

Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Proteomische Analyse des Nierenzellkarzinoms:
Identifikation von potentiellen Biomarkern

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Annette Meyfarth

aus

Witzenhausen

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. H. Dihazi

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. H.-J. Radzun

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 03. August 2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	5
1.1 Das Nierenzellkarzinom	5
3.1.1 Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms.....	5
1.1.2 Therapie des Nierenzellkarzinoms	6
1.2 Proteomics	7
1.2.1 Methoden der Proteomforschung.....	8
1.2.1.1 SELDI-TOF-MS in der Proteomanalyse.....	9
1.3 Biomarker beim Nierenzellkarzinom	9
1.3.1 Galectin-1 als potentieller Biomarker für das Nierenzellkarzinom	11
1.4 Zielsetzung/ Fragestellung	12
2. Materialien und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Geräte und Chemikalien	14
2.1.2 Histopathologisches Material	17
2.2 Kryoschnitte, Fixierung und Hämatoxylin-Färbung	18
2.2.1 Anfertigung der Kryoschnitte	18
2.2.2 Fixierung und Färbung	18
2.3 Herstellung von Gewebelysat (Rattennieren)	19
2.4 Laser-Capture-Mikrodissektion (LCM)	19
2.4.1 Das Laser-Capture-Mikrodissektion-System	19
2.4.2 Funktionsprinzip der PALM-Laser-Mikrodissektion.....	20
2.4.3 Vorgang der Dissektion	20
2.5 SELDI-TOF MS (Surface-Enhanced-Laser-Desorption- and Ionisation)	21
2.5.1 Instrumentelle Einstellungen	22
2.5.2 Arbeitsablauf der SELDI-Analyse mit Gewebeschnitten	22
2.5.3 Arbeitsablauf der SELDI-Analyse mit Gewebelysat	23
2.5.4 Vorbereitung der Chips und Weiterverarbeitung der LCM-Proben	24
2.5.5 Statistische Analyse	24
2.6 Die Zwei-Dimensionale Gel-Elektrophorese	25

2.6.1	Vorbereitung der Proteinextrakte und Proteinfällung	25
2.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford	25
2.6.3	Die erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	26
2.6.4	Arbeitsablauf Probenvorbereitung für die IEF.....	26
2.6.5	Die zweite Dimension: Vertikale SDS-Gelelektrophorese (SDS-Page)	27
2.6.6	Arbeitsablauf der vertikalen SDS-Gelelektrophorese (SDS-Page)	28
2.6.6.1	Äquibrierung	29
2.6.6.2	Durchführung der SDS-Page.....	29
2.6.7	Coomassie-Färbung	29
2.6.7.1	Arbeitsablauf Coomassie-Färbung	30
2.6.8	Silberfärbung (nach Shevchenko et al., 1996).....	30
2.6.9	Trocknen der Gele	31
2.7	In-Gel-Proteinverdau	31
2.7.1	Protokoll tryptischer In-Gel-Proteinverdau	32
2.8	Massenspektrometrische Analyse	33
2.8.1	Arbeitsablauf ESI-Analyse.....	34
2.9	Datenbank-Suche	35
2.10	Western-Blot-Analyse	35
2.10.1	Vorbereitung der Proben für die SDS-Elektrophorese.....	36
2.10.2	Herstellung der Minigele.....	36
2.10.3	SDS-Elektrophorese	37
2.10.4	Tankblotting	37
2.10.5	Ponceau-S-Färbung.....	37
2.10.6	Antigendetektion.....	38
2.11	Immunhistochemie mit Galectin-1-Antikörper	38
2.11.1	Arbeitsablauf indirekte Immunfärbung	38
3.	Ergebnisse	40
3.1	Histologische Analyse der NZK-Gewebeschnitte (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)	40
3.2	Vergleichende SELDI-Analyse von Gewebeschnitten	41
3.2.1	Proteinprofil von Gewebeschnitten der Rattenniere	42
3.2.2	Proteinprofil von Gewebelysat der Rattenniere.....	44
3.2.3	Proteinprofil von Rattennierengewebe unter Zuhilfenahme der Laser-Capture- Mikrodissektionstechnik	44
3.2.4	Auswahl der Methode	45
3.2.5	Vergleichendes Proteinprofiling von Nierenzellkarzinom und normaler Niere	45
3.3	Proteomanalyse mit Hilfe der Zweidimensionalen Gelelektrophorese	52
3.3.1	2D-Gel von Rattennierengewebe unter Zuhilfenahme der Laser-Capture- Mikrodissektionstechnik	52
3.3.2	2D-Gel von Proteinextrakten aus normalem Nierengewebe.....	53
3.3.3	Identifizierung von Proteinen des Nierenzellkarzinomgewebes und normalen Nierengewebes	55
3.3.4	Cyclophilin-A-Expression beim Nierenzellkarzinom und normaler Niere	58
3.3.5	Expression von Rho dissociation inhibitor (GDI) beta (Rho GDI beta).....	59

3.3.6 Expression von Fatty acid binding protein 7 (B-FABP), brain beim Nierenzellkarzinom im Vergleich zur normalen Niere.....	60
3.3.7 Expression von Galectin-1 beim Nierenzellkarzinom im Vergleich zu normaler Niere	61
3.4 Western-Blot-Analyse von Galectin-1	62
3.5 Immunfärbung von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe.....	63
4. Diskussion	65
4.1 Biomarker beim Nierenzellkarzinom.....	65
4.2 Methoden zur Identifizierung spezifischer Proteinexpressionsprofile und Detektion von Biomarkern	65
4.2.1 Proteomanalyse mit SELDI-TOF-MS	66
4.2.2 Auswahl der Methode	67
4.3 Erstellung von charakteristischen Proteinprofilen mittels SELDI-TOF-MS beim Nierenzellkarzinom	68
4.3.1 Proteomische Analyse von Nierenzellkarzinomgewebeschnitten mittels SELDI-TOF-MS	68
4.3.2 SELDI-Analyse beim Nierenzellkarzinom	69
4.4 Proteomische Untersuchung von Nierenzellkarzinomgewebe mittels 2D-Page	70
4.4.1 Peptidyl-prolyl-isomerase A (Cyclophilin-A)	71
4.4.2 Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta (Rho GDI beta).....	71
4.4.3 Fatty acid binding protein, brain (B-FABP)	72
4.4.4 Galectin-1	73
5. Zusammenfassung	75
6. Literaturverzeichnis	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Unterschied Genom und Proteom.....	8
Abbildung 2: Abfolge der Proteomanalyse (Schrattenholz, 2001)	9
Abbildung 3: Methode zur direkten massenspektrometrischen Analyse von NZK-Zellen, kultiviert auf ProteinChips.	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines SELDI-TOF-MS und Abbildung eines Proteinbiochips.....	22
Abbildung 5: Schematische Darstellung der SELDI-Analyse	23
Abbildung 6: HE-gefärbte Gewebeschnitte vom Nierenzellkarzinom und von normaler Niere.	41
Abbildung 7: SELDI-TOF-MS-Messung von Gewebeschnitten unterschiedlicher Rattennieren in verschiedenen Molekularbereichen.....	43
Abbildung 8: SELDI-TOF-MS-Messung von Gewebelysat hergestellt aus verschiedenen Rattennieren.....	44
Abbildung 9: SELDI-TOF-MS-Messung von dissezierten Zellverbänden einer Rattenniere. ..	45
Abbildung 10: Proteinprofil von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe, m/z 15931 Da.	47
Abbildung 11: Proteinprofil von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe, m/z 15159 Da.	48
Abbildung 12: Proteinprofil von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe, m/z 7947 Da. .	49
Abbildung 13: Proteinprofil von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe, m/z 9948 Da. 50	
Abbildung 14: Proteinprofil von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe, m/z 14043 Da.	51
Abbildung 15: 12%iges Minigel von Rattennierengewebe, pH-Bereich 3-10.....	53
Abbildung 16: 12%ige SDS Page von Proteinextrakt aus normalem Nierengewebe, pH-Bereich 3-10 (Coomassie-Färbung).	54
Abbildung 17: Ausschnitt eines 12%igen 2D-Gels im pH-Bereich 3-10 vom Nierenzellkarzinom (A) und eines 2D-Gels von normaler Niere im pH-Bereich 3-10 (B) im Massenbereich von 10000 bis 20000Da.	55
Abbildung 18: Ausschnitt von 12%igen 2D-Gelen im pH-Bereich 3-10 vom Nierenzellkarzinom (A) und von normaler Niere (B) im Massenbereich von 25000 bis 50000 Da.....	57
Abbildung 19: Ausschnitt eines 2D-Gels vom normalem Nierengewebe (A) und von Nierenzellkarzinomgewebe (B) im Massenbereich von 14000 Da.	59

Abbildung 20: Ausschnitt eines 2D-Gels vom Nierenzellkarzinomgewebe (A) und von normalem Nierengewebe (B) im Massenbereich von 10-20 kDa.....	60
Abbildung 21: Ausschnitt eines 2D-Gels vom normalem Nierengewebe (A) und von Nierenzellkarzinomgewebe (B) im Massenbereich von 14000 Da.	61
Abbildung 22: Ausschnitt eines 2D-Gels vom Nierenzellkarzinom (A) und von normaler Niere (B) im Massenbereich von 14000 Da.	62
Abbildung 23: Western-Blot-Analyse von Nierenzellkarzinomgewebe.....	63
Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe mit einem Anti-Galectin-1-Antikörper.....	64
Abbildung 25: Immunhistochemie von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe mit einem Anti-Galectin-1-Antikörper.....	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach UICC.....	6
Tabelle 2: Klinische Befunde der Patienten mit NZK.....	17
Tabelle 3: Vorbereitung eines H50-Chips.....	24
Tabelle 4: Bradford-Pipettierschema	26
Tabelle 5: Fokussierprotokoll.....	27
Tabelle 6: Trenngellösung 12% für große Gele.....	28
Tabelle 7: Trenngellösung 12% für Minigele.....	28
Tabelle 8: Vorbereitungsprotokoll der Coomassi-Blau-Färbelösung.....	30
Tabelle 9: Entfärbelösung	30
Tabelle 10: Protokoll Silberfärbung	31
Tabelle 11: Trenngellösung 12%, pH 8,8	36
Tabelle 12: Sammelgellösung 4%, pH 6,8.....	36
Tabelle 13: Elektrophoreseprotokoll.....	37
Tabelle 14: Statistische Auswertung der SELDI-Spektren	52
Tabelle 15: Liste der identifizierten Proteine (pH 3-10) entsprechend zu Abbildung 17, gemessen mit Q-TOF und Datenbankvergleich	56
Tabelle 16: Liste der identifizierten Proteine (pH 3-10) entsprechend zu Abbildung 18, gemessen mit Q-TOF und Datenbankvergleich	58

Abkürzungsverzeichnis

2D-Page	Zwei-Dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin/ Bovines Serum Albumin
CHAPS	3-((3-cholamidopropyl)-dimethylamino)-propansulfat
Da	Dalton
DTT	1,4-Dithiothreitol
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-MS
FABP	Fatty acid binding protein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPR	Horseradish Peroxidase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kDa	Kilodalton
LCM	Laser capture mikrodisection
MALDI-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption- and Ionization-MS
MDR	Multi drug resistance
MS	Mass spectrometry
MW	Molekulargewicht
NZK	Nierenzellkarzinom
PBS	Phosphate buffered saline
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q-TOF	Quadropole-time of flight
RCC	Renal cell carcinoma
Rho-GDI	Rho GDP dissociation inhibitor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SELDI-MS	Surface-Enhanced-Laser-Desorption- and Ionization-MS
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylen-diamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time-of-flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Vol	Volumen

1. Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (NZK), auch genannt Grawitz-Tumor, ist eine eher seltene Tumorerkrankung. 2% aller malignen Erkrankungen sind Nierenzellkarzinome. Es handelt sich bei 95% aller Nierentumoren um Nierenzellkarzinome (Deutsche Krebsgesellschaft e.V. o.J.). In den letzten 50 Jahren gab es eine Zunahme des Auftretens von Nierenzellkarzinomen um 126% und eine Zunahme der Jahressterblichkeit um 36,5% (Jemal et al., 2003; Pantuck et al., 2001). Der Altersgipfel liegt beim NZK in der 5.- 7. Lebensdekade (Walther et al., 1997). Bei Männern liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 65 Jahren, bei Frauen liegt es bei 70 Jahren (Deutsche Krebsgesellschaft e.V. o.J.) Es erkranken etwa doppelt soviel Männer wie Frauen am Nierenzellkarzinom (Herold, 2003) Die Inzidenz des NZK ist weltweit ansteigend. Die Zunahme beträgt jährlich etwa 2% (Ljungberg et al., 2007). Die Ursache dafür ist unbekannt (Deutsche Krebsgesellschaft e. V. o.J.). Neben dem Anstieg der Neuerkrankungen konnte auch eine Erhöhung der krankheitsspezifischen Mortalität erfasst werden (Hock et al., 2002). Während man für das Jahr 1985 54.000 Todesfälle registrierte, wurde für das Jahr 2000 eine Anzahl von 102.000 Menschen weltweit errechnet, die der Krankheit erlagen (Mickisch et al., 2001). Beim Nierenzellkarzinom ist die 5-Jahres-Überlebensrate abhängig vom Tumorstadium. Für lokal begrenzte Tumore liegt sie bei 50-90%. Bei multipler Metastasenbildung beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nur noch 13%. Bei 25-30% aller Patienten mit Nierenzellkarzinom werden bei Diagnosestellung Metastasen gefunden (Motzer et al., 1996).

Beim NZK gibt es keine Frühsymptome. Symptome wie Hämaturie, Flankenschmerzen, unklares Fieber, Anämie usw. treten sporadisch auf und stellen meist Spätsymptome dar (Herold, 2003). 25-60% aller Nierenzellkarzinome werden sonographisch zufällig diagnostiziert (Mickisch et al., 2001; Jayson und Sanders, 1998).

Beim Nierenzellkarzinom können 5 verschiedene Subtypen unterschieden werden. Mit 80% kommt am häufigsten der klarzellige Typ vor. Daneben gibt es den chromophilen Typ (10%), den chromophoben Typ (5%), den Spindelzelltyp (1%) und den Bellini-Gang-Typ, welcher äußerst selten auftritt (Riede und Schaefer, 1999/2001).

3.1.1 Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms

Das Staging des Nierenzellkarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation maligner Tumore der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) des Jahres 2002 (Müller, 2006/2007):

- pT1 Karzinom, lokal begrenzt, bis zu einer Größe von 7 cm
 - Karzinom kleiner als 4 cm (pT1a)
 - Karzinom größer als 4 cm (pT1b)

- pT2 Karzinom größer als 7 cm, lokal begrenzt
- pT3 lokal fortgeschrittenes Karzinom
 - Karzinom durchbricht Fettkapsel bzw. ipsilateraler Nebennierenbefall (pT3a)
 - Karzinom mit makroskopischer Ausbreitung in die Vena cava unterhalb des Zwerchfells (pT3b)
 - Karzinom mit makroskopischer Ausbreitung in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells (pT3c)
- pT4 Karzinom mit Infiltration über die Gerota-Faszie hinaus

Der Status der Lymphknoten wird als pN0 bezeichnet, wenn keine befallenen Lymphknoten gefunden werden konnten. pN1 gilt, wenn eine Metastase in einem regionären Lymphknoten gefunden werden konnte. Wenn mehr als ein Lymphknoten befallen wurde, spricht man von pN2. Das Fehlen von Fernmetastasen wird als M0 bezeichnet, das Vorhandensein als M1 (Müller, 2006/2007). Das Grading des Nierenzellkarzinoms erfolgt nach zytopathologischen Gesichtspunkten, insbesondere nukleären Atypien, in drei Grade (G1-G3) (Thoenes et al., 1986).

Die Erkrankung wird in 4 Stadien eingeteilt und erfolgt nach UICC-Empfehlungen (siehe Tabelle 1) (Müller, 2006/2007)).

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach UICC (Müller, 2006/2007)

Stadium	T	N	M
1	T1	N0	M0
2	T2	N0	M0
3	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
4	T4	N0, N1	M0
	Jedes T	N2	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

1.1.2 Therapie des Nierenzellkarzinoms

Die Therapie des Nierenzellkarzinoms besteht in der Entfernung von Tumor und Niere samt Adrenaektomie und Lymphektomie (Herold, 2003). Kleine Tumoren bis zu einer Größe von 4 cm können erfolgreich organerhaltend operiert werden (Miller et al., 1999). Des Weiteren hat sich die organerhaltende Operation bei drohender und bereits vorbestehender Niereninsuffizienz oder bilateralen Nierentumoren durchgesetzt (Fergany et al., 2006). Bei Inoperabilität des Tumors kommen verschiedene Therapieansätze in Frage. Diese

Therapieansätze beinhalten Radiotherapie, Chemotherapie sowie Immuntherapie und werden in den meisten Fällen in palliativen Situationen angewendet. Die Radiotherapie kommt bei Metastasen zum Einsatz und stellt eine effektive palliative Behandlung im Falle von schmerzhaften lokalen Läsionen, wie sie von Metastasen verursacht werden können, dar (Fossa et al., 1982). Ein großes Problem in der Behandlung des NZK stellt die Multi Drug Resistance (MDR) des Tumors dar. Aufgrund von Multi-Drug-Resistance-Genprodukten spricht das NZK kaum auf Chemotherapeutika an (Fojo et al., 1987). Derzeit hat sich eine Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms mit den Immuntherapeutika Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- α 2 (IFN- α 2) etabliert. Die Wirksamkeit bzw. Remissionsrate beider Zytokine, auch in Kombination mit anderen Substanzen, wurde in vielen Studien untersucht (Pyrhönen et al., 1999, Atzpodien et al., 1999, CRECY-Studie (Negrier et al., 2000)).

Bisher gibt es beim Nierenzellkarzinom keine spezifischen Biomarker, die sich in der klinischen Routine durchgesetzt haben. Die mittlerweile frühere Diagnosestellung des NZK und die erweiterten Therapieoptionen haben die Prognose für Nierenzellkarzinompatienten in den letzten Jahren zwar positiv beeinflusst, ein großer Fortschritt läge weiterhin in der Identifikation von Biomarkern für das Nierenzellkarzinom hinsichtlich Verbesserung der Diagnosestellung, Therapie und Nachbetreuung der Tumorpatienten (Eichelberg et al., 2009).

1.2 Proteomics

Das Wort Proteomics leitet sich von dem Begriff Proteom ab. Proteom bedeutet die Gesamtheit aller **Proteine**, die zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen von einem **Genom** in einer Zelle exprimiert werden. Der Begriff Proteom wurde 1994 das erste Mal von Marc Wilkins formuliert (Wilkins et al., 1996). Das Wort Proteomics kennzeichnet die Methoden, die zu der Entschlüsselung des Proteoms dienen. Im Gegensatz zu dem Genom, welches in jeder Zelle des Organismus gleich ist, variiert das Proteom in Abhängigkeit von unterschiedlichen Faktoren und stellt somit eine dynamische Größe dar. Die Proteinexpression einer Zelle variiert also von Gewebe zu Gewebe. Das Proteom einer Tumorzelle unterscheidet sich von einer gesunden Zelle und auch das Proteinexpressionsmuster einer ruhenden Zelle unterscheidet sich von einer Wachsenden. Außerdem verfügt die Zelle über verschiedene Mittel, das Protein nach erfolgter Translation zu verändern. Dafür stehen ihr unterschiedliche Mechanismen, wie Glykosylierung, Phosphorylierung und Acetylierung zur Verfügung. Diese Proteinmodifikation ist genetisch festgelegt (Klose, 1999a). Genetische Informationen können also zu unterschiedlichen (phänotypischen) Ausprägungen führen. Das wird im Falle der Kaulquappe und des Froschs

besonders deutlich. Beide haben ein identisches Genom, aber ein völlig unterschiedliches Proteom (siehe Abb. 1).



Abbildung 1: Unterschied Genom und Proteom

Auf dem linken Bild ist eine Kaulquappe abgebildet, auf dem rechten Bild ein Frosch. Beide haben ein identisches Genom, aber ein völlig unterschiedliches Proteom. Dieser Unterschied zeigt, dass trotz desselben Genoms ein ganz anderer Phänotyp zu sehen ist.

Damit wird deutlich, dass die Hypothese „Ein-Gen-ein-Protein“ nicht stimmen kann. Ein Gen kodiert demnach mehrere Proteine. Durch posttranslationale Modifikation entstehen die verschiedenen Proteine mit ihren mannigfaltigen Funktionen (De Hoog und Mann, 2004). Es wird davon ausgegangen, dass es pro Protein 2-3 unterschiedliche Formen gibt (Klose, 1999b). Das Proteinmuster einer Zelle kann sich gegebenenfalls durch äußere Einflüsse, wie Umweltfaktoren, Genexpression, Medikamentengabe, Temperatur etc. innerhalb von Minuten verändern. Daran ist zu erkennen, dass das Proteom nicht statisch ist wie das Genom. Um das Proteinexpressionsmuster einer Zelle zu einer bestimmten Zeit zu analysieren, benötigt man die Proteomics-Methoden.

1.2.1 Methoden der Proteomforschung

Die Zwei-Dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-Page) ist die bekannteste und verbreitetste Methode der Proteomforschung. Schrattenholz (2001) beschreibt die 2D-Page als eine der leistungsstärksten analytischen Methoden, die der Trennung von tausenden von Proteinen dient. Neben der 2D-Page gibt es noch andere Methoden in der Proteomanalytik, die ebenfalls der Trennung von Proteingemischen dienen. Dazu gehören chromatographische Methoden, die Kapillarelektrophorese, Proteinchips, Protein-Mikroarrays sowie Molekulare Scanner. Diese Methoden eignen sich allerdings nur zur Darstellung und Untersuchung von Proteinen.

Zur molekularen Identifizierung der zu interessierenden Proteine dienen Massenspektrometrische Methoden. Die Massen der Peptide werden bestimmt und mit theoretischen Massenlisten verglichen. Auf diese Weise werden Wissenschaftler in die Lage versetzt, über Datenbankrecherche Proteine aus 2D-Gelen zu identifizieren (Schrattenholz,

2001). Massenspektrometer wie Elektrospray-Ionisations-MS (ESI-MS) und Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisations-MS (MALDI-MS) sind schonende Ionisationsverfahren, die seit ihrer Entdeckung ein wichtiges Werkzeug in der Proteinanalyse darstellen und ein Schlüsselinstrument in der Proteomforschung sind (Mann et al., 2001). Die Massenspektrometrische Proteinanalytik teilt sich in mehrere Schritte auf, die in Abbildung 2 zusammengefasst sind:

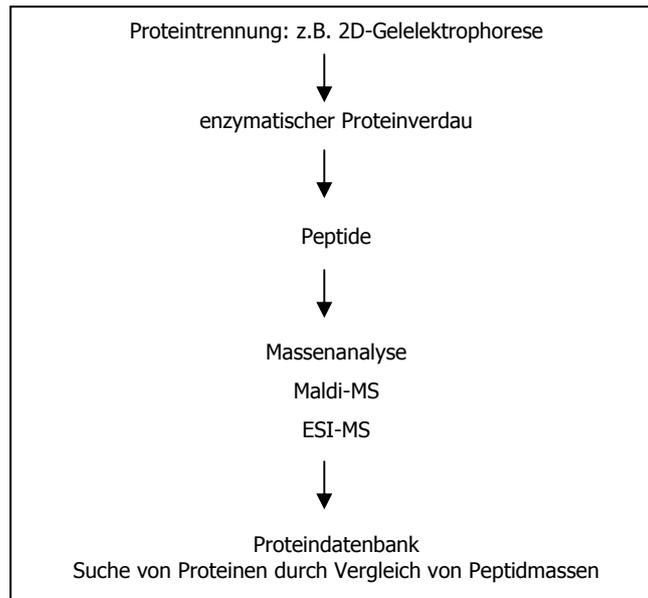


Abbildung 2: Abfolge der Proteomanalyse (nach Schrattenholz, 2001, S. 183)

Das zu untersuchende Proteingemisch wird im ersten Schritt zur Trennung der Proteine der 2D-Page zugeführt. Danach folgt der enzymatische Proteinverdau, durch den die Peptide in spezifische Peptidfragmanete zerlegt werden. Die Massen der Peptide werden mit MALDI-MS und/oder ESI-MS gemessen. Die Ergebnisse, d.h. die Peptidmassenlisten werden mit Massenlisten aus Proteindatenbanken verglichen. Auf diesem Weg können die Proteine identifiziert werden.

1.2.1.1 SELDI-TOF-MS in der Proteomanalyse

SELDI stellt eine neuartige Technologie dar, die mit hoher Sensitivität und hohem Probendurchsatz eine sehr effektive Probenanalyse ermöglicht. Als Resultat bekommt man ein Profil, welches die Massen und Intensitäten der einzelnen Proteine zeigt. Durch den Vergleich der verschiedenen Proteinprofile können mit Hilfe der zugehörigen Software unterschiedlich exprimierte Proteine detektiert werden.

1.3 Biomarker beim Nierenzellkarzinom

Ein Biomarker ist eine Substanz, eine Struktur oder ein Prozess, der selbst oder dessen Produkt im Körper messbar ist und der das Auftreten oder die Folgen einer Krankheit vorhersagen kann (World Health Organization, 2001).

Der Einsatz von Biomarkern in der Medizin dient der:

- Risikoabschätzung einer Erkrankung,
- Diagnosestellung einer bestehenden Erkrankung
- Charakterisierung des Schweregrads einer Erkrankung
- Beschreibung eines Therapieeffektes im Organismus
- Beurteilung bezüglich Sicherheit einer Therapie
- Identifizierung von Patientengruppen, die nicht von einer Therapie profitieren (Schmitz et al., 2008).

Biomarker existieren auf verschiedenen biologischen Ebenen. Auf der Protein-Ebene können biologische Marker identifiziert werden genau wie auf der Genom-Ebene und auf der metabolischen Ebene (Denkert, 2008). Wenn der menschliche Organismus erkrankt, dann kann es zu Veränderungen dieser Ebenen kommen.

Ein Tumorleiden zum Beispiel oder Fremdstoffe wie z.B. Medikamente können dazu führen, dass in einem Organismus bzw. in bestimmten Zellen oder Zellverbänden des Organismus, Veränderungen auf den verschiedenen Ebenen stattfinden. Die Screening Untersuchung bei Phenylketonurie ist ein Beispiel für Veränderungen der metabolischen Ebene. Die Mutation bei zystischer Fibrose spiegelt die veränderte Genom-Ebene wider. Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Veränderungen der Proteom-Ebene. Tumormarker sind Biomarker, deren Erscheinen bzw. deren erhöhte Konzentration in Korrelation mit dem Auftreten bzw. dem Verlauf einer tumorösen Erkrankung stehen (Brinkmann und Hertle, 2001). Ein Beispiel für einen Biomarker der Proteomebene ist das Prostata-spezifische Antigen (PSA) beim Prostatakarzinom. PSA wurde 1979 von Wang entdeckt (Wang et al., 1979). Die Messung des Tumormarkers PSA wird im Blut vorgenommen. PSA ist ein Protein, das in der Prostata (Vorsteherdrüse) gebildet wird und zur Verflüssigung des Samens beiträgt. In geringem Umfang ist PSA auch im Blut nachweisbar. Falls eine Erhöhung der PSA-Konzentration im Blut festgestellt wird, ist das Risiko, dass ein Prostatakarzinom vorliegt, erhöht (Deutsche Krebsgesellschaft e.V. o.J.). Des Weiteren dient der PSA-Wert der Verlaufskontrolle des Prostatakarzinoms.

Das Prostata-spezifische Antigen wird genau wie β -HCG und AFP beim Hoden- oder beim Chorionkarzinom vom Tumor selbst produziert und korreliert mit seiner Masse. Aus diesem Grund stellen diese Proteine optimale Tumormarker dar (Brinkmann und Hertle, 2001). Tumormarker dieser Art, die zur Diagnose und zum Verlauf herangezogen werden können, sind beim Nierenzellkarzinom bis zum heutigen Zeitpunkt nicht beschrieben worden. Daher ist die Entwicklung von Tumormarkern beim Nierenzellkarzinom gefordert.

1.3.1 Galectin-1 als potentieller Biomarker für das Nierenzellkarzinom

Dihazi et al. (2007) haben in ihrer Arbeit eine Methode für die Proteomanalyse von Nierenzellkarzinomzellen mit Hilfe der Protein-Chip-Technologie etabliert. Dabei wurden verschiedene NZK-Zelllinien in vitro direkt auf Protein-Chips für 24 Stunden kultiviert (siehe Abb. 3A). Die direkte massenspektrometrische Analyse mit SELDI-TOF-MS der Proteine der angehefteten Zellen ergaben identische Proteinprofile bei allen analysierten Zelllinien (siehe Abb. 3B). Die vergleichende Analyse der isolierten malignen Zellen von nativen Tumorproben mit den Zelllinien zeigten sehr ähnliche Proteinexpressionsmuster. Allerdings zeigten kultivierte primäre Kortezellen spezifische Unterschiede der Proteinprofile. Das differentielle Proteinprofiling der isolierten zytosolischen Fraktion und der angereicherten Membranfraktion der NZK-Zelllinien ergab, dass das Expressionsmuster der Membranproteine identisch zu denen der Gesamtzellen ist. Der Arbeitsgruppe gelang es mit Hilfe der proteomischen Analyse der chipbindenden Membranfraktion, drei Formen von Galectin-1 als potentiellen Biomarker für das Nierenzellkarzinom zu identifizieren. Die Protein-Chip-Analyse mit einem bindungsspezifischen Antikörper bestätigte die Ergebnisse, dass Galectin-1 ein Biomarker für das Nierenzellkarzinom sein könnte. Des Weiteren konnte mit immunhistochemischen Methoden die Überexpression von Galectin-1 beim Nierenzellkarzinom im Vergleich zur gesunden Niere gezeigt werden.

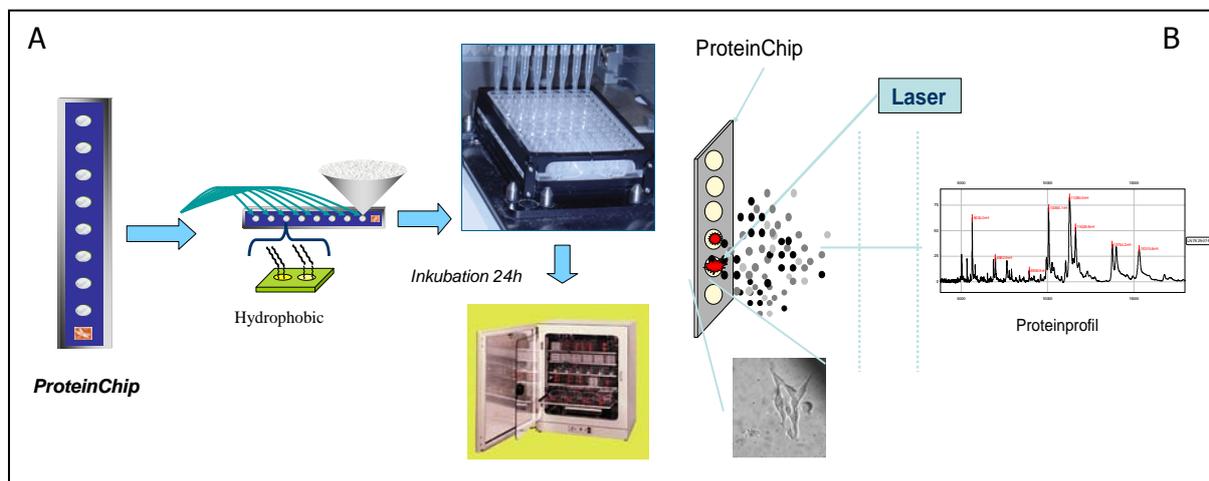


Abbildung 3: Methode zur direkten massenspektrometrischen Analyse von NZK-Zellen, kultiviert auf Protein-Chips.

NZK-Zelllinien werden direkt auf ProteinChips für 24h kultiviert (A). Die Proteine der kultivierten Zellen werden danach mit dem UV-Laser ionisiert und im Flugrohr beschleunigt, um anschließend im TOF-Detektor analysiert zu werden (B).

1.4 Zielsetzung/ Fragestellung

Das Nierenzellkarzinom ist gekennzeichnet durch eine hohe Letalität. Diese vergleichsweise hohe Letalitätsrate ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass das Nierenzellkarzinom aufgrund fehlender Früherkennungs- und Screeningmethoden erst relativ spät diagnostiziert wird. Gegenwärtig hat sich kein Biomarker bewährt, weder zur Detektion noch zum Monitoring von Krankheitsverlauf oder Therapie des NZK.

Neben der Erforschung spezifischer genetischer Veränderungen auf DNA- und RNA-Ebene ist es von größter Bedeutung, die Veränderungen der Proteomebene beim Nierenzellkarzinom zu erfassen. Studien im Rahmen der Proteomforschung konnten eine Reihe von Proteinen identifizieren, die mit dem Nierenzellkarzinom assoziiert sind. So werden die Proteine Ubiquinol cytochrome c reductase und NADH-ubiquinone oxido-reductase complex I beim NZK-Gewebe herunterreguliert (Sarto et al., 1997), während die manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) im normalen Nierengewebe nicht identifiziert werden kann (Unwin et al., 2003). Die Ermittlung der veränderten Proteinexpressionsmuster könnte ein besseres Verständnis der metabolischen Vorgänge auf zellulärer Ebene beim NZK ermöglichen. Es ist von großem Interesse, mehr Informationen über die Veränderung der Proteinebene zu erhalten und somit die Entstehung des Nierenkrebses auf der Proteomebene zu erfassen.

Die vorliegende Arbeit umfasst mehrere Zielsetzungen:

- Im Rahmen einer Studie, die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde (siehe Abschnitt 1.3.1), konnten spezifische Proteinprofile von NZK-Zelllinien erstellt und Galectin-1 als Marker für das Nierenzellkarzinom identifiziert werden (Dihazi et al., 2007). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Validierung dieses Markers auf der Gewebeebene, das heißt, es soll versucht werden, die Ergebnisse von Dihazi et al. auf Gewebeebene zu bestätigen und gegebenenfalls zu ergänzen.
- Hierzu folgte die Entwicklung und Etablierung einer Methode für die direkte Analyse des Proteoms von intakten Gewebeschnitten. Die Analyse erfolgte mit Hilfe von SELDI-TOF-MS (Surface-Enhanced-Laser-Desorption- and Ionisation-TOF-MS). Man erhält ein Spektrum, welches die Massen und Intensitäten der einzelnen Proteine zeigt. Durch den Vergleich der Proteinprofile von Nierenzellkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe ist es möglich, mit Hilfe der Software unterschiedlich exprimierte Proteine zu detektieren.
- Mit dieser neu entwickelten Methode erfolgte die Etablierung von spezifischen Proteinprofilen aus Nierenzellkarzinom- und gesundem Nierengewebe und daran anschließend die vergleichende Analyse der etablierten Profile und die Ermittlung von unterschiedlich exprimierten Proteinen.

- Zusätzlich zur Analyse der Proteinexpression mit SELDI-TOF konnte das Proteom von Nierenzellkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe durch die Herstellung von Zellysaten und 2-Dimensionalen Gelelektrophoresen dargestellt werden. Die Proteine wurden nach der Spaltung mit Trypsin massenspektrometrisch (Q-TOF) analysiert, durch Datenbankrecherche identifiziert und mit spezifischen Datenbanken verglichen. Proteine, die von Interesse waren, konnten mit der Western-Blot-Analyse und Immunfärbung bestätigt werden.

Durch die Etablierung von Biomarkern bzw. Tumormarkern beim Nierenzellkarzinom wäre es möglich, frühzeitig, das heißt Monate evtl. sogar Jahre vor Ausbruch der Erkrankung verlässliche Diagnosen zu stellen und damit die Patienten rechtzeitig einer tumororientierten Therapie zuzuführen. Somit könnte das pathologische Fortschreiten der Erkrankung verhindert werden. Des Weiteren wäre eine effektive Therapieüberwachung beim Nierenzellkarzinom gegeben. Mit Hilfe der SELDI-Analyse ist es realisierbar, charakteristische Proteinprofile von Nierenzellkarzinomgewebe und charakteristische Profile von gesundem Nierengewebe zu erstellen. Im Rahmen von Früherkennungsuntersuchungen wäre es ein großer Fortschritt, wenn sich diese Proteinprofile eventuell auch mit Serum- oder Urinproben reproduzieren ließen. Mit einer derartigen Screeningmethode könnte das Nierenzellkarzinom in einem frühen Krankheitsstadium erkannt werden und kausal therapiert werden. Die so nachgewiesenen spezifischen Proteinexpressionsmuster beim Nierenzellkarzinom können die Basis zur Identifizierung spezifischer Tumormarker bilden und so eventuell die Voraussetzung für eine Diagnosestellung zu einem frühen Zeitpunkt, eine Prognosedifferenzierung des Patienten und eine effektive Therapie bilden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril (ACN) 100%	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic Säure (HCCA) 30% Acrylamid/ Bisacrylamid	Applied Biosystems, Darmstadt Bio-Rad, München
Ameisensäure (Methansäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumbicarbonat (Ambic)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampholyte 3/10	Bio-Rad München
Ampuwa (destilliertes Wasser)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
BiomarkerPatterns- Software	Ciphergen Biosystems, Fremont, Californien, USA
Bioprozessor- Vorrichtung	Ciphergen Biosystems, Fremont, Californien, USA
Blotmembran Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences, UK
Bovines Serumalbumin (BSA)	Paesel und Lorei, Hanau
Bradford-Reagens	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Butanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid- Dihydrat	Merck, Darmstadt
3-((3-cholamidopropyl)-dimethylamino)-propansulfat (CHAPS)	Merck, Darmstadt
Deckgläser, 24 x 50 mm	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Elektrophoresekammer, Protean Cell	Bio-Rad, München
Eluierungssäulen	LC Packings, Dionex, CA, USA
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Roth, Karlsruhe
Eppendorfgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Filterpapier	Bio-Rad, München
Fokussierungskammer, Protean IEF Cell	Bio-Rad, München

Formaldehyd (37%)	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
Gel Dryer, Model 543	Bio-RAD, München
Gelkassette , Gelgießstand, Glasplatte, Spacer	Bio-RAD, München
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Handschuhe, Peha Soft	Hartmann, Heidenheim
Hämatoxylin	DakoCytomation, Glostrup, Denmark
Immobilisierter pH-Gradient-Streifen	Bio-Rad, München
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Iodacetamid	Sigma- Aldrich, Steinheim
IPG-Gelstreifen	Bio-Rad, Hercules, Kanada
Kryostat, Jung CM 3000	Leica, Wetzlar
Labor- Zentrifuge	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lichtmikroskop, binokular	Carl Zeiss, Jena
MALDI-Peptidgemisch zur Kalibrierung	Applied Biosystems, Darmstadt
MALDI-Edelstahl- Target	Applied Biosystems, Darmstadt
MALDI-TOF-MS	Applied Biosystems, Darmstadt
Mascot Peptid-Fingerprint Software	Matrix Science, Oxford, UK
MassLynx (v 4.0) Software	Mikromass, Manchester, UK
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Bio-Rad, München
Nano- ESI-Quadrupol-TOF-MS	Mikromass, Manchester, UK
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
PALM RoboSoftware	P.A.L.M., Bernried
Parafilm	Roth, Karlsruhe
PDQuest Image Analysis Software 6.1	Bio-Rad, Hercules, Kanada
Peptidgemisch zum Kalibrieren	Ciphergen Biosystems, Fremont, Californien, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluca, Seelze
Phosphate buffered saline (PBS)	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Photometer, Lambda	Perkin-Elmer & Co GmbH, Stuttgart
Pipettenspitzen (10, 20, 100, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Ponceau-S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Power Supply, Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech, UK
Precision Plus Protein Standard All Blue	Bio-Rad, München
ProteinChip-Arrays	Ciphergen Biosystems, Fremont, Californien, USA
Protein-Lynx-Global-Server (v2.1)	Mikromass, Manchester, UK
ProteinChip Biology System Reader	Ciphergen Biosystems, Fremont, Californien, USA

ProteinChip- Software 3.0	ProteinChip- Software 3.0
Q-TOF Ultima Global	Mikromass, Manchester, UK
Reaktionsgefäße (500, 1500, 2000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nürmbrecht
Roti-Blue, kolloidale Coomassie-Färbelösung	Roth, Karlsruhe
Scanner, Molecular Imager PhorosFX Systems	Bio-Rad, München
Schüttler, Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fluka BioCemika, Buchs, Schweiz
Silbernitrat (AgNO ₃)	Karl Roth GmbH
SilverQuest Destainer A	Invitrogen life technologies, Paisley, UK
Sinapinsäure	Ciphergen Biosystems, Fremont, Californien, USA
Speed Vakuum Zentrifuge, SVC 10 CH	Savant, Holbrook, NY, USA
Superfrost-Plus Objektträger	Menzel, München
Thiourea	Sigma- Aldrich, Steinheim
Tissue freezing medium	Jung, Nussloch, Deutschland
Tissue Tek	Sakura, Zoeterwonde, Niederlande
Trifluoressigsäure (TFA) 100%	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
Ultraschall-Wasserbad	Bandelin Sonorex, Berlin
Ultraschallpulser, Branson Sonifer 250	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Urea für Elektrophorese	Sigma- Aldrich, Steinheim
Vakuumzentrifuge	Kendro, Hanau
Vitro-Clud	Langenbrinck, Teningen
Vortexer, REAX Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Voyager- DE STR time-of-flight MS	Applied Biosystems, Darmstadt
Waage, Universal	Sartorius, Göttingen
Western Blot Apparatur, X Cell TM Blot Module	Bio-Rad, München
Xylol (Isomere)	Roth, Karlsruhe
Zentrifuge, Biofuge 15 R	Heraeus Sepatech, Berlin
Zentrifuge Sigma 3-18K	Sigma, Osterode
Zentrifuge, Optima TM TL Ultrazentrifuge 100.000 U/ min, Modell TL-100	Beckmann, Palo Alto, USA

2.1.2 Histopathologisches Material

Zur Optimierung der Methode wurde zunächst mit gesunden Rattennieren gearbeitet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Untersuchungen wurden an Nierenkarzinomgewebe und gesundem Nierengewebe durchgeführt, welche zu einem früheren Zeitpunkt im Rahmen einer anderen Studie entnommen wurden. Ein Ethikvotum liegt vor. Die histologisch gesicherten ca. 0,5 x 0,5 cm großen Karzinomgewebe und gesunden Nierengewebe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Insgesamt handelte es sich bei den 18 Nierenkarzinomgeweben um meist klarzellige NZK, teilweise aber auch um onkozytäre, sarkomatoide oder papilläre NZK (siehe Tabelle 2). Die 12 gesunden Nierengewebe stammen aus dem gesunden Abschnitt einer Karzinomniere.

Tabelle 2: Klinische Befunde der Patienten mit NZK

Patient	Geschlecht	Alter	Diagnose	Malignitätsgrad
P1	M	36	RCC, klarzellig	G2 – G3
P2	F	61	RCC, klarzellig	
P3	F	66	RCC, hellzellig	G2
P4	M	70	RCC, klarzellig	G2
P5	M	55	RCC, klarzellig	G2
P6	M	63	RCC, klarzellig	G1
P7	M	66	RCC, sarkomatoid	G3
P8	F	63	RCC, klarzellig	G2
P9	M	58	RCC, papillär	
P10	M	68	RCC, klarzellig	G2
P11	M	67	Lungenmetastase eines RCC, hellzellig	
P12	M	69	RCC, zystisch	G2
P13	M	76	RCC, klarzellig	
P14	F	38	RCC, papillär	G2
P15	M	42	RCC, klarzellig	
P16	M	29	RCC, papillär	G2
P17	M	64	RCC, klarzellig	G2
P18	F	35	RCC, onkozytär	

2.2 Kryoschnitte, Fixierung und Hämatoxylin-Färbung

2.2.1 Anfertigung der Kryoschnitte

Zur Anfertigung der Kryoschnitte wurden frische Nierengewebe und Nierengewebe, welche in Flüssigstickstoff eingefroren waren, verwendet. Die Nierengewebe wurden mit dem Skalpell in 0,5 x 0,5 cm große Stücke geschnitten und zusammen mit Gefriermedium (Tissue freezing medium von Jung) in kleine dafür vorgesehene Kryoformen (Tissue Tek von SAKURA) eingebettet. Diese wurden unverzüglich in flüssigen Stickstoff getaucht. Bereits eingefrorenes Gewebe wurde kurz angetaut und daraufhin ebenfalls in definiert große Stücke geschnitten. Bis zur Bearbeitung mit dem Kryomikrotom (Leica) wurden die in Gefriermedium gebetteten Gewebe bei -80°C aufbewahrt.

Es wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte wie folgt angefertigt:

Die Gewebeproben wurden aus dem Gefrierschrank genommen und auf Trockeneis zum Kryomikrotom transportiert.

Das in Gefriermedium gebettete Tumorstück wurde vorsichtig aus der Kryoform gelöst und sofort mit Gefriermedium auf den Objekthalter (-22°C), welcher sich in dem Kryomikrotom befand, festgefroren. Das Kryomikrotom wurde im Vorfeld auf -24°C gekühlt. Die Schnittstärke wurde auf 5 µm eingestellt, um Serienschnitte anzufertigen. Diese Schnitte wurden auf Superfrost-Plus Objektträger aufgebracht.

2.2.2 Fixierung und Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurde zur orientierenden Übersichtsfärbung verwendet. Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff, der alle basophilen Strukturen, wie Zellkerne, blau anfärbt. Bei Eosin handelt es sich um einen sauren Farbstoff, der Zellstrukturen, die azidophil sind, rot anfärbt. Dazu zählen insbesondere die Proteine des Zytoplasmas.

Die auf dem Objektträger befindlichen Schnitte wurden kurz luftgetrocknet. Anschließend wurden sie in einem Methanol/Aceton-Gemisch (1:1) 10 Minuten bei -20°C fixiert. Danach wurden die fixierten Schnitte 5 min lang in PBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal wiederholt.

Nach dem Waschvorgang erfolgte die Hämatoxylin-Färbung für mindestens 5-7 Minuten. Es folgte ein 5 minütiger Waschvorgang unter fließendem Leitungswasser. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte mit Eosin für maximal 20 Sekunden gefärbt. Nach einem kurzen Waschschrift in Aqua dest. wurden die Schnitte für 1 min in 70% Ethanol, für 2 min in 90% und für 2 mal 2 min in 100% Ethanol entwässert. Die Fixierung erfolgte zweimal 1 min in

Xylol. Zur Haltbarmachung der Gewebeschnitte wurden sie mit Vitro-Clud Einschlussmittel eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

2.3 Herstellung von Gewebelysat (Rattennieren)

Die frischen Rattennieren wurden mit einem Skalpell in vier gleich große Teile geschnitten. Einem Stück der Rattenniere wurden 2 ml Lysis-Puffer (Urea 9,5 M, CHAPS 2% (w/v), Ampholyte 2% (v/v), DTT 1%, PMSF 1 mM) hinzugefügt, anschließend wurden die Gewebestücke 3 x 10 sec mit jeweils 1 min Pause auf Eis mit Ultraschall lysiert.

Zum Vergleich wurde ein zweites Stück ebenfalls mit Lysis-Puffer versetzt und im Anschluss mit einem Mörser bearbeitet. Beide Proben wurden jeweils 30 min mit 15000 rpm zentrifugiert. Der Absatz wurde verworfen und der Überstand jeweils wieder mit 15000 rpm 30 min zentrifugiert. Der Überstand der zweiten Zentrifugation entspricht dem Gewebelysat der Rattenniere, der nun mit SELDI analysiert werden konnte.

2.4 Laser-Capture-Mikrodissektion (LCM)

2.4.1 Das Laser-Capture-Mikrodissektion-System

Die Laser-Capture-Mikrodissektion ist eine Mikrodissektionstechnik, mit der unter mikroskopischer Sicht verschiedene Zellverbände lasergestützt von anderen getrennt werden können. Im Falle von Gefrierschnitten der Niere können Glomeruli mittels der LCM von dem angrenzenden Nierengewebe isoliert „herausgeschnitten“ werden. Dies gewährleistet eine hohe Reinheit des zu untersuchenden Gewebes. Im National Institute of Health (Washington, USA) wurde die LCM entwickelt. Publiziert wurde diese Methode 1996 von Emmert-Buck und Mitarbeitern (Emmert Buck et al., 1996).

Das Laser-Capture-Mikrodissektion-System besteht aus einem binokularen Lichtmikroskop (ZEISS), welches mit drei Objektiven versehen ist (10x, 20x, 40x), einem Laser (Palm by P.A.L.M. Mikrolaser Technologie, Wolfratshausen, Deutschland), einer Videokamera (Sony 3CCD Color Video Camera) und einem Monitor. Zur Einstellung und Dokumentation ist ein Computer angeschlossen. Der Objektträger ist auf dem Objektisch befestigt. Diese Einheit aus Objektisch und Objektträger kann, außer mit dem Objektführer, auch mittels der Computertastatur in x- und y-Richtung bewegt werden. Oberhalb des Objektträgers befindet sich ein Transportarm, in den der Cap eines Sample Tubes hineingelegt wird. Der Transportarm, der an dem Objektisch befestigt ist, wird aufgrund dessen simultan mit dem Objektisch mitbewegt. Der Transportarm mit dem Cap ist höhenverstellbar. Für den Vorgang der Laserdissektion sollte der Cap nahezu auf dem zu dissezierenden Gewebe aufliegen.

Das PALM System benutzt einen Nitrogen Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm. Der Laser, welcher durch ein Objektiv fokussiert wird, verfügt über genügend Energie, um einzelne Zellverbände, die sich in diesem Focus befinden, herauszulösen. Dieser Vorgang unterliegt einem Mechanismus, bei dem chemische Verbindungen in dem Gewebe zerstört werden und auf diese Art und Weise Zellverbände, die von Interesse sind, von dem übrigen Gewebe isoliert werden können. Die restliche Energie des defokussierten Laserstrahls wird benötigt, um das dissezierte Material in das Auffangbehältnis, den Cap, zu katapultieren und dort zu sammeln.

2.4.2 Funktionsprinzip der PALM-Laser-Mikrodissektion

Für die LCM benötigt man einen durchsichtigen Cap eines Tubes (PCR Tubes 0,2ml, Biozym budget line). Dieser wird mit der Innenseite nach unten auf die Vorrichtung des Transportarms platziert. Nun wird der Transportarm in der Höhe verstellt und zwar so, dass der Cap dem Objektträger mit dem Gewebeschnitt nahezu aufsitzt. Die relevanten Zellverbände werden unter mikroskopischer Sicht bzw. unter Abbildung auf dem Monitor mit entsprechender Software (PALM RoboSoftware) markiert (Graphic toolbar) und anschließend mit dem Laserstrahl beschossen. Verschiedene Einstellungen des Lasers, wie der Laser-Focus und die Laserenergie können mit der zugehörigen Software variiert werden.

Die Laserenergie sorgt zum einen dafür, dass die interessierenden Zellen aus dem übrigen Zellverband gelöst werden und zum anderen, dass diejenigen beschossenen Zellen in den Cap katapultiert werden.

2.4.3 Vorgang der Dissektion

Von der Anfertigung der Gefrierschnitte bis zur Laser Capture Mikrodissektion wurde mit unsterilen Einmalhandschuhen gearbeitet. Der Objektträger mit dem 5 µm dicken Gefrierschnitt, welcher mit Hämatoxylin gefärbt war, wurde auf dem Objektisch befestigt. Die Innenfläche des Caps wurde mit 10 µl Harnstoffpuffer benetzt und anschließend, wie unter 2.4.1 beschrieben, über dem Gewebe befestigt. Mit Hilfe der Laser-Software wurden die für die Arbeit relevanten Zellverbände markiert. Nun wurden die markierten Areale mit dem Nitrogen Laser beschossen. Der Laser schoss zuerst der Markierung entlang, umkreiste also das Areal, um im Anschluss die Zellen, welche sich innerhalb der Markierung befanden, zu beschießen und in den Cap zu katapultieren. Nach dem Dissektionsvorgang wurde der Tube mit dem Cap, der die dissezierten Zellen und den Harnstoffpuffer enthielt, verschlossen und bei 14000 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert. Im Anschluss an diesen Vorgang wurde der Cap wieder mit 10 µl Harnstoff gespült und nochmals zentrifugiert. Danach konnte mit

der Probe entweder direkt weitergearbeitet werden oder sie wurde im Gefrierschrank bei -20° gelagert und zu einem beliebigen Zeitpunkt für SELDI (siehe Abschnitt 2.5.3) genutzt.

2.5 SELDI-TOF MS (Surface-Enhanced-Laser-Desorption- and Ionisation)

Die SELDI-Proteinchip-Technologie (Ciphergen, CA, USA) stellt eine Methode zur massenspektrometrischen Charakterisierung von Proteinen und Peptiden dar. Durch SELDI werden zwei verschiedene Verfahren zweckmäßig zusammengefügt. Das ist zum einen die Massenspektrometrie, zum anderen die Chromatographie.

SELDI steht für Surface-Enhanced-Laser-Desorption- and Ionisation. Bei der SELDI-Analyse kommen Proteinbiochips zum Einsatz. Ein Chip besteht aus einem Aluminiumstreifen, auf dem jeweils acht runde Spots sichtbar sind. Diese Spots sind mit speziellen chromatographischen Oberflächen versehen, damit eine Anreicherung der Proteine, aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften, auf dem Chip möglich ist. Die chromatographischen Oberflächen bestehen aus anionischen oder kationischen Ionenaustauschern, metallaffinen sowie hydrophilen oder hydrophoben Oberflächen. Zu den Ionenaustauscher-Chips gehören der WCX (Weak Cationic Exchanger) und der SAX (Strong Anionic Exchanger). Zu den Metallaffinitätschips zählt der IMAC-Chip (Immobilized Metal Affinity Chromatography). Zu den hydrophoben Chips gehören der H50- und H4-Chip (Hydrophobic). In Abhängigkeit zu den chromatographischen Oberflächen müssen die Chips vor der Probenmessung mit entsprechenden Puffern vorbereitet werden, damit die Proteine der Probe optimal an die Oberfläche binden können. Die beschichteten Oberflächen mit den darauf gebundenen Proteinen werden, bevor sie mit dem UV-Laser ionisiert werden, ebenfalls mehreren Waschschritten unterworfen. Die Analyse der auf den Spots gebundenen Proteine erfolgt, nachdem Matrixsubstanz hinzugefügt wird, in dem TOF-Massenspektrometer. Die auf den Spots gebundenen Proteine werden nun mit einem UV-Laser von der bindenden Oberfläche gelöst und im Flugrohr beschleunigt (Schrattenholz, 2001). Das Massenspektrometer ermittelt die Flugzeit eines Proteins in dem relativ kurzen Flugrohr. Anhand der Flugzeit kann das Molekulargewicht des Proteins bzw. des Peptids errechnet werden. Das dadurch erhaltene Massenspektrum stellt ein Proteinprofil dar.

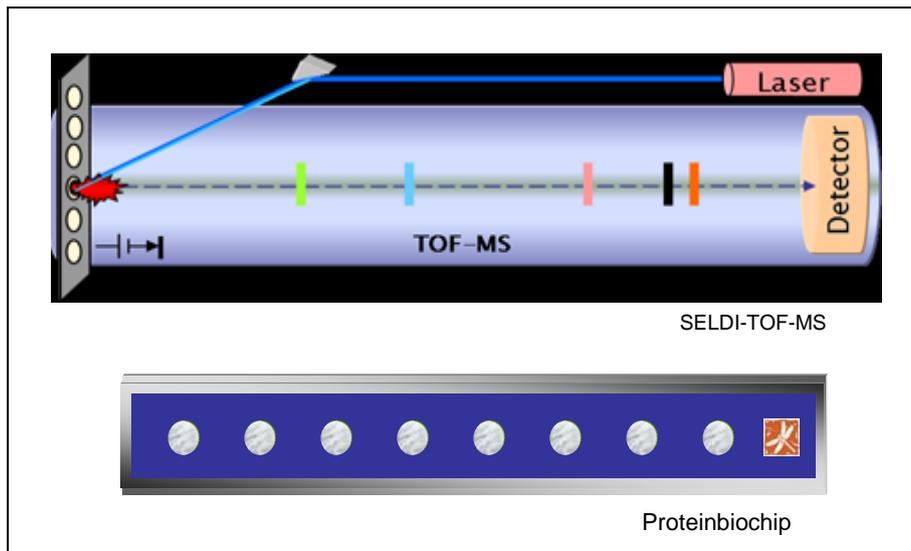


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines SELDI-TOF-MS und Abbildung eines Proteinbiochips.

Die auf dem Spot des Proteinbiochips gebundenen Proteine werden mit dem UV-Laser ionisiert, im Flugrohr beschleunigt und anschließend detektiert.

2.5.1 Instrumentelle Einstellungen

Folgende Einstellungen wurden für das Gerät vorgenommen: Der Messbereich lag in der Größenordnung von 2000-50000 Da, die Laser Intensität wurde auf 200 U und die Detektor Sensitivität auf 8 gestellt. Die „focus mass“ lag im Bereich von 10000 Da. Pro Spot wurden durchschnittlich 80 Laserschüsse abgegeben. Es wurde extern kalibriert unter Zuhilfenahme von bovinem Insulin (m/z 5733.6), bovinem Ubiquitin (m/z 8564.8), bovinem Cytochrom c (m/z 12230.9) und boviner Superoxid-Dismutase (m/z 15591.4). Die Werte wurden analysiert mit der Ciphergen Protein Chip Software 3.2 und Biomarker Wizard. Alle Werte wurden normalisiert mit der TIC-Normalisierungsfunktion anhand der Software-Instruktionen.

2.5.2 Arbeitsablauf der SELDI-Analyse mit Gewebeschnitten

Protein-Chips haben den Vorteil, dass sie dank ihrer chromatographischen Oberfläche mit Zell-Oberflächenproteinen interagieren können, was zu einer sehr starken Bindung der Zellen mit den Chip-Oberflächen führt. Um die Auswirkungen der verschiedenen Oberflächen auf das Proteinprofil zu analysieren, haben wir Messungen mit Gewebeschnitten auf verschiedenen Protein-Chips (WCX2, SAX2, H4, H50 und IMAC) durchgeführt.

Die zu untersuchenden Gewebe wurden wie in Abschnitt 2.2.1 mit dem Mikrotom in 5 μm dicke Gefrierschnitte geschnitten. Diese Schnitte wurden jedoch nicht, wie in 2.2.1 beschrieben, auf den Objektträger platziert, sondern jeweils direkt auf den Spot des Bioproteinchips (H4) aufgebracht. Zur besseren Interaktion zwischen Chipoberfläche und

Gewebe musste der Chip 3 x 5 min mit 1% TFA äquilibriert werden. Nun wurden die Gewebeschnitte auf die Spots des Chips appliziert. Anschließend wurde 2 x mit 1% TFA jeweils 10 Minuten auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem zweiten Waschvorgang ließ man den Chip trocknen, um anschließend 1 µl Matrix pro Spot aufzutragen. Es wurde abgewartet, bis die Matrix getrocknet war, um nochmals 1 µl Matrix auf jedem Spot zu applizieren. Nach Trocknung der Matrix konnte der Chip mit den Proben mit dem „ProteinChip Biology System Reader“ (Model PBS II, CIPHERGEN Biosystems) analysiert werden.

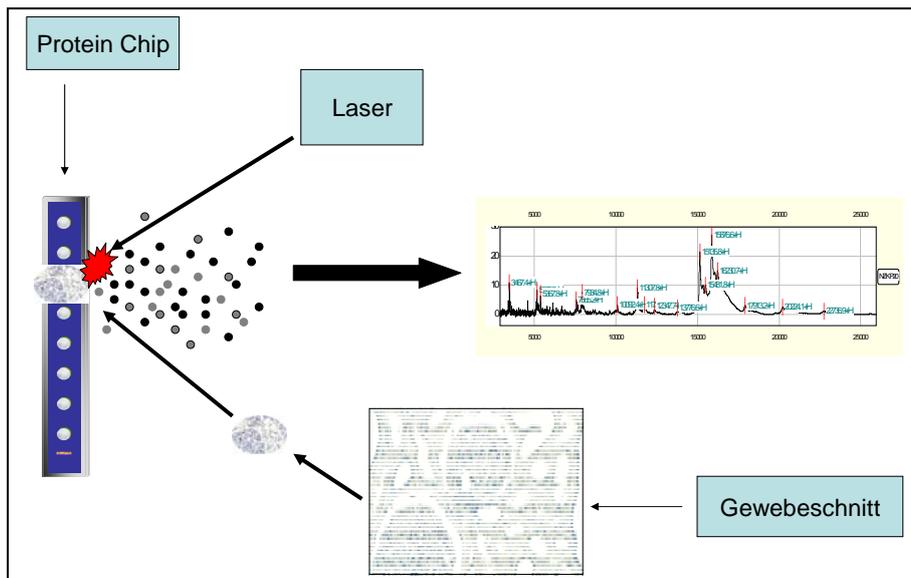


Abbildung 5: Schematische Darstellung der SELDI-Analyse

Ein Gewebeschnitt (Tumorgewebe oder normales Nierengewebe) wird direkt auf einem Spot des Proteinbiochips platziert. Im SELDI-TOF-MS werden die gebundenen Proteine mit einem UV-Laser ionisiert und im Flugrohr beschleunigt, um dann anschließend im TOF-Detektor analysiert zu werden.

2.5.3 Arbeitsablauf der SELDI-Analyse mit Gewebelysat

Das Gewebelysat wurde, wie unter 2.3 beschrieben, hergestellt. Für die SELDI-Analyse mit Gewebelysat wurde der H50-Chip verwendet. In mehreren Versuchen, wie unter 2.5.2 beschrieben, wurde der H50-Chip aufgrund der Gewebelysat-Chipoberflächeninteraktion als der Günstigste bewertet, der die besten Ergebnisse lieferte. Für die Weiterverarbeitung der Proben müssen die Chips für die Proteinbindung vorbereitet werden. Dazu wird ein Bioprozessor benötigt. Ein Bioprozessor dient der optimalen Chipvorbereitung und der darauf folgenden Probenapplikation. Er besteht aus einem Halteapparat für die Chips sowie aus einem Aufsatz, der die Spots abdichtet und es ermöglicht, die entsprechenden Puffer und Proteingemische genau zu applizieren. Die Auswahl der Puffer sowie die Anzahl und Dauer der Waschvorgänge zur Bindung der Proteine wurden für einen H50-Chip wie folgt optimiert:

Tabelle 3: Vorbereitung eines H50-Chips

Lösung	Menge (µl)	Anzahl der Waschschrirte	Dauer (min)
50% Acetonitril	100	3	10
80% Acetonitril	100	3	10
1% TFA	100	2	10

Alle Waschschrirte erfolgten auf einem Schüttler. Nach jedem Waschschrirte wurde der Puffer verworfen. Nach der Vorbereitung des Chips erfolgte die Applikation der Probe. 20 µg des Gewebelysats (siehe Abschnitt 2.3) wurden nun mit 80 µl 1% TFA versetzt und anschließend für 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Probe auf dem Chip aufgetragen und für eine Stunde auf den Schüttler gestellt. Im Anschluss wurde zweimal mit 1% TFA für 10 min gewaschen. Daraufhin wurde der Chip mit den zu messenden Proben aus dem Bioprozessor gelöst, um an der Luft zu trocknen. Nachdem die Probe auf den Spots getrocknet ist, wurde zweimal 1 µl Matrix aufgetragen. Anschließend wurde der Proteinchip mittels „Protein chip reader“ analysiert.

2.5.4 Vorbereitung der Chips und Weiterverarbeitung der LCM-Proben

Für die Weiterverarbeitung der mit dem LCM-Gerät gewonnenen Proben müssen die Chips ebenfalls für die Proteinbindung vorbereitet werden. Für die Messung der LCM-Proben wurde ebenfalls der H50-Chip verwendet, da er auch hier in Vorversuchen aufgrund der Proteinbindung überzeugte. Hierzu wird genau wie in 2.5.2 beschrieben ein Bioprozessor benötigt und der Chip (H50) musste mit entsprechenden Puffern vorbereitet werden. Nach Vorbereitung des Chips erfolgte das Auftragen der Probe. 20 µg der mit dem LCM-Gerät gewonnenen Probe (siehe Abschnitt 2.4.3) wurden nun mit 80 µl 1% TFA versetzt und anschließend für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde die Probe auf den Chip aufgetragen und eine Stunde geschüttelt. Dann wurde zweimal mit 1% TFA für 10 min gewaschen. Es wurde der Chip mit den zu messenden Proben aus dem Bioprozessor entnommen und luftgetrocknet. Anschließend wurde zweimal 1 µl Matrix aufgetragen. Nach erfolgter Trocknung der Matrix wurde das Proteinprofil mittels „Protein chip reader“ ermittelt.

2.5.5 Statistische Analyse

Die Protein Profile der verschiedenen Proben müssen, um Unterschiede der Expression zu erfassen, mit einer Kontrollgruppe verglichen werden. Um Unterschiede in der Peak Intensität der verschiedenen Profile zu quantifizieren, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test, welcher in der Biomarker Wizard Software enthalten ist, genutzt. Des Weiteren wurde, um die Expressionsunterschiede der verschiedenen Proteinprofile zu analysieren, mit der Biomarker Patterns Software (CIPHERgen) gearbeitet.

2.6 Die Zwei-Dimensionale Gel-Elektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese gliedert sich in zwei Dimensionen: Die erste Dimension, die isoelektrische Fokussierung der Proteine, und die zweite Dimension, die Trennung der Proteine aufgrund ihrer Masse. In abgewandelter Form wurde diese nach O´Farrell (1975) und Klose (1975) durchgeführt.

2.6.1 Vorbereitung der Proteinextrakte und Proteinfällung

Es wurden zwei verschiedene Gewebeproben vorbereitet, welche zuvor in Flüssigstickstoff gefroren waren. Die Gewebe (jeweils 0,7 x 0,7 cm) wurden aufgetaut und mit PBS gewaschen. Parallel dazu wurde Lysispuffer (9,5M Urea, 2% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) Ampholyte, 1% DTT, 10 mM PMSF) vorbereitet. Der Lysepuffer wurde frisch hergestellt. Die zwei verschiedenen Gewebestücke wurden jeweils mit 3 ml Lysispuffer in ein Reagenzglas gefüllt und zermörsert. Im Anschluss daran wurde das Lysat in Eppendorf-Gefäße gefüllt und 30 Minuten mit 15000 U/min in der großen Zentrifuge zentrifugiert. Danach konnte der Überstand abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß gefüllt werden. Der Überstand wurde dann nochmals zentrifugiert (30 min, 15000 U/min, 4 °C). Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Für die Proteinfällung wurden 500 µl des Überstandes der letzten Zentrifugation mit 1500 µl Aceton gemischt. Die Fällung erfolgte bei -20°C für 2 Stunden. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 4 °C mit 4500 U/min zentrifugiert (Biofuge, Heraeus, Berlin). Der Überstand konnte verworfen werden und das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet. Das trockene Pellet wurde nun in Rehydrationspuffer gelöst und die Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 2.6.2) konnte durchgeführt werden.

2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Probe wurde nach Bradford bestimmt. Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde erstmals 1976 von Marion M. Bradford publiziert (Analytical Biochemistry). Mit dem Bradford Test ist es möglich, den Proteingehalt der zu untersuchenden Probe quantitativ zu erfassen. Für diese Proteinbestimmung wurde der Farbstoff Coomassie-Brillantblau G 250 benutzt. Der Farbstoff bildet im sauren Milieu mit Proteinen Komplexe. Im ungebundenen Zustand hat der Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Aufgrund der Komplexbildung, welche mit den Proteinen stattfindet, verschiebt sich das Absorptionsmaximum bei 595 nm.

Als Standard wurde eine BSA-Stammlösung (1 mg/ml) verwendet.

Für die Eichkurve wurde eine Konzentrationsreihe von der Proteinstandardlösung in Küvetten 10x 5x 45mm (Sarstedt Nürmbrecht) hergestellt (Tab. 4)

Tabelle 4: Bradford-Pipettierschema

BSA- Stammlösung	Wasser	Bradford-Reagenz
0 µl	800 µl	200 µl
2 µl	798 µl	200 µl
5 µl	795 µl	200 µl
10 µl	790 µl	200 µl
15 µl	785 µl	200 µl
20 µl	780 µl	200 µl

Die Proteinlösungen mit dem Coomassie-Farbstoff wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit dem Photometer Lambda 2 (Perkin-Elmer & Co GmbH, Stuttgart) wurden die optischen Dichten bestimmt. In einer Doppelbestimmung wurden die Proben als 1:5 oder 1:10 Verdünnung gemessen. Nach Bestimmung des Proteingehaltes der Proben wurden sie entweder sofort weiterbearbeitet oder bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.3 Die erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung ist eine Methode zur Trennung der Proteine aufgrund ihrer isoelektrischen Punkte. In Abhängigkeit des pH-Wertes der Umgebung tragen Proteine positive, negative oder eine neutrale Nettoladung. Die Nettoladung eines Proteins setzt sich aus allen positiven und negativen Ladungen der einzelnen Aminosäuren zusammen. Für jedes Protein gibt es einen bestimmten pH-Wert, bei dem seine Nettoladung gleich Null ist. Bei der IEF (Isoelektrischen Fokussierung) wandern die Proteine unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes zu ihrem isoelektrischen Punkt, also zu dem Ort, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist. Hat ein Protein eine positive Nettoladung, so läuft es in Richtung Kathode. Hat es eine negative Nettoladung, so läuft es in Richtung Anode. Die isoelektrische Fokussierung hat demnach den Effekt, Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung zu trennen.

Für die IEF werden so genannte IPG-Gelstreifen (Gelstreifen mit immobilisierten pH-Gradienten) verwendet.

2.6.4 Arbeitsablauf Probenvorbereitung für die IEF

Die Proben des Gewebelysats wurden wie unter 2.6.1 gewonnen.

Die Proteinkonzentration jeder Probe betrug 400 µg. Jeder Probe wurde Rehydratationspuffer (Urea 8M, CHAPS 1% (w/v), DTT 15 mM, Ampholyte 0,2% (v/v)) hinzugefügt, so dass ein Endvolumen von 350 µl entstand. Zur Beobachtung der Proteinwanderung während der IEF wurden 5 µl Bromphenolblau hinzupipettiert. Um eine

gute Durchmischung zu gewährleisten, wurde das Gemisch gevortext. Anschließend wurde für die Rehydratation die Probenlösung in der Fokussierkammer (Protean Cell, Bio-Rad, München) aufgetragen. Auf die vorbereiteten Proben wurde ein 17 cm langer immobilisierter pH-Gradient-Streifen (pH 3-10) (Bio-Rad, München) mit der Gelseite nach unten gelegt. Nach einer Stunde Rehydratation bei Raumtemperatur, in der der Gelstreifen sich vollgesogen hat, konnte nun 1 ml Mineralöl auf den Gelstreifen aufgetragen werden. Das Öl dient dem Schutz vor Lösungsverdampfungen. Für die passive Rehydratation wurde der Streifen über Nacht für mindestens 12 h bei Raumtemperatur in der Fokussierkammer inkubiert.

Die isoelektrische Fokussierung mit Protean IEF Cell wurde am darauf folgenden Tag mit einem mehrstufigen Protokoll bei 20 °C durchgeführt (Tab. 5).

Tabelle 5: Fokussierprotokoll

Zeit	Spannung
1h	500 V
1h	1000 V
4 h	8000 V

Die fokussierten Streifen konnten entweder weiterbearbeitet oder eingeschweißt und bei -20° C aufbewahrt werden.

2.6.5 Die zweite Dimension: Vertikale SDS-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Gele wirken wie Molekularsiebe und deswegen werden sie am häufigsten für elektrophoretische Auftrennungen verwendet. Die Wanderungsgeschwindigkeit (v) eines Proteins im elektrischen Feld hängt von der elektrischen Feldstärke (E), der Nettoladung des Proteins (z) und dem Reibungskoeffizienten (f) ab (Berg et al., 1996).

Die elektrische Kraft (Ez) treibt das geladene Protein zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Dieser Kraft wirkt die Reibungskraft entgegen. Die Reibungskraft ist abhängig von der Masse des Proteins, sowie von der Beschaffenheit des Gels. Kleine Proteine, d.h. Proteine mit geringer Molekülmasse wandern relativ schnell im elektrischen Feld durch die Poren des Gels, mittlere Proteine brauchen etwas länger um das Gel zu passieren. Proteine, welche größer sind als die Poren des Gels sind folglich fast unbeweglich. Die Gelelektrophorese wird in einer vertikalen Schicht aus Polyacrylamid durchgeführt. Sie läuft von oben nach unten. Das aufzutrennende Proteingemisch wird mit SDS (sodium dodecyl sulfate) versetzt. Durch die Zugabe von dem anionischen Detergens SDS werden die Proteine denaturiert, d.h. alle nicht kovalenten Wechselwirkungen innerhalb der Proteine werden zerstört. Durch die Applikation von DTT (Dithiothreitol) werden die Disulfidbrücken der Proteine reduziert. Die SDS-Anionen binden an die Proteine. Es entsteht ein Komplex aus SDS und denaturiertem

Protein, welcher die ursprüngliche Eigenladung des Proteins überdeckt und nun eine stark negative Ladung aufweist. Aufgrund dieser einheitlichen negativen Ladung laufen alle Proteine nur in Richtung der Anode.

2.6.6 Arbeitsablauf der vertikalen SDS-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die zweite Dimension (SDS-Page) wurde in veränderter Weise nach Laemmli (1970) in einer Plattenelektrophoreseapparatur (PROTEAN II XL Cell, Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Polyacrylamidgele wurden unter zu Hilfenahme einer Gießvorrichtung, welche aus zwei Glasplatten mit einer Größe von 18 x 20 cm (Bio-Rad, München), zwei 1 mm IPG Spacern (Bio-Rad, München) und einer Haltevorrichtung besteht, hergestellt.

Es wurden 12%ige Gele nach folgender Rezeptur (siehe Tab. 6/7) angefertigt:

Tabelle 6: Trenngellösung 12% für große Gele

Trenngellösung 12%	
H ₂ O	28 ml
1,5 M Tris-Puffer	20 ml
Acrylamid 30%	32 ml
10 min Entgasen	
SDS 10%	800 µl
APS 10%	400 µl
TEMED	40µl

Tabelle 7: Trenngellösung 12% für Minigele

Trenngellösung 12%	
H ₂ O	7 ml
1,5 M Tris-Puffer	5 ml
Acrylamid 30%	8 ml
10 min Entgasen	
SDS 10%	200 µl
APS 10%	100 µl
TEMED	10 µl

Während des Gießens des Gels in die Gießvorrichtung sollte darauf geachtet werden, dass möglichst keine Blasen entstehen. Um Unebenheiten und Blasen sowie Austrocknung zu vermeiden, wurde der Oberrand des Gels mit Butanol glatt aufgefüllt. Das Gel wurde über Nacht zur Polymerisierung in den Kühlraum (4°C) gestellt.

2.6.6.1 Äquibrilierung

Der IPG-Gelstreifen, der die erste Dimension der Proteinauftrennung (IEF) durchlaufen hat, musste nun den Bedingungen für die zweite Dimension (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) optimal angepasst werden. Dafür sind zwei Äquibrilierungsschritte essentiell. Der erste Äquibrilierungspuffer enthält DTT. Hierdurch soll eine vollständige Reduktion aller Disulfidbrücken erreicht werden. Der daraufhin verwendete Äquibrilierungspuffer enthält Iodacetamid, welches die freien Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste alkyliert.

Jeder Streifen wurde 20 min mit 10 ml Äquibrilierungspuffer (Urea 6 M, Glycerol 30% (w/v), SDS 2% (w/v), Tris-HCl 0,05 M pH 6,8) zu dem 100 mg DTT (65 mM) und 50 µl Bromphenolblaulösung (0,25% (w/v) Bromophenolblau, Tris-HCl, pH 8,8 1,5 M) frisch dazu gegeben wurden, inkubiert. Anschließend wurde der gleiche Streifen für 20 min in 10 ml Äquibrilierungspuffer und 50 µl Bromphenolblaulösung inkubiert, diesmal mit Zugabe von 400 mg Iodacetamid (135 mM).

2.6.6.2 Durchführung der SDS-Page

Nach Äquibrilierung des Gelstreifens konnte dieser auf das SDS-Polyacrylamidgel, welches sich in der Elektrophoresekammer (Protean II XL, Bio-Rad, München) befand, aufgetragen werden.

Die Elektrophoresekammer (Protean II XL, Bio-Rad, München) wurde mit 1x Elektrophoresepuffer (5x Elektrophoresepuffer: Tris 15 g, Glycerin 72 g, SDS 5 g, auffüllen auf 1 l H₂O) aufgefüllt. Auf einen 0,3 x 2 cm Filterstreifen wurden 10-15 µl Marker (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad) aufgetragen. Dieser wurde links neben den Gelstreifen geschoben. Mit dem Verschließen der Apparatur erfolgte gleichzeitig das Anschließen der Elektroden über den Deckel. Die zweite Dimension wurde über Nacht bei 4°C und bei einer Spannung von 100 Volt durchgeführt. Anhand des Markers ist es möglich zu sehen, wie weit die Proteine bereits gewandert sind. Der Endpunkt ist erreicht, wenn die mit dem Marker markierte Front am unteren Ende des Gels angekommen ist. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst. Jetzt konnte es, je nach Proteinkonzentration, mit Coomassie-Blau oder Silber angefärbt werden.

2.6.7 Coomassie-Färbung

Durch die Färbung der Gele können die Proteine visuell dargestellt werden. Das Endergebnis ist ein Spotmuster auf dem Gel. Jeder Spot (Punkt) stellt ein bestimmtes Protein dar. Die am häufigsten angewandten Färbemethoden sind die Silbernitrat- und die Coomassie-Blau-

Färbung (Triphenylmethanfarbstoffe). Die Proteindarstellung mit Coomassie-Blau kann nur mit größeren Proteinmengen erfolgen, d.h. die Nachweisempfindlichkeit ist relativ niedrig. Die Vorteile der Coomassie-Färbung liegen im geringeren Arbeitsaufwand und geringeren Kosten. Die Coomassie-Färbung (Roti-Blue) ist eine kolloidale Färbung, welche Proteine in Polyacrylamidgelen färbt. Mit einer hohen Spezifität bindet Coomassie-Blau an Proteine, während der Farbstoff nur minimal die Gelmatrix anfärbt.

Tabelle 8: Vorbereitungsprotokoll der Coomassie-Blau-Färbelösung

Coomassie-Blau Färbelösung	
20% (vol/vol)	Roti-Blue
20% (vol/vol)	Methanol

Tabelle 9: Entfärbelösung

Entfärbelösung	
20% (vol/vol)	Methanol
5% (vol/vol)	Essigsäure
75% (vol/vol)	Aqua dest.

2.6.7.1 Arbeitsablauf Coomassie-Färbung

Nach Beendigung des Elektrophoresevorgangs wurde das Gel in eine Färbeschale mit 100 ml Coomassie-Blau-Färbelösung (Tab. 8) gelegt. Bereits nach ca. 30 min liessen sich Proteinspots erkennen. Allerdings sind diese nur an der Oberfläche gefärbt. Die vollständige Färbung erfolgt erst nach mehreren Stunden. Daher wurde das Gel über Nacht in der Coomassie-Blau Färbelösung auf dem Schüttler geschwenkt. Im Anschluß daran wurde die Farbe entsorgt und das Gel 3 x 10 Minuten mit Entfärber (Tab. 9) gewaschen.

2.6.8 Silberfärbung (nach Shevchenko et al., 1996)

Die Silberfärbung erfolgte nach einer von Shevchenko et al. (1996) abgeleiteten Methode. Die Nachweisempfindlichkeit der Silberfärbung ist im Vergleich zur Coomassie-Färbung sensitiver. Daher ist sie ideal zur Untersuchung von Proben mit geringer Proteinkonzentration. Der Nachteil ist allerdings die geringere Kompatibilität mit massenspektrometrischen Methoden.

Genau wie die Färbung mit Coomassie-Blau erfolgte die Silberfärbung in Färbeschalen auf dem Schüttler.

Die Silberfärbung wurde wie in Tabelle 10 beschrieben durchgeführt:

Tabelle 10: Protokoll Silberfärbung

Schritt	Lösung	Volumen (ml)	Zeit
1. Fixierung	50% Methanol,	500	1 h bis über Nacht
	12% Essigsäure		
2. Waschen	50% Ethanol	2 x 500	2 x 20 min
3. Waschen	30% Ethanol	500	1 x 20 min
4. Sensitizing	0,02% Natriumthiosulfat	500	1 min
5. Waschen	Aqua dest.	3 x 500	3 x 20 sec
6. Silberfärbung	0,2% Silbernitrat,	500	Mindestens 20 min
	0,026% Formaldehyd		
7. Waschen	Aqua dest.	3 x 500	3 x 20 sec
8. Entwicklung	6% Natriumbicarbonat, 0,0185% Formaldehyd, 16 µM Natriumthiosulfat	2 x 500	2 x 10 min
9. Stoppen	50% Methanol,	1 x 500	10 min
	12% Essigsäure		
10. Konservieren	5% Essigsäure	1 x 500	

2.6.9 Trocknen der Gele

Um die Gele haltbar zu machen, müssen sie getrocknet werden. Zuerst wurden die Gele 3 x mit Aqua dest. gewaschen. Im Anschluß daran wurden sie für mindestens 30 min in der Trockenlösung (Glycerinpuffer: Glycerin 10%, Methanol 20% ad 1 l aqua dest.) auf den Schüttler gestellt. In der Zwischenzeit konnten die Cellophanfolien vorbereitet werden. Die Folien (2 Stück pro Gel) wurden entsprechend der Gelgröße zugeschnitten. Diese mussten kurze Zeit in Aqua dest. einwirken. Die vorbehandelten Gele wurden zwischen zwei Cellophanfolien auf den Vakuumtrockner (Gel Dryer, Bio-Rad) gelegt. Hierbei war darauf zu achten, dass dies möglichst blasenfrei geschieht. Der Vakuumtrockner konnte nun geschlossen und gestartet werden. Die Trocknungszeit dauert ca. 2 Stunden.

2.7 In-Gel-Proteinverdau

Der tryptische In-Gel-Verdau erfüllt einen bestimmten Zweck, nämlich das intakte Protein, dass durch die 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt wurde, in definierte Peptide zu zerlegen und der Finger Print Analyse zugänglich zu machen. Das Spalten der Proteine erfolgt mit der Protease Trypsin. Trypsin trennt die Peptidbindungen C-terminal der Aminosäuren Lysin und Arginin. So entsteht ein für ein bestimmtes Protein typisches Peptidgemisch. Die Befreiung der ausgeschnittenen Gelstücke von störenden Chemikalien, sowie die Peptidspaltung geschieht, indem man die Gelstücke in verschiedenen Puffern und Lösungen wäscht bzw. inkubiert.

2.7.1 Protokoll tryptischer In-Gel-Proteinverdau

Bevor die Proteine des Gelspotmusters mit MALDI-TOF-MS oder ESI-MS identifiziert werden, müssen sie verdaut werden.

Um Kontaminationen mit Keratin zu vermeiden, wurde bei allen Arbeitsschritten mit Handschuhen gearbeitet. Die enzymatische Proteinspaltung wurde nach Dihazi et al. (2005) durchgeführt. Zuerst wurde das Gel mit Aqua bidest. gewaschen und anschließend auf eine gereinigte Glasplatte gelegt. Danach wurden die Spots, welche von Interesse waren manuell mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Jede ausgeschnittene Probe (Spot) wurde in ein Eppendorfgefäß platziert und entsprechend nummeriert. Nun wurde jedes Protein mit mehreren Arbeitsschritten gewaschen und mit der Protease Trypsin in charakteristische Fragmente zerlegt: Zuerst wurden die Proben zweimal 15 min lang in Wasser gewaschen. Im Anschluss wurde noch mal für 15 min 100 µl Wasser dazugegeben. Das Wasser wurde wieder abgesaugt und es wurde 40 µl 50%iges ACN in die Gefäße pipettiert. Nachdem die Lösung abgesaugt wurde, wurden 40 µl 100%iges ACN zu den Proben gegeben. ACN wurde abgesaugt und die Proben wurden mit 40 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat 5 min inkubiert, sobald die Proben sich entfärbt hatten. Im Anschluss wurden, um eine 1:1 Lösung zu erhalten, 40 µl ACN hinzugegeben und 15 min inkubiert. Nach Verwerfen der Lösung wurden die Proben in der Speed-Vakuum Zentrifuge (SVC 10 CH, Savant, New York, USA) 15 min lang getrocknet. Zur Spaltung der Proteine wurde Trypsinlösung (Ammoniumbicarbonat 100 mM, Calciumchlorid 1M, 5 µl, Trypsinstammlösung (10 ng/µl) 12,5 µl) verwendet. Der Puffer wurde so aufgetragen, dass er die Probe vollständig bedeckte und auf Eis für 45 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Puffer abgesaugt und es wurde 40-60 µl eines Verdauopuffers (100 mM Ammoniumbicarbonat, 2 mM Calciumchlorid) auf die Probe aufgetragen und bei 37 °C für 12 h inkubiert. Die Länge der Inkubation hat zum Zweck, dass Trypsin die Proteine in möglichst viele charakteristische Fragmente spaltet. Um die Spaltung zu stoppen, wurden die Proben mit 2% TFA für 1-2 min behandelt. Danach wurde der Überstand in einem zweiten Eppendorfgefäß gesammelt. Nun erfolgte die Peptidextraktion: Die Probe wurde mit 0,1% TFA in Wasser versetzt und für 30 min in ein Ultraschallbad (Bandelin, Sonorex, Berlin) gegeben. Wieder wurde der Überstand abgesaugt und in die Cups mit dem Überstand zuvor vermischt. Wiederholt wurde dieser Schritt mit 30% ACN in 0,1% TFA und im Anschluss mit 60% ACN und in 0,1% TFA. Danach wurden die Peptidextrakte in der Speed-Vakuum Zentrifuge (SVC 10 CH, Savant, New York, USA) getrocknet. Anschließend wurde 10 µl Ameisensäure hinzugegeben und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -20 °C verwahrt.

2.8 Massenspektrometrische Analyse

Massenspektrometrische Analysen stellen heutzutage eine der wichtigsten biowissenschaftlichen Methoden dar. Wesentlich dazu beigetragen haben dabei die „Matrix-Assisted-Laser-Desorption and Ionisation“ MALDI-Methode (Karas und Hillenkamp, 1988) und die „Electrospray-Ionisation“ ESI-Methode (Fenn et al., 1989). MALDI und ESI sind sogenannte Ionisierungstechniken, d. h. es handelt sich um Massenspektrometer, die fähig sind, Moleküle zu ionisieren und somit massenspektrometrisch zu untersuchen. Mit diesen beiden Methoden können Bestimmungen des Molekulargewichts und Sequenzanalysen von Proteinen und Peptiden durchgeführt werden. Obwohl die Typenpalette von Massenspektrometern beachtlich groß ist, bestehen sie doch alle aus einzelnen Bauelementen mit sich gleichender Funktion:

Ein Massenspektrometer besteht daher aus einer Probenschleuse (Einlasssystem), einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. Die Probenschleuse gewährleistet den Transfer der Probe ins Hochvakuum des Massenspektrometers. In der Ionenquelle wird die Probe ionisiert, d.h. die Ionenquelle dient der Erzeugung und Beschleunigung der Ionen. Der Massenanalysator lenkt die Flugbahnen der sich bewegenden Ionen proportional zu ihrem Masse-/ Ladungsverhältnis ab und sorgt damit für die Massentrennung. Das Detektorsystem registriert letztendlich die Intensitäten der Ionenströme. (Schrattenholz, 2001)

Die **MALDI-Analyse** basiert auf folgendem Prinzip:

Die zu analysierenden Peptidproben werden mit Matrixmolekülen zu einer sauren Lösung vermischt. Es werden Verbindungen als Matrix eingesetzt, die die Fähigkeit haben, Laserlicht stark zu absorbieren. Nachdem die Lösung mit einem Laserstrahl (in der Regel ein Stickstofflaser, Wellenlänge 337 nm im ultravioletten Strahlungsbereich) beschossen wird, kommt es zum Verdampfen der Matrix und zur Überführung der Probenmoleküle in die gasförmige Phase. Des Weiteren ist die Matrix an der Ionisierung der Probenmoleküle beteiligt.

Die in dieser Arbeit verwendete **ESI-Analyse** macht sich ein anderes Prinzip zu Nutze:

Bei ESI wird eine flüssige Probe unter hohem Druck durch einen dünnen Hohlraum (Kapillare) gesprüht. Durch eine angeschlossene Spannung von einigen Kilovolt wird die Peptidprobe, wenn sie aus der Kapillarspritze austritt, in den gasförmigen Zustand überführt. So entstehen positiv geladene Tröpfchen. Durch Verdampfung des Lösungsmittels werden diese immer kleiner und damit die Ladungsdichte immer größer. Am Schluss dieses Vorgangs steht dann das geladene Peptidmolekül. Aufgrund der Ladung der Moleküle kommt es zu einer elektrostatischen Abstoßung der Moleküle und somit zum so genannten „Elektrospray“. Der Ionisationsvorgang bei ESI ist noch nicht vollständig verstanden. Hierzu existieren verschiedene Theorien.

Für die Massenanalyse der zu untersuchenden Proben gibt es drei verschiedene Methoden-basierend auf unterschiedlichen Prinzipien: Eine Methode ist die Massentrennung nach Flugzeit (time-of-flight, TOF-MS). Eine weitere Methode trennt die zu untersuchenden Proben durch ein elektrisches Feld, welches durch Metallstäbe erzeugt wird (quadropole MS). Die dritte Methode (ion trap MS) kann die Massen analysieren durch die Ausstoßung von Ionen aus einem Feld, welches eine dreidimensionelle Falle darstellt. Auf diese drei Arten ist es möglich, die Massen der Peptidgemische zu ermitteln. Wenn zwei verschiedene Massenanalytoren hintereinander geschaltet werden, können Peptide sequenziert werden. Gängige Kombinationen sind MALDI mit einem TOF Analysator und ESI mit einem Quadropol. In dieser Arbeit wurde ein kombiniertes Quadropol-Flugzeit-Massenspektrometer verwendet (Q-TOF Ultima Global)

2.8.1 Arbeitsablauf ESI-Analyse

Nach dem unter 2.8 beschriebenen tryptischen In-Gel-Proteinverdau wurden die zu untersuchenden Proben je nach Spotgröße bzw. Farbintensität in 3-5 µl 0,1% Ameisensäure gelöst. Jeweils 1 µl der Probe wurde direkt in ein Analysegefäß pipettiert und anschließend in der analytischen Säule (LC Packings Dionex, CA, USA) weiterbearbeitet.

Das ESI-Massenspektrometer wurde wie folgt eingestellt:

- positiver Ionenmodus
- Peptidmassentoleranz 50 ppm
- Fragmenttoleranz 100 multi mass unit.

Nun wurden die Proben in eine elektrische Kapillare injiziert, welche an dem Massenspektrometer angeschlossen ist. Daraufhin kam es zur chromatographischen Auftrennung der Probe. Die chromatographische Auftrennung des Peptidgemischs ist von Bedeutung, da man hierdurch Auskunft über die Proteinsequenz erhält. Die chromatographische Trennung konnte erzielt werden, indem die Proteine unter zu Hilfenahme eines Elusionsgradienten von der Säule eluiert wurden. Dies erfolgte mit zwei verschiedenen Lösungen: Lösung A und Lösung B. Lösung A bestand aus 5% ACN in 0,1% Ameisensäure. Lösung B bestand aus 95% ACN in 0,1% Ameisensäure. Der Vorgang der Elution dauerte eine Stunde. Begonnen wurde er mit 10% von Lösung B und geendet ist er mit 95% der Lösung B. Aufgrund des steigenden ACN Anteils wurde bewirkt, dass die Peptide nach ihren hydrophoben Eigenschaften von der Säule eluiert wurden (Westermeier, 2001). Anschließend wurden die Peptide von einer Nanospraynadel (Spannung zwei Kilovolt) in ein elektrisches Feld gesprüht. So erfolgte die Peptidsequenzierung. Nachdem die Ionen markiert wurden, wurden sie in die Quadropole eingelesen. Fragmentiert wurden die Peptide in der so genannten Hexapolkollisionszelle und anschließend von dem Detektor registriert

bzw. analysiert. Die Massen aller Peptide, die in einem Massenspektrum aufgedeckt werden, beschreibt man als so genannten peptide mass fingerprint (Fingerabdruck der Peptidmassen). Jedes Protein hat damit seinen charakteristischen peptide mass fingerprint (PMF). Der PMF kann nun genutzt werden, um in speziellen Protein-Datenbanken das Protein zu identifizieren.

Zur Akquirierung der Daten wurde die MassLynx Software (v.4.0, Waters, Massachusetts, USA) zu Hilfe genommen. Die Datenprozessierung erfolgte dann mit der Proteindatenbanksuchmaschine MASCOT (durchsucht Datenbanken wie Swissprot und MSDB).

2.9 Datenbank-Suche

Unter Verwendung von Bioinformatic Harvester (<http://harvester.embl.de/>) wurde der peptide mass fingerprint nochmals analysiert. Der Isoelektrische Punkt der Proteine wurde unter Zuhilfenahme von Expasy Proteomics Server (<http://expasy.org/>) ermittelt.

2.10 Western-Blot-Analyse

Der Name Western Blot wurde von W.N. Burnette eingeführt (Burnette, 1981) Es stellt ein Verfahren dar, bei der Proteine auf eine Trägermembran übertragen werden und anschließend über verschiedene Wege nachgewiesen werden können. Es gibt unterschiedliche Übertragungsweisen (Diffusion, Kapillareffekt oder Elektrophorese) der Proteine auf die Trägermembran. Eingeführt wurde die Methode des Western Blots von Renart et al. für Diazobenzylxymethyl-Papier und von Towbin et al. auf Nitrozellulose abgewandelt. Bei dieser Arbeit wurde zur Bestätigung der 2D-Gel-Elektrophoreseergebnisse die Western-Blot-Analyse nach dem Protokoll von Towbin et al. durchgeführt.

Ein Proteingemisch wird unter Zuhilfenahme der Gel-Elektrophoresetechnik in einem SDS-Gel entsprechend des Molekulargewichtes und der Ladung aufgetrennt. Auf diesem Weg werden auf dem Gel einzelne Proteinbanden darstellbar. Durch ein elektrisches Feld ist es den Proteinen möglich, von dem Gel auf die Nitrozellulose Membran zu wandern. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben diese auf der Membranoberfläche haften. Auch das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt bestehen. Nach diesem Vorgang kann das an den Proteinen gebundene SDS ausgewaschen werden, und den Proteinen ist es möglich, zu renaturieren. Jetzt können die Proteine auf der Membran mit spezifischen Antikörpern identifiziert werden. Für die Immunodetektion (spezifische Primärantikörper binden an Epitope des Proteins, an die wiederum ein Sekundärantikörper bindet, der für die anschließende Detektion zuständig ist) ist es wichtig, freie Bindungsstellen der Membranen

mit Milchpulver zu blockieren. Nun erfolgt die Behandlung der Membran mit der verdünnten (Primär-)Antikörperlösung. Nach einigen Waschschrinen wird die zweite (Sekundär-)Antikörperlösung hinzugegeben, deren Antikörper bestimmte Bereiche des ersten Antikörpers zum Ziel haben. Hierauf folgt die Sichtbarmachung anhand einer Lumineszenzreaktion.

2.10.1 Vorbereitung der Proben für die SDS-Elektrophorese

Die Proteinproben wurden nach der in Abschnitt 2.6.1 beschriebenen Methode gewonnen. Für die Western-Blot-Analyse wurde mit 50 µg Proteinlösung gearbeitet.

2.10.2 Herstellung der Minigele

Die Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) für Gele wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt.

Hergestellt wurden die 12%igen Minigele in einer Gießvorrichtung in zwei Polymerisationsschritten. Zuerst wurde ein 12%iges Trenngel (Tab. 11) gegossen. Um einen glatten, geraden Gelabschluss zu bekommen wurde das Gel mit 1 ml Butanol überschichtet.

Tabelle 11: Trenngellösung 12%, pH 8,8

Trenngellösung 10%, pH 8,8	
Wasser	7 ml
1,5 M Tris-HCl	5 ml
Acrylamid	8 ml
Entgasen 5 min	
SDS 10%	200 µl
APS 10%	100 µl
TEMED	10 µl

Nachdem das Gel polymerisiert war, konnte das Butanol verworfen werden und darauf ein Sammelgel (Tab. 12) unter Verwendung eines Kammes (Bio-Rad, München) für 8 Slots angefertigt werden.

Tabelle 12: Sammelgellösung 4%, pH 6,8

Sammelgellösung 4%, pH 6,8	
Wasser	15 ml
0,5 M Tris-HCl	6,3 ml
Acrylamid	3,3 ml
Entgasen 5 min	
SDS 10%	250 µl
APS 10%	125 µl
TEMED	25 µl

Die fertig polymerisierten Gele konnten nun in eine Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München) gesetzt werden. Aufgefüllt wurde diese mit 1 x

Elektrophoresepuffer (5 x Elektrophoresepuffer: Tris 15 g, Glycerin 72 g, SDS 5 g, aufgefüllt auf 1 l ddH₂O).

2.10.3 SDS-Elektrophorese

Nach Herstellung der Minigele konnten die Proteinproben in die Probenfächer pipettiert werden. 7 µg eines Markers (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad, München) wurden aufgetragen. Nun konnte die Elektrophorese nach folgendem Protokoll (Tab. 13) starten.

Tabelle 13: Elektrophoreseprotokoll

Zeit	Spannung
10 min	100 V
40 min	200 V

2.10.4 Tankblotting

Zum Blotting wurde Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) verwendet. Diese wurde 15 min lang in 1x Transferpuffer (5x Transferpuffer: Glycerin 950 mM, Tris 125 mM, SDS 0,05% (w/v), Methanol 20% (v/v)) inkubiert bevor sie zum Einsatz kam. Die Minigele wurden, nach beendeter Elektrophorese, in bestimmter Reihenfolge in der Blotzelle angeordnet:

Mit der negativen Seite lag die Blotzelle unten, eingetaucht in 1x Transferpuffer. Als nächstes wurde ein Vlies (Bio-Rad, München), zwei Filterpapiere (Bio-Rad, München), das Minigel, die Nitrozellulosemembran, nochmals zwei Filterpapiere und ein Vlies übereinander gelegt und die Blotzelle wurde geschlossen. Beim Aufbau des Blots sollte sorgfältig gearbeitet werden, um mögliche Luftblasenbildung zu vermeiden. Des Weiteren ist es von Bedeutung, dass alle Bauteile des Blotsandwiches mit Transferpuffer durchfeuchtet sind, damit ein guter Stromfluss gewährleistet ist. Die Blotzelle konnte jetzt in einer Kammer (Bio-Rad, München) befestigt werden. Die Kammer wurde aufgefüllt mit 1x Transferpuffer. Nun konnte der Blotvorgang bei 4°C und 30 Volt über Nacht laufen.

2.10.5 Ponceau-S-Färbung

Die Membranen wurden in einer Ponceau-(S)-Lösung (0,2% in 3% TCA) 5 min lang geschüttelt. Dies diente zur Kontrolle des Blotvorgangs. Man erhielt eine rosa Färbung der Membranen. Anschließend wurden sie mit Essigsäure (5%) entfärbt und daraufhin getrocknet.

2.10.6 Antigendetektion

Die Membranen wurden für 2 h bei Raumtemperatur mit Blockpuffer (Magermilchpulver 5% (w/v) in Waschpuffer pH 7,5 (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, Tween 20 0,1% (v/v), NaCl 100 mM)) behandelt, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Nachfolgend wurde der primäre Antikörper (monoklonaler Maus-Anti-Galectin-1-Antikörper) dem Blockpuffer hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 37°C auf einem Schüttler ((400, Robbins Scientific, CA, USA). Im Anschluss erfolgten 2 Waschschrte mit Waschpuffer für 15 min bei 37°C. Nach dem Waschvorgang wurden die Membranen mit einer 1:1200 Verdünnung mit HPR- (Horseradish Peroxidase) konjugiertem Schaf-Antimaus-Antikörper (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) für 60 min bei 37°C inkubiert. Zwei weitere Waschschrte folgten mit dem Waschpuffer für je 15 min bei 37°C. Im Anschluss wurde die Waschlösung verworfen und die Nitrozellulosemembran wurden zur Sichtbarmachung der Proteinbanden mit Chemilumineszenzfarbstoff (Perkin Elmer Inc, Boston, USA) für 1-2 min behandelt. In einer Dunkelkammer wurde auf die Membranen ein Röntgenfilm (Kodak Film) gelegt und mit unterschiedlichen Belichtungszeiten (10 sek-1 min) entwickelt.

2.11 Immunhistochemie mit Galectin-1-Antikörper

Die Immunfärbung ist eine Verfahrensweise bei der Proteine mittels Antikörper erkennbar gemacht werden. Für diese Färbemethode werden in der Regel Gewebeschnitte genommen, ebenso können aber auch Zellen aus Zellkulturen oder Körperflüssigkeiten verwendet werden. Die Methode der immunhistochemischen Färbung gründet auf der Tatsache, dass es zu Antikörper-Antigen-Reaktionen kommt, d.h., dass ein spezifischer Antikörper an ein bestimmtes Protein bindet. Bei der Immunfärbung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zum Beispiel die direkte und die indirekte Methode. Bei der direkten Methode ist an dem spezifischen, gegen ein bestimmtes Antigen gerichteten Antikörper ein Enzym gebunden. Diesem Enzym wird in einem weiteren Schritt ein Substrat zugeführt, worauf hin sich ein Farbstoff bildet. In dieser Arbeit verwendeten indirekten Methode wird dem zu untersuchenden Gewebe ein Primärantikörper hinzugefügt. In einem weiteren Schritt wird ein Sekundärantikörper, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist, hinzugegeben. An diesen Sekundärantikörper ist ebenfalls ein Enzym gekoppelt, welches, wenn es mit einem bestimmten Substrat zusammentrifft, einen Farbstoff bildet.

2.11.1 Arbeitsablauf indirekte Immunfärbung

Um die Expression von Galectin-1 in Gewebeschnitten zu zeigen, wurde die indirekte Immunperoxidasefärbung an fünf Tumor-Gewebeschnitten und an fünf Cortex-Gewebeschnitten durchgeführt.

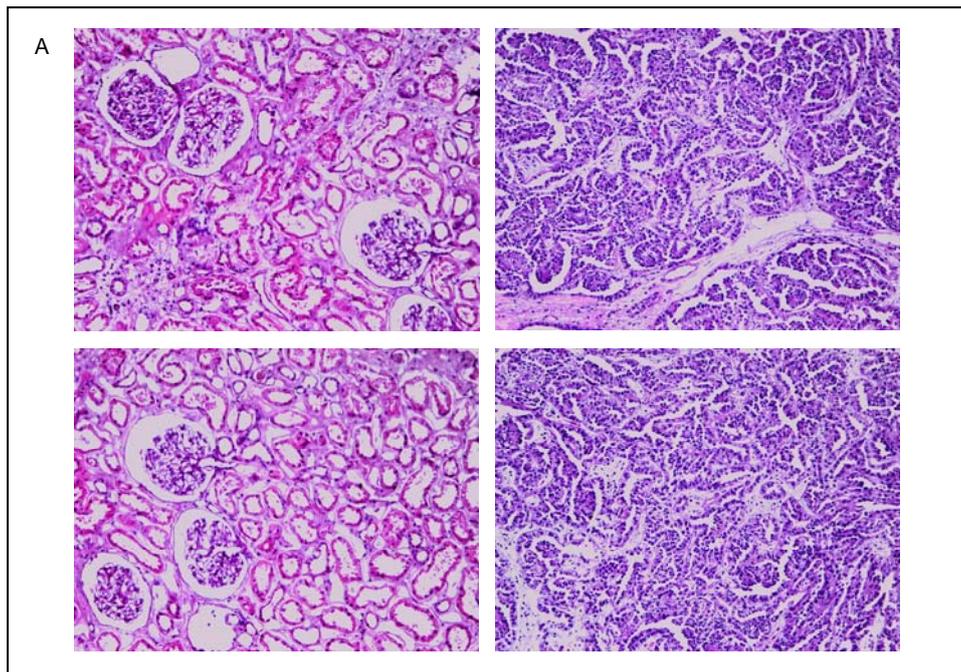
Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden zuerst zweimal in Isopropanol für 15 min bei 60°C inkubiert. Anschließend trockneten die Schnitte 20 sek. Die getrockneten Gewebeschnitte wurden nun weitere 15 min in 70%igen Aceton bei 4°C inkubiert, für 2-3 min getrocknet und nachfolgend zwei mal 10 min mit destillierten Wasser gewaschen. Nach dem Entparaffinieren und der Inaktivierung endogener Peroxidase wurden die Gewebeschnitte mit einer Glukoselösung (0,1 mM Glukose, 0,19 U Glukoseoxidase und 1 M Natriumazid gelöst in PBS Puffer) 30 min bei 37°C behandelt. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Gewebeschnitte 60 min mit Fetal Calf Serum (FCS) geblockt. Die Inkubation mit dem Antigalectin-1-Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Als Sekundärantikörper wurde Horseradish peroxidase (HRP)-konjugierter Antimaus-Antikörper (DAKO) benutzt, an dem ein fluoreszierender Farbstoff gekoppelt ist. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte bei Raumtemperatur für 60 min. Um die ungebundenen Sekundärantikörper auszuwaschen, folgten drei Waschschrritte mit PBS-Puffer für 10 min. Als Substrat für den HRP-konjugierten Antimaus-Antikörper wurde frisch hergestelltes Diaminobenzidin/H₂O₂ (0,05% w/v /0,01% v/v) genutzt. Die Proben wurden schließlich mit dem Zeiss Axiophot Mikroskop (Carl Zeiss) und der AnalySIS Software analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Histologische Analyse der NZK-Gewebeschnitte (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

Die lichtmikroskopischen Bilder in Abbildung 6 zeigen Hämatoxylin-Eosin gefärbte Gefrierschnitte von Nierenzellkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe. Es wurden 5 µm dicke Serienschnitte mit dem Mikrotom angefertigt. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine schnelle und einfache Färbemethode. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen blau (DNA, Zellkerne) während Eosin azidophile Strukturen (z.B. Proteine des Zytoplasmas) rot färbt. Die HE-Färbung ist daher optimal für die orientierende Übersichtsfärbung geeignet.

Die Fotos der gesunden Niere entstammen dem Nierencortex. Dies ist daran zu erkennen, dass Glomeruli mit dazugehörigen Tubulisystem abgebildet sind. Abbildung 6A zeigt Glomeruli und Tubuli. Bei den Nierenzellkarzinombildern (Abbildung 6B) sind weder Glomeruli noch ein Tubulisystem zu erkennen. Zu sehen ist ein ungeordnetes Wachstum. Das Gewebe läßt bei dieser Färbemethode keine Ähnlichkeit mehr zum Ursprungsgewebe erkennen.



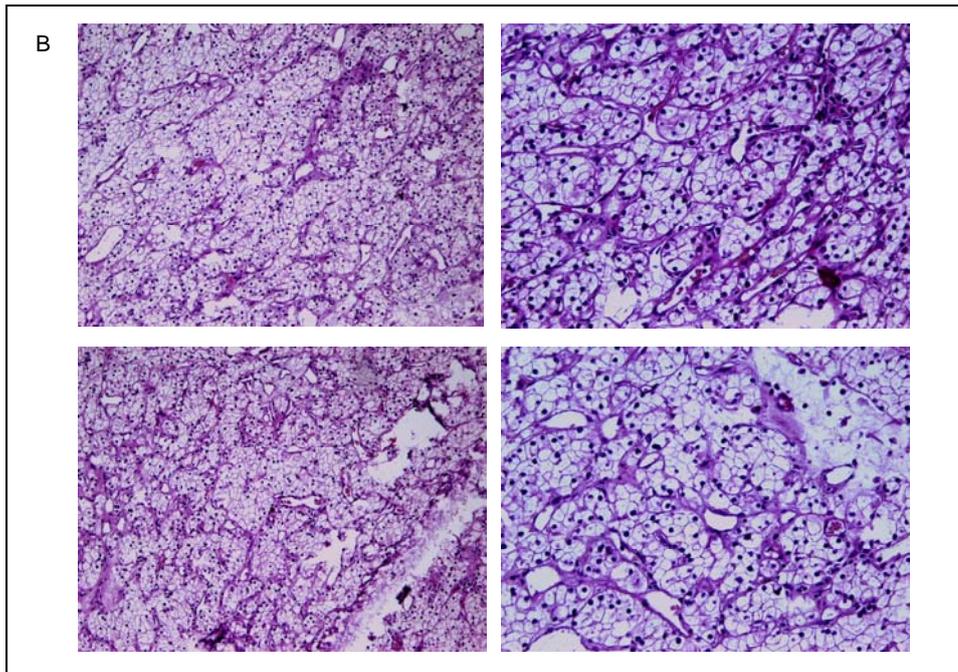


Abbildung 6: HE-gefärbte Gewebeschnitte vom Nierenzellkarzinom und von normaler Niere.

Dargestellt sind 5 µm dicke, HE gefärbte Gefrierschnitte. Das obere Bild zeigt normales Nierengewebe (A) während auf dem unteren Bild Nierenzellkarzinomgewebe dargestellt ist (B).

3.2 Vergleichende SELDI-Analyse von Gewebeschnitten

Zu Beginn der Arbeit stand die Überlegung eine Methode zu finden, mit Hilfe derer man beim Nierenzellkarzinom zu einem frühen Zeitpunkt in der Lage ist, Veränderungen auf der Proteom-Ebene zu erkennen. Zudem sollte die Methode schnell und einfach durchzuführen sein. Die Entscheidung fiel auf die SELDI-Proteinchip-Technologie (Ciphergen, CA, USA). SELDI stellt eine Methode zur massenspektrometrischen Charakterisierung von Proteinen und Peptiden dar. Protein-Chips haben den Vorzug, dass sie aufgrund ihrer chromatographischen Oberfläche mit Zell-Oberflächenproteinen interagieren können, was zu einer sehr starken Bindung der Zellen mit den Chip-Oberflächen führt. Außerdem ist bei SELDI vor der massenspektrometrischen Messung keine vorherige Aufreinigung der Proben notwendig. Die Proben (Urin-, Serum-, Zell- oder Gewebeprobe) werden direkt auf dem Proteinbiochip inkubiert. Alle potentiell störenden Substanzen werden mit Waschpuffern entfernt.

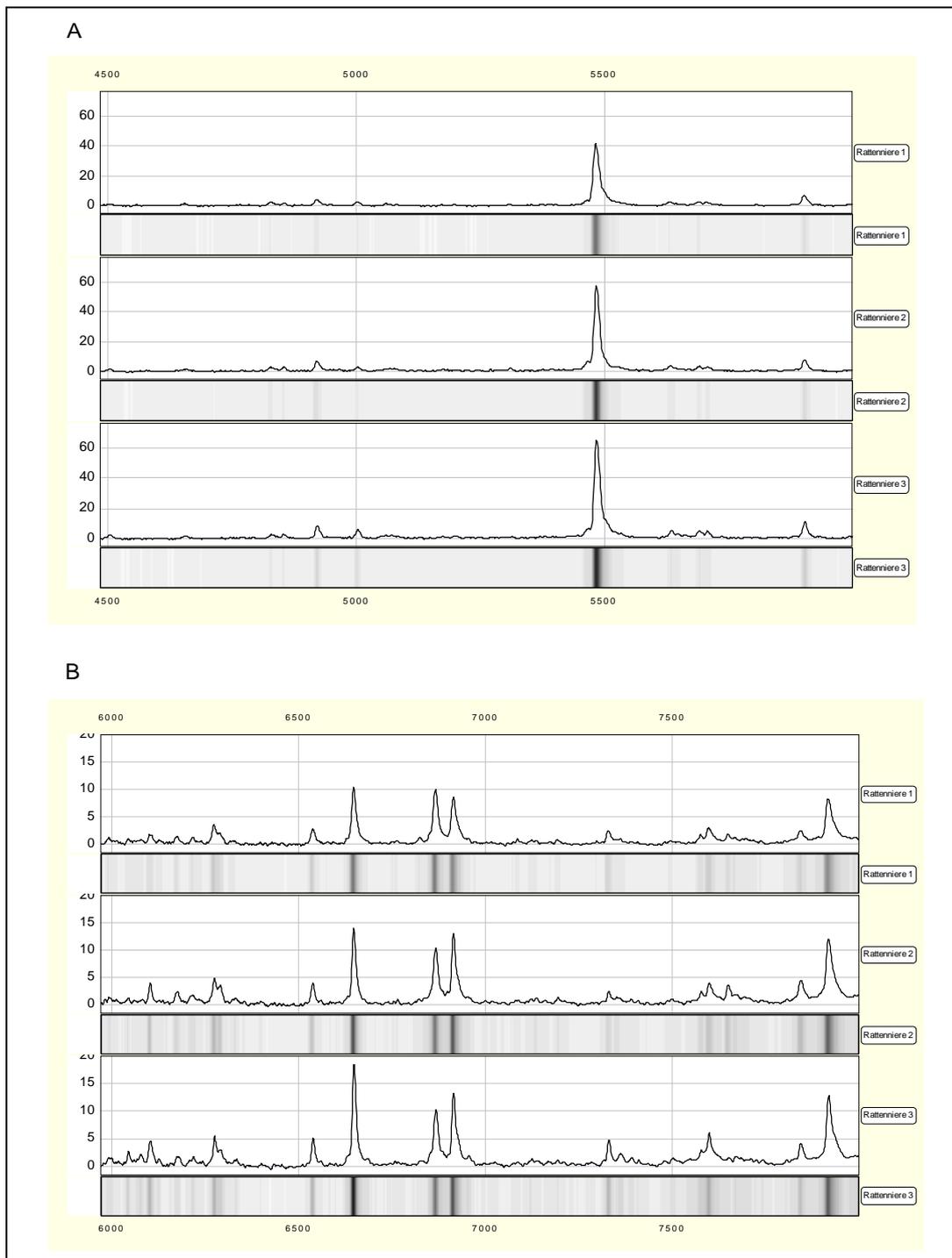
Mit Hilfe von SELDI sollen Unterschiede der Proteinexpression beim Nierenzellkarzinom gefunden werden, die charakteristisch für das Nierenzellkarzinom sind. Es sollen somit Biomarker auf Ebene der Proteinprofile detektiert werden.

Zur Etablierung und Optimierung der Methode wurde zunächst mit Rattennierengewebe gearbeitet. Dabei wurden die Messungen mit Gewebeschnitten, Gewebelysate und mit unter Zuhilfenahme der LCM Technik isolierten Zellverbänden durchgeführt, um herauszufinden welche Methode charakteristische Proteinprofile für Nierengewebe liefert.

3.2.1 Proteinprofil von Gewebeschnitten der Rattenniere

Die Rattennierengewebe wurden, wie in 2.2.1 und 2.5.2 beschrieben, mit dem Mikrotom in 5 µm dicke Gefrierschnitte geschnitten und nach mehreren Waschschriften und Applikation der Matrix mit SELDI-TOF-MS gemessen.

Die Abbildung 7 zeigt Proteinspektren von Rattennierengewebe im Massenbereich von 4500-16000 Da. Wiederholte Messungen mit Gewebeschnitten der Rattenniere ergaben ein reproduzierbares und quantitativ sowie qualitativ gutes Proteinexpressionsmuster.



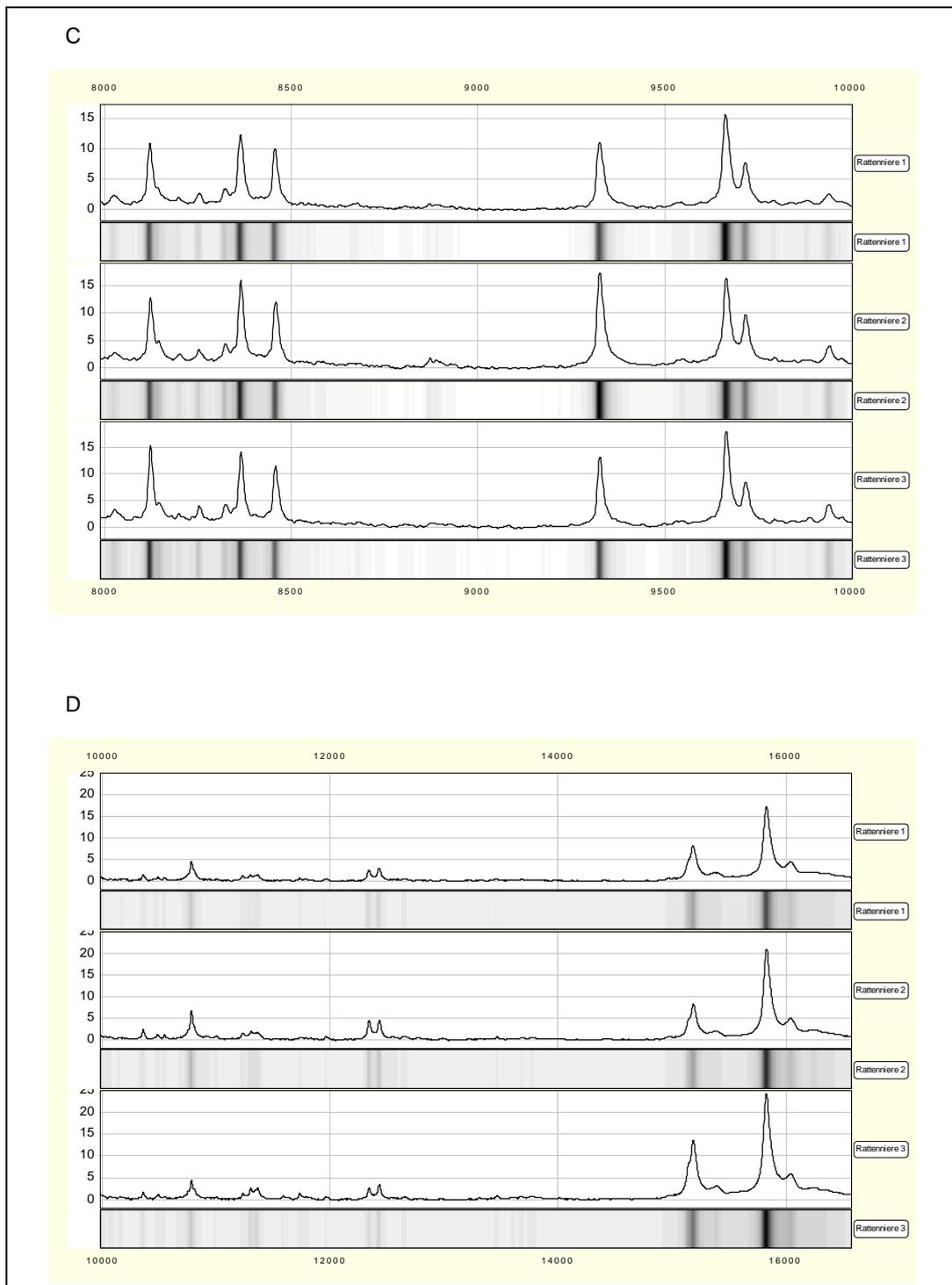


Abbildung 7: SELDI-TOF-MS Messung von Gewebeschnitten unterschiedlicher Rattennieren in verschiedenen Molekularbereichen.

Dargestellt als „Map View“ und als „Gel View“. Auf der y-Achse sind die Signalintensitäten gegen die auf der x-Achse befindlichen m/z -Werte aufgetragen. Im Massenbereich von 4500-6000 Da (A), 6000-8000 Da (B), 8000-10000 Da (C) und 10000-16000 Da (D).

3.2.2 Proteinprofil von Gewebelysat der Rattenniere

Neben der SELDI-Analyse mit Gewebeschnitten wurde die Messung von Gewebelysat durchgeführt. Die Messungen mit Gewebelysat zeigten reproduzierbare Proteinexpressionsmuster, auf denen, genau wie bei den Messungen mit Gewebeschnitten, viele Proteine erkennbar sind (siehe Abb. 8). Im Vergleich zu den Messungen mit den Gewebeschnitten ist diese Methode relativ zeitaufwendig.

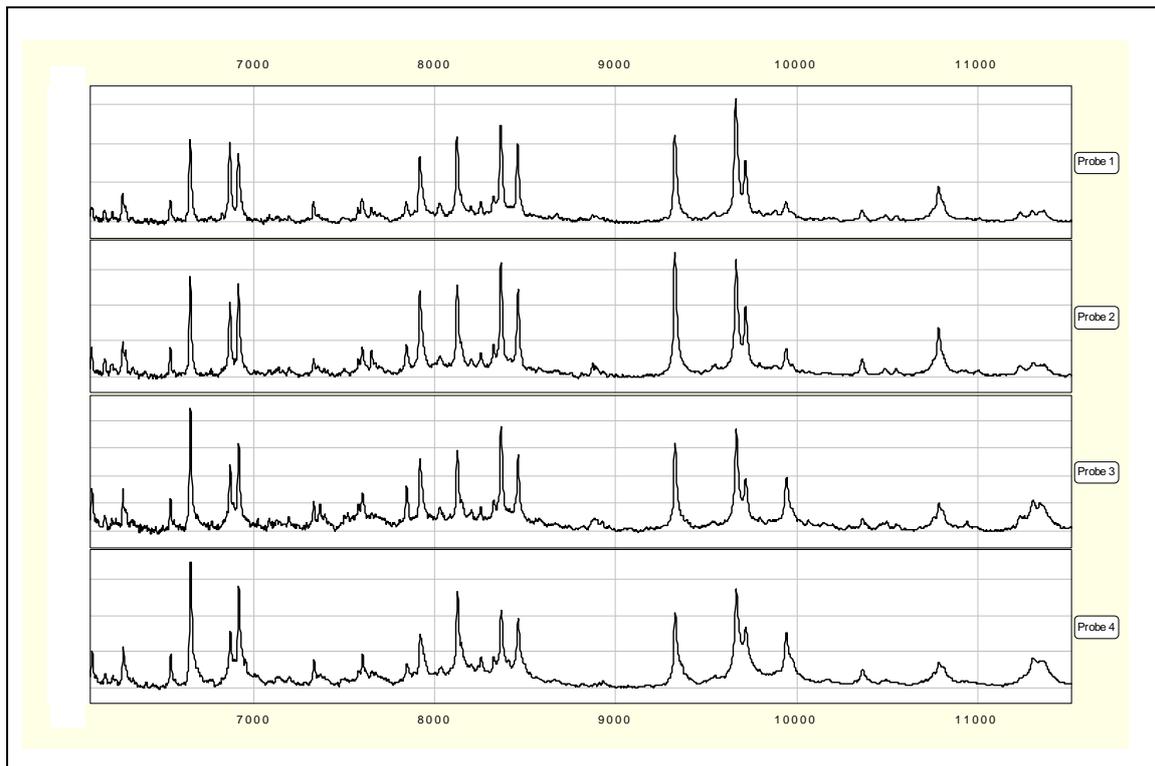


Abbildung 8: SELDI-TOF-MS-Messung von Gewebelysat hergestellt aus verschiedenen Rattennieren.

Dargestellt als SELDI-Spektrum und als Gel-Ansicht. Auf der y-Achse sind die Signalintensitäten die auf der x-Achse befindlichen m/z-Werte aufgetragen. Die Proben 1-4 sind Gewebelysate von 4 unterschiedlichen Rattennieren.

3.2.3 Proteinprofil von Rattennierengewebe unter Zuhilfenahme der Laser-Capture-Mikrodissektionstechnik

Es wurden aus dem Rattennierengewebe mit dem Mikrotom 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Aus den Gefrierschnitten wurden, wie in 2.4.3 beschrieben, mit dem Laser-Capture-Mikrodissektionsgerät isolierte Zellverbände herausgeschossen und in einem Cap aufgefangen. Die gesammelten Zellverbände wurden nach entsprechender Vorbereitung mit SELDI-TOF-MS gemessen.

Die mit Abstand zeitaufwendigste Methode ergab Proteinexpressionsmuster mit starkem Rauschen (Abb. 9). Zudem sind nur wenige Proteine darstellbar.

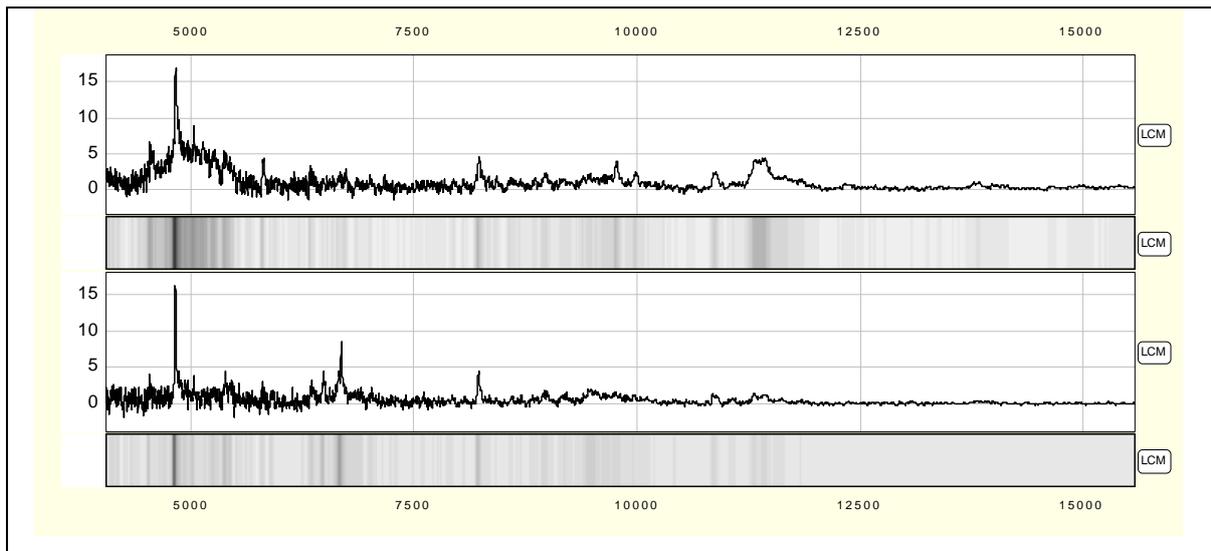


Abbildung 9: SELDI-TOF-MS-Messung von dissektierten Zellverbänden einer Rattenniere.

Dargestellt als SELDI-Spektrum und als Gelansicht. Auf der y-Achse sind die Signalintensitäten gegen die auf der x-Achse befindlichen m/z -Werte aufgetragen.

3.2.4 Auswahl der Methode

Wie in 2.3 beschrieben wurde eine Methode gesucht, die reproduzierbar, schnell und genau ist. Die SELDI-Analyse mit den unterschiedlich aufbereiteten Proben zeigte, dass die Methode mit Gewebeschnitten die oben genannten Suchkriterien erfüllte. Die Proteinprofile zeigten ein Spektrum mit vielen darstellbaren Proteinen, das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis ist optimal und in wiederholten Versuchen zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit. Im Vergleich zu den Versuchen mit Gewebelysate sowie mit den isolierten Zellverbänden, welche mit dem Laser-Capture-Mikrodissektionsgerät herausgeschossen wurden, konnte gesehen werden, dass die Methode mit den Gewebeschnitten, welche man direkt ohne Vorbehandlung auf den Proteinbiochip aufbringen kann, die einfachste, schnellste und zu den besten Ergebnissen führende Methode ist.

3.2.5 Vergleichendes Proteinprofiling von Nierenzellkarzinom und normaler Niere

Es wurden insgesamt 20 verschiedene Nierenzellkarzinomgewebe und 12 verschiedene Gewebe von normaler Niere mit dem Mikrotom zu 5 μm dicken Gefrierschnitten verarbeitet. Diese wurden direkt auf dem Proteinbiochip platziert. Nach mehreren Waschschritten und Auftragen der Matrix konnten die Gewebe mit SELDI analysiert werden. Parallel wurden Gewebeschnitte aus demselben Bereich für die HE-Färbung vorbereitet.

Die Proteinprofile der Nierenzellkarzinomgewebe im Vergleich zum normalen Nierengewebe veranschaulichen deutliche Überexpressionen von verschiedenen Proteinen. Diese Überexpressionen zeigten sich bei Proteinen mit dem Molekulargewicht von 15931 Da (siehe

Abb. 10), 15159 Da (siehe Abb. 11) und 7947 Da (siehe Abb. 12). Hier zeigte sich beim Nierenzellkarzinom ein deutlicher Expressionsanstieg.

Bei Proteinen mit dem Molekulargewicht von 9948 Da (siehe Abb. 13) und 14043 Da (siehe Abb. 14) hingegen ist eine höhere Signalintensität bei dem normalen Nierengewebe zu beobachten. Das Nierenzellkarzinom zeigt in diesem Massenbereich kaum Signale.

Die Analyse der erstellten Proteinprofile von Nierenzellkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe lieferte eine Reihe m/z-Signale, die deutliche Intensitätsunterschiede zwischen den Geweben aufzeigte. Diese Intensitätsunterschiede weisen auf unterschiedlich hoch exprimierte Proteine hin.

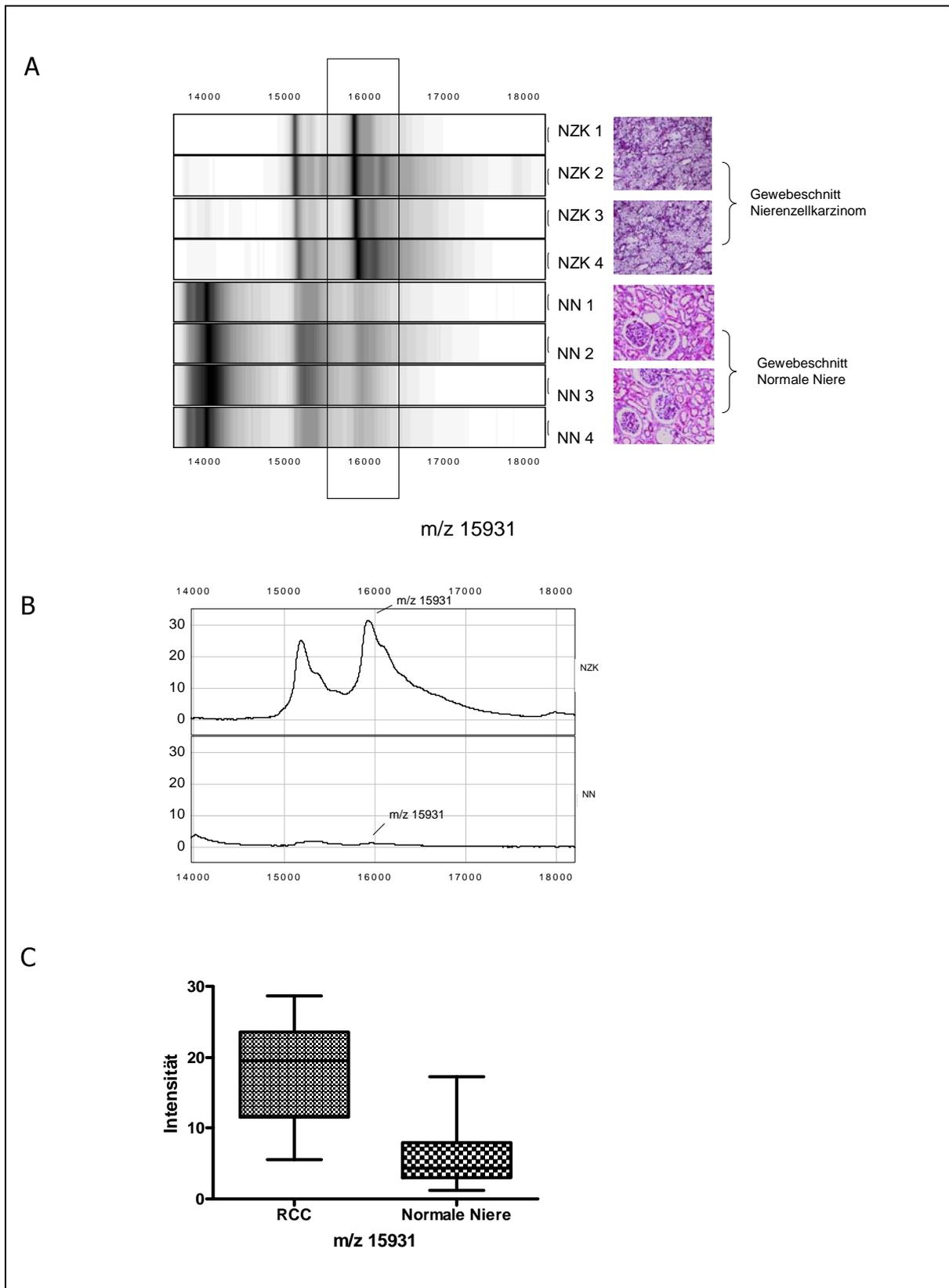


Abbildung 10: Proteinprofil von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe, m/z 15931 Da.

Auf der y-Achse sind die Signalintensitäten gegen die auf der x-Achse befindlichen m/z-Werte aufgetragen. Die Proteinprofile wurden mit dem „ProteinChip Reader“ erstellt. A: Vier Nierenzellkarzinomgewebe und vier normale Nierengewebe in Gel-Ansicht, B: Jeweils ein Beispiel eines Nierenzellkarzinomgewebes und eines normalen Nierengewebes dargestellt als Proteinprofil. C: Statistisch ausgewertet und dargestellt in Form eines Boxendiagramms, welches die Intensität der Proteinexpression von Nierenzellkarzinomgewebe (n=20) und normalem Nierengewebe (n=12) bei m/z 15931Da zeigt.

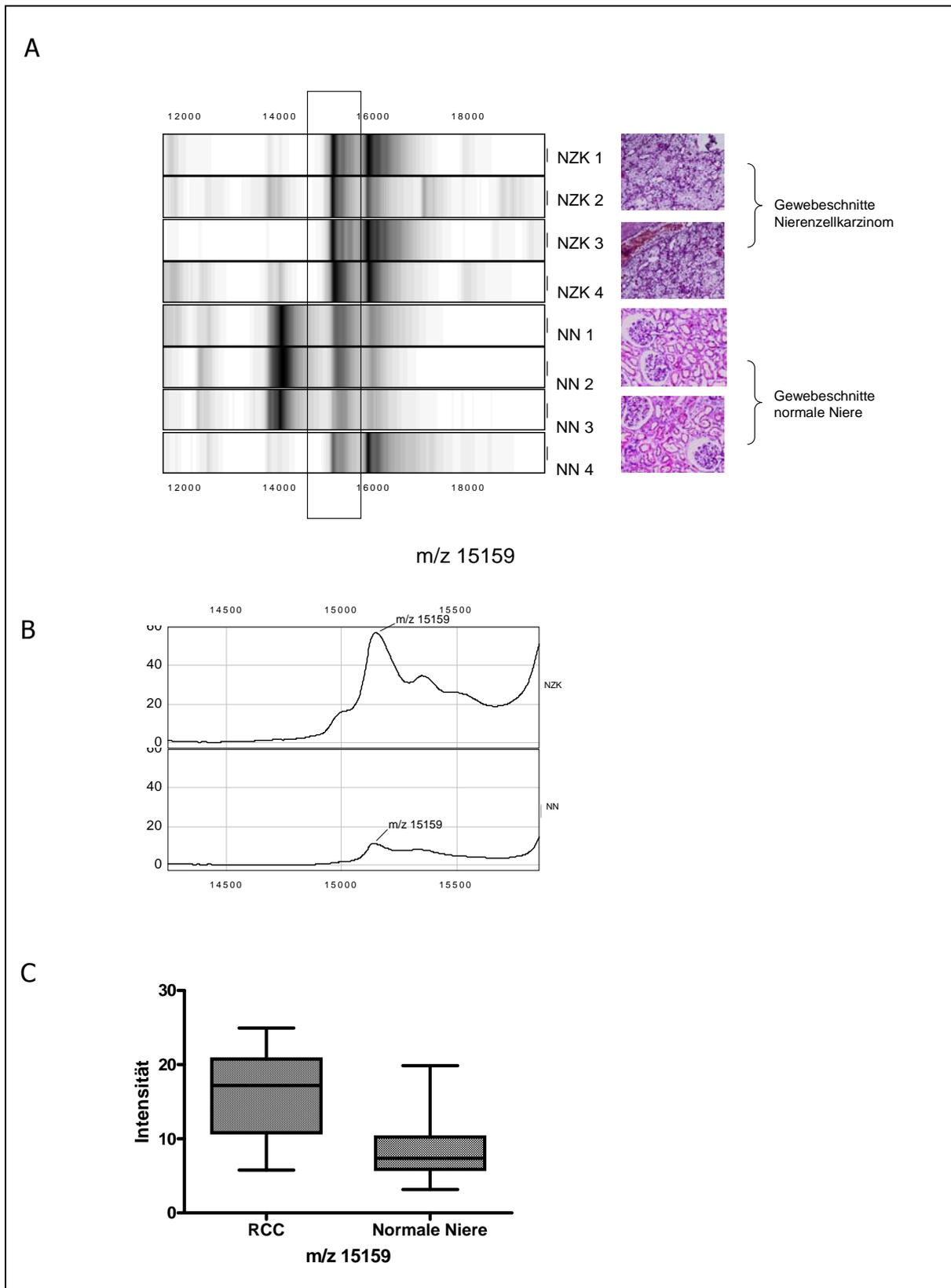


Abbildung 11: Proteinprofil von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe, m/z 15159 Da.

Auf der y-Achse sind die Signalintensitäten gegen die auf der x-Achse befindlichen m/z-Werte aufgetragen. Die Proteinprofile wurden mit dem „ProteinChip Reader“ erstellt. A: Vier Nierenzellkarzinomgewebe und vier normale Nierengewebe in Gel-Ansicht, B: Jeweils ein Beispiel eines Nierenzellkarzinomgewebes und eines normalen Nierengewebes dargestellt als Proteinprofil. C: Statistisch ausgewertet und dargestellt in Form eines Boxendiagramms, welches die Intensität der Proteinexpression von Nierenzellkarzinomgewebe (n=20) und normalem Nierengewebe (n=12) bei m/z 15159 Da zeigt.

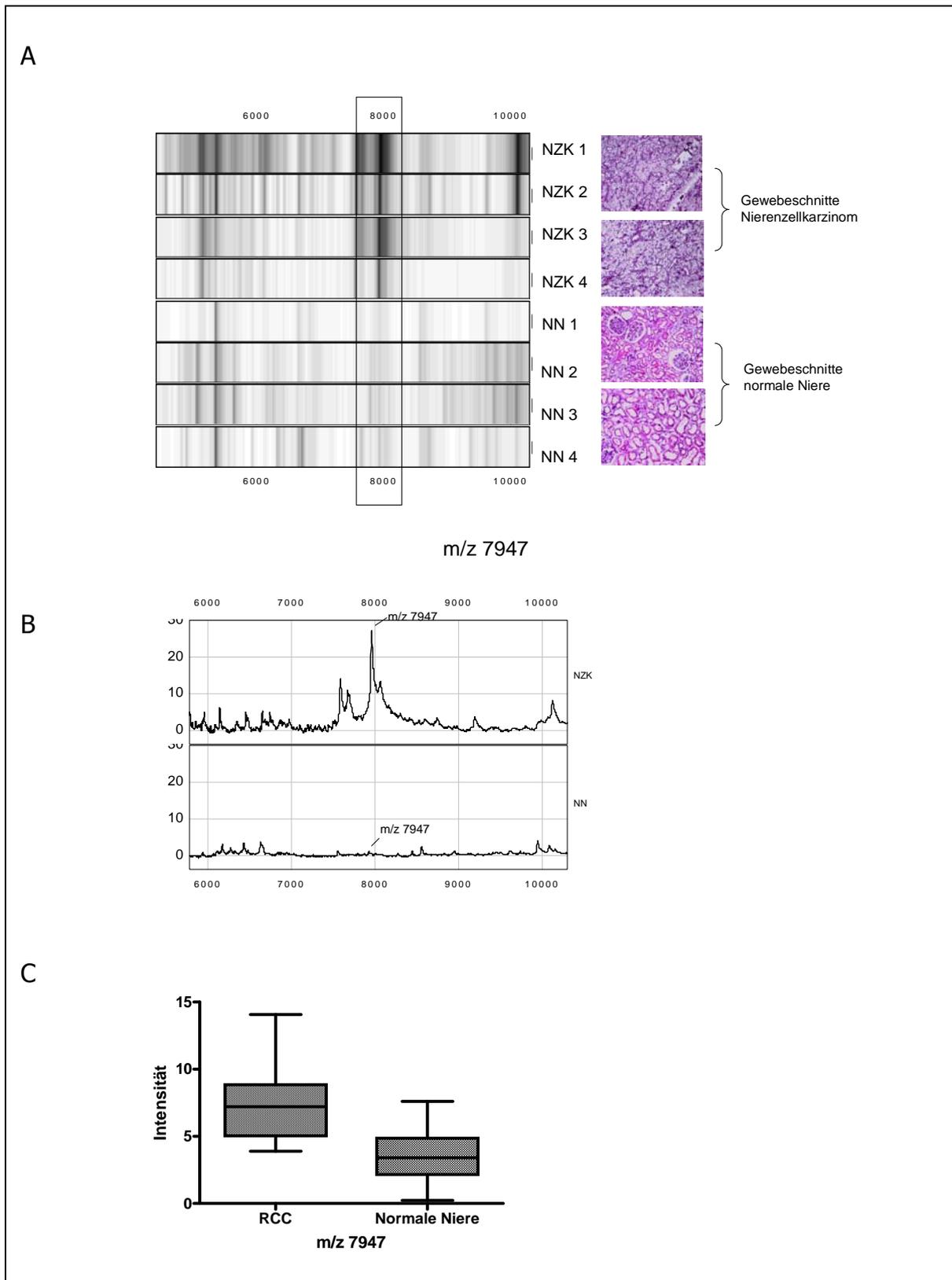


Abbildung 12: Proteinprofil von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe, m/z 7947 Da.

Auf der y-Achse sind die Signalintensitäten gegen die auf der x-Achse befindlichen m/z-Werte aufgetragen. Die Proteinprofile wurden mit dem „ProteinChip Reader“ erstellt. A: Vier Nierenzellkarzinomgewebe und vier normale Nierengewebe in Gel-Ansicht, B: Jeweils ein Beispiel eines Nierenzellkarzinomgewebes und eines normalen Nierengewebes dargestellt als Proteinprofil. C: Statistisch ausgewertet und dargestellt in Form eines Boxendiagramms, welches die Intensität der Proteinexpression von Nierenzellkarzinomgewebe (n=20) und normalem Nierengewebe (n=12) bei m/z 7947 Da zeigt.

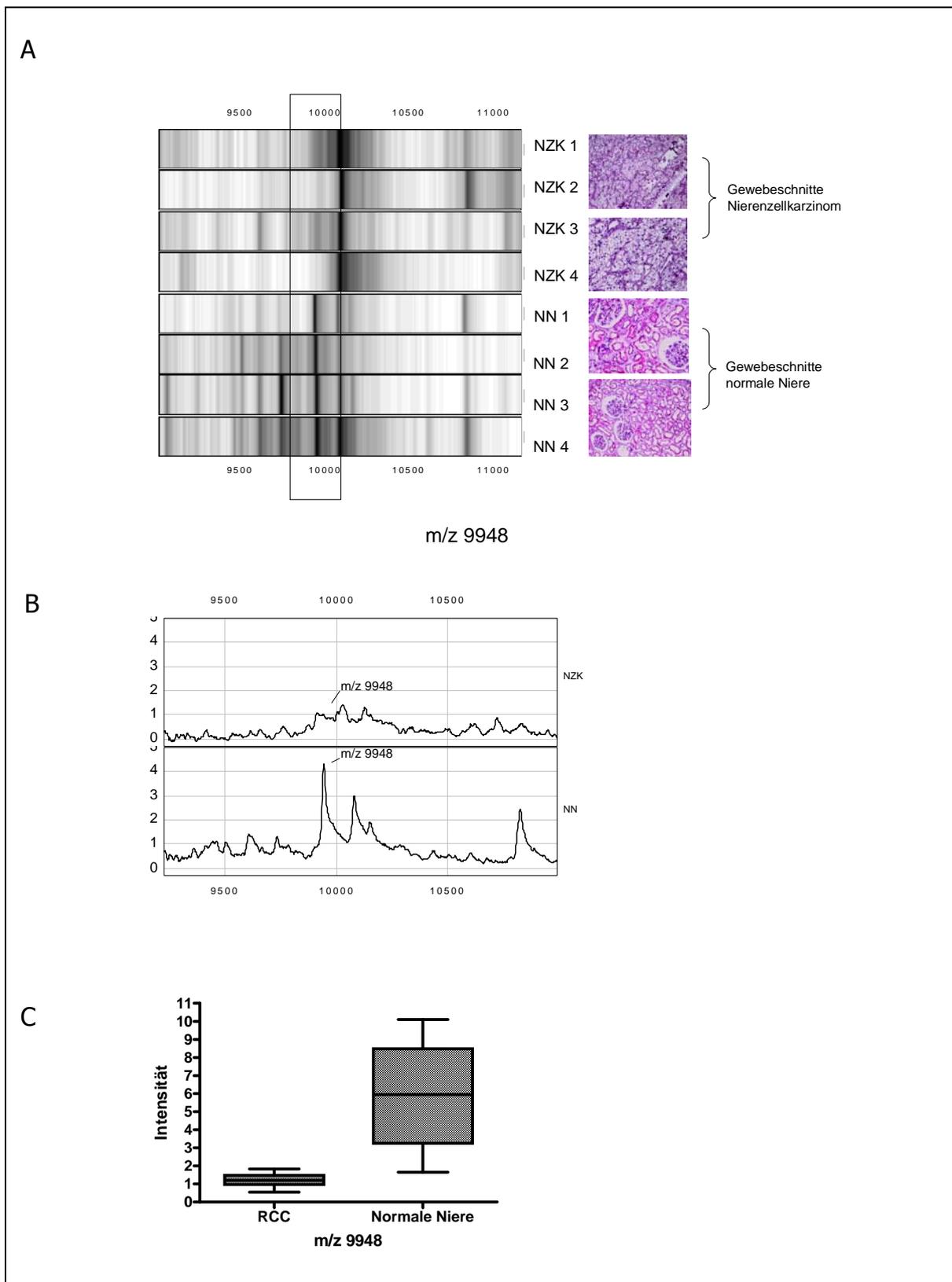


Abbildung 13: Proteinprofil von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe, m/z 9948 Da.

Auf der y-Achse sind die Signalintensitäten gegen die auf der x-Achse befindlichen m/z-Werte aufgetragen. Die Proteinprofile wurden mit dem „ProteinChip Reader“ erstellt. A: Vier Nierenzellkarzinomgewebe und vier normale Nierengewebe in Gel-Ansicht, B: Jeweils ein Beispiel eines Nierenzellkarzinomgewebes und eines normalen Nierengewebes dargestellt als Proteinprofil. C: Statistisch ausgewertet und dargestellt in Form eines Boxendiagramms, welches die Intensität der Proteinexpression von Nierenzellkarzinomgewebe (n=20) und normalem Nierengewebe (n=12) bei m/z 9948 Da zeigt.

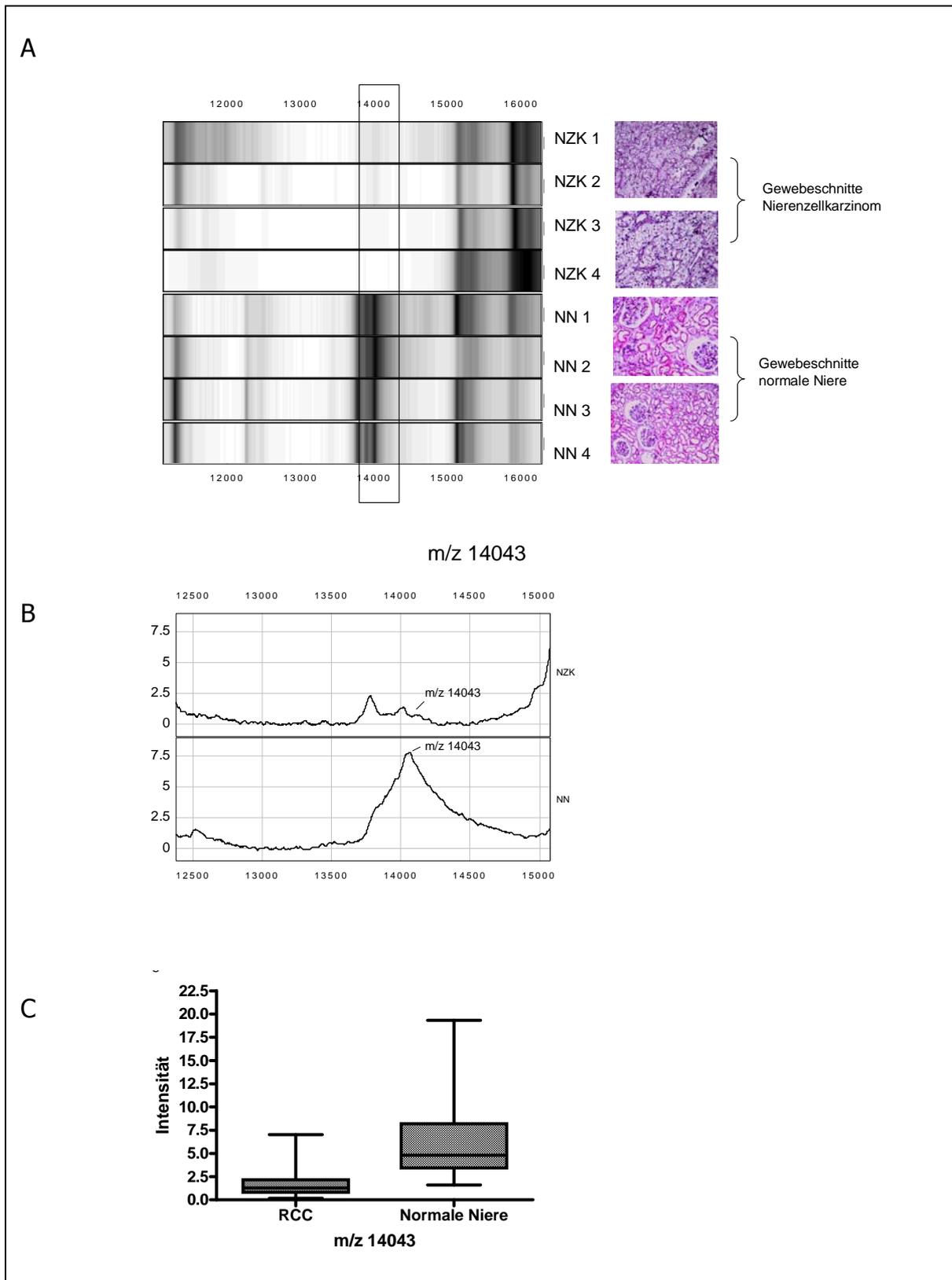


Abbildung 14: Proteinprofil von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe, m/z 14043 Da.

Auf der y-Achse sind die Signalintensitäten gegen die auf der x-Achse befindlichen m/z-Werte aufgetragen. Die Proteinprofile wurden mit dem „ProteinChip Reader“ erstellt. A: Vier Nierenzellkarzinomgewebe und vier normale Nierengewebe in Gel-Ansicht, B: Jeweils ein Beispiel eines Nierenzellkarzinomgewebes und eines normalen Nierengewebes dargestellt als Proteinprofil. C: Statistisch ausgewertet und dargestellt in Form eines Boxendiagramms, welches die Intensität der Proteinexpression von Nierenzellkarzinomgewebe (n=20) und normalem Nierengewebe (n=12) bei m/z 14043 Da zeigt.

Nicht nur optisch konnte man anhand des Proteinprofils Unterschiede im Expressionsmuster erkennen, auch die statistische Auswertung (Tabelle 14) machte die Unterschiede zwischen Proteinexpression des Tumors und normaler Niere verifizierbar. Im Bereich von 15931, 15159 und 7947 Da (siehe Abb. 10, 11 und 12) machten die m/z-Signale eine Überexpression von Proteinen beim Nierenzellkarzinom deutlich, während im Bereich von 9948 und 14043 Da (siehe Abb. 13 und 14) eine Überexpression von Proteinen bei der normalen Niere zu erkennen war.

Tabelle 14: Statistische Auswertung der SELDI-Spektren

Aufgelistet sind 11 statistisch signifikante Proteine, die zwischen NZK und NN unterschiedlich exprimiert wurden. Die Tabelle zeigt das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z-Wert), p-Wert sowie der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) von Tumor und Normalgewebe.

	M/Z	p-Wert	MW Tumor	SD Tumor	MW normale Niere	SD- normale Niere
1	15931,81	0,0000130304	19,98	7,57	4,8	3,82
2	7947,35	0,0000185434	8,55	3,31	2,92	1,71
3	20278,13	0,0000311395	4,05	4,73	0,28	0,38
4	9948,94	0,0001164081	1,39	0,42	4,66	2,43
5	13805,42	0,0035073857	2,21	1,54	4,15	1,74
6	14043,08	0,0021045263	1,92	1,79	5,01	3,89
7	5173,97	0,0000717688	6,15	2,97	1,59	1,21
8	15159,7	0,0000844458	17,86	6,73	6,9	3,96
9	16101,55	0,0000075923	16,04	5,92	3,54	3,01
10	15349,25	0,0000369056	12,93	4,69	5,05	2,74
11	11835,53	0,0000609069	2,97	1,49	0,85	0,74

3.3 Proteomanalyse mit Hilfe der Zweidimensionalen Gelelektrophorese

3.3.1 2D-Gel von Rattennierengewebe unter Zuhilfenahme der Laser-Capture-Mikrodissektionstechnik

Wie unter 2.4.3 beschrieben, wurden mit Hilfe des Laser-Capture-Mikrodissektionsgeräts aus einem Gewebeschnitt einer Rattenniere Zellverbände herausgeschossen und diese in einem Deckel eines Eppendorfgefäßes, welcher 10 µl Harnstoffpuffer enthält, gesammelt. Manuell wurden die für die Arbeit relevanten Zellverbände mit der Laser Software markiert und die Areale mit dem Nitrogen Laser beschossen. Der Laser schießt die Zellen, welche sich innerhalb der Markierung befinden und katapultiert die Zellen in den Deckel. Nach diesem Vorgang wurde das Eppendorfgefäß mit dem Deckel, der die dissezierten Zellen und den Harnstoffpuffer enthält, verschlossen und bei 14000 rpm fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Deckel wieder mit 10 µl Harnstoff gespült und nochmals

zentrifugiert. Insgesamt wurden bei diesem Gel 110 markierte Areale beschossen. Das entspricht ca. 1500 Zellen. Anschließend wurden die Proteine extrahiert und für die 2D-Gelelektrophorese vorbereitet. Abbildung 15 zeigt ein 12%iges Minigel von Rattennierenproteinen, welche mit Hilfe der LCM-Technik gewonnen wurden. Gefärbt wurde dieses Gel mit einer nach Shevchenko et al. (1996) modifizierten Methode. Auf dem Gel sind wenige Proteine zu sehen, was an der zu geringen Anzahl der durch die LCM-Methode gewonnenen Zellen lag.

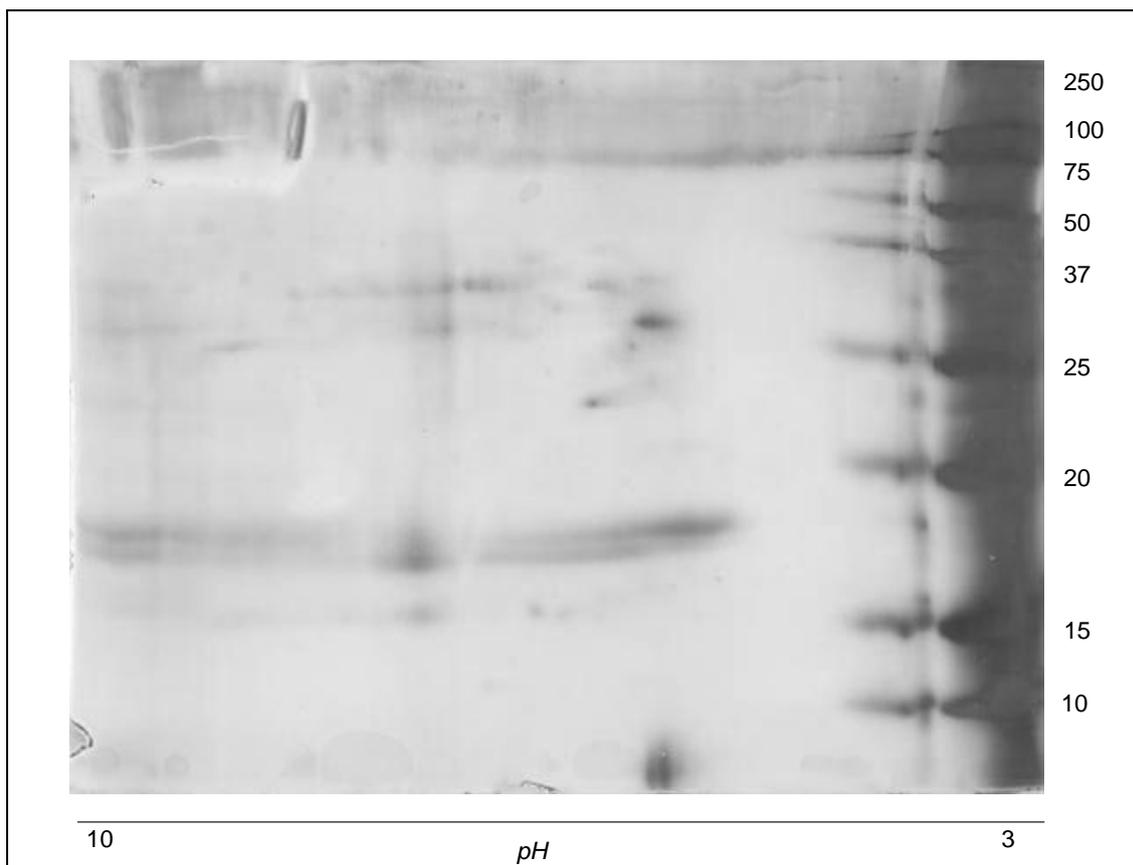


Abbildung 15: 12%iges Minigel von Rattennierengewebe, pH-Bereich 3-10.

Die Rattennierenzellen wurden mittels der LCM-Technik gewonnen. Das Gel wurde wie unter 2.6 beschrieben angefertigt und mit einer von Shevchenko et al. abgeleiteten Methode gefärbt (2.6.8).

3.3.2 2D-Gel von Proteinextrakten aus normalem Nierengewebe

Neben SELDI-TOF-MS Analysen wurden 2D-Gele angefertigt. SELDI zeigt Proteinspektren im Molekularbereich von 2000-20000 Da, während bei 2D-Gelelektrophorese Proteine im Bereich von 10000-250000 Da visualisiert werden können. Des Weiteren bietet die 2D-Gelelektrophorese die Möglichkeit der Identifizierung der Proteine, die eine unterschiedliche Expression aufweisen. Daher stellt die 2D-Gelelektrophorese die optimale Ergänzung zu SELDI dar und umgekehrt. Aus gesundem Nierengewebe wurden die Proteine extrahiert und die Proteinkonzentration anschließend nach der Bradford-Methode (1976) bestimmt. Nach der Ermittlung der

Proteinkonzentration des Gewebelysats wurden 400 µg Protein der Probe auf einen 17 cm langen immobilisierten pH-Gradienten-Streifen im pH-Bereich 3-10 fokussiert. Die rehydrierten und fokussierten Streifen wurden auf die SDS-Page geladen und die Elektrophorese wurde durchgeführt. Angefärbt wurde das Gel mit Coomassie-Brillantblau um die Proteinspots sichtbar zu machen. Es sind Proteine dargestellt im Massenbereich von 10-250 kDa (siehe Abb. 16).

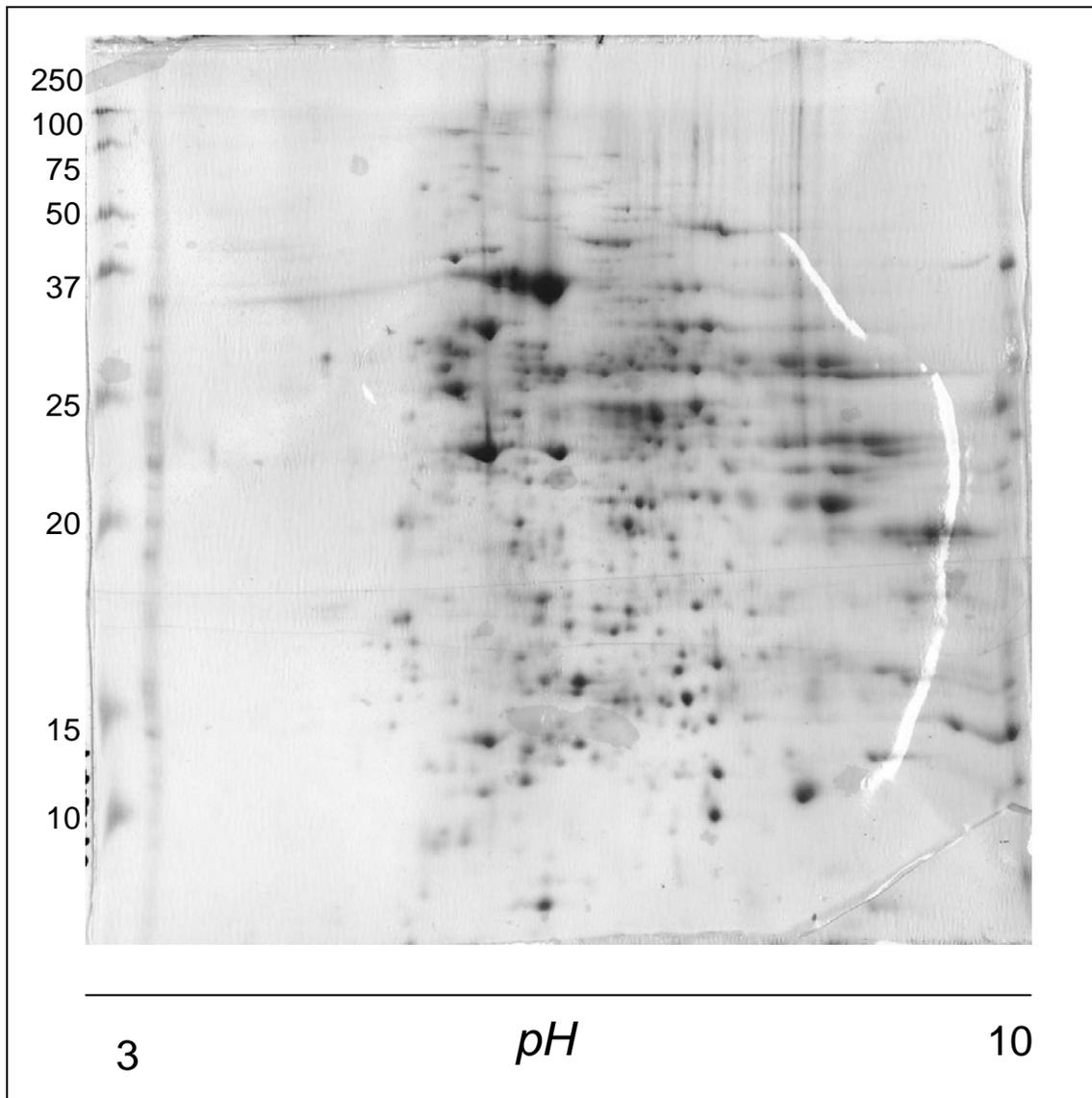


Abbildung 16: 12%ige SDS Page von Proteinextrakt aus normalem Nierengewebe, pH-Bereich 3-10 (Coomassie-Färbung).

Das Gel wurde gemäß dem in Abschnitt 2.6 beschriebenen Protokoll angefertigt. Die Proteine wurden mit der Coomassie-Färbung visualisiert (2.6.8)

3.3.3 Identifizierung von Proteinen des Nierenzellkarzinomgewebes und normalen Nierengewebes

Die Proteinidentifizierung wurde wie unter 2.7- 2.9 beschrieben durchgeführt.

Durch Messungen mit Q-TOF und der Proteindatenbanksuche konnten einige Proteine identifiziert werden. Die aus den Gelen geschnittenen Spots wurden auf der Abbildung mit Umrandungen und Nummern kenntlich gemacht. Es wurden zwei repräsentative 2D-Gele von Nierenzellkarzinomgewebe und gesundem Nierengewebe ausgewählt. Die Gele wurden mit der Silberfärbung nach einer nach Shevchenko et al. (1996) abgeleiteten Methode gefärbt. Es handelt sich dabei um 12%ige Gele im pH-Bereich 3-10. Die nachfolgend präsentierten Ausschnitte stammen aus denselben 2D-Gelen.

In Abbildung 17 werden zwei Ausschnitte von Nierenzellkarzinomgewebe und gesundem Nierengewebe im Massenbereich von 10-20 kDa präsentiert.

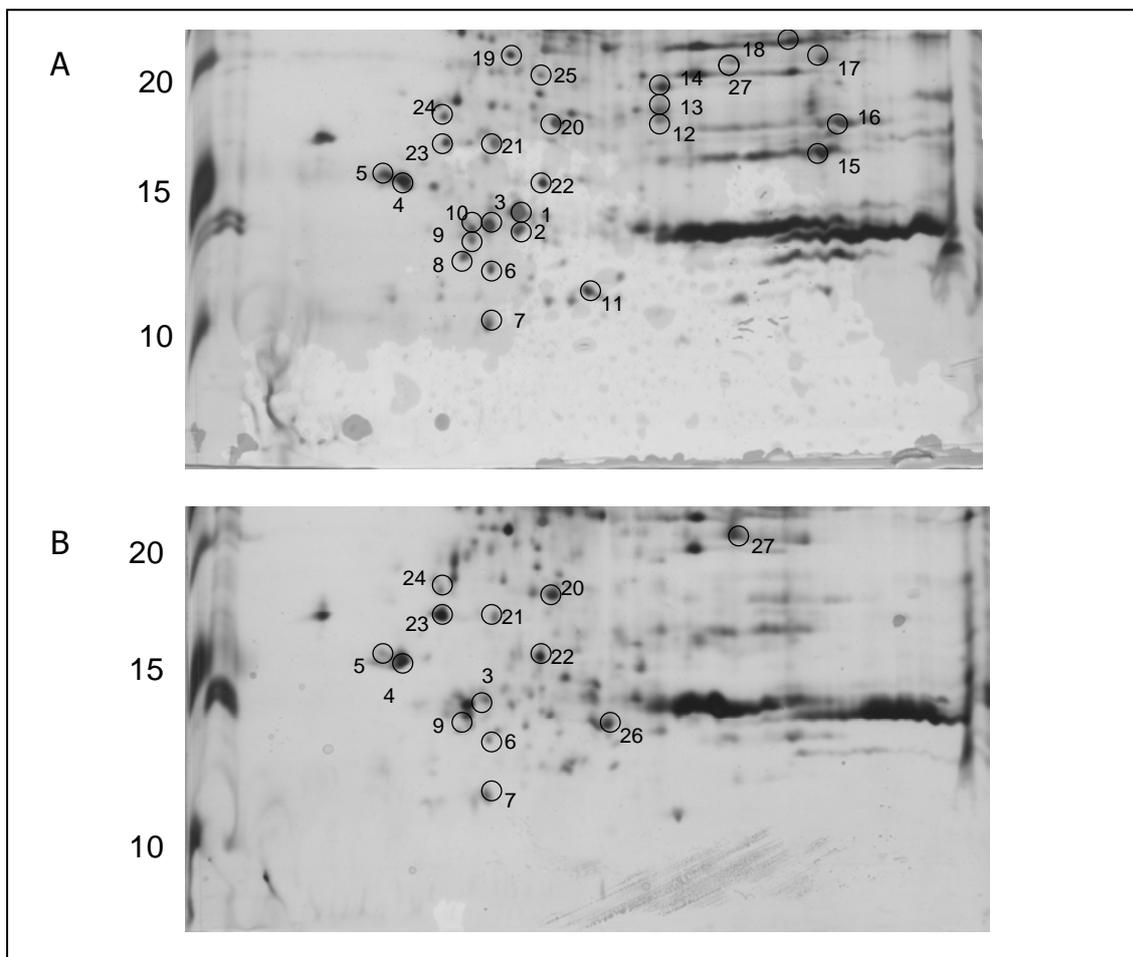


Abbildung 17: Ausschnitt eines 12%igen 2D-Gels im pH-Bereich 3-10 vom Nierenzellkarzinom (A) und eines 2D-Gels von normaler Niere im pH-Bereich 3-10 (B) im Massenbereich von 10000 bis 20000Da.

Das Gel wurde gemäß dem in Abschnitt 2.6 beschriebenen Protokoll angefertigt. Die Proteine wurden mit der Silberfärbung (2.6.8) visualisiert. Nummeriert sind repräsentative Proteine, die mittels Massenspektrometrie und Datenbankrecherche identifiziert wurden.

Die mit Massenspektrometrie und Datenbanksuche im Bereich von 10-20 kDa identifizierten Proteine des Nierenzellkarzinoms bzw. der gesunden Niere wurden in Tabelle 15 zusammengefasst.

Die identifizierten Proteine wurden in der Tabelle entsprechend ihrer Spotnummer im Gel aufgelistet. Des Weiteren informiert die Tabelle über den Namen des Proteins, das Molekulargewicht, den isoelektrischen Punkt, die Trefferquote („Score“) und den Wert der Übereinstimmung zwischen gemessenen und theoretisch errechneten Peptidmassen („match“) an.

Tabelle 15: Liste der identifizierten Proteine (pH 3-10) entsprechend zu Abbildung 17, gemessen mit Q-TOF und Datenbankvergleich

Aufgelistet sind Spot-Nummer, Proteinname, Molekulargewicht, IP, MS Score und No. Of peptide matched.

Spot	Protein	MW Da)	IP	MS Score	No. Of peptide matched
1	Fatty acid binding protein 7, brain	14758	5,41	407	15
2	Fatty acid binding protein 7, brain	14758	5,41	407	15
3	Galectin 1	14585	5,34	280	8
4	Myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non muscle	16766	4,56	125	6
5	Myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non muscle	16766	4,56	125	6
6	Myotrophin	12764	5,28	51	1
7	S100 calcium binding protein A6 (Calcyclin)	10180	5,32	100	3
8	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	22857	5,1	166	7
9	Thioredoxin	11606	4,82	144	3
10	Cytochrom c oxidase subunit Va	16762	6,3	79	2
11	S100 calcium binding protein A11 (Calgizzarin)	11740	6,65	71	3
12	Transgelin	22480	8,88	123	5
13	Transgelin	22480	8,88	123	5
14	Crystallin, alpha B	20159	6,76	107	4
15	Peptidyl-prolyl isomerase A (Cyclophilin A)	17881	7,82	250	7
16	Cofilin 1 (non-muscle)	18371	8,26	182	6
17	Phosphatidylethanolamine binding protein 1	20926	7,45	261	6
18	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	24722	8,35	116	6
19	Apolipo-protein A-1	30778	5,56	72	4
20	Superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))	15805	5,7	203	3
21	Eucaryotic translation initiation factor 5A	16701	5,08	141	4
22	Transthyretin (präalbumin amyloidosis type 1)	15887	5,52	95	4
23	Cytochrom b5 type A (microsomal)	15199	4,88	110	3
24	Myosin regulatory light chain MRCL 3	19663	4,67	243	6
25	Adenine phosphoribosyltransferase	19477	5,79	139	6
26	Fatty acid binding protein 1, liver	14208	6,6	129	4
27	Phosphatidylethanolamine binding protein 1	20926	7,43	252	7

In Abbildung 18 werden zwei Ausschnitte von Nierenzellkarzinomgewebe und gesundem Nierengewebe im Massenbereich von 25-50 kDa dargestellt.

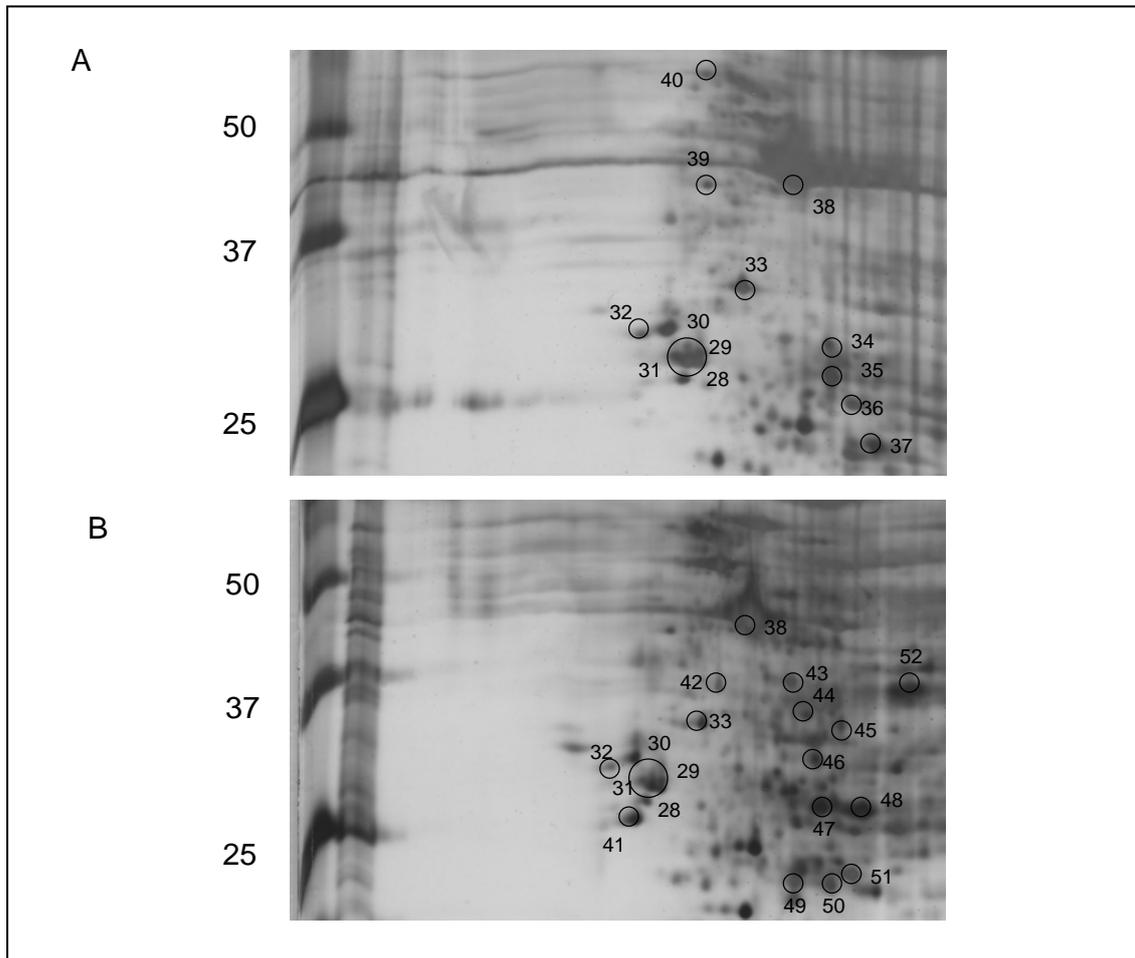


Abbildung 18: Ausschnitt von 12%igen 2D-Gelen im pH-Bereich 3-10 vom Nierenzellkarzinom (A) und von normaler Niere (B) im Massenbereich von 25000 bis 50000 Da.

Das Gel wurde gemäß dem in Abschnitt 2.6 beschriebenen Protokoll angefertigt. Die Proteine wurden mit der Silberfärbung (2.6.8) visualisiert. Nummeriert sind representative Proteine, die mittels Massenspektrometrie und Datenbankrecherche identifiziert wurden.

Die identifizierten Spots sind in Tabelle 16 entsprechend ihrer Spotnummer im Gel aufgelistet.

Tabelle 16: Liste der identifizierten Proteine (pH 3-10) entsprechend zu Abbildung 18, gemessen mit Q-TOF und Datenbankvergleich

Aufgelistet sind Spot-Nummer, Proteinname, Molekulargewicht, IP, MS Score und No. of peptide matched.

Spot	Protein	MW (Da)	IP	MS Score	No. of peptide matched
28	Tyrosine 3- monooxygenase/tryptophan, 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide	27951	4,76	467	13
29	Tyrosine 3- monooxygenase/tryptophan, 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	28171	4,8	193	6
30 (33)	Tyrosine 3- monooxygenase/tryptophan, 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	27745	4,73	314	11
31 (32)	Tyrosine 3- monooxygenase/tryptophan, 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	27745	4,73	3,73	11
32	Eucaryotic translation elongation factor 1 beta 2	24633	4,5	51	4
33	Annexin A5	35806	4,49	497	20
34	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)	27402	5,54	254	9
35	Nicotinamide N-methyltransferase	29574	5,56	109	9
36	Heat shock 27kDa protein 1	22783	5,98	382	14
37	Peroxiredoxin 2	21761	5,67	243	10
38	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	42009	5,24	815	41
39	Ribosomal Protein SA	32723	4,79	434	8
40	Procollagene proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide	57116	4,76	406	22
41	Calbindin 1	29894	4,7	414	18
42	Crystallin, mu (tissue specific!)	33776	5,06	462	10
43	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	30991	5,53	457	12
44	Quinolate phosphoribosyltransferase (nicotinatenucleotide pyrophosphorylase (carboxylating))	30816	5,81	86	6
45	Crystallin, lambda 1	35288	5,81	426	10
46	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	35329	8,38	226	8
47	Enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	31387	8,34	263	12
48	Enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	31387	8,34	362	17
49	Glutathione peroxidase 3 (plasma)	25505	8,2	145	5
50	Abhydrolase domain containing 16B	22346	5,94	233	7
51	Peroxiredoxin 3	27693	7,68	233	12
52	Chromosome 11 open reading frame 54	35117	6,23	299	7

3.3.4 Cyclophilin-A-Expression beim Nierenzellkarzinom und normaler Niere

Peptidyl-prolyl isomerase A (Cyclophilin-A) ist ein Protein der Immunophilin Familie. Es hat eine Masse von 17881 Da. Der isoelektrische Punkt liegt bei 7,82. Es handelt sich um ein Protein, das in der Lage ist, das Immunsuppressivum Cyclosporin-A zu binden. Des Weiteren kann es Proteine durch seine cis-trans Isomerasefunktion aktivieren. Außerdem spielt es eine Rolle bezüglich Proteinfaltung und intrazellulären Proteintransport. Die 2D-Page von Nierenzellkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe in Abbildung 19 macht deutlich, dass Cyclophilin-A beim Nierenzellkarzinom im Gegensatz zu gesundem Nierengewebe stark exprimiert wird

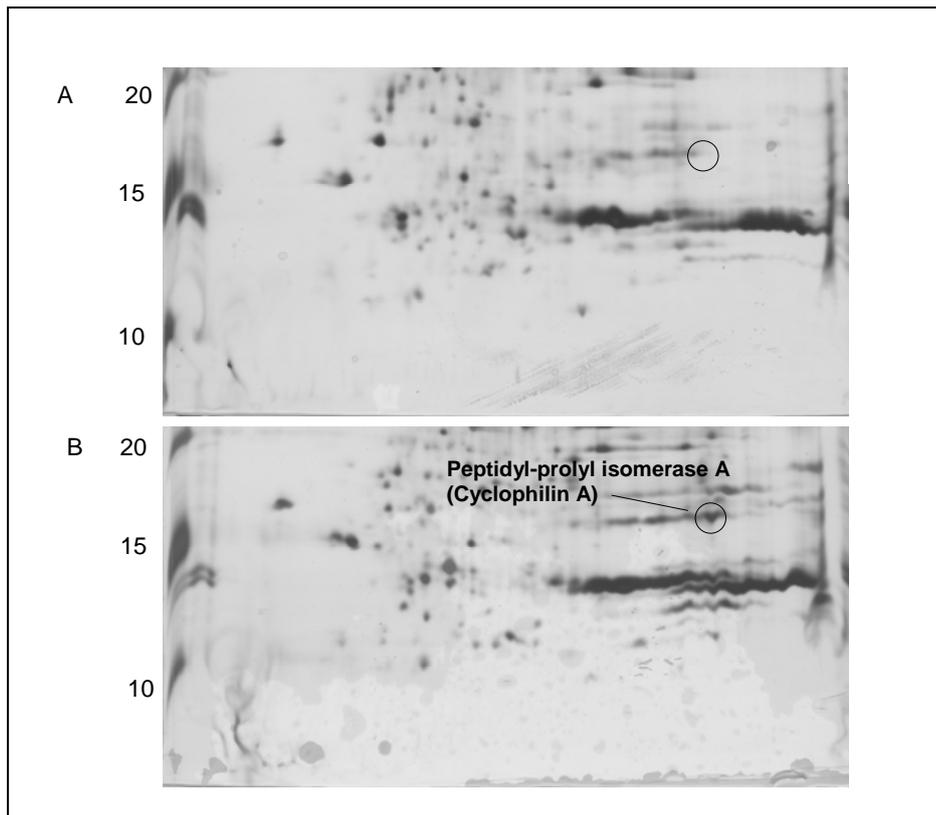


Abbildung 19: Ausschnitt eines 2D-Gels vom normalem Nierengewebe (A) und von Nierenzellkarzinomgewebe (B) im Massenbereich von 14000 Da.

Es handelt sich um ein 12%iges Gel, pH-Wert 3-10, Silberfärbung nach Shevchenko. Dargestellt ist die Expression von Cyclophilin-A.

3.3.5 Expression von Rho dissociation inhibitor (GDI) beta (Rho GDI beta)

Rho GDI beta ist ein Mitglied der Rho GDI Familie. Es hat ein Molekulargewicht von 22988 Da und einen isoelektrischen Punkt von 5,1. Rho GDI beta reguliert den GDP/GTP Austausch der Rho GTPasen, indem es deren Dissoziation von GDP inhibiert und die anschließende Bindung von GTP. Die Rho GTPasen werden somit inaktiv (Sasaki et al., 1993 und Zalzman et al., 1999). Abbildung 20 zeigt Ausschnitte von 2D-Gelen von Nierenzellkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe im Massenbereich von 10-20 kDa. Zu sehen ist, dass beim Nierenzellkarzinom Rho GDI beta exprimiert wird. Bei der normalen Niere hingegen konnte keine Expression von Rho GDI beta nachgewiesen werden.

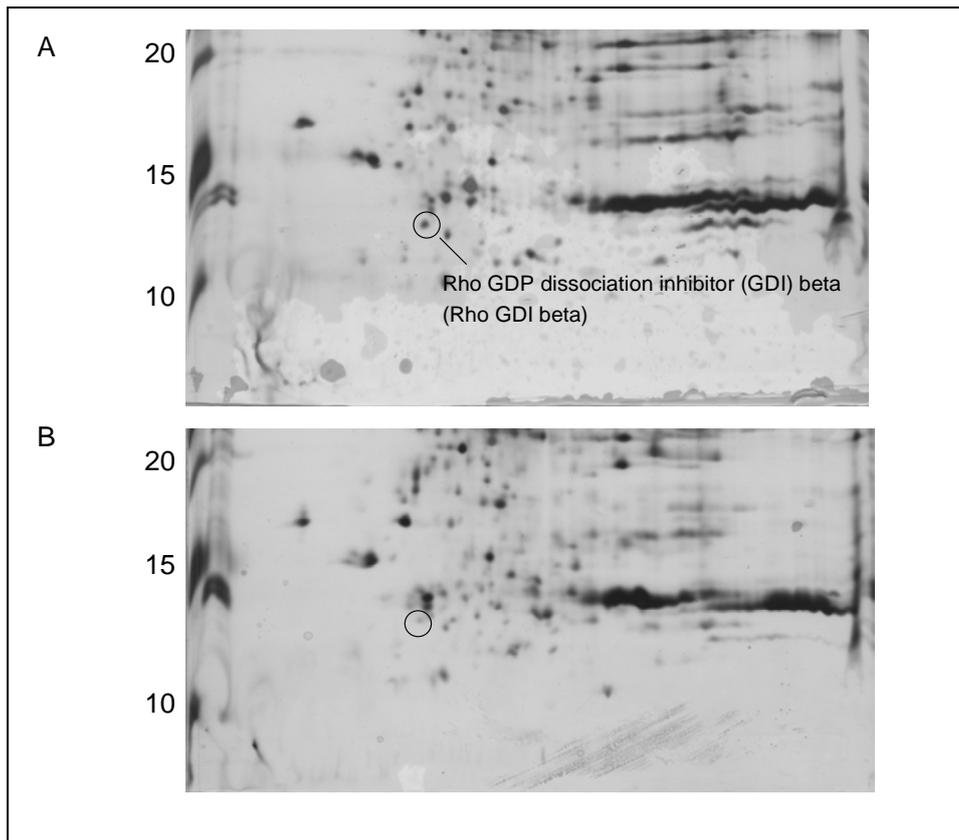


Abbildung 20: Ausschnitt eines 2D-Gels vom Nierenzellkarzinomgewebe (A) und von normalem Nierengewebe (B) im Massenbereich von 10-20 kDa.

Es handelt sich um ein 12%iges Gel, pH-Wert 3-10, Silberfärbung von Shevchenko et al., (1996). Dargestellt ist die Expression von Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta.

3.3.6 Expression von Fatty acid binding protein 7 (B-FABP), brain beim Nierenzellkarzinom im Vergleich zur normalen Niere

B-FABP gehört zur Familie der Lipid bindenden Proteine. Es hat ein Molekulargewicht von 14758 Da und einen isoelektrischen Punkt von 5,41. B-FABP bindet langkettige Fettsäuren und andere hydrophobe Liganden. Des Weiteren spielt dieses Protein eine Rolle bei Aufnahme, Transport und Metabolismus von Fettsäuren. Mit Hilfe der Zwei-dimensionalen Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass B-FABP vom Nierenzellkarzinom hoch exprimiert wird. Im Gegensatz dazu konnte bei dem normalen Nierengewebe B-FABP nicht identifiziert werden. Abbildung 21 zeigt einen Ausschnitt eines 2D-Gels von Nierenzellkarzinomgewebe im Massenbereich von 10000-20000 Da. Man erkennt eine hohe Expression von B-FABP beim Nierenzellkarzinomgewebe.

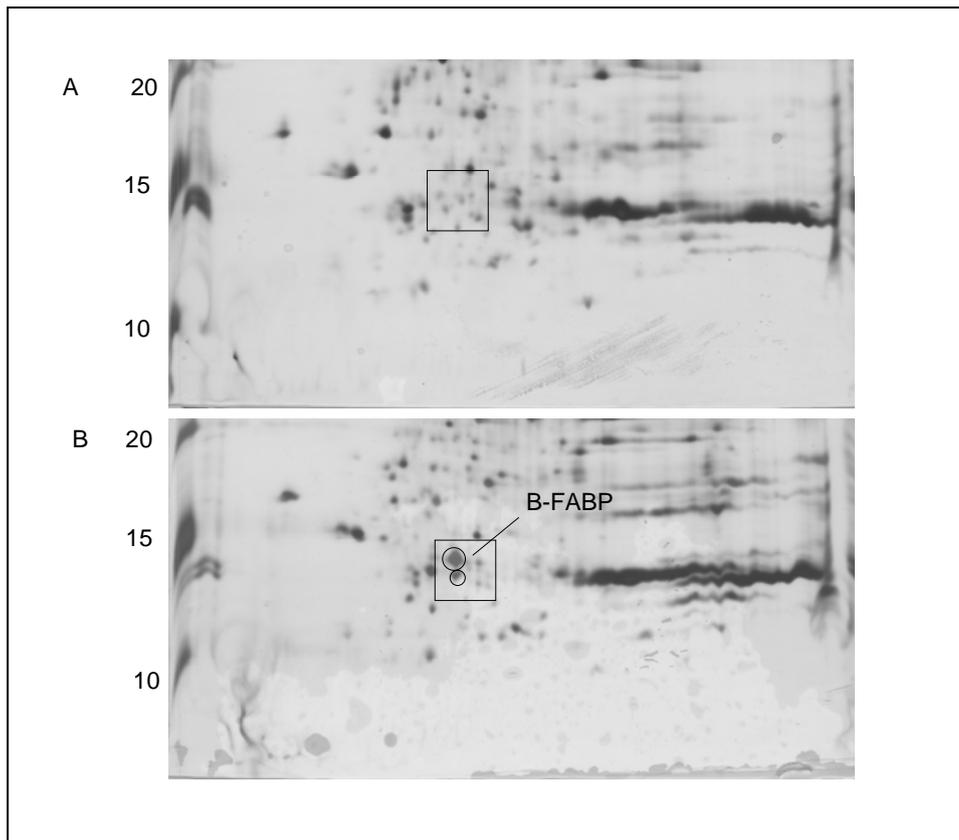


Abbildung 21: Ausschnitt eines 2D-Gels vom normalen Nierengewebe (A) und von Nierenzellkarzinomgewebe (B) im Massenbereich von 14000 Da.

Es handelt sich um ein 12%iges Gel, pH-Wert 3-10, Silberfärbung von Shevchenko et al., (1996). Dargestellt ist die Expression von Fatty acid binding Protein 7, brain.

3.3.7 Expression von Galectin-1 beim Nierenzellkarzinom im Vergleich zu normaler Niere

Galectin-1 ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 14585 Da und einem isoelektrischen Punkt von 5,34. Die Funktion von Galectin-1 liegt in der Regulierung der Zellapoptose und der Zelldifferenzierung. Es ist sowohl in gesundem als auch im Nierenzellkarzinomgewebe vorhanden. Weiterhin bindet Galectin-1 beta-Galactoside. Die Zwei-Dimensionale Gelelektrophorese von Nierenzellkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe zeigte, dass Galectin-1 in beiden Geweben vorhanden ist. Es zeigte sich aber auch, dass Galectin-1 im Tumorgewebe 2,5 fach höher exprimiert wird als in gesundem Nierengewebe. Abbildung 22 zeigt jeweils einen Ausschnitt eines 2D-Gels von Nierenzellkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe im Massenbereich von 10000-15000 Da. Zu erkennen ist, dass Galectin-1 deutlich stärker beim Tumorgewebe exprimiert wird.

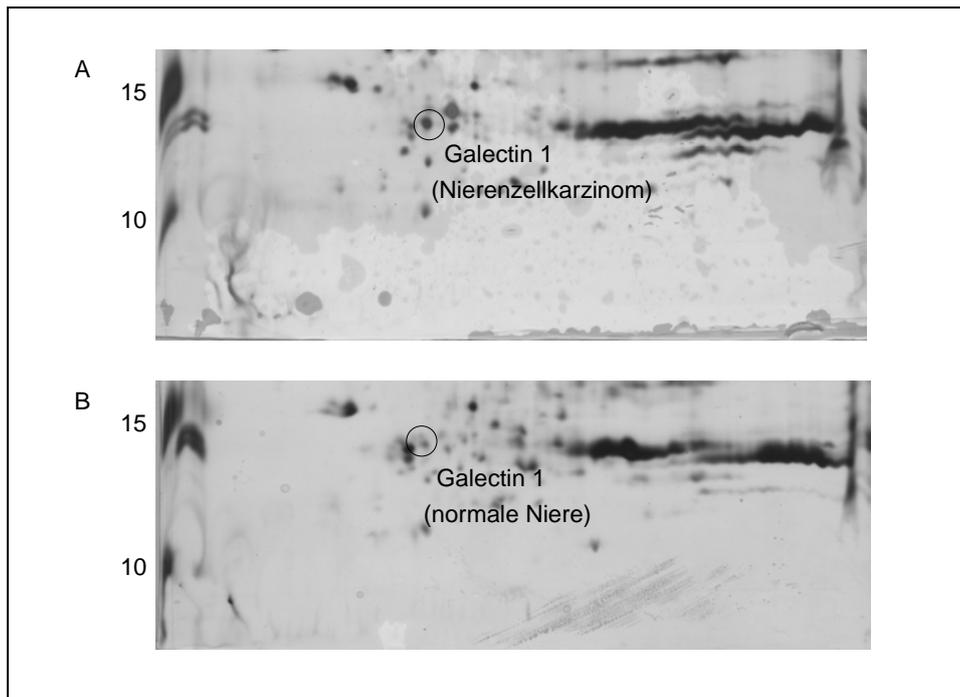


Abbildung 22: Ausschnitt eines 2D-Gels vom Nierenzellkarzinom (A) und von normaler Niere (B) im Massenbereich von 14000 Da.

Es handelt sich um ein 12%iges Gel, pH-Wert 3-10, Silberfärbung von Shevchenko et al., (1996). Dargestellt ist die Expression von Galectin-1.

3.4 Western-Blot-Analyse von Galectin-1

Die unterschiedliche Expression von Galectin-1 beim Nierenzellkarzinom und bei gesunder Niere wurde mit Hilfe der Zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht. Um die Ergebnisse mit einer zweiten Methode zu verifizieren, wurde für das Protein Galectin-1 die Western-Blot-Analyse durchgeführt.

Die Western Blots wurden nach Towbin (1971) modifiziert als Tankblotting durchgeführt. Es wurde der monoklonale Antigalectin-1 Antikörper verwendet. Als Kontrolle (positiv) wurde der Marker β -Aktin benutzt.

Abbildung 23 zeigt repräsentative Westernbanden zweier Nierenzellkarzinome und gesunder Niere. Das Expressionsverhalten von Galectin-1 in der 2D-Gelelektrophorese konnte in der Western-Blot-Analyse bestätigt werden.

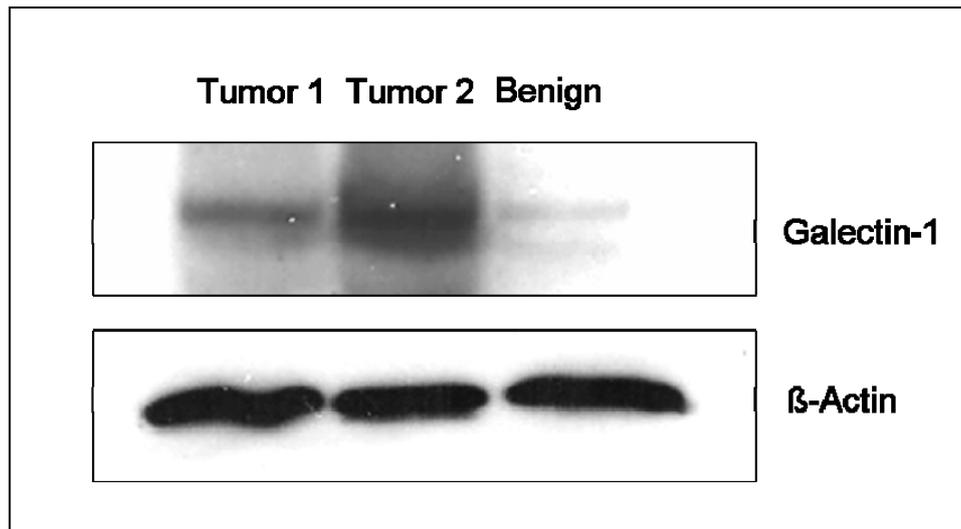


Abbildung 23: Western-Blot-Analyse von Nierenzellkarzinomgewebe.

Western-Blot-Analyse von Zellextrakten zweier Nierenzellkarzinomgewebe (Tumor 1 und Tumor 2) und gesundem Nierengewebe (Cortex) mit monoklonalem Antigalectin-1-Antikörper.

3.5 Immunfärbung von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe

Um die Expression und Lokalisation von Galectin-1 aufzuzeigen, wurden Gewebeschnitte vom Nierenzellkarzinom und normaler Niere angefertigt. Diese Schnitte wurden mit einem Galectin-1-spezifischen Antikörper gefärbt. Galectin-1 ist ein Protein, das beim Nierenzellkarzinom im Vergleich zur gesunden Niere überexprimiert wird. Dieses Expressionsverhalten konnte mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese und der Western-Blot-Analyse gezeigt werden. Die Immunfluoreszenzfärbung in Abbildung 24 zeigt, dass Galectin-1 nur bei einer kleinen Anzahl von Zellen des gesunden Cortexgewebes schwach exprimiert wird. Beim Nierenzellkarzinom hingegen zeigt sich eine hohe Expression dieses Proteins. Abbildung 25 zeigt eine immunhistochemische Färbung von Tumor- und Cortexgewebe. Genau wie bei der Immunfluoreszenzfärbung sieht man die erhöhte Expression von Galectin-1 beim Nierenzellkarzinom im Vergleich zu gesundem Nierengewebe.

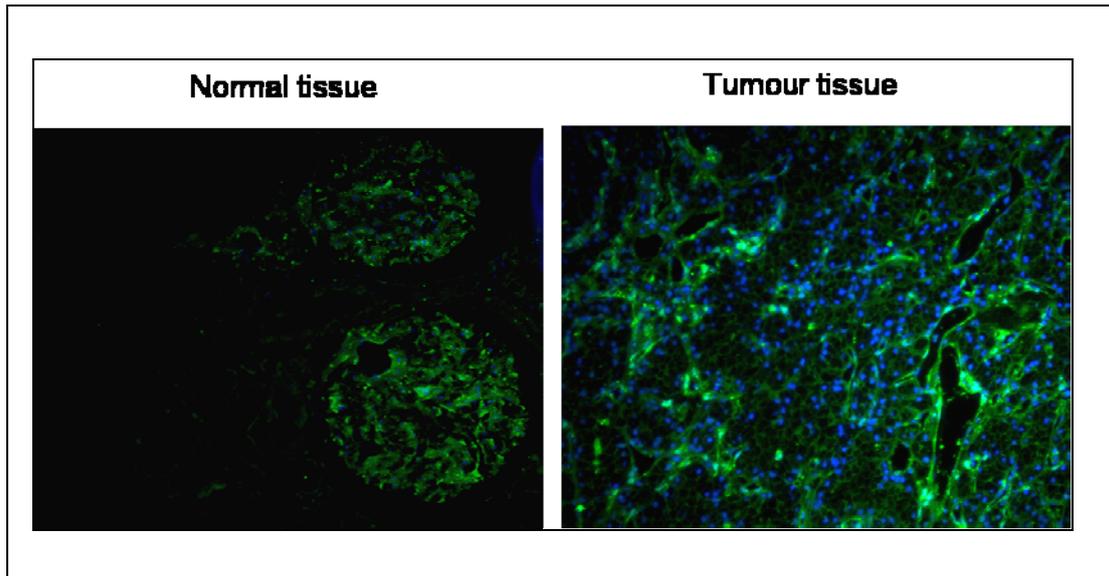


Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe mit einem Anti-Galectin-1-Antikörper.

Immunfluoreszenzfärbung von tumorösen und gesundem Nierengewebeschnitten mit dem Galectin-1-spezifischen Antikörper.

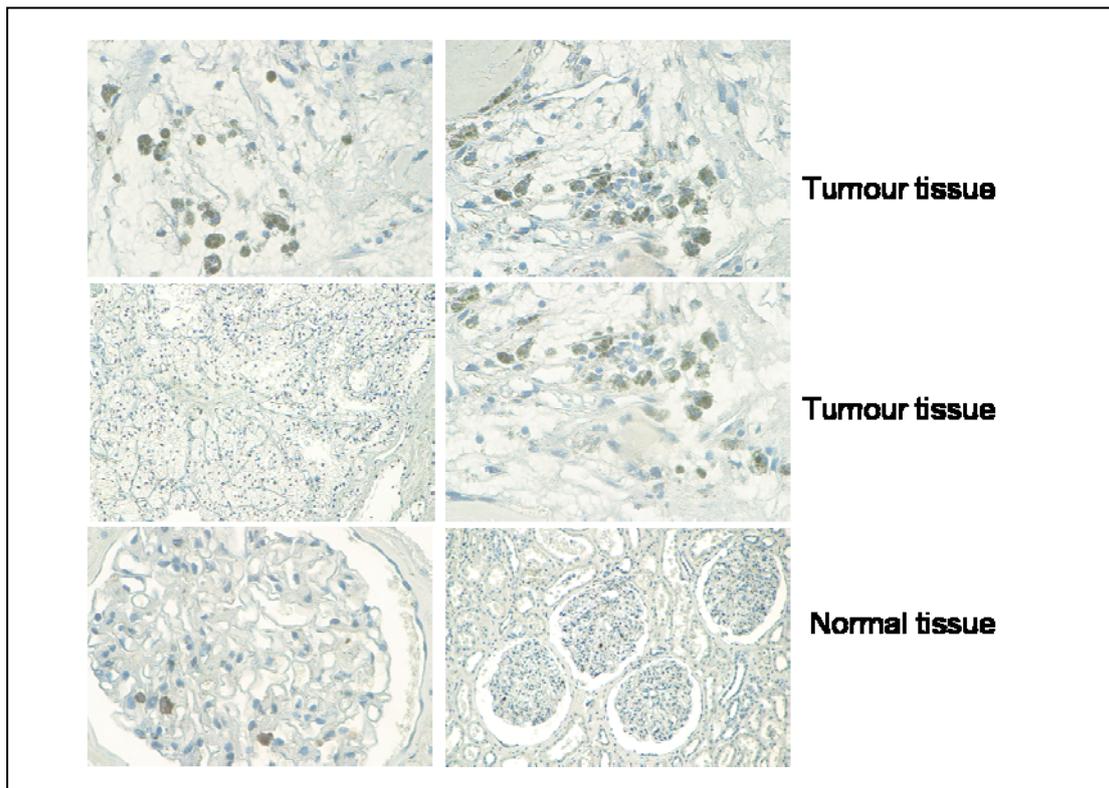


Abbildung 25: Immunhistochemie von NZK-Gewebe und normalem Nierengewebe mit einem Anti-Galectin-1-Antikörper.

Immunhistochemie von tumorösen und gesunden Nierengewebeschnitten mit dem Galectin-1-spezifischen Antikörper.

4. Diskussion

4.1 Biomarker beim Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom ist ein Tumor, der charakterisiert ist durch das Fehlen von Frühsymptomen. Aus diesem Grund resultiert eine Metastasierung bei einem Großteil der Patienten (Motzer et al., 1996). Metastasierte Tumorstadien haben eine sehr schlechte Prognose, was nicht zuletzt an der weitestgehenden Multi-Drug-Resistance (MDR) gegenüber antineoplastischen Medikamenten liegt. Erklärt wird die Multi-Drug-Resistance durch Multi-Drug-Resistance-Genprodukten des Tumors (Fojo et al., 1987). Die inzwischen zufällige, frühe Diagnosestellung im Rahmen einer Ultraschalluntersuchung der Bauchorgane und die kürzliche Vergrößerung der Therapieoptionen haben die Aussicht für Patienten mit Nierenzellkarzinom deutlich verbessert. Jedoch sind das Voranschreiten der Krankheit und die Ansprechraten der Therapien noch nicht ausreichend vorhersehbar. An dieser Stelle könnten Biomarker dabei helfen verlässliche Aussagen bezüglich der individuellen Krankheitsprognose, Planung und Wahl der Therapie bzw. des Therapieerfolges zu treffen (Eichelberg et. al., 2009). Das Verständnis über die Veränderungen der Proteomebene eines Tumors, das heißt die Charakterisierung der veränderten Proteinexpression, könnte hilfreich dabei sein die Biologie des Krebses zu erfassen (Yanagisawa et al., 2003). Dadurch wäre ein weiterer Schritt getan, um die grundlegenden Mechanismen der Krebsentstehung auf molekularer Ebene zu verstehen. Aus diesem Grund besteht ein besonders großes Interesse an der Identifizierung von Biomarkern für das Nierenzellkarzinom.

Vor einigen Jahren haben sich die Forschungsarbeiten im molekularbiologischen Bereich beim Nierenzellkarzinom vornehmlich auf die Identifizierung spezifischer Veränderungen auf der Genom-Ebene gehäuft. Die viel komplexere und hochdynamische Proteom-Ebene wurde lange Zeit nicht berücksichtigt. Seit einiger Zeit rückt die Proteom-Ebene immer mehr in den Fokus der molekularbiologischen Arbeiten.

4.2 Methoden zur Identifizierung spezifischer Proteinexpressionsprofile und Detektion von Biomarkern

Für die Erfassung der Veränderungen der Proteinexpressionen stehen einige Methoden zur Verfügung. Die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Standardmethode zur Identifizierung von Proteinen. Dieses Verfahren stellt die leistungsstärkste analytische Methode für die Trennung von Proteinen dar. Die Vorteile dieser Methode sind die gleichzeitige Visualisierung tausender Proteine, die Visualisierung

modifizierter Proteine und die Möglichkeit der ergänzenden massenspektrometrischen Identifizierung der Proteine. Der Nachteil der SDS-PAGE ist, dass sehr große Proteine (>120 kDa) und sehr kleine Proteine (<12 kDa) ungenügend dargestellt werden können. Außerdem kommt es zwischen schwach exprimierten und stark exprimierten Proteinen zu Überlagerungen. Trotz vieler Vorteile der 2D-Gelelektrophorese kann diese Methode im Hinblick auf die Tumormarkersuche nur schlecht als Standardmethode Verwendung finden. Massenspektrometrische Analysen haben sich für die Untersuchungen der Proteomveränderungen ebenfalls als besonders geeignet erwiesen. Techniken wie MALDI-TOF-MS konnte erfolgreich genutzt werden für die Erstellung von Proteinprofilen ab 50 kDa von Säugetiergewebe (Stoeckli et al., 2001). Des Weiteren konnten charakteristische Proteinprofile mit MALDI-TOF-MS von tumorösen Gewebeschnitten etabliert werden (Chaurand et al., 2001). Massenspektrometrische Methoden haben sich hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit und Genauigkeit für die Analyse von humanen Materialien in vorausgegangenen Studien bewährt (Yanagisawa et al., 2003).

4.2.1 Proteomanalyse mit SELDI-TOF-MS

Eine relativ neue Technologie stellt die Surface-Enhanced-Laser-Desorption-/Ionisation-TOF-MS (SELDI-TOF-MS) dar. Neben MALDI-TOF-MS erwies sich diese Methode als ebenfalls geeignet für die Erstellung charakteristischer Proteinprofile. SELDI vereint MALDI-TOF mit chromatographischen Eigenschaften. Die SELDI-Analyse ist eine Methode zur massenspektrometrischen Analyse von spezifischen Proteinexpressionsmustern, die mit hoher Sensitivität einfach durchzuführen ist. Vorteilhaft ist, dass die zu untersuchenden Proben ohne vorherige Aufreinigung direkt auf den Spots der Proteinbiochips appliziert werden können (Dihazi et al., 2007). Es kommt nach kurzer Zeit zu einer sehr starken Bindung der Proteine aufgrund der chromatographischen Chipoberflächen. Durch mehrere Waschstufen werden nicht gebundene Proteine sowie andere störende Substanzen eliminiert. Dies ist unter anderem ein weiterer Vorteil von SELDI-TOF-MS. Nach anschließender Matrixapplikation können die Proben analysiert werden. Nach erfolgter Messung erhält man ein für die Probe spezifisches Proteinexpressionsmuster. Dieses wird anschließend mit der entsprechenden Software ausgewertet und unterschiedlich exprimierte Proteine können so erkannt werden (siehe Abschnitt 2.5).

Das Hauptanwendungsgebiet von SELDI-TOF-MS ist gegenwärtig die Proteinanalyse von Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin und nur in geringerem Umfang die Analyse von Geweben (Junker et al., 2006). Durch die Analyse des Blutes oder des Urins von Patienten mit bestimmten Tumorerkrankungen verspricht man sich die Detektion von spezifischen Proteinexpressionsmustern die pathogenomisch sind für die jeweilige Tumorerkrankung.

Hieraus resultierend erwartet man eine kaum invasive Diagnosestellung, die hilfreich ist bezüglich Früherkennung, individueller Prognose des Patienten, Therapieplanung und Therapieüberwachung. Bisher konnten bei verschiedenen Tumorarten mit Hilfe dieser neuen Technologie erste Resultate erzielt werden. Prostatahyperplasien und Prostatakarzinome können anhand spezifischen Proteinprofile, ermittelt durch SELDI-TOF-MS, unterschieden werden (Adam et al., 2002 und Petricoin et al., 2002b). Auch für das Ovarialkarzinom wurden spezifische Proteinexpressionsmuster von Patientenserum mit Ovarialkarzinom gefunden (Petricoin et al., 2002a). Mit Hilfe der SELDI-Technik konnten auch beim Mammakarzinom auf diese Weise spezifische Proteinprofile ermittelt werden (Li J et al., 2002).

4.2.2 Auswahl der Methode

Für diese Arbeit wurde eine Methode gesucht, die schnelle, genaue und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die Entscheidung fiel auf SELDI-TOF-MS. SELDI ist aufgrund der in Abschnitt 4.2.1 genannten Eigenschaften in der Lage, mit hoher Sensitivität und geringem Zeitaufwand spezifische Proteinprofile der gewünschten Proben zu erstellen.

Nach der Auswahl der Methode folgte die Wahl der Probe. Bisher wurden SELDI-Analysen überwiegend mit Serum- und Urinproben durchgeführt. Um spezifische Proteinexpressionsmuster von Nierenzellkarzinomgewebe zu erhalten, entschieden wir uns für die Messung von Nierenzellkarzinomgewebe und gesundem Nierengewebe. Zur Auswahl standen drei unterschiedliche Verfahren, um die Gewebe zu messen:

- Die Verarbeitung der Nierengewebe zu Gewebelysaten und anschließende Messung mit SELDI-TOF-MS
- Die Anfertigung von Gewebeschnitten mit nachfolgender Laser-Mikrodissektion und SELDI-Analyse
- Die Anfertigung von Gewebeschnitten mit direkter Applikation der Schnitte auf die ProteinChips und Messung mit SELDI-TOF-MS

Zur Etablierung der SELDI-Analyse von Nierenzellkarzinomgewebe und gesundem Nierengewebe wurde zunächst mit Rattennierengewebe gearbeitet. Alle drei unten aufgelisteten Verfahren wurden mit Nierengewebe der Ratte getestet, um herauszufinden, welches Verfahren gute und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die SELDI-Analyse mit den unterschiedlich aufbereiteten Proben zeigte, dass die Methode mit den Gewebeschnitten, welche direkt und ohne Vorbehandlung auf die Protein-Chips aufgebracht wurden, die oben genannten Suchkriterien erfüllte. Die Proteinexpressionsmuster zeigten Spektren mit vielen darstellbaren Proteinen ohne Rauschen und in wiederholten Versuchen zeigte sich eine sehr gute Reproduzierbarkeit (siehe Abschnitt 3.2.1).

SELDI-Messungen mit Gewebelysat (siehe Abschnitt 3.2.2) erbrachte zwar auch gute Proteinprofile und zeigte reproduzierbare Ergebnisse, beanspruchte aber aufgrund der Herstellungszeit des Gewebelysats mehr Zeit. Des Weiteren ist fraglich, ob bei der Herstellung von Gewebelysat auch tatsächlich alle Proteine lysiert und damit analysiert werden.

Das Verfahren mit der LCM-Technik beanspruchte einen erheblichen Zeitaufwand und erbrachte zudem, aufgrund der vergleichsweise geringen Proteinmenge, ein schlechtes Ergebnis (siehe Abschnitt 3.2.3).

Hinsichtlich dieser Ergebnisse wurden für die Erstellung charakteristischer Proteinprofile vom Nierenzellkarzinom Gefrierschnitte von NZK-Gewebe angefertigt und mittels SELDI-TOF-MS analysiert.

4.3 Erstellung von charakteristischen Proteinprofilen mittels SELDI-TOF-MS beim Nierenzellkarzinom

Die Identifizierung von Biomarkern gehört zur Grundlage von Diagnostik, Prognosestellung, Therapiewahl und Therapieüberwachung bei Tumorerkrankungen. Speziell für das Nierenzellkarzinom ist die Nachfrage bezüglich solcher Marker groß. Wie zuvor beschrieben ist das Nierenzellkarzinom ein Tumor der wegen fehlender Frühsymptome teilweise erst spät erkannt wird und aus diesem Zusammenhang heraus viele Tumoren bereits Metastasen gesetzt haben. Somit resultiert eine schlechtere Prognose für die Patienten (Motzer et al., 1996). Wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben haben Bestrahlung und Chemotherapie beim Nierenzellkarzinom nur eine geringfügige klinische Bedeutung. Auch aus diesem Grund ist es von größter medizinischer Bedeutung die molekularbiologische Ebene des Nierenzellkarzinoms zu verstehen. Bislang wurden SELDI-Analysen beim Nierenzellkarzinom mit Blut, Urin und Gewebelysaten durchgeführt.

4.3.1 Proteomische Analyse von Nierenzellkarzinomgewebeschnitten mittels SELDI-TOF-MS

In dieser Arbeit etablierten wir ein Protokoll für die Erstellung charakteristischer Proteinprofile von Gewebeschnitten aus Nierenzellkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe. Die Nutzung von SELDI-TOF, welches den Vorteil der chromatographischen Chipoberflächen hat, ermöglichte es die Gewebeschnitte (Kryoschnitte) direkt auf den Chip aufzutragen. Die Oberflächen-bindenden Proteine wurden daraufhin massenspektrometrisch analysiert. Somit entstanden für das Nierenzellkarzinom und die normale Niere charakteristische Proteinprofile. Wie unter 2.3.5 beschrieben, zeigte sich eine signifikant

erhöhte Expression von Proteinen mit dem Molekulargewicht 15931 Da (siehe Abb. 9), 15159 Da (siehe Abb. 10) und 7947 Da (siehe Abb. 11) beim Nierenzellkarzinom. Des Weiteren zeigten sich Überexpressionen bei NZK-Gewebeschnitten mit dem Molekulargewicht 20278 Da, 5173 Da, 16101 Da, 15349 Da und 11835 Da (Tabelle 1). Bei der normalen Niere wurden erhöhte Expressionen festgestellt bei Proteinen mit dem Molekulargewicht 9948 Da, 14043 Da (siehe Abb. 12 und 13). Außerdem sah man Überexpressionen bei 13805 Da (siehe Tabelle 14).

Vergleichend dazu konnten Dihazi et al., mit Hilfe der SELDI-Analyse von isolierten NZK-Zellen nativer Tumorproben und Zelllinien im Vergleich zu primären Kortexzellen, zeigen, dass drei Proteine bei den NZK-Zellen überexprimiert wurden: 13791 Da, 14021 Da und 15346 Da. Die drei Proteine konnten als Galectin-1 identifiziert werden. Diese Proteine konnten mit Hilfe unserer Methode nicht ermittelt werden. Gründe dafür könnten sein, dass die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode mit Gesamtgeweben (Gewebeschnitten) arbeitete. Daraus resultierten Proteinprofile, die andere Proteine erfasst als mit der Methode von Dihazi et al. Des Weiteren hat die hier verwendete Methode den Vorteil, dass die Gewebeschnitte direkt, das heißt ohne Modifikation und Zerstörung der Zellen, die Proteine analysiert. Dies ermöglicht die Analyse anderer Proteingruppen. Demzufolge könnte die SELDI-Analyse mit Gewebeschnitten eventuell ergänzend zu der Methode von Dihazi et al. genutzt werden und potentiell neue Marker könnten identifiziert werden.

4.3.2 SELDI-Analyse beim Nierenzellkarzinom

In vorangegangenen Arbeiten über die Proteomanalyse des Nierenzellkarzinoms mit Hilfe von SELDI-TOF-MS wurde bisher mit Serum- und Urinproben oder Gewebelysaten gearbeitet.

Won et al. analysierten Serumproben von Nierenzellkarzinompatienten, anderweitig urologisch erkrankten Patienten und gesunden Probanden. Die Forschungsgruppe konnte fünf Proteine mit den Massen 3900, 4107, 4153, 5352, and 5987 Da bestimmen, die Nierenzellkarzinompatienten von den anderen Probanden unterschieden (Won et al., 2003).

In Zusammenarbeit mit unserer Abteilung konnte eine weitere Arbeitsgruppe ebenfalls fünf Proteine bestimmen, die die Unterscheidung zwischen Serumproben von gesunden Probanden und Probanden mit Nierenzellkarzinom erlaubt. Sie ermittelten Proteine mit einem Molekulargewicht von 11400, 11500, 11700, 10840 und 9200 Da. Mit Hilfe der 2D-PAGE, Trypsinverdau und massenspektrometrischer Analyse konnten die Peaks mit der Masse 11700 Da als Serumamyloid 1 α (SAA-1) und Peak bei 9200 Da als Haptoglobin 1 α (Hpt1 α) identifiziert werden (Tolson et al., 2004).

Junker et al. untersuchten 50 Serumproben von Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom und 50 Serumproben von gesunden Probanden. Bei dieser Studie konnten Peaks mit den Molekulargewichten von 11700, 50100, 43300, 13700, 6800, 4500, 8900, 9100, 18400, 25500 und 122900 Da gefunden werden, die die Unterscheidung zwischen Tumorpatienten und gesunden Probanden erlauben. Die Proteine mit der Masse um 11,7 kDa und 13,7 kDa konnten als SAA-1 und Transthyretin identifiziert werden (Junker et al., 2006).

Neben der SELDI-Analyse von Serumproben gibt es auch Studien über die Urin-Analyse von Patienten mit NZK verglichen mit einer Kontrollgruppe. Rogers et al., bewiesen, dass die Ermittlung von Nierezellkarzinompatienten durch die Urin-Analyse mit SELDI-TOF-MS umsetzbar ist. In der 10 Monate später durchgeführten Kontrollstudie sanken die Werte von Sensitivität und Spezifität (Rogers et al., 2003).

Entsprechend den massenspektrometrischen Untersuchungen mit Patientenblut oder Urin gibt es verhältnismäßig wenige Studien, in denen die Analyse mittels SELDI von Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Nierengewebe untersucht wurde. Barnerjee und seine Mitarbeiter konnten mit SELDI spezifische Proteinprofile aus Proteinlysaten von Astrozytombgewebe analysieren (Barnerjee et al., 2004). Des Weiteren wurden spezifische Expressionsmuster beim Zervixkarzinom und beim Kolonkarzinom gefunden (Wong et al., 2004, Krieg et al., 2004). Dihazi et al. etablierten in ihrer Studie mit SELDI-TOF-MS ein Protokoll für die Darstellung von Proteinprofilen von Nierenzellkarzinomzellen. Die direkte Analyse von NZK-Zellen, welche auf den Protein-Chips kultiviert wurden, ergab proteomische Muster, welche für das Nierenzellkarzinom charakteristisch sind. Des Weiteren konnte das Protein Galectin-1 als potentieller Tumormarker identifiziert werden (Dihazi et al., 2007).

4.4 Proteomische Untersuchung von Nierenzellkarzinomgewebe mittels 2D-Page

Die Untersuchung des Proteoms von Nierenzellkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe führte jeweils zur Detektion von weit über 2000 Proteinen. Mittels Massenspektrometrie (ESI-MS) gelang es bei dem Nierenzellkarzinomgewebe 36 Proteine zu identifizieren. Beim normalen Nierengewebe gelang die Identifizierung von 29 Proteinen (siehe Abschnitt 3.3.2). Die übrigen Spots konnten aus verschiedenen Gründen nicht identifiziert werden. Ursachen dafür könnten zum einen die eventuelle posttranslationale Modifikation der Proteine, Sensitivität des Massenspektrometers, mangelnde Datenbankeintragungen und zu geringe Proteinmenge sein. Zum anderen könnte die Silberfärbung ursächlich sein, denn sie ist nicht vollständig kompatibel mit ESI-MS.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese von Nierenzellkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe veranschaulichte die differentielle Expression einiger Proteine. Vier dieser

differentiell überexprimierten Proteine werden nachfolgend besprochen, wobei Galectin-1 in dieser Arbeit von besonderem Interesse ist.

4.4.1 Peptidyl-prolyl-isomerase A (Cyclophilin-A)

Cyclophilin-A (CypA) ist ein Mitglied der Immunosuppressivum Cyclosporin-A dar (Handschumacher et al., 1984). Es handelt sich um ein zytoplasmatisches Protein, das in fast jedem Organ exprimiert wird. Die physiologischen Funktionen der Cyclophiline sind noch nicht vollständig verstanden. Cyclophilin-A ist eine Peptidyl-prolyl-isomerase, welche in der Lage ist, Proteine durch ihre cis-trans Isomerasefunktion zu aktivieren. Des Weiteren ist Cyclophilin-A für Proteinfaltung und intrazellulären Proteintransport zuständig (Danielson et al., 1988 und Fischer et al., 1989). Es ist bekannt, dass Cyclophilin-A in einigen Tumoren überexprimiert wird. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden, dass Cyclophilin-A beim Nierenzellkarzinom überexprimiert wird (siehe Abschnitt 3.3.3). In weiteren Studien zeigte sich eine Hochregulierung von CypA bei Pankreaskarzinomzellen (Li M et al., 2005 und Shen et al., 2004), beim Plattenepithelkarzinomzellen der Mundhöhle (Rey et al., 1999) sowie dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Howard et al., 2004 und Howard et al., 2005). CypA scheint von Kardiomyozyten als Antwort auf Hypoxie/Reoxygenierung vermehrt exprimiert zu werden und vermag somit Kardiomyozyten vor oxidativer Stress-induzierter Apoptose zu schützen (Seko et al., 2004). Neben Kardiomyozyten stellt CypA auch für andere Zellen einen Schutz bezüglich oxidativer Stress-induzierter Apoptose dar (Doyle et al., 1999). Choi und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Überexpression von CypA in Tumorzellen einen Schutz vor Hypoxie- und Cisplatin induzierter Apoptose darstellt (Choi et al., 2007). Es wird deutlich, dass Cyclophilin-A eine wichtige Rolle hinsichtlich Tumorentstehung spielen könnte.

4.4.2 Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta (Rho GDI beta)

Die Familie der Rho GDP dissociation inhibitors (Rho-GDI) besteht aus drei Mitgliedern: Rho-GDI alpha, beta und gamma. Die Expression von Rho-GDI alpha geschieht ubiquitär (Ueda et al., 1990) während Rho-GDI beta vornehmlich von hämatopoetischen Geweben exprimiert wird (Lelias et al., 1993), vor allem von B- und T-Lymphozyten (Scherle et al., 1993). Rho-GDI gamma wird größtenteils in Lunge, Gehirn, Pankreas, Hoden und Niere exprimiert (Dovas und Couchman, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels 2D-Gelelektrophorese gezeigt werden, dass Rho GDI beta von Nierenzellkarzinomgewebe im Gegensatz zum Normalgewebe exprimiert wird (siehe Abschnitt 3.3.4). Rho GDIs sind Inhibitoren der Rho GTPasen. Rho GTPasen sind in eine Vielzahl von zellulären Prozessen involviert. Sie sind wesentliche Faktoren der zellulären Migration und Adhäsion (Fukata und

Kaibuchi, 2001; Titus et al., 2005b). Des Weiteren haben sie Einfluss auf die Organisation des Aktinskeletts und die Ausbildung von Filopodien und Lamellopodien (Ridley, 2001 und Ridley et al., 1992). Für die Migration durch Gefäßendothelien wird die Aktivität von Rho GTPasen benötigt (Adamson P. et al., 1999). Rho GTPasen werden im Vergleich zum Normalgewebe in Mamma-, Colon- sowie Bronchialkarzinomen überexprimiert und spielen möglicherweise eine Rolle in Tumorenstehung und Tumorprogression (Fritz et al., 1999).

Die Hauptfunktion der Rho GDIs ist die Inhibierung der GDP Dissoziation von Rho GTPasen; Diese bleiben somit inaktiv (Sasaki et al., 1993 und Zalzman et al., 1999). Neben der Expression von RhoGDI beta in hämatopoetischen Zellen wurde dieses Protein auch in Karzinomzellen gefunden. So konnte Rho GDI beta beim Blasenkarzinom mit der Supprimierung von Invasion und Metastasierung in Zusammenhang gebracht werden (Gildea et al., 2002 und Titus et al., 2005a). Außerdem stellt RhoGDI beta beim Blasenkarzinom einen positiven prognostischen Faktor dar (Theodurescu et al., 2004). In der Arbeit von Lenburg et al. konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von Rho GDI beta beim Nierenzellkarzinom hochreguliert ist (Lenburg et al., 2003). Des Weiteren konnte eine erhöhte Genexpression beim hochinvasiven malignen Melanom (Seftor et al., 2002), beim Magenkarzinom (Jinawath et al., 2004), dem malignen Mesotheliom (Kettunen et al., 2001) und beim paclitaxelresistenten Ovarialkarzinom (Goto et al., 2006) gefunden werden.

4.4.3 Fatty acid binding protein, brain (B-FABP)

Fatty acid binding proteins (FABPs) gehören zur Familie der Lipid-binding proteins (LBPs). Es wurden 9 gewebespezifische FABPs identifiziert: L (liver), I (intestinal), H (muscle and heart), A (adipocyte), E (epidermal), Il (ileal), B (brain), M (myelin) und T (testis) (Chmurzyńska, 2006). Die Hauptaufgabe der FABPs ist die Aufnahme und der intrazelluläre Transport von Fettsäuren (Weisinger 2002 und Veerkamp et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass B-FABP in den radialen Gliazellen des sich entwickelnden Zentralen Nervensystems und auch teilweise in humanen malignen Gliomzelllinien exprimiert wird (Bisgrove et al., 2000 und Godbout et al., 1998). Es wird angenommen, dass B-FABP eine Funktion in der Neurogenese, bzw. der neuronalen Migration in dem sich entwickelnden Nervensystem zukommt (Kurtz et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine starke Expression von B-FABP beim Nierenzellkarzinom im Vergleich zu gesunder Niere beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.3.4).

In diversen vorangegangenen Arbeiten konnte bewiesen werden, dass die Genexpression/ Expression der FABPs in verschiedenen Tumoren unterschiedliche Expressionsmuster aufweist. Zum Beispiel konnte beim Prostata Karzinom eine vermehrte Proteinexpression von

C-FABP gefunden werden (Adamson J et al., 2003). Ohlsson und Mitarbeiter konnten beweisen, dass eine verminderte Expression von A-FABP assoziiert ist mit einer Progression beim Blasenkarzinoms (Ohlsson et al., 2005). Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese konnte veranschaulicht werden, dass beim Nierenzellkarzinom FABPs, insbesondere B-FABP, überexprimiert wird (Seliger et al., 2005). Teratani et al. (2007) konnten ebenfalls zeigen, dass das Nierenzellkarzinom eine erhöhte Genexpression von B-FABP aufweist. Das B-FABP-Transkript konnte sogar im Urin von Patienten mit NZK vor einem operativen Eingriff gefunden werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass B-FABP möglicherweise in die Nierenzellkarzinomentwicklung involviert ist und als Biomarker zur frühzeitigen Diagnosestellung und Therapiemonitoring eine Rolle spielen könnte.

4.4.4 Galectin-1

Lectine sind kohlenhydratbindende Proteine. Galectine sind Lectine mit der Fähigkeit β -Galactose zu binden (Barondes et al., 1994). Alle Galectine beinhalten Aminosäuresequenzen welche für die Kohlenhydratbindung verantwortlich sind. Galectine können trotz der Abwesenheit von Signalsequenzen von intra- nach extrazellulär sezerniert werden. (Cooper et al., 1990 und Hughes, 1999). Das Expressionsmuster von Galectin ist äußerst komplex und wechselt in Abhängigkeit von physiologischen bzw. pathologischen Zustand und auch vom Entwicklungsstadium der Zelle, des Gewebes oder des Organismus (Chiariotti et al., 2004). Neben der Fähigkeit Kohlenhydrate zu binden ist Galectin-1 am Splicing von mRNA beteiligt, wobei diese beiden Aktivitäten unabhängig voneinander stattfinden (Voss et al., 2008).

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese, der Western-Blot-Analyse und Immunhistochemie gezeigt werden, dass Galectin-1 beim Nierenzellkarzinom 2,5 fach erhöht exprimiert wird. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe konnte ebenfalls beweisen, dass Galectin-1 bei Nierenzellkarzinomzellen überexprimiert und bei normalen Zellen nur schwach exprimiert wird (Dihazi et al., 2007).

In vorangegangenen Arbeiten wurde beschrieben, dass sich die Galectin-Expression in Tumorzellen vergleichend zu den entsprechenden gesunden Zellen ändert (Oka et al., 2004 und Van den Brûle et al., 2004). Galectine werden in verschiedenen Tumorzellen und angrenzenden Stromazellen überexprimiert. Die Überexpression von Galectin korreliert häufig mit der Aggressivität des Tumors und der Anwesenheit von Metastasen. Diese Ergebnisse belegen eine mögliche Rolle der Galectine in der Regulierung von Tumorprogression und Krankheitsfolgen. Frühere Studien beschreiben, dass der Übergang normaler Zellen in Tumorzellen mit einem Wechsel der subzellulären Lokalisation der Galectine einhergeht (beispielsweise vom Nukleus in das Zytosol) (Van den Brûle et al., 2004). Im Fall der Niere wurde die Expression von Galectin-1 in humanen tubulären epithelialen Zellen gefunden

(Bürger et al., 1996). Saussez et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Galectin-1 und Galectin-3 Expression mit den ersten Schritten neoplastischer Transformation korrelieren (Saussez et al., 2005). Francois et al. analysierten die Galectin-1 und -3 Expression und ihre jeweiligen Bindungsstellen beim Nierenzellkarzinom. Sie fanden, dass der Anstieg der biologischen Aggressivität mehr durch einen Abfall der Expression der Galectin-1 Bindungsstellen als durch die Galectin-1 Expression selbst begleitet wird (Francois et al., 1999). Yamaoka et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass eine Inhibierung der Galectin-1 Expression das Tumorwachstum von humanen Gliomzellen unterdrückt (Yamaoka et al., 2000). Außerdem scheint Galectin-1 eine Rolle in der Modulierung von Invasion und Migration im Falle von Gliomzellen zu spielen (Jung et al., 2008 und Rorive et al., 2001). Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass Galectin-1 mit Ras, einem Proto-Onkogen, welches die maligne Transformation von Zellen fördert, interagiert (Paz et al., 2001). Roda et al. fanden in ihrer Studie heraus, dass Galectin-1 mit tPA interagiert und somit an der Progression beim Pankreaskarzinom beteiligt ist (Roda et al., 2008).

Galectine werden also von Tumoren verstärkt exprimiert. Außerdem sind sie genau wie Zytokine und Chemokine in der Lage, eine Vielzahl inflammatorischer Antworten zu modulieren (Liu et al., 2000). Galectine sind involviert in parasitäre Infektionen sowie in allergische Entzündungsreaktionen (Young et al., 2004). Es gibt viele Studien über die Rolle von Galectin-1 in Bezug auf die Regulation der Immunantwort. Chung et al. demonstrierten in ihrer Arbeit, dass Galectin-1 in der Lage ist, die T-Zell Aktivierung zu inhibieren (Chung et al., 2000). Außerdem induziert Galectin-1 Wachstumsstop und die Apoptose aktivierter T-Zellen (He und Baum, 2004 und Perillo et al., 1995). Die Korrelation zwischen der Galectin-1 Expression bei Tumoren in Verbindung mit den immuno-regulatorischen Effekten von Galectin-1 zeigt, dass tumoröse Zellen durch die Sekretion von Galectin-1 T-Zell-Effektor-Funktionen beeinflussen und somit die Balance in Richtung einer immunsuppressiven Umgebung auf Seiten des Tumors verschieben können. Die meisten Tumoren besitzen Strategien um Immunattacken zu überwinden. Rubinstein et al. zeigen in ihrer Studie, dass Galectin-1 ein negativer Regulator bezüglich T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Überleben ist (Rubinstein et al., 2004). Die Auswirkungen der Galectin-1-Überexpression beim Nierenzellkarzinom bezüglich der Regulation der Immunantwort sind noch nicht erforscht.

5. Zusammenfassung

Aufgrund mangelnder Früherkennung und schlechter Ansprechraten der Therapien ist das Outcome für Patienten mit Nierenzellkarzinom bis zum heutigen Zeitpunkt unbefriedigend. Dies erklärt sich dadurch, dass das Nierenzellkarzinom wegen mangelnder Frühsymptome erst relativ spät diagnostiziert wird. Zu diesem Zeitpunkt sind etwa ein Drittel der Patienten schon mit Metastasen besiedelt (Landis et al., 1998). Darüber hinaus besteht das Problem der Multi-Drug-Resistance. Nierenzellkarzinome sind resistent auf unterschiedliche Zytostatika. Auch die Strahlentherapie kann beim Nierenzellkarzinom keinen kurativen Effekt erzielen. Das Problem der schlechten Früherkennung liegt zum einen an den fehlenden Frühsymptomen, zum anderen daran, dass keine Screeningmethode beim Nierenzellkarzinom zur Verfügung steht, die zu einem frühen Zeitpunkt Veränderungen auf Seite der Niere erkennen könnte. So gibt es keinen Tumormarker, wie zum Beispiel PSA beim Prostatakarzinom, der eine frühe Diagnose möglich machen könnte. Die Identifizierung von Biomarkern gehört zur Grundlage von Diagnostik, Prognosestellung, Therapiewahl und Therapieüberwachung bei Tumorerkrankungen. Speziell für das Nierenzellkarzinom ist die Nachfrage bezüglich solcher Marker groß. In den letzten Jahren haben sich die molekularbiologischen Studien beim Nierenzellkarzinom vor allem auch auf die Identifizierung spezifisch veränderter Proteinexpressionsmuster konzentriert. Die Erfassung der veränderten Proteinprofile dient neben der Erfassung der Veränderungen auf der DNA- und RNA-Ebene dazu, die Biologie des Nierenzellkarzinoms zu verstehen. Die Analyse auf Proteomebene könnte in Zukunft für Diagnostik und Therapie des Nierenkrebses eine entscheidende Rolle spielen.

Um diese Veränderungen auf Proteomebene zu erfassen, wurde in dieser Studie das Nierenzellkarzinom mit verschiedenen proteomischen Methoden untersucht. SELDI stellt eine neuartige Technologie dar, die bei hoher Sensitivität Proben in vergleichbar kurzer Zeit analysiert. Es wurde eine Methode etabliert zur direkten Identifizierung spezifischer Proteinprofile durch die massenspektrometrische Analyse sowohl von Nierenzellkarzinom-Gewebeschnitten als auch von gesunden Nieren-Gewebeschnitten. Es wurden Serienschnitte der Gewebe angefertigt, an spezielle Protein-Chips gebunden und anschließend mit SELDI-TOF-MS gemessen. Durch die Analyse von 20 Nierenzellkarzinomgeweben und 12 Kontrollproben konnten Proteinprofile ermittelt werden, die für das Nierenzellkarzinom spezifisch sind. Differenzierend zwischen Nierenzellkarzinom und normaler Niere konnten Proteinpeaks mit dem Massengewicht von 15931, 15159, 7947, 20278, 5173, 16101, 15349 und 11835 Da bestimmt werden, die beim Nierentumor deutlich überexprimiert wurden. Neben diesen überexprimierten Proteinen konnte ermittelt werden, dass Proteinpeaks mit molekularen Massen von 9948, 14043 und 13805 Da beim Nierenzelltumor im Vergleich zur

normalen Niere herunterreguliert wurden. Ergänzend zu diesem Ergebnis wurden 2D-Gele von Nierenzellkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe angefertigt. Es konnten einige 1000 Proteine auf der SDS-Page detektiert werden. Mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse mittels ESI-MS konnten 36 Proteine beim NZK und 29 Proteine bei der normalen Niere identifiziert werden. Die Auswertung der Spots ergab, dass neben Cyclophilin-A, B-FABP und Rho-GDI beta das Protein Galectin-1 beim Nierenzellkarzinom deutlich überexprimiert wird. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde die Western-Blot-Analyse durchgeführt mit dem Ergebnis, dass Galectin-1 beim Nierentumor verstärkt exprimiert wird. Galectine sind Proteine, die die Fähigkeit besitzen, Kohlenhydrate zu binden. Studien belegen, dass Galectine in Zusammenhang mit neoplastischer Transformation und Inhibierung von T-Zellen stehen (Saussez et al., 2005 und Chung et al., 2000). Diese Eigenschaften weisen darauf hin, dass Galectin-1 ein möglicher Wegbereiter der Tumorprogression zu sein scheint.

Die Veränderungen, die sich beim Nierenzellkarzinom auf der Proteomebene abspielen, eröffnen ein weites Feld für ergänzende Untersuchungen, um die grundlegenden biologischen Mechanismen zu verstehen, die der Tumorentstehung zu Grunde liegen. Durch die Etablierung spezifischer Proteinprofile sowie Galectin-1 als Biomarker im klinischen Alltag könnte eine Optimierung von Diagnostik, Bewertung der Prognose sowie Therapie für jeden einzelnen Patienten erreicht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL Jr. (2002): Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 62, 3609-14.
2. Adamson J, Morgan EA, Beesley C, Mei Y, Foster CS, Fujii H, Rudland PS, Smith PH, Ke Y (2003): High-level expression of cutaneous fatty acid-binding protein in prostatic carcinomas and its effect on tumorigenicity. *Oncogene* 22, 2739-49.
3. Adamson P, Etienne S, Couraud PO, Calder V, Greenwood J (1999): Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway. *J Immunol* 162, 2964-73
4. Atzpodien J, Buer J, Sel S, Janssen J, Oevermann K (1999): Chemoimmunotherapy in the systemic treatment of advanced renal carcinoma. *Urologe* 38, 474-478.
5. Banerjee H, Hawkins Z, Williams J, Blackshear M, Sawyer C, Cazares L, Pramanik SK, Williams A (2004) Search for a novel biomarker for the brain cancer astrocytoma by using surface enhanced laser desorption/ionisation (SELDI) technique. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50, 733-6.
6. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD et al. (1994): Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76, 597-8.
7. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin 1996.
8. Bisgrove DA, Monckton EA, Packer M, Godbout R (2000) Regulation of brain fatty acid-binding protein expression by differential phosphorylation of nuclear factor I in malignant glioma cell lines. *J Biol Chem* 275, 30668-76.
9. Bouzahzah B, Albanese C, Ahmed F, Pixley F, Lisanti MP, Segall JD, Condeelis J, Joyce D, Minden A, Der CJ, Chan A, Symons M, Pestell RG (2001): Rho family GTPases regulate mammary epithelium cell growth and metastasis through distinguishable pathways. *Mol Med* 7, 816-30.
10. Bradford MM (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.
11. Brinkmann OA, Hertle L (2001): Molekulargenetik des Nierenzellkarzinoms und Tumormarker. *Onkologe* 7, 715-721.
12. Bürger A, Filsinger S, Cooper DN, Hänsch GM (1996): Expression of the 14 kDa galactose-binding protein, galectin-1, on human tubular epithelial cells. *Kidney Int* 50, 754-9.
13. Burnette WN. (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
14. Chaurand P, DaGue BB, Pearsall RS, Threadgill DW, Caprioli RM (2001): Profiling proteins from azoxymethane-induced colon tumors at the molecular level by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics* 1, 1320-1326.
15. Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB (2004): Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J* 19, 441-9.
16. Chmurzyńska A (2006): The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet* 47, 39-48.
17. Choi KJ, Piao YJ, Lim MJ, Kim JH, Ha J, Choe W, Kim SS (2007): Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death. *Cancer Res* 67, 3654-62.

18. Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Miceli MC (2000): Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol* 165, 3722-9.
19. Cooper DN, Barondes SH (1990): Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol* 110, 1681-91.
20. Custer RP, Sorof S (1984): Target polypeptide of a carcinogen is associated with normal mitosis and carcinogen-induced hyperplasias in adult hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6738-42.
21. Danielson PE, Forss-Petter S, Brow MA, Calavetta L, Douglass J, Milner RJ, Sutcliffe JG (1988): p1B15: a cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA* 7, 261-7.
22. De Hoog CI, Mann M (2004) : Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5, 267-293.
23. Denkert C (2008): Molekulares Profiling und prädiktive Signaturen. *Pathologe* 6, 168-171.
24. Deutsche Krebsgesellschaft e.V.
http://www.krebsgesellschaft.de/db_nierenkrebs,4265.html (Zugriff 2009)
25. Dihazi H, Müller C, Abdul RA, Flad T, Elmaouhoub A, Müller GA (2007): Whole cell profiling and identification of galectin-1 as a potential marker of renal cell carcinoma. *Proteomics Clin Appl* 1, 200-214.
26. Dovas A, Couchman JR (2005) RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* 390, 1-9.
27. Doyle V, Virji S, Crompton M (1999): Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress. *Biochem J* 341, 127-32.
28. Eichelberg C, Junker K, Ljungberg B, Moch H. (2009): Diagnostic and Prognostic Molecular Markers for Renal Cell Carcinoma: A Critical Appraisal of the Current State of Research and Clinical Applicability. *Eur Urol* 55, 851-63.
29. Elad-Sfadia G, Haklai R, Ballan E, Gabius HJ, Kloog Y (2002): Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 277, 37169-75.
30. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF et al. (1996) : Laser capture microdissection. *Science* 274, 998-1001.
31. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71.
32. Fergany A, Saad I, Woo L, Novick AC (2006): Open partial nephrectomy for tumour in a solitary kidney: Experience with 400 Cases. *J Urol* 175, 1630-3.
33. Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX (1989): Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337, 476-8.
34. Fojo AT, Shen DW, Mickley LA, Pastan I, Gottesmann MM (1987): Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of human multidrug-resistance gene. *J Clin Oncol* 5, 1922-1927.
35. Fossa SD, Kjolseth I, Lund G (1982): Radiotherapy of metastases from renal cancer. *Eur Urol* 8, 340-2
36. François C, van Velthoven R, De Lathouwer O, Moreno C, Peltier A, Kaltner H, Salmon I, Gabius HJ, Danguy A, Decaestecker C, Kiss R (1999): Galectin-1 and galectin-3 binding pattern expression in renal cell carcinomas. *Am J Clin Pathol* 112, 194-203.
37. Fritz G, Just I, Kaina B (1999): Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* 81, 682-7.
38. Fukata M, Kaibuchi K (2001): Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 887-97.

39. Gildea JJ, Seraj MJ, Oxford G, Harding MA, Hampton GM, Moskaluk CA, Frierson HF, Conaway MR, Theodorescu D (2002): RhoGDI2 is an invasion and metastasis suppressor gene in human cancer. *Cancer Res* 62, 6418-23.
40. Godbout R, Bisgrove DA, Shkolny D, Day RS 3rd (1998): Correlation of B-FABP and GFAP expression in malignant glioma. *Oncogene* 16, 1955-62.
41. Goto T, Takano M, Sakamoto M, Kondo A, Hirata J, Kita T, Tsuda H, Tenjin Y, Kikuchi Y (2006): Gene expression profiles with cDNA microarray reveal RhoGDI as a predictive marker for paclitaxel resistance in ovarian cancers. *Oncol Rep* 15, 1265-71.
42. Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW (1984): Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226, 544-7.
43. He J, Baum LG (2004): Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J Biol Chem* 279, 4705-12.
44. Herold G: *Innere Medizin*. Eigenverlag, Köln 2003
45. Hock LM, Lynch J, Balaji KC (2002): Increasing incidence of all stages of kidney cancer in the last 2 decades in the United States: an analysis of surveillance, epidemiology and end results program data. *J Urol* 167, 57-60.
46. Howard BA, Zheng Z, Campa MJ, Wang MZ, Sharma A, Haura E, Herndon JE 2nd, Fitzgerald MC, Bepler G, Patz EF Jr (2004): Translating biomarkers into clinical practice: prognostic implications of cyclophilin A and macrophage migratory inhibitory factor identified from protein expression profiles in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 46, 313-23.
47. Howard BA, Furumai R, Campa MJ, Rabbani ZN, Vujaskovic Z, Wang XF, Patz EF Jr (2005): Stable RNA interference-mediated suppression of cyclophilin A diminishes non-small-cell lung tumor growth in vivo. *Cancer Res* 65, 8853-60.
48. Hughes RC (1999): Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1473, 172-85.
49. Jayson M, Sanders H (1998): Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology* 51, 203-5.
50. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ (2003): Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 53, 5-26.
51. Jinawath N, Furukawa Y, Hasegawa S, Li M, Tsunoda T, Satoh S, Yamaguchi T, Imamura H, Inoue M, Shiozaki H, Nakamura Y (2004): Comparison of gene-expression profiles between diffuse- and intestinal-type gastric cancers using a genome-wide cDNA microarray. *Oncogene* 23, 6830-44.
52. Jung TY, Jung S, Ryu HH, Jeong YI, JIN YH, Jin SG, Kim IY, Kang SS, Kim HS (2008): Role of galectin-1 in migration and invasion of human glioblastoma multiforme cell lines. *J Neurosurg* 109, 273-84.
53. Junker K, von Eggeling F, Müller J, Steiner T, Schubert J (2006): Identifizierung von Biomarkern und therapeutischen Targets beim Nierenzellkarzinom mittels ProteinChip-Technologie. *Urologe* 45, 305-315.
54. Junker K, Steiner T, Sanjmyatav J, Pilchowski R, Heinze C, Walter M, Schubert J (2008): Tumor profiling of renal cell tumors: relevance for diagnostics and therapy. *Pathologe* 30, 105-10.
55. Karas M, Hillenkamp F (1988): Laser desorption ionisation with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60, 2299-301.
56. Kettunen E, Nissén AM, Ollikainen T, Taavitsainen M, Tapper J, Mattson K, Linnainmaa K, Knuutila S, El-Rifai W (2001): Gene expression profiling of malignant mesothelioma cell lines: cDNA array study. *Int J Cancer* 91, 492-6.
57. Klose J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26, 231-243.

58. Klose J (1999a): Genotypes and phenotypes. *Electrophoresis* 20, 643-52.
59. Klose J (1999b): Large-gel 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol* 112, 147- 72.
60. Krieg RC, Fogt F, Braunschweig T, Herrmann PC, Wollscheidt V, Wellmann A (2004): ProteinChip Array analysis of microdissected colorectal carcinoma and associated tumor stroma shows specific protein bands in the 3.4 to 3.6 kDa range. *Anticancer Res* 24, 1791-6.
61. Kurtz A, Zimmer A, Schnütgen F, Brüning G, Spener F, Müller T (1994): The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* 120, 2637-49.
62. Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
63. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA (1998): Cancer Statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 48, 6-29.
64. Lelias JM, Adra CN, Wulf GM, Guillemot JC, Khagad M, Caput D, Lim B (1993): cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1479-83.
65. Lenburg ME, Liou LS, Gerry NP, Frampton GM, Cohen HT, Christman MF (2003): Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer* 3, 31.
66. Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW (2002): Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 48, 1296-304.
67. Li M, Wang H, Li F, Fisher WE, Chen C, Yao Q (2005): Effect of cyclophilin A on gene expression in human pancreatic cancer cells. *Am J Surg* 190, 739-45.
68. Liu FT (2000): Galectins: a new family of regulators of inflammation. *Clin Immunol* 97, 79-88.
69. Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA (2007): European Association of Urology Guideline Group for renal cell Carcinoma: Renal cell carcinoma guidelines. *Eur Urol* 51, 1502-10.
70. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A (2001): Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 70, 437-73.
71. Mickisch G, Carballido J, Hellsten S, Schulze H, Mensink H (2001): Guidelines of Renal Cell Cancer. *Eur Urol* 40, 252-255.
72. Miller J, Fischer C, Freese R, Altmannsberger M, Weidner W (1999): Nephron-sparing surgery for renal cell carcinoma--is tumor size a suitable parameter for indication? *Urology* 54, 988-93.
73. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM (1996): Renal Cell Carcinoma. *N Eng J Med* 335, 865-875.
74. Müller M: Chirurgie. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach, 2006/2007.
75. Negrier S, Maral J, Drevon M, Vinke J, Escudier B, Philip T (2000): Long-term follow-up of patients with metastatic renal cell carcinoma treated with intravenous recombinant interleukin-2 in Europe. *Cancer J Sci Am* 1, 93-8.
76. O'Farrell PH (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021.
77. Ohlsson G, Moreira JM, Gromov P, Sauter G, Celis JE (2005) Loss of expression of the adipocyte-type fatty acid-binding protein (A-FABP) is associated with progression of human urothelial carcinomas. *Mol Cell Proteomics* 4, 570-81.
78. Oka N, Takenaka Y, Raz A (2004): Galectins and urological cancer. *J Cell Biochem* 91, 118-24.
79. Pantuck AJ, Zisman A, Belldegrun AS (2001): The changing natural history of renal cell carcinoma. *J Urol* 166, 1611-23.

80. Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, Kloog Y (2001): Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* 20, 7486-93.
81. Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG (1995): Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378, 736-9.
82. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA (2002a): Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359, 572-577.
83. Petricoin EF 3rd, Ornstein DK, Paweletz CP, Ardekani A, Hackett PS, Hitt BA, Velasco A, Trucco C, Wiegand L, Wood K, Simone CB, Levine PJ, Linehan WM, Emmert-Buck MR, Steinberg SM, Kohn EC, Liotta LA (2002b): Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 94, 1576-8.
84. Pyrhönen S, Salminen E, Ruutu M, Lehtonen T, Nurmi M, Tammela T, Juusela H, Rintala E, Hietanen P, Kellokumpu-Lehtinen PL (1999): Prospective randomized trial of interferon alfa-2a plus vinblastine versus vinblastine alone in patients with advanced renal cell cancer. *J Clin Oncol* 17, 2859-67.
85. Renart J, Reiser J, Stark GR (1979): Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3116-20.
86. Rey O, Baluda MA, Park NH (1999): Differential gene expression in neoplastic and human papillomavirus-immortalized oral keratinocytes. *Oncogene* 18, 827-31.
87. Ridley AJ (2001): Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114, 2713-22.
88. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992): The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-10.
89. Riede U-N, Schaefer H-E: *Allgemeine und spezielle Pathologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999/2001.
90. Roda O, Ortiz-Zapater E, Martinez-Bosch N, Gutiérrez-Gallego R, Vila-Perelló M et al. (2008): Galectin-1 is a novel functional receptor for tissue plasminogen activator in pancreatic cancer. *Gastroenterology* (article in press).
91. Rogers MA, Clarke P, Noble J, Munro NP, Paul A, Selby PJ, Banks RE (2003): Proteomic profiling of urinary proteins in renal cancer by surface enhanced laser desorption ionisation and neutral-network analysis: identification of key issues affecting potential clinical utility. *Cancer Res* 63, 6971-83.
92. Rorive S, Belot N, Decaestecker C, Lefranc F, Gordower L, Micik S, Maurage CA et al. (2001): Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma. *Glia* 33, 241-55.
93. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL, Rabinovich GA (2004): Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 5, 241-51.
94. Sahai E, Marshall CJ (2002): RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 133-42.
95. Sarto C, Marocchi A, Sanchez JC, Giannone D, Frutiger S, Golaz O, Wilkins MR, Doro G, Cappellano F, Hughes G, Hochstrasser DF, Mocarelli P (1997): Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression. *Electrophoresis* 18, 599-604.
96. Sasaki T, Kato M, Takai Y (1993): Consequences of weak interaction of rho GDI with the GTP-bound forms of rho p21 and rac p21. *J Biol Chem* 268, 23959-63.
97. Saussez S, Nonclercq D, Laurent G, Wattiez R, André S, Kaltner H, Gabius HJ, Kiss R, Toubeau G (2005): Toward functional glycomics by localization of tissue lectins: immunohistochemical galectin fingerprinting during diethylstilbestrol-induced kidney tumorigenesis in male Syrian hamster. *Histochem Cell Biol* 123, 29-41.

98. Scherle P, Behrens T, Staudt LM (1993): Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7568-72.
99. Schmitz G, Endres S, Götte D: Biomarker- Bedeutung für medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung. Schattauer Stuttgart 2008.
100. Schratzenholz A: Methoden der Proteomforschung, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin 2001.
101. Seftor EA, Meltzer PS, Schatteman GC, Gruman LM, Hess AR, Kirschmann DA, Seftor RE, Hendrix MJ (2002): Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol* 44, 17-27.
102. Seko Y, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Murayama K, Nagai R (2004): Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 317, 162-8.
103. Seliger B, Lichtenfels R, Atkins D, Bukur J, Halder T, Kersten M, Harder A, Ackermann A, Malenica B, Brenner W, Zobawa M, Lottspeich F (2005): Identification of fatty acid binding proteins as markers associated with the initiation and/or progression of renal cell carcinoma. *Proteomics* 5, 2631-40.
104. Shen J, Person MD, Zhu J, Abbruzzese JL, Li D (2004): Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Cancer Res* 64, 9018-26.
105. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-8.
106. Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, Caprioli RM (2001): Imaging mass spectrometry: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med* 7, 493-496.
107. Teratani T, Domoto T, Kuriki K, Kageyama T, Takayama T, Ishikawa A, Ozono S, Nozawa R (2007): Detection of transcript for brain-type fatty Acid-binding protein in tumor and urine of patients with renal cell carcinoma. *Urology* 69, 236-40.
108. Theodorescu D, Sapinoso LM, Conaway MR, Oxford G, Hampton GM, Frierson HF Jr (2004): Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer. *Clin Cancer Res* 10, 3800-6.
109. Thoenes W, Störkel S (1991): Pathology of benign and malignant renal cell tumors. *Urologe A* 30, 41-50.
110. Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ (1986): Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol Res Pract* 181, 125-43.
111. Titus B, Frierson HF Jr, Conaway M, Ching K, Guise T, Chirgwin J, Hampton G, Theodorescu D (2005a): Endothelin axis is a target of the lung metastasis suppressor gene RhoGDI2. *Cancer Res* 65, 7320-7.
112. Titus B, Schwartz MA, Theodorescu D (2005b): Rho proteins in cell migration and metastasis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 15, 103-104.
113. Tolson J, Bogumil R, Brunst E, Beck H, Elsner R, Humeny A, Kratzin H, Deeg M, Kuczyk M, Mueller GA, Mueller CA, Flad T (2004): Serum protein profiling by SELDI mass spectrometry: detection of multiple variants of serum amyloid alpha in renal cancer patients. *Lab Invest* 84, 845-56.
114. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4.
115. Ueda T, Kikuchi A, Ohga N, Yamamoto J, Takai Y (1990): Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting

- the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem* 265, 9373-80.
116. Unwin RD, Craven RA, Harnden P, Hanrahan S, Totty N, Knowles M, Eardley I, Selby PJ, Banks RE (2003): Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics* 3, 1620-32.
 117. Van den Brûle F, Califice S, Castronovo V (2004): Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj J* 19, 537-42.
 118. Veerkamp JH, Peeters RA, Maatman RG (1991): Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1081, 1-24.
 119. Voss PG, Gray RM, Dickey SW, Wang W, Park JW, Kasai K, Hirabayashi J, Patterson RJ, Wang JL Voss (2008): Dissociation of the carbohydrate-binding and splicing activities of galectin-1. *Arch Biochem Biophys* 478, 18-25.
 120. Walther MM, Yang JC, Pass HI, Linehan WM, Rosenberg SA (1997): Cytoreductive surgery before high dose interleukin-2 based therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 158, 1675-8.
 121. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979): Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 17, 159-163.
 122. Weisinger RA (2002): Cytosolic fatty acid binding proteins catalyze two distinct steps in intracellular transport of their ligands. *Mol Cell Biochem* 239, 35-43.
 123. Westermeier R: *Electrophoresis in Practice*. Wiley-VCH, Weinheim 2001.
 124. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL (1996): Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13, 19-50.
 125. Won Y, Song HJ, Kang TW, Kim JJ, Han BD, Lee SW (2003): Patterns analysis of serum proteome distinguishes renal cell carcinoma from other urologic diseases and healthy persons. *Proteomics* 3, 2310-6.
 126. Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Wang VW, Chan CS, Ng TB, Chung TK, Mok SC (2004): Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips: proteomic scoring to discriminate cervical cancer from normal cervix. *Cancer Lett* 211, 227-34.
 127. World Health Organization: *Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation*. WHO, Genf 2001.
 128. Yamaoka K, Mishima K, Nagashima Y, Asai A, Sanai Y, Kirino T (2000): Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *J Neurosci Res* 59, 722-30.
 129. Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, Massion PP, Larsen PH, White BC, Roberts JR, Edgerton M, Gonzalez A, Nadaf S, Moore JH, Caprioli RM, Carbone DP (2003): Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet* 362, 433-439.
 130. Young AR, Meeusen EN (2004): Galectins in parasite infection and allergic inflammation. *Glycoconj J* 19, 601-6.
 131. Zalcman G, Dorseuil O, Garcia-Ranea JA, Gacon G, Camonis J (1999): RhoGAPs and RhoGDIs, (His)stories of two families. *Prog Mol Subcell Biol* 22, 85-113.

Danksagung

Ich möchte mich bei Allen bedanken, die mich auf vielfältige Weise bei meiner Arbeit unterstützten und die Durchführung ermöglicht haben. Insbesondere gilt mein Dank:

Meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. H. Dihazi für die Überlassung des Themas, für die fachlichen Diskussionen, für die Unterstützung bei dieser Arbeit und für die kritische Durchsicht beim Anfertigen dieses Manuskripts;

Frau E. Brunst-Knoblich für die nette Zusammenarbeit und für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche im Labor;

den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Strutz für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Studienzzeit unterstützen, mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und somit einen wesentlichen Teil zu der Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.