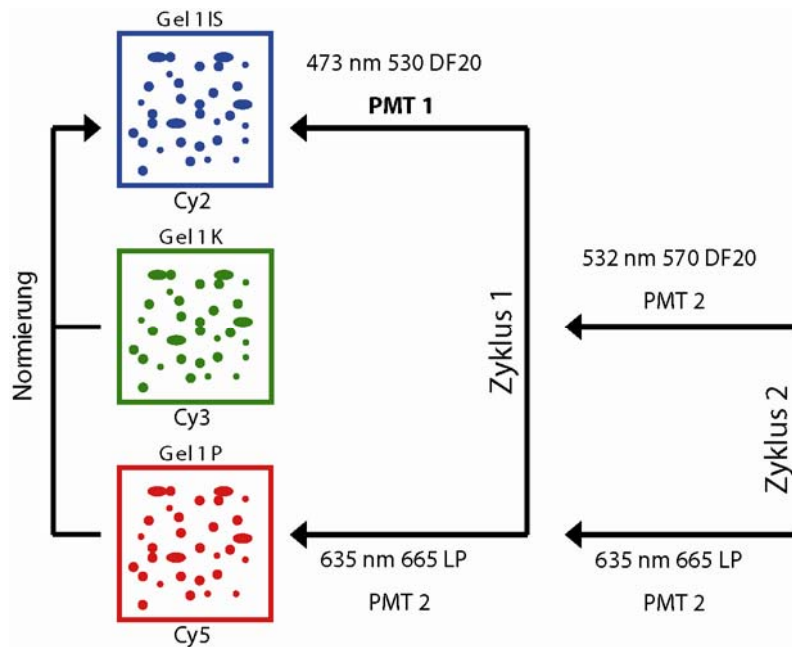


Abbildung 9: Digitalisierungseinstellungen der DIGE-Gele im Lesemodus *2Laser2Image*.

Je nach Einsatz und Größe der Gele (gesamte Darstellung bzw. nur einen Ausschnitt) wurde mit einer Auflösung von 100 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ für Protean II-Gele und 50 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ für Criterion-Gele in 16-bit Farbtiefe gescannt. Es wurde, für qualitative Analysen das TIFF-Format gewählt.

Bei quantitativen Analysen wurde auf das IMG-Format (Ohyama *et al.* 1983) zurückgegriffen. Dieses Format, das auch als *image-save-and-carry*-Format bekannt ist, bietet einen kalibrierten Farbraum an und vermag es, durch Tonwertspreizung, die physikalischen Limitierungen des Laserscanners in Bezug auf Signaldynamik zu verbessern. Damit unterscheidet es sich wegen seiner adaptiven Farbraumkalibrierung zur herkömmlichen TIFF-Datei.

5.5.3 Statistische Auswertung von DIGE-Gelen

Zur Auswertung von DIGE-Gelen wurde die Software Delta2D der Decodon AG in der Version 3.4 verwendet.

Für die Auswertung sind nur Gele zulässig, die keine digitale Nachbearbeitung erfahren haben. Nur die Operationen wie Spiegeln, Beschneiden und das Drehen um 90°, 180° und 270° sind zulässig. Aus diesem Grund ist das korrekte Ausrichten der Bilder während des Scannens empfehlenswert.

Die Vorgehensweise der quantitativen Auswertung von 2D-Gelen ist in Abbildung 10 dargestellt und orientiert sich an dem *consensus spot pattern*-Algorithmus (Luhn *et al.* 2003; Berth *et al.* 2007), der Gegenüber der *separate spot detection* deutlich mehr Expressionsunterschiede in deutlich kürzerer Zeit ermöglicht (Eravci *et al.* 2007).

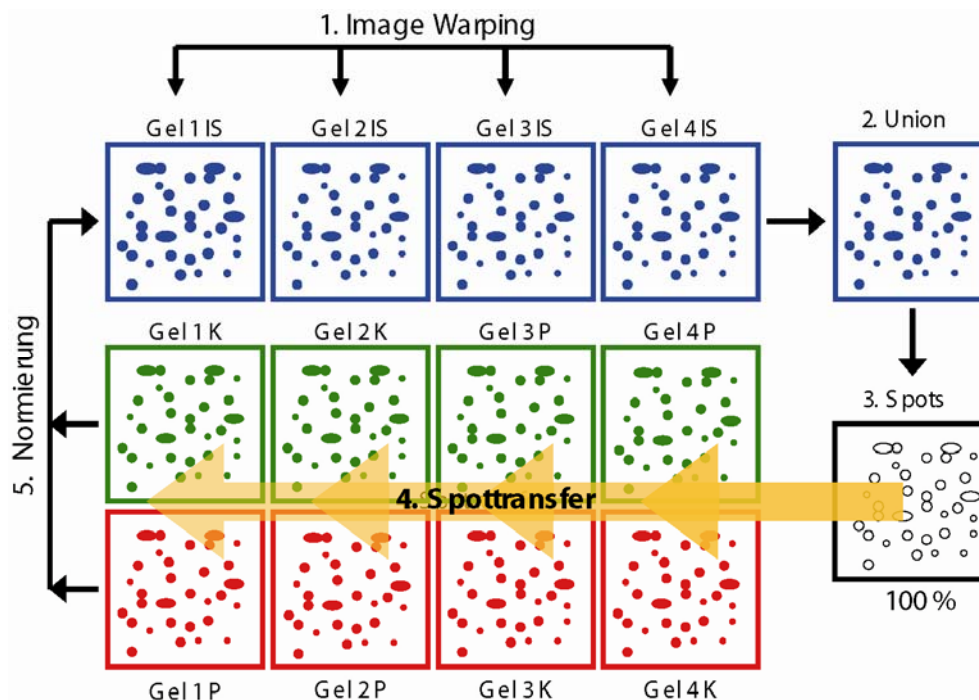


Abbildung 10: Gelauswertungsstrategie von DIGE Gelen nach *Consensus Spot Patterns*. Der Prozess unterteilt sich in 5 Schritte; **(1)** Angleichung der Internen Standards (Cy2) durch *image warping* **(2)** Erstellung eines Mastergels durch *image fusion* **(3)** Erstellung einer *proteome map* und **(4)** Spottransfer der in der *proteome map* festgelegten Spots. Die Auswertung der Gele erfolgte durch Delta2D.

1. Im ersten Schritt werden die Positionsunterschiede der Spots durch so genanntes *image warping* ausgeglichen. Dies geschieht durch das Setzen so genannter *match-vectors*, die die Positionsunterschiede der Spots quantifizieren. Die aus diesem Schritt gewonnenen Informationen werden für die anschließende Erstellung eines *Mastergels* und die Übertragung des *consensus spot patterns* verwendet

2. Im zweiten Schritt wird aus den übereinander gelegten Bildern ein artifizielles Mastergel durch Bildfusionierung erstellt. Dabei wird die Funktion „union“ als Fusionsalgorithmus gewählt und es entsteht ein Mastergel, das sämtliche Spots und Intensitäten der Einzelgele besitzt. Da dieses Gel keine quantitative Aussage besitzt, kann man es durch wiederholte Hintergrundreduzierung und Farbraumnormierung digital verbessern.
3. Im dritten Schritt wird anhand des artifiziiellen Mastergels eine Spotkarte (*Proteome Map*) erstellt. Dabei werden auf diesem Gel nur die Spotumrisse festgelegt, die sich aus den Parametern Hintergrund, mittlere Spotgröße und Sensitivität errechnen. Es findet eine Festlegung statt, ab welcher Stärke des Graustufenüberganges ein Spot erkannt wird. Dieser Faktor kann durch den Parameter „Sensitivität“ und „Hintergrund“ beeinflusst werden. Der Parameter „mittlere Spotgröße“ dient daneben zur besseren Trennung von Spotclustern.
4. Im vierten Schritt wird die Spotkarte des Mastergels auf alle anderen Gele übertragen. Durch das Setzen der *Match Vectors* wird garantiert, dass das *consensus pattern* auf die richtige Position der anderen Gele übertragen wird. Die Intensitäten der Spots werden anhand der Rohdaten der einzelnen Gele (interner Standard, Probe, Kontrolle) errechnet, zusammenaddiert und auf 100 % normiert. Die Angabe der Spotintensitäten erfolgt daher als prozentualer Anteil und nicht als gemittelter Graustufenwert.
5. Im fünften Schritt werden die auf 100 % normierten Intensitäten der Probe und der Kontrolle mit den Intensitäten des Internen Standards verrechnet.

Für die Darstellung der Regulationsunterschiede und deren statistische Signifikanz werden für jeden Spot das relative Verhältnis der normierten Intensität, die Standardabweichung und ein t-Test berechnet.

Ein Protein gilt als signifikant in seiner Expression geregelt, wenn der errechnete Quotient aus dem Vergleich Probe zu Kontrolle einen Wert von 2 für eine Hochregulierung, oder einen Wert von 0,6 für eine Herunterregulierung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) von $p < 0,05$ aufweist.

5.6 Statistische Auswertung von Flamingo® Gelen

Neben DIGE-Gelen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch 2D-Gele ausgewertet, bei denen die Visualisierung der Proteine durch Flamingo® Pink (Biorad) erfolgte. Im Vergleich zur kolloidalen Coomassiefärbung hat die Anfärbung durch Flamingo® eine deutlich bessere Signaldynamik.

Das Vorgehen der Analyse greift auf die Grundlagen des *image warping*, die Erstellung eines *consensus spot patterns* auf einem Mastergel und identischer Quantifizierungsalgorithmen zurück, die zuvor in der Analyse der DIGE-Gele gezeigt wurden (vgl. Abschnitt 5.5.3).

Eine schematische Übersicht der Auswertungsstrategie ist in Abbildung 11 dargestellt und erfolgte beispielhaft an Hand der Gele, die bei der Proteomanalyse der synovialen Fibroblasten erstellt wurden.

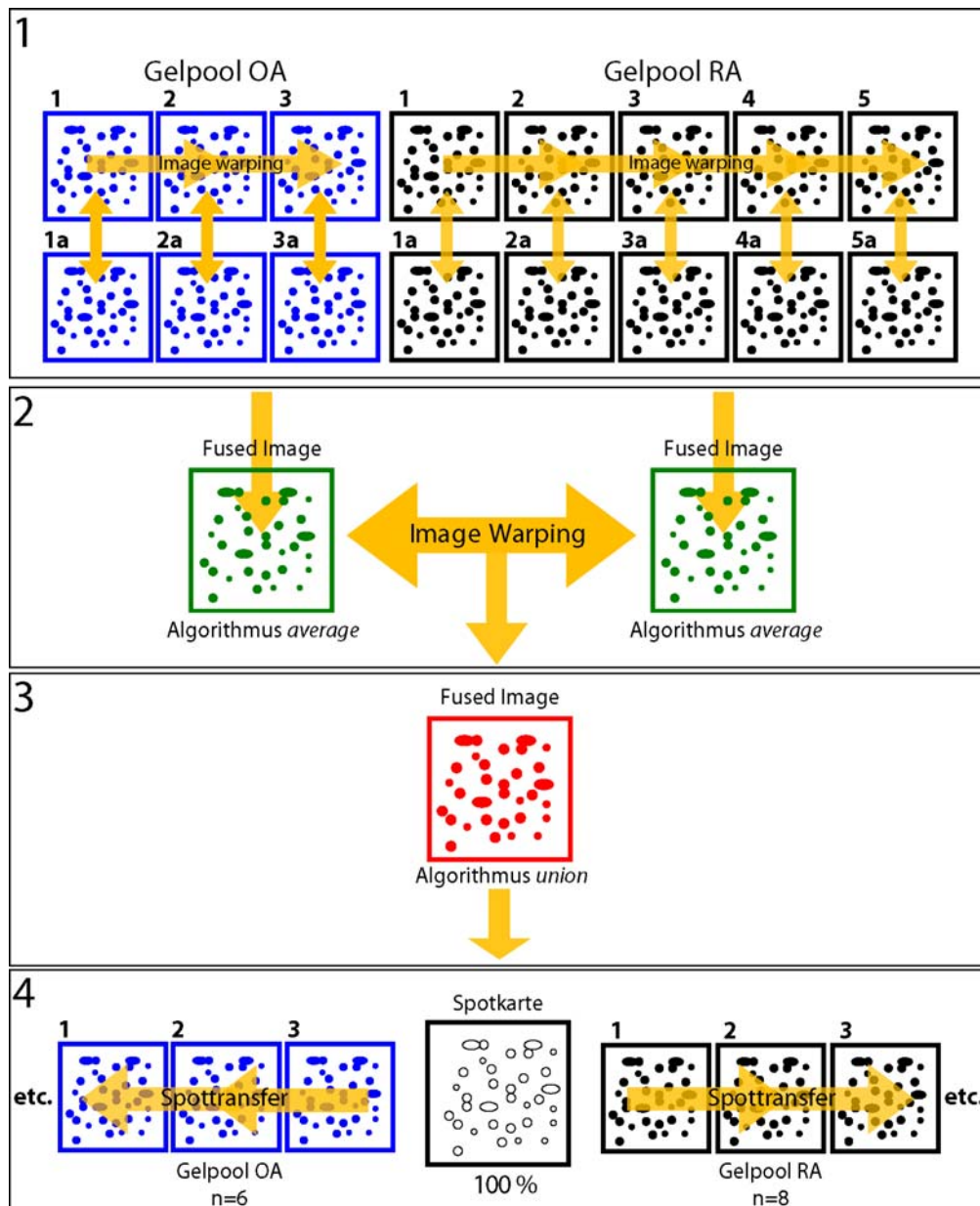


Abbildung 11: Gelauswertungsstrategie von Flamingo[®]-gefärbten Gelen. Beispielhaft gezeigt an den Gelen der Zelllysate der synovialen Fibroblasten. **(1)** Gele werden durch *image warping* einander angeglichen **(2)** Erstellung der Mastergele (Fusionsalgorithmus **average**) der beiden Patientengruppen und Angleichung **(3)** Erstellung einer *proteome map* durch *image fusion* (Fusionsalgorithmus **union**) und **(4)** Spottransfer der in der *proteome map* festgelegten Spotgrenzen.

Die Gele der fünf Patienten der Gruppe RA und die drei in der Gruppe OA, jeweils in einer Doppelbestimmung, wurden im ersten Schritt durch *image warping* einander angeglichen (Schritt 1). Dabei wurde jeweils die Replikatsgele untereinander und alle anderen Gele einer Gruppe auf das erste jeweilige Gruppengel angeglichen. Auf diese Weise war es möglich, durch *image fusion* mit dem Fusionsalgorithmus *average* ein virtuelles Mastergel für die Gruppen zu erlangen (Schritt 2). Die Mastergele der beiden Gruppen wurden durch *image warping* einander angeglichen und eine *proteome map* durch Fusionierung mit dem Algorithmus *union* (vgl. 5.5.3) erstellt (Schritt 3). Die im Mastergel determinierten Spotgrenzen werden anschließend auf alle Gele übertragen (Schritt 4).

Für die Darstellung der Regulationsunterschiede und deren statistische Signifikanz werden für jeden Spot das relative Verhältnis der normierten Intensität, die Standardabweichung und ein T-Test berechnet.

Ein Protein gilt als signifikant in seiner Expression geregelt, wenn der errechnete Quotient aus dem Vergleich Probe zu Kontrolle einen Wert von 2 für eine Hochregulierung, oder einen Wert von 0,6 für eine Herunterregulierung bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) von $p < 0,05$ aufweist.

5.7 Gelfärbungsmethoden

5.7.1 Kolloidale Coomassiefärbung

Nach dem Gellauf wird das Gel für mindestens 2 Stunden in Fixierlösung (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) fixiert und anschließend für 2 x 20 Minuten in Milli-Q gewaschen. Anschließend erfolgt eine Inkubation von mindestens 12 h in Coomassie-Färbelösung. Zum Entfärben des Gels wird das Gel mehrmals in 1 % (v/v) Essigsäure gewaschen und die Färbeschale gewechselt. Die Coomassiefärbung kam vorrangig nach der Färbung der Gele mittels Flamingo zum Einsatz, um Spots auszuschneiden und zu identifizieren.

5.7.2 Flamingo[®] Färbung

Bei der Flamingo[®]-Färbung handelt es sich um eine fluoreszenzbasierte Proteinfärbungsmethode der Firma Bio-Rad. Die genaue Zusammensetzung des Produktes ist nicht erhältlich.

Das Protokoll der Färbung ist vergleichbar mit der Coomassiefärbung. Nach dem Gellauf wird das Gel mindestens zwei Stunden fixiert und anschließend für mindestens drei Stunden in der Färbelösung inkubiert. Weitere Waschschriffe sind nicht erforderlich. Die Gele lassen sich entweder mit der 473 nm oder der 532 nm Laserlinie bei mittlerer Sensitivität (PMT 1 400-600 V) digitalisieren

5.8 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine analytische Technik, die zur chemischen Komponentenanalyse benutzt wird. Das Messprinzip beruht auf der Detektion der unterschiedlichen Masse-Ladungs-Verhältnissen von Substanzen.

Grundsätzlich besteht ein Massenspektrometer aus den folgenden Hauptkomponenten: die Ionenquelle, die die Moleküle in geladene Ionen transformiert, den Masseanalysator, der die Ionen unter Einwirkung eines elektrischen Feldes in ihre Massen aufteilt und dem Detektor, der die Ionen detektiert und in ein messbares elektrisches Signal umwandelt. Eine schematische Übersicht ist in Abbildung 12 dargestellt.

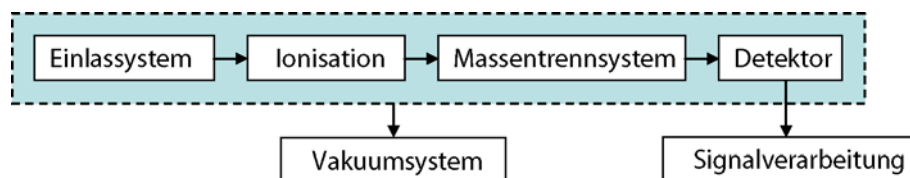
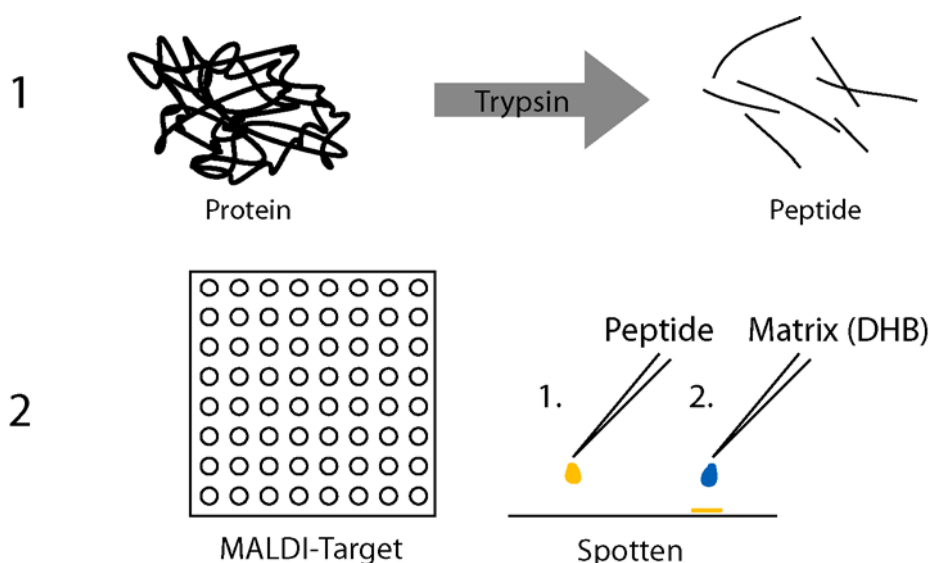


Abbildung 12 Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers.

Die Massenspektrometrie diente in dieser Arbeit zur Identifikation von Proteinen mittels *peptide mass fingerprinting* (PMF) durch MALDI-TOF MS Analyse (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry*). Diese von Franz Hillenkamp und Michael Karas (Hillenkamp *et al.* 1990) begründete Analysetechnik wird oft zur Identifizierung von Proteinen in heutigen Proteomanalysen angewendet.

Methodisch unterteilt sich der Identifizierungsvorgang in vier Teilschritte, die in einer schematischen Übersicht in Abbildung 13 dargestellt sind. In den folgenden Absätzen werden die einzelnen Schritte näher erläutert und die zu Grunde liegenden Parameter spezifiziert.



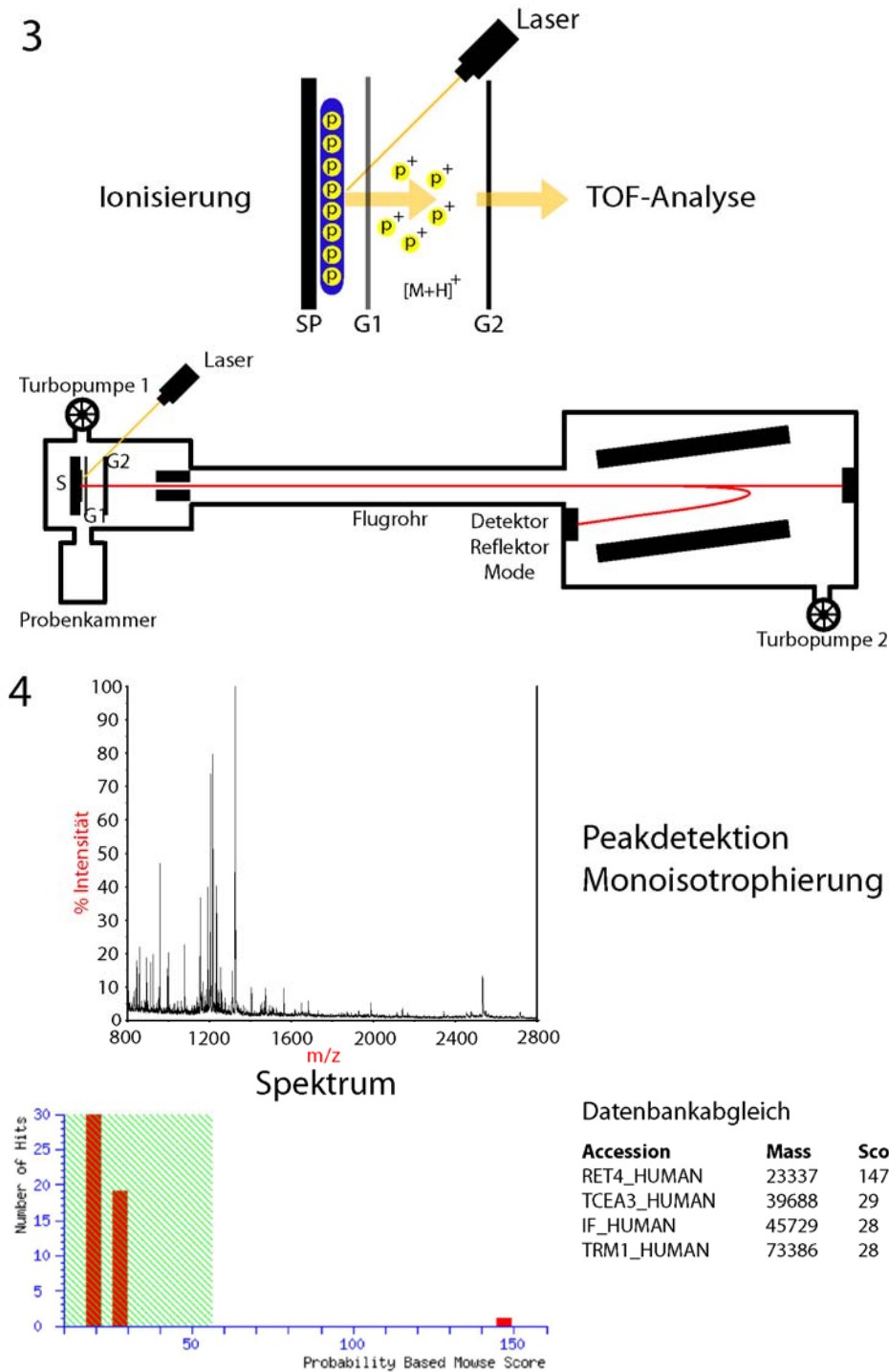


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Identifikation eines Proteins mittels MALDI-TOF MS Peptid Fingerprint-Analyse. Nach erfolgter Auftrennung des Proteingemischs durch 2D-SDS-PAGE und Herausschneiden der Proteinspots erfolgt in Schritt **(1)** der Verdau durch Trypsin (vgl. Abschnitt 5.8.1.) Anschließend werden die Peptide mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) vermischt und auf ein MALDI-Target gespottet **(2)**. Es kommt zur Kokristallisation von Matrix (DHB) und Peptiden. Durch den Beschuss des Lasers werden die Peptide ionisiert und deren Massen in einem Flugzeitmassenspektrometer (TOF-Analysator) analysiert (vgl. Abschnitt 5.8.3) **(3)**. Es ergibt sich aus den Massen der Peptide ein für das Protein charakteristisches Spektrum, das mit einer Datenbank (SWISS-PROT) abgeglichen werden kann **(4)**. Die Wahrscheinlichkeit des korrekten Datenbankabgleichs wird in Form des sog. MOWSE-Score quantifiziert (vgl. Abschnitt 5.8.4).

5.8.1 Tryptischer Verdau von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel

Um Proteine aus 2D-Gelen identifizieren zu können, müssen sie zunächst punktuell genau aus dem Gel herausgeschnitten werden. Zu diesem Zweck wird eine Pipettenspitze mit einem Skalpell so weit abgeschnitten, dass die Spitze einen Durchmesser von 2 mm hat. Mit Hilfe dieser Hohlnadel werden die Proteinspots aus dem Gel gestochen und anschließend tryptisch verdaut.

Es wurden in dieser Arbeit ausschließlich Proteinspots aus Gelen bearbeitet, die mit kolloidalem Coomassie angefärbt wurden. Die Methodik ist im Vergleich zu anderen manuellen Verdauprotokollen (Rosenfeld *et al.* 1992; Hellman *et al.* 1995) deutlich abgekürzt. Die Bearbeitungsschritte wurden auf ein minimales Maß gekürzt, um Kontaminationen mit Keratin zu vermeiden. Das Protokoll unterteilt sich in insgesamt fünf Teilbereiche, die im Folgenden Beschrieben sind:

Tabelle 10: Arbeitsschritte des tryptischen Verdau von Proteinspots zur Identifizierung durch PMF.

1	Entsalzung	Nach dem Ausschneiden werden die 2 mm großen Gelstücke in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Je nach Verunreinigungsgrad mit Gelfragmenten und Coomassierückständen wird das Gelstück zwei Mal mit jeweils 100 µl Milli-Q gewaschen.
2	Entfärbung	Die entsalzen Gelstücke werden mit 100 µl 50 % (v/v) Acetonitril/Milli-Q für mind. 60 Minuten inkubiert, bis keine Blaufärbung mehr zu erkennen ist.
3	Entwässern	Nach dem Entfärben werden die Gelstücke durch Zugabe von 50 µl 100 % Acetonitril vollständig entwässert. Nach 30 Minuten wird das Acetonitril abgezogen und die Gelstücke unter der Reinraumwerkbank getrocknet.
4	Verdau	Modifiziertes porcines Trypsin (Promega) in 1 mM HCl auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl verdünnen. Diese Trypsin-Stammlösung ist so für 3 Monate bei -20 °C lagerfähig. 10 µl dieser Stammlösung werden mit 90 µl Trypsin Verdaupuffer (10 % Acetonitril (v/v) 10 mM NH ₄ HCO ₃) vermischt. Die Gelstücke werden mit 3 µl dieser Trypsinlösung überschichtet. Es erfolgt eine Inkubation von mind. 3 h bei 45 °C.
5	Extraktion	Nach dem Verdau werden die Gelstücke mit 15 µl Extraktionslösung (60 % (v/v) Acetonitril/Milli-Q, 0,1 % (v/v) TFA) für 30 Minuten versetzt. Die Probe kann direkt gespottet werden.

5.8.2 Spotten

In dieser Arbeit wurde ausschließlich durch die *dried droplet*-Methode gespottet. Dazu wurde 1 µl des Peptidextraktes mit 0,5 µl einer gesättigten 2,5-Dihydroxybenzoesäure-Lösung (DHB) auf einem MALDI-Target aus Edelstahl pipettiert und vermischt.

Im Falle geringer Signalintensitäten wurden die eingesetzten Peptidmengen des Extraktes variiert. Kokristallisation findet nur in einem engen Konzentrations- sowie Analyten zu Matrix-Verhältnis statt. Daher wurden Peptidextrakte aus besonders intensiv gefärbten Gelstücken mit 0,1 % (v/v) TFA in Milli-Q 1 : 20 verdünnt und anschließend gespottet. Bei sehr gering gefärbten oder kleinen Spots wurde durch Aufkonzentrieren in einem Vakuumkonzentrator und das Resuspendieren in einem geringeren Volumen (2-10 µl) versucht, die Kriterien der Kokristallisation zu treffen.

5.8.3 Akquirierung der Spektren

Die Messung der verdauten und gespotteten Peptide erfolgte an einem Voyager-DE-STR Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems.

Es wurde im *positive mode* mit einer Beschleunigungsspannung von 20.000 V in der Summe gemessen. Davon verteilten sich 80 % auf das der Gitter G2, 19,98 % auf Gitter G1 und 0,02 % auf den *guide wire*. Durch das Anlegen der unterschiedlichen Spannungen werden die mittels Laser ionisierten Peptide beschleunigt, während der Führungsdraht (*guide wire*) die freigesetzten Ionen führt und gebündelt auf den Detektor bringt. Zur Intensitätsverbesserung wird die entstandene Ionenwolke periodisch abgeführt (*delayed extraction*). Die so genannte *delay time* (Verzögerungszeit) betrug 180 ms.

Es wurde im *reflector mode* gemessen, der für den verwendeten m/z-Bereich von 700-3000 Da ein erhöhtes Auflösungsvermögen besitzt. Dies ist durch die verlängerte Flugdauer der Ionen durch die unterschiedliche Ablenkung zu erklären, die sie im Reflektor erfahren. Technisch wird die Ablenkung durch eine Kaskade unterschiedlicher Ringelektroden realisiert, die je nach Spannung die freigesetzten Ionen unterschiedlich stark beeinflussen.

Ein Spektrum wurden durch 50 Schüsse mit einer Pulsrate von 3 Hz (N₂-Laser / 337 nm) akquiriert. Es wurden jeweils zwei Spektren pro Messung akkumuliert.

Das Ionisierungsprinzip beruht auf der primären Absorption der Lichtenergie des Lasers durch die Matrix und die gleichzeitige Übertragung eines Energieteils auf den Analyten. Durch den Energietransfer werden entweder Protonen hinzugefügt [M+H]⁺ oder abgezogen [M-H]⁻ und der Analyt somit in ein geladenes Teilchen überführt, das durch das Anlegen einer Spannung beschleunigt werden kann. Damit das Ion detektiert und nicht vorher durch den Zusammenprall mit einem anderen Teilchen abgebremst wird, muss seine Flugbahn in einem Hochvakuum liegen (10⁻⁷-10⁻⁹ mbar).

Die Kalibrierung der Messungen erfolgte mittels des Sequazyme™ Peptide Mass Standards Kit (Applied Biosystems), das eine Mischung hochreiner Peptide mit den folgenden bekannten Massen enthält. Die monoisotopischen Massen $(M+nH)^+$ sind wie folgt: des-Arg¹-Bradykinin (904,4681 m/z), Angiotensin I (1296,6853 m/z), Glu¹-Fibrinopeptid B (1672,9175 m/z), Neurotensin (1672,9175 m/z), ACTH (clip 1-17) (2093,0867 m/z) und ACTH (clip 18-39) (2465,1989 m/z). Da sich schon kleinste Feldinhomogenitäten und Oberflächenunebenheiten des Targets auf die Flugdauer auswirken, erfolgt die Kalibrationsmessung so räumlich dicht wie möglich an der Messung des unbekanntes Analyten.

5.8.4 Datenbankabgleich

Um das Protein anhand seines Peptide-Fingerprints zu identifizieren wurde ein Datenbankabgleich mit der Swiss-Prot Proteindatenbank durchgeführt. Dazu wurde das halbautomatische Tool *Mascot Wizzard* benutzt, welches makrogesteuert die Vorverarbeitung der akquirierten Spektren übernimmt. Es werden hier auf die Programmbibliotheken des *Mascot Distillers* zurückgegriffen, um aus den Rohspektren die Peaklisten der einzelnen Messungen zu generieren. Im Zentrum der Peakdetektion und Anisotrophierung steht die Anpassung der experimentellen Elementarverteilung mit der idealen errechneten Verteilung. Diese Idealverteilung ist vorherberechnet für das Peptid oder die Aminosäuresequenz bei genau dem gemessenen m/z-Wert. Das Profil der Idealverteilung wird im nachfolgenden Schritt durch die Annäherung der Masse, Auflösung, Intensität und Ladungszahl angepasst. Im Fall einer qualitativ guten Anpassung wird der Wert zur Peakliste hinzugefügt und weitere Peaks angepasst (Berndt *et al.* 1999).

Anschließend werden die experimentell bestimmten Massen der Peptide mit den errechneten Massen der Datenbank Wert für Wert abgeglichen. Jedes Peptid, das zu einem Protein mit einer angegebenen Massentoleranz zugeordnet werden kann wird gezählt, wobei jedes theoretisch errechnete Peptid eine empirische Gewichtung erhält.

Diese Gewichtung hängt von dem relativen Vorkommen des Peptides ab und wird maßgeblich durch seine Zusammensetzung bestimmt. Selten vorkommende Aminosäuren (Prolin, Cystein bei Prokaryoten) oder spezielle für ein Protein hochspezifische Domänen beeinflussen somit den MOWSE-Score besonders signifikant (Pappin *et al.* 1993).

Neben der Gewichtung der Peptide geht auch die Massentoleranz in die Berechnung mit ein. Hohe Massentoleranzen wirken sich negativ auf den Score aus.

In Tabelle 11 sind die Standardsuchparameter des Datenbankabgleich mit der SWISS-Prot-Datenbank dargestellt.

Tabelle 11: Suchparameter des Datenbankabgleich der akquirierten MS-Spektren mit der SWISS-Prot Proteindatenbank.

Feld	Variable
Suchtyp	Peptide Mass Fingerprint (PMF)
Enzym	Trypsin
Fixe Modifikation	Carbamidomethyl (C)
Variable Modifikation	Oxidation (M)
Massetyp	Monoisotopisch
Toleranz	± 0,6 Da
Ladungszahl	1+
Maximale Anzahl verpasster Trypsinspaltstellen	1
MOWSE Signifikanzgrenze	55
Irrtumswahrscheinlichkeit	0,05

Eine Proteinidentifizierung gilt als Signifikant, wenn der MOWSE-Score die Signifikanzgrenze von 55 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ unterschreitet. Je nach Spezies und Datenbank (SWISS-Prot, NCBI, MSDB) und Datenbankgröße sind jedoch die Signifikanzgrenzen für den MOWSE-Score individuell verschieden. Die Ergebnisse sind wie folgt aufgelistet: Für Identifizierungen, die die Signifikanzgrenze überschritten haben, sind die genauen Peptidmassen und Abweichungen aufgelistet.

```

RET4_HUMAN    Mass: 23337    Score: 147    Expect: 4.1e-11    Queries matched: 18
Retinol-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=RBP4 PE=1 SV=3

```

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
806.6100	805.6027	805.3501	0.2527	18	-	23	R.AERDCR.V
879.6730	878.6657	878.4498	0.2160	29	-	35	R.VKENFDK.A
1018.7520	1017.7447	1017.4913	0.2534	174	-	181	R.QEELCLAR.Q
1161.8020	1160.7947	1160.5325	0.2623	38	-	47	R.FSGTWYAMAK.K
1165.8380	1164.8307	1164.5775	0.2532	158	-	168	R.DPNGLPPEAQK.I
1177.7870	1176.7797	1176.5274	0.2524	38	-	47	R.FSGTWYAMAK.K
1198.8860	1197.8787	1197.6182	0.2605	108	-	117	K.YWGVASFLQK.G
1289.9260	1288.9187	1288.6274	0.2913	38	-	48	R.FSGTWYAMAKK.D
1302.9470	1301.9397	1301.6510	0.2887	172	-	181	R.QRQEELCLAR.Q
1303.9150	1302.9077	1302.6139	0.2938	185	-	195	R.LIVHNGYCDGR.S
1305.8920	1304.8847	1304.6223	0.2624	38	-	48	R.FSGTWYAMAKK.D
1458.0430	1457.0357	1456.7537	0.2820	106	-	117	K.MKYWGVASFLQK.G
1474.0660	1473.0587	1472.7486	0.3101	106	-	117	K.MKYWGVASFLQK.G
1676.1590	1675.1517	1674.7896	0.3621	185	-	198	R.LIVHNGYCDGRSER.N
2065.4740	2064.4667	2063.9623	0.5045	140	-	157	R.LLNLDGTCADSYSFVFSR.D
2628.6220	2627.6147	2627.1520	0.4627	81	-	103	R.LLNNWDVCCADMVGTFTDTEPAK.F
2693.6920	2692.6847	2692.1136	0.5711	118	-	139	K.GNDDHWIVDTDYTYAVQYSCR.L
2903.7980	2902.7907	2902.3154	0.4754	81	-	105	R.LLNNWDVCCADMVGTFTDTEPAKFK.M

No match to: 705.5750, 735.5160, 746.5910, 751.5870, 763.5930, 765.5850, 794.6040, 796.5930, 812.6100, 828.6220, 842.7300, 860.6510, 870.7550, 875.7290, 922.6770, 927.7220, 960.7900, 976.7220, 980.7620, 1001.7350, 1021.7630, 1030.7800, 1075.7780, 1088.8500, 1090.8480

Abbildung 14: Auflistung der Massen, die im Rahmen einer PMF-Analyse mit der SWISS-Prot Proteindatenbank abgeglichen werden konnten. Die Tabelle enthält neben der gemessenen Masse *Observed* die berechnete Masse *Mr(Calc)*, die Masseabweichung *Delta*, die nicht verdauten Trypsinschnittstellen *Miss* und die Peptidsequenz im Einbuchstabencode. Anhand der nicht aufgeführten Gewichtung der 18 Peptide errechnet sich der MOWSE-Score von 147 des gemessenen Retinol-Binding Protein 4.

5.9 Chromatographische Methoden

5.9.1 Funktionsprinzip der Immunodepletion

Das Funktionsprinzip einer MARC (*multiple affinity removal column*) ist schematisch in Abbildung 15 dargestellt und basiert auf den Grundlagen der Immunaффinitätschromatographie. Die *high abundant* Proteine, d.h. Proteine, die in sehr großen Quantitäten vorliegen, werden durch die Funktionalisierung des Chromatographiematerials mit polyklonalen Antikörpern zurückgehalten und verbleiben auf der Säule. Die *low abundant* Proteine befinden sich im Durchlauf, weil sie nicht an die Säule binden.

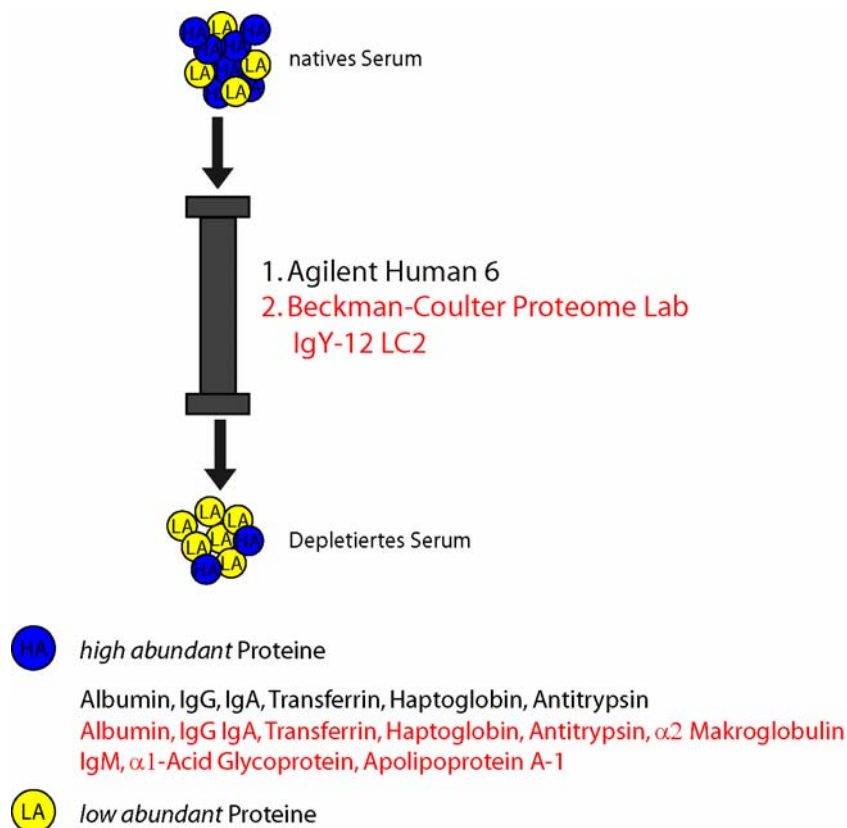


Abbildung 15: Funktionsprinzip einer MARC (*multiple affinity removal column*) und Auflistung der deplierten Proteine durch die (1) Agilent Human 6 Depletionssäule und die (2) Beckman-Coulter Proteome Lab IgY-12 LC2 Depletionssäule.

5.9.2 Agilent Human 6 Depletionssäule

Bei der Agilent Human 6 Depletionssäule handelt es sich um eine Immunaффinitätssäule in den Dimensionen 4,6 x 100 mm. Das Chromatographiematerial ist hochgradig mit polyklonalen Antikörpern gegen die sechs häufigsten Serumproteine funktionalisiert und ermöglicht die Depletion von Albumin, Transferrin, IgG, IgA, Antitrypsin und Haptoglobin in einem einzelnen

Schritt. Laut Hersteller ist die Depletion von bis zu 60 µl Serum für mindestens 200 Durchläufe validiert.

Zur Entfernung möglicher Präzipitate wird das humane Serum zuvor im Verhältnis 1:5 mit dem Equilibrierpuffer verdünnt und durch einen 0,22 µm Filter gefiltert. Das Injektionsvolumen beträgt 200 µl des verdünnten und gefilterten Serums.

Da es sich methodisch um eine Affinitätschromatographie handelt, beschränkt sich die Methode auf ein wässriges Puffersystem: ein Puffer zum Equilibrieren (Puffer A; 10 mM Tris-HCl pH 7,4), Eluieren (Puffer B; 100 mM Glycin-HCl pH 2,5) und ein Neutralisationspuffer (Puffer C; 100 mM Tris-HCl pH 8,0). Im Fall einer Nichtbenutzung von mindestens drei Tagen wird dem Equilibrierpuffer 0,3 % (w/v) NaN₃ zugesetzt, die Säule mit 10 Säulenvolumen gespült und anschließend bei 4 °C gelagert.

Der Depletionslauf erfolgt mit einer Flussrate von 1 ml/min bei Raumtemperatur und einer Detektorwellenlänge von 280 nm. Nach dem Auftragen mit Puffer A von Minute 0 bis 15 wird zunächst eine Durchlauffraktion von Minute 2,5 bis 7,5 aufgefangen. Diese Fraktion beinhaltet die so genannten „*low abundant*“ Proteine. Ab Minute 15 erfolgt die Elution über einen Stufengradienten mit 100 % B und es wird von Minute 17,5 bis 21 eine Elutionsfraktion aufgefangen, die aus den sechs depletierten Serumproteinen besteht und als „*high abundant*“ Fraktion bezeichnet wird. Ab Minute 25 erfolgt die Neutralisation und Reequilibrierung der Säule. Ab Minute 30 wird die Säule mit Puffer A reequilibriert.

Die aus den Läufen erhaltenen Fraktionen werden durch die in Punkt 5.2.2 beschriebenen Probenaufarbeitungsmethoden bearbeitet.

5.9.3 Beckman-Coulter Proteome Lab IgY-12 LC2 Depletionssäule

Die Beckman-Coulter Depletionssäule entfernt 12 verschiedene Proteine des menschlichen Blutes. Neben Albumin, IgG, Transferrin, α₂-Makroglobulin, IgM, α₁-Acid Glykoprotein, Apolipoprotein A-I, und Apolipoprotein A-II entfernt sie auch Fibrinogen und ist somit auch für die Analyse von humanen Plasma einsetzbar. Sie hat die Dimensionen 4,6 x 50 mm und erlaubt die Depletion von bis zu 50 µl humanen Serums oder Plasma.

Das experimentelle Layout orientiert sich an dem Protokoll der Agilent Human 6 Depletionssäule. Es werden dieselben Puffer und Lösungen verwendet. Das Serum wird 1:5 in Puffer A verdünnt und durch einen 0,2 µm Filters gefiltert. Das Injektionsvolumen beträgt 200 µl des verdünnten und gefilterten Serums.

Der Depletionslauf erfolgt von Minute 0-25 mit einer Flussrate von 0,25 ml/min mit Puffer A bei Raumtemperatur und einer Detektorwellenlänge von 280 nm. Es wird von Minute 6,8 bis Minute 21 eine Durchlauffraktion aufgefangen (*low abundant*). Ab Minute 25 wird die Flussrate auf 1 ml/min erhöht und in einem Stufengradienten auf 100 % Puffer B die *high abundant* Proteine von der Säule eluiert. Es wird von Minute 28 bis 34 eine Eluatsfraktion aufgefangen.

Anschließend erfolgt ab Minute 35 eine Neutralisation der Säule mit Puffer C mit fünf Säulenvolumina und eine Reequilibrierung.

5.9.4 Entsalzungs- und Fraktionierungsmethoden

Die Methoden dieses Abschnitts basieren auf den Mechanismen der reversed phase (RP) Chromatographie. Dabei erfolgt eine Trennung nach der Hydrophobizität einer Substanz. Es wurde ausschließlich die Agilent mRP *hi recovery protein column* verwendet.

Die makroporöse C-18 Umkehrphasensäule (mRP-C18-Column) ist eine silicabasierende Säule zur Auftrennung und Entsalzung komplexer Proteingemische mit hohen Wiederfindungsraten. Das makroporöse Material hat eine Porengröße von 5 µm und kann daher auch für die Auftrennung großer Biomoleküle verwendet werden.

Das Material ist in eine Säule aus PEEK Kunststoff gepackt, was unspezifische Adsorption von Proteinen minimiert. Die Beladungskapazität der Säule ist laut Hersteller mit 380 µg Protein angegeben.

5.9.4.1 Entsalzung

Die Entsalzung einer proteinhaltigen Probe erfolgte bei einer Flussrate von 0,75 ml/min, einer Temperatur von 80 °C und einer Detektorwellenlänge von 280 nm. Es wurden ausschließlich depletierte Serumproben entsalzt. Vor Applikation wurde jeweils 1 ml Depletat mit 480 mg Harnstoff versetzt und mit 13 µl Eisessig angesäuert. Die Probe wurde anschließend durch einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilters gefiltert und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Das Injektionsvolumen richtet sich nach der Konzentration des depletierten Serums und darf einen Grenzwert von 380 µg nicht überschreiten.

Nach Applikation der Proteinprobe wird für 10 Säulenvolumina mit Laufmittel A (H₂O + 0,05 % (v/v) TFA) gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen Stufengradienten ab Minute 10 mit Laufmittel B (ACN + 0,05 % (v/v) TFA). Diese Fraktion wird aufgefangen (Sammlung von Minute 11 bis Minute 15; entsprechend einer Fraktion von 3 ml) und bis zur Trockne eingengt. Anschließend wird das lyophilisierte Protein in Lysepuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

5.9.4.2 Fraktionierung durch eine Gradiententrennung

Die Gradientenauftrennung des depletierten Serums (Agilent Human 6 Depletionssäule) erfolgte an dem Äkta[®] System (GE Healthcare). Die Temperierung der Säule erfolgte über ein Doppelmantelmetallrohr (Eigenbau), das über ein Wasserbad beheizt wurde.

Vor Applikation wurde 1 ml depletiertes Serum mit 480 mg Harnstoff versetzt und mit 13 µl Eisessig angesäuert. Anschließend wurde die Probe durch eines 0,2 µm Spritzenvorsatzfilters gefiltert und Protein bestimmt. Das Injektionsvolumen richtet sich nach der Konzentration des depletierten Serums und darf eine Proteinmenge von 380 µg nicht überschreiten.

Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Flussrate von 0,75 ml/min und einer Detektorwellenlänge von 280 nm. Bis zu 1,8 ml Probe wurden bei einer Konzentration von 3 % B aufgetragen. Die erste Gradientenstufe erfolgte von Minute 5 bis 10 mit einer linearen Konzentrationserhöhung von 3 % B bis 30 % B. Ab Minute 10 bis Minute 45 erfolgte die zweite Gradientenstufe mit einer linearen Konzentrationserhöhung von 30 % B bis 50 % B. Ab Minute 45 bis 50 wurde die Konzentration von 50 % B auf 100 % B erhöht und für 10 Minuten nicht verändert. Ab Minute 60 erfolgte eine Reequilibrierung der Säule mit 3 % B.

Für die Fraktionierung wurde ab Minute 10 in Abständen von zwei Minuten bis einschließlich Minute 50 insgesamt 20 Fraktionen aufgefangen, die ein Volumen von jeweils 1,5 ml hatten. Um genügend Protein für die Analysen zu erhalten, wurde der Lauf mehrfach durchgeführt und die gesammelten Fraktionen zusammengeführt. Die Fraktionen wurden anschließend in einem Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt und das resultierende Proteinpellet in 20-50 µl Lysepuffer resuspendiert.

5.9.4.3 Fraktionierung durch einen Stufengradienten

Die chromatographische Auftrennung der Proteine des Depletierten Serums (Agilent Human 6 Depletionssäule) erfolgte neben einer Gradiententrennung auch als Stufengradient. Die Probenvorbereitung war identisch zu der Entsalzungsmethode und Gradiententrennung.

Insgesamt wurden 8 Trennstufen mit einem Trennintervall von 10 Minuten gewählt, die unterschiedliche Acetonitrilkonzentrationen aufwiesen: 33, 36, 39, 42, 45, 48, 55, 100 % Acetonitril. Die Auftrennung erfolgte an einem Shimadzu LC10-System bei einer Flussrate von 0,75 ml/min, einer Detektorwellenlänge von 280 nm und einer Säulentemperatur von 80 °C.

Ab Minute 20 wurde für die Dauer von jedem Trennintervall (10 Minuten) eine Fraktion von 7,5 ml aufgefangen. Um genügend Protein für die Analysen zu erhalten, wurden mehrere Läufe durchgeführt und die Fraktionen zusammengeführt. Die Fraktionen wurden anschließend in einem Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt und das resultierende Proteinpellet in 20-50 µl Lysepuffer resuspendiert.

6 Ergebnisse

6.1 Patientenproben

6.1.1 Synoviale Fibroblasten

Es wurden in Kooperation mit den Orthopädischen Kliniken Kassel e.G. unter der Mitarbeit von Herrn Dr. Mai insgesamt 15 Gewebeproben durch Synovektomien gesammelt. Aufgrund der Proteinmenge, die für die 2D-Gel-Analytik benötigt wurde, wurden nur Gewebe aus Knie, Hüft- und Schultergelenken verwendet, da nur in diesen Gelenken ausreichende Mengen Synovia anfielen. Die Gewebe wurden zur Gewinnung der Synovialen Fibroblasten mit Kollagenase-Dispase verdaut und die gewonnenen Zellen bis zur vierten Passage kultiviert und anschließend in Lysepuffer aufgeschlossen. In den nachfolgenden Abschnitten werden die synovialen Fibroblasten der Patientengruppe RA als RASF (*rheumatoid synovial fibroblast*) und für die Gruppe OA als OASF (*osteoarthritis synovial fibroblast*) bezeichnet.

Für die Patientengruppe RA konnte Gewebe von 10 Patienten akquiriert werden. Es handelte sich um 8 weibliche und 2 männliche Spender im Alter von 34 - 78 Jahren. Das Gewebe stammte aus Synovektomien des Knies (n=7), der Hüfte (n=2) und der Schulter (n=1).

Für die Patientengruppe OA konnte Gewebe von 5 Patienten akquiriert werden: Es wurden 2 männlichen und 3 weiblichen Spendern Gewebe hauptsächlich aus dem Knie (n=4) und der Schulter (n=1) entnommen. Die Patienten waren zwischen 60 und 81 Jahren alt.

6.1.2 Serum

Es wurden drei Serumpools erstellt: RA, OA und Gesund. Eine schematische Übersicht der Alters- und Geschlechtsverteilung ist in Abbildung 16 dargestellt.

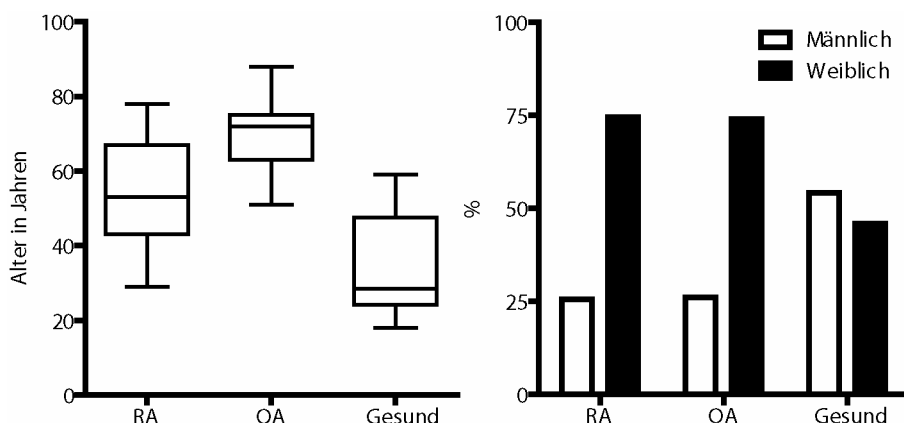


Abbildung 16: Alters- und Geschlechtsverteilung der drei untersuchten Serumpools. (RA) Rheumatiker; (OA) Arthrosepatienten; (Gesund) Kontrollpatienten.

Für die Patientengruppe RA konnten 43 Seren gesammelt werden, die allesamt einen deutlich erhöhten CCP-Spiegel aufwiesen. Dies war im Rahmen des Projektes das einzige Ausschlusskriterium für das Akquirieren des Serums. Es handelte sich dabei um 32 weibliche und 11 männliche Patienten im Alter von 29 - 78 Jahren (Mittelwert 55,34 Jahre).

Für die Patientengruppe OA konnten 24 Seren gesammelt werden. Es handelte sich hier um 6 männliche und 17 weibliche Spender im Alter von 51 - 88 Jahren (Mittelwert 70,16 Jahre).

Als weitere Kontrollgruppe wurden Seren von gesunden Personen gesammelt, die keine rheumatische oder entzündliche Gelenkskrankheit aufwiesen. Es wurden für die gesunde Kontrollgruppe 48 Serumproben gesammelt, wobei es sich um 26 männliche und 22 weibliche Spender im Alter von 18 - 59 Jahren handelte (Mittelwert 34,85 Jahre).

6.2 Synoviale Fibroblasten

6.2.1 Kultivierung synovialer Fibroblasten

Die Kultivierung der synovialen Fibroblasten erwies sich als problematisch, weil sich die einzelnen Zellchargen in ihrem Wachstumsverhalten stark unterschieden. Zur weiteren Betrachtung wurden daher nur Zellen nach der dritten Passage verwendet, die ein ähnliches Wachstumsverhalten aufwiesen.

Die Wachstumscharakteristika der einzelnen Zellchargen ist in Abbildung 17 dargestellt.

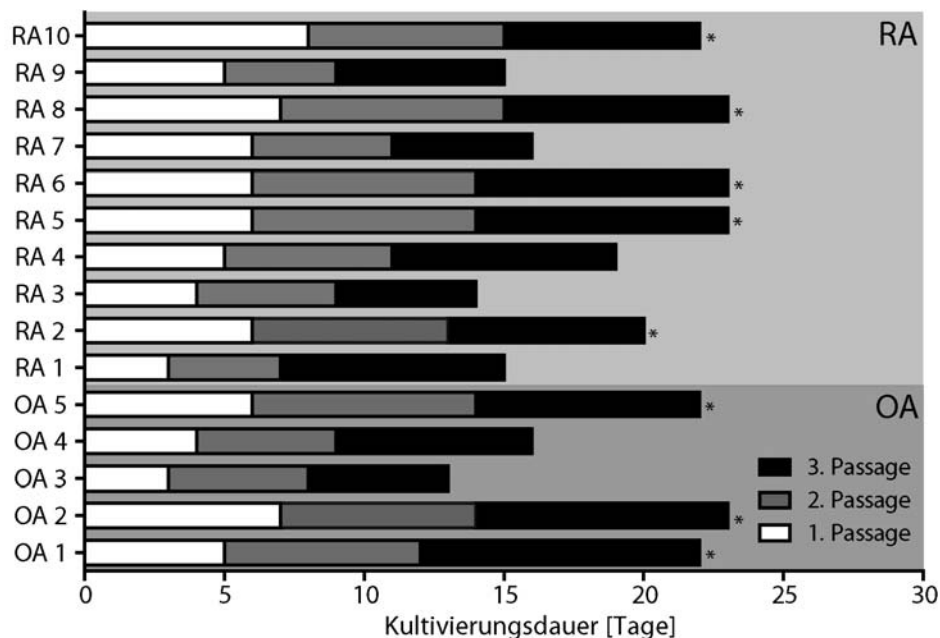


Abbildung 17: Kultivierungsdauer synovialer Fibroblasten, die mittels Kollagenase-Dispase-Verdau aus Synovia gewonnen wurden und bis zur dritten Passage kultiviert wurden. Nur Zellchargen, die sich in ihrer Wachstumscharakteristik ähnelten, wurden für die weiteren Experimente verwendet und sind mit einem (*) markiert.

Es ergaben sich für die Patientengruppe RA insgesamt fünf Proben (Wachstumsdauer 20-23 Tage) und in der Patientengruppe OA drei Proben (Wachstumsdauer 22-23 Tage), die in Bezug auf Zellmorphologie, Wachstumsdauer, Probenmenge und Passagenzahl die geforderten Kriterien entsprachen.

6.2.2 Gelelektrophoretische Analyse der synovialen Fibroblasten

Nach Erreichen der dritten Passage der Kultivierung der synovialen Fibroblasten wurden die Zellen abtrypsinisiert, mehrmals in PBS gewaschen und anschließend in Lysepuffer lysiert. Die verschiedenen Zelllysate wurden mittels 2D-SDS-PAGE analysiert, Proteinspots mittels *peptide mass fingerprint* (PMF) identifiziert und durch Delta2D (Decodon AG) quantifiziert. Insgesamt konnten 191 Proteine identifiziert werden. Die 2D-Gele wiesen große Gemeinsamkeiten auf, unterschieden sich jedoch in ihrer Gesamtspotanzahl (vgl. Anhang Abschnitt.10.1.1, Seite 106 und Abschnitt 10.1.2, Seite 107). An dieser Stelle soll daher nur ein exemplarisches 2D-Gel dargestellt werden. Die restlichen Gele, sowie die identifizierten Proteine sind im Anhang zu finden (siehe Anhang Abschnitt 10.1.3).

Es konnten Expressionsunterschiede für Vimentin, β -Actin, HSPB1 und Destrin gefunden werden.

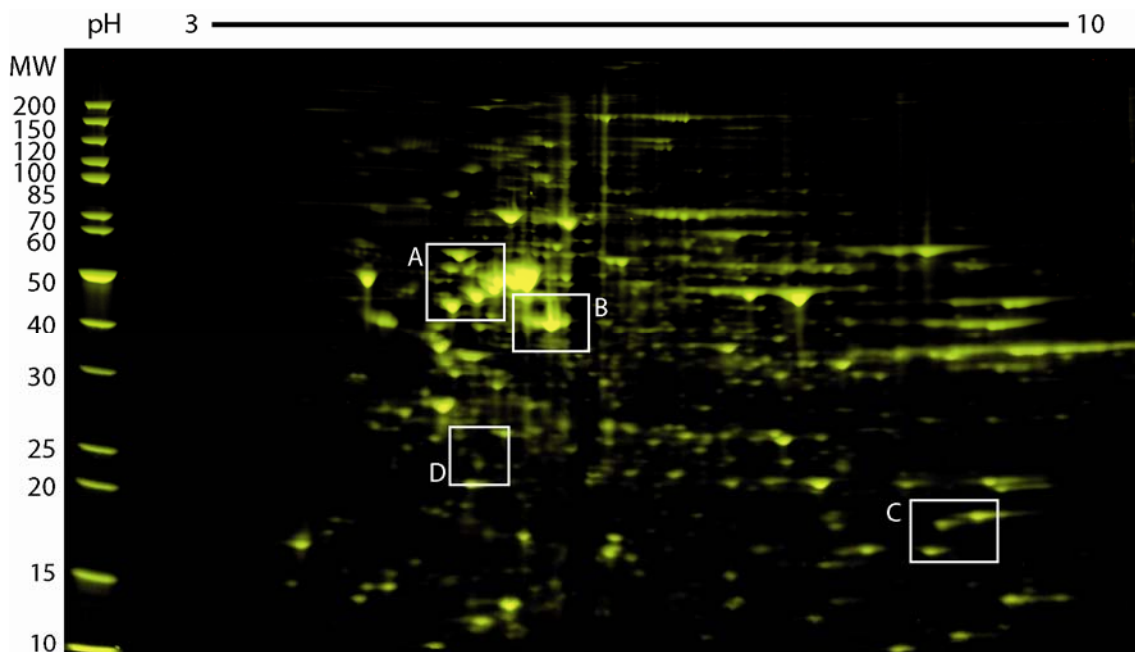


Abbildung 18: 2D-SDS-PAGE eines Zelllysats von synovialen Fibroblasten. Synoviale Fibroblasten wurden mittels Kollagenase-Dispase-Verdau aus Synovia gewonnen, bis zur dritten Passage kultiviert und in Lysepuffer lysiert. 150 μ g Protein wurden auf einem IPG-Streifen pH 3-10 (BIORAD) fokussiert und auf einem Criterion[®] 12 % Bis-Tris-Gel (BIORAD) aufgetrennt. Zur Visualisierung wurde das Gel fixiert und mit Flamingo[®] (BIORAD) gefärbt. Unterschiedliche Spotintensitäten und deren vergrößerte Darstellung ist in den folgenden Abbildungen dargestellt: **(A)** Vimentin, **(B)** β -Actin, **(C)** Destrin, **(D)** HSPB1 und Vimentin (Fragmente).

Die Auswertung der Gele erfolgte nach dem in Abschnitt 5.6 beschriebenen Schema zur Auswertung Flamingo[®]-gefärbter Gele. Als Kriterium für eine signifikante Regulierung eines Proteins galt ein Quotient der normierten Spotintensitäten der Proben von 2 für eine Hochregulation und 0,6 für eine Herunterregulation bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05. Es wurden nur Spots betrachtet, die auf allen Gelen identifiziert werden konnten.

In Abbildung 23 sind die Expressionsunterschiede und deren vergrößerte Lokalisation im Gel aufgetragen.

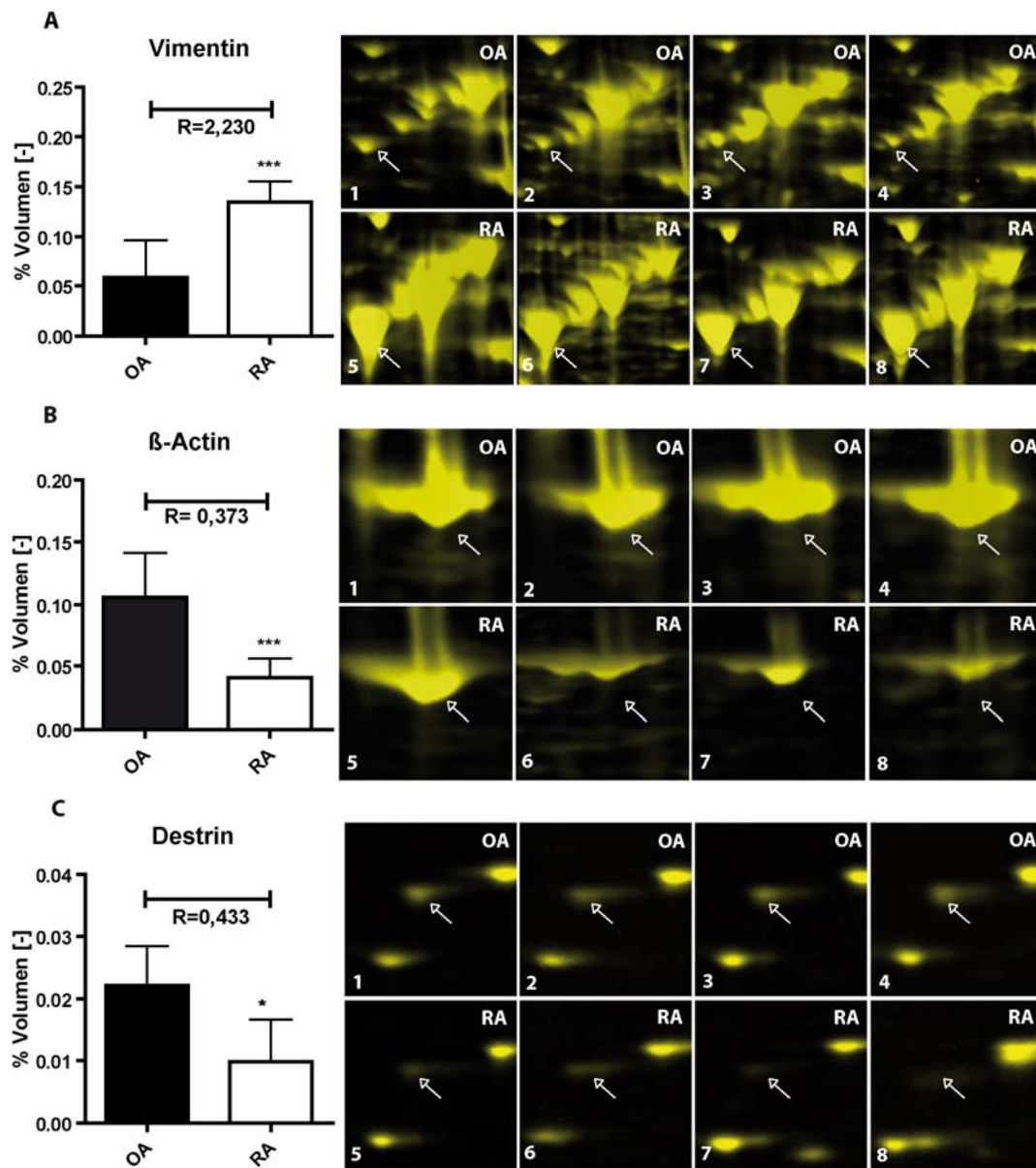


Abbildung 19: Darstellung der Expressionsunterschiede von (A) Vimentin, (B) β -Actin und (C) Destrin. Auftragung des normierten Spotvolumens der Gruppe RA und OA. R bezieht sich auf den Quotienten der beiden Mittelwerte und gibt die relativen Expressionsunterschiede an. Ungepaarter t-Test mit folgenden Irrtumswahrscheinlichkeiten: (*) $p = 0,05$, (***) $p = 0,001$. Die Gelregionen mit den jeweils zugrunde liegenden Spotintensitäten sind in den Bildern 1-8 abgebildet. Bild 1-4 Gele OA, Bild 5-8 Gele RA.

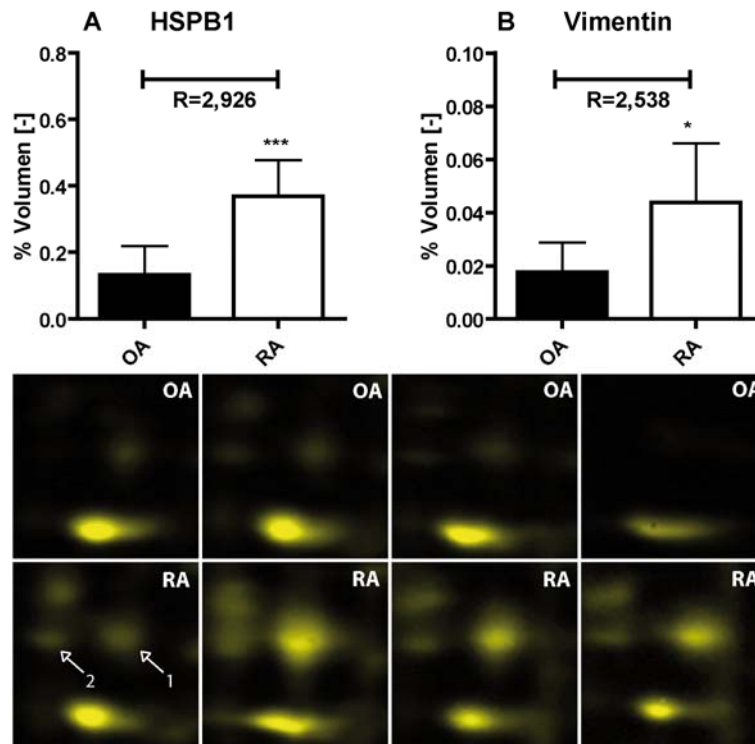


Abbildung 20: Darstellung der Expressionsunterschiede von **(A)** Hitzeschockprotein Beta 1 (Spot 1) und **(B)** Vimentin (Fragmente, Spot 2). **R** bezieht sich auf den Quotienten der beiden Mittelwerte und gibt die relativen Expressionsunterschiede an. Ungepaarter t-Test mit folgenden Irrtumswahrscheinlichkeiten: (*) $p = 0,01$, (***) $p = 0,001$. Die Gelregionen mit den jeweils zugrunde liegenden Spotintensitäten sind in den Bildern 1-8 abgebildet. Bild 1-4 Gele OA, Bild 5-8 Gele RA.

Es wurde mittels 2D-SDS-PAGE Expressionsunterschiede von Vimentin identifiziert. Diese Unterschiede sind in Abbildung 19 und 20 dargestellt. Die Patientengruppe RA zeigte im bei Vimentin einen Regulationsunterschied von 2,23 ($p = 0,001$) bezüglich eines Degradationsprodukts mit einem Molekulargewicht von ca. 44 kDa (siehe Abschnitt 10.1.3, Spot 20). In Abbildung 20 sind Fragmente von Vimentin (Spot 10) mit einem Molekulargewicht von 25 kDa identifiziert worden, die einen Regulationsunterschied in der Patientengruppe RA von 2,54 ($p = 0,05$) aufweisen. Die restlichen identifizierten Formen des Vimentins (siehe Abschnitt 10.1.3; Spot 21, 22, 23) zeigen keine signifikanten Regulationsunterschiede.

Abbildung 20 zeigt darüber hinaus, dass die RASF mit einer 3-fachen Regulation ($p = 0,001$) im Vergleich zu den OASF eine deutliche verstärkte Expression des Hitzeschockprotein Beta 1 (HSPB1, Spot 9) aufweisen.

Des Weiteren konnte bei die RASF eine Herunterregulation von $R = 0,37$ ($p = 0,001$) von β -Actin (Spot 24) im Vergleich zu den OASF festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 19 zu erkennen.

Die Herunterregulation des Actin-bindenden Proteins Destrin (Spot 41) bei RASF mit einer Regulationsrate von $R = 0,43$ ($p = 0,05$) im Vergleich zu den OASF ist im unteren Drittel der Abbildung 19 beschrieben.

6.2.3 Validierung der Expressionsunterschiede durch Western Blot

Die Expressionsunterschiede der Proteine Vimentin, Hitzeschockprotein Beta 1 und Destrin wurden mittels Western Blot untersucht. Dazu wurden 40 µg Protein elektrophoretisch in einem 12,5 % Tris-HCl Gel (Biorad, Mini-Protean®-Kammer) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteine und deren Fragmente wurden anschließend durch spezifischer Antikörper nachgewiesen.

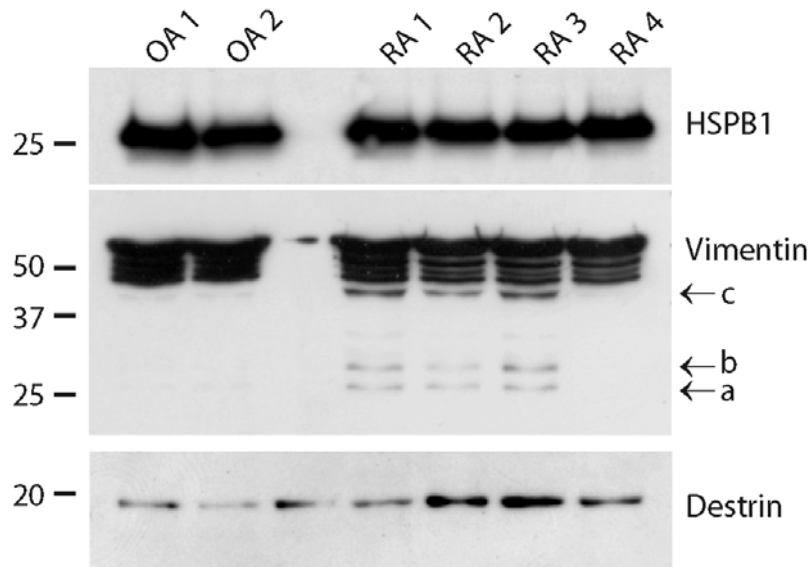


Abbildung 21: Western Blots der Zelllysate der RASF und OASF. Dazu wurden jeweils 40 µg von zwei unterschiedlichen Patienten der Gruppe OA und drei verschiedene Patientenproben der Gruppe RA mittels SDS-PAGE (12,5 % Tris-HCl, Mini-Protean®, BIORAD) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen HSPB1 (Anti-HSPB1, R&D; 1:500), Vimentin (Anti Vimentin, SIGMA ALDRICH; 1:2000) und Destrin (Anti-Destrin, SIGMA ALDRICH; 1:1000). **(a)**, **(b)** und **(c)** sind Vimentinfragmente, die in drei von vier RA - Patienten nachgewiesen werden konnten.

Die durch 2D-SDS-PAGE gezeigten Ergebnisse konnten nur zum Teil durch Western Blot bestätigt werden. Wie aus Abbildung 21 ersichtlich wird, konnte kein signifikanter Regulationsunterschied beim HSPB1 gefunden werden. Die Bandenintensitäten sind bei RA und OA nahezu identisch.

Bei der Expression des Intermediärfilaments Vimentin hingegen zeigte sich bei drei von vier RA-Patienten ein spezifisches Bandenmuster an Vimentinfragmenten zwischen 25, 37 kDa (a & b), sowie bei 40 kDa (c).

Bei Destrin konnte eine erhöhte Expression bei der Gruppe RA im Vergleich zur Gruppe OA detektiert werden.

6.2.4 Nachweis citrullierter Proteine in Zelllysaten synovialer Fibroblasten

Der Nachweis von citrullierten Proteinen erfolgte in zwei unterschiedlichen Ansätzen: die immunologische Detektion von Citrullinresten in unmodifizierter und modifizierter Form.

Beim Nachweis von Citrullin ohne vorhergehende Modifizierung wurde der *Anti-Citrullin* Antikörper (Anti-Citrullin, BIOMOL) verwendet. Im zweiten Ansatz, d.h. nach Modifizierung (vgl. Abschnitt 5.4.2), wurde der monoklonale Antikörper des *Anti-Citrullin Detection Kits* (BIOMOL) verwendet, der Citrullin in seiner modifizierten Form erkennt.

Die korrekte Funktionsweise des Kits und die Spezifität des Anti-Citrullin-Antikörpers konnte durch ein Lysat der Zellen der Hornhaut bestätigt werden. Die Präsenz von citrullierten Proteinen in der humanen Epidermis ist von Senshu *et al.* mittels des *Anti-Citrullin-Detection Kit* nachgewiesen worden und dient als Kontrolle (Senshu *et al.* 1992). Zur Gewinnung citrullierter Proteine wurde mittels eines Skalpell die Zellen der Hornhaut abgekratzt und lysiert (2 % SDS (w/v) 20 mM TCEP 10 Minuten 98 °C), ungelöste Bestandteile bei 16.000 g für eine Minute abzentrifugiert und anschließend 2-10 µl als Kontrolle aufgetragen.

Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der zwei unterschiedlichen Detektionsstrategien.

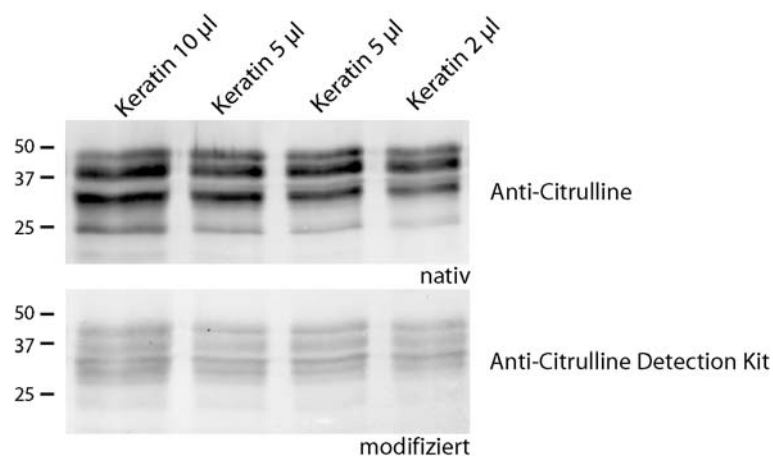


Abbildung 22: Western Blots von Zelllysaten der humanen Epidermis. Nach dem Aufschluss der Zellen in 20 mM TCEP 2 % SDS bei 98 °C für 10 Minuten wurden 2, 5 und 10 µl des Lysats mittels SDS-PAGE (12 % Gel) aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis unmodifizierter citrullierter Proteine erfolgte durch den Anti-Citrullin Antikörper (BIOMOL; 1:1000). Beim Nachweis mit vorhergehender Modifizierung der Citrullinresiduen wurden die Proteine mittels 4 % PFA auf der Membran fixiert, anschließend erfolgte eine Modifizierung der Citrullinreste durch Inkubation mit 2,3-butadione monoxim und Antipyrin in stark saurem Milieu und eine Detektion mittels Anti-Citrullin (modifiziert) Antikörper (BIOMOL; 1:500).

Anhand der Kontrolle wurden die Reaktionsbedingungen der Modifizierungsreaktion für die Auftragung der RASF und OASF optimiert. Zur besseren Retention wurden die Proteine

zunächst durch eine 30-minütige Inkubation mit 4 % (w/v) PFA in PBS auf der PVDF-Membran fixiert. Anschließend erfolgte die Modifikation bei 37 °C für 3 h. Längere Inkubationszeiten resultierten in einem massiven Proteinverlust und sind daher nicht zu empfehlen. Nitrozellulosemembranen sind aufgrund der geringen chemischen Beständigkeit gegenüber den extremen Modifizierungsbedingungen nicht zu verwenden. Die Retention der Proteine war deutlich schlechter als bei PVDF-Membranen.

Wie aus Abbildung 22 zu erkennen ist, unterscheiden sich die Signalintensitäten der Detektionsstrategien stark. Während sich die Banden bei der Detektion in unmodifizierter Form stark abzeichnen, sind die Intensitäten der Detektion durch Modifizierung deutlich abgeschwächt. Die Signalschwäche bei der Detektion nach Modifizierung konnte durch die Erhöhung der Proteinmenge, noch durch die Verlängerung der Modifikationsreaktion signifikant beeinflusst werden.

Nach der Optimierung wurden die Lysate der RASF und OASF untersucht. Trotz mehrerer Replikate und Variationen in Proteinmenge konnte kein signifikanter Nachweis für citrullierte Proteine in den Zelllysaten der RASF oder OASF erbracht werden.

6.3 Serumanalytik

6.3.1 Elektrophoretische Auftrennung von Serumproteinen

Abbildung 23 zeigt die elektrophoretische Auftrennung von Serum nach Fällung der Proteine durch die in Abschnitt 5.2.2.2 beschriebene Chloroform-Methanol-Fällung. 20 µl humanes Serum der gesunden Kontrollgruppe wurden 1:5 mit PBS verdünnt, gefällt und durch 2D-SDS-PAGE analysiert. Es wurden 26 Spots ausgeschnitten und durch PMF identifiziert (siehe Anhang Abschnitt 10.2.1 Seite 111). Insgesamt konnten nur acht verschiedene Proteine identifiziert werden: Albumin, Serotransferrin, α_1 -Antitrypsin, Clusterin, Haptoglobin, β_2 -Glykoprotein, Apolipoprotein A-I und IgG, aufgetrennt in ihre schwere γ - und leichte κ -Domäne. Bei diesen Proteine handelt es sich vorrangig um funktionelle, *high abundant* Proteine, die wegen der natürlichen Varianzen in ihren Anteilen keinen Aufschluss über den pathologischen Zustand des Patienten geben.

Aufgrund der hohen Dynamik der Proteinverteilung des Serumproteoms ist hier die Grenze der Proteine festzusetzen, die durch 2D-SDS-PAGE zu visualisieren sind.

Insbesondere Albumin (Spots 1-3, 6-12, 16) ist in großen Bereichen des Gels vorhanden und erstreckt sich über den gesamten pI-Bereich. Aufgrund der hohen Konzentration ist eine korrekte Fokussierung nicht möglich. Die schwere γ - (Spots 19, 20) und leichte κ -Domäne (Spots 22, 23) der IgG resultieren aufgrund des hohen Anteils an stark geladener Glykosilie-

rungen in einem unaufgelösten Proteinpattern bei 25 kDa und 50 kDa. Albumin und IgG mit einem Gesamtproteinanteil von über 50 % beeinflussen die Beladungskapazität und die Gelqualität somit am nachhaltigsten.

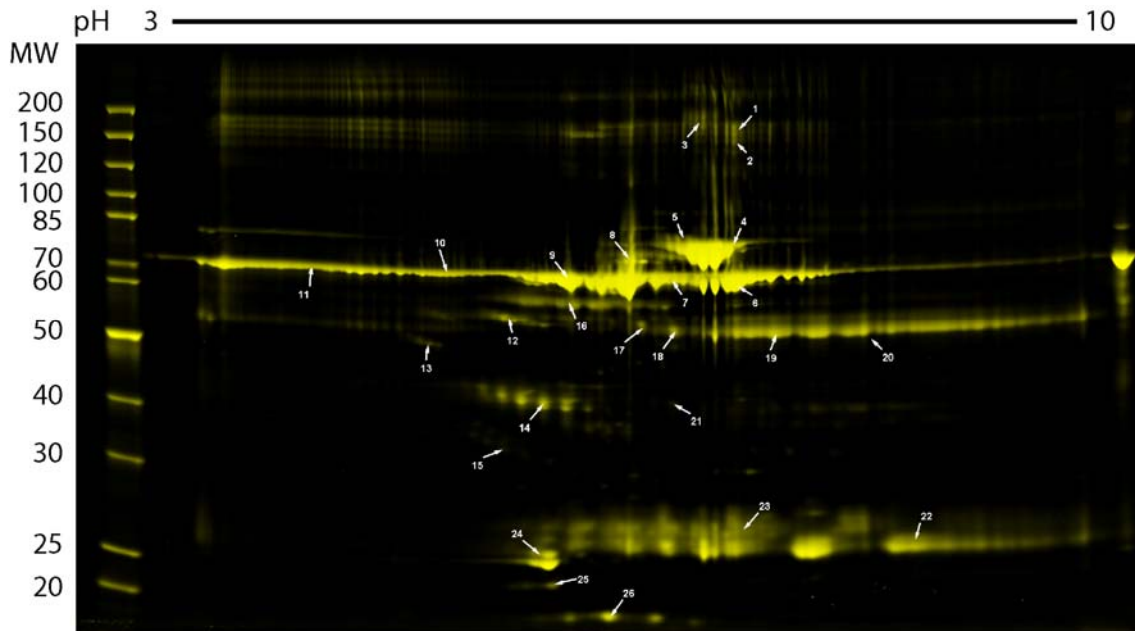


Abbildung 23: 2D-Gel von undepletiertem Serum der gesunden Kontrollgruppe. 20 µl Serum wurden 1:5 mit PBS verdünnt und durch Chloroform-Methanol-Fällung (Abschnitt 5.2.2.2) entsalzt. 150 µg Protein wurden auf einem IPG-Streifen pH 3-10 (BIORAD) fokussiert. Es wurden 26 Spots ausgeschnitten, tryptisch verdaut und durch PMF identifiziert. Die SDS-Page erfolgte über ein 10 % Bis-Tris Criterion (BIORAD) Neutralgel. Marker Page Ruler™ (FERMENTAS). Die Färbung der Proteine erfolgte mittels Flamingo® (BIORAD).

Zur Abreicherung der *high abundant* Proteine kamen in dieser Arbeit zwei verschiedene Depletionssäulen zum Einsatz; die Agilent Human 6 Depletionssäule (vgl. Abschnitt 5.9.2) und die Beckman Coulter Proteome Lab IgY12 LC2 Depletionssäule (vgl. Abschnitt 5.9.3). Die Säulen unterscheiden sich nicht nur in ihren Dimensionen und Beladungskapazitäten, sondern auch in der Spezifität der polyklonalen Antikörper, die kovalent an das Chromatographiematerial gebunden sind. Während Agilent keine Angaben über die Beschaffenheit und die Spezies macht, verweist Beckman Coulter explizit auf die Tatsache, dass ausschließlich polyklonale Antikörper verwendet wurden, die im Huhn produziert wurden. Durch den größeren phylogenetischen Unterschied zwischen humanen Proteinen und denen des Huhns kommt es zu weniger Kreuzreaktionen zwischen den applizierten humanen Proteinen und den Antikörpern. Die Bindung der *high abundant* Proteine soll deutlich spezifischer erfolgen, als bei der Verwendung von polyklonalen Antikörpern, die in Säugetieren produziert wurden (Huang *et al.* 2008).

Die Chromatogramme der Depletionsläufe sind exemplarisch für jede Säule in der Abbildung 24 dargestellt.

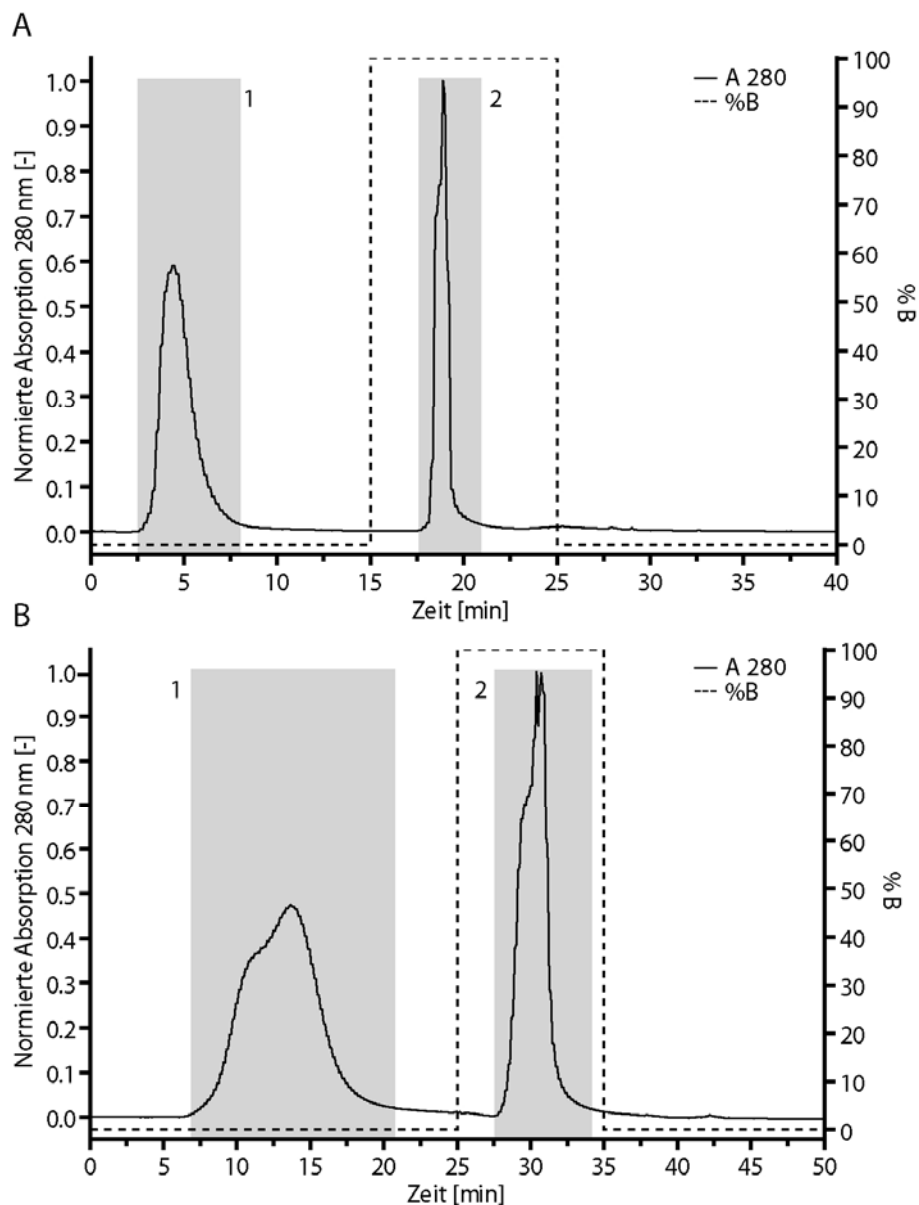


Abbildung 24: Chromatogramme der unterschiedlichen Depletionssäulen. Es wurden 40 µl humanes Serum der gesunden Kontrollgruppe 1:5 mit dem Equilibrierpuffer A verdünnt und auf die Säulen appliziert. **(A)** Chromatogramm der Agilent Human 6 (AH6) Depletionssäule **(B)** Chromatogramm der Beckman Coulter Proteome Lab IgY12 LC[®] (BCY12) Depletionssäule. Es wurden zwei Fraktionen für jeden Lauf gesammelt: **(1)** *low abundant* Fraktion (Durchlauf) und nach dem Wechsel auf das Elutionslaufmittel B die **(2)** *high abundant* Fraktion mit den 6 (AH6) bzw. 12 (BCY12) gebundenen Proteinen.

Das chromatographische Verhalten der Säulen ist wegen der unterschiedlichen Dimensionen (4,6 x 10 mm vs. 6,4 x 63 mm) anders. Die Agilent Human 6 Depletionssäule produzierte deutlich schärfere Peaks ohne so genanntes *fronting* (vgl. Peak 1). Diese Peaks ähnelten mehr einer Gaußverteilung und wiesen keine Inhomogenitäten wie der Durchlaufspeak der Beckman-Coulter Depletionssäule auf. Des Weiteren wurde deutlich schneller nach dem Durchlaufen der Probe das Signal wieder auf Niveau der Basislinie gebracht. Dies lässt auf

eine verminderte Proteinretention durch unspezifische Bindung am Chromatographiematerial oder Säulenmaterial (Agilent PEEK, Beckman Coulter PS) schließen. Nicht nur wegen der kürzeren Laufzeit, sondern auch wegen der besseren chromatographischen Eigenschaften und Säulenmaterials ist die Agilent Human 6 gegenüber der Beckman Coulter vorzuziehen. Des Weiteren bietet die Agilent eine höhere Kapazität.

6.3.2 Optimierung der depletierten Serumproben für die 2D-SDS-PAGE

Bei der isoelektrischen Fokussierung wurden die Proben durch passive Rehydratation appliziert. Es konnte ein maximales Probenvolumen von 200 µl pro 11 cm IPG-Streifen aufgetragen werden. Außerdem wurden bei DIGE aufgrund der Volumenvorgaben sehr hohe Proteinkonzentrationen in den Proben (> 5 µg/µl) benötigt. Durch die chromatographischen Methoden kam es jedoch zu einer starken Verdünnung der Proben mit den Equilibrier- und Elutionspuffer.

Nicht nur der Verdünnungsfaktor, sondern auch der Salzeintrag machte eine Aufarbeitung der Proteine der Fraktionen unabdingbar. Dabei kamen bei der Ankonzentrierung der Proben die Acetonfällung, die Chloroform-Methanol-Fällung und die Entsalzung der depletierten Serumproben durch die Agilent *high recovery protein column* zum Einsatz.

Die genannten Ankonzentrierungsmethoden waren universell zur Ankonzentrierung von Proteinen geeignet. Sie unterschieden sich jedoch in ihren Ausbeuten und Spezifitäten. Je nach Methode wurden daher einzelne Proteine besser ankonzentriert als andere.

Aus diesem Grund besaß jede Methode ihr charakteristisches Proteinpattern. Beim Vergleich von 2D-Gelen, deren Proteine auf unterschiedliche Weise ankonzentriert wurden, konnten deutliche Unterschiede in der Spotanzahl zu detektieren werden. Diese Unterschiede waren jedoch methodisch begründet. Daher waren Proben, die auf unterschiedliche Weise aufgearbeitet wurden, nicht vergleichbar. Es sollte sich zu Beginn einer Studie auf eine Methode festgelegt werden. Dabei war die Methode am besten zu bewerten, die in der größten Spotanzahl und der besten Proteinabdeckung resultierte.

Zur Optimierung der Ankonzentrierungs- und Entsalzungsstrategie kam ausschließlich Serum zum Einsatz, das mit der Agilent Human 6 Depletionssäule depletiert wurde.

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Strategien sind in der folgenden Abbildung 25 aufgeführt. Unterschiede der Proteinspatterns sind durch die Buchstaben A-F gekennzeichnet und geben nicht einzelne, distinktive Spots wieder, sondern Bereiche, wo Unterschiede erkennbar sind.

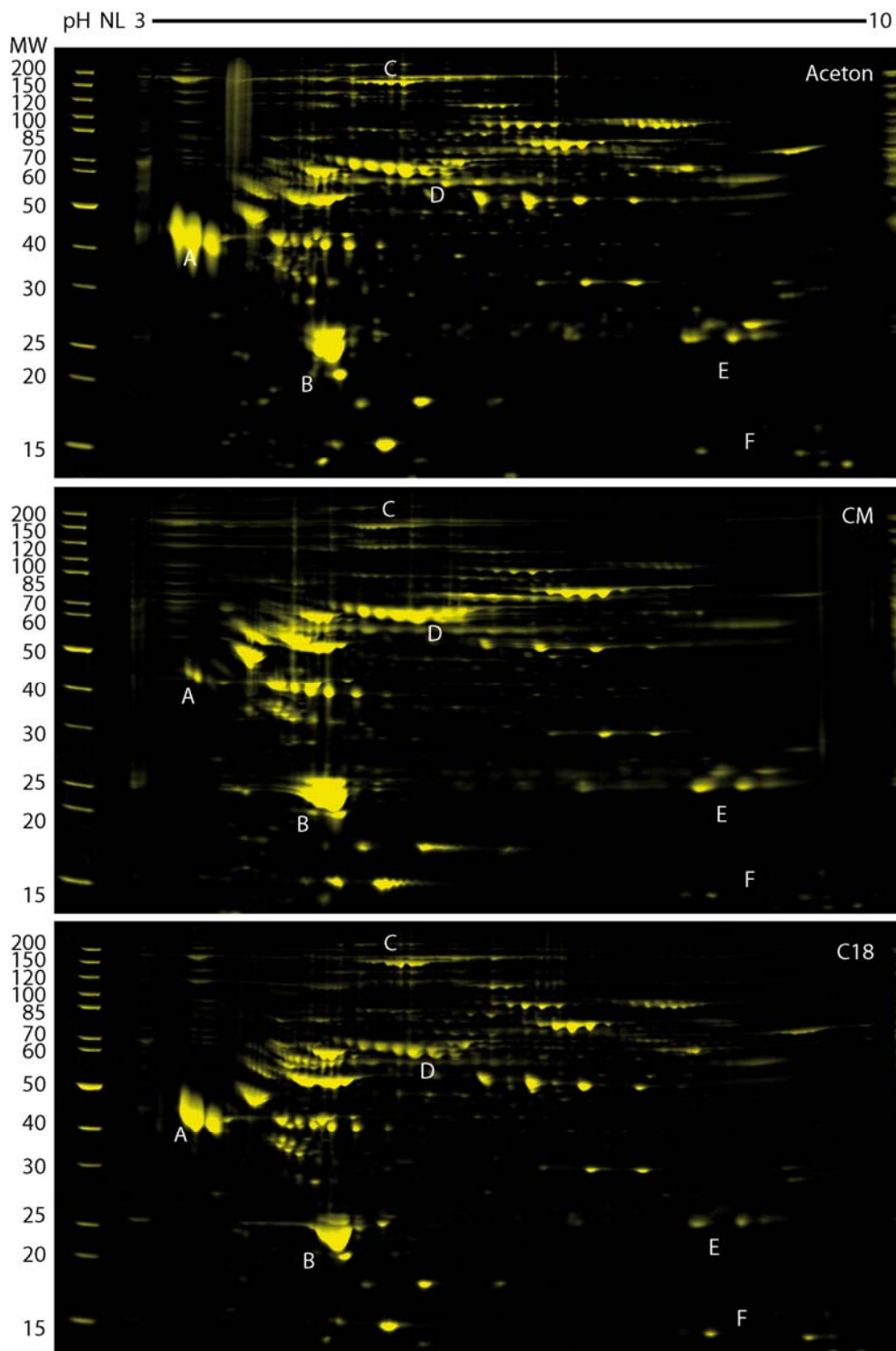


Abbildung 25: 2D-SDS-PAGE (pH 3-10 NL, 12 % Bis-Tris Criterion® Gel) von unterschiedlich ankonzentrierten und entsalzten depletierten Seren der gesunden Kontrollgruppe. **(Aceton)** Depletiertes Serum wurde durch Aceton gefällt. **(CM)** Depletiertes Serum wurde zunächst durch eine Vivaspin® 5000 Da MWCO-Membran auf 100 µl eingengt und anschließend durch Chloroform-Methanol-Fällung entsalzt. **(C18)** Chromatographische Entsatzung mit der Agilent mpCP *high recovery protein column*. Die Visualisierung erfolgte über Flamingo®-Färbung. Unterschiede sind durch A-F gekennzeichnet und werden im Text behandelt.

Bei der Fällung der Proteine mit Aceton wurde direkt nach der Depletion der Durchlauf mit den *low abundant* Proteinen mit dem Dreifachen an Aceton vermischt und der Ansatz bei -20 °C über Nacht inkubiert. Es erfolgte im Anschluss eine Zentrifugation bei 6.000 g für 30 Minuten. Das resultierende Proteinpellet wurde in 40 µl Lysepuffer resuspendiert. Bei der Chloroform-Methanol-Fällung wurde das Depletat zunächst mittels Vivaspin® Zentrifugalkonzentratoren mit einem Cut-Off von 5000 Da auf ein Volumen von 100 µl eingengt. Diese 100 µl wurden nach dem in Abschnitt 5.2.2.2 beschriebenen Protokoll gefällt und das Proteinpellet in 40 µl Lysepuffer aufgenommen.

Als drittes wurde das depletierte Serum chromatographisch entsalzt und ankonzentriert. Dabei wurde das Depletat mit Harnstoff versetzt und mit Eisessig angesäuert. 350 µg Protein wurden auf die Säule (Agilent mpCP *hi-recovery protein column*) appliziert. Das Eluat wurde aufgefangen, zur Trockne eingengt und das resultierende, lyophilisierte Proteinpellet in 40 µl Lysepuffer aufgenommen. Diese Methode wird in der Abbildung 25 als C18 abgekürzt.

Alle Aufarbeitungsmethoden zeigten ein gutes Ergebnis und könnten zur Entsalzung und Ankonzentrierung depletierter Serumproben verwendet werden. Bei der Spotanzahl und -verteilung waren jedoch Unterschiede der drei Methoden auszumachen.

Die Chloroform-Methanol-Fällung weist im Bereich der sauren Proteine, d.h. in einem pH von 3-6 eine deutlich verringerte Spotintensität des α_1 -Acid-Glykoproteins auf (Bereich A), während die Intensität des Apolipoproteins A-1 im Vergleich zu den anderen Aufarbeitungsmethoden erhöht ist (Bereich B). Des Weiteren sind die Konzentrationen an α_2 -Makroglobulin und Complement Faktor H im Vergleich zu den anderen Aufarbeitungsmethoden deutlich verringert (Bereich C). Insgesamt ist eine Abnahme der Spotschärfe auszumachen. Das Hemopexin (Bereich D) ist im Vergleich zu Aceton und C18 deutlich schlechter fokussiert.

Die Aufarbeitungsmethoden Aceton und C18 weisen sehr vergleichbare Spotpatterns auf, unterscheiden sich jedoch in Bereich E bei der Fokussierung der leichten κ -Domäne des IgG. Des Weiteren sind Intensitätsunterschiede im unteren Molekulargewichtsbereich auszumachen (Bereich F).

Bei der Betrachtung erwies sich die Fällung mit Aceton als die einfachste, methodisch robusteste und mit der größten Spotabdeckung. Im Gegensatz zur Chloroform-Methanol-Fällung konnte diese Methode auch bei größeren Probenvolumina eingesetzt werden. Im Vergleich zur Entsalzung durch die Agilent mpCR *high recovery protein column* wurde kein Chromatographiegerät benötigt. Die Zugabe von kaltem Aceton direkt nach der Depletion schützte die Proteine durch augenblickliche Absenkung der Temperatur und Denaturierung vor proteolytischem Abbau. Wegen dieser Vorteile wurde die Acetonfällung bei der Analytik depletierten Serums vorgezogen und fand in dieser Arbeit vorrangig Anwendung.

6.3.3 Vergleich der Depletionssäulen

Nachdem in Abschnitt 6.3.2 festgelegt wurde, welche Probenaufarbeitungsmethode für die Ankonzentrierung depletierten Serums zu wählen war, erfolgte der Vergleich der beiden Depletionssäulen auf Basis von 2D-Gelen. Als ausschlaggebende Kriterien für die Beurteilung der Depletionsleistung wurden die Gesamtspotzahl, Unterschiede im Spotpattern und die Gelqualität gewählt. Im Vergleich zur Agilent Human 6 Depletionssäule sollte die Proteome Lab IgY-12 LC2 eine deutliche Verringerung der *high abundant* Proteine erzielen, da sie mit sechs weiteren polyklonalen Antikörpern funktionalisiert war. Die theoretische Berechnung des Restproteinanteils nach der Depletion ist in Abbildung 26 dargestellt.

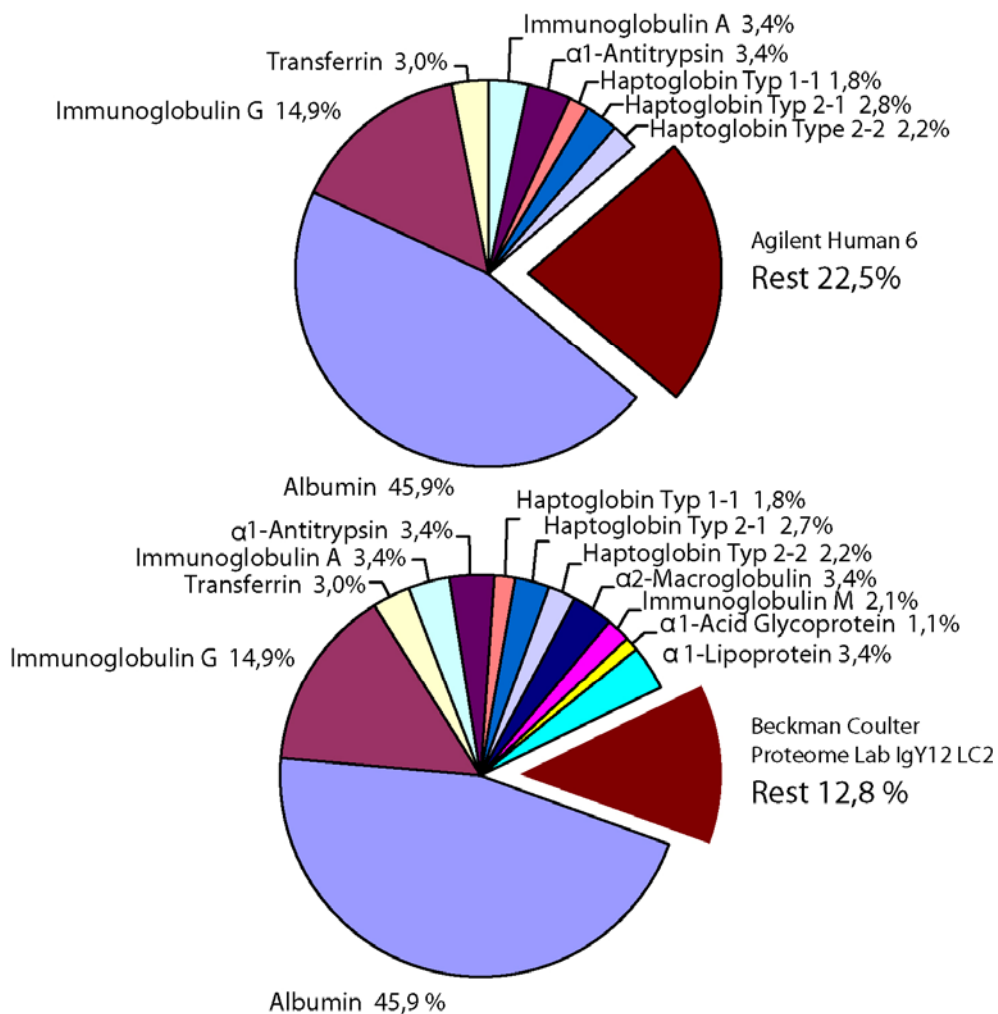


Abbildung 26: Prozentuale Verteilung der *high abundant* Proteine im humanen Serum. Bei den auf 100 % fehlenden Werten handelt es sich um *low abundant* Proteine. Die Graphik wurde durch Addition und Normierung der Serumkonzentrationen der gelisteten Proteine erstellt. Werte aus „The Plasma Proteins“, Volume IV, 2. Ausgabe 1984 von Frank W. Putnam.

Nach der tabellarischen Auflistung der Konzentration der Serumproteine und deren Verrechnung war bei der Agilent Human 6 Depletionssäule mit einem Restproteinanteil von 22,5 % zu rechnen. Bei der Beckman Coulter Proteome Lab IgY12 LC2 waren es aufgrund der zusätzlichen Depletion von α_2 -Makroglobulin, IgM, α_1 -Acid Glykoprotein und Apolipoprotein A-1 theoretisch nur 12,8 %. Diese Anteile galten jedoch nur bei der Annahme, dass die Depletion eines Proteins zu 100 % war und kein Restprotein im Depletat verblieb.

In Abbildung 27 ist ein Vergleich der realen Depletionsleistungen durch 2D-SDS-PAGE dargestellt.

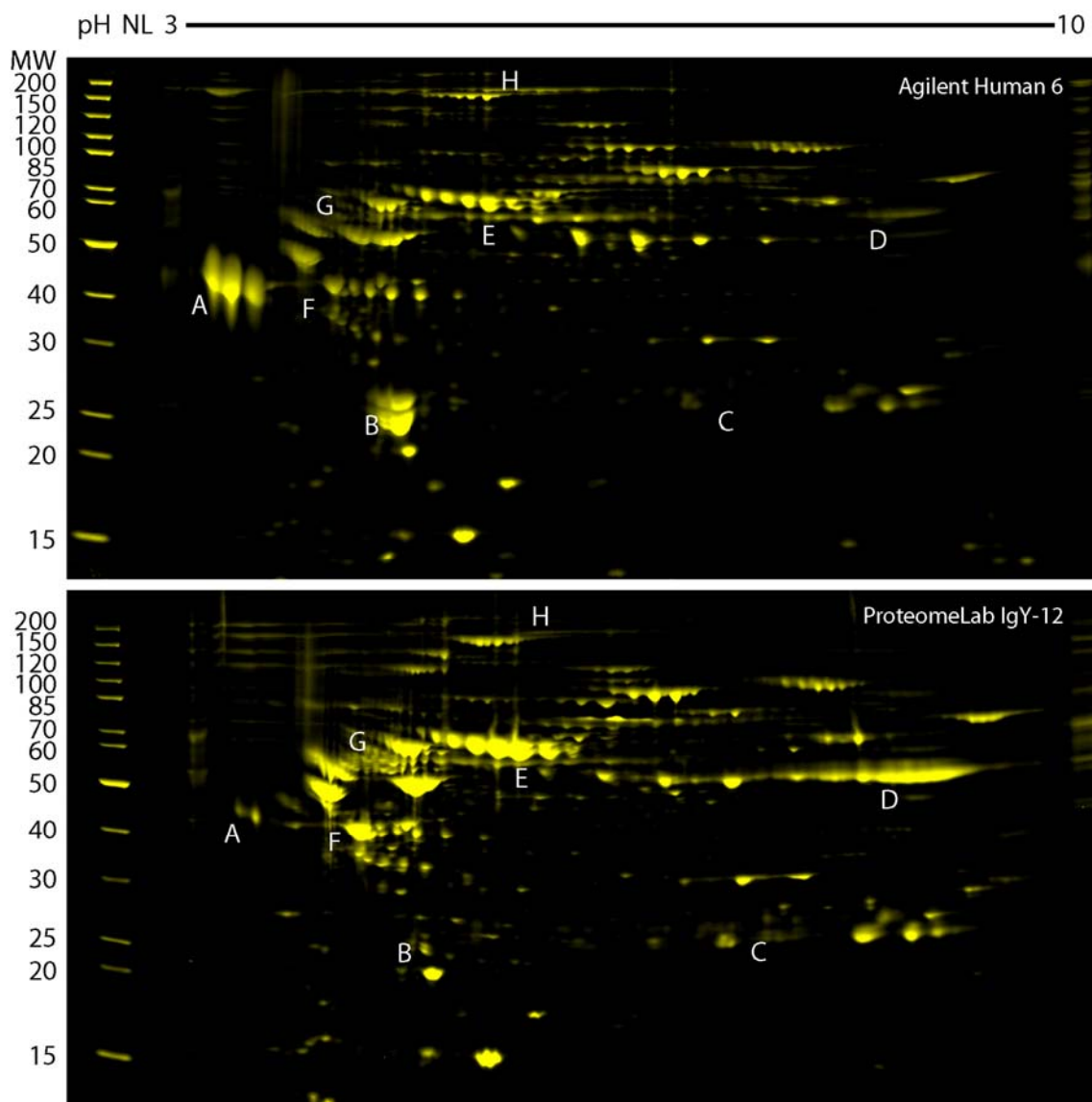


Abbildung 27 2D-SDS-PAGE von depletiertem Serum der gesunden Kontrollgruppe. Es wurden jeweils 150 μ g Protein aufgetragen und im Bereich pH 3-10 NL fokussiert. Anschließend erfolgte die SDS-Page auf einem Criterion[®] 12% Bis-Tris Gel. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Flamingo[®]. Die jeweiligen Unterschiede A-H sind im nachfolgenden Abschnitt erläutert.

Abbildung 27 zeigt an den Bereichen A-H, dass Unterschiede in den Spotpattern der Depletate vorhanden waren. Im Bereich A war bei der Proteome Lab Depletionssäule die Intensität des Spots stark vermindert. Da es sich hierbei um das α_1 -Acid-Glykoprotein handelte, wurde es erwartungsgemäß von der Beckman-Coulter Proteome Lab IgY12 LC2 entfernt. Gleiches traf auch für die Spots im Bereich B (Apolipoprotein A-1) und H (α_2 Makroglobulin) zu. Alle drei Proteine wurden im Vergleich zur Agilent Human 6 deutlich abgereichert, sind jedoch noch in kleinen Quantitäten vorhanden.

Im Gegensatz dazu waren bei den Spots im Bereich C (κ -Kette der IgG), Bereich D (γ -Kette der IgG) und Bereich F (Haptoglobin) eine deutlich geringere Abreicherung der Proteine im Vergleich zur Agilent Human 6 Depletionssäule zu verzeichnen.

In den Bereichen E und G war eine erhöhte Konzentration der Proteine im Depletat der Beckman Coulter Proteome Lab IgY12 LC2 festzustellen. Es handelte sich im Bereich E um Spots von Hemopexin während im Bereich G Spots von Kininogen, α_1 -Glykoprotein und Vitamin-D-bindendes Protein zu identifizieren waren. Diese Proteine wurden nicht durch die Depletionssäulen entfernt und liegen aufgrund der Abreicherung der *high abundant* Proteine in ihren Quantitäten erhöht vor.

Trotz der erfolgreichen Abreicherung des α_1 -Acid-Glykoprotein, Apolipoprotein A-1 und α_2 -Makroglobulin ähnelten sich die Spotpatterns der beiden Depletionssäulen. Das Ziel, dass sich durch die Depletion von weiteren Proteinen andere *low abundant* Proteine darstellen lassen, konnte nicht erreicht werden. Die Depletion des Immunglobulin G (Spotregion C und D) war bei der Beckman Coulter Proteome Lab IgY12 deutlich schlechter als bei der Agilent Human 6.

Die Analyse der 2D-Gele zeigte, dass bei beiden Depletionssäulen alle depletierten Proteine in der Durchlaufsfraction noch in großen Quantitäten nachweisbar waren. Die Depletion stellte somit nur eine Abreicherung der Proteine dar, durch die jedoch eine deutlich bessere Visualisierung von *low abundant* Proteinen erreicht werden konnte.

6.3.4 Identifizierungen im humanen depletierten Serum

Nach Ermittlung der optimalen Aufarbeitungsmethoden des depletierten Serums (vgl. Abschnitt 6.3.2 und Erörterung der Säulenwahl (vgl. Abschnitt 6.3.3) wurde im nachfolgenden Schritt die Gesamtheit der darstellbaren Proteine identifiziert. Dazu wurden aus einem 2D-SDS-PAGE Gel mit dem pH 3-10 NL insgesamt 103 Proteine durch PMF identifiziert. Abbildung 28 zeigt das Gel und die identifizierten Proteine. Die Tabelle aller identifizierten Proteine ist im Anhang (Abschnitt 10.2.2, Seite 112) zu finden. Anhand der Identifizierungen dieses Gels wurden die Spots in anderer Gelen zugeordnet.

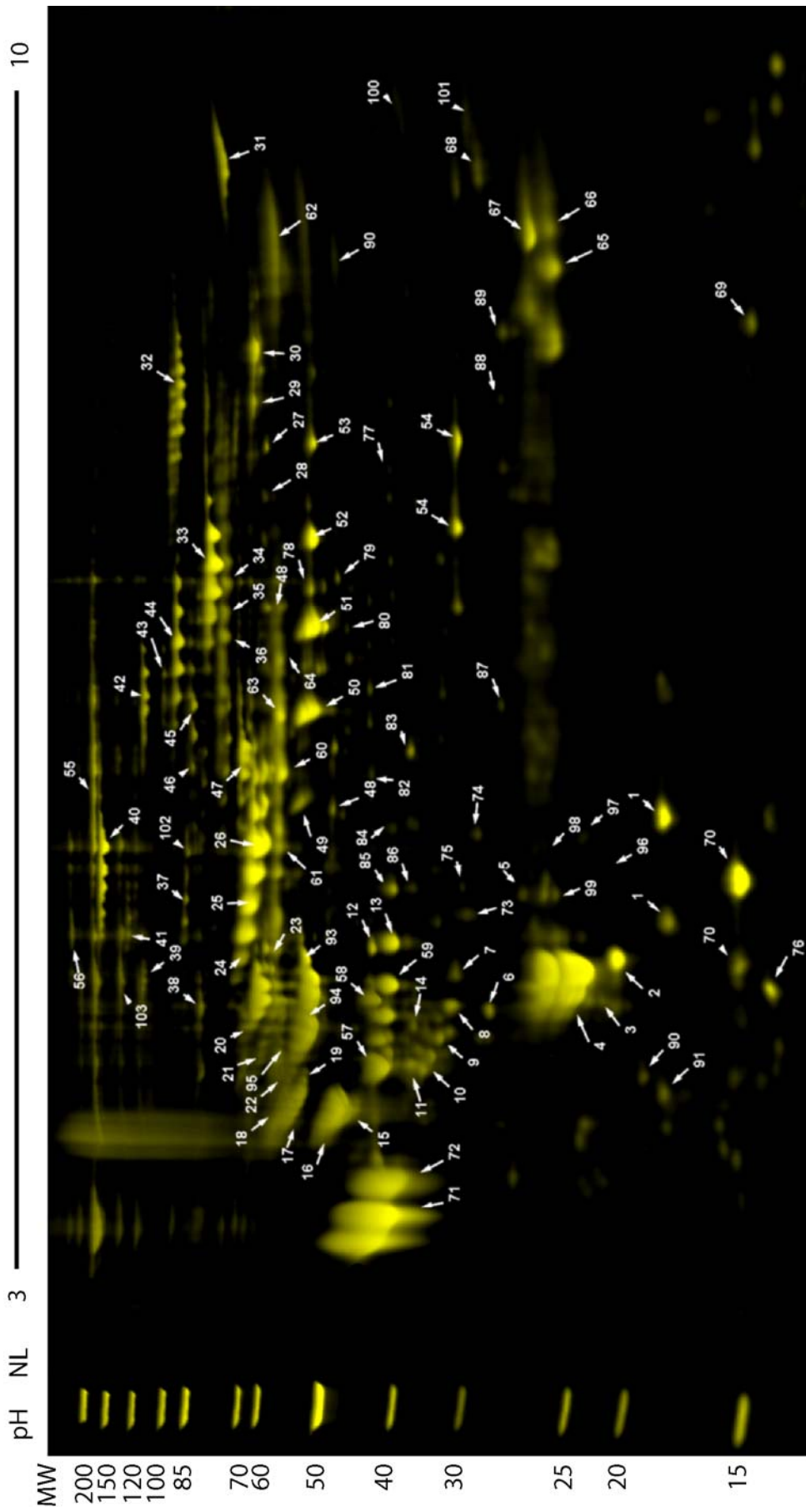


Abbildung 28: Identifizierungen im humanen, mit der Agilent Human 6 Depletionssäule depletierten Serum. 150 µg humanes depletiertes Serum wurde auf einem IPG-Streifen pH 3-10 NL (BIORAD) fokussiert und anschließend durch SDS-PAGE (Criterion® 12 % Bis-Tris Gel) aufgetrennt. Es erfolgte eine Anfärbung der Proteine durch Flamingo® (BIORAD). Nach Digitalisierung mittels dem Fuji FLA 5100 mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm wurde das Gel mit Kolloidalm Coomassie nachgefärbt und 101 Spots ausgeschnitten, mittels Trypsin verdaut und durch PMF identifiziert.

Durch den hohen Anteil an Glykosilierungen der Serumproteine ist das Aussehen eines 2D-Gels grundlegend anders als das von Zelllysaten (vgl. Abbildung 18, Seite 51). Durch die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen erstrecken sich viele Proteine als horizontal verlaufende Spotskaskaden. Bei der Identifizierung durch PMF ergaben sich daher für diese unterschiedlichen Spots identische Identifizierungsergebnisse. Als Beispiele für Proteine, die sich über eine Kaskade von Proteinspots erstrecken, sind das Hemopexin (Spots 24-26), das β_2 -Glykoprotein (Spots 49-53) und das α_1 -Acid-Glykoprotein (Spots 71-72) zu nennen. Aus diesem Grund konnten 52 verschiedene Proteine identifiziert werden, obwohl im Verlauf der Arbeit weit mehr als 103 Proteine analysiert wurden.

6.3.5 Fraktionierung von depletiertem Serum

6.3.5.1 Fraktionierung durch eine Gradiententrennung

Aufgrund der geringen Varianz der Proteindistribution und der unvollständigen Abreicherung der *high abundant* Proteine wurde eine Methode gesucht, um die Anzahl der detektierbaren Proteinen zu erhöhen. Dies sollte durch eine Fraktionierung erfolgen, bei der die Serumproteine spezifisch in Fraktionen angereichert würden.

Zum Einsatz kam die Agilent mpCP *high recovery protein column*, die im Abschnitt 6.3.2 zur Entsalzung und Ankonzentrierung beschrieben wurde. Bei dieser Art der chromatographischen Separation werden die Proteine gemäß ihrer Hydrophobizität aufgetrennt.

Zunächst wurde eine Methode mit einer Gradientenelution (vgl. 5.9.4.2, Seite 47) entwickelt, um die Proteine des Serums zu fraktionieren. Die Proteine wurden auf die Säule appliziert und anschließend durch einen ansteigenden Acetonitrilgradienten von der Säule eluiert. Von Minute 10 bis Minute 40 wurden im Abstand von jeweils zwei Minuten 20 Fraktionen gesammelt. Das Elutionsprofil dieser Methode ist in Abbildung 29 dargestellt.

Da die Proteinausbeute der einzelnen Fraktionen aufgrund der geringen Beladungskapazität der Säule sehr gering war, mussten die Fraktionen aus mehreren Läufen vereint werden. Die vereinten Fraktionen wurden zur Trockne eingeengt, das lyophilisierte Protein in Lysepuffer resuspendiert und durch 1D-SDS-PAGE analysiert.

Die in Abbildung 29 dargestellte Fraktionierung zeigte eine gute Auftrennung der Serumproteine. Dabei verteilte sich der größte Anteil der Proteine auf die Fraktionen 2-16. Aufgrund der geringen Proteinkonzentration in Fraktion 17, die aus einem Pool der Fraktionen 17-20 besteht, ist eindeutig belegt, dass das Absorptionssignal im Chromatogramm nicht durch Proteine verursacht ist, sondern durch Lipide, die erst bei hohen Acetonitrilkonzentrationen eluiert werden.

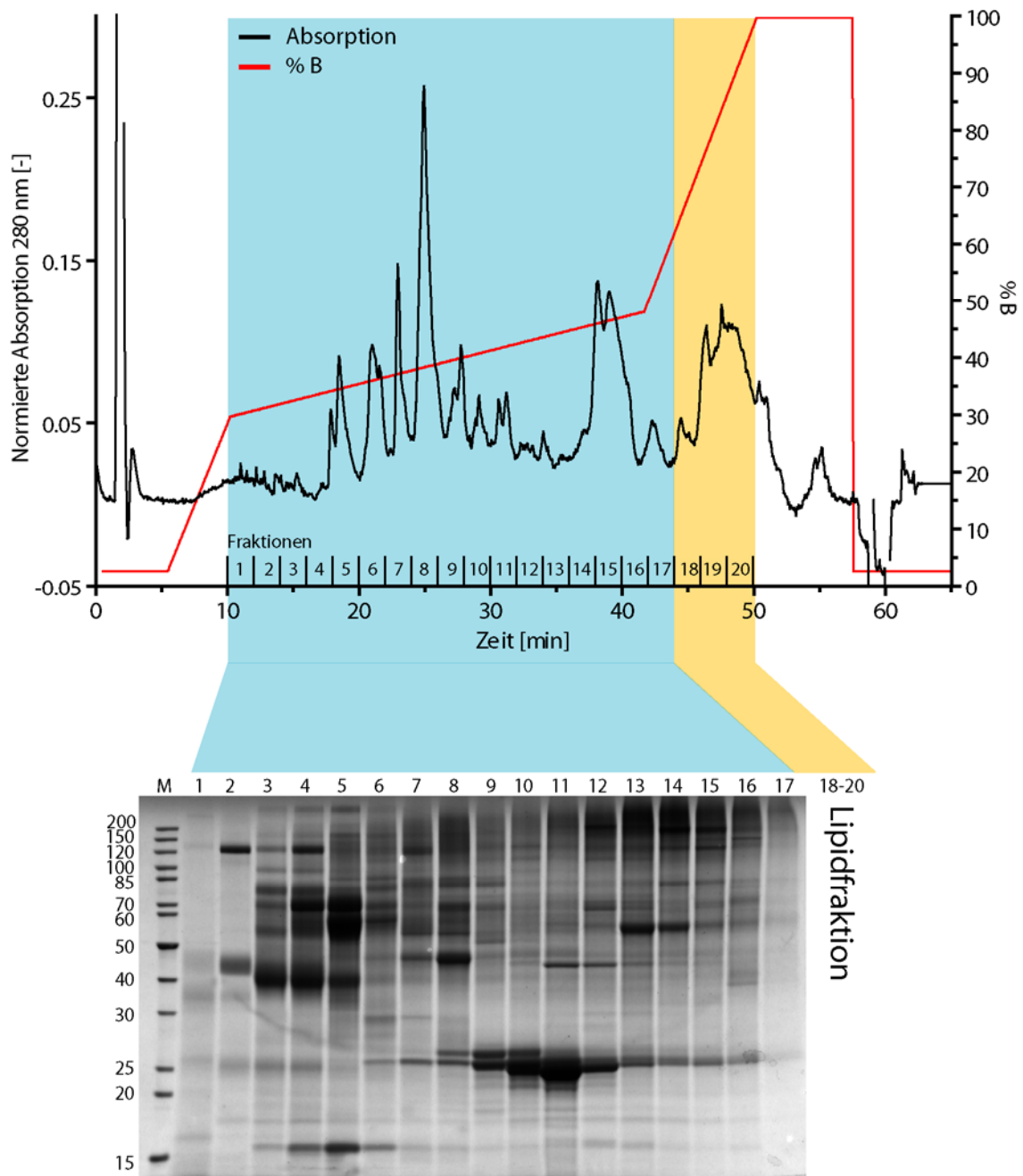


Abbildung 29: Chromatogramm der Gradientenelutionsmethode von depletiertem Serum der gesunden Kontrollgruppe. 1 ml Depletat wurde mit 480 mg Urea und 13 μ l Eisessig versetzt und nach Filtration auf die Agilent mpCR *high recovery protein column* appliziert. Die Elution erfolgte durch einen ansteigenden Acetonitrilgradienten. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Von Minute 10 bis Minute 50 wurden im Abstand von 2 Minuten Fraktionen von 1,5 ml aufgefangen, zur Trockne eingengt und das resultierende Proteinpellet in Lysepuffer resuspendiert und durch 1D-SDS-PAGE analysiert. Die Färbung der Proteine erfolgte durch kolloidales Coomassie.

Zur Identifizierung von Proteinen und zum Vergleich einzelner Proteine ist die Auftrennung durch 1D-SDS-PAGE nicht ausreichend. Aus diesem Grund sollten die Fraktionen durch 2D-SDS-PAGE untersucht werden. Für diese Analyse waren jedoch pro Fraktion 100-150 μ g Protein erforderlich, um ein 2D-Gel anschließend mit kolloidalem Coomassie färben und Proteine durch PMF identifizieren zu können. Dies hätte bedeutet dass man die Fraktionen

aus 10-15 Chromatographieläufen vereinen hätte müssen, um genügend Protein für das Gel einer Fraktion zu erhalten. Aus diesem Grund musste absolute Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der Proteine garantiert werden. Schwankungen in der Retentionszeit der Proteine würden sich in einer Änderung des Proteinpatterns niederschlagen.

Abbildung 30 zeigt, dass trotz modernster apparativer Ausstattung signifikante Änderungen der Retentionszeit zu detektieren waren.

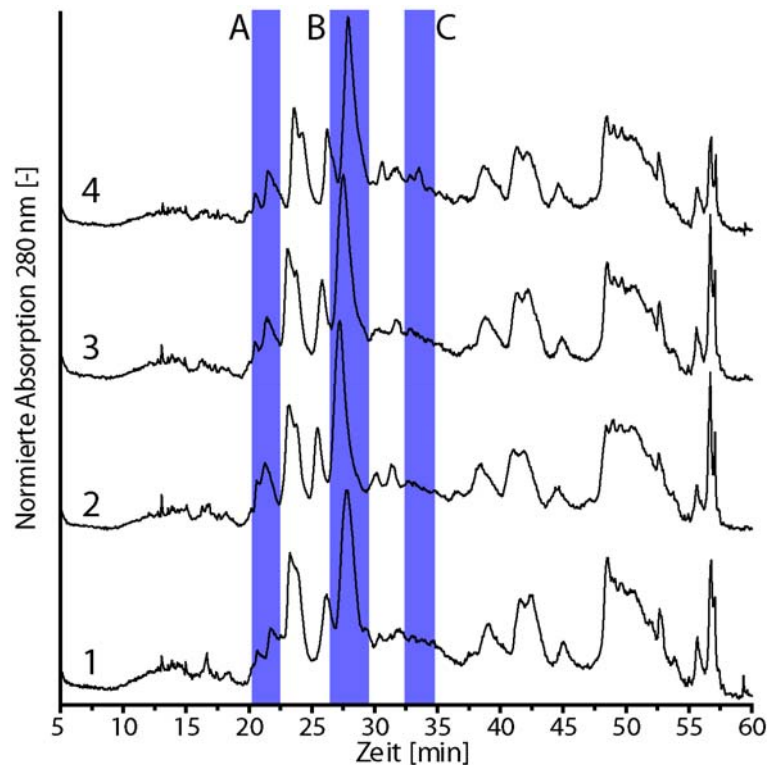


Abbildung 30: Vergleich der Chromatogramme der Gradientenelution von depletiertem Serum der gesunden Kontrollgruppe (Agilent Human 6) mit der Agilent mpCR *high recovery protein column*. Pro Lauf (1-4) wurden 380 µg Protein appliziert. Veränderungen der Retentionszeit sind in den Bereichen A-C dargestellt.

Im Bereich A ist eine signifikante Veränderung der Retentionszeiten und der Auflösung zu erkennen. Im ersten und zweiten Lauf ist nur eine unvollständige Trennung der beiden Peaks zu erkennen. In Bereich B ist die Retentionszeit der einzelnen Läufe mit einer Differenz von $t=1,5$ Minuten deutlich unterschiedlich. Im Bereich C ist im vierten Lauf ein Peak auszumachen, der in den anderen Läufen nicht vorhanden ist.

Aufgrund der Änderungen der Retentionszeiten einzelner Proteine ist eine Fraktionierung durch eine Gradiententrennung nicht empfehlenswert. Die Abweichungen des Proteinpatterns der 2D-Gele dieser Fraktionen wären zu groß.

Abhilfe könnte eine größer dimensionierte Säule schaffen, die genügend Protein in einem einzelnen Lauf binden könnte. Mit Hilfe von Standardproteinen könnten die Laufunterschiede abgeglichen und die Fraktionierung angepasst werden. Allerdings könnten sich durch dieses

upscaling die chromatographischen Eigenschaften der Säule verändern. Die Separationsleistung müsste daher erneut bestätigt werden und kann nicht direkt aus diesen Experiment übernommen werden.

6.3.5.2 Fraktionierung durch eine Stufenelution

Um die fehlende Präzision der Gradiententrennung zu verbessern wurde eine Stufenelutionsmethode (siehe Abschnitt 5.9.4.3, Seite 48) entwickelt. Es wurden insgesamt 8 Stufen mit den Acetonitrilkonzentrationen von 33, 36, 39, 42, 45, 48, 55, 100 %. Jede Konzentrationsstufe wurde für 10 Minuten gehalten und eine Fraktion von 7,5 ml gesammelt. Eine schematische Übersicht über das Retentionsverhalten ist in Abbildung 31 dargestellt.

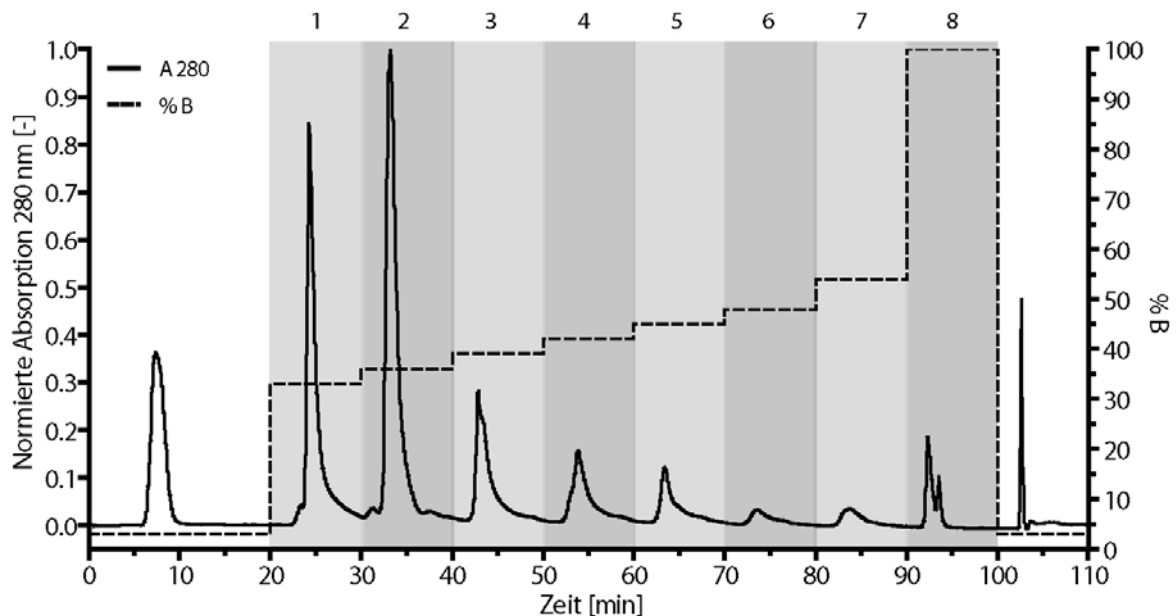


Abbildung 31: Chromatogramm der Stufenelution von depletiertem Serum (Agilent Human 6) mit der Agilent mpCR *high recovery protein column*. Es wurden 380 µg Protein auf die Säule appliziert und in 8 Stufen (33, 36, 39, 42, 45, 48, 55, 100 % ACN) von der Säule eluiert. Für jede Stufe wurde eine Fraktion von 7,5 ml aufgefangen, die zur Trockne eingengt wurde. Das resultierende lyophilisierte Protein wurde in Lysepuffer resuspendiert und mittels 2D-SDS-PAGE analysiert.

Das Chromatogramm der Stufenelutionsmethode gab keinen Aufschluss über die Retentionszeit einzelner Proteine. Bei jeder Änderung der Acetonitrilkonzentration wurde parallel eine deutliche Änderung der Absorption gemessen.

In den Fraktionen 6-8 nahm diese pro Gradientenschritt deutlich ab. Aufgrund der geringen Proteinkonzentration der letzten Fraktion und des hohen Anteils an Lipiden, die die folgenden Analysen stören konnten, wurde diese Fraktion nicht analysiert und die Fraktionen 6 und 7 vereint. Man erhält daher sechs Fraktionen zur Analyse, deren elektrophoretische Auftragungen in den Abbildungen 32 und 33 dargestellt sind.

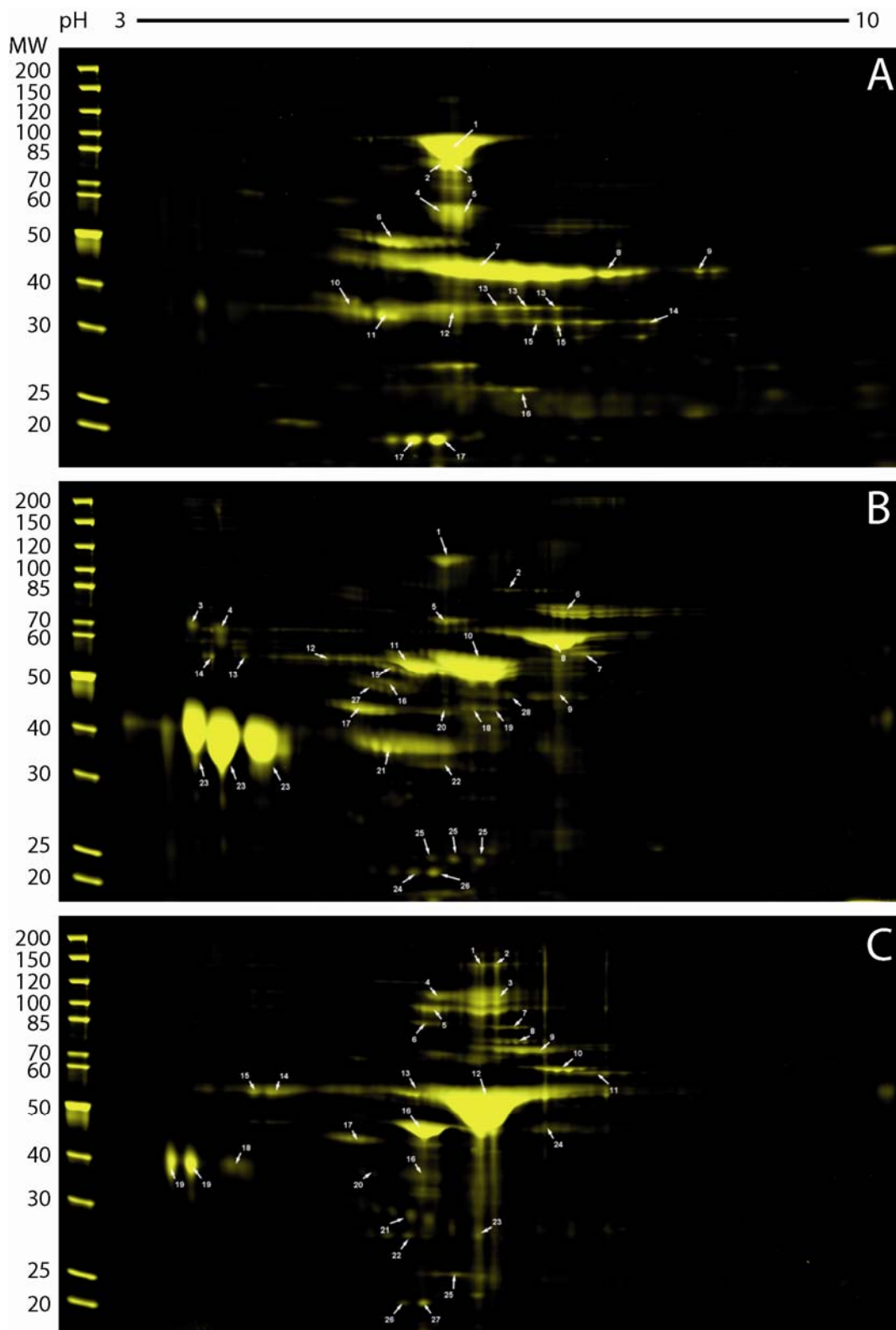


Abbildung 32: 2D-SDS-PAGE von depletiertem humanem Serum der Patientengruppe RA. Es wurden 100 µg Protein pro Gel aufgetragen und im Bereich von pH 3-10 fokussiert. Die Auftrennung erfolgte über ein Criterion® 10 % Bis-Tris Gel. (A) Fraktion 33 % ACN, (B) Fraktion 36 % ACN, (C) Fraktion 39 % ACN. Die Identifizierungen der Spots sind im Anhang im Abschnitt 10.2.3 zu finden.

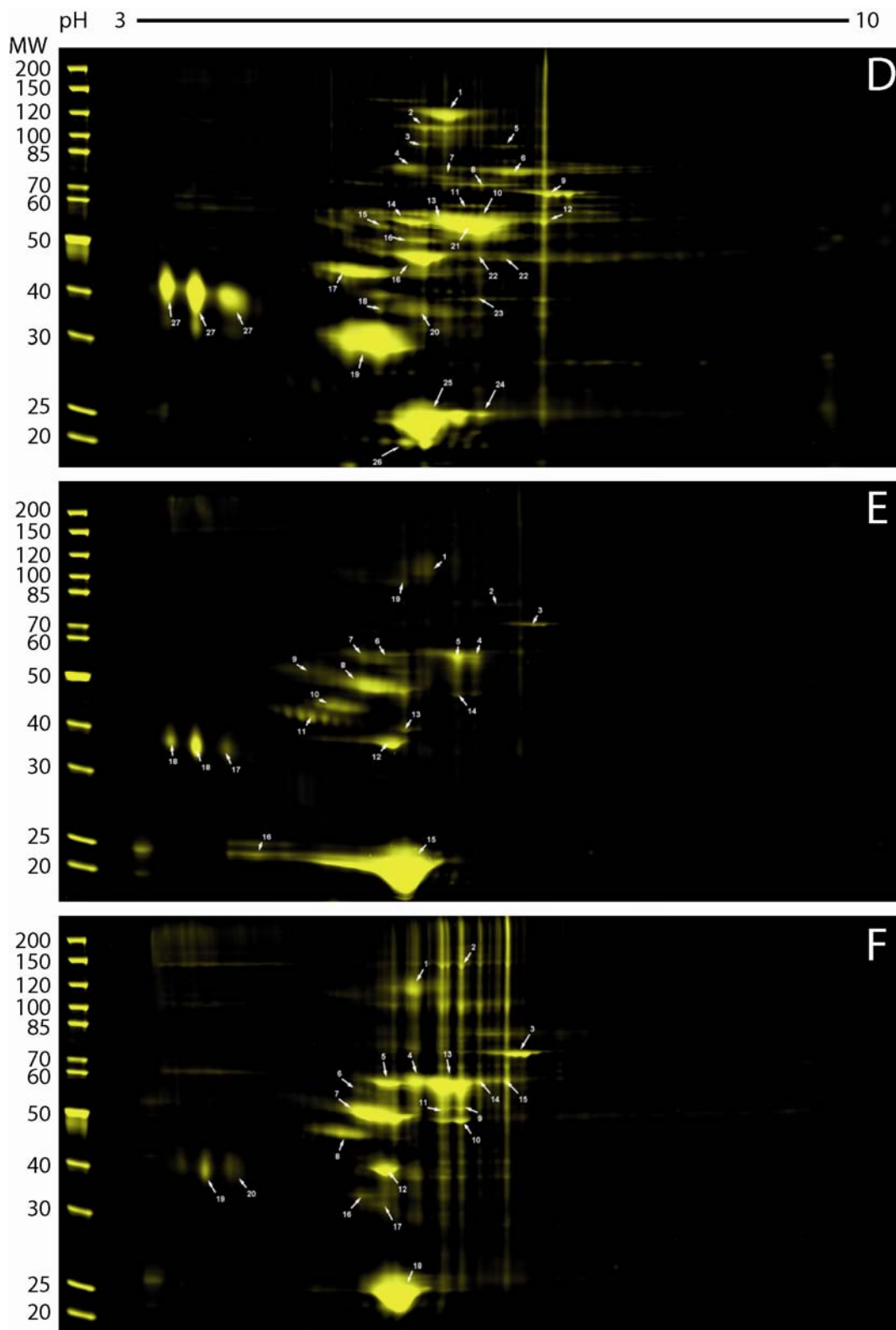


Abbildung 33: 2D-SDS-PAGE von depletiertem humanem Serum der Patientengruppe RA. Es wurden 100 µg Protein pro Gel aufgetragen und im Bereich von pH 3-10 fokussiert. Die Auftrennung erfolgte über ein Criterion® 10 % Bis-Tris Gel. (D) Fraktion 42 % ACN, (E) Fraktion 45 % ACN, (F) Fraktion 48 % ACN und 55 % ACN (Pool). Die Identifizierungen der Spots sind im Anhang im Abschnitt 10.2.3 zu finden.

Tabelle 12: Auflistung und Vorkommen der in den Fraktionen identifizierten Proteine. Insgesamt wurden 132 Spots identifiziert, die in 40 unterschiedliche Proteine resultierten. Die Identifizierungen der Spots sind im Anhang im Abschnitt 10.2.3 Seite 114 zu finden.

Nr.	Swiss-Prot Access-ID	Protein Beschreibung	pI	Fraktion						
				1	2	3	4	5	6	
1	AFAM_HUMAN	Afamin	5,64							
2	A1AG1_HUMAN	α_1 -Acid Glycoprotein 1	4,93							
3	A1AG2_HUMAN	α_1 -Acid Glycoprotein 2	5,03							
4	A1AT_HUMAN	α_1 -Antitrypsin	5,37							
5	A1BG_HUMAN	α_1 -Glycoprotein	5,58							
6	FETUA_HUMAN	α_2 -HS-Glycoprotein	5,43							
7	A2MG_HUMAN	α_2 -Macroglobulin	5,90							
8	AMBP_HUMAN	AMBP protein	5,95							
9	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	6,32							
10	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	5,56							
11	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	5,28							
12	APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	5,65							
13	APOH_HUMAN	β_2 -Glycoprotein 1	8,34							
14	CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	5,44							
15	CLUS_HUMAN	Clusterin	5,89							
16	FA12_HUMAN	Coagulation Factor XII	8,04							
17	F13B_HUMAN	Coagulation Factor XIII B Chain	6,01							
18	C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent	5,89							
19	CO3_HUMAN	Complement C3	6,02							
20	CO6_HUMAN	Complement C6	6,39							
21	CO7_HUMAN	Complement C7	6,09							
22	CFAB_HUMAN	Complement factor B	6,67							
23	CFAH_HUMAN	Complement factor H	6,21							
24	FHR1_HUMAN	Complement factor H-protein 1	7,75							
25	FHR2_HUMAN	Complement factor H-protein 2	6,00							
26	CFAI_HUMAN	Complement factor I	7,72							
27	IGKC_HUMAN	IgG κ Kette Region C	7,6							
28	HPT_HUMAN	Haptoglobin	6,13							
29	HEMO_HUMAN	Hemopexin	6,55							
30	KNG1_HUMAN	Kininogen-1	6,34							
31	A2GL_HUMAN	Leucine-rich α_2 -Glycoprotein	6,00							
32	RETBP_HUMAN	Plasma retinol-binding protein	5,76							
33	PLMN_HUMAN	Plasminogen	7,04							
34	THRB_HUMAN	Prothrombin	5,64							
35	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	6,81							
36	ALBU_HUMAN	Serum albumin	5,92							
37	SAMP_HUMAN	Serum Amyloid P-Component	6,10							
38	TETN_HUMAN	Tetranectin	5,52							
39	VTDB_HUMAN	Vitamin D-Binding Protein	5,40							
40	ZA2G_HUMAN	Zinc- α_2 -Glycoprotein	5,57							

Die Fraktionierung von depletiertem Serum resultierte in einem nicht zufrieden stellenden Ergebnis. Die Anzahl an identifizierten Proteinen, die durch die aufwendige Fraktionierung erreicht wurde, war nicht höher, als die, die man durch eine Depletion alleine erreicht hatte (vgl. Abbildung 28, Seite 65). Zudem ist die Gelqualität der Fraktionen nicht optimal. Die Fraktion F war durch starke vertikale Streifenbildung gekennzeichnet. Insgesamt waren die meisten Proteine deutlich schlechter aufgetrennt als bei Fokussierungen von unfraktioniertem Depletat.

Aufgrund der geringen Säulenkapazität mussten die Fraktionen aus 5 Läufen vereint werden. Für jede Fraktion wurden daher 37,5 ml zur Trockne eingeeengt. Dies benötigte je nach Acetonitrilgehalt 10-12 h. Ein gravierendes Problem bei der Einengung ist die Ankonzentrierung der Trifluoressigsäure (TFA), die in Anteilen von 0,05 vol.-% in beiden Laufmitteln enthalten war. Sie veränderte den pH-Wert der Proben nach dem Resuspendieren der lyophilisierten Proteinpellets sehr stark. Durch die Zugabe kleiner Mengen 100 % Ethanol nach dem Trocknen wurde versucht, die TFA zu verestern. Durch diese Umwandlung war sie im Lyophilisator leichter abdampfbar und konnte besser entfernt werden. Trotzdem musste vor den Analysen die Proben durch eine 0,1 M Tris-HCl-Lösung (pH 9,0) wieder ausgeglichen werden. Der hieraus entstandene, hohe Salzeintrag resultierte in einer deutlichen Verschlechterung der isoelektrischen Fokussierung.

Insbesondere bei DIGE-Gelen konnten nur unzureichende Fokussierer- und Intensitätsergebnisse erzielt werden. Da zur Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe ein pH-Wert von mindestens 8,0 benötigt wurde, musste bei dieser Art der Probenvorbereitung stark gegen-titriert werden.

Obwohl Proteine, wie z.B. Afamin, α_2 -Macroglobulin und Clusterin ausschließlich in einzelnen Fraktion (Fraktion 6) nachgewiesen werden konnten, so gibt es andere, die in sämtliche Fraktionen in mittleren bis großen Quantitäten nachweisbar waren. Zu diesen Proteinen zählten das α_1 -Acid Glykoprotein 1, α_1 -Acid Glykoprotein 2, α_2 -HS-Glykoprotein, Komplement Faktor H und Serotransferrin. Auffällig ist, dass Proteine, die durch die Depletion entfernt werden sollten, nach der Fraktionierung wieder deutlich intensiver auf den Gelen auszumachen waren. Dies ist gut an Abbildung 32 Gel C zu erkennen. Die Spot 12-14 wurde alle als Serumalbumin identifiziert. Die starke Anreicherung des Albumins zeigt in diesem Gel eine ähnliche Fokussierproblematik wie in Abbildung 23 bei undepletiertem Serum. Das Protein ist schlecht aufgetrennt über den gesamten pH-Bereich verteilt. Beim Apolipoprotein A-1 (Spot 24, 25 Gel D; Spot 15, 16 Gel E; Spot 18 Gel F, Abbildung 33) ist eine weitere, überdurchschnittliche Anreicherung zu beobachten. Dieses lipidbindende Protein ist in den Fraktionen ab einem Acetonitrilanteil von 42 % (ab Fraktion 4) sehr stark angereichert. Aufgrund der lipophilen Trenneigenschaften einer *reversed-phase* (RP) Chromatographie wurde dieses Protein selektive angereichert.

Es befinden sich zudem deutlich weniger Spots auf den Gelen.

Die Fraktionierung hat sich daher zur Visualisierung weiterer *low abundant* Proteine als nicht geeignet herausgestellt. Die Prozedur ist langwierig und aufgrund der großen Verdünnung der Proben und den langwierigen Einengungsschritten äußerst umfangreich.

Es wurde sich stattdessen auf die Etablierung der DIGE-Technologie konzentriert und deren Anwendung bei der Analyse depletierter Seren.

6.3.6 DIGE-Vergleich der depletierten Seren

Durch den hohen Glykosilierungsanteil der Serumproteine ergeben sich bei der 2D-SDS-PAGE oft keine klar abgegrenzten Spots, sondern häufig Spotkaskaden und unförmige Spotmuster. Der konventionelle Vergleich dieser Spotmuster ist nur sehr schwer möglich und resultiert stets in fragwürdigen Quantifizierungen mit schlechten Signifikanzen und Standardabweichungen. Der Vorteil, dass im Falle eines DIGE-Experimentes die Proben in nur einem Gel laufen und anschließend die Intensitäten durch den Abgleich mit einem internen Standard normiert werden, ermöglicht quantitativ hochsignifikante Quantifizierungsergebnisse.

Die Durchführung eines DIGE-Experimentes und deren statistische Auswertung ist in Abschnitt 5.5 ausführlich beschrieben.

Da in dieser Arbeit von den 103 identifizierten Proteinen im Serum (siehe Abbildung 28, Identifizierungen Abschnitt 10.2.2, Seite 112) 80,7 % im pH 4-7 liegen und nur 19,3 % im Bereich 7-10 wurde für die Analyse mittels DIGE-Gele der pH 4-7 gewählt. Nach Kopplung der Proben (50 µg Protein) mit ihren jeweiligen Farbstoffen (400 pmol / Farbstoff und Probe) wurden die depletierten Serumproben auf einem IPG-Streifen pH 4-7 fokussiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zwei exemplarische Gele für den Vergleich der Gruppe RA mit OA und RA mit Gesund sind in den Abbildungen 35 und 36 dargestellt.

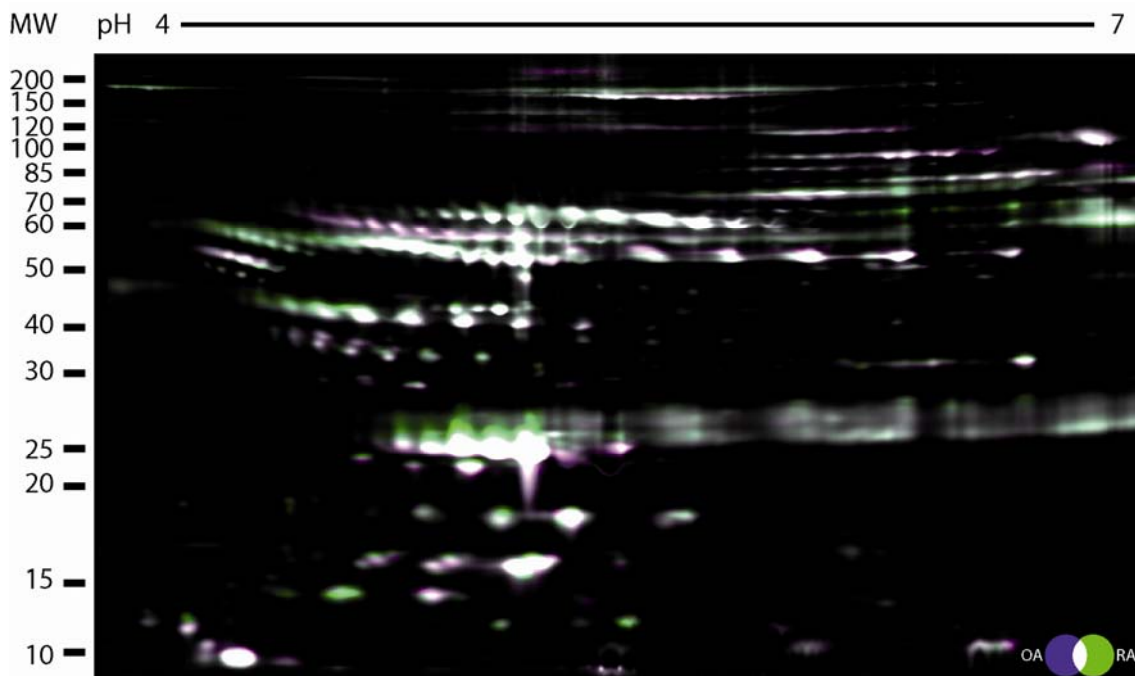


Abbildung 34: Darstellung eines DIGE-Gels, in dem depletiertes Serum (Agilent Human 6 Depletionsssäule) der RA-Patientengruppe mit dem der OA-Patientengruppe verglichen wurde. pH 4-7, 12 % Criterion® Bis-Tris Neutralgel (BIORAD).

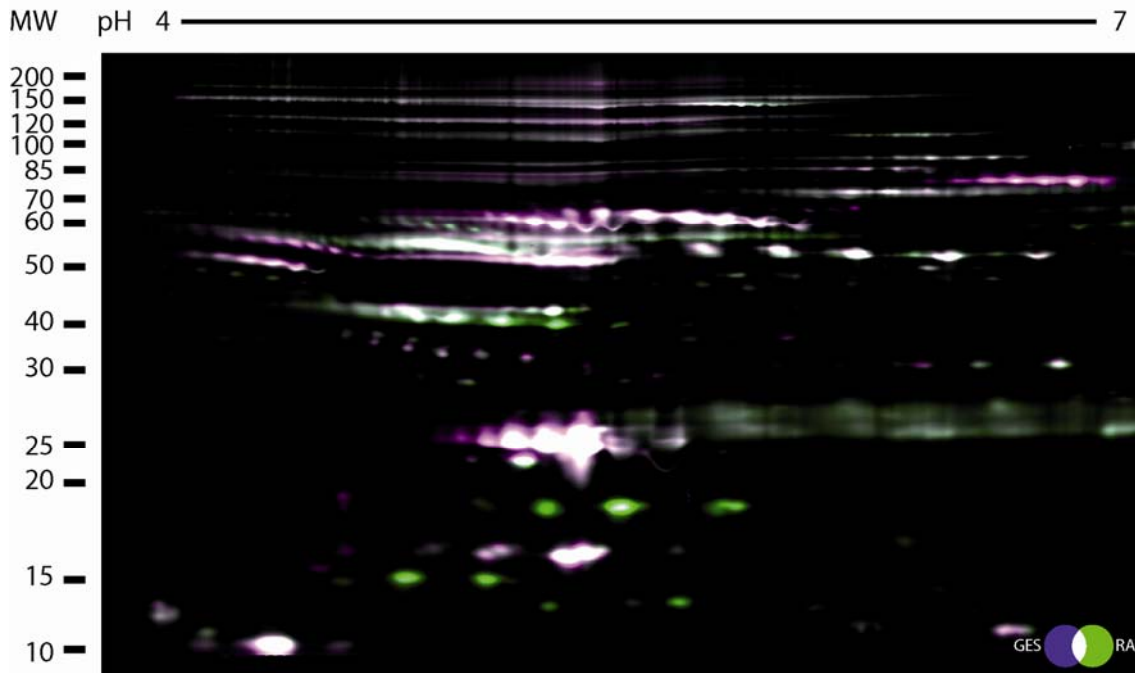


Abbildung 35: Darstellung eines DIGE-Gels, in dem depletiertes Serum (Agilent Human 6 Depletionssäule) der RA-Patientengruppe mit dem der gesunden Kontrollgruppe verglichen wurde. pH 4-7, 12 % Criterion® Bis-Tris Neutralgel (BIORAD).

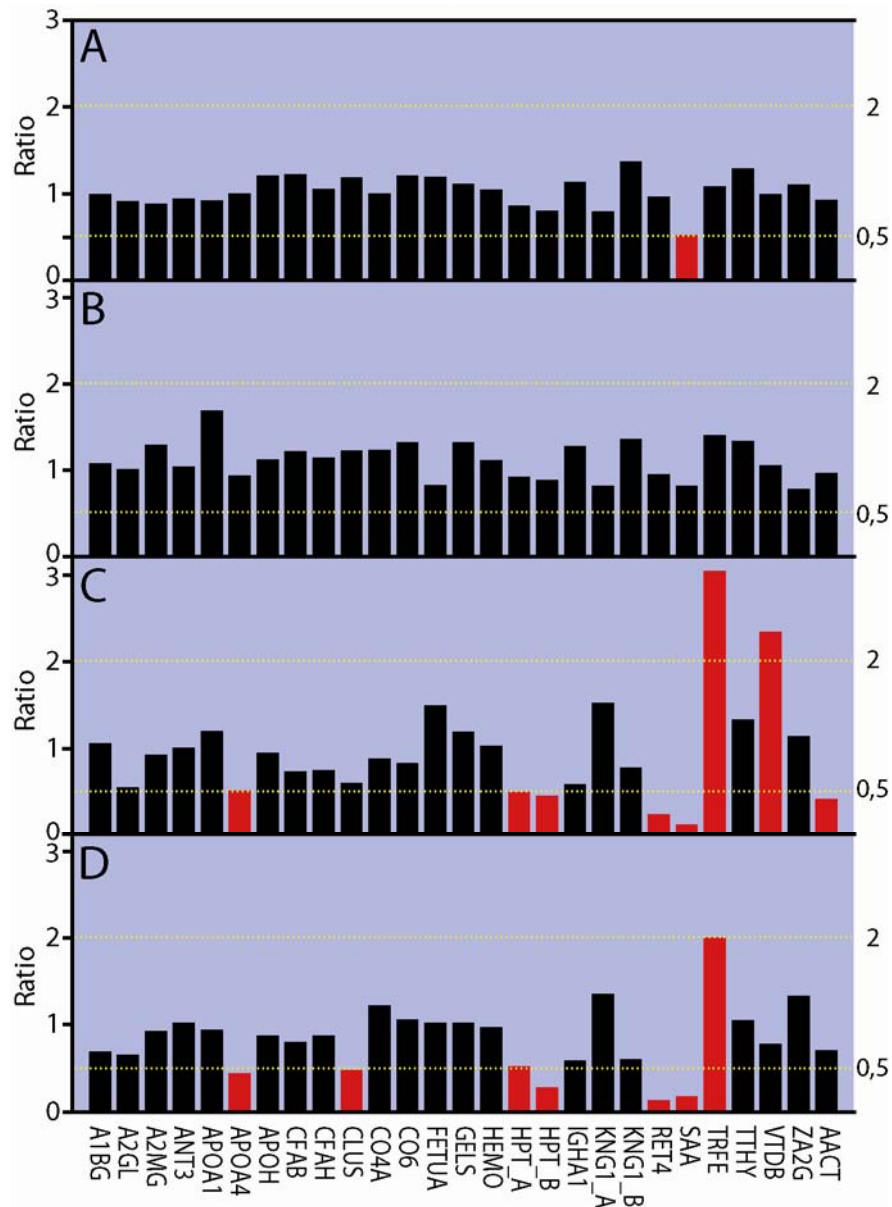
Bei der Patientengruppe RA konnte im Vergleich zu den OA-Patienten und den gesunden Kontrollpersonen keine neuen Spots identifiziert werden. Es wurden jedoch Expressionsunterschiede verschiedener Proteine gemessen, die in den DIGE-Gelen je nach Regulation farblich markiert sind.

Aus diesem Grund wurden die Quantitäten der identifizierten Proteine verglichen. Um sicherstellen zu können, dass die Expressionsunterschiede nicht durch die Depletion resultieren, wurden die DIGE-Experimente neben den Depletaten der Agilent Human 6 zusätzlich mit depletierten Seren der Beckman-Coulter Proteome Lab IgY-12 LC2 durchgeführt. Durch diese Ausweitung konnten quantitative Daten aus den folgenden vier Ansätzen gewonnen werden:

Tabelle 13: Übersicht der unterschiedlichen DIGE-Experimente

Experiment	Vergleich	Depletionssäule
A	RA vs. OA	Agilent Human 6
B	RA vs. OA	BC Proteome Lab IgY12
C	RA vs. Gesund	Agilent Human 6
D	RA vs. Gesund	BC Proteome Lab IgY12

Die identifizierten Proteine und deren Spotzuordnung sind im Anhang unter Abschnitt 10.2.4 (Seite 117) zu finden. Die 78 durchgeführten Proteinidentifizierungen resultierten in 26 unterschiedlichen Proteinen, deren relative Expressionsunterschiede und Abkürzungen in Abbildung 36 dargestellt sind.



Protein ID	Proteinname
A1BG	α_1 -Glykoprotein
A2GL	Leucine-rich α_2 -Glykoprotein
A2MG	α_2 -Makroglobulin
ANT3	Antithrombin-III
APOA1	Apolipoprotein A-I
APOA4	Apolipoprotein A-IV
APOH	β_2 -Glykoprotein 1
CFAB	Complement factor B
CFAH	Complement factor H
CLUS	Clusterin
CO4A	Komplement C4-A
CO6	Komplement C6
FETUA	α_2 -HS-Glykoprotein
GELS	Gelsolin

Protein ID	Proteinname
HEMO	Hemopexin
HPT_A	Haptoglobin HMW
HPT_B	Haptoglobin LMW
IGHA1	Ig alpha-1 chain C region
KNG1_A	Kininogen-1 LMW
KNG1_B	Kininogen-1 HMW
RET4	Retinol-Binding Protein 4
SAA	Serum Amyloid A Protein
TRFE	Serotransferrin
TTHY	Transthyretin
VTDB	Vitamin D-Binding protein
ZA2G	Zinc- α_2 -Glykoprotein
AACT	α_1 -Antichymotrypsin

Abbildung 36 Relative Expressionsunterschiede (Ratio) der 26 untersuchten Proteine der DIGE-Ansätze A-D (vgl. Tabelle 13). Expressionsunterschiede > 2 und $< 0,6$ gelten als signifikant geregelt und sind farbig markiert (Werte: Anhang Abschnitt 10.2.4).

In den Experimenten A und B, die den Vergleich der Pools RA mit OA darstellen, ist nur eine signifikante Regulierung zu erkennen (siehe Abbildung 37). Das Serum Amyloid A Protein ist im Experiment A mit einem relativen Expressionsunterschied von 0,55 beim Pool OA herunterreguliert. Dieser Expressionsunterschied ist in Experiment B nicht signifikant und beträgt 0,79. In den Experimenten C und D ist es hochsignifikant herunterreguliert mit Quotienten von 0,075 und 0,128.

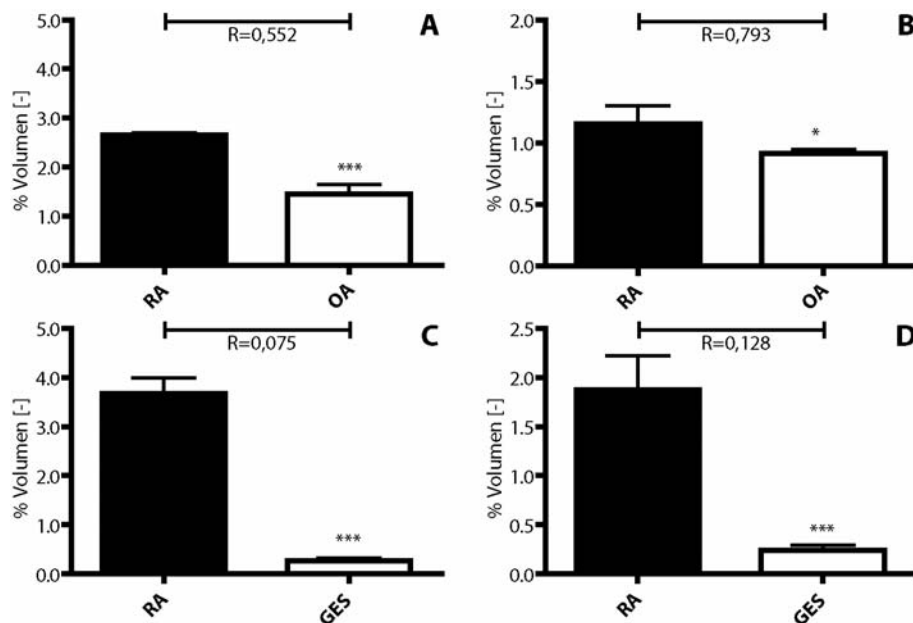


Abbildung 37: Regulationsunterschiede des Serum Amyloid A Proteins (SAA) in den unterschiedlichen DIGE-Experimenten A-D R bezieht sich auf den Quotienten der beiden Mittelwerte und gibt die relativen Expressionsunterschiede an. Ungepaarter t-Test mit folgenden Irrtumswahrscheinlichkeiten: (*) $p = 0,05$ (**) $p = 0,01$ (***) $p = 0,001$.

Beim Experiment C konnten folgende Regulationsunterschiede detektiert werden: Haptoglobin (LMW) ($R = 0,549$), Haptoglobin (HMW) ($R = 0,321$), Apolipoprotein A-IV ($R=0,572$), Retinol Binding Protein 4 ($R=0,191$), Serum Amyloid A Protein ($R=0,075$), α_1 -Antichymotrypsin ($R=0,403$), Serotransferrin ($R=4,367$) und Vitamin D Binding Protein ($R=2,326$).

Das Experiment D zeigte insgesamt sechs Regulationsunterschiede in den folgenden Proteinen: Haptoglobin (LMW) ($R=0,506$), Haptoglobin (HMW) ($R=0,235$), Retinol Binding Protein 4 ($R=0,085$), Apolipoprotein A-IV ($R=0,425$), Serum Amyloid A Protein ($R=0,128$), Clusterin ($R=0,466$) und Serotransferrin ($R=1,951$).

6.3.7 Nachweis von citrullierten Proteinen im humanen Serum

Der Nachweis von citrullierten Proteinen basiert auf den gleichen Bedingungen und Methoden, für die im Abschnitt 6.2.4 die Kontrollen dargestellt sind.

In Abbildung 38 sind die verschiedenen Nachweise aufgeführt, durch die jedoch kein signifikanter Nachweis von citrullierten Proteinen im Serum erbracht werden konnte.

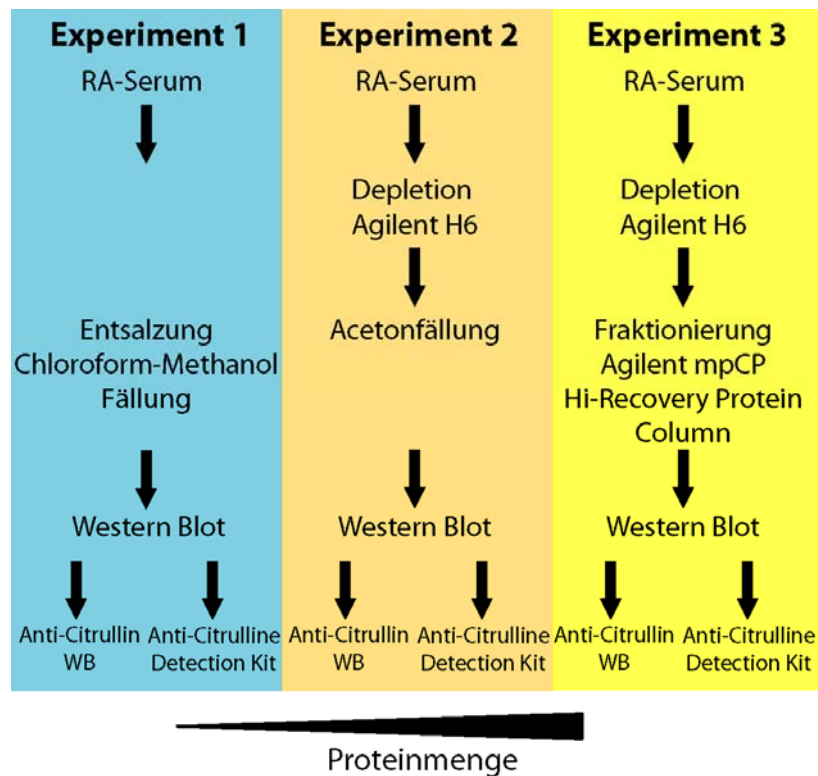


Abbildung 38: Experimentelle Ansätze zur Detektion citrullierter Proteine im humanen Serum.

Im ersten Experiment wurde natives, undepletiertes Serum von unterschiedlichen Patienten der Gruppe RA aufgetragen, die vorher mittels der in Abschnitt 5.2.2.2 beschriebenen Chloroform-Methanol-Fällung entsalzt wurden. Da keine citrullierung Proteine nachgewiesen werden konnten, wurde im zweiten Experiment 40 µg depletiertes Serum (Agilent Human 6 Depletionssäule) aufgetragen und somit die dynamische Verteilung der aufgetragenen Proteine deutlich erhöht. Es konnten auch in diesem zweiten Experiment keine citrullierten Proteine nachgewiesen werden.

Um die dynamische Verteilung der Proteine nochmals zu erhöhen, wurde depletiertes, fraktioniertes Serum aufgetragen. Zum Einsatz kamen hierbei die Fraktionen der Gradientenelutionsmethode (Abschnitt 5.9.4.2). Es wurde jeweils 40 µg Protein pro Fraktion aufgetragen und geblottet. Trotz der drastisch erhöhten relativen Proteinmenge im Vergleich zum ersten Experiment konnten keine citrullierten Proteine nachgewiesen werden.

7 Diskussion

7.1 Ergebnisteil Synoviale Fibroblasten

7.1.1 Methodische Einflüsse auf die Analysen

Synoviale Fibroblasten gehören neben den synovialen Makrophagen zu den zwei Hauptzelltypen des Pannusgewebes. Im gesunden Stadium eines Gelenkes sind die synovialen Fibroblasten an der Kollagen- und Hyaluronsäureproduktion beteiligt und bilden als Zellverband die Verbindungsmembran (*membrana synovialis*) zwischen Bindegewebe und Knochen. Es konnte gezeigt werden, dass neben den einwandernden Zellen des Immunsystems auch die synovialen Fibroblasten selbst eine aktive Rolle in der Gelenkzerstörung einnehmen (Migita *et al.* 2004). Da bisher nicht alle pathologischen Veränderungen dieser Zellen aufgrund der Untersuchungen bekannter Signalkaskaden zu erklären sind, erfolgte in dieser Arbeit eine explorative Analyse des Proteoms dieser Zellen durch 2D-SDS-PAGE.

Die Analysen wurden im Vorfeld durch die Patientenauswahl, die Gewebeentnahme und die anschließenden Bearbeitungsschritte beeinflusst. Es wurde nur Gewebe aus großen Gelenken (Knie, Schulter und Hüfte) gesammelt, da aufgrund der Methodik viel Probe benötigt wurde.

Dies schränkte die Anzahl von möglichen Spendern stark ein. Des Weiteren war die Ausbeute synovialer Fibroblasten je nach Probe sehr unterschiedlich. In den Gelenken von Rheumatikern, die ein sehr fortgeschrittenes Stadium der Krankheit hatten, war nahezu keine Synovia mehr vorhanden. Die Chronifizierung der Krankheit und die damit verbundene langjährige Sekretion von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) haben zu einer starken Verschmälerung bzw. zum vollständigen Verlust der *membrana synovialis* geführt. Viele der Proben führten daher zu einer sehr geringen Zellausbeute und konnten mit dem zur Verfügung stehenden, methodischen Spektrum nicht oder nur unvollständig analysiert werden. Aus diesem Grund konnten die Ergebnisse der 2D-SDS-PAGE bei vier von acht Zelllysaten der RASF durch Western Blots bestätigt werden (Abbildung 21). Bei den fünf Proben der OASF konnte die Validierung durch zwei Lysate erfolgen

Unterschiede der beiden Patientengruppen konnten bereits durch den Verdau der Gewebe festgestellt werden. Nach Verdau der extrazellulären Matrix durch Kollagenase und Dispase zur Freisetzung der Pannuzyten, waren neben den spindelförmigen synovialen Fibroblasten eine Vielzahl runder Monozyten zu erkennen. Die Anteile dieser Zellpopulationen unterschieden sich stark vom Schweregrad der Entzündungsreaktion. Im Fall einer akuten Entzündung war das Gewebe stark durchblutet und wies sehr viele Monozyten auf, die jedoch nicht adhärent wuchsen.

Da nur das Proteom der synovialen Fibroblasten untersucht werden sollte, musste ausgeschlossen werden, dass die Zellpopulationen nicht durch Anteile weiterer Zellen des Immunsystems verunreinigt waren. Zimmermann *et al.* bestimmten 2001 die Anteile der Zellpopulationen nach einem solchen Verdau und Kultivierung bis zur dritten Passage mittels FACS. Sie konnten zeigen, dass die Anteile an CD3⁺ T-Lymphozyten, CD19⁺ B-Lymphozyten, CD38⁺ Plasmazellen, CD56⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten und CD83⁺ Dendritischen Zellen nach der dritten Passage insgesamt nur 3 % der Gesamtzellzahl ausmachen (Zimmermann *et al.* 2001). Die Gefahr der Kontamination der Zellysate durch die Proteinanteile anderer Zellen ist somit als minimal einzustufen und ermöglichte daher eine gezielte proteomische Betrachtung der Fibroblasten.

Neben den synovialen Fibroblasten sind synoviale Makrophagen und deren Einfluss auf die Pathogenese der RA weit reichend diskutiert worden (Simon *et al.* 2001). Synoviale Makrophagen sind durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, oder durch Proliferation von Monozyten an den Entzündungsort gelangt. Makrophagen modulieren den Entzündungsprozess, jedoch scheint ihre Rolle in der Chronifizierung der RA eher untergeordnet zu sein (Simon *et al.* 2001; Bondeson *et al.* 2006; Szekanecz *et al.* 2007).

RASF unterscheiden sich stark von Fibroblasten aus gesunden Gelenken. Dieser aktivierte Phänotyp setzt sich aus Änderungen in Wachstumsverhalten (Nakano *et al.* 2004; Pohlers *et al.* 2006), Apoptoseverhalten (Pap *et al.* 2000; Yamanishi *et al.* 2002) und der Zellmorphologie zusammen. Insbesondere die Sekretion von MMPs (Bradley *et al.* 2004), Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Hoberg *et al.* 2007; Sakuma *et al.* 2007; Aicher *et al.* 2008) unterscheidet die aktivierten RASF von ihren gesunden Vorläufern.

Der aktivierte Phänotyp der RASF ist nicht über eine unbegrenzte Passagenzahl aufrecht zu erhalten. Die Zellen verlieren mit der Zeit ihre rheumatypischen Eigenschaften. Des Weiteren ist mit großen Varianzen des Phänotyps zu rechnen, da es sich bei den Zellpopulationen um Primärzellen handelt, die stark exogen beeinflusst werden können. Aus diesem Grund wurden ausschließlich Zellen nach der dritten Passage untersucht, um möglichst nah an den *in vivo* Verhältnissen zu bleiben.

7.1.2 Diskussion der Expressionsunterschiede von HSPB1 und Destrin in RASF

Die Analyse der synovialen Fibroblasten durch 2D-SDS-PAGE resultierte in Expressionsunterschieden der Proteine Vimentin, β -Actin, Hitzeschockprotein Beta-1 (HSPB1) und Destrin. Der Expressionsunterschied von HSPB1 konnte durch Western Blot nicht bestätigt werden. Dies könnte durch einen Phosphorylierungsunterschied zu erklären sein. Durch die

Phosphorylierung wird der pI des HSPB1 verändert. Dies zeigte sich jedoch nur im 2D-Gel und nicht im Western Blot. Das HSPB1 gehört zur Gruppe der Hitzeschockproteine, die in einer Vielzahl von zellulären Prozessen involviert sind. Unter Stresseinwirkung kann das HSPB1 an mehreren Stellen phosphoryliert werden (Faucher *et al.* 1993; Daub *et al.* 2008). Sur *et al.* konnten 2008 in Keratozyten eine Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in Abhängigkeit der Expression von HSPB1 nachweisen, die die Produktion von IL-8 und PGE(2) reguliert (Sur *et al.* 2008). Auf diese Weise könnte das HSPB1 in inflammatorische Prozesse involviert sein. Dies konnte bisher jedoch noch nicht bei den RASF gezeigt werden.

Eine deutlich verstärkte Expression in der Gruppe der RA-Patienten zeigte Destrin. Hierbei handelt es sich um einen Regulator des Zytoskeletts, der für die Depolymerisation der Actinfilamente zuständig ist (Hawkins *et al.* 1993). Die Bedeutung des Destrins in der RA ist nicht geklärt. Hatanaka *et al.* konnten 1996 eine sehr starke strukturelle Ähnlichkeit von Destrin mit dem ebenfalls Actin-regulierenden Protein Gelsolin feststellen (Hatanaka *et al.* 1996). Osborn *et al.* beschrieben 2008 eine verringerte Konzentration von Gelsolin im Plasma von RA-Patienten (Osborn *et al.* 2008). Somit könnte Destrin neben Gelsolin eine Rolle in der Bindung extrazellulären Actins spielen, das bei Gewebeverletzungen freigesetzt wird und dem eine proinflammatorische Wirkung zugeschrieben wird. (Erukhimov *et al.* 2000; Murphy *et al.* 2003). Ein direkter Zusammenhang mit der RA muss allerdings noch erbracht werden.

7.1.3 Vimentinfragmente als spezifische Gewebemarker der RA

Von den Proteinen, die durch Western Blots untersucht wurden, konnten die Expressionsunterschiede von Vimentin eindeutig mittels Western Blot bestätigt werden. Vergleichbar zur Analyse durch 2D-SDS-PAGE zeigten sich hier RA-spezifische Vimentinfragmente bei 45, 30 und 25 kDa.

Citrulliertes Vimentin wurde 2004 als Epitop des Anti-SA-Autoantikörpers beschrieben (Vossenaar *et al.* 2004), der hochspezifisch für die RA ist (Despres *et al.* 1994; Hayem *et al.* 1999; Hueber *et al.* 1999). Dabei ist die Modifizierung des Vimentins essentiell für die Spezifität (De Rycke *et al.* 2005). Im Folgenden soll erörtert werden, ob es sich bei den Fragmenten um das spezifische SA-Antigen handeln könnte, dessen zelluläre Herkunft bisher nicht geklärt ist.

Abbildung 39 zeigt eine Gegenüberstellung der Western Blot Ergebnisse von Hueber *et al.* und denen dieser Arbeit. Das SA-Antigen wurde von Hueber *et al.* partiell aus Lysaten humaner Plazenta aufgereinigt. Anschließend wurde mit Seren von 25 RA-Patienten ein Immunoblot durchgeführt. In Teil A der Abbildung ist das spezifische Bandenmuster des SA-Antigens dargestellt, während in Teil B der Western Blot der Lysate von RASF und OASF mit Anti-Vimentin abgebildet ist.

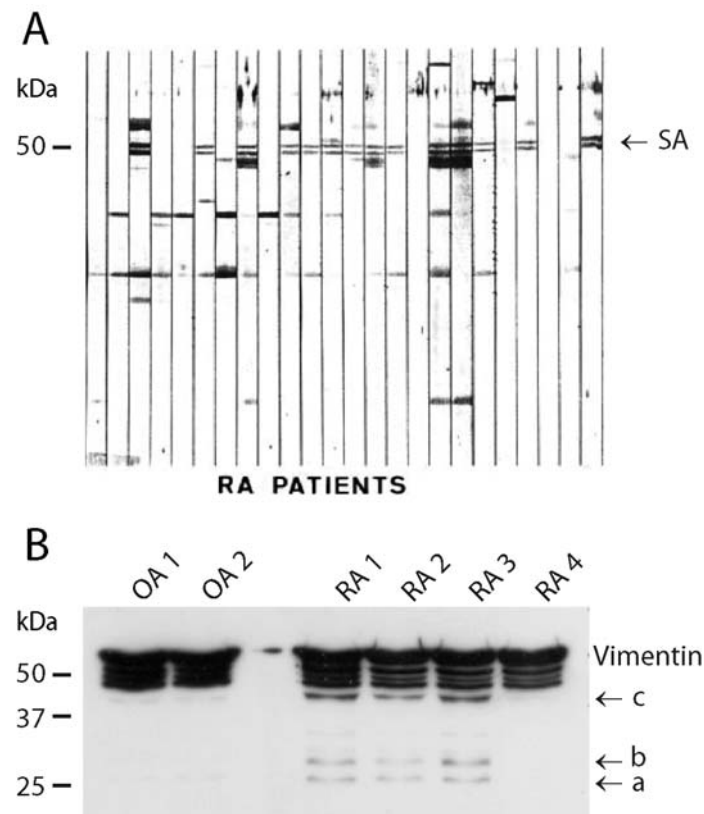


Abbildung 39: Gegenüberstellung des spezifischen Bandenmusters des Anti-SA-Autoantikörpers aus Seren von RA-Patienten (**A**) und der spezifischen Vimentinfragmente der RASF (**B**). Abbildung A zeigt einen Western Blot des aufgereinigten SA-Antigens (Größe ca. 50 kDa) gegen Seren von RA-Patienten. Ausschnitt der Abbildung 1 nach Hueber et al. 1999. Abbildung B zeigt Vimentin Spaltprodukte (a-c) der RASF *in vivo* (vgl. Ergebnisteil synoviale Fibroblasten, Abbildung 21).

Es sind Parallelen zwischen beiden Blots zu erkennen. Das SA-Antigen, das später als citrulliertes Vimentin identifiziert wurde, weist spezifische Banden auf, deren approximative Größe im Bereich der Vimentinfragmente liegen, die auch bei den Lysaten der RASF gefunden wurden.

Trotz der Ähnlichkeiten der Fragmentgrößen gibt es Gründe, die gegen die Ähnlichkeit mit dem SA-Antigen sprechen. Zum einen wurde das in Abbildung A dargestellte Bandenmuster in einem teilweise aufgereinigten Lysat von humaner Milz und Plazenta detektiert. Somit ist die spezifische Fragmentierung von Vimentin nicht nur auf synoviale Zellen begrenzt, sondern scheint auch in anderen Geweben vorzukommen. Zum anderen konnte durch den Anti-Citrullin-Detektionskit kein modifiziertes Vimentin in den Lysaten der RASF nachgewiesen werden.

Die Citrullierung von Vimentin ist demnach nicht nur auf die Synovia begrenzt, sondern erfolgt auch in anderen Geweben. Dies wirft die Frage auf, warum citrulliertes Vimentin keine Autoantigenität in diesen Geweben hervorruft und keine Produktion von ACPA mit sich bringt. Da das SA-Antigen in der Plazenta gefunden wurde, müssten bei Autoantigenität von citrulliertem Vimentin auch schwangere Frauen einen erhöhten ACPA-Spiegel aufweisen. Es

konnten jedoch keine Daten in der Literatur gefunden werden, die diesen Verdacht bestätigen oder widerlegen.

Diese Ergebnisse können allerdings durch die in Abschnitt 7.2 beschriebene Problematik der Detektion citrullierter Proteine beeinflusst worden sein. Der Nachweis von Citrullin in der Aminosäuresequenz von Proteinen ist im Augenblick fast ausschließlich nach vorhergehender Modifizierung über einen Immunoblot möglich. Trotz vielfältiger Bemühungen der Optimierung dieser komplexen Analyseverfahren konnte kein Nachweis für eine Citrullierung erbracht werden. Wenn es sich jedoch um ein methodisches Artefakt handelt, könnten die Vimentinfragmente sehr gut als Gewebemarker für die RA Verwendung finden. Zur Abklärung dieser Frage bedarf es jedoch einer besseren Methode zur Detektion von Citrullin.

7.1.4 Die Bedeutung von Vimentin bei Apoptose der RASF

7.1.4.1 Vimentin als anti-apoptisches Protein

RASF zeichnen sich im Gegensatz zu den OASF durch eine erhöhte Apoptoseresistenz aus (Mountz *et al.* 2001). Neben citrulliertem Vimentin als spezifisches Antigen der RA konnte der Einfluss von unmodifiziertem Vimentin bei der Regulation apoptotischer Prozesse und des Zellzyklus bei RASF nachgewiesen werden. Im Folgenden soll der Einfluss des Vimentins auf die so genannte TRAIL-vermittelte Apoptose (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) diskutiert werden.

Der Einfluss der TRAIL-vermittelten Apoptose konnte bisher in Tumorzelllinien gezeigt werden (Wiley *et al.* 1995). Bei RASF konnte bisher nur eine Abhängigkeit des Rezeptors TRAIL-R2 (auch DR5, *death receptor 5* genannt) nachgewiesen werden, jedoch nicht für den TRAIL-R1 (auch unter DR4 bekannt) (Jungel *et al.* 2006).

Die genaue Regulation der TRAIL-vermittelten Apoptose ist nicht vollständig geklärt. Ein möglicher Regulationsmechanismus besteht in der Expression von p53 (El-Deiry 2001; Wang *et al.* 2003). So beschrieben Guan *et al.* 2001 eine Abhängigkeit der Expression des TRAIL-R1 durch p53 (Guan *et al.* 2001).

Die Expression von intrazellulärem p53-Protein ist durch das Onkoprotein Mdm2 reguliert. Im Fall einer Bindung des Mdm2 wird das p53-Protein ubiquitiniert, wodurch es zu einem schnellen Abbau des p53-Proteins durch das 26S-Proteasom kommt (Daujat *et al.* 2001; Inoue *et al.* 2001). Im Fall einer Akkumulation werden von freiem p53-Protein einerseits DNA-Reparatur-Mechanismen in Gang gesetzt und der Zellzyklus gestoppt, andererseits kann auch Apoptose eingeleitet werden (Efeyan *et al.* 2007). Der genaue Vorgang dieser Regulation ist allerdings bisher ungeklärt.

Neben der Bindung des Mdm2-Proteins kann p53 auch über Bindung mit Vimentin in seiner Verfügbarkeit beeinflusst werden und somit den Zellzyklus und die Apoptose aktiv beeinflus-

sen. Bei Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass p53 und Vimentin miteinander interagieren und dadurch die Resistenz gegenüber Apoptose verstärkt wird (Klotzsche *et al.* 1998). Yang *et al.* konnten durch Immunpräzipitation einen Komplex aus Vimentin und p53 bei RASF nachweisen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei Spaltung des spezifischen p53-Vimentin-Komplexes durch Caspase-4 die Apoptoserate in RASF erhöht werden konnte. Bei Blockierung der spezifischen Caspase-Spaltstelle durch den Einsatz eines mutierten Vimentinkonstruktes hatten die RASF eine deutlich erhöhte Apoptoseresistenz bei Stimulation mit TNF- α (Yang *et al.* 2005).

Pundt *et al.* konnten überdies eine starke Abhängigkeit der TRAIL-vermittelten Apoptose bei RASF zum Zellzyklus feststellen. RASF, die sich in der S- oder G2/M-Phase befanden, wiesen eine deutlich verringerte Apoptoserate bei Stimulation mit TNF- α auf. RASF, die sich in der G0/G1-Phase befanden, zeigten deutlich höhere Apoptoseraten (Pundt *et al.* 2009).

Somit könnte Vimentin ein zentrales Element in der Regulation der Apoptose und des Zellzyklus der RASF darstellen. Es kann durch die Bindung den Abbau von p53 Protein modulieren und somit die TRAIL-vermittelte Apoptose durch das Anhalten des Zellzyklus verlangsamen. Die Zelle befindet sich demnach in einem Zwischenstadium der Apoptose und kann diese nicht beenden (siehe Abbildung 40).

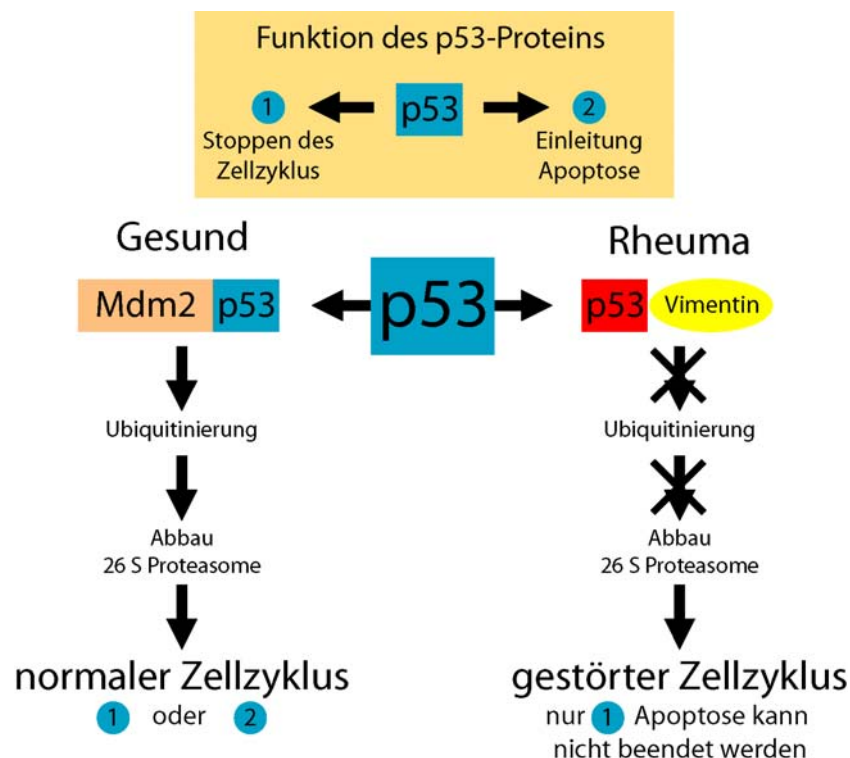


Abbildung 40: Einfluss des p53-Proteins auf die TRAIL-vermittelte Apoptose. Durch die Bildung eines Vimentin-p53-Komplexes kann die Verfügbarkeit von p53 beeinflusst werden. Dies könnte eine Störung des Zellzyklus mit sich bringen und das Apoptoseverhalten modulieren.

Bei den Vimentinfragmenten, die in den Lysaten der RASF identifiziert wurden, könnte es sich um Intermediärprodukte der Caspase-Kaskade handeln, die nicht vollständig prozessiert wurden und in der zellulären Granula aggregieren. Diese Fragmente könnten Mutationen in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen, die die Affinität zum p53 positiv beeinflussen und somit zu einer verstärkten Bildung des Vimentin-p53-Komplex führen. Somit wären die Fragmente unter anderem als Indiz anzusehen, dass die Apoptose in diesen Zellen gestört verläuft.

Es konnte auch auf Seiten des p53-Proteins eine Vielzahl von Mutationen der Aminosäuresequenz bei RA Patienten nachgewiesen werden (Firestein *et al.* 1997; Yamanishi *et al.* 2002). Diese Mutationen waren insbesondere bei Fibroblasten zu detektieren, die sich in Regionen mit hoher erosiver Aktivität befanden. Die Änderung der Aminosäuresequenz könnte auch zu veränderten Bindungsaffinitäten des p53 zu Vimentin führen.

In den nachfolgenden Studien sollten daher zur Validierung dieser These Studien über die durch Mutationen veränderten Bindungsverhältnisse von p53 mit Vimentin durchgeführt werden.

In wie weit jedoch die TRAIL-vermittelte Apoptose bei RASF die Pathogenese der RA an sich beeinflusst, bleibt fragwürdig. Es konnten weitere molekulare Mechanismen identifiziert werden, die an der Apoptoresistenz synovialer Fibroblasten beteiligt sind. Vorrangig zu nennen sind hier die anti-apoptotischen Mediatoren FLIP (*FLICE inhibitory protein*) und Sentrin (SUMO-1). Dabei bewirkt FLIP die Inhibition des intrazellulären Apoptose induzierenden Enzyms Caspase-8 (Kataoka 2005). In RASF konnte durch Inhibierung von FLIP mit antisense Oligonukleotiden eine Verstärkung der Fas-vermittelten Apoptose bewirkt werden (Palao *et al.* 2004). Sentrin modifiziert das Leukämieprotein PML und verhindert somit die Freisetzung von DAXX (*death-associated protein*), was sowohl die Fas- als auch die TNF-induzierte Apoptose inhibiert. Sentrin wurde stark überexprimiert in RASF gefunden (Franz *et al.* 2000).

Die Analyse der Apoptose bei RASF scheint daher ein aussichtsreiches Forschungsgebiet zu sein, das einen bedeutenden Teil zur Aufklärung der Mechanismen der RA beitragen könnte.

7.1.4.2 Vimentin als pro-apoptotisches Protein

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass die detektierten Fragmente des Vimentins die Apoptose fördern. Vimentin wird bei apoptotischen Prozessen durch Caspasen in spezifische Fragmente gespalten. Die Spaltprodukte von Vimentin durch Caspasen *in vitro* und der Vergleich mit den *in vivo* Verhältnissen ist in Abbildung 41 dargestellt.

Durch den Vergleich der ermittelten Fragmente von Byun *et al.* und der Auftragung der Proteinlysate der RASF ergibt sich ein vergleichbares Bandenmuster von Vimentin. Diese

Fragmente sollten daher bei allen Zellen detektierbar sein, bei denen die Caspase-Kaskade im Rahmen apoptotischer Prozesse aktiviert ist. Byun *et al.* konnten zunächst durch *in vitro* Experimente an aufgereinigtem, ^{35}S -gelabeltem Vimentin zeigen, dass unter Einfluss der Caspasen 3, 6 und 8 Vimentin am effektivsten proteolytisch gespalten wurde. Bei den Caspasen 3 und 8 wurde Vimentin vorrangig in die Fragmente II und III gespalten, während die Caspase 6 Vimentin hauptsächlich in die Fragmente IV und V spaltete (Blot A). Diese Fragmente konnten bei der Stimulation von HeLa-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ und Staurosporin (Apoptose induzierendes Alkaloid des Bakteriums *Streptomyces staurosporeus*) in vergleichbarer Form nachgewiesen werden (Blot B). Der Vergleich mit den Spaltprodukten des Vimentins bei den RASF (Blot C) zeigt bei drei von vier Patienten ein ähnliches Muster mit spezifischen Banden bei 25-30 kDa. Es handelt sich bei den Banden höchstwahrscheinlich um Vimentinfragmente, die durch die proteolytische Spaltung durch die Caspasen 3, 6 und 8 entstanden sind.

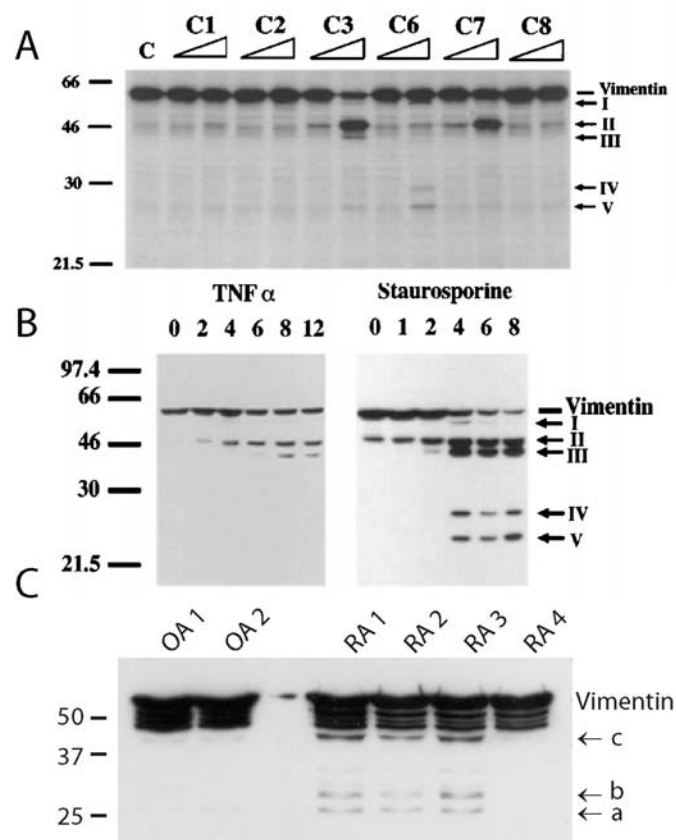


Abbildung 41: Vergleich der spezifischen Vimentin-Spaltprodukte durch Caspasen. **(A)** Spaltprodukte von Vimentin *in vitro* durch die Caspasen 1, 2, 3, 6, 7, 8. Es wurden 2,5 bzw. 25 ng pro Ansatz aufgetragen (radiographische Darstellung durch ^{35}S -gelabeltes humanes Vimentin). Spaltprodukte sind durch die Ziffern I-V bezeichnet. **(B)** Vimentin Spaltprodukte (I-V) *in vivo*. HeLa-Zellen wurden mit 10 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ bzw. 1 μM Staurosporin stimuliert und die Spaltprodukte von Vimentin in verschiedenen Zeitabständen (0, 2, 4, 5, 8, 12 h) mittels Western Blot (anti-Vimentin, SIGMA ALDIRCH, 1:1000) analysiert. **(C)** Vimentin Spaltprodukte der RASF (a-c) *in vivo* (vgl. Ergebnisteil synoviale Fibroblasten, Abbildung 21). Abbildungen **(A)** und **(B)** nach Byun *et al.* „Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis” *Cell Death and Differentiation* (2001) 8, 443 - 450.

Bei den Fragmenten könnte es sich nach Byun *et al.* um ein amino-terminales Spaltprodukt handeln. Dieses wird als *truncated vimentin* bezeichnet und kann keine Intermediärfilamente mehr ausbilden (Hofmann *et al.* 1992). Des Weiteren bildet es granuläre Aggregate in apoptotischen Zellen. Obwohl bisher nicht eindeutig bewiesen, postulieren Byun *et al.* einen pro-apoptotischen Effekt dieses Fragmentes. Da *truncated vimentin* in RASF vorkommt und deren Apoptoserate erhöhen soll, ist diese Aussage konträr zu den Beobachtungen, dass RASF apoptoseresistenter sind als normale, nichtaktivierte synoviale Fibroblasten.

7.2 Detektion citrullierter Proteine

Die Einführung von Citrullin in Proteine wird posttranslational durch so genannte Peptidylarginindeiminasen (PAD) bewerkstelligt. Diese calciumabhängigen Enzyme katalysieren die Umwandlung des positiv geladenen Arginins zum neutralen Citrullin, was zu einer Änderung der Tertiärstruktur, der Nettoladung und der Bindungsverhältnisse der Wasserstoffbrückenbindungen führen kann (Tarcsa *et al.* 1996). Bisher sind fünf Isoformen dieser Enzyme bekannt (PAD1-4, PAD6) und in eine Vielzahl regulatorischer Prozesse der Differenzierung und Entwicklung involviert. PAD1 spielt beispielsweise bei der Keratinisierung der Haut eine Rolle (Ishida-Yamamoto *et al.* 2002), PAD2 bei der Myelinentwicklung (Pritzker *et al.* 1999), PAD3 bei der Entwicklung und Aushärtung der Haarfollikel (Rogers *et al.* 1997) und PAD4 bei der Histondeiminierung (Cuthbert *et al.* 2004). Bisher ist sehr wenig über die Verteilung der Isoformen in unterschiedlichen Geweben und deren potentielle Zielproteine bekannt. Bei der RA konnten aus Synovia Monozyten und Makrophagen gewonnen werden, die vorrangig die Isoformen PAD2 und PAD4 exprimierten (Chang *et al.* 2005). Diese Enzyme stehen bei der RA im Verdacht durch posttranslationale Modifikation von Proteinen für die Produktion von hochspezifischem Autoantikörper (ACPA, Abschnitt 2.3.2, Seite 7) gegen citrullierte Proteine verantwortlich zu sein.

Bei der RA sind viele Proteine in der Synovia und der Synovialflüssigkeit als citrulliert beschrieben und als Autoantigen klassifiziert worden. Masson-Bessiere *et al.* konnten mittels Immunohistochemie die Präsenz von deiminierten α - und β -Ketten von Fibrin in Synovialgewebe nachweisen (Masson-Bessiere *et al.* 2001). Diese Ergebnisse wurden in einer darauf folgenden Studie bestätigt. Jedoch zeigte sich, dass citrulliertes Fibrin keine alleinige Spezifität für RA hat, da man diese Modifizierung auch in Proteinen der Synovia von Osteoarthritis- und Spondylarthropathiepatienten nachweisen konnte (Chapuy-Regaud *et al.* 2005). Ferner wurden Fibronectin (Chang *et al.* 2005; Tabushi *et al.* 2008), Filaggrin (Masson-Bessiere *et al.* 2000), α -Enolase (Kinloch *et al.* 2005), Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA-1) (Pratesi *et al.* 2006), F-actin capping protein α -1 subunit (CapZ α -1), Asporin (Matsuo *et al.* 2006),

Histonproteine (Wang *et al.* 2004) und Vimentin (Tabushi *et al.* 2008) bei der RA als citrulliert beschrieben. Bei all diesen Proteinen handelt es sich um ubiquitär zelluläre Bestandteile.

Citrullierte Proteine nehmen daher bei der RA eine Schlüsselstellung ein, konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit weder im Serum, noch in den Lysaten der synovialen Fibroblasten detektiert werden. Nur anhand eines Kontrollblots mit einer hohen Konzentration von citrulliertem Keratin der Hornhaut konnte überhaupt eine Citrullierung nachgewiesen werden.

Die Detektion von Citrullin erfolgte in zwei verschiedenen Ansätzen. Zunächst wurde versucht, Citrullin in seiner unmodifizierten, nativen Form nachzuweisen. Dabei kam der Anti-Citrullin-Antikörper (Biomol) zum Einsatz. Da sich Citrullin nur marginal von Arginin unterscheidet, ist eine spezifische Erkennung des äußerst kleinen Epitops mit Hilfe von immunologischen Methoden sehr unwahrscheinlich. Vielmehr spielen die angrenzenden Aminosäuren eine weitaus bedeutendere Rolle. Daher könnte sich die Spezifität des zuerst verwendeten Antikörpers auf die Erkennung von Hautkeratinen beschränken und nicht auf eine spezifische Citrullierungsstelle im Protein. Da sich im Serum kein Keratin befindet, waren keine positiven Signale auf den Blots erkennbar.

Die Konzentration von Antikörpern gegen citrullierte Proteine war bei den RA-Patienten sehr hoch. Es wurde daher postuliert, dass sich ein unbekanntes, citrulliertes Antigen im Serum befindet. Aus diesem Grund wurde die Spezifität des ersten Antikörpers angezweifelt und die Ergebnisse durch den Anti-Citrullin-Detektionskit (Biomol) überprüft.

Dieser Kit basiert auf einem veränderten Detektionsmechanismus. Die Ureidogruppe der Citrullinseitenkette kann spezifisch modifiziert werden, was in einem deutlich vergrößerten Epitop resultierte. Senshu *et al.* konnten einen Antikörper gegen das modifizierte Citrullin entwickeln, dessen Spezifität durch enzymatisch deiminierte Histone im Western Blot bewiesen werden konnte (Senshu *et al.* 1992). Es zeigte sich, dass durch diese Modifikation die Detektion von Citrullin in Proteinen deutlich weniger abhängig von den umgebenden Aminosäuren war.

Die Bedingungen, die die Modifizierungsreaktion mit sich bringt, sind jedoch sehr extrem. Es kamen bei der Modifikation sehr starke Säuren in hohen Konzentrationen zum Einsatz. Neben dem starken Proteinverlust von der Membran besteht daher die Gefahr, dass die Proteine modifiziert oder hydrolysiert wurden. Des Weiteren mangelt es der Methode an einer Kontrolle, die zeigt, ob die Modifizierungsreaktion korrekt und vollständig abgelaufen ist. Ferner gibt die Methode keine Auskunft über den Grad der Modifizierung und die spezifischen Modifizierungsstellen.

Jedoch konnten auch nach Modifikation keine citrullierten Proteine in Serum und Lysaten der synovialen Fibroblasten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis konnte durch die Veränderungen in der Proteinbeladung, Verdünnung des Primärantikörpers und der Dauer der Modifizierungsreaktion nicht beeinflusst werden.

Da die beiden verwendeten Detektionsmethoden Schwächen aufweisen, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass tatsächlich keine citrullierten Proteine vorlagen. Für den Fall, dass die Analysen den tatsächlichen *in-vivo* Verhältnissen entsprechen, scheinen sich citrullierte Proteine bei der RA nur lokal auf das Gelenk zu begrenzen. Eine Freisetzung der Proteine in das Blut kann somit nicht bestätigt werden.

Eine erhöhte Aktivität der PAD konnte bisher nur bei den einwandernden Makrophagen und Monozyten nachgewiesen werden, jedoch nicht bei synovialen Fibroblasten (Vossenaar *et al.* 2004; Szekanecz *et al.* 2007). Dies würde erklären, warum in den Lysaten keine citrullierten Proteine nachgewiesen werden konnten.

Die Aktivität der Makrophagen im Rahmen einer Entzündungsreaktion ist jedoch nicht nur bei der RA zu beobachten. Makrygiannakis *et al.* konnten 2006 zeigen, dass citrullierte Proteine auch in anderen, chronisch entzündeten Geweben zu detektieren sind (Makrygiannakis *et al.* 2006).

Zur Klärung, ob es sich bei den vorliegenden Analysen um ein methodisches Artefakt handelt, ist eine genauere Detektionsmethode nötig. Die Massenspektrometrie bietet zur Zeit diverse Möglichkeiten zur Detektion posttranslationaler Modifikationen (Ouvry-Patat *et al.* 2009). Auf Basis der Massenspektrometrie ist die Detektion von Citrullin in Peptiden nur über eine sehr hohe Auflösung möglich, da sich die molekularen Massen von Arginin (MW = 174,20 g mol⁻¹) und Citrullin (MW=175,19 g mol⁻¹) kaum unterscheiden. Ein Masse-schiff von 1 Da kann zudem durch mehrere Modifikationen zu messen sein (Citrullierung, Amidierung, Deaminierung) und ist folglich nicht spezifisch für ein Peptid im PMF. Holm *et al.* zeigten 2006 eine Methode, in der sie die Detektion citrullierter Proteine im Rahmen der Proteinidentifizierung mittels 1D LC ESI-MS/MS erbrachten (Holm *et al.* 2006). Durch die Modifikation entsteht ein optisch aktives Peptid, das im Fall einer in sich tragenden modifizierten Citrullinseitenkette spezifisch bei 464 nm absorbiert. Im Fall eines positiven Signals wäre belegt, dass das Peptid Citrullin enthält. Bisher konnte diese Methode jedoch nicht auf Peptidpools aus tryptischen Verdaus angewendet werden, sondern nur an synthetisch erzeugten Peptiden. Diese Methode stellt dennoch einen Erfolg versprechenden Ansatz zur Detektion citrullierter Proteine dar.

7.3 Ergebnisteil Serumanalytik

7.3.1 Akquirierung der Seren

Die HUPO (*Human Proteome Organisation*) verfasste 2005 (Rai *et al.* 2005) eine Liste von präanalytischen Variablen, um eine Standardisierung in die proteomische Betrachtung von Serum oder Plasma zu bekommen. Generell sollten die Serum- und Plasmaproben aliquotiert werden und die Anzahl der Auf- und Abtauzyklen möglichst gering gehalten werden. Die

Gabe von Proteaseinhibitoren sollte je nach experimentellem Layout abgewogen werden, da beispielsweise Aprotinin mit der Massenspektrometrie interferiert und PMSF und AEBSF an Proteine binden können (Rai *et al.* 2005; Tammen *et al.* 2005; Tammen *et al.* 2005; West-Nielsen *et al.* 2005). Im Vergleich zu Serum enthält Plasma antikoagulatorische Substanzen wie Heparin, EDTA oder Natriumcitrat. Die Zugabe von EDTA resultiert in einem geringeren proteolytischen Abbau *ex vivo* und wird daher für die proteomische Betrachtung präferiert. Allerdings wird dieser Aspekt noch kontrovers diskutiert (Baumann *et al.* 2005). In der klinischen Routineanalytik wird jedoch fast ausschließlich mit Serum gearbeitet, wie auch in der vorliegenden Arbeit.

Durch den proteolytischen Abbau, der durch die fehlende Zugabe von Proteasehemmern, durch die Verwendung von Serum anstelle von Plasma (EDTA) oder durch die unterschiedlichen Standzeiten des Serums bei der Abnahme entstanden ist, können eine Vielzahl von Ergebnissen beeinflusst worden sein. Die in Abschnitt 6.3.5 beschriebene Fraktionierung von depletiertem Serum weist durchweg eine geringe Spotdichte auf. Durch die vielen Bearbeitungsschritte und die langen Standzeiten der einzelnen Fraktionen während und nach der Fraktionierung kann es schon im Vorfeld der Experimente zu einem Verlust von *low abundant* Proteinen durch proteolytischen Abbau gekommen sein. Gleiches gilt auch für die geringe Anzahl unterschiedlich regulierter Proteine bei dem Vergleich der Patientengruppen RA und OA in Abschnitt 6.3.6.

7.3.2 Methodenoptimierung

Wie aus der Auftragung von undepletiertem Serum (Abbildung 23) ersichtlich, ist für die Analyse des Serumproteoms eine Aufarbeitung in Form von Fraktionierung oder Depletion zwingend erforderlich, da wenige Proteine dargestellt werden konnten. Diese Proteine (Albumin, Transferrin, Haptoglobin, Antitrypsin, Apolipoprotein A-1, Antitrypsin) kommen in großen Quantitäten im Serum vor und können aufgrund ihrer Konzentrationsschwankungen im Patientenkollektiv nicht als Biomarker verwendet werden. Wie bereits im Einleitungsteil erwähnt wurde, stellt die Abreicherung der *high abundant* Proteine die zur Zeit aussichtsreichste Technologie für die Biomarkerfindung dar. Es kamen hier zwei MARCs zum Einsatz, die in den Experimenten deutliche Unterschiede in ihren Depletionsleistungen erzielten. Die Agilent Human 6 erwies sich schon bei der Flüssigkeitschromatographie der Beckman Coulter IgY12 LC2 als überlegen, da sie eine deutlich schärfere Trennung aufwies. Dies ist unter anderem auf die hochwertigeren Säulenmaterialien (PEEK bei Agilent, PS bei Beckman Coulter) und das Chromatographiematerial zurückzuführen, das deutlich weniger Proteine bindet. Den Vorteil der Verwendung des IgY-Systems der Beckman Coulter, das in deutlich weniger Kreuzreaktionen resultieren sollte, konnte nicht beobachtet werden. Insbesondere die Abreicherung der IgG ist mit der Proteome Lab IgY12-Säule deutlich schlechter.

Des Weiteren konnte durch die Abreicherung der weiteren Proteine (vgl. Abbildung 26) keine signifikante Verbesserung der Visualisierung der *low abundant* Proteine erreicht werden.

Bei der Probenaufarbeitung durch Fällung des depletierten Serums stellte sich die Acetonfällung als die einfachste und reproduzierbarste Methode mit der größten Spotabdeckung dar.

Die Entsalzung und Aufkonzentrierung mit Hilfe der Chloroform-Methanol-Extraktion nach Wessel *et al.* ist durch ihr geringes Probenvolumen von maximal 100 µl beschränkt. Des Weiteren erweist sich die daher notwendige Ankonzentrierung des Depletats durch Ultrafiltration (Vivaspin-Konzentratoren) als sehr aufwendig. Die Spotabdeckung ist insbesondere im sauren pH-Bereich deutlich schlechter als bei anderen Methoden (z. B. Acetonfällung).

Die Entsalzung durch die Agilent *high recovery protein column* erwies sich als eine apparativ aufwendige Methode, die jedoch in einer guten Spotabdeckung resultierte. Die Beschränkung der Säulenkapazität von 380 µg Protein pro Lauf und die lang andauernde Einengung der Probe im Lyophilisator macht diese Methode für die Analyse durch 2D-SDS-PAGE jedoch nicht sehr attraktiv.

Bei der Probenvorbereitung sind generell Methoden vorzuziehen, die nur wenige Bearbeitungsschritte benötigen und eine gute Proteinausbeute aufweisen. Die Acetonfällung erweist sich daher als die Methode, die vorrangig in dieser Arbeit zum Einsatz kam.

7.3.3 Identifizierungen der Proteine im depletierten Serum und deren Rolle in der Pathogenese der RA

Nach der Depletion mit Hilfe der Agilent Human 6 und anschließender Fällung konnten im Serum durch 2D-SDS-PAGE 103 Proteine nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 10.2.2). Durch die Abreicherung der sechs häufigsten Proteine konnte die Anzahl der visualisierten Proteine drastisch erhöht werden.

Serum hat eine extreme Verteilungscharakteristik der Proteinkonzentrationen. Albumin macht fast 50 % des gesamten Proteingehaltes aus, während einige Zytokine oder andere Botenstoffe nur in Spuren vorkommen. Es soll daher zunächst geklärt werden, ob in dem dargestellten Konzentrationsbereich ein möglicher Biomarker detektierbar ist.

Die Depletion durch eine MARC erwies sich bei der Abreicherung der high abundant Proteine als sehr zuverlässig. In den Depletaten war nahezu kein Albumin mehr zu detektieren. Auch die Abreicherung der Immunglobuline war sehr gut. Die Spotanzahl konnte im Vergleich zum undepletierten Serum deutlich gesteigert werden.

Einige der visualisierten Proteine sind bisher schon als Biomarker für die RA diskutiert. Darunter ist das Gelsolin. Dieses Actin-bindende Protein ist in der Aufrechterhaltung der Zellmorphologie, Beweglichkeit und in apoptotischen Prozessen involviert. Eine extrazelluläre Gelsolin-Isoform kann im Plasma in Konzentrationen von 200-250 mg/l nachgewiesen

werden. Osborn *et al.* konnten 2008 durch ELISA zeigen, dass Plasmakonzentrationen von Gelsolin bei RA-Patienten deutlich herabgesetzt waren (Osborn *et al.* 2008). Devauchelle *et al.* konnten 2004 durch RT-PCR und DNA Micoarrays eine deutliche Verminderung der Expression von Clusterin in Synovialgewebe von RA-Patienten nachweisen (Devauchelle *et al.* 2004). Rossol *et al.* konnten 2005 eine deutlich verringerte Expression von Apolipoprotein A-I bei RA-Patienten nachweisen (Bierther *et al.* 1974; Devauchelle *et al.* 2004; Rossol *et al.* 2005). Das S100A8 Protein wurde von Uchida *et al.* 2002 durch SELDI-TOF sowohl in der Synovialflüssigkeit als auch im Serum als hochreguliert beschrieben.

Diese Proteine konnten auch in dieser Arbeit detektiert werden und bestätigen, dass die Methodik und der dargestellte Konzentrationsbereich zur Auffindung eines Biomarkers herangezogen werden kann. Es konnte aber keine signifikante Regulierung dieser Proteine im Rahmen dieser Arbeit erbracht werden.

Allerdings zeigte dieser proteomische Ansatz auch Schwächen auf. Es konnte nicht auf die Spezifität der Immunglobuline geschlossen werden. Gerade bei Autoimmunkrankheiten wie der RA ist die Präsenz eines Autoantikörpers (Rheumafaktor, Anti-SA, Anti-CCP, Anti-MCV) hochspezifisch für die Krankheit. Aufgrund der Denaturierung der Antikörper durch die Fällung ist keine Klassifizierung und genaue Determination des Paratops mehr möglich.

Eine immunologische Ausrichtung eines proteomischen Ansatzes wäre dennoch in anderer Weise möglich. Durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers oder Antigens an eine Säule wird eine spezifische Immunaффinitätssäule erstellt. Ähnlich zu MARCs, jedoch spezifischer auf die Fragestellung ausgerichtet, kann die Säule selektiv zur Anreicherung der Bindungspartner aus dem Serum oder Plasma benutzt werden. Als Beispiel kann die spezifische Analyse von Glykoproteinen genannt werden, die mit Hilfe von Lektinen spezifisch angereichert werden können (Liu *et al.* 2005; Ramachandran *et al.* 2006). Durch Kombination unterschiedlicher Immunaффinitätssäulen würde die Komplexität des aufzutrennenden Proteingemisches herabgesetzt werden.

7.3.4 Untersuchung des depletierten und fraktionierten Serums

Durch den Einsatz der MARCs konnte eine deutlich bessere Visualisierung der Serumproteine erreicht werden. Die Fraktionierung sollte anschließend eine noch bessere Trennung und Darstellung weiterer *low abundant* Proteine erzielen. Es wurden zur Trennung zwei verschiedene Methoden entwickelt.

Die Auftrennung der Serumproteine konnte durch die Fraktionierung mit der Agilent *high recovery protein column* nicht verbessert werden. Insbesondere die Standardisierung des HPLC-Laufs stellte ein schwerwiegendes Problem dar. Wie aus Abbildung 30 ersichtlich wird, kam es im Rahmen der Gradiententrennung zu massiven Veränderungen der Retentionszeiten. Die Auftrennung mittels Stufengradienten brachte mehr Standardisierung, jedoch

überzeugte die Auftragung der Fraktionen auf 2D-Gele hinsichtlich der Gelqualität und der gebotenen Spotanzahl nicht (vgl. Abbildung 32 und 33). Wie aus Tabelle 12 ersichtlich wird, konnten durch die Fraktionierung keine weiteren Proteine im Vergleich zum depletierten Serum nachgewiesen werden. Des Weiteren waren die meisten Proteine deutlich schlechter fokussiert.

Die Verarbeitung des Serums benötigte eine Vielzahl von weiteren Bearbeitungsschritten. Aufgrund von Adsorption an den Gefäßwandungen und saurer Hydrolyse von Proteinen (pH 2.5, 80 °C) ist es eventuell zu einem hohen Proteinverlust gekommen. Diese methodischen Unzulänglichkeiten belegen, dass die Säule Schwächen im Bereich der semipräparativen Serumfraktionierung hat. Diese liegen vor allem bei der geringen Kapazität von 380 µg Protein pro Lauf und den umständlichen Einengungsschritten. Ihre Eigenschaften als Entsalzungssäule hingegen sind deutlich besser. Spotausbeute und -abdeckung sind nahezu vergleichbar zur Acetonfällung.

Die Fraktionierung wurde daher nicht weiter verfolgt. Es wurde sich auf die Analyse der Seren mittels DIGE konzentriert.

7.3.5 Untersuchungen der DIGE-Gele

Den aussichtsreichsten Ansatz dieser Arbeit zur Analyse des Serumproteoms mittels 2D-SDS-PAGE stellte die DIGE-Technologie dar (*differential in gel eletrophoresis*), da durch sie die Laufunterschiede im Vergleich zur konventionellen 2D-SDS-PAGE minimiert werden konnten.

Plasma, Serum und andere Körperflüssigkeiten haben einen hohen Anteil an modifizierten Proteinen, die in einem sehr komplexen Spotpattern resultieren. Aufgrund der starken Laufunterschiede sind diese Gele nur schwer vergleichbar. Die Quantifizierung ist kaum möglich und resultiert meist in einer geringen Signifikanz und hohen Standardabweichungen. Doch gerade die posttranslationalen Modifizierungen machen diese Methode sehr attraktiv. Änderungen der Proteine durch Glykosylierung, Phosphorylierung, Degradation oder Isoformen durch alternatives Spleißen lassen sich sehr gut darstellen. DIGE schafft daher den Brückenschlag zwischen der Visualisierung posttranslationaler Modifikationen, guter Reproduzierbarkeit und Quantifizierbarkeit. (Minden 2007; Timms *et al.* 2008)

In diesem Projekt konnte durch DIGE beim Vergleich der depletierten Seren der Gruppen RA und OA ein Protein identifiziert werden, bei dem eine signifikante Herunterregulation bei der Gruppe OA zu verzeichnen war (vgl. Abbildung 37). Das Serum Amyloid A Protein (SAA) gehört zur Gruppe der Apolipoproteine und wird zu den Akute-Phase-Proteinen gezählt (O'Brien *et al.* 2006). Im Rahmen einer Entzündungsreaktion wird es von der Leber produziert und sezerniert. Bei kontinuierlicher Ausschüttung dieser Proteine durch Chronifizierung einer entzündlichen Krankheit wie der RA kommt es zu Ablagerungen und Aggregatbildung

in einer Vielzahl von Geweben und Organen (Nakamura 2008). Diese Merkmale werden unter dem Krankheitsbegriff Amyloidose zusammengefasst. Amyloidose kommt bei RA-Patienten sehr häufig vor und kann durch die Gabe eines TNF- α -Antagonisten (Etanercept, Embrel[®]) behandelt werden, da die Ausschüttung von SAA maßgeblich durch TNF- α und IL-1 reguliert wird (Nakamura *et al.* 2007; Nakamura 2008; Pettersson *et al.* 2008).

SAA scheint darüber hinaus selbst in die Pathogenese der RA einzugreifen. Koga *et al.* konnten zeigen, dass SAA die IL-6-Produktion bei RASF induziert (Koga *et al.* 2008). Okamoto *et al.* bestätigten diese Beobachtung und konnten eine Stimulierung des NF κ B-Signalwegs durch Bindung des SAA an den Rezeptor für *advanced glycation end products* (RAGE) feststellen (Okamoto *et al.* 2008). Durch Stimulation mit rekombinantem SAA konnte in RASF die Produktion von MMPs induziert werden (Migita *et al.* 1998; O'Hara *et al.* 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SAA aktiv von RASF produziert wird (Kumon *et al.* 1999; O'Hara *et al.* 2000; Vallon *et al.* 2001) und dass die Expression in starker Abhängigkeit vom IL-18 steht (Tanaka *et al.* 2004). Durch die Expression und Ausschüttung von SAA konnten Mullan *et al.* belegen, dass SAA die Produktion von VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) und ICAM-1 (*intercellular adhesion factor molecule 1*) induziert. Dies führt zur Gefäßbildung im Pannusgewebe und trägt zur Infiltration von Immunzellen bei (Mullan *et al.* 2006).

All diese Arbeiten belegen, dass dem SAA in der RA eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird. Es ist jedoch fraglich, in wie weit diese Interaktionen ausschließlich auf die RA bezogen werden können und ob daher SAA als spezifischer Biomarker der RA anzusehen ist. SAA als Akute-Phase-Protein unterliegt generell einer massiven Regulation während Entzündungsreaktionen. Somit ist SAA auch während der akuten Entzündungsphase bei anderen, degenerativen Formen des Gelenkrheumas messbar. De Seny *et al.* konnten auf Basis der SELDI-Technologie keine messbaren Unterschiede des Serum-SAA-Spiegels bei Patienten mit RA, Psoriasis-Arthritis und Spondylitis ankylosans nachweisen (de Seny *et al.* 2008). Kokubun *et al.* verwiesen auf große Schwankungen der SAA-Konzentration bei RA-Patienten und schlugen die Normierung des SAA-Wertes mit CRP vor (Kokubun *et al.* 2005).

Neben der RA ist SAA bei diversen Krebsarten durch Proteomanalysen als serologischer Marker beschrieben worden. Beim Lungenkarzinom konnte auf Basis von Antikörper-Mikroassays (Gao *et al.* 2005) und MALDI-TOF (Howard *et al.* 2003) SAA als Marker identifiziert werden, beim Prostatakarzinom auf Basis von SELDI-TOF (Le *et al.* 2005), beim Ovarkarzinom auf Basis von SELDI-TOF (Moshkovskii *et al.* 2005), beim Pankreaskarzinom auf Basis von SELDI- und MALDI-TOF (Koomen *et al.* 2005; Yokoi *et al.* 2005). und beim Nierenzellkarzinom durch SELDI-TOF (Rossi *et al.* 2006). Des Weiteren konnte mittels SELDI-TOF eine Korrelation vom SAA-Spiegel und der Metastasierung bei Hirntumoren hergestellt werden (Combaret *et al.* 2005). Beim Magenkarzinom konnte im Serum von

Mäusen, die mit Krebszellen infiziert wurden, mittels 2D-SDS-PAGE im Serum erhöhte SAA-Werte nachgewiesen werden (Juan *et al.* 2004).

SAA wird zur Zeit in den unterschiedlichsten medizinischen Fachgebieten als serologischer Marker diskutiert. Der Einfluss des SAA auf die Pathologie der unterschiedlichen Krankheiten ist in jedem Fachgebiet hinreichend belegt und diskutiert. Somit stellt SAA ein Protein dar, das man bei erhöhtem Spiegel als Indiz für eine krankhafte Veränderung ansehen kann. Jedoch scheint SAA zu unspezifisch, um es als Frühdiagnosemarker für die RA einzusetzen. Dennoch können deutlich erhöhte SAA-Spiegel in Kombination mit den restlichen rheumasppezifischen Parametern zur Sicherung einer Diagnose helfen.

Zur Validierung der Methodik und Ergebnisse wurden in den DIGE-Ansätzen C und D (siehe Tabelle 13) das Serum der RA-Patienten mit Serum gesunder Kontrollpatienten verglichen. Dabei erwiesen sich die Spiegel von Tranferrin bei gesunden Patienten als deutlich erhöht, während die Spiegel des Serum Amyloid A Proteins, Haptoglobins und Apolipoproteins A4 deutlich erniedrigt waren. Diese Ergebnisse entsprechen den erwarteten Regulationsunterschieden im Rahmen einer chronischen Entzündungsreaktion (Ritchie *et al.* 1999; Ritchie *et al.* 2000) und können somit als Bestätigung der Methodik angesehen werden.

8 Zusammenfassung

Auf Basis der Proteomanalyse wurden in dieser Arbeit zwei Ansätze verfolgt, um einen Biomarker für die Früherkennung der rheumatoiden Arthritis zu finden.

Im ersten Ansatz wurden die pathologisch veränderten, aktivierten synovialen Fibroblasten (RASf) mit den nichtaktivierten Fibroblasten von Arthrosepatienten (OASF) verglichen und unterschiedlich exprimierte Proteine identifiziert. Da die Citrullierung von Proteinen sehr spezifisch für die RA ist, wurden die Lysate der RASf und OASF auf diese Modifikation untersucht, um nähere Informationen über dessen zellulären Ursprung zu erhalten.

Durch 2D-SDS-PAGE konnten unterschiedliche Expressionsmuster des Intermediärfilament-Proteins Vimentin detektiert und mittels Western Blot bestätigt werden. Diese spezifischen Proteinfragmente wurden ausschließlich in den Zelllysaten der RASf detektiert.

Es wird zur Zeit ein Autoantikörper gegen mutiertes, citrulliertes Vimentin als diagnostischer Früherkennungsmarker diskutiert. Daher wurde zunächst erörtert, ob es sich bei den Fragmenten des Vimentins um das spezifische Antigen handelt, das von diesem Autoantikörper erkannt wird. Es konnten jedoch keine citrullierten Proteine in den Lysaten der RASf nachgewiesen werden. Daher konnte kein Beleg dafür gefunden werden, dass der zelluläre Ursprung des Antigens in den RASf zu finden ist.

Neben der Aufrechterhaltung der Zellmorphologie hat Vimentin Einfluss auf eine Vielzahl anderer zellulärer Prozesse. Dabei wurde auf die Interaktion mit dem p53-Protein fokussiert und erörtert, welchen Einfluss dies auf die erhöhte Apoptoseresistenz der RASf gegenüber den OASF hatte.

Im zweiten Ansatz erfolgte eine Proteomanalyse humanen Serums. In depletierten Seren von RA-Patienten konnte durch DIGE eine erhöhte Konzentration des Serum Amyloid A Proteins (SAA) nachgewiesen werden. Dabei war der Expressionsunterschied nur nach Depletion mit der Agilent Human 6 Depletionssäule statistisch signifikant.

Das SAA-Protein zeigt bei der Pathogenese der RA zahlreiche Interaktionen. Es reguliert unter anderem die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Matrix-Metalloproteasen (MMPs), fördert die Angiogenese und stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen, die zur Infiltration des Gewebes durch die Zellen des Immunsystems beitragen.

Dennoch wird eine Erhöhung der SAA-Konzentration im Serum bei einer Vielzahl anderer entzündlicher Krankheiten und bei mehreren Karzinomen beobachtet. Die Erhöhung der SAA-Konzentration im Serum bei RA-Patienten ist wahrscheinlich auf die deutlich längere Persistenz der Krankheit im Vergleich zur Osteoarthritis zurück zu führen.

Im Serum konnten des Weiteren keine citrullierten Proteine nachgewiesen werden. Das spezifische Antigen, das die Produktion der ACPA zur Folge hat, ist demnach nicht im Serum zu finden.

9 Literaturverzeichnis

- Aebersold, R. and M. Mann (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." Nature **422**(6928): 198-207.
- Agrawal, S., R. Misra, et al. (2007). "Autoantibodies in rheumatoid arthritis: association with severity of disease in established RA." Clin Rheumatol **26**(2): 201-4.
- Ahmed, N., G. Barker, et al. (2003). "An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum." Proteomics **3**(10): 1980-7.
- Aicher, W. K., T. Pap, et al. (2008). "[Laminin-dependent inflammatory response in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients]." Z Rheumatol **67**(1): 59-61.
- America, A. H. and J. H. Cordewener (2008). "Comparative LC-MS: a landscape of peaks and valleys." Proteomics **8**(4): 731-49.
- Anderson, L. (2005). "Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease." J Physiol **563**(Pt 1): 23-60.
- Anderson, N. L. and N. G. Anderson (2002). "The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects." Mol Cell Proteomics **1**(11): 845-67.
- Arnett, F. C., S. M. Edworthy, et al. (1988). "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **31**(3): 315-24.
- Baggerman, G., E. Vierstraete, et al. (2005). "Gel-based versus gel-free proteomics: a review." Comb Chem High Throughput Screen **8**(8): 669-77.
- Baumann, S., U. Ceglarek, et al. (2005). "Standardized approach to proteome profiling of human serum based on magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." Clin Chem **51**(6): 973-80.
- Becker, S., L. H. Cazares, et al. (2004). "Surfactant-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) differentiation of serum protein profiles of BRCA-1 and sporadic breast cancer." Ann Surg Oncol **11**(10): 907-14.
- Bennett, J. C. (1973). "The role and character of immunoglobulins in rheumatoid inflammation." Fed Proc **32**(2): 138-42.
- Berndt, P., U. Hohohm, et al. (1999). "Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints." Electrophoresis **20**(18): 3521-6.
- Bernhard, J. u. V., P. M. (2001). "Rheumatoide Arthritis: Pathogenese und Pathologie." Schweiz Med Forum **8**: 179-183.
- Berth, M., F. M. Moser, et al. (2007). "The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images." Appl Microbiol Biotechnol **76**(6): 1223-43.
- Bierther, M. and R. Wagner (1974). "[Electron microscope studies of the pannus in rheumatoid arthritis]." Z Rheumatol **33**(1): 32-42.
- Bjorhall, K., T. Miliotis, et al. (2005). "Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples." Proteomics **5**(1): 307-17.
- Bondeson, J., S. D. Wainwright, et al. (2006). "The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis." Arthritis Res Ther **8**(6): R187.
- Bonneville, M., E. Scotet, et al. (1998). "Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis." Rev Rhum Engl Ed **65**(6): 365-8.
- Boschetti, E. and P. Giorgio Righetti (2008). "Hexapeptide combinatorial ligand libraries: the march for the detection of the low-abundance proteome continues." Biotechniques **44**(5): 663-5.
- Boschetti, E., L. Lomas, et al. (2007). "Romancing the "hidden proteome", Anno Domini two zero zero seven." J Chromatogr A **1153**(1-2): 277-90.
- Boschetti, E. and P. G. Righetti (2008). "The ProteoMiner in the proteomic arena: a non-depleting tool for discovering low-abundance species." J Proteomics **71**(3): 255-64.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Bradley, K., J. C. Scatizzi, et al. (2004). "Retinoblastoma suppression of matrix metalloproteinase 1, but not interleukin-6, through a p38-dependent pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts." Arthritis Rheum **50**(1): 78-87.
- Burrage, P. S., K. S. Mix, et al. (2006). "Matrix metalloproteinases: role in arthritis." Front Biosci **11**: 529-43.
- Cantaert, T., L. De Rycke, et al. (2006). "Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: crucial...but not sufficient!" Arthritis Rheum **54**(11): 3381-9.
- Castagna, A., D. Cecconi, et al. (2005). "Exploring the hidden human urinary proteome via ligand library beads." J Proteome Res **4**(6): 1917-30.
- Chang, X., R. Yamada, et al. (2005). "Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue." Rheumatology (Oxford) **44**(11): 1374-82.
- Chang, X., R. Yamada, et al. (2005). "Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) **44**(1): 40-50.
- Chapuy-Regaud, S., M. Sebbag, et al. (2005). "Fibrin deimination in synovial tissue is not specific for rheumatoid arthritis but commonly occurs during synovitides." J Immunol **174**(8): 5057-64.
- Chen, G., T. G. Gharib, et al. (2003). "Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13537-42.
- Cho, S. Y., E. Y. Lee, et al. (2005). "Efficient prefractionation of low-abundance proteins in human plasma and construction of a two-dimensional map." Proteomics **5**(13): 3386-96.
- Combaret, V., C. Bergeron, et al. (2005). "Protein chip array profiling analysis of sera from neuroblastoma patients." Cancer Lett **228**(1-2): 91-6.
- Cuthbert, G. L., S. Daujat, et al. (2004). "Histone deimination antagonizes arginine methylation." Cell **118**(5): 545-53.
- Daub, H., J. V. Olsen, et al. (2008). "Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle." Mol Cell **31**(3): 438-48.
- Daujat, S., H. Neel, et al. (2001). "MDM2: life without p53." Trends Genet **17**(8): 459-64.
- De Rycke, L., A. P. Nicholas, et al. (2005). "Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity." Arthritis Rheum **52**(8): 2323-30.
- de Seny, D., M. Fillet, et al. (2008). "Monomeric calgranulins measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis." Clin Chem **54**(6): 1066-75.
- Depper, J. M. and N. J. Zvaifler (1981). "Epstein-Barr virus. Its relationship to the pathogenesis of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **24**(6): 755-61.
- Despres, N., G. Boire, et al. (1994). "The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis." J Rheumatol **21**(6): 1027-33.
- Devauchelle, V., S. Marion, et al. (2004). "DNA microarray allows molecular profiling of rheumatoid arthritis and identification of pathophysiological targets." Genes Immun **5**(8): 597-608.
- Dihazi, H., G. A. Muller, et al. (2007). "Characterization of diabetic nephropathy by urinary proteomic analysis: identification of a processed ubiquitin form as a differentially excreted protein in diabetic nephropathy patients." Clin Chem **53**(9): 1636-45.
- Doyle, A., J. B. Griffiths, et al. (1996). "Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures."
- Echan, L. A., H. Y. Tang, et al. (2005). "Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma." Proteomics **5**(13): 3292-303.
- Efeyan, A. and M. Serrano (2007). "p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes." Cell Cycle **6**(9): 1006-10.

- El-Deiry, W. S. (2001). "Insights into cancer therapeutic design based on p53 and TRAIL receptor signaling." Cell Death Differ **8**(11): 1066-75.
- Eravci, M., S. Fuxius, et al. (2007). "Improved comparative proteome analysis based on two-dimensional gel electrophoresis." Proteomics **7**(4): 513-23.
- Erukhimov, J. A., Z. L. Tang, et al. (2000). "Actin-containing sera from patients with adult respiratory distress syndrome are toxic to sheep pulmonary endothelial cells." Am J Respir Crit Care Med **162**(1): 288-94.
- Faucher, C., J. Capdevielle, et al. (1993). "The 28-kDa protein whose phosphorylation is induced by protein kinase C activators in MCF-7 cells belongs to the family of low molecular mass heat shock proteins and is the estrogen-regulated 24-kDa protein." J Biol Chem **268**(20): 15168-73.
- Fernandes, J. C., J. Martel-Pelletier, et al. (2002). "The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology." Biorheology **39**(1-2): 237-46.
- Fernandez-Suarez, A., S. Reneses, et al. (2005). "Efficacy of three ELISA measurements of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in the early diagnosis of rheumatoid arthritis." Clin Chem Lab Med **43**(11): 1234-9.
- Firestein, G. S., F. Echeverri, et al. (1997). "Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10895-900.
- Fox, R. I., M. Lotz, et al. (1985). "Epstein-Barr virus in rheumatoid arthritis." Clin Rheum Dis **11**(3): 665-88.
- Franz, J. K., T. Pap, et al. (2000). "Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(3): 599-607.
- Fu, Q., C. P. Garnham, et al. (2005). "A robust, streamlined, and reproducible method for proteomic analysis of serum by delipidation, albumin and IgG depletion, and two-dimensional gel electrophoresis." Proteomics **5**(10): 2656-64.
- Gao, W. M., R. Kuick, et al. (2005). "Distinctive serum protein profiles involving abundant proteins in lung cancer patients based upon antibody microarray analysis." BMC Cancer **5**: 110.
- Georgiou, H. M., G. E. Rice, et al. (2001). "Proteomic analysis of human plasma: failure of centrifugal ultrafiltration to remove albumin and other high molecular weight proteins." Proteomics **1**(12): 1503-6.
- Girbal-Neuhauser, E., J. J. Durieux, et al. (1999). "The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues." J Immunol **162**(1): 585-94.
- Gonzalez-Gay, M. A., C. Garcia-Porrúa, et al. (2002). "Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis." Semin Arthritis Rheum **31**(6): 355-60.
- Graham, D. R., C. P. Garnham, et al. (2005). "Improvements in two-dimensional gel electrophoresis by utilizing a low cost "in-house" neutral pH sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis system." Proteomics **5**(9): 2309-14.
- Greenough, C., R. E. Jenkins, et al. (2004). "A method for the rapid depletion of albumin and immunoglobulin from human plasma." Proteomics **4**(10): 3107-11.
- Guan, B., P. Yue, et al. (2001). "Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene." J Cell Physiol **188**(1): 98-105.
- Gultekin, H. and K. H. Heermann (1988). "The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix." Anal Biochem **172**(2): 320-9.
- Gundry, R. L., Q. Fu, et al. (2007). "Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome." J Proteomics – Clinical Applications **1**: 73-88.
- Hajiroussou, V. J., J. Skingle, et al. (1985). "Significance of antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis." J Rheumatol **12**(1): 57-9.
- Hatanaka, H., K. Ogura, et al. (1996). "Tertiary structure of destrin and structural similarity between two actin-regulating protein families." Cell **85**(7): 1047-55.
- Hawkins, M., B. Pope, et al. (1993). "Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments." Biochemistry **32**(38): 9985-93.

- Hayem, G., P. Chazerain, et al. (1999). "Anti-Sa antibody is an accurate diagnostic and prognostic marker in adult rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* **26**(1): 7-13.
- Hellman, U., C. Wernstedt, et al. (1995). "Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing." *Anal Biochem* **224**(1): 451-5.
- Hijmans, W., H. R. Schuit, et al. (1964). "Comparative Study for the Detection of Antinuclear Factors with the Fluorescent Antibody Technique." *Ann Rheum Dis* **23**: 73-7.
- Hillenkamp, F. and M. Karas (1990). "Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization." *Methods Enzymol* **193**: 280-95.
- Hinerfeld, D., D. Innamorati, et al. (2004). "Serum/Plasma depletion with chicken immunoglobulin Y antibodies for proteomic analysis from multiple Mammalian species." *J Biomol Tech* **15**(3): 184-90.
- Hoberg, M., M. Rudert, et al. (2007). "Attachment to laminin-111 facilitates transforming growth factor beta-induced expression of matrix metalloproteinase-3 in synovial fibroblasts." *Ann Rheum Dis* **66**(4): 446-51.
- Hofmann, I. and H. Herrmann (1992). "Interference in vimentin assembly in vitro by synthetic peptides derived from the vimentin head domain." *J Cell Sci* **101 (Pt 3)**: 687-700.
- Holm, A., F. Rise, et al. (2006). "Specific modification of peptide-bound citrulline residues." *Anal Biochem* **352**(1): 68-76.
- Horn, A., S. Kreuzsch, et al. (2006). "Multidimensional proteomics of human serum using parallel chromatography of native constituents and microplate technology." *Proteomics* **6**(2): 559-70.
- Howard, B. A., M. Z. Wang, et al. (2003). "Identification and validation of a potential lung cancer serum biomarker detected by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight spectra analysis." *Proteomics* **3**(9): 1720-4.
- Huang, L. and X. Fang (2008). "Immunoaffinity fractionation of plasma proteins by chicken IgY antibodies." *Methods Mol Biol* **425**: 41-51.
- Hueber, W., W. Hassfeld, et al. (1999). "Sensitivity and specificity of anti-Sa autoantibodies for rheumatoid arthritis." *Rheumatology (Oxford)* **38**(2): 155-9.
- Inoue, T., R. K. Geyer, et al. (2001). "MDM2 can promote the ubiquitination, nuclear export, and degradation of p53 in the absence of direct binding." *J Biol Chem* **276**(48): 45255-60.
- Ishida-Yamamoto, A., T. Senshu, et al. (2002). "Sequential reorganization of cornified cell keratin filaments involving filaggrin-mediated compaction and keratin 1 deimination." *J Invest Dermatol* **118**(2): 282-7.
- Juan, H. F., J. H. Chen, et al. (2004). "Identification of tumor-associated plasma biomarkers using proteomic techniques: from mouse to human." *Proteomics* **4**(9): 2766-75.
- Jungel, A., V. Baresova, et al. (2006). "Trichostatin A sensitises rheumatoid arthritis synovial fibroblasts for TRAIL-induced apoptosis." *Ann Rheum Dis* **65**(7): 910-2.
- Kataoka, T. (2005). "The caspase-8 modulator c-FLIP." *Crit Rev Immunol* **25**(1): 31-58.
- Keskin, G., A. Inal, et al. (2008). "Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-modified citrullinated vimentin antibodies in rheumatoid arthritis." *Protein Pept Lett* **15**(3): 314-7.
- Khani-Hanjani, A., D. Lacaille, et al. (2002). "Expression of QK/QR/RRRAA or DERAA motifs at the third hypervariable region of HLA-DRB1 and disease severity in rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* **29**(7): 1358-65.
- Kinloch, A., V. Tatzler, et al. (2005). "Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* **7**(6): R1421-9.
- Kleveland, G., T. Egeland, et al. (1988). "Quantitation of rheumatoid factors (RF) of IgM, IgA and IgG isotypes by a simple and sensitive ELISA. Discrimination between false and true IgG-RF." *Scand J Rheumatol Suppl* **75**: 15-24.
- Klotzsche, O., D. Etzrodt, et al. (1998). "Cytoplasmic retention of mutant tsp53 is dependent on an intermediate filament protein (vimentin) scaffold." *Oncogene* **16**(26): 3423-34.
- Koga, T., T. Torigoshi, et al. (2008). "Serum amyloid A-induced IL-6 production by rheumatoid synoviocytes." *FEBS Lett* **582**(5): 579-85.

- Kokubun, M., Y. Imafuku, et al. (2005). "Serum amyloid A (SAA) concentration varies among rheumatoid arthritis patients estimated by SAA/CRP ratio." Clin Chim Acta **360**(1-2): 97-102.
- Koomen, J. M., L. N. Shih, et al. (2005). "Plasma protein profiling for diagnosis of pancreatic cancer reveals the presence of host response proteins." Clin Cancer Res **11**(3): 1110-8.
- Kumon, Y., T. Suehiro, et al. (1999). "Local expression of acute phase serum amyloid A mRNA in rheumatoid arthritis synovial tissue and cells." J Rheumatol **26**(4): 785-90.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Le, L., K. Chi, et al. (2005). "Identification of serum amyloid A as a biomarker to distinguish prostate cancer patients with bone lesions." Clin Chem **51**(4): 695-707.
- Liu, T., W. J. Qian, et al. (2005). "Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry." J Proteome Res **4**(6): 2070-80.
- Luhn, S., M. Berth, et al. (2003). "Using standard positions and image fusion to create proteome maps from collections of two-dimensional gel electrophoresis images." Proteomics **3**(7): 1117-27.
- Makrygiannakis, D., E. af Klint, et al. (2006). "Citruination is an inflammation-dependent process." Ann Rheum Dis **65**(9): 1219-22.
- Martosella, J., N. Zolotarjova, et al. (2005). "Reversed-phase high-performance liquid chromatographic prefractionation of immunodepleted human serum proteins to enhance mass spectrometry identification of lower-abundant proteins." J Proteome Res **4**(5): 1522-37.
- Masson-Bessiere, C., M. Sebbag, et al. (2000). "In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum." Clin Exp Immunol **119**(3): 544-52.
- Masson-Bessiere, C., M. Sebbag, et al. (2001). "The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin." J Immunol **166**(6): 4177-84.
- Mathsson, L., M. Mullazehi, et al. (2008). "Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides." Arthritis Rheum **58**(1): 36-45.
- Matsuo, K., Y. Xiang, et al. (2006). "Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach." Arthritis Res Ther **8**(6): R175.
- Mertens, M. and J. A. Singh (2009). "Anakinra for rheumatoid arthritis." Cochrane Database Syst Rev(1): CD005121.
- Migita, K., Y. Kawabe, et al. (1998). "Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts." Lab Invest **78**(5): 535-9.
- Migita, K., T. Miyashita, et al. (2004). "Suppressive effect of leflunomide metabolite (A77 1726) on metalloproteinase production in IL-1beta stimulated rheumatoid synovial fibroblasts." Clin Exp Immunol **137**(3): 612-6.
- Minden, J. (2007). "Comparative proteomics and difference gel electrophoresis." Biotechniques **43**(6): 739, 741, 743 passim.
- Moshkovskii, S. A., M. V. Serebryakova, et al. (2005). "Ovarian cancer marker of 11.7 kDa detected by proteomics is a serum amyloid A1." Proteomics **5**(14): 3790-7.
- Mountz, J. D. and H. G. Zhang (2001). "Regulation of apoptosis of synovial fibroblasts." Curr Dir Autoimmun **3**: 216-39.
- Mullan, R. H., B. Bresnihan, et al. (2006). "Acute-phase serum amyloid A stimulation of angiogenesis, leukocyte recruitment, and matrix degradation in rheumatoid arthritis through an NF-kappaB-dependent signal transduction pathway." Arthritis Rheum **54**(1): 105-14.
- Muller-Ladner, U., R. E. Gay, et al. (2000). "Activation of synoviocytes." Curr Opin Rheumatol **12**(3): 186-94.

- Murphy, J. T. and S. Duffy (2003). "ZO-1 redistribution and F-actin stress fiber formation in pulmonary endothelial cells after thermal injury." *J Trauma* **54**(1): 81-9; discussion 89-90.
- Nakamura, T. (2008). "Clinical strategies for amyloid A amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis." *Mod Rheumatol* **18**(2): 109-18.
- Nakamura, T., S. Higashi, et al. (2007). "Efficacy of etanercept in patients with AA amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol* **25**(4): 518-22.
- Nakano, K., Y. Okada, et al. (2004). "Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts." *Arthritis Rheum* **50**(8): 2450-8.
- Negishi, A., M. Ono, et al. (2008). "Large-scale quantitative clinical proteomics by label-free liquid chromatography and mass spectrometry." *Cancer Sci*.
- Newsome, G. (2002). "Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 update." *J Am Acad Nurse Pract* **14**(10): 432-7.
- Nienhuis, R. L. and E. Mandema (1964). "A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor." *Ann Rheum Dis* **23**: 302-5.
- Nogueira, L., M. Sebbag, et al. (2001). "Performance of two ELISAs for antifilaggrin autoantibodies, using either affinity purified or deiminated recombinant human filaggrin, in the diagnosis of rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* **60**(9): 882-7.
- O'Brien, K. D. and A. Chait (2006). "Serum amyloid A: the "other" inflammatory protein." *Curr Atheroscler Rep* **8**(1): 62-8.
- O'Hara, R., E. P. Murphy, et al. (2000). "Acute-phase serum amyloid A production by rheumatoid arthritis synovial tissue." *Arthritis Res* **2**(2): 142-4.
- O'Hara, R., E. P. Murphy, et al. (2004). "Local expression of the serum amyloid A and formyl peptide receptor-like 1 genes in synovial tissue is associated with matrix metalloproteinase production in patients with inflammatory arthritis." *Arthritis Rheum* **50**(6): 1788-99.
- Ohya, N., T. Honda, et al. (1983). "Advanced coded-aperture imaging system for nuclear medicine." *Appl Opt* **22**(22): 3555.
- Okamoto, H., Y. Katagiri, et al. (2008). "Serum amyloid A activates nuclear factor-kappaB in rheumatoid synovial fibroblasts through binding to receptor of advanced glycation end-products." *J Rheumatol* **35**(5): 752-6.
- Ordeig, J. and J. Guardia (1984). "Diagnostic value of antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* **11**(5): 602-4.
- Osborn, T. M., M. Verdrengh, et al. (2008). "Decreased levels of the gelsolin plasma isoform in patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* **10**(5): R117.
- Ospelt, C. and S. Gay (2008). "The role of resident synovial cells in destructive arthritis." *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**(2): 239-52.
- Ouvry-Patat, S. A., M. P. Torres, et al. (2009). "Top-down proteomics on a high-field Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer." *Methods Mol Biol* **492**: 215-31.
- Palao, G., B. Santiago, et al. (2004). "Down-regulation of FLIP sensitizes rheumatoid synovial fibroblasts to Fas-mediated apoptosis." *Arthritis Rheum* **50**(9): 2803-10.
- Pap, T., J. K. Franz, et al. (2000). "Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of Expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction." *Arthritis Res* **2**(1): 59-64.
- Pappin, D. J., P. Hojrup, et al. (1993). "Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting." *Curr Biol* **3**(6): 327-32.
- Pettersson, T., Y. T. Kontinen, et al. (2008). "Treatment strategies for amyloid A amyloidosis." *Expert Opin Pharmacother* **9**(12): 2117-28.
- Pieper, R., C. L. Gatlin, et al. (2003). "The human serum proteome: display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins." *Proteomics* **3**(7): 1345-64.
- Pieper, R., Q. Su, et al. (2003). "Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: an innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome." *Proteomics* **3**(4): 422-32.

- Pohlers, D., R. Huber, et al. (2006). "Expression of platelet-derived growth factors C and D in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis." Arthritis Rheum **54**(3): 788-94.
- Pratesi, F., C. Tommasi, et al. (2006). "Deiminated Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is a target of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **54**(3): 733-41.
- Pritzker, L. B., T. A. Nguyen, et al. (1999). "The developmental expression and activity of peptidylarginine deiminase in the mouse." Neurosci Lett **266**(3): 161-4.
- Pundt, N., M. A. Peters, et al. (2009). "Susceptibility of RASF to FasL- and TRAIL- induced apoptosis is cell cycle dependent." Arthritis Res Ther **11**(1): R16.
- Rai, A. J., C. A. Gelfand, et al. (2005). "HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples." Proteomics **5**(13): 3262-77.
- Ramachandran, P., P. Boonthueung, et al. (2006). "Identification of N-linked glycoproteins in human saliva by glycoprotein capture and mass spectrometry." J Proteome Res **5**(6): 1493-503.
- Rantapaa-Dahlqvist, S., B. A. de Jong, et al. (2003). "Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **48**(10): 2741-9.
- Righetti, P. G. and E. Boschetti (2008). "The ProteoMiner and the FortyNiners: searching for gold nuggets in the proteomic arena." Mass Spectrom Rev **27**(6): 596-608.
- Ritchie, R. F., G. E. Palomaki, et al. (1999). "Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort." J Clin Lab Anal **13**(6): 273-9.
- Ritchie, R. F., G. E. Palomaki, et al. (2000). "Reference distributions for the positive acute phase serum proteins, alpha1-acid glycoprotein (orosomucoid), alpha1-antitrypsin, and haptoglobin: a practical, simple, and clinically relevant approach in a large cohort." J Clin Lab Anal **14**(6): 284-92.
- Rogers, G., B. Winter, et al. (1997). "Peptidylarginine deiminase of the hair follicle: characterization, localization, and function in keratinizing tissues." J Invest Dermatol **108**(5): 700-7.
- Rose, H. M., C. Ragan, et al. (1948). "Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis." Proc Soc Exp Biol Med **68**(1): 1-6.
- Rosenfeld, J., J. Capdevielle, et al. (1992). "In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis." Anal Biochem **203**(1): 173-9.
- Rossi, L., B. M. Martin, et al. (2006). "Inflammatory protein profile during systemic high dose interleukin-2 administration." Proteomics **6**(2): 709-20.
- Rossol, M., H. Hantzschel, et al. (2005). "[T cell-dependent monocyte activation, TNFalpha and apolipoprotein A-I in autoimmunity and inflammation]." Z Rheumatol **64**(4): 249-54.
- Roudier, J. (2006). "HLA-DRB1 genes and extraarticular rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **8**(1): 103.
- Rui, Z., J. Jian-Guo, et al. (2003). "Use of serological proteomic methods to find biomarkers associated with breast cancer." Proteomics **3**(4): 433-9.
- Sakuma, M., K. Hatsushika, et al. (2007). "TGF-beta type I receptor kinase inhibitor down-regulates rheumatoid synoviocytes and prevents the arthritis induced by type II collagen antibody." Int Immunol **19**(2): 117-26.
- Schellekens, G. A., B. A. de Jong, et al. (1998). "Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies." J Clin Invest **101**(1): 273-81.
- Schellekens, G. A., H. Visser, et al. (2000). "The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide." Arthritis Rheum **43**(1): 155-63.
- Scott, D. L., J. P. Delamere, et al. (1981). "Significance of laminar antikeratin antibodies to rat oesophagus in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **40**(3): 267-71.

- Sebbag, M., M. Simon, et al. (1995). "The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies." J Clin Invest **95**(6): 2672-9.
- Senshu, T., T. Sato, et al. (1992). "Detection of citrulline residues in deiminated proteins on polyvinylidene difluoride membrane." Anal Biochem **203**(1): 94-100.
- Serdaroglu, M., H. Cakirbay, et al. (2008). "The association of anti-CCP antibodies with disease activity in rheumatoid arthritis." Rheumatol Int **28**(10): 965-70.
- Sghiri, R., E. Bouajina, et al. (2008). "Value of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in diagnosing rheumatoid arthritis." Rheumatol Int **29**(1): 59-62.
- Shmerling, R. H. and T. L. Delbanco (1991). "The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility." Am J Med **91**(5): 528-34.
- Shores, K. S., D. G. Udugamasooriya, et al. (2008). "Use of peptide analogue diversity library beads for increased depth of proteomic analysis: application to cerebrospinal fluid." J Proteome Res **7**(5): 1922-31.
- Silvestris, F., J. S. Goodwin, et al. (1985). "IgM, IgA and IgG rheumatoid factors in patients with rheumatoid arthritis and normal donors." Clin Rheumatol **4**(4): 392-8.
- Simon, J., R. Surber, et al. (2001). "Systemic macrophage activation in locally-induced experimental arthritis." J Autoimmun **17**(2): 127-36.
- Sondag-Tschroots, I. R., C. Aaij, et al. (1979). "The antiperinuclear factor. 1. The diagnostic significance of the antiperinuclear factor for rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **38**(3): 248-51.
- States, D. J., G. S. Omenn, et al. (2006). "Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study." Nat Biotechnol **24**(3): 333-8.
- Steel, L. F., D. Shumpert, et al. (2003). "A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma." Proteomics **3**(5): 601-9.
- Sur, R., P. A. Lyte, et al. (2008). "Hsp27 regulates pro-inflammatory mediator release in keratinocytes by modulating NF-kappaB signaling." J Invest Dermatol **128**(5): 1116-22.
- Szekanecz, Z. and A. E. Koch (2007). "Macrophages and their products in rheumatoid arthritis." Curr Opin Rheumatol **19**(3): 289-95.
- Tabushi, Y., T. Nakanishi, et al. (2008). "Detection of citrullinated proteins in synovial fluids derived from patients with rheumatoid arthritis by proteomics-based analysis." Ann Clin Biochem **45**(Pt 4): 413-7.
- Tammen, H., I. Schulte, et al. (2005). "Peptidomic analysis of human blood specimens: comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display." Proteomics **5**(13): 3414-22.
- Tammen, H., I. Schulte, et al. (2005). "Prerequisites for peptidomic analysis of blood samples: I. Evaluation of blood specimen qualities and determination of technical performance characteristics." Comb Chem High Throughput Screen **8**(8): 725-33.
- Tanaka, F., K. Migita, et al. (2004). "Interleukin-18 induces serum amyloid A (SAA) protein production from rheumatoid synovial fibroblasts." Life Sci **74**(13): 1671-9.
- Tarcsa, E., L. N. Marekov, et al. (1996). "Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin." J Biol Chem **271**(48): 30709-16.
- Teitsson, I. (1988). "IgA rheumatoid factor as predictor of disease activity." Scand J Rheumatol Suppl **75**: 233-7.
- Thulasiraman, V., S. Lin, et al. (2005). "Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands." Electrophoresis **26**(18): 3561-71.
- Timms, J. F. and R. Cramer (2008). "Difference gel electrophoresis." Proteomics **8**(23-24): 4886-97.
- Torrigiani, G. and I. M. Roitt (1967). "Antiglobulin factors in sera from patients with rheumatoid arthritis and normal subjects. Quantitative estimation in different immunoglobulin classes." Ann Rheum Dis **26**(4): 334-40.

- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Vallon, R., F. Freuler, et al. (2001). "Serum amyloid A (apoSAA) expression is up-regulated in rheumatoid arthritis and induces transcription of matrix metalloproteinases." J Immunol **166**(4): 2801-7.
- van Gaalen, F. A., H. Visser, et al. (2005). "A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides (CCP1 and CCP2) autoantibody tests for rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **64**(10): 1510-2.
- Veenstra, T. D., T. P. Conrads, et al. (2005). "Biomarkers: mining the biofluid proteome." Mol Cell Proteomics **4**(4): 409-18.
- Vencovsky, J., S. Machacek, et al. (2003). "Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **62**(5): 427-30.
- Vincent, C., L. Nogueira, et al. (2002). "Detection of antibodies to deiminated recombinant rat filaggrin by enzyme-linked immunosorbent assay: a highly effective test for the diagnosis of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **46**(8): 2051-8.
- Vossenaar, E. R., N. Despres, et al. (2004). "Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin." Arthritis Res Ther **6**(2): R142-50.
- Vossenaar, E. R., T. R. Radstake, et al. (2004). "Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages." Ann Rheum Dis **63**(4): 373-81.
- Waalder, E. (2007). "On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939." Apmis **115**(5): 422-38; discussion 439.
- Wang, S. and W. S. El-Deiry (2003). "Requirement of p53 targets in chemosensitization of colonic carcinoma to death ligand therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 15095-100.
- Wang, Y., J. Wysocka, et al. (2004). "Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation." Science **306**(5694): 279-83.
- Wessel, D. and U. I. Flugge (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." Anal Biochem **138**(1): 141-3.
- West-Nielsen, M., E. V. Hogdall, et al. (2005). "Sample handling for mass spectrometric proteomic investigations of human sera." Anal Chem **77**(16): 5114-23.
- Westermeier, R. (2004). "Isoelectric focusing." Methods Mol Biol **244**: 225-32.
- Westermeier, R., W. Postel, et al. (1983). "High-resolution two-dimensional electrophoresis with isoelectric focusing in immobilized pH gradients." J Biochem Biophys Methods **8**(4): 321-30.
- Westermeier, R. and B. Scheibe (2008). "Difference gel electrophoresis based on lys/cys tagging." Methods Mol Biol **424**: 73-85.
- Wiley, S. R., K. Schooley, et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." Immunity **3**(6): 673-82.
- Yamanishi, Y., D. L. Boyle, et al. (2002). "Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 10025-30.
- Yang, X., J. Wang, et al. (2005). "Cleavage of p53-vimentin complex enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts." Am J Pathol **167**(3): 705-19.
- Yates, J. R., 3rd (2004). "Mass spectral analysis in proteomics." Annu Rev Biophys Biomol Struct **33**: 297-316.
- Yokoi, K., L. C. Shih, et al. (2005). "Serum amyloid A as a tumor marker in sera of nude mice with orthotopic human pancreatic cancer and in plasma of patients with pancreatic cancer." Int J Oncol **27**(5): 1361-9.
- Youinou, P. and G. Serre (1995). "The antiperinuclear factor and antikeratin antibody systems." Int Arch Allergy Immunol **107**(4): 508-18.
- Zimmermann, T., E. Kunisch, et al. (2001). "Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture--primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells." Arthritis Res **3**(1): 72-6.

10 Anhang

10.1 Synoviale Fibroblasten

10.1.1 2D-SDS-PAGE Patientengruppe OA

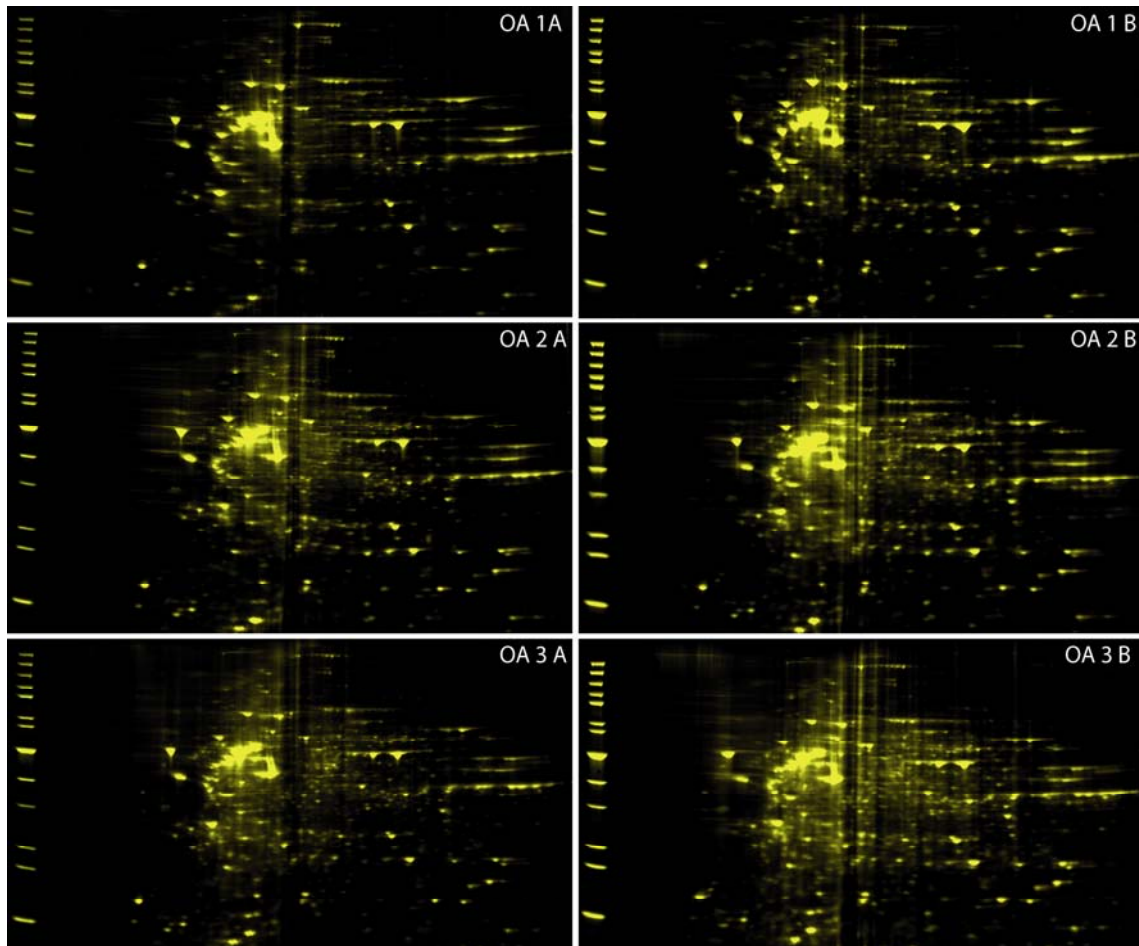


Abbildung 42: Übersicht aller 2D-SDS-PAGE Gele der Patientengruppe OA. 150 µg Protein wurden auf einen IPG-Streifen (BIORAD) aufgetragen und fokussiert. Die Auftrennung nach Größe erfolgte auf einem Criterion® 12 % Bis-Tris Neutralgel (BIORAD). Als Marker wurde der Page Ruler™ (FERMENTAS) verwendet. Die Färbung der Proteine erfolgte über Flamingo® (Biorad).

10.1.2 2D-SDS-PAGE Patientengruppe RA

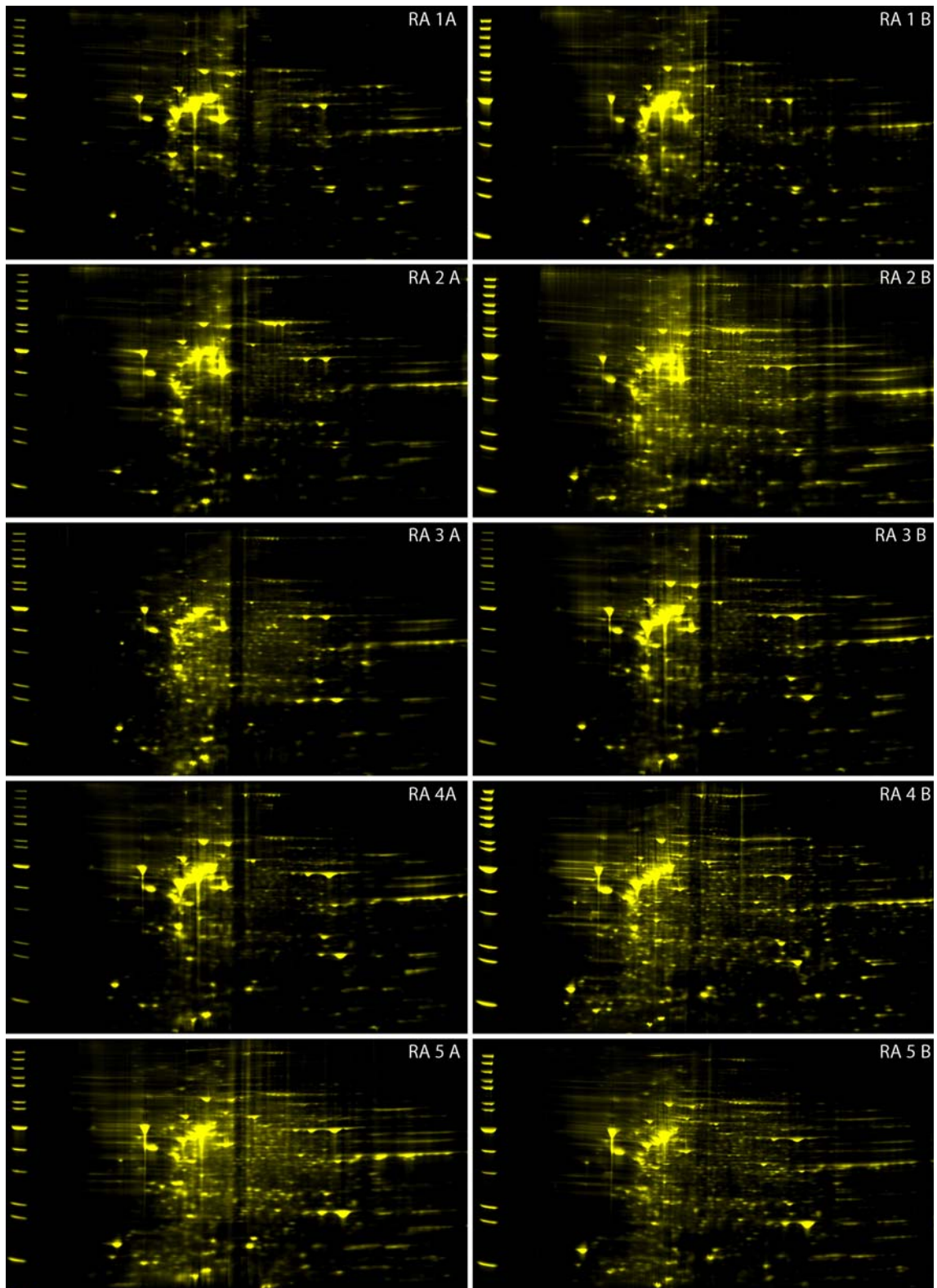


Abbildung 43: Übersicht aller 2D-SDS-PAGE Gele der Patientengruppe OA. 150 µg Protein wurden auf einen IPG-Streifen (BIORAD) aufgetragen und fokussiert. Die Auftrennung nach Größe erfolgte auf einem Criterion® 12 % Bis-Tris Neutralgel (BIORAD). Als Marker wurde der Page Ruler™ (FERMENTAS) verwendet. Die Färbung der Proteine erfolgte über Flamingo® (Biorad).

10.1.3 Identifizierungen von Proteinen der Lysate von synovialen Fibroblasten

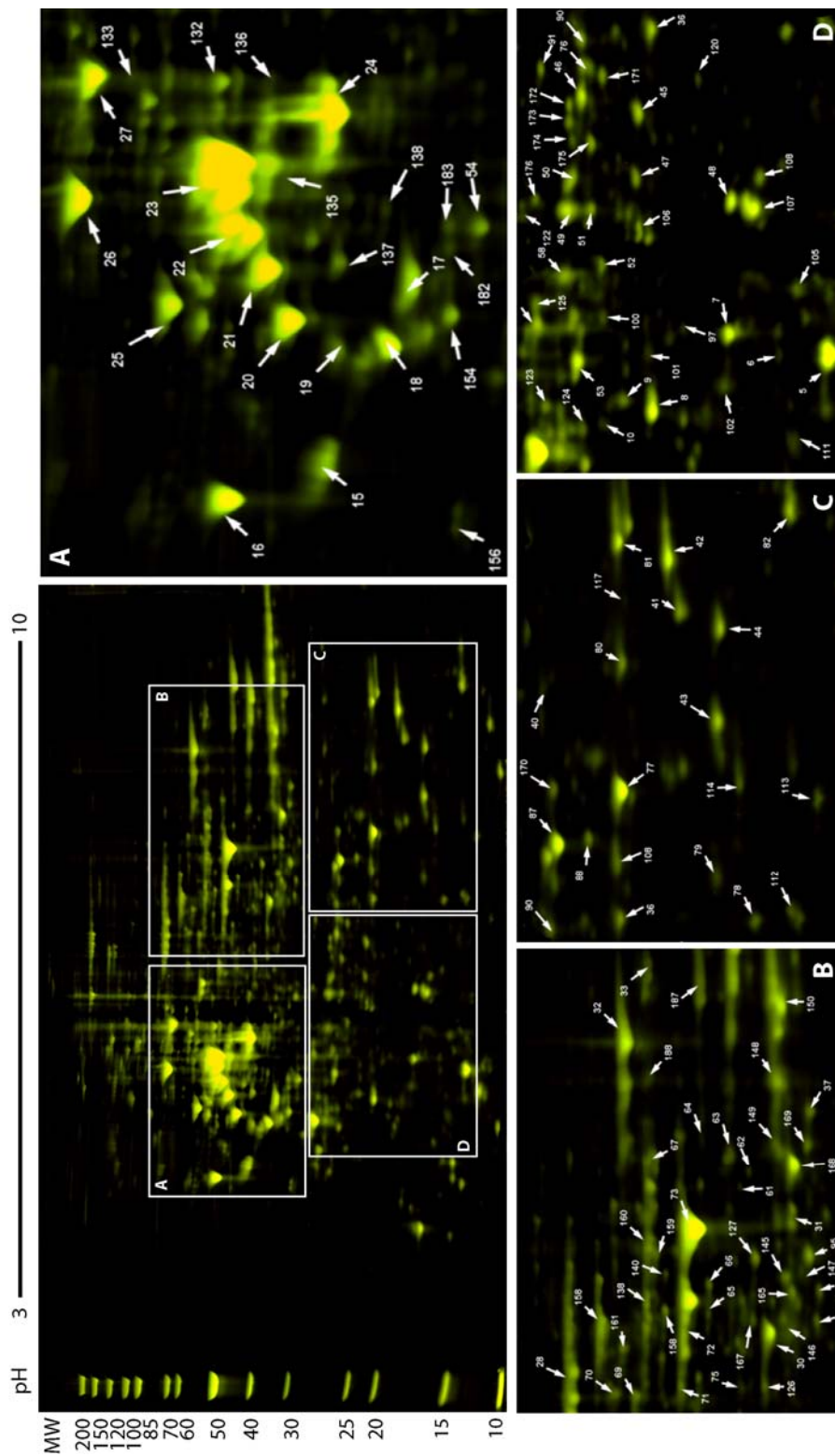


Abbildung 44. Identifizierungen der Proteine in den Lysaten synovialer Fibroblasten. 150 µg Protein wurden auf einen IPG-Streifen (BIORAD) aufgetragen und fokussiert. Die Auftrennung nach Größe erfolgte auf einem Criterion® 12 % Bis-Tris Neutralgel (BIORAD). Als Marker wurde der Page Ruler™ (FERMENTAS) verwendet. Die Färbung der Proteine erfolgte über Flamingo® (Biorad).

Identifizierungen Tabelle 2

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI	MOWSE [I]	SC [%]
41	B4DYA6_HUMAN	desitin isoform a	18950	8,06	140	78
42	FKB1A_HUMAN	peptidylprolyl isomerase A	18229	7,68	183	85
43	FKB1A_HUMAN	peptidylprolyl isomerase A	18229	7,68	176	85
44	FKB1A_HUMAN	peptidylprolyl isomerase A	18229	7,68	274	89
45	PARK7_HUMAN	Dj-1	20063	6,33	104	66
46	TPIS_HUMAN	triosephosphate isomerase 1	26938	6,45	188	70
47	PARK7_HUMAN	Parkinson disease protein 7	20050	6,33	100	67
48	SODC_HUMAN	Cu-Zn Superoxide Dismutase Mutant	16664	5,87	128	69
49	CATD_HUMAN	Cathepsin D	26511	5,14	158	72
50	ERP29_HUMAN	endoplasmic reticulum protein 29 isoform 1	29032	6,77	92	41
51	PRDX2_HUMAN	thioredoxin peroxidase	30749	5,86	111	60
52	ACTG_HUMAN	ACTG1 protein	29678	5,50	152	51
53	GDIR1_HUMAN	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	23250	5,02	126	58
54	ANXA5_HUMAN	annexin 5	35971	4,94	199	73
55	CAZA2_HUMAN	F-actin capping protein beta subunit	30952	5,69	153	57
56	TBB8_HUMAN	tubulin, beta 8	50257	4,79	54	15
57	CLIC1_HUMAN	chloride intracellular channel	27248	5,09	86	41
58	CATD_HUMAN	Cathepsin D	26511	5,14	86	56
61	PRST0_HUMAN	proteasome subunit p42	444418	7,1	184	62
62	EF1A3_HUMAN	translation elongation factor 1 alpha-like 3	50495	9,15	98	29
63	ENOA_HUMAN	enolase 1	39720	8,39	96	46
64	ENOA_HUMAN	enolase 1	47481	7,01	155	48
65	IDHC_HUMAN	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	46915	6,53	172	60
66	ENOA_HUMAN	enolase	47481	7,01	178	65
67	UGDH_HUMAN	UDP-glucose dehydrogenase	55674	6,73	340	57
68	TCPOQ_HUMAN	chaperonin containing TCP1, subunit 2	57794	6,01	247	63
69	KPYM_HUMAN	Pyruvate Kinase (Pkm2)	60277	8,22	186	8
70	K2C5_HUMAN	keratin 1	666170	8,15	242	50
71	ENOA_HUMAN	enolase 1	47481	7,01	282	70
72	ENOA_HUMAN	enolase 1	47481	7,01	221	66
73	ENOA_HUMAN	enolase 1	47481	7,01	241	68
75	KPYM_HUMAN	Pyruvate Kinase (Pkm2)	60277	8,22	137	52
76	PRDX6_HUMAN	peroxiredoxin 6	25133	6,00	236	85
77	SODM_HUMAN	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	22304	6,86	160	62
78	CS010_HUMAN	R33729_1	11383	7,03	79	52
79	FKB1A_HUMAN	peptidylprolyl isomerase A	18229	7,68	129	74
80	PEBP1_HUMAN	neuropolyptide h3	16068	8,81	112	79
81	PRDX1_HUMAN	peroxiredoxin 1	22324	8,27	135	53
82	PROF1_HUMAN	profilin 1	15216	8,44	154	74
85	LEG3_HUMAN	galectin 3	26193	8,57	127	42
86	G3P_HUMAN	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	17463	8,82	99	69
87	TPIS_HUMAN	triosephosphate isomerase 1	26938	6,45	259	79
88	PSA2_HUMAN	proteasome alpha 2 subunit	25996	6,92	80	67
90	TPIS_HUMAN	triosephosphate isomerase 1	26938	6,45	184	73
91	PSA2_HUMAN	proteasome alpha 1 subunit isoform 2	29822	6,15	84	42

Identifizierungen Tabelle 1

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI	MOWSE [I]	SC [%]
1	CALM_HUMAN	CALM3 protein	16610	4,33	66	31
2	RLA2_HUMAN	ribosomal protein P2	11658	4,42	86	81
3	MYL6_HUMAN	MYL6 protein	15923	4,6	142	67
4	THIO_HUMAN	thioredoxin	12015	4,82	111	94
5	LEG1_HUMAN	beta-galactoside-binding lectin precursor	15048	5,34	130	66
6	Q1KLZ0_HUMAN	hCG15971, isoform CRA_b	13907	5,24	118	63
7	IF5A1_HUMAN	Eukaryotic Translation Initiation Factor Eif5a	15368	5,8	176	84
8	TCTP_HUMAN	tumor protein, translationally-controlled 1	19697	4,84	126	68
9	HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	22826	5,98	91	44
9	HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	22826	5,98	76	37
9	HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	22826	5,98	91	51
10	VIME_HUMAN	vimentin	53676	5,06	170	50
11	TPM4_HUMAN	tropomyosin 4	28619	4,67	150	52
12	TPM4_HUMAN	tropomyosin 4	28619	4,67	100	64
13	TPM4_HUMAN	tropomyosin 4	28619	4,67	202	78
14	TCEA1_HUMAN	translation elongation factor 1 beta 2	24919	4,5	190	49
15	B3KPG9_HUMAN	calumenin, isoform CRA_c	38141	4,47	163	58
16	CALR_HUMAN	calreticulin precursor variant	47061	4,30	251	53
17	NPM_HUMAN	nucleophosmin	32611	4,67	96	50
18	VIME_HUMAN	vimentin	53676	5,06	182	55
19	VIME_HUMAN	vimentin	53676	5,06	174	52
20	VIME_HUMAN	vimentin	53676	5,06	351	63
21	VIME_HUMAN	vimentin	53676	5,06	343	73
22	VIME_HUMAN	vimentin	53676	5,06	269	74
23	VIME_HUMAN	vimentin	53676	5,06	370	84
24	ACTB_HUMAN	actin, beta [Homo sapiens]	41321	5,56	215	55
25	PDIA1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase precursor	57480	4,76	481	73
26	B0QZ61_HUMAN	heat shock 70kDa protein 5 [Homo sapiens]	72402	5,07	397	62
27	Q53GZ6_HUMAN	heat shock 70kDa protein 8 isoform 1	71082	5,37	259	54
28	CALD1_HUMAN	caldesmon 1 isoform 2	62683	6,18	136	50
29	PDIA3_HUMAN	protein disulfide isomerase family A, member 3	54454	6,78	303	66
30	ANXA1_HUMAN	annexin 1	36918	6,57	205	82
31	G3P_HUMAN	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36201	8,57	137	49
32	KPYM_HUMAN	Human Muscle Pyruvate Kinase (Pkm2)	60277	8,22	63	24
33	ATP6_HUMAN	ATP synthase, mitochondrial F1 complex	59828	9,16	273	63
34	PGK1_HUMAN	phosphoglycerate kinase 1	44985	8,30	238	73
35	ALDOA_HUMAN	aldolase A	39851	8,30	151	65
36	SODM_HUMAN	Human Manganese Superoxide Dismutase	22275	7,85	40	0
37	HPRT_HUMAN	guanine nucleotide binding protein (G protein)	30942	7,03	305	74
38	G3P_HUMAN	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36201	8,57	180	65
39	PSB4_HUMAN	proteasome, subunit, alpha type 4	25316	6,45	109	74
40	IF4H_HUMAN	translation initiation factor 4H isoform 2	25242	7,79	165	57

Identifizierungen Tabelle 3

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI	MOWSE	SC [%]
92	ANXA2_HUMAN	annexin A2 isoform	38808	7,57	113	61
93	ESTD_HUMAN	esterase D[formyl]glutathione hydrolase	31956	6,54	151	76
95	G3P_HUMAN	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36201	8,57	65	37
96	VATE1_HUMAN	vacuolar H+ ATPase E1 isoform a	26186	7,71	94	51
97	ATPD_HUMAN	ATP synthase, F0 complex, subunit d isoform b	15820	6,60	117	64
100	ACTB_HUMAN	ACTB protein	40536	5,55	83	45
101	ANXA2_HUMAN	annexin A2, isoform CRA_c	32600	5,93	140	58
102	TBB2A_HUMAN	tubulin, beta 2	50274	4,78	74	28
105	COTL1_HUMAN	coactosin-like	16049	5,54	103	61
106	GSTP1_HUMAN	Hgsp1-1[104] Complexed	23506	5,43	72	62
107	STMN1_HUMAN	Stathmin	15264	8,47	48	33
108	NDKA_HUMAN	Nm23 protein	20740	7,07	138	62
110	ACTN4_HUMAN	Thioredoxin domain of Protein Disulfide-isomerase	13341	5,58	63	48
111	TPM4_HUMAN	tropomyosin 4, isoform CRA_c	18472	4,65	68	46
112	HINT1_HUMAN	Chain A, PkcI-Substrate Analog	13774	6,46	81	77
113	CYTB_HUMAN	cystatin B	11190	6,96	102	87
114	PRDX5_HUMAN	Peroxiredoxin 5	17060	6,96	159	88
115	NDKB_HUMAN	Nucleoside Diphosphate Kinase B	17270	8,55	121	83
117	PRDX1_HUMAN	peroxiredoxin 1	19135	6,41	51	45
120	Q53GZ6_HUMAN	heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant	71083	5,28	127	25
121	ACTB_HUMAN	actin, beta	41321	5,56	88	25
122	PSME1_HUMAN	proteasome activator subunit 1 isoform 1	28876	5,78	137	56
123	ANXA5_HUMAN	annexin 5	35971	4,94	88	46
124	VIME_HUMAN	vimentin	53676	5,06	227	44
125	ANXA5_HUMAN	annexin 5	35971	4,94	131	55
126	ANXA1_HUMAN	annexin A1	38918	6,57	208	60
127	PCBP1_HUMAN	poly(rC) binding protein 1	38015	6,66	113	48
128	KPYM_HUMAN	pyruvate kinase, muscle, isoform CRA_c	60773	7,95	149	40
129	TBB2C_HUMAN	tubulin, beta 2C, isoform CRA_b	49250	4,88	184	56
130	HNRH1_HUMAN	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	49484	5,89	123	51
132	TBA1A_HUMAN	alpha-tubulin	50810	5,02	143	51
134	CH60_HUMAN	chaperonin	61187	5,7	263	52
135	VIME_HUMAN	vimentin variant 3	49680	5,19	83	32
136	HSP7C_HUMAN	HSPA8 protein	64804	5,36	71	18
137	VIME_HUMAN	vimentin	53676	5,06	330	69
138	KPYM_HUMAN	Muscle Pyruvate Kinase (Pkm2)	60277	8,22	190	56
140	SEP11_HUMAN	septin 11, isoform CRA_a	51543	6,40	126	49
145	ALDR_HUMAN	Chain A, Apo R268a Human Aldose Reductase	36014	6,34	150	40
146	ANXA1_HUMAN	annexin A1	38918	6,57	72	39
147	CNN2_HUMAN	CNN2	34106	6,95	125	55
148	ANXA2_HUMAN	Annexin A2	38780	7,57	170	64
149	AK1C2_HUMAN	dihydrodiol dehydrogenase	37740	6,57	114	41
150	G3P_HUMAN	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36202	8,26	93	50

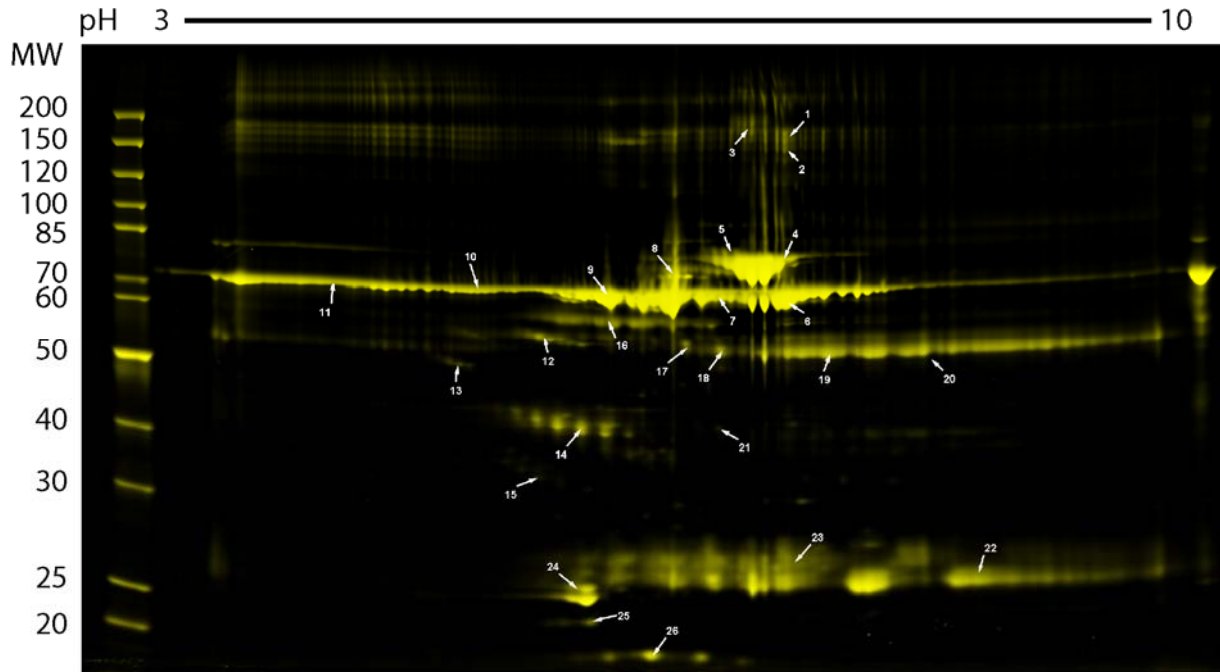
Identifizierungen Tabelle 4

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI	MOWSE	SC [%]
151	G3P_HUMAN	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	24776	8,68	157	67
152	LDHB_HUMAN	lactate dehydrogenase A variant	36951	7,63	165	50
154	TPM1_HUMAN	tropomyosin 1 (alpha), isoform CRA_m	28730	4,78	81	25
156	CALR_HUMAN	calreticulin precursor	47061	4,30	101	33
158	LMNA_HUMAN	Lamin-A/C	74380	6,57	65	28
159	SEP11_HUMAN	Septin-11	49652	6,36	100	36
160	SEP11_HUMAN	Septin-11	49652	6,36	77	32
161	HNRH1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49484	5,89	98	50
162	TCFZ_HUMAN	T-complex protein 1 subunit	58444	6,23	110	39
165	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	42052	5,29	59	30
167	GRHRP_HUMAN	Glyoxylate reductase/hydroxy-pyruvate reductase -	36045	7,01	120	57
169	G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36201	8,57	149	52
169	VDAC2_HUMAN	anion-selective channel protein 2	32060	7,49	159	57
170	RAN_HUMAN	GTP-binding nuclear protein Ran	24579	7,01	126	52
171	PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxin-6	25133	6,00	209	81
172	ERP29_HUMAN	Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	29032	6,77	117	54
173	GSTO1_HUMAN	Glutathione transferase omega-1	27833	6,23	105	43
174	ECHM1_HUMAN	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor	31823	8,34	96	48
175	HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	22826	5,98	137	56
176	PSME1_HUMAN	Proteasome activator complex subunit 1	28876	5,78	100	50
177	CAPZB_HUMAN	F-actin-capping protein subunit beta	31616	5,36	123	57
178	IPYR_HUMAN	Inorganic pyrophosphatase	33095	5,54	73	47
179	CAZA1_HUMAN	F-actin-capping protein subunit alpha-1	33073	5,45	76	56
180	CAZA2_HUMAN	F-actin-capping protein subunit alpha-2	33157	5,57	159	59
181	KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	58470	7,96	135	36
182	TPM1_HUMAN	Tropomyosin alpha-1 chain	32746	4,69	151	40
183	EF1D_HUMAN	Elongation factor 1-delta	31217	4,90	123	59
184	PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	18229	7,68	82	70
187	PGK1_HUMAN	Phosphoglycerate kinase	44985	8,3	61	19
188	KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	58470	7,96	70	37
200	DLDH_HUMAN	Dihydrolypyl dehydrogenase, mitochondrial	54686	7,59	75	25
201	FINC_HUMAN	Fibronectin precursor	266034	5,45	69	14
202	CO1A1_HUMAN	Collagen alpha-1(I) chain precursor	139853	5,60	169	44

10.2 Serumanalytik

10.2.1 Identifizierungen der Proteine im nativen Serum

2D-SDS-PAGE natives, entsalztes Serum

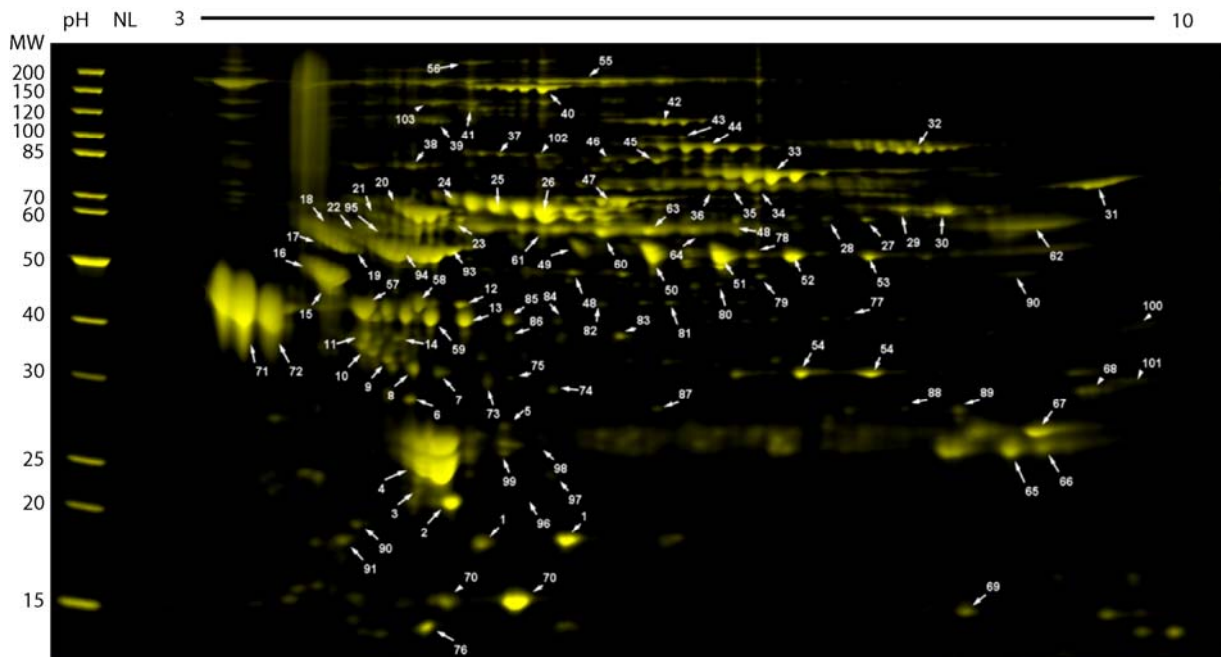


Identifizierungen

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI [-]	Mowse [-]	SC [%]
1	ALBU_HUMA	Serum albumin	71317	5,92	311	70
2	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	156	42
3	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	262	64
4	TRFE_HUMAN	Serotransferrin precursor	79280	6,81	241	51
5	TRFE_HUMAN	Serotransferrin precursor	79280	6,81	311	56
6	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	335	70
7	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	163	55
8	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	139	51
9	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	115	43
10	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	145	39
11	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	109	41
12	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	90	44
13	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	46878	5,37	272	56
14	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	122	34
15	CLUS_HUMAN	Clusterin	53031	5,89	79	34
16	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	124	0
17	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	39584	8,34	159	51
18	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	39584	8,34	174	58
19	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	36596	8,46	93	52
20	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	36596	8,46	110	56
21	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79280	6,81	134	46
22	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	11773	5,58	73	87
23	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	11773	5,58	59	66
24	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	323	80
25	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	202	83
26	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	59	20

10.2.2 Identifizierungen der Proteine im depletierten Serum

2D-SDS-PAGE depletiertes Serum (Agilent Human 6 Depletionssäule)



Identifizierungen

Identifizierungen Tabelle 1

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI	MOWSE [-]	SC [%]
1	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	59	17
2	RET4_HUMAN	Retinol-binding protein 4	23337	5,76	60	59
3	RET4_HUMAN	Retinol-binding protein 4	23337	5,76	60	58
4	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I precursor	30759	5,56	221	81
5	CO4A_HUMAN	Complement C4-A	47937	5,78	78	34
6	AMBP_HUMAN	AMBP protein	39886	5,95	106	31
7	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	45371	5,28	115	51
8	TIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	103489	6,51	58	26
9	ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34079	5,57	87	47
9	CLUS_HUMAN	Clusterin	53031	5,89	72	31
10	ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34079	5,57	64	45
10	CLUS_HUMAN	Clusterin	53031	5,89	63	26
10	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	80	17
11	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	45371	5,28	290	69
12	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	123	31
13	HPT_HUMAN	Haptoglobin precursor	45861	6,13	176	33
14	ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34079	5,57	67	52
14	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	52	14
15	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	40098	5,43	88	29
16	AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	47792	5,33	90	39
17	VTNC_HUMAN	Vitronectin	55069	5,55	74	23
18	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	120	26
19	VTNC_HUMAN	Vitronectin	55069	5,55	86	25
19	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	77	12
20	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	82	28
20	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	54809	5,58	66	36
21	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	54809	5,58	109	46
22	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	54526	5,40	135	45
23	IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	38486	6,08	63	26
24	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	172	42
25	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	220	39
26	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	300	54
27	CFAB_HUMAN	Complement factor B	86847	6,67	131	33
28	CFAB_HUMAN	Complement factor B	86847	6,67	136	31
29	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	177	27
30	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	133	31
30	CO8B_HUMAN	Complement component C8 beta chain	68714	8,50	91	37
31	CO4A_HUMAN	Complement C4-A	194247	6,65	155	25
32	PLMN_HUMAN	Plasminogen	93247	7,04	97	24
33	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79280	6,81	123	32
34	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	53025	6,32	67	34
35	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	53025	6,32	70	39
36	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	53025	6,32	83	41
36	THRB_HUMAN	Prothrombin	71475	5,64	58	30
37	C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent	81661	5,89	102	24
38	ALS_HUMAN	Insulin-like growth factor-binding protein	66735	6,33	75	24
39	PLMN_HUMAN	Plasminogen	93247	7,04	51	11
40	CFAH_HUMAN	Complement factor H	143680	6,21	107	25
41	GERU_HUMAN	Ceruloplasmin	122983	5,44	64	21

Identifizierungen Tabelle 2

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI	MOWSE [-]	SC [%]
42	CO6_HUMAN	Complement component C6	108367	6.39	107	23
43	CO7_HUMAN	Complement component C7	96650	6.09	62	20
44	CFAB_HUMAN	Complement factor B	86847	6.67	151	33
45	GELS_HUMAN	Gelsolin	86043	5.90	220	50
46	GELS_HUMAN	Gelsolin	86043	5.90	158	39
47	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6.55	64	35
48	SHBG_HUMAN	Sex hormone-binding globulin	43980	6.22	122	41
48	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6.02	238	27
49	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1 precursor	39584	8.34	81	35
50	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1 precursor	39584	8.34	114	42
51	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1 precursor	39584	8.34	139	51
52	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1 precursor	39584	8.34	115	52
53	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1 precursor	39584	8.34	94	34
54	CO4A_HUMAN	Complement C4-A precursor	194247	6.65	88	12
55	A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin precursor	164600	6.21	243	47
56	FINC_HUMAN	Fibrinectin precursor	266034	5.45	121	48
57	HPT_HUMAN	Haptoglobin precursor	45861	6.13	88	42
58	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV precursor	45371	5.28	224	63
59	HPT_HUMAN	Haptoglobin precursor	45861	6.13	72	32
60	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6.55	153	47
61	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6.55	201	48
62	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	36596	8.45	79	34
63	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	36596	7.88	67	29
64	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	36596	7.88	56	36
65	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	11773	7.60	84	56
66	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	21251	7.60	94	69
67	LAC_HUMAN	Ig lambda chain C regions	25347	8.14	80	43
68	C1QB_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit	26670	8.83	79	42
69	HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	16102	6.57	231	95
70	TTHY_HUMAN	Transferrin	15991	5.52	152	77
71	A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein	23725	4.93	90	47
72	A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1 precursor	23725	5.00	98	45
73	ITI4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	103489	6.51	75	15
74	ITI4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	103489	6.51	100	21
75	MBL2_HUMAN	Mannose-binding protein C	26562	5.39	82	31
76	TTHY_HUMAN	Transferrin	15991	5.52	139	77
77	FHR1_HUMAN	Complement factor H-related protein 1	38777	7.75	58	27
78	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6.55	110	37
79	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6.55	62	34
80	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	39584	8.34	58	46
81	CFAH_HUMAN	Complement factor H	143680	6.21	62	26
82	CFAH_HUMAN	Complement factor H	143680	6.21	101	21
83	ITI4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	103489	6.51	100	21
84	APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	36246	5.65	130	69
85	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6.13	126	41
86	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6.13	135	37
87	FHR2_HUMAN	Complement factor H-related protein 2	31543	6.00	60	33
88	CAH1_HUMAN	Carbonic anhydrase 1	28909	6.59	117	74
89	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6.02	96	14
90	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	36596	8.46	53	36

Identifizierungen Tabelle 3

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI	MOWSE [-]	SC [%]
91	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5.56	161	46
92	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5.56	135	47
93	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	54526	5.4	131	27
94	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	54526	5.4	136	32
95	ANGT_HUMAN	Angiotensinogen	53406	5.57	86	32
95	CDC73_HUMAN	Parafibromin	60653	9.62	52	27
96	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5.56	112	40
97	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5.56	112	44
98	TETN_HUMAN	Tetranectin	22951	5.52	99	61
99	PRDX2_HUMAN	Peroxisredoxin-2	22049	5.66	80	46
100	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6.02	64	10
101	C1QA_HUMAN	Complement C1q subcomponent	26285	9.26	70	41
102	GELS_HUMAN	Gelsolin	86043	5.9	90	29
103	TETN_HUMAN	Tetranectin	22951	5.52	68	40

10.2.3 Identifizierungen der Proteine der Stufenfraktionierung

Identifizierungen Fraktion 1

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI [-]	MOWSE [-]	SC [%]
1	CFAH_HUMAN	Complement factor H	143680	6,21	225	46
2	CFAH_HUMAN	Complement factor H	143680	6,21	261	51
3	CFAH_HUMAN	Complement factor H	143680	6,21	308	51
4	F13B_HUMAN	Coagulation factor XIII B chain	77742	6,01	101	37
5	F13B_HUMAN	Coagulation factor XIII B chain	77742	6,01	197	49
6	KNG1_HUMAN	Kininogen-1	72996	6,34	117	32
7	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	39584	8,34	90	54
8	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	39584	8,34	104	54
9	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	39584	8,34	100	42
10	ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34079	5,57	150	55
11	ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34079	5,57	144	58
12	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	68	32
14	FHR1_HUMAN	Complement factor H- protein 1	38777	7,75	100	31
15	FHR1_HUMAN	Complement factor H- protein 1	38777	7,75	117	31
16	FHR2_HUMAN	Complement factor H- protein 2	31543	6	98	34
17	RETBP_HUMAN	Plasma retinol-binding protein	23337	5,76	111	62
13	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	97	37

Identifizierungen Fraktion 2

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI [-]	MOWSE [-]	SC [%]
1	CFAH_HUMAN	Complement factor H	143680	6,21	250	48
2	CO6_HUMAN	Complement component C6	108367	6,39	86	22
3	A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23725	4,93	86	40
4	A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23725	4,93	94	40
5	C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent	81661	5,89	123	28
6	PLMN_HUMAN	Plasminogen	93247	7,04	200	44
7	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79280	6,81	180	53
8	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79280	6,81	300	56
9	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79280	6,81	237	51
10	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	105	32
11	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	54809	5,58	124	42
12	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	54809	5,58	59	33
12	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	105	40
13	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	107	41
14	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	125	42
15	KNG1_HUMAN	Kininogen-1	72996	6,34	77	20
15	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	40098	5,43	73	27
16	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	46787	5,37	275	66
17	ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34079	5,57	103	39
18	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	131	39
19	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	129	40
20	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	149	41
20	CFAI_HUMAN	Complement factor I	68072	7,72	82	29
21	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	97	37
22	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	84	35
23	A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23725	4,93	107	42
24	RETBP_HUMAN	Plasma retinol-binding protein	23337	5,76	80	59
25	TETN_HUMAN	Tetranectin	22951	5,52	100	58
26	RETBP_HUMAN	Plasma retinol-binding protein	23337	5,76	80	51
27	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	40098	5,43	67	22
28	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	39584	8,34	85	26

Identifizierungen Fraktion 3

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI [-]	MOWSE [-]	SC [%]
1	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	283	62
2	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	313	71
3	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	338	72
4	CFAH_HUMAN	Complement factor H	143680	6,21	313	45
5	CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	122983	5,44	146	33
5	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	84	35
6	CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	122983	5,44	147	28
7	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	95	35
7	CO6_HUMAN	Complement component C6	108367	6,39	90	27
8	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	99	47
8	CO7_HUMAN	Complement component C7	96650	6,09	135	45
9	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79280	6,81	225	54
10	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79280	6,81	224	53
11	FA12_HUMAN	Coagulation factor XII	70055	8,04	105	37
12	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	314	72
13	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	360	75
14	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	287	69
15	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	327	71
16	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	54526	5,4	112	56
16	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	80	36
17	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	40098	5,43	76	25
18	A1AG2_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 2	23725	5,03	70	40
19	A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23725	4,93	84	44
20	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	650	44
20	ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34079	5,57	112	58
21	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	46787	5,37	275	66
22	AMBP_HUMAN	AMBP protein	39886	5,95	52	28
23	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	156	53
24	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	164	45
24	GPX3_HUMAN	Glutathione peroxidase 3	25765	8,26	85	50
25	SAMP_HUMAN	Serum amyloid P-component	25485	6,1	78	31
26	RETBP_HUMAN	Plasma retinol-binding protein	23337	5,76	86	40
27	RETBP_HUMAN	Plasma retinol-binding protein	23337	5,76	110	51

Identifizierungen Fraktion 4

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI [-]	MOWSE [-]	SC [%]
1	CFAH_HUMAN	Complement factor H	143680	6,21	307	44
2	CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	122983	5,44	93	31
2	CFAH_HUMAN	Complement factor H	143680	6,21	158	32
3	CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	122983	5,44	93	16
4	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	53025	6,32	113	41
5	CO6_HUMAN	Complement component C6	108367	6,39	147	25
6	CFAB_HUMAN	Complement factor B	86847	6,67	153	39
7	C1R_HUMAN	Complement C1r subcomponent	81661	5,89	97	31
7	THRB_HUMAN	Prothrombin	71475	5,64	94	29
8	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	53025	6,32	74	35
8	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	53025	6,32	78	44
9	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79280	6,81	304	56
10	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	187	47
11	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	53025	6,32	68	30
12	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	129	26
13	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	77	43
13	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	103	38
14	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	54809	5,58	93	33
15	KNG1_HUMAN	Kininogen-1	72996	6,34	120	34
16	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	54526	5,4	179	66
17	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	40098	5,43	66	25
18	ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34079	5,57	112	44
19	CLUS_HUMAN	Clusterin	53031	5,89	72	30
20	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	86	32
21	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	105	30
21	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	53025	6,32	84	44
22	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	39584	8,34	88	41
22	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	61	28
23	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	64	30
23	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	62	28
24	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	167	62
25	RETBP_HUMAN	Plasma retinol-binding protein	23337	5,76	90	63
25	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	110	50
26	RETBP_HUMAN	Plasma retinol-binding protein	23337	5,76	74	43
26	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	148	61
27	A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23725	4,93	94	40

Identifizierungen Fraktion 5

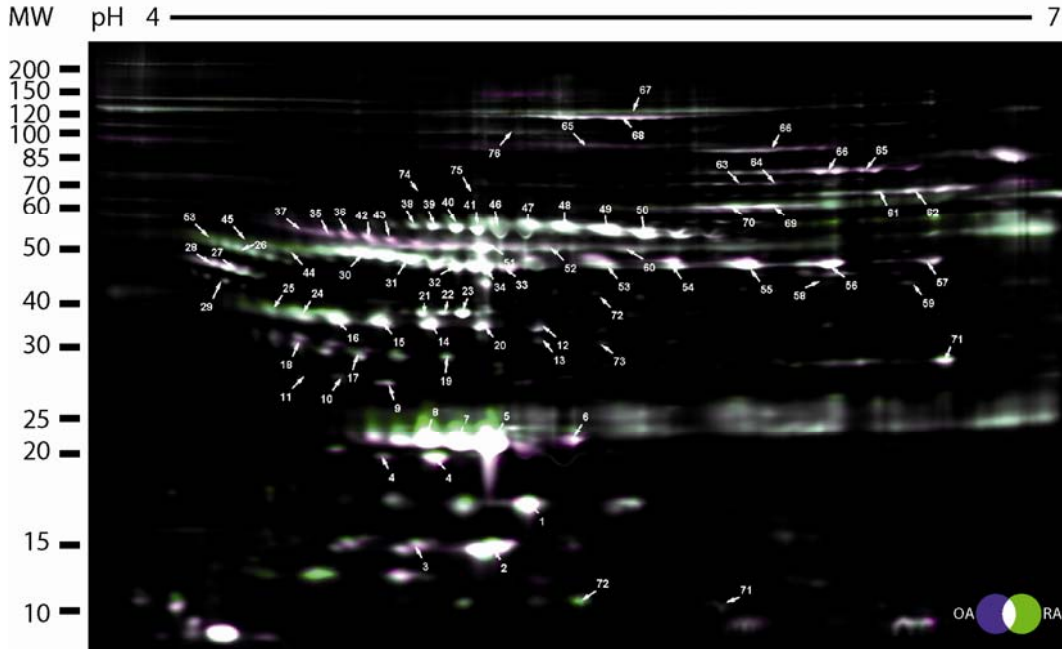
Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI [-]	MOWSE [-]	SC [%]
1	CFAH_HUMAN	Complement factor H	143680	6,21	140	35
2	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	95	57
3	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	190	35
4	CFAB_HUMAN	Complement factor B	86847	7	161	30
5	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79280	7	311	56
6	ALBU_HUMAN	Serum albumin	713170	5,92	131	27
6	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	141	35
7	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	74	26
7	ALBU_HUMAN	Serum albumin	713170	5,92	100	24
8	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	46878	5,37	215	58
9	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	54809	5,58	64	26
9	A2GL_HUMAN	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	38382	6	114	47
9	KNG1_HUMAN	Kininogen-1	72996	6,34	109	29
10	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	40098	5,43	73	25
12	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	45371	5,28	218	59
13	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	54526	5	70	25
15	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	157	63
16	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	219	61
17	A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23725	5	70	42

Identifizierungen Fraktion 6

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI [-]	MOWSE [-]	SC [%]
1	CFAH_HUMAN	Complement factor H	143680	6,21	123	22
2	A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	164600	6	88	23
2	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	102	27
3	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79280	6,81	241	51
4	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	84	33
5	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	92	35
6	AFAM_HUMAN	Afamin	70963	5,64	80	25
7	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	54526	5,4	138	57
7	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	46878	5,37	106	39
8	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	46878	5,37	148	56
9	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	145	39
10	FETUA_HUMAN	Alpha 2 HS glycoprotein	40098	5,43	58	23
11	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	83	29
12	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	45371	5,28	211	61
13	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	55	20
13	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	124	30
14	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	180	31
15	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	207	30
16	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	70	49
17	APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	36246	5,65	103	53
17	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	45371	5,28	80	40
17	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	74	50
18	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	167	62
19	A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23725	5	70	42
20	A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23725	5	84	40

10.2.4 Identifizierungen und Quantifizierungen der Proteine der DIGE-Gele

DIGE 2D-SDS-PAGE depletiertes Serum (Agilent Human 6 Depletionssäule)



Identifizierungen

Identifizierungen Tabelle 1

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI	MOWSE	sc [%]
1	TTHY_HUMAN	Transthyretin	15991	5,52	209	80
2	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	88	22
3	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	75	22
4	RET4_HUMAN	Retinol-binding protein 4	23337	5,76	124	63
5	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	458	82
6	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	224	67
7	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	322	78
8	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30759	5,56	319	86
9	AMBP_HUMAN	AMBP protein	39886	5,95	75	31
10	CLUS_HUMAN	Clusterin	53031	5,89	79	22
11	CLUS_HUMAN	Clusterin	53031	5,89	90	30
12	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	96	36
13	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	96	36
14	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	83	29
15	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	121	35
16	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	5,28	90	35
17	ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34079	5,57	193	60
18	ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34079	5,57	59	49
19	ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34079	5,57	160	51
20	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	74	41
21	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	45371	5,28	164	53
22	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	45371	5,28	69	46
23	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	45371	5,28	382	73
24	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	143	35
25	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	5,28	94	31
26	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	40098	5,43	94	28
27	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	40098	5,43	93	27
28	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	40098	5,43	58	31
29	A2GL_HUMAN	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	38382	6,45	106	55
30	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	54526	5,4	248	66
31	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	54526	5,4	300	62
32	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	54526	5,4	254	62
33	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	54526	5,4	154	54
34	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	54526	5,4	112	41
35	KNG1_HUMAN	Kininogen-1 HMW	72996	6,34	106	36
36	KNG1_HUMAN	Kininogen-1 HMW	72996	6,34	142	36
37	VTNC_HUMAN	Vitronectin	55069	5,55	55	24
38	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	54809	5,58	134	36
39	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	54809	5,58	186	45
40	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	54809	5,58	176	45
41	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	54809	5,58	221	49
42	KNG1_HUMAN	Kininogen-1 HMW	72996	6,34	137	29
43	KNG1_HUMAN	Kininogen-1 HMW	72996	6,34	94	33
44	KNG1_HUMAN	Kininogen-1 LMW	72996	6,34	80	28
45	KNG1_HUMAN	Kininogen-1 LMW	72996	6,34	94	36
46	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	221	62
47	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	176	62
48	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	236	50
49	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	164	44
50	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	177	50

Identifizierungen Tabelle 2

Spot	Swiss-Prot ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI	MOWSE [-]	SC [%]
51	IGHA2_HUMAN	Ig alpha-2 chain C	37283	5,71	62	33
51	IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	38486	6,08	64	33
52	IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	38486	6,08	85	43
52	IGHA2_HUMAN	Ig alpha-2 chain C region	37283	5,71	61	25
52	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	163	55
53	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	39584	8,34	137	43
53	AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	47792	5,33	124	58
54	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	39584	8,34	83	35
55	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	39584	8,34	113	57
56	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	39584	8,34	133	57
57	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	39584	8,34	79	28
58	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	90	40
59	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	94	40
60	IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	38486	6,08	63	43
60	HEMO_HUMAN	Hemopexin	52385	6,55	88	45
61	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79280	6,81	180	44
62	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	79280	6,81	128	41
63	GELS_HUMAN	Gelsolin	86043	5,9	103	32
64	GELS_HUMAN	Gelsolin	86043	5,9	134	39
65	CFAB_HUMAN	Complement factor B	86847	6,67	296	53
65	GELS_HUMAN	Gelsolin	86043	5,9	98	41
66	CO6_HUMAN	Complement component C6	108367	6,39	181	37
66	CFAB_HUMAN	Complement factor B	86847	6,67	383	50
67	A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	164600	6	321	41
68	CFAH_HUMAN	Complement factor H	143680	6,21	508	58
69	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	53025	6,32	70	39
69	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	144	22
70	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	53025	6,32	83	41
70	CO3_HUMAN	Complement C3	188569	6,02	70	17
71	CO4A_HUMAN	Complement C4-A precursor	194247	6,65	88	12
72	SHBG_HUMAN	Sex hormone-binding globulin	43980	6,22	122	41
73	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	73	27
74	ALS_HUMAN	Insulin-like growth factor-binding protein	66735	6,33	170	42
75	ALS_HUMAN	Insulin-like growth factor-binding protein	66735	6,33	111	39
76	CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	122983	5,44	81	28
77	SAA_HUMAN	Serum amyloid A protein	13581	6,28	123	66
78	SAA_HUMAN	Serum amyloid A protein	13581	6,28	82	53

Auswertung DIGE-Experiment A

ID	Protein	DIGE-Gele			MW	SD [%]	DIGE-Gele			MW	SD [%]	Ratio [-]
		RA 1	RA 2	RA 3			OA 1	OA 2	OA 3			
A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	1,039	0,999	0,966	1,001	2,974	0,934	0,991	1,017	0,981	3,466	0,979
A2GL_HUMAN	Leucine alpha-2-glycoprotein	1,115	0,999	1,028	1,047	4,944	0,842	0,991	0,993	0,942	7,054	0,899
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	1,102	1,012	1,065	1,060	3,676	0,842	0,980	0,944	0,922	5,834	0,870
ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	1,082	1,009	0,998	1,030	3,736	0,881	0,986	0,994	0,954	5,138	0,926
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	0,908	1,175	1,158	1,081	12,212	1,143	0,884	0,895	0,974	11,942	0,901
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	1,037	0,975	0,996	1,003	2,545	0,941	1,014	0,997	0,984	3,087	0,981
APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	4,967	4,167	4,336	4,490	34,427	4,989	5,598	5,466	5,351	26,165	1,192
CFAB_HUMAN	Complement factor B	1,025	0,811	0,819	0,885	9,895	0,954	1,132	1,126	1,071	8,222	1,209
CFAH_HUMAN	Complement factor H	1,013	0,952	0,948	0,971	2,994	0,968	1,028	1,030	1,009	2,903	1,039
CLUS_HUMAN	Clusterin	0,954	0,885	0,904	0,914	2,921	1,064	1,088	1,064	1,072	1,118	1,173
CO4A_HUMAN	Complement C4-A precursor	1,043	0,975	0,989	1,002	2,914	0,938	1,010	1,004	0,984	3,252	0,982
CO6_HUMAN	Complement component C6	1,007	0,831	0,843	0,893	8,047	0,976	1,112	1,104	1,064	6,226	1,191
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HSglycoprotein	1,019	0,834	0,861	0,905	8,157	0,968	1,123	1,105	1,066	6,913	1,178
GELS_HUMAN	Gelsolin	1,035	0,877	0,896	0,936	7,046	0,938	1,082	1,057	1,026	6,291	1,096
HEMO_HUMAN	Hemopexin	1,023	0,945	0,962	0,977	3,343	0,956	1,032	1,020	1,003	3,345	1,027
HPT_HUMAN	Haptoglobin - LMW	1,134	1,057	1,041	1,077	4,051	0,819	0,952	0,966	0,912	6,625	0,847
HPT_HUMAN	Haptoglobin - HMW	2,343	2,241	2,226	2,270	5,206	1,616	1,853	1,866	1,778	11,474	0,783
IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	0,986	0,908	0,900	0,931	3,872	1,005	1,057	1,067	1,043	2,722	1,120
KNG1_HUMAN	Kininogen-1 LMW	1,156	1,095	1,117	1,123	2,499	0,789	0,923	0,911	0,874	6,052	0,779
KNG1_HUMAN	Kininogen-1 HMW	0,903	0,810	0,805	0,839	4,524	1,126	1,144	1,150	1,140	0,999	1,358
RET4_HUMAN	Retinol-binding protein 4	3,256	2,982	2,918	3,052	14,640	2,651	3,009	3,046	2,902	17,837	0,951
SAA_HUMAN	Serum amyloid A protein	2,668	2,687	2,610	2,655	3,259	1,245	1,541	1,586	1,457	15,120	0,549
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	0,996	0,937	0,941	0,958	2,710	0,992	1,030	1,032	1,018	1,833	1,063
TTHY_HUMAN	Transthyretin	0,942	0,845	0,829	0,872	4,987	1,078	1,125	1,139	1,114	2,582	1,277
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	2,180	1,905	1,912	1,999	12,808	1,749	2,056	2,050	1,951	14,331	0,976
ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	3,020	2,712	2,771	2,834	13,343	2,951	3,177	3,144	3,091	9,983	1,090
AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	1,129	0,984	0,994	1,036	6,613	0,826	1,004	0,995	0,942	8,190	0,909

Tabelle 14 Spotquantitäten der 26 untersuchten Proteine des DIGE-Experimentes A. Vergleich von depletiertem Serum der Gruppe Rheuma (RA) mit dem der Gruppe Osteoarthritis (OA). (MW) Mittelwert; (SD) Standardabweichung, (Ratio) Quotient der Mittelwerte der Vergleichsgruppen. Spotquantitäten sind in Volumen-Prozent angegeben.

Auswertung DIGE-Experiment B

ID	Protein	DIGE-Gele				MW	SD [%]	DIGE-Gele				MW	SD [%]	Ratio [-]
		RA 1	RA 2	RA 3	RA 4			OA 1	OA 2	OA 3	OA 4			
A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	0,948	0,936	0,985	0,998	0,967	2,564	1,037	1,044	1,015	0,988	1,021	2,165	1,056
A2GL_HUMAN	Leucine alpha-2-glycoprotein	1,037	1,003	0,994	0,981	1,004	2,082	0,952	0,971	1,005	1,040	0,992	3,357	0,988
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	0,886	0,868	0,919	0,913	0,897	2,052	1,089	1,097	1,177	1,179	1,135	4,240	1,266
ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	0,949	0,970	1,028	1,007	0,988	3,086	1,035	1,007	0,957	1,040	1,010	3,281	1,021
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	0,721	0,723	0,853	0,849	0,786	6,438	1,254	1,243	1,381	1,381	1,315	6,659	1,672
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	0,952	0,959	1,102	1,059	1,018	6,421	1,035	1,029	0,784	0,867	0,929	10,735	0,912
APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	0,964	0,938	0,961	0,968	0,958	1,174	1,025	1,042	1,078	1,058	1,051	1,987	1,097
CFAB_HUMAN	Complement factor B	1,001	0,939	0,909	0,892	0,935	4,146	0,988	1,037	1,196	1,243	1,116	10,624	1,193
CFAH_HUMAN	Complement factor H	0,919	0,916	0,977	0,961	0,943	2,644	1,058	1,059	1,044	1,079	1,060	1,243	1,124
CLUS_HUMAN	Clusterin	0,905	0,910	0,932	0,945	0,923	1,628	1,083	1,074	1,151	1,125	1,108	3,109	1,201
CO4A_HUMAN	Complement C4-A precursor	0,960	0,963	0,914	0,889	0,931	3,121	1,025	1,033	1,189	1,261	1,127	10,150	1,210
CO6_HUMAN	Complement component C6	0,883	0,868	0,896	0,919	0,892	1,858	1,090	1,097	1,234	1,200	1,155	6,287	1,296
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HSglycoprotein	1,162	1,111	1,053	1,050	1,094	4,593	0,865	0,899	0,876	0,881	0,880	1,211	0,805
GELS_HUMAN	Gelsolin	0,883	0,868	0,896	0,919	0,892	1,858	1,090	1,097	1,234	1,200	1,155	6,287	1,296
HEMO_HUMAN	Hemopexin	0,936	0,927	0,976	0,978	0,954	2,294	1,048	1,050	1,039	1,037	1,044	0,578	1,093
HPT_HUMAN	Haptoglobin HMW	1,051	1,049	1,025	1,037	1,040	1,017	0,952	0,957	0,937	0,913	0,940	1,681	0,903
HPT_HUMAN	Haptoglobin LMW	1,146	1,119	1,022	1,028	1,079	5,458	0,901	0,904	0,973	0,957	0,934	3,184	0,866
IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	0,884	0,819	0,957	0,912	0,893	5,030	1,144	1,264	1,021	1,043	1,118	9,627	1,252
KNG1_HUMAN	Kininogen-1 LMW	1,093	1,087	1,202	1,140	1,131	4,614	0,879	0,875	0,908	0,933	0,899	2,334	0,795
KNG1_HUMAN	Kininogen-1 HMW	0,831	0,820	0,910	0,918	0,870	4,429	1,138	1,138	1,192	1,173	1,160	2,337	1,334
RET4_HUMAN	Retinol-binding protein 4	1,079	1,081	0,993	1,005	1,040	4,084	0,931	0,930	1,014	0,987	0,965	3,606	0,929
SAA_HUMAN	Serum amyloid A protein	1,025	1,051	1,185	1,350	1,153	12,913	0,953	0,919	0,910	0,873	0,914	2,820	0,793
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	0,890	0,798	0,884	0,882	0,863	3,796	1,084	1,152	1,261	1,260	1,189	7,548	1,378
TTHY_HUMAN	Transthyretin	0,843	0,825	0,923	0,929	0,880	4,637	1,139	1,143	1,177	1,153	1,153	1,458	1,311
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	0,971	0,985	1,007	0,970	0,983	1,506	1,019	1,007	0,970	1,051	1,011	2,885	1,029
ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	1,178	1,159	1,076	1,072	1,121	4,776	0,848	0,875	0,837	0,850	0,853	1,361	0,760
AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	1,040	0,995	1,022	1,017	1,019	1,564	0,962	0,994	0,934	0,953	0,961	2,165	0,943

Tabelle 15: Spotquantitäten der 26 untersuchten Proteine des DIGE-Experimentes B. Vergleich von depletiertem Serum der Gruppe Rheuma (RA) mit dem der Gruppe Osteoarthritis (OA). (MW) Mittelwert; (SD) Standardabweichung, (Ratio) Quotient der Mittelwerte der Vergleichsgruppen. Spotquantitäten sind in Volumen-Prozent angegeben.

Auswertung DIGE-Experiment C

ID	Protein	DIGE-Gele				MW	SD [%]	DIGE-Gele				MW	SD [%]	Ratio [-]
		RA 1	RA 2	RA 3	RA 4			G 1	G 2	G 3	G 4			
A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	1,005	0,939	0,977	0,957	0,969	2,431	0,965	1,054	1,005	1,025	1,012	3,224	1,044
A2GL_HUMAN	Leucine alpha-2-glycoprotein	1,241	1,223	1,277	1,268	1,252	2,126	0,611	0,686	0,696	0,686	0,669	3,418	0,535
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	1,022	1,045	1,018	1,020	1,026	1,101	0,925	0,913	0,950	0,947	0,934	1,538	0,910
ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	1,009	1,037	0,961	0,954	0,990	3,416	0,948	0,940	1,021	1,026	0,984	4,003	0,994
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	0,877	0,914	0,947	0,949	0,922	2,939	1,195	1,085	1,036	1,038	1,088	6,437	1,181
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	1,294	1,190	1,312	1,262	1,265	4,658	0,589	0,818	0,730	0,758	0,724	8,416	0,572
APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	5,142	5,298	4,985	4,998	5,106	12,714	4,614	4,607	4,901	4,903	4,756	14,572	0,932
CFAB_HUMAN	Complement factor B	1,115	1,135	1,155	1,118	1,131	1,608	0,780	0,815	0,820	0,846	0,815	2,333	0,721
CFAH_HUMAN	Complement factor H	1,125	1,139	1,124	1,149	1,134	1,022	0,787	0,846	0,860	0,841	0,834	2,781	0,735
CLUS_HUMAN	Clusterin	1,231	1,159	1,255	1,292	1,234	4,873	0,598	0,810	0,761	0,713	0,720	7,851	0,584
CO4A_HUMAN	Complement C4-A precursor	1,046	1,075	1,031	1,034	1,047	1,727	0,878	0,891	0,936	0,928	0,908	2,458	0,868
CO6_HUMAN	Complement component C6	1,089	1,066	1,094	1,071	1,080	1,174	0,827	0,897	0,887	0,903	0,879	3,034	0,814
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HSglycoprotein	0,856	0,815	0,782	0,804	0,814	2,698	1,223	1,196	1,209	1,188	1,204	1,321	1,478
GELS_HUMAN	Gelsolin	0,933	0,934	0,903	0,893	0,916	1,835	1,069	1,057	1,082	1,089	1,074	1,244	1,173
HEMO_HUMAN	Hemopexin	1,008	0,996	0,950	0,980	0,984	2,181	0,962	0,993	1,027	1,001	0,996	2,346	1,012
HPT_HUMAN	Haptoglobin- LMW	1,287	1,195	1,351	1,285	1,279	5,568	0,575	0,795	0,699	0,742	0,703	8,105	0,549
HPT_HUMAN	Haptoglobin- HMW	2,816	3,033	3,097	2,995	2,985	10,412	0,786	0,947	1,042	1,061	0,959	10,893	0,321
IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	1,222	1,250	1,255	1,250	1,244	1,325	0,635	0,721	0,745	0,747	0,712	4,570	0,572
KNG1_HUMAN	Kininogen-1 LMW	0,828	0,820	0,772	0,808	0,807	2,172	1,271	1,186	1,221	1,186	1,216	3,500	1,507
KNG1_HUMAN	Kininogen-1 HMW	1,182	1,028	1,181	1,076	1,117	6,659	0,711	0,956	0,832	0,918	0,854	9,403	0,765
RET4_HUMAN	Retinol-binding protein 4	4,691	5,199	5,418	5,375	5,171	28,901	0,815	1,030	1,066	1,044	0,989	10,131	0,191
SAA_HUMAN	Serum amyloid A protein	3,248	3,608	3,981	3,831	3,667	27,587	0,225	0,342	0,225	0,304	0,274	5,111	0,075
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	0,499	0,446	0,384	0,380	0,427	4,901	2,058	1,781	1,794	1,834	1,866	11,133	4,367
TTHY_HUMAN	Transthyretin	0,916	0,889	0,822	0,835	0,866	3,860	1,121	1,119	1,167	1,158	1,141	2,134	1,319
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	1,415	1,335	1,206	1,215	1,293	8,717	3,178	2,900	2,961	2,991	3,008	10,349	2,326
ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	2,906	2,847	2,712	2,791	2,814	7,156	3,058	3,129	3,263	3,181	3,158	7,505	1,122
AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	1,480	1,247	1,620	1,459	1,451	13,333	0,407	0,764	0,542	0,626	0,585	12,966	0,403

Tabelle 16: Spotquantitäten der 26 untersuchten Proteine des DIGE-Experimentes C. Vergleich von depletiertem Serum der Gruppe Rheuma (RA) mit dem der Gruppe Gesund (GES). (MW) Mittelwert; (SD) Standardabweichung, (Ratio) Quotient der Mittelwerte der Vergleichgruppen. Spotquantitäten sind in Volumen-Prozent angegeben.

Auswertung DIGE-Experiment D

ID	Protein	DIGE-Gele				MW	SD [%]	DIGE-Gele				MW	SD [%]	Ratio [-]
		RA 1	RA 2	RA 3	RA 4			G 1	G 2	G 3	G 4			
A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	1,276	1,104	1,262	1,214	7,790	0,796	0,863	0,818	0,826	2,768	0,680		
A2GL_HUMAN	Leucine alpha-2-glycoprotein	1,261	1,240	1,093	1,198	7,491	0,647	0,803	0,851	0,767	8,714	0,640		
A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	0,838	1,183	1,124	1,048	15,059	1,215	0,756	0,876	0,949	19,442	0,905		
ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	1,017	0,972	0,954	0,981	2,617	0,938	1,014	1,002	0,984	3,341	1,004		
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	1,042	1,008	1,043	1,031	1,646	0,950	0,968	0,935	0,951	1,338	0,922		
APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	1,355	1,572	1,330	1,419	10,873	0,567	0,607	0,634	0,603	2,752	0,425		
APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	1,061	1,020	1,080	1,054	2,504	0,885	0,950	0,862	0,899	3,724	0,853		
CFAB_HUMAN	Complement factor B	1,089	1,071	1,145	1,102	3,169	0,868	0,930	0,782	0,860	6,089	0,780		
CFAH_HUMAN	Complement factor H	1,028	1,190	0,964	1,060	9,521	0,937	0,768	1,002	0,902	9,895	0,851		
CLUS_HUMAN	Clusterin	1,339	1,418	1,343	1,367	3,644	0,558	0,724	0,628	0,637	6,831	0,466		
CO4A_HUMAN	Complement C4-A precursor	0,857	0,977	0,828	0,887	6,468	1,077	1,009	1,113	1,066	4,321	1,202		
CO6_HUMAN	Complement component C6	1,019	1,020	0,847	0,962	8,119	0,951	0,953	1,090	0,998	6,502	1,037		
FETUA_HUMAN	Alpha-2-HSglycoprotein	1,035	0,934	0,987	0,985	4,127	0,929	1,053	0,978	0,987	5,091	1,002		
GELS_HUMAN	Gelsolin	0,843	1,118	1,024	0,995	11,396	1,214	0,840	0,947	1,000	15,738	1,005		
HEMO_HUMAN	Hemopexin	0,908	1,035	1,129	1,024	9,044	1,110	0,941	0,883	0,978	9,662	0,955		
HPT_HUMAN	Haptoglobin- LMW	1,245	1,380	1,326	1,317	5,561	0,666	0,719	0,614	0,666	4,276	0,506		
HPT_HUMAN	Haptoglobin- HMW	1,624	2,009	1,464	1,699	22,875	0,295	0,423	0,478	0,399	7,669	0,235		
IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	1,372	1,087	1,243	1,234	11,680	0,514	0,912	0,696	0,707	16,277	0,573		
KNG1_HUMAN	Kininogen-1 LMW	0,879	0,836	0,843	0,853	1,895	1,146	1,104	1,168	1,139	2,641	1,336		
KNG1_HUMAN	Kininogen-1 HMW	1,220	1,294	1,201	1,238	4,001	0,706	0,758	0,715	0,726	2,244	0,586		
RET4_HUMAN	Retinol-binding protein 4	1,862	2,549	1,971	2,127	30,167	0,166	0,219	0,155	0,180	2,786	0,085		
SAA_HUMAN	Serum amyloid A protein	1,663	2,274	1,691	1,876	28,179	0,192	0,303	0,228	0,241	4,627	0,128		
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	0,719	0,609	0,756	0,695	6,237	1,413	1,357	1,296	1,356	4,788	1,951		
TTHY_HUMAN	Transthyretin	0,992	0,928	1,013	0,978	3,640	0,985	1,073	0,962	1,006	4,774	1,030		
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	1,122	1,088	1,183	1,131	3,906	0,813	0,912	0,857	0,861	4,058	0,761		
ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	0,860	0,883	0,806	0,850	3,215	1,075	1,137	1,140	1,117	2,982	1,315		
AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	1,115	1,209	1,158	1,161	3,845	0,842	0,813	0,769	0,808	3,012	0,696		

Tabelle 17: Spotquantitäten der 26 untersuchten Proteine des DIGE-Experimentes D. Vergleich von depletiertem Serum der Gruppe Rheuma (RA) mit dem der Gruppe Gesund (GES). (MW) Mittelwert; (SD) Standardabweichung, (Ratio) Quotient der Mittelwerte der Vergleichgruppen. Spotquantitäten sind in Volumen-Prozent angegeben.

11 Abstract

The rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systematic inflammatory disorder that affects primarily the joints and will lead to a progressive destruction of the articular cartilage and ankylosis. Other clinical manifestations are inflammation in the lungs, pericardium, pleura, sclera and subcutaneous nodular lesions. About 1 % of the world's population is affected by RA whereas women are affected three times more often than man. The onset is most frequent in 40 to 50 years.

Although there are specific immunological blood tests and the diagnosis is fairly well categorized by the criteria for the classification of rheumatoid arthritis the confirmation of the diagnosis strikes often too late for a matutinal therapy. This circumstance leads to an arising need for valid biomarkers in order to diagnose this disease as early as possible.

In this work human serum and activated synovial fibroblasts were analysed via a two step proteomic approach to discover a protein-based marker for the RA. In the first step activated synovial fibroblasts were obtained by digest with collagenase of human synovia, cultivated and analyzed by 2D-SDS-PAGE. Specific fragments of vimentin were significantly regulated and could only be detected in the fibroblasts of RA-patients. Vimentin is aspersed to be a mediator in the inhibition of the release of p53 and could modulate the resistance against apoptosis in these cells.

The second step human serum was analysed by DIGE. Prior to analysis the serum was depleted using a MARC (*multiple affinity removal column*) in oder to visualise low abundant proteins. Serum amyloid A protein (SAA) was significantly upregulated in the sera of RA compared to the sera of osteoarthritis (OA) patients. SAA is a key mediator in the release of matrix-metallo-proteases, modulates the release of inflammatory cytokines and could emerge to take an active part in the pathogenesis of the RA.

Furthermore a fractionation technique based on reverse-phase chromatography was developed to enhance the visualisation of *low abundant* proteins.

12 Danksagung

Ich möchte mich hiermit ganz herzlich bei Prof. Dr. G.A. Müller für die Möglichkeit bedanken, dass ich meine Doktorarbeit in seinem Forschungslabor habe durchführen können und für die Bereitstellung des Themas.

Ich danke Frau Prof. Dr. Hoyer-Fender für die Betreuung meiner Doktorarbeit und für die anregenden Gespräche und Ideen. Prof. Dr. Groß danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ich danke Herrn PD Dr. Dihazi für seine engagierte und aufschlussreiche Betreuung meiner Arbeit. Für die Unterstützung im klinischen Bereich möchte ich Frau PD Dr. med. Blaschke danken. Ganz besonderer Dank geht an Dr. Mai von den Orthopädischen Kliniken Kassel gGmbH für die freundliche und kompetente Korrespondenz und die Bereitstellung der Synoviaprobe, ohne die diese Arbeit kaum möglich gewesen wäre.

Ich danke dem Team der Proteomics Einheit, insbesondere Elke Brunst-Knoblich für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit, sowie dem Team des Routinelabors unter der Leitung von Herrn Dr. Wessels für die Hilfe bei der Akquirierung der klinischen Daten. Dr. Nitin Argawal danke ich für die Einführung in den klinischen Laboralltag. Bei Rabi Raj Datta, Bettina Buchmaier, Moritz Hoffmann, Cosima Baumann und Souad Bazra möchte ich mich für die erfrischenden Momente im Alltag und das konstruktive freundschaftliche Arbeitsklima bedanken. Spezieller Dank geht an Hannes Vossfeld und Nadine Dannemann.

In der AG Klinische Chemie geht besonderer Dank an Dr. Streit für die Hilfe bei chromatographischen Fragestellungen und der freundlichen Bereitstellung des LC-Systems. Des Weiteren danke ich Dr. Asif für die Proteinidentifizierungsarbeiten.

Für die Einarbeitungszeit im Bereich LC danke ich ganz herzlich der AG Hanisch.

Dem Team der molekularen Gynäkologie danke ich für all die schöne Zeit, dabei insbesondere Martin Block, Dr. Stefanie Fister, Dr. Fadi Hussein und Antje Schubert.

Mein ganz besonderer herzlicher Dank gilt meinen Eltern für alles, was sie jemals für mich gemacht haben und noch tun werden.

Als letztes möchte ich Venita Daebel danken, die mir jeden Tag aufs Neue beweist, was Liebe, Geborgenheit und beispielloser Willen und Kraft bedeutet. Ohne sie wären die letzten Jahre sehr einsam, tier- und freudlos gewesen.

13 Lebenslauf

Name	Streich
Vorname	Jan-Hendrik
Geburtsdatum	15.Dezember 1977
Geburtsort	Oldernburg i.O.
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Adresse	Neuer Kamp 16 25451 Quickborn

Schulbildung

1984 - 1988	Goethe-Schule, Quickborn
1988 - 1998	Elsensee-Gymnasium, Quickborn
1995 - 1996	South Fork High School, Stuart, FL 34997 Vereinigte Staaten von Amerika

Ersatzdienst

1998 - 1999	Herzchirurgische Intensivstation Albertinen Krankenhaus, Hamburg
-------------	---

Hochschulstudium

1999 - 2005	Studium der Molekularen Biotechnologie Universität Bielefeld Abschluss: Diplom
05.2005 - 09.2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Bereich F&E Bibitec GmbH
11.2005 - 04.2006	Promotion Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie Göttingen
Seit 11.2005	Promotion Nephrologie und Rheumatologie Universitätsmedizin Göttingen