

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

# **Analyse prognostischer Faktoren für die TNF $\alpha$ - Antagonisten-Therapie bei Rheumatoider Arthritis**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Kathinka Rinke  
aus Kassel

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. S. Blaschke

Berichterstatter/in:

Berichterstatter/in

Tag der mündlichen Prüfung:

---

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	1
Tabellenverzeichnis .....	3
Abkürzungsverzeichnis .....	4
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Die Rheumatoide Arthritis (RA).....</b>	<b>9</b>
1.1.1 Pathogenese .....	9
1.1.2 Biologie von TNF $\alpha$ .....	11
1.1.3 Klinik und Diagnose.....	12
1.1.3.1 Klinische Diagnostik .....	13
1.1.3.2 Labordiagnostik .....	14
1.1.4 Therapie .....	16
1.1.4.1 Das Biologikum Etanercept .....	17
<b>1.2 Biomarker.....</b>	<b>18</b>
1.2.1 Biomarkerdefinition.....	18
1.2.2 Biomarkerdetektion mit Hilfe von Proteomics.....	18
1.2.3 Proteom.....	19
1.2.3.1 Posttranslationale Modifikationen.....	21
1.2.4 Überblick über Proteomics-Methoden .....	22
1.2.4.1 Gelbasierte Biomarkersuche .....	22
1.2.4.2 Gelfreie Biomarkersuche .....	23
1.2.5 Schlussfolgerungen für Methodenwahl .....	24
<b>1.3 Zielsetzung.....</b>	<b>25</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>26</b>
2.1.1 Serum.....	26
2.1.2 Chemikalien und Lösungen.....	26
2.1.3 Geräte .....	28
2.1.4 Software .....	29
2.1.5 Patientenkollektiv .....	29

2.1.6	Methodische Einflüsse auf die Analysen.....	31
2.1.7	Chromatographie.....	32
2.1.7.1	Charakteristika der Immunoaffinitätssäule .....	33
2.1.8	Proteinbiochemische Methoden zur Vorbereitung der 2D-Gelelektrophorese .....	34
2.1.8.1	Acetonfällung .....	34
2.1.8.2	Ankonzentrierung und Entsalzung mit Harnstoff .....	35
2.1.8.3	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	35
2.1.8.4	Proteinbestimmung nach Bradford .....	36
2.1.9	Elektrophoretische Methoden für die Gelelektrophorese .....	37
2.1.9.1	Ladungsunterschiede und pI-Wert .....	37
2.1.9.2	Massenunterschiede .....	37
2.1.9.3	Chemisch-physikalische Unterschiede.....	37
2.1.9.4	Gelmatrix .....	38
2.1.9.5	Die 1. Dimension .....	38
2.1.9.6	Äquilibrierung.....	39
2.1.9.7	Die 2. Dimension .....	39
2.1.10	Färbungsmethoden für 2D-Gele.....	40
2.1.11	Massenspektrometrie .....	43
2.1.11.1	Trypsinverdau von Proteinen.....	43
2.1.11.2	Erfassung der Spektren und Proteinidentifikation .....	44
2.1.12	Surface-Enhanced Laser Desorption Ionisation.....	45
2.1.12.1	Vorbereitung, Auftragen und Messung der Proben.....	46
2.1.12.2	Messung der Chips und statistische Auswertung.....	46
2.1.13	Western Blot.....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnis.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Vorbemerkung .....</b>	<b>49</b>
3.1.1	Optimierung der Gelqualität .....	49
3.1.2	Patienten im DIGE-Gel-Vergleich.....	51
<b>3.2</b>	<b>Überblick über die Ergebnisse der Proteomanalyse .....</b>	<b>52</b>
3.2.1	Gelbasierte Proteomics .....	52
3.2.2	Identifizierung der Serumproteine mit MALDI .....	54
3.2.2.1	Proteomanalyse zur Biomarkeridentifikation vor Beginn der ETA-Behandlung (V0)....	59
3.2.2.2	Proteomanalyse zur Biomarkeridentifikation unter ETA-Behandlung (Woche 12, V5) .	60
3.2.2.3	Proteomanalyse zur Biomarkeridentifikation unter ETA-Behandlung (Woche 24, V6) .	61
3.2.3	Ergebnisse der 1D-Western Blot.....	62
3.2.3.1	Untersuchung der Seren mit Anti-Haptoglobin-Antikörper .....	63
3.2.4	Vergleich der DBP-Isoformen im 2D-Western Blot .....	67

---

3.2.4.1	Glykosylierungsfärbungen .....	68
<b>3.3</b>	<b>Gelfreie Proteomics</b> .....	<b>70</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Gelbasierte Proteomics</b> .....	<b>71</b>
4.1.1	Biomarker bei Karzinom- und Autoimmunerkrankungen .....	71
4.1.2	Bisherige Biomarkerdetektion bei RA .....	72
4.1.3	Gelbasierte Proteomics zur Biomarkerdetektion (DIGE) .....	73
4.1.3.1	Haptoglobin .....	73
4.1.3.2	Vitamin-D-binding Protein .....	76
<b>4.2</b>	<b>Gelfreie Proteomics</b> .....	<b>83</b>
4.2.1	Biomarkerdetektion bei Karzinomen .....	83
4.2.2	Bisherige Biomarkerdetektion bei RA .....	83
4.2.3	Ergebnisse der gelfreien Serumanalytik mit SELDI .....	84
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Anhang: Messwerttabellen</b> .....	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>88</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Zelluläre Interaktionen und Zytokinausschüttung bei RA. ....	10
Abbildung 2:	Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bei der RA. ...	10
Abbildung 3:	Ablauf der natürlichen Akut-Phase-Reaktion bei Antigen-Stimulation. ....	11
Abbildung 4:	TNF $\alpha$ hat eine zentrale Rolle in der RA-Pathogenese. ....	12
Abbildung 5:	Klinisches Bild bei schwerer Verlaufsform der RA. ....	13
Abbildung 6:	28 Gelenke werden zur Erstellung des DAS28 untersucht und klassifiziert. ....	14
Abbildung 7:	Schematischer Aufbau des ETA-Moleküls. ....	17
Abbildung 8:	ETA ist ein zirkulierendes, synthetisches TNF $\alpha$ Rezeptor- Fusionsprotein. ....	17
Abbildung 9:	Pathogenese und Einsatzmoment von Biomarkern bei RA. ....	18
Abbildung 10:	Metamorphose von der Raupe zum Falter. ....	20
Abbildung 11:	Schematische Darstellung der Dimensionen von Genom und Proteom. ....	20
Abbildung 12:	Mögliche methodische Vorgehensweisen bei der Proteomanalyse. ....	22
Abbildung 13:	Depletion von <i>high abundant</i> Proteinen mittels Affinitätschromatographie. ....	33
Abbildung 14:	Human-14-Immunoaffinitätssäule zur Proteindepletion. ....	33
Abbildung 15:	Schematische Darstellung der 2D-Gelelektrophorese. ....	40
Abbildung 16:	Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers. ....	43
Abbildung 17:	Erster Schritt zur Proteinidentifikation mit MALDI ist der Protein-Trypsinverdau. ....	44
Abbildung 18:	Nach dem Trypsinverdau wurde die Peptidlösung auf eine Metallplatte pipettiert. ...	44
Abbildung 19:	Analyse von Peptiden im Flugzeitmassenspektrometer. ....	44
Abbildung 20:	Parameter aus der MALDI-Analyse wurden mit Daten aus Swiss-Prot verglichen. ...	45
Abbildung 21:	Schematische Auflistung der Vorbereitungsschritte zur Messung mit SELDI. ....	46
Abbildung 22:	Elektronentransferprinzip im WB. ....	48
Abbildung 23:	Kopplung des sekundären Antikörpers. ....	48
Abbildung 24:	Das 2D-Gel zeigt das Proteom eines nicht-depletierten Serums. ....	49
Abbildung 25:	Das 2D-Gel zeigt die <i>high abundant</i> Proteinfraction von Serum. ....	50
Abbildung 26:	MALDI-Identifikation der <i>high abundant</i> Proteine. ....	50
Abbildung 27:	Das 2D-Gel zeigt die <i>low abundant</i> Fraktion von Serum. ....	51
Abbildung 28:	Übersicht zu den Ergebnissen der Laborarbeiten. ....	52
Abbildung 29:	Proteomprofil der <i>responder</i> und <i>non-responder</i> vor Therapiebeginn (V0). ....	53
Abbildung 30:	Proteomprofil der <i>responder</i> und <i>non-responder</i> unter ETA-Therapie (V6). ....	53
Abbildung 31:	Proteinidentifikation der Proteine aus dem DIGE-Gel V0 mit MALDI-TOF. ....	55
Abbildung 32:	DIGE-Gel zur Identifizierung der Proteinspots zum Zeitpunkt V6. ....	57
Abbildung 33:	Analyse des Serumproteoms zum Zeitpunkt V0 im DIGE-Gel. ....	59
Abbildung 34:	Analyse des Serumproteoms zum Zeitpunkt V5 im DIGE-Gel. ....	60
Abbildung 35:	Analyse des Serumproteoms zum Zeitpunkt V6 im DIGE-Gel. ....	61
Abbildung 36:	Darstellung der Regulation elf im Therapieverlauf regulierter Proteine. ....	62
Abbildung 37:	WB <i>responder</i> (R) und <i>non-responder</i> . ....	63
Abbildung 38:	WB zum Vergleich von Einzelseeren. ....	63
Abbildung 39:	WB zum Vergleich von V0 <i>responder</i> mit V6 <i>responder</i> bei weiteren Einzelseeren. .	64

---

Abbildung 40:	Statistische Auswertung der Bandenintensitäten von der Hp $\alpha_2$ -Kette. ....	64
Abbildung 41:	Regulation der Haptoglobin $\alpha_1$ - Kette bei den <i>respondern</i> im Therapieverlauf. ....	65
Abbildung 42:	Verteilung der Hp-Phänotypen bei 16 Patienten. ....	65
Abbildung 43:	Vergleich der DBP-Isoformen der <i>responder</i> und <i>non-responder</i> (V0) im 2D-WB. ...	67
Abbildung 44:	Vergleich der DBP-Isoformen der <i>responder</i> (V0 und V6). ....	67
Abbildung 45:	Die Glykoproteinfärbung zeigt das Glykosylierungsmuster der <i>responder</i> in V0. ....	68
Abbildung 46:	Flamingofärbung des 2D-Gels der <i>responder</i> vor der Therapie (V0). ....	68
Abbildung 47:	Glykosylierungsmuster der <i>non-responder</i> vor der Behandlung (V0). ....	69
Abbildung 48:	Die Auswertung der Proteinintensitäten im SELDI-Experiment. ....	70
Abbildung 49:	Geldarstellung des SELDI- <i>peak</i> bei 28.718 m/z. ....	70
Abbildung 50:	Hp-Struktur: Disulfidbrücken verbinden kovalent die einzelnen Hp-Ketten. ....	74
Abbildung 51:	Das Modell zeigt die enzymatische Deglykosylierung von DBP zu MAF. ....	80

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	ACR-Kriterien zur Diagnose der Rheumatoiden Arthritis .....	14
Tabelle 2:	Pharmaka zur RA-Behandlung und deren Nebenwirkungen .....	17
Tabelle 3:	Studienplan für den Ablauf der Studie.....	29
Tabelle 4:	Bradford-Pipettierschema.....	36
Tabelle 5:	Fokussierprogramm für die erste Dimension .....	39
Tabelle 6:	Identifizierung der Proteinspots.....	55
Tabelle 7:	Identifikationsliste für die Proteine aus Abbildung 32.....	58
Tabelle 8:	Spotquantitäten der regulierten Proteine der DIGE-Gele V0, V5, V6. ....	87



## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AK	Antikörper
Anti-CCP	Antikörper gegen <i>cyclic-citrullinated-peptide</i>
Anti-MCV	Antikörper gegen <i>modified citrullinated vimentin</i>
APCA	Anti-Citrulliniertes Protein-Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CCP	Zyklisch-citrulliniertes-Peptid
CD	Cluster of differentiation
CHAPS	Cholamidopropionsäure-Sulf

**Abbildungsverzeichnis ..... 1**

**Tabellenverzeichnis ..... 3**

**Abkürzungsverzeichnis ..... 4**

**1 Einleitung ..... 7**

**1.1 Die Rheumatoide Arthritis (RA).. 9**

1.1.1 Pathogenese ..... 9

1.1.2 Biologie von TNF $\alpha$ ..... 11

1.1.3 Klinik und Diagnose..... 12

1.1.4 Therapie ..... 16

**1.2 Biomarker ..... 18**

1.2.1 Biomarkerdefinition..... 18

1.2.2 Biomarkerdetektion mit Hilfe von Proteomics ..... 18

1.2.3 Proteom..... 19

1.2.4 Überblick über Proteomics-Methoden ..... 22

1.2.5 Schlussfolgerungen für Methodenwahl ..... 24

**1.3 Zielsetzung ..... 25**

**2 Material und Methoden ..... 26**

**2.1 Verbrauchsmaterialien ..... 26**

2.1.1 Serum ..... 26

2.1.2 Chemikalien und Lösungen .. 26

2.1.3 Geräte ..... 28

2.1.4 Software ..... 29

2.1.5 Patientenkollektiv ..... 29

2.1.6 Methodische Einflüsse auf die Analysen ..... 31

2.1.7 Chromatographie..... 32

2.1.8 Proteinbiochemische Methoden zur Vorbereitung der 2D-Gelelektrophorese ..... 34

2.1.9 Elektrophoretische Methoden für die Gelelektrophorese ..... 37

2.1.10 Färbungsmethoden für 2D-Gele 40

2.1.11 Massenspektrometrie ..... 43

2.1.12 Surface-Enhanced Laser Desorption Ionisation ..... 45

2.1.13 Western Blot..... 47

**3 Ergebnis ..... 49**

**3.1 Vorbemerkung ..... 49**

3.1.1 Optimierung der Gelqualität .49

3.1.2 Patienten im DIGE-Gel-Vergleich..... 51

**3.2 Überblick über die Ergebnisse der Proteomanalyse ..... 52**

3.2.1	Gelbasierte Proteomics .....	52
3.2.2	Identifizierung der Serumproteine mit MALDI .....	54
3.2.3	Ergebnisse der 1D-Western Blot	62
3.2.4	Vergleich der DBP-Isoformen im 2D-Western Blot.....	67
<b>3.3</b>	<b>Gelfreie Proteomics.....</b>	<b>70</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Gelbasierte Proteomics .....</b>	<b>71</b>
4.1.1	Biomarker bei Karzinom- und Autoimmunerkrankungen.....	71
4.1.2	Bisherige Biomarkerdetektion bei RA	72
4.1.3	Gelbasierte Proteomics zur Biomarkerdetektion (DIGE).....	73
<b>4.2</b>	<b>Gelfreie Proteomics.....</b>	<b>83</b>
4.2.1	Biomarkerdetektion bei Karzinomen.....	83
4.2.2	Bisherige Biomarkerdetektion bei RA	83
4.2.3	Ergebnisse der gelfreien Serumanalytik mit SELDI.....	84
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Anhang: Messwerttabellen.....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
	onat	
CRP	C-reaktives Protein	
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure	
DIGE	Differentielle In-Gel-Elektrophorese	
DMF	N,N-Dimethylformamid	

DTT	1,4-Dithiothreitol
ELISA	<i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
ETA	Etanercept
GC	<i>gas chromatography</i>
high abundant	reichlich vorkommende Proteine
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IGP	immobilisierter pH-Gradient
IL	Interleukin
INF	Interferon
kDa	Kilodalton
LC	<i>liquid chromatography</i>
low abundant	wenig vorkommend
m	Masse
MALDI	<i>matrix-assisted-laser-desorption/ionisation</i>
MMP	Matrixmetalloproteasen
M <sub>r</sub>	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
NFκB	<i>nuclear factor κ light-chain-enhancer</i> of B-cells
PAD	Peptidylarginindeiminase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pl	isoelektrischer Punkt
PMF	<i>peptide mass fingerprinting</i>
PTM	posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
ratio	relativer Expressionsunterschied
RF	Rheumafaktor
SC	Sequenzabdeckung
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELDI	<i>surface-enhanced laser</i>

---

	<i>desorption ionisation</i>
SF	synoviale Fibroblasten
TEMED	N,N,N',N', Tetramethyl- ethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vh	Voltstunden
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z	Ladung

In dieser Arbeit wurden die gebräuchlichen SI-Einheiten verwendet.

# 1 Einleitung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Gelenkserkrankung mit schubweisem Verlauf, die unbehandelt zu Gelenksdestruktion (Lee and Weinblatt 2001) und extraartikulären, systemischen Manifestationen führt (Mielants and Van den Bosch 2009). Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie bisher nicht zufriedenstellend erklärbar (Lee and Weinblatt 2001).

Die RA ist mit einer Prävalenz von etwa 1 % die häufigste Arthritisform in den westlichen Industrieländern. Der Altersgipfel der Neuerkrankungen liegt zwischen dem 35. und 50. Lebensjahr, wobei das Auftreten zwischen dem 30. und 80. Lebensjahr häufig ist (Renz-Polster et al. 2004).

Die Entzündung der Gelenksinnenhaut (Synovia) führt bei fortschreitendem Krankheitsverlauf durch eine Knorpel- und Knochendestruktion zu einem weitgehenden Funktionsverlust der betroffenen Gelenke. In der Pathogenese sind sowohl immunologische als auch genetische Faktoren von Bedeutung, wobei als wichtigste Einflussgröße eine Fehlsteuerung des Immunsystems anzunehmen ist.

Der chronische Entzündungsprozess wird von entzündungsfördernden (syn. proinflammatorischen) Zytokinen aufrechterhalten. Eine zentrale Rolle spielt das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Durch TNF $\alpha$  wird die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine angeregt und es wird die Freisetzung von matrixdestruierenden Enzymen, sogenannte Matrixmetalloproteasen (MMP), stimuliert. Diese schädigen im Gelenk den Knorpel und durch die Aktivierung von Osteoklasten auch den Knochen (Choy and Panayi 2001).

Die Diagnostik der RA beruht auf der Klassifikation des *American College of Rheumatology* (Arnett et al. 1988). Mit dem *disease activity score* (DAS28) gibt es ein standardisiertes Verfahren zur Erfassung der klinischen Krankheitsaktivität (Fuchs 1993; Prevoo et al. 1995). Für die Überwachung des gesamten Therapieverlaufs und des Therapieerfolgs werden die Remissionskriterien der *European League against Rheumatism* (EULAR) benutzt (van Gestel et al. 1999).

Zur Schmerzbehandlung kommen Medikamente der Gruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) zum Einsatz. Eine Behandlungsform zur unspezifischen Hemmung des Immunsystems und des entzündlichen Prozesses sind neben Glukokortikoiden (Prednisolon) die sogenannten Basistherapeutika (Methotrexat und Leflunomid). Diese Behandlung verspricht längerfristig aber nur mäßigen Erfolg und ist z.T. mit schweren Nebenwirkungen behaftet (O'Dell 2004; Cronstein 2005).

Mit dem Einsatz der neuen biologischen Therapieverfahren (Interleukin-1- oder TNF $\alpha$ - Antagonisten) kann gezielt in die Pathogenese des chronischen Entzündungsprozesses eingegriffen werden, um das Fortschreiten der Gelenkdestruktion aufzuhalten.

Die Gabe von TNF $\alpha$ -Antagonisten stellt seit ungefähr zehn Jahren eine erfolgversprechende Therapieoption dar (Maini et al. 1999; Bathon et al. 2000; Weinblatt et al. 2003; Keystone et al. 2004; van de Putte et al. 2004).

Jedoch ist die Indikationsstellung zur Therapie mit TNF $\alpha$ -Antagonisten durch hohe Behandlungskosten und gravierende therapieassoziierte Nebenwirkungen, wie Infektionen, Herzinsuffizienz, Autoimmunreaktionen, Hepatotoxizität und Erkrankungen des erythropoetischen Systems, limitiert (Bongartz et al. 2006).

Noch schwerer wiegt die Erkenntnis, dass in 30 - 40 % der Fälle ein Therapieversagen bei der Behandlung mit TNF $\alpha$ -Antagonisten auftritt (*non-responder* nach EULAR). Aus bisher ungeklärten Gründen kann bei nur 60 - 70 % der mit TNF $\alpha$ -Antagonisten behandelten Patienten ein Therapieansprechen (*responder* nach EULAR-Kriterien) festgestellt werden (Klareskog et al. 2004; Goekoop-Ruiterman et al. 2005; Breedveld et al. 2006).

Aus diesen Gründen sind für den Einsatz von Biologika wie die TNF $\alpha$ -Antagonisten eine gute und wissenschaftlich fundierte Indikationsstellung sowie ein valider Prädiktor für einen Behandlungserfolg wichtig. Demgemäß ist es wünschenswert, ein Versagen einer Anti-TNF $\alpha$ -Therapie *ex ante* ausschließen zu können.

Es konnte aber bisher kein valider Prädiktor für eine erfolgreiche Behandlung der RA mit TNF $\alpha$ -Antagonisten identifiziert werden.

Die unterschiedliche Pharmakokinetik der Biologika, die Bildung von humanen Antikörpern gegen das eingesetzte Biologikum und pharmakogenetische Faktoren wurden als mögliche Ursachen für ein Therapieversagen ausgeschlossen (Hyrich et al. 2006; Kooloos et al. 2007).

In dem vorliegenden Projekt „Analyse prognostischer Faktoren für die TNF $\alpha$ -Antagonisten-Therapie bei Rheumatoider Arthritis“ wird die Veränderung des Proteinexpressionsmusters im Serum von Patienten, die bei fortgeschrittener RA mit dem TNF $\alpha$ -Antagonisten Etanercept (ETA) behandelt wurden, beschrieben. Darüber hinaus werden die Suche, der Einsatz und der Nutzen von prognostischen Biomarkern thematisiert.

Ziel dieses Projekts ist es, spezifische Biomarker im Serum von RA-Patienten zu identifizieren, die es ermöglichen, ein Ansprechen bzw. Nichtansprechen auf das Biologikum ETA - ein lösliches rekombinantes TNF $\alpha$ -Rezeptorfusionsprotein - vorherzusagen.

Im Folgenden werden die RA, das Forschungsgebiet Proteomics und die möglichen methodischen Vorgehensweisen zur Biomarkerdetektion vorgestellt. Aufgrund der Methodenvielfalt im Bereich der Proteomicsforschung besteht die Notwendigkeit, die hier getroffene Methodenwahl zu erläutern. Im Anschluss folgen die Darstellung der Untersuchungsergebnisse und ihre wissenschaftliche Einordnung.

## 1.1 Die Rheumatoide Arthritis (RA)

Zu den Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises gehören alle chronisch schmerzhaften und mit dauerhaften Bewegungseinschränkungen verbundenen Störungen des Bewegungs- und Stützapparates. Eine von diesen vielfältigen Erkrankungen ist die RA. In der internationalen Klassifikation der Krankheiten (ICD) werden 450 verschiedene Erkrankungen des Muskel-Skelett-Systems und des Bindegewebes differenziert, die sich in Beschwerdebild, Verlauf und Prognose stark unterscheiden.

Laut Angaben des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums konsultieren bis zu 15 % der Bevölkerung mindestens ein Mal im Jahr wegen rheumatischer Beschwerden einen Arzt. Überdies verursachen Erkrankungen von Skelett, Muskeln und Bindegewebe etwa 15 % aller verlorenen Erwerbsjahre. Damit haben Krankheiten des rheumatischen Formenkreises nicht nur sozialmedizinische Bedeutung sondern stellen wegen ihrer ätiologischen, pathogenetischen und klinischen Heterogenität eine diagnostische Herausforderung dar.

### 1.1.1 Pathogenese

Die wichtigsten Kennzeichen der systemischen Autoimmunerkrankung sind die lange Krankheitsdauer und die Vielzahl der betroffenen und entzündeten Gelenke. Daher wird die RA auch chronische Polyarthritis bezeichnet.

Die aktuelle Erklärung zur Entstehung der RA basiert auf der Vorstellung, dass das Immunsystem fehlgesteuert ist und körpereigene Gewebe, in diesem Fall vor allem die Gelenke, von Zellen des Immunsystems angegriffen werden. Die RA wird spät erkannt und es ist unklar, warum es zu dem aggressiven und chronischen Verlauf der Entzündung kommt. Es könnte analog zur Lyme-Arthritis (Borreliose-assoziierte bakterielle Arthritis) eine Antigenpersistenz im Gelenk vorliegen. Dazu passen die konstant hohe Anzahl an T-Zellen in der Synovialmembran, die vermehrte HLA-Expression (*human leukocyte antigen*) auf Synovialzellen und auf antigenpräsentierenden Zellen (APC), sowie die stetige Aktivierung von Antikörper produzierenden B-Zellen (Muller-Ladner et al. 2000).

Es könnte auch der Einfluss eines viralen Infektes von Bedeutung sein. Der virale Stimulus kann ein Grund dafür sein, dass die Expression von HLA-II-Molekülen auch auf nicht-antigenpräsentierenden Zellen induziert wird. Dadurch wären diese dann auch Zielobjekte der Immunantwort. Bei dem neuen, dann immunogen wirkenden Epitop, könnte es sich aber um ein zelleigenes Protein handeln, welches bis zu diesem Zeitpunkt nicht in Erscheinung getreten ist (verstecktes Epitop). Dieser Prozess würde ebenfalls die starke T-Zell-Infiltration im Gelenk und die damit verbundenen Entzündungsvorgänge erklären (Depper and Zvaifler 1981).

Charakteristisch für die Pathogenese der RA sind drei Phänomene: Hyperplasie der synovialen Fibroblasten (SF), pathologische Immunphänomene und progressive Gelenkzerstörung.

Zur Erklärung der drei Phänomene lässt sich die Hypothese von Bernhard und Villiger in Abbildung 1 heranziehen (Bernhard and Villiger 2001).

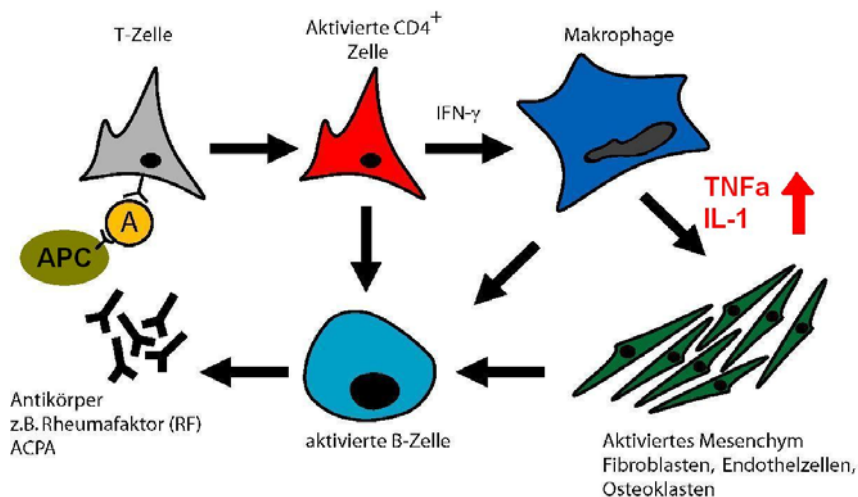


Abbildung 1: Zelluläre Interaktionen und Zytokinausschüttung bei RA. Die Arbeitshypothese von Bernhard postuliert, dass ein unbekanntes Antigen auf dem Blutweg in die Synovia gelangt (oder direkt dort entsteht) und von APCs aufgenommen wird. Das unbekannte Antigen wird über das HLA-System den T-Lymphozyten präsentiert. Im Endeffekt führt das unbekannte Antigen über Ausschüttung von Zytokinen ( $\text{TNF}\alpha$ , Interleukin-1, Interferon- $\gamma$ ) zu einem Entzündungsprozess, der die Autoantikörperproduktion und Aktivierung des mesenchymalen Gewebes auslöst (Bernhard und Villiger 2001, S. 180).

Durch die Interaktion von APC und dem passenden T-Zell-Rezeptor kommt es zur Aktivierung von Immunzellen und zur klonalen Expansion spezifischer T-Zellen ( $\text{CD4}^+$ -T-Zellen). Die  $\text{CD4}^+$ -Zellen exprimieren bei ihrer Aktivierung zusätzlich  $\text{CD154}$ , wodurch die Interaktion von T-Zellen mit dem auf B-Zellen exprimierten  $\text{CD40}$ , aber auch mit Monozyten, dem Endothel und den dendritischen Zellen möglich wird. Zusätzlich führen angiogenetische Faktoren wie VEGF zur Proliferation von endotheliale Synovialgewebe. Es folgt eine verstärkte Angiogenese und die Permeabilitätsänderung des Endothels. Daraus resultiert, dass vermehrt Entzündungszellen in das Gelenk penetrieren und bei ihrer Aktivierung die proinflammatorische Zytokinkaskade weiterhin unterhalten (Roudier 2006). Die Interaktion zwischen T-Zellen, APC und B-Zellen aktiviert das Immunsystem im Allgemeinen. Genauer gesagt aktiviert sie Monozyten und Makrophagen, erhöht die Sekretion von Interferon  $\gamma$  ( $\text{INF}\gamma$ ), steigert die Apoptose-Resistenz und die Produktion des Rheumafaktors in B-Zellen (1.1.3.2). Zentral für die RA-Pathogenese ist die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ , Interleukin-1 und 6 (Brennan et al. 1998).

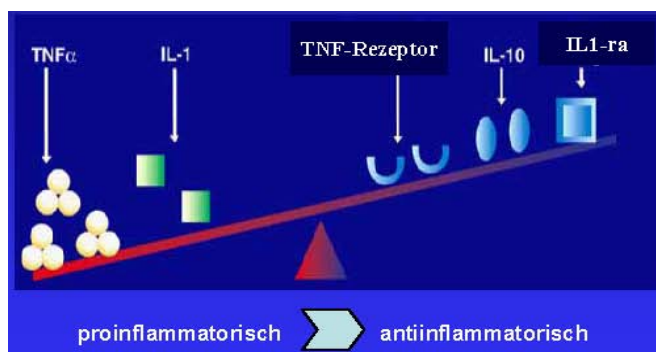


Abbildung 2: Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bei der RA. Durch die Aktivierung der verschiedenen Entzündungszellen ist das Gleichgewicht der Entzündungskaskade auf die proinflammatorische Seite verschoben und gegenregulatorische Effekte sind weitgehend ineffektiv. Für den Krankheitsverlauf der RA steht die Wirkung hoher  $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel im Mittelpunkt der Pathogenese (Brennan et al. 1998, S. 139).

## 1.1.2 Biologie von $\text{TNF}\alpha$

$\text{TNF}\alpha$  gehört zur TNF-Superfamilie. Dies ist ein Zytokinsystem, das eine wichtige Rolle bei der Funktion der Immunantwort und Organogenese des Lymphsystems spielt. Es wurde entdeckt, als bei Tumor- Mausmodellen unter  $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung Tumorzellen starben (Löffler et al. 2007).  $\text{TNF}\alpha$  ist als pleiotroper, proinflammatorischer Signalstoff an lokalen und systemischen Entzündungen, sowie an der Regulation der am Entzündungsort ablaufenden Prozesse (Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Ausschüttung weiterer Zytokine) beteiligt.

Das Zytokin wird hauptsächlich von Makrophagen (aber auch von Lymphozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Fibroblasten) produziert.  $\text{TNF}\alpha$  hat Einfluss auf die Induktion von Fieber (durch die Produktion von Pyogenen), auf den Fettstoffwechsel, die Blutgerinnung, Insulinresistenz und Endothelfunktion. Außerdem induziert es in der Leber die Produktion von positiven Akut-Phase-Proteinen und ist ein Phagozytosestimulus für Makrophagen.  $\text{TNF}\alpha$  fördert die Migrationsfähigkeit von Granulozyten aus der Blutbahn in entzündliches Gewebe und induziert vor Ort die Cyclooxygenase-Synthese (COX), was die Schmerzempfindungen der RA-Patienten erklärt (Beutler 1999; Löffler et al. 2007). Die  $\text{TNF}\alpha$ -Wirkung im Zuge der Akut-Phase-Reaktion ist in Abbildung 3 gezeigt (Dayer 2002).

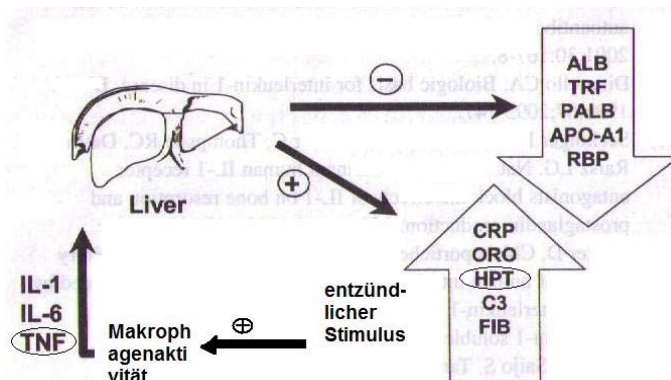


Abbildung 3: Ablauf der natürlichen Akut-Phase-Reaktion bei Antigen-Stimulation. Nach Makrophagenaktivierung und Zytokinspiegelanstieg werden in der Leber positive Akut-Phase-Proteine gebildet. Die Produktion negativer Akut-Phase-Proteine nimmt ab (Dayer 2002, S.13).

In der Zirkulation gibt es lösliches und membrangebundenes  $\text{TNF}\alpha$ . Enzymatisch kann membrangebundenes in freies  $\text{TNF}\alpha$  umgewandelt werden. Für freies  $\text{TNF}\alpha$  existieren zwei Rezeptoren (R). Es gibt den  $\text{TNF}\alpha$ -R1 mit einer Todesdomäne (*death domaine*, p55R) und den  $\text{TNF}\alpha$ -R2 (p75R), wobei freies  $\text{TNF}\alpha$  seinen größten Aktivitätsanteil über den  $\text{TNF}\alpha$ -R1 bewirkt. Die Wirkung von  $\text{TNF}\alpha$  (sowohl am Rezeptortyp 1 als auch 2) mündet in den Signalweg des *nuclear-factor-kappa-light-chain-enhancer* von aktivierten B-Zellen (NFkB). Der NFkB-Signalweg aktiviert im Zellkern Gene zur Expression proinflammatorischer Zytokine. Ausschließlich über die Aktivierung des  $\text{TNF}\alpha$ -R1 kann durch Enzyminduktion von Caspasen eine Zellapoptose ausgelöst werden. Der  $\text{TNF}\alpha$ -R2 kann nur von membrangebundenem  $\text{TNF}\alpha$  aktiviert werden. Von R2 ausgehend wird sowohl der Apoptoseweg aktiviert, als auch über NFkB eine Entzündungsreaktion hervorgerufen (Beutler 1999; Löffler et al. 2007).



Bei der RA findet die Gelenkzerstörung vor allem in der Initialphase der Erkrankung statt. Eine starke Aktivierung der Synovialzellen findet vor Manifestation der klinischen Symptome statt und persistiert zusammen mit der Aktivierung von Entzündungszellen (Lambrecht et al. 2008). Im frühen Stadium der RA kommt es im Rahmen der Entzündungsreaktion zu einer massiven Verdickung der Synovia, es resultiert eine Verschmälerung des Gelenkspalts und es kommt aufgrund einer erhöhten Osteoklastenaktivität zur Demineralisation von Knochen (Takayanagi et al. 1997).

Im Verlauf einer RA entwickelt sich im Rahmen einer Entzündungsreaktion eine starke Verdickung der Synovia (Pannusbildung). Durch die Aktivierung des mesenchymalen Gewebes kommt es zu Knochenerosionen, Synoviaverlust und in der Folge zu Bewegungsunfähigkeit.

Die Zellen des Pannusgewebes (Pannozyten) entwickeln eine Autonomie, aus der eine Art Kontrollverlust des Immunsystems über die Entzündungskaskade entsteht. Sowohl beim Gesunden als auch beim Kranken hat  $TNF\alpha$  pleiotrope Wirkungen (Beutler 1999; Choy and Panayi 2001). Im späten Stadium der RA ist die Bewegungsfähigkeit des Gelenks stark beeinträchtigt und die Synovia aufgrund persistierender entzündlicher Prozesse nahezu vollständig abgebaut.

Abbildung 4 fokussiert die Effekte von  $TNF\alpha$ .

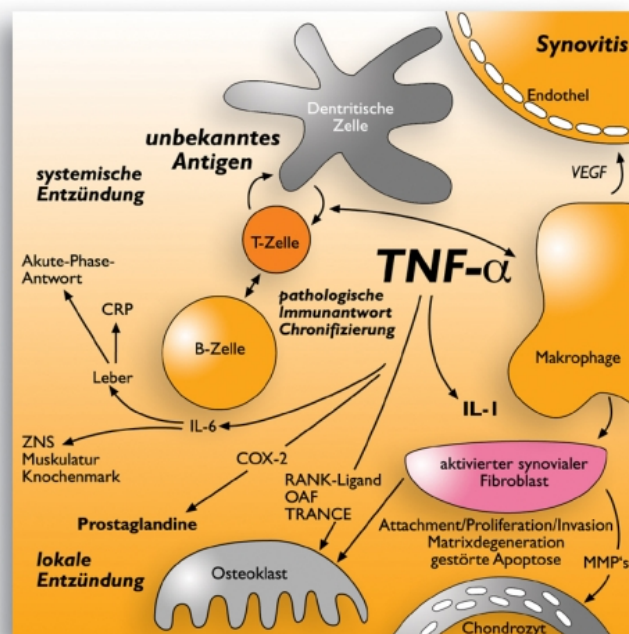


Abbildung 4:  $TNF\alpha$  hat eine zentrale Rolle in der RA-Pathogenese.

Die RA-Hauptmanifestationen, die durch  $TNF\alpha$  verursacht werden, äußern sich zusammengefasst in einer Synovialitis und Pannusbildung, einer entzündlichen Destruktion von Gelenkknorpel und Knochen, in lokalen Schmerzen durch die Induktion der COX und nicht zuletzt in systemischen Manifestationen (Anstieg der Akute-Phase-Proteine und systemischer Entzündungszeichen wie BSG und CRP).  
Quelle: Online-Portal <http://www.tiz-info.de/info/biologischetherapie/was-ist-tnf-alpha/> am 02.04.2010

### 1.1.3 Klinik und Diagnose

Die typische Symptomatik der RA sind symmetrische polyartikuläre Schmerzen, Steifheit, Überwärmung und Schwellungen der Gelenke, wobei zunächst die kleinen Finger- und Zehengelenke, später auch die großen Gelenke betroffen sind. Besonders morgens ist die Beweglich-

keit eingeschränkt (Morgensteifigkeit). Abbildung 5 zeigt ein für die RA pathognomonisches Bild einer Knochen- und Gelenkdeformationen der Hände.



Abbildung 5: Klinisches Bild bei schwerer Verlaufsform der RA.

Bild A zeigt, dass es bei einer unbehandelten und schweren Verlaufsform der RA zu einer Überstreckung der Finger- und Mittelgelenke und Beugstellung der Fingerendgelenke kommt („Schwanenhalsdeformität“). Bereits in früheren Stadien imponieren die Hände von RA-Patienten mit geschwollenen, druckschmerzhaften und funktionsuntüchtigen Gelenken. Zudem sind in 20 % der Fälle subkutane Rheumaknoten an Fingern und Ellenbogen charakteristisch.

Bild B zeigt die typische Ulnardeviation im Spätstadium der RA, welche sich im Röntgenbild verifizieren lässt (Renz-Polster et al. 2004, S. 1015).

Meistens ist der Ausbruch der RA nicht datierbar, denn die Schmerzen und Schwellungen entstehen über Wochen und Monate. Unspezifische allgemeine Krankheitssymptome wie Schwäche, Leistungsabfall, Nachtschweiß, Anorexie oder Müdigkeit treten als Begleiterscheinungen auf. Durch die ungebremste und nicht behandelte Entzündungsreaktion sind allerdings nicht nur die Gelenke betroffen, sondern auch innere Organe. Bei diesen sogenannten „extraartikulären Manifestationen“ können

- die Augen (Skleritis, Episkleritis, Trockenheit, Sjögren-Syndrom)
- die Lunge (Pleuritis, Pleuraerguss, Lungenfibrose, subpleurale Rheumaknoten)
- die Haut (Rheumaknoten, Hautulzera, neutrophile Dermatitis),
- die Muskeln (Synovitis, Myositis, Vaskulitis),
- das Skelett (Osteopenie),
- die Niere (sekundäre Amyloidose, Medikamententoxizität),
- die Milz (Splenomegalie),
- das Herz (Perikarditis, Myokarditis),
- und das hämatologische System (Anämie, Leukozytose oder Trombozytose) betroffen sein (Mielants and Van den Bosch 2009).

Die Krankheitsaktivität und Progredienz der RA werden mit dem DAS28, durch radiologische Veränderungen und spezifische Laborparameter wie z.B. CRP, BSG, Anti-CCP und Anti-MCV überwacht (Abschnitt 1.1.3.2).

### 1.1.3.1 Klinische Diagnostik

Für die Diagnosestellung werden die typischen RA-Symptome, klinische Untersuchung, Labor und Röntgenbild genutzt. Bereits 1987 hat das *American College of Rheumatology* (ACR) klinische Kriterien zur Diagnose von RA festgelegt, wobei mindestens vier von sieben auftreten und mindestens sechs Wochen lang Bestand haben müssen (Tabelle 1).

Tabelle 1: ACR-Kriterien zur Diagnose der Rheumatoiden Arthritis  
Mindestens vier ACR-Kriterien müssen für die RA-Diagnose erfüllt sein (Arnett et al. 1988).

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

Für die Messung der Krankheitsaktivität kommt eine Formel zum Einsatz, die anhand empirischer Daten von RA-Patienten entwickelt wurde.

$$\text{DAS28} = 0.56 \cdot \sqrt{\text{druckschmerzhaftGelenke}} + 0.28 \cdot \sqrt{\text{geschwolleneGelenke}} + 0.70 \cdot \ln(\text{BSG}) + 0.014 \cdot \text{Krankheitszustand}$$

In der sogenannten DAS28-Formel werden 28 definierte Gelenke in Hinblick auf Schwellung und Schmerzempfinden beurteilt (Abbildung 6).

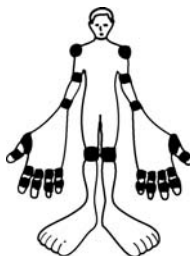


Abbildung 6: 28 Gelenke werden zur Erstellung des DAS28 untersucht und klassifiziert. Besondere Aufmerksamkeit wird dabei den Gelenken der Finger und des Handgelenks zugemessen, da diese Gelenke bei der RA häufig besonders schwer betroffen sind. Quelle: [www.gp-training.net/rheum/ra.htm](http://www.gp-training.net/rheum/ra.htm) am 02.04.2010

Zusätzlich zur Betrachtung der Anzahl geschwollener und schmerzhafter Gelenke werden die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und der subjektiv angegebene Gesundheitszustand des Patienten in die Formel mit eingerechnet.

Die Veränderung des DAS28 wird auch zur Beurteilung der Therapiewirksamkeit benutzt. Ein DAS28 von 0 bis 3.2 gibt eine geringe, ein DAS28 von 3.2 bis 5.1 eine mittlere und Werte von 5.1 bis 10 eine hohe Krankheitsaktivität an.

Nach den Kriterien der EULAR liegt bei einer DAS28-Verbesserung von mindestens 0.6 ein moderates Therapieansprechen vor. Bei Verbesserung um 1.2 liegt ein gutes Ansprechen vor und der Patient wird als *responder* klassifiziert (van Gestel et al. 1999). Zusätzlich zur Beurteilung der Krankheitsaktivität mittels DAS28 werden Veränderungen im Röntgenbild festgehalten. Außerdem gibt es RA-spezifische Laborparameter zur Diagnose und Krankheitsüberwachung.

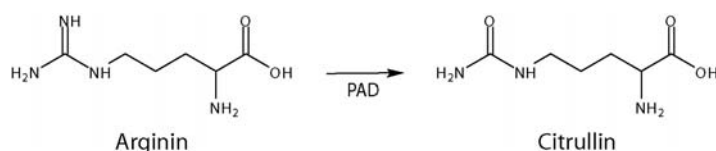
### 1.1.3.2 Labordiagnostik

Für die Diagnose der RA ist eine umfangreiche laborchemische Analyse des peripheren Blutes wichtig. Es werden BSG, CRP sowie spezifische Autoantikörper bestimmt. Die Qualität eines Markers wird durch Sensitivität und Spezifität bestimmt. Dabei spiegelt die Sensitivität den prozentualen Anteil der „richtig erkannten Patienten“ wider, bei denen die RA tatsächlich vorliegt

und die mit Hilfe der Marker detektierbar waren. Die Spezifität zeigt den Anteil der als „gesund zu erkennenden Untersuchten“ (richtig-negatives Testergebnis).

Der erste rheumatologische Biomarker war der Rheumafaktor (RF). Seine Entdeckung und Bedeutung zur Diagnosestellung begann im Jahr 1937 und seine klinische Anwendbarkeit wurde viel untersucht (Rose et al. 1948; Waaler 2007). Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei Rheumafaktoren um Autoantikörper der Subklassen Immunglobulin M (IgM), IgG, IgA und IgE handelt. Diese Immunglobuline richten sich gegen Epitope des F<sub>c</sub>-Fragment des körpereigenen IgG (Bennett et al. 2008). Ein positiver RF ist bei vielen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen messbar und deswegen kein Beweis für die RA.

RA-spezifischer sind Antikörper gegen citrullinierte Proteine (ACPAs). ACPAs sind gegen Proteine gerichtet, bei denen das Enzym Peptidylarginindeiminase (PAD) die Aminosäure Arginin zu Citrullin umgewandelt hat (Cantaert et al. 2006). Es handelt sich dabei um eine posttranslationale Modifikation.



Der Grund für die Citrullinierung von Proteinen und die folgende Produktion von Autoantikörpern gegen citrullinierte Aminosäuren ist bisher jedoch nicht gefunden worden. Im Zeitraum von 1964 bis 1995 wurden viele Forschungsvorhaben zur Nutzbarkeit von spezifischen Antikörpern gegen RA-spezifische Proteinstrukturen unternommen. Alle Tests der neuen Antikörper wie z.B. die Anti-perinukleären-Antikörper (APF) und Anti-Keratin-Antikörper (AKA) waren wenig sensitiv (Nienhuis and Mandema 1964; Sondag-Tschroots et al. 1979; Scott et al. 1981).

1995 wurde nachgewiesen, dass sowohl der APF als auch der AKA citrulliniertes Filaggrin als Epitop erkannten (Sebbag et al. 1995). Nun war es möglich, die Analysen mittels Immunoblot und *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) auf Basis eines Anti-Filaggrin-Antikörpers durchzuführen (Nogueira et al. 2001). Der ELISA-Test bot Vorteile in der Quantifizierung und Reproduzierbarkeit und es gelang erstmalig der Nachweis in einer Studie, dass das Vorhandensein von Citrullin für die Antigenität und Autoimmunreaktion bei der RA verantwortlich ist.

Mit einem Fragment des Filaggrins wurden ab 1998 die Versuche ausgeweitet. Ein synthetisch hergestelltes, citrulliniertes Peptid wurde in mehreren Schritten in seiner Antigenstruktur optimiert und die Peptidsequenz von Filaggrin zum *cyclic citrullinated peptide* (CCP) zyklisiert. Nach zahlreichen Optimierungsschritten wurde die Sensitivität der Peptide auf 80 % und Spezifität auf 98-99 % erhöht. Dieser Test wurde CCP2-ELISA genannt (Fernandez-Suarez et al. 2005).

Die gemessenen CCP-Titer ließen eine Korrelation mit dem Krankheitsverlauf vermuten und wiesen sogar auf einen Ausbruch der Erkrankung hin, obwohl der Proband noch keine RA-Symptome hatte (Rantapaa-Dahlqvist et al. 2003; Vencovsky et al. 2003; Agrawal et al. 2007).

Zur Frühdiagnostik wurde der Antikörper gegen modifiziertes citrulliniertes Vimentin (Anti-MCV) eingeführt. Anti-MCV-Antikörper wurden 1994 entdeckt, gehören zur ACPA-Gruppe (Despres et al. 1994) und erkennen als Antigen citrulliniertes Vimentin (Vossenaar et al. 2004). Der Anti-MCV-Test korreliert besser als der CCP-Titer mit dem radiologischen Verlauf (Mathsson et al. 2008). Obwohl hohe Spezifitäten vorliegen und der Anti-MCV-Test sowie CCP1 und CCP2 Anwendung in der klinischen Routineanalytik finden, ist die Definition des Epitops, gegen welches sich die Tests richten, weiterhin unklar. Es muss sich bei dem Epitop um modifizierte Formen von Intermediärelementen des Zytoskeletts (Vimentin und Filaggrin) handeln. Warum und an welchen Stellen der Zytoskelettproteine die Modifikationen stattfinden, ist genauso ungeklärt, wie ihr Einfluss auf die Pathogenese der RA.

Derzeit ist die RA-Diagnose durch klinische Tests, radiologische Befunde und die Labordiagnostik (BSG, RF, Anti-CCP, Anti-MCV) zuverlässig und durch Studien hinreichend validiert.

Doch zur Vorhersage, ob eine Therapie mit  $\text{TNF}\alpha$ -Antagonisten erfolgversprechend ist, sind die bisher etablierten Antikörper und Laborparameter nicht nutzbar.

### 1.1.4 Therapie

Grundsätzlich kommen zur Schmerzbehandlung NSAR (Ibuprofen, Diclofenac) zum Einsatz. Sie bewirken über die Hemmung der COX, dass keine Prostaglandine synthetisiert werden (Analgese). Des Weiteren kommen Glukokortikoide zum Einsatz, die immunsuppressive und entzündungshemmende Wirkung haben. Sie hemmen die Synthese der proinflammatorischen Zytokine (IL-1,  $\text{TNF}\alpha$ ) in Makrophagen und vermindern auch die Genexpression der COX. Außerdem vermindern Glukokortikoide die Synthese von IL-2 und damit die Selbsterhaltung von Autoimmunreaktionen (IL-2 gesteuerte T-Zellaktivierung, MHC-II-Expression). NSARs und Glukokortikoide beeinflussen den Verlauf bzw. den Progress der RA nicht.

RA-Patienten sollten schnell nach Diagnosestellung mit sogenannten *disease-modifying antirheumatic drugs* (DMARDs, z.B. Methotrexat als Folsäureantagonist) behandelt werden (Newsome 2002). Außerdem kann Leflunomid eingesetzt werden was durch die Hemmung der Pyrimidinbasensynthese die Proliferation aktivierter T-Zellen vermindert. DMARDs greifen in den Entzündungsprozess ein und können den Progress der RA verlangsamen.

In der nächsten Behandlungsstufe kommen die genannten Biologika, z.B.  $\text{TNF}\alpha$ -Antagonisten wie Adalimumab, Infliximab und Etanercept, zum Einsatz. Es handelt sich um Moleküle biologischen Ursprungs, die auf die Wirkung des proinflammatorischen Zytokins  $\text{TNF}\alpha$  Einfluss nehmen. Dabei kommen Fragmente von rekombinanten humanisierten monoklonalen Antikörpern (Adalimumab, Infliximab) oder aber Rezeptorantagonisten (Etanercept) auf Basis von rekombinanten Proteinen zum Einsatz, welche durch kompetitive Bindung mit dem jeweiligen Liganden ( $\text{TNF}\alpha$  oder seinem Rezeptor) gezielt den  $\text{TNF}\alpha$ - Spiegel senken. Ein weiteres Biologikum ist Anakinra, ein IL-1-Rezeptorantagonist (Mertens and Singh 2009). Die Therapiemöglichkeiten und deren Nebenwirkungen sind in Tabelle 2 dargestellt (Willburger et al. 2006).

Tabelle 2: Pharmaka zur RA-Behandlung und deren Nebenwirkungen  
(Deutsches Ärzteblatt, Jan 2006, S. A51).

Pharmakon	Haupt-Nebenwirkungen
Methotrexat	Knochenmarkssuppression, Hepatotoxizität, Alopezie, Pneumonie, Stomatitis, hämatologische Erkrankungen
Sulfasalazin	Knochenmarkssuppression
Leflunomid	Diarrhö, Alopezie, Exanthem, Immunsuppression
Etanercept	Immunsuppression (Infektion)
Infliximab	Nur in Kombination mit MTX, siehe MTX, Immunsuppression, Lymphome
Adalimumab	Immunsuppression (Infektion)
Anakinra	Immunsuppression (Infektion)

### 1.1.4.1 Das Biologikum Etanercept

Das Biologikum Etanercept (ETA) ist ein gentechnologisch hergestelltes, lösliches Rezeptor-Fusionsprotein, das aus zwei Teilen besteht. Das Protein besteht aus einem Trägermolekül, auf das ein Antikörper gekoppelt ist (Abbildung 7).

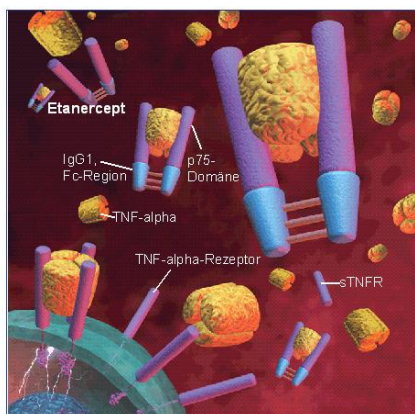


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des ETA-Moleküls.  
Das chimäre Molekül besteht in der Basis (blau) aus dem konstanten F<sub>c</sub>-Teil des humanen IgG-Proteins. An das Trägermolekül (produziert in den Ovarialzellen des chinesischen Hamsters), sind zwei Bindungsdomänen (violett) für TNF $\alpha$  gekoppelt, die den natürlichen p75-Rezeptoren nachempfunden sind. An dieser Domäne bindet das im Blut zirkulierende TNF $\alpha$  (Wyeth 2009). 02.04.10  
<http://www.rheuma-online.de/medikamente/etanercept-enbrel/info/aufbau-von-etanercept.html>

Da bei der RA erhöhte TNF $\alpha$ -Spiegel sowohl im Serum als auch in der Synovialflüssigkeit zu finden sind, ist das therapeutische Hauptziel, den TNF $\alpha$ -Überschuss aus der Zirkulation und vom Entzündungsort zu eliminieren (Nestorov 2005). Durch Bindung des zirkulierenden TNF $\alpha$  wird die Auslösung der proinflammatorischen Kaskade in Zielzellen verhindert (Abbildung 8).

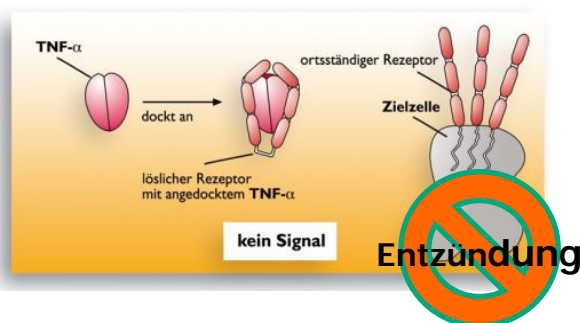


Abbildung 8: ETA ist ein zirkulierendes, synthetisches TNF $\alpha$  Rezeptor- Fusionsprotein. ETA verhindert die Bindung von freiem TNF $\alpha$  an seinen natürlichen Rezeptor und verhindert somit die Auslösung der Entzündungskaskade bei der RA. Quelle am 02.04.2010: <http://www.rheuma-online.de/medikamente/etanercept-enbrel/info/der-wirkmechanismus-von-etanercept.html>



## 1.2 Biomarker

### 1.2.1 Biomarkerdefinition

Ein Biomarker, der in der Klinik Anwendung finden soll, muss in Proben bestimmbar sein, die leicht vom Patienten zu gewinnen sind. Viele Krankheiten gehen von einem bestimmten Organ aus, so sind bei der RA besonders die Gelenke betroffen. Da in der Rheumatologie die pathologischen Gelenksveränderungen im Mittelpunkt stehen, wird konsequenterweise neben dem Serum auch Gewebe aus dem Gelenk intensiv in Studien untersucht (Lambrecht et al. 2008). Die Probenentnahmen mittels Biopsie sind mit großem Aufwand und hohem Infektionsrisiko verbunden. Deutlich sicherer in der Entnahmetechnik ist die Gewinnung von Körperflüssigkeiten (Blut, Urin oder Speichel). Die klinische Routinediagnostik greift bereits seit Jahrzehnten auf das Medium des Serums zurück. Ein Biomarker in leicht zu erreichenden Medien wie Serum wäre wünschenswert. Abbildung 9 zeigt das aktuelle Konzept der RA-Pathogenese und den gewünschten Einsatzort von Biomarkern. Im Fall der RA sollten Biomarker eine Entzündung frühzeitig anzeigen und Hinweise auf die anzuwendende Therapieart geben (Pratt et al. 2009).

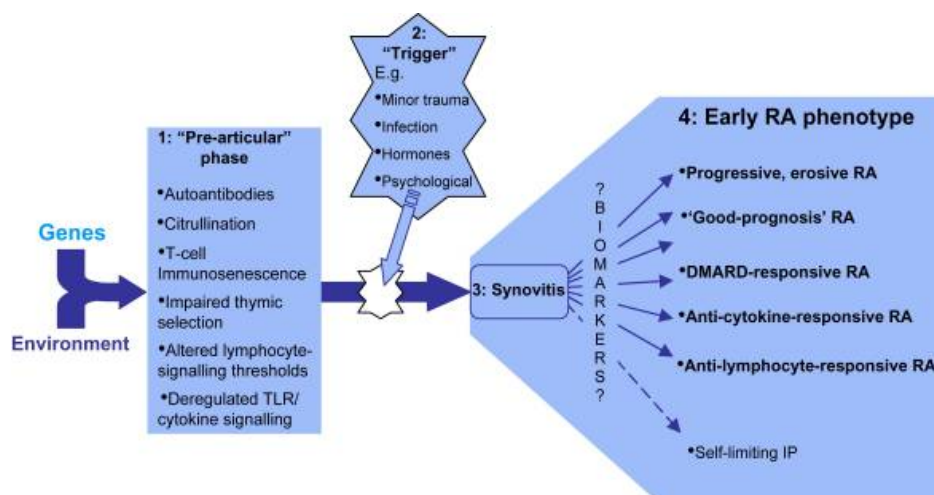


Abbildung 9: Pathogenese und Einsatzmoment von Biomarkern bei RA. Ein RA-Biomarker soll es ermöglichen, den Verlauf der RA abzuschätzen. Er soll z.B. anzeigen, dass eine Behandlung mit zytokinneutralisierenden Antikörpern Aussicht auf Erfolg hat (Pratt et al. 2009, S.42). Von einem Biomarker wird erwartet, dass er objektiv messbar und schnell evaluierbar ist. Er sollte als Indikator für ein pharmakologisches Ansprechen auf eine Therapie nutzbar sein (Atkinson et al. 2001).

Durch den enormen Wissenszuwachs und die schnelle Entwicklung im Bereich der Massenspektrometrie (MS) ist die Biomarkerdetektion mittlerweile eines der Hauptaufgabengebiete der klinischen Proteomics geworden. Dabei stellt die Analyse des Proteoms von humanen Körperflüssigkeiten einen der aussichtsreichsten Ansätze bei der Entdeckung neuer, proteinbasierender Biomarker dar (Aebersold and Goodlett 2001).

### 1.2.2 Biomarkerdetektion mit Hilfe von Proteomics

Mit Hilfe etablierter proteomischer Methoden sollen im vorliegenden Projekt Serumproteine identifiziert werden, um vor der ETA-Therapie zukünftige *responder* von *non-respondern* unterscheiden zu können.

Der Einsatz von Proteomics in der medizinischen Forschung fokussiert sich auf quantitative Veränderungen von Proteinexpressionsmustern um Schlussfolgerungen für Diagnostik, Therapie, Medikamentenentwicklung und Therapieüberwachung zu ermöglichen (Schrattenholz 2001). Die systematische Analyse des Proteingehalts von Zellen, Geweben und Körperflüssigkeiten steht bei Proteomics im Mittelpunkt. Das Proteinprofil wird als dynamisch und durch zahlreiche intra- und extrazelluläre Stimuli veränderbar beschrieben. Die proteomische Analyse stellt eine vielversprechende und vor allem nicht-invasive, zukunftssträchtige Technik zur Betrachtung der Veränderung des Proteoms dar und kann zur Diagnose- und Prognosestellung sowie für das Therapieüberwachung wertvolle Informationen liefern. Mit der Entdeckung krankheitsspezifischer Proteine erhofft man sich neue Therapieziele im Sinne von Biomarkern für Intervention, Therapieüberwachung und individuelle Interventionsstrategie zu finden. Es wird problematisiert, dass durch weitere Verbesserungen und Standardisierung der Labormethoden ein Einsatz von Proteomics im klinischen Alltag erst noch etabliert werden muss. Derzeit ist es mit Proteomics zwar möglich Unterschiede bei vielen Erkrankungen zwischen „physiologisch“ und „pathologisch“ zu erkennen, die Lücke zur klinischen Anwendbarkeit in der Routinediagnostik sei aber noch zu schließen (Muller et al. 2007).

Coombes und Morris definieren ein klares Ziel für Proteomicsstudien. Es gehe darum mit den verschiedenen Methoden Biomarkerprofile im menschlichen Proteom zu finden und diese Proteine für die Krankheitsüberwachung oder sogar als therapeutisches Ziel nutzbar zu machen (Coombes et al. 2005). Darüber hinaus formuliert die Arbeitsgruppe von Emilio Camafeita für den Einsatz von *gelbasierten* und *gelfreien* proteomischen Forschungsmethoden bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises das Ziel einer besseren Beschreibung des zugrunde liegenden Krankheitsmechanismus und die Detektion von Biomarkern zur Vorhersage des Ansprechens oder Nicht-Ansprechens auf spezifische medikamentöse Behandlungskonzepte (Camafeita et al. 2009). Die Entdeckung eines Biomarkers mit den oben aufgezählten Charakteristika und der Eigenschaft differenzieren zu können welcher RA-Patient auf eine Therapie mit ETA ansprechen und welcher nicht ansprechen wird, wäre ein großer Erfolg für Proteomics in der Rheumatologie. Den Proteomicsansätzen gilt ein hohes Interesse in der Rheumatologie, wobei die Verknüpfung der *gelfreien* und *gelbasierten* proteomischen Methoden favorisiert wird (Meri and Baumann 2001; Lambrecht et al. 2008; Tilleman and Deforce 2008).

### 1.2.3 Proteom

Das Proteom ist das dynamische Proteinexpressionsmuster auf Basis des Genoms. Es wird durch zahlreiche Umweltbedingungen (Zellmilieu, Gewebeeigenschaften, Organismusstruktur) verändert. Der Begriff Proteom bezieht sich immer auf eine Momentaufnahme des Proteinexpressionsmusters einer Zelle oder einer Körperflüssigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt unter genau definierten Bedingungen und schließt alle Proteinisoformen und Proteinmodifikationen mit ein (Tilleman et al. 2005 a). Die umfassendere Definition des Begriffes Proteom berücksichtigt



besonders die Abhängigkeit des Proteinprofils von Umweltbedingungen und postuliert, dass das alte Paradigma „Ein Gen- ein Protein“ als überholt einzuschätzen ist. Das Genom ist eher als statisches Gebilde zu beschreiben, während das Proteom dynamische Eigenschaften hat (Muller et al. 2007). Ein einfaches Beispiel, um die Bedeutung des Wortes Proteom auf den Punkt zu bringen, ist die Metamorphose der Raupe zum Falter (Abbildung 10).



Abbildung 10: Metamorphose von der Raupe zum Falter. Beide haben ein identisches Genom, während die Expression der Proteine (Proteom) völlig verschieden ist. Bildquelle: <http://www.proteincenter.rub.de/start.htm> am 02.04.2010

Das Genom und die codierende Sequenz sind lediglich die verhältnismäßig überschaubare Basis aller möglicher verschiedenartiger Proteome. Das Proteom unterliegt durch die posttranslationalen Modifizierungen (PTM) wie Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Hydroxylierung, Gammacarboxylierung, Citrullinierung uvm. einer großen Variabilität. Es entstehen bis zu 10 Mio. verschiedene Proteine (Meri and Baumann 2001; Schrattenholz 2001). Abbildung 11 zeigt schematisch die Vielfältigkeit des Proteoms.

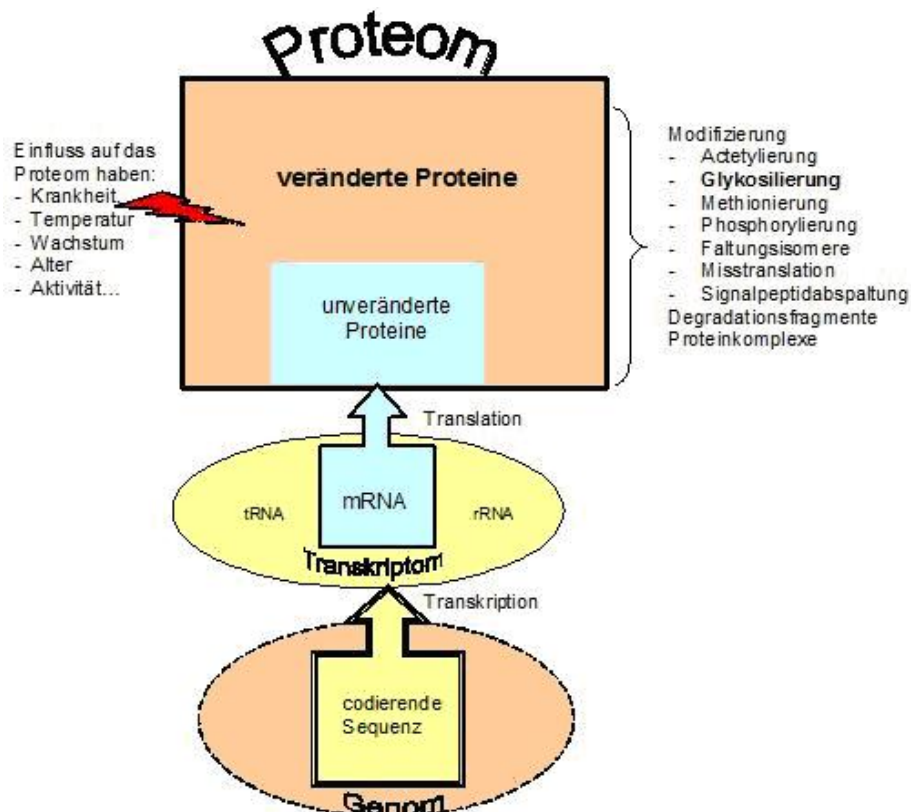


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Dimensionen von Genom und Proteom. Das Proteom beschreibt die Gesamtheit aller Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter bestimmte Bedingungen. Proteomics ist die Analyse des Proteoms, welches auf Basis des Genoms ausgeprägt ist (Wasinger et al. 1995). Die aktuelle Definition von Proteomics ist umfassender (1.2.3). Aus den ungefähr 22.000 „statischen“ Genen, die durch Art und Abfolge von Nukleotiden definiert sind, können in Abhängigkeit multipler Umweltparameter viele Proteine entstehen. Das Proteom entsteht durch das An- oder Abschalten von Genen, durch Variabilität in der Translation, durch alternatives *splicing* uvm. Auf Proteomebene können zusätzlich durch > 300 verschiedene PTM bis zu 500.000 mögliche Proteincharakteristika (de Hoog and Mann 2004).

### 1.2.3.1 Posttranslationale Modifikationen

Oligosaccharidketten eignen sich zur Kodierung biologischer Informationen, denn durch das Hinzufügen einer Zuckerstruktur an ein Protein werden Proteineigenschaften und Funktionen wie Faltung, Sekretionsvorgänge, Serumhalbwertszeiten, Ligand- und Rezeptorinteraktionen, Zell-Matrix-Wechselwirkungen, Proteinlokalisierung und Signaltransduktion verändert (Gornik et al. 2006). Die Proteinmodifikationen sind nicht im Genom kodiert, sondern entstehen während bzw. nach der Proteinbiosynthese. Es sind chemische Modifikationen, bei denen Zuckerstrukturen durch kovalente Proteinbindungen addiert werden. Auch die Umwandlung einer Aminosäure in eine Zweite ist eine PTM: so etwa die Umwandlung von einer proteinogenen Aminosäure (Asparagin) in eine nicht-proteinogene (Citrullin) (Meri and Baumann 2001). An der Zelloberfläche dienen Zuckermoleküle als Identifizierungsstrukturen. Sie markieren Zellen als „selbst“ oder „fremd“ und machen es dem Immunsystem möglich, potentiell bedrohliche Strukturen (z.B. Bakterienlektine) zu erkennen und anzugreifen (Gornik et al. 2006).

Die Analyse von PTM enthüllt wichtige Proteineigenschaften, wie z.B. eine erhöhte Antigenität, die zur Entwicklung von Autoimmunreaktionen führen können. Die physiologischerweise bestehende Toleranz gegenüber „selbst-Protein“ kann durch PTMs gebrochen werden und für Erkrankungen prädisponieren (Meri and Baumann 2001).

Zuckerstrukturen sind auch aus therapeutischer Sicht interessant, denn z.B. durch das Addieren von Zuckerstrukturen (syn. glykosylieren) an rekombinantes Erythropoetin (EPO) verlängert sich seine Plasmahalbwertszeit, so dass es an der renalen Ausscheidung gehindert wird und in glykosylierter Form biologisch aktiver ist (Gornik et al. 2006).

Ein Beispiel für den Effekt einer dynamischen PTM ist die Methylierung oder Acetylierung von Histonprotein, was entscheidet, ob genetisches Material in der transkriptionell aktiven oder inaktiven Form vorliegt. Durch eine Glykosylierung kann z.B. auch die Funktion von Zytokinen und anderer extrazellulärer Signalmoleküle beeinflusst werden (Meri and Baumann 2001).

Die Glykosylierung ist die häufigste PTM und gilt als regulatorisch, weil durch sie die Faltung, die Halbwertszeit, die Zell-zu-Zell Interaktionen und die Antigenität von Proteinen beeinflusst wird (Hamby and Hirst 2008). Oligosaccharide werden enzymatisch kovalent an Stickstoff (N)-Atome in Proteinseitenketten gebunden, so dass co-translational mehr als 120 Varianten von Glykanketten entstehen (Seo and Lee 2004). Glykanketten sind heterogen und komplex verzweigt und enthalten als Oligosaccharide N-Acetylglukosamin, Galaktose und Sialsäure. Schon eine kleine Veränderung der Glykoproteinstrukturen (Verlust von Sialsäure oder Galaktose) beeinflusst die Proteinfunktion. Viele Krankheiten sind mit Veränderungen der Glykanstruktur assoziiert (Gornik and Lauc 2008; Hamby and Hirst 2008).

Ändert sich die Glykoproteinstruktur, verändert sich auch die Ladung eines Proteins und damit seine Position im 2D-Gel. Sind viele Glykanketten vorhanden (starke Glykosylierung bedeutet viel Sialsäure), kommt das Protein in der Gelelektrophorese in der Nähe der Anode im sauren

Bereich zu liegen, da es viele negative Ladungen trägt. Weniger stark glykosylierte Proteine wandern im elektrischen Feld eher in Richtung Kathode, da sie weniger negativ geladen sind als stark glykosylierte Proteine.

Zusammenfassend liefert also die Proteomanalyse, im Gegensatz zur DNA/RNA Analyse, auch Informationen über Proteinvariabilitäten und bietet somit ein erweitertes Betrachtungs- und Interpretationsspektrum bei der Erforschung von Erkrankungen.

Methodisch gibt es mehrere Ansätze zur Detektion von Biomarkern. Zentraler Bestandteil der Analysen ist die massenspektrometrische Identifikation von Proteinen (Muller et al. 2007). Im Folgenden werden gelfreie und gelbasierte Methoden mit ihren Vor- und Nachteilen dargestellt.

### 1.2.4 Überblick über Proteomics-Methoden

In der Literatur werden hauptsächlich zwei methodische Untersuchungsansätze zur Analyse des Proteoms thematisiert: die gelfreie und die gelbasierte Proteomforschung (Abbildung 12).

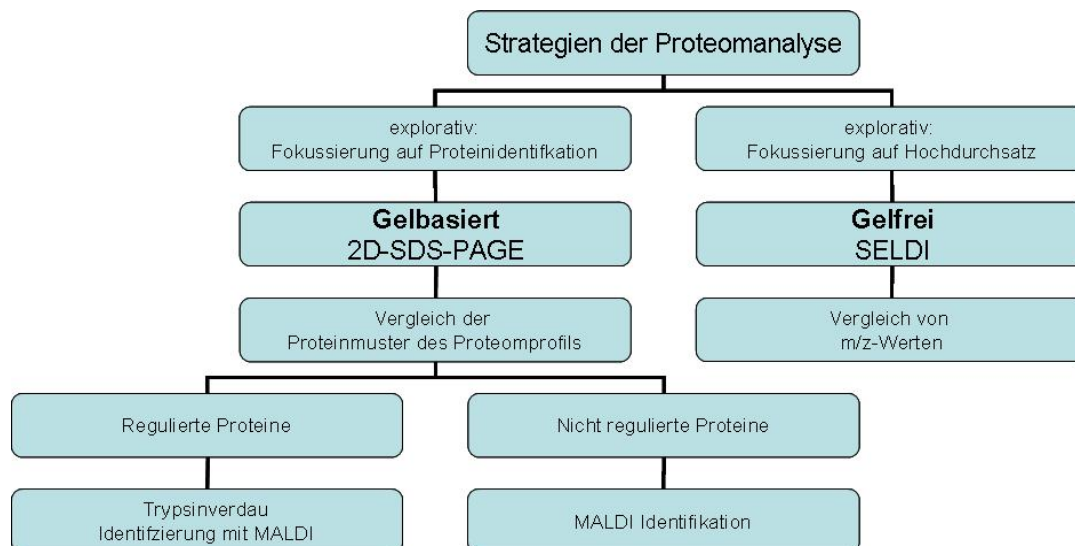


Abbildung 12: Mögliche methodische Vorgehensweisen bei der Proteomanalyse. Bei der Biomarkersuche kann Serum mit gelfreien oder gelbasierten Methoden untersucht werden. Die Erfolge gelbasierter und gelfreier Ansätze wurden in der Literatur miteinander verglichen. Es wird hervorgehoben, dass beide methodischen Ansätze zu verfolgen sind, um ein gutes Ergebnis bei proteomischen Analysen zu erreichen (Tilleman et al. 2005 a).

#### 1.2.4.1 Gelbasierte Biomarkersuche

Die klassische Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE) mit anschließendem enzymatischen Verdau der Proteine und Identifizierung mittels *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF-MS) wird erfolgreich zur Proteomanalyse eingesetzt.

Die physikalisch-technische Grundlage des gelbasierten Ansatzes und der Arbeit mit 2D-Gelen beinhaltet die Trennung der Proteine nach ihrer charakteristischen Ladung (pI-Wert) und ihrer molekularen Masse ( $M_r$ ), sowie ihre Charakterisierung und Identifikation (Muller et al. 2007).

Die klassische Variante der proteomischen Methoden ist die 2D-Gel-Elektrophorese. Sie wird als anspruchsvoll beschrieben, hat aber wichtige Vorteile (Zimny-Arndt et al. 2009). Ein grundlegender Vorteil ist, dass mehr als 10.000 Proteinspots in einem Gel aufgetrennt werden können.

2D-Gele haben also eine hohe Auflösungskraft, denn die Proteine liegen in den Formen vor, die sie gerade in der Zelle oder Flüssigkeit hatten.

Die 2D-Geltechnik bringt aber technisch verursachte Laufunterschiede von Proteinen bei Einzelgelen mit sich. Laufunterschiede in 2D-Gelen, bei denen jeweils nur eine Probe aufgetrennt wird, führen dazu, dass die Proteinspots nur wenig vergleichbar sind und eine Quantifizierung von Proteinregulationen nur mit geringer Signifikanz und hoher Standardabweichung möglich ist. In ein und demselben DIGE-Gel hingegen ist es möglich, zwei Proben gleichzeitig auf Proteinregulationen zu untersuchen. Es ist eine gute direkte Quantifizierung der Proteinexpression und eine gute Ergebnisreproduzierbarkeit möglich. Proteine, die einen hohen Anteil modifizierter Proteinseitenketten haben, unterscheiden sich in ihren Ladungseigenschaften. Das bedeutet, dass PTM zu einem komplexen Proteinmuster im 2D-Gel führen (Timms and Cramer 2008).

Die Stärke der gelbasierten Proteomics ist die exakte Visualisierung von Proteinen und Proteinformen, die sich nur gering in ihrer Ladung unterscheiden. Seit die besondere Rolle und Bedeutung von PTM klar geworden ist, sind verschiedene Visualisierungsmöglichkeiten (Gelfärbungsmethoden) für spezifische Phosphorylierungen oder Glykosylierung an Proteinen in 2D-Gelen entwickelt worden (Tilleman et al. 2005 a). Der nächste klare Vorteil der gelbasierten Variante ist, dass Proteine mit hoher Sensitivität auch namentlich identifiziert werden können (Zimny-Arndt et al. 2009).

Die 2D-Gele haben neben den genannten Vorteilen einen großen Nachteil, der daran zweifeln lässt, ob die Methode routinemäßig in Laboren zur Diagnostik genutzt werden kann. So wird problematisiert, dass eine Identifikation von Proteinen mit 2D-Gelen methodisch zwar gut möglich, jedoch wenig standardisiert und personal- und zeitintensiv ist (Muller et al. 2007).

Allen Positionen in der Literatur gemeinsam ist das Argument, dass bei dem zeitlichen Aufwand für die 2D-Gelerstellung zu wenig Proben analysiert werden können um Einzug in die klinische Routinediagnostik zu halten (Tilleman et al. 2005 a).

Aus methodischer Sicht lässt sich hinzufügen, dass die Auftrennung des humanen Serums mittels 2D-Gelen aufwendiges Unterfangen mit mehreren Arbeitsschritten ist. Das Blut übernimmt neben der Versorgung der Organe mit Sauerstoff auch den Transport von Nährstoffen und enthält daher Lipide, Salze und freie Aminosäuren. Die 2D-Gel-Methode birgt die Gefahr, dass neben den zu untersuchenden Proteinen viele andere geladene und ungeladene Moleküle die elektrophoretische Auftrennung stören.

#### **1.2.4.2 Gelfreie Biomarkersuche**

Unter den gelfreien Systemen der Biomarkerforschung ist *surface-enhanced laser desorption ionization* (SELDI) ebenfalls eine wichtige Technik, die in den letzten Jahren ihre Anwendbarkeit bei Studien mit hohen Patientenzahlen unter Beweis gestellt hat. Es handelt sich um eine

Kombination von MALDI-TOF und der Anwendung chromatographischer Oberflächen auf Trägern (*chips*), die durch verschiedene Liganden funktionalisiert wurden (Hutchens and Tai-Tung 1993). Gebräuchliche Oberflächen sind Anionen- und Kationenaustauscher, hydrophobe Liganden oder spezifische Antikörper, die auf die Oberfläche gekoppelt sind. Komplexe Proteingemische wie Serum können mit SELDI in hoher Probenanzahl sehr schnell, genau und zuverlässig reproduzierbar analysiert werden. Dadurch, dass die Proteine aufgrund ihrer Struktur an die Chipoberfläche gebunden wurden, lassen sich mit SELDI die chemisch-funktionellen Eigenschaften der Proteine zeigen. Es können bekannte und unbekannte Proteine visualisiert werden, die für die Erkrankung relevant sind (Hutchens and Tai-Tung 1993).

Diese gelfreie MS-Technologie ermöglicht die Biomarkerdetektion direkt aus der einen halben Mikroliter großen Probe heraus, ohne vorherige Bearbeitung der Proben (Srinivas et al. 2001). Dadurch, dass die Probenpräzipitation und Konzentration in der Vorbereitung entfällt, kann mit SELDI mit relativ geringem Aufwand eine hohe Analysezahl erreicht werden. SELDI hat deshalb großes Potential als automatisierte technische Analyseverfahren Einzug in die klinische Diagnostik zu halten. Die SELDI-Technik hat aber den Nachteil, dass sie sehr teuer ist. Die SELDI-Analyse braucht zudem eine sehr hohe Probenanzahl, um statistisch signifikante Ergebnisse zu liefern. Ein weiterer Nachteil liegt darin, dass die in Biomarkerstudien mit SELDI ermittelten  $m/z$ -Proteine nur als  $m/z$ -Werte angegeben werden, was die Einsetzbarkeit in der Routinediagnostik einschränkt. Es bedarf aufwendiger Arbeitsschritte zur Proteinidentifizierung (Muller et al. 2007). Beispiele für Biomarkerdetektion mit SELDI werden in Abschnitt 4.1.1 dargestellt.

### 1.2.5 Schlussfolgerungen für Methodenwahl

Trotz der oben genannten Vorzüge der gelfreien Proteomics gibt es Kritik gegenüber den aktuellen SELDI-Studien, da die Kohorten bisher sehr klein und damit nicht zur Verallgemeinerung geeignet sind. Forscher suchen mit proteomischen Methoden nach Unterscheidungsmerkmalen zwischen RA-Patienten und Gesunden und gehen davon aus, dass die Identifikation eines einzelnen Markers unrealistisch ist.

Die Detektion eines Biomarker-Sets gilt als wahrscheinlicher. Das Set sollte zur Patientenklassifizierung und auch zur Überwachung des Therapieerfolges nutzbar sein (Lambrecht et al. 2008). Die Entwicklung von Proteomics zeigt den Trend, dass die proteomischen Techniken in Kombination zu benutzen sind, um möglichst viel über biologische Systeme zu erfahren. Die These ist, dass 2D-Gele und SELDI-Techniken komplementär zu betrachten sind (Zimny-Arndt et al. 2009). Daher kommen in diesem Projekt beide Verfahren zu Einsatz.

Unter dem Aspekt der kleinen Gruppengröße von 13 Patienten zum Zeitpunkt der SELDI-Analyse bot sich eine Untersuchung im orientierenden Sinne (Pilotstudie) an. Die Ergebnisse müssen an einer größeren Kohorte validiert werden.

Der Fokus der Arbeit liegt auf der Analyse der Seren mit DIGE-Gelen.

### 1.3 Zielsetzung

Das primäre Ziel der vorliegenden Untersuchung „Analyse prognostischer Faktoren für die TNF $\alpha$ -Antagonisten-Therapie bei Rheumatoider Arthritis“ ist es, Änderungen des Serumproteomprofils bei RA-Patienten unter TNF $\alpha$ -Antagonisten-Therapie mit Etanercept zu beobachten, zu analysieren und Biomarker im Serum zu identifizieren.

Mit Hilfe eines prognostischen Proteinmarkers im Serum (möglicherweise in Kombination mit anderen etablierten RA-Markern) soll es zukünftig möglich sein, vor Therapiebeginn Patienten zu bestimmen, die von einer ETA-Therapie profitieren werden. Mit Hilfe dieses Markers könnte ein Patient mit einer Blutentnahme und einer proteomischen Analyse bereits vor Therapiebeginn als *ETA-responder* klassifiziert werden.

Zur Erreichung dieses Ziels werden zwei Wege verfolgt:

Im ersten Teil der Untersuchung wird nach Auftrennung der Seren in zwei Fraktionen (eine Fraktion enthält die 14 häufigsten Serumproteine, die andere Fraktion enthält diese nicht) mittels Immunaffinitätschromatographie in 2D-Gelen, eine qualitative Serumanalytik von zwei Gruppen (fünf *responder* und fünf *non-responder*), durchgeführt.

Die Visualisierung des Proteoms erfolgt mittels 2D-DIGE-Gelen.

Die Regulationsunterschiede zwischen den *respondern* und *non-respondern* auf Proteinexpressionsebene sind durch Anwendung des 2D-Delta Softwaretools analysierbar.

Es erfolgt die Darstellung des Proteoms mit DIGE-Gelen vor der Therapie mit ETA und unter der Therapie (nach 12 und 24 Wochen)

Im zweiten Teil werden zur Ergebnisvalidierung die in den Serumgruppen als vermehrt reguliert identifizierten Proteine mit Western Blot (1D und 2D) untersucht.

Ergänzend zu den Western Blots werden selektive Spezialanfärbungen von auffälligen Proteinmodifikationen (Glykosylierungen) in den Seren der *responder* und *non-responder* durchgeführt.

Im dritten Untersuchungsteil wird im Sinne einer Pilotstudie nicht-depletiertes Serum mit der gelfreien proteomischen Analysemethode SELDI auf das Vorliegen eines geeigneten Biomarkers untersucht.

Im Idealfall lassen sich in allen Ansätzen (gleichartige) Proteine identifizieren, die es vor ETA-Therapiebeginn ermöglichen *responder* von *non-respondern* zu unterscheiden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden zur Sicherstellung von Sterilität und Reinheit als Einwegartikel verwendet. Falls nicht anders vorgegeben, wurden alle anderen Geräte bei einem Wasserdampfdruck von zwei Bar bei 121 °C für eine Stunde im Autoklaven sterilisiert.

#### 2.1.1 Serum

In diesem Projekt wurden Serumproben analysiert. Das menschliche Serum ist eine Fraktion des Blutes, denn dem Serum fehlen die korpuskulären Anteile und gerinnungsaktive Substanzen wie Prothrombin oder Fibrinogen. Albumin hat mit 67 % den größten relativen Anteil am Serum, gefolgt von den Fraktionen der  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - Globuline. Serum hat eine Osmolarität von 281-297 mosmol/l und besteht zu 91 % aus Wasser, zu 7 % aus Proteinen und aus Elektrolyten (2 %), Hormonen (1 %) und Nährstoffen (Löffler et al. 2007).

Serum stellt ein schwierig zu analysierendes Proteingemisch dar. Serum enthält eine sehr große Anzahl von Proteinen, die sich auch stark in ihren Konzentrationen unterscheiden. Die reichlich vorhandenen (*high abundant*) Proteine Albumin, IgG und IgA, Transferrin,  $\alpha_1$ -Antitrypsin und Haptoglobin machen fast 75 % der im Serum befindlichen Proteine aus. Die Konzentration allein von Albumin liegt bei etwa 35–50 mg/ml oder  $35\text{--}50 \times 10^9$  pg/ml.

Neben den *high abundant* Proteinen enthält das Serum auch Proteine, die sich nur in Spuren nachweisen lassen (*low abundant*). Im Vergleich zu Albumin ist das Zytokin IL-6 im Serum im Bereich von 0–5 pg/ml messbar und steigt sensitiv bei Entzündungen an. Dieser Vergleich zeigt, dass sich Proteine im Serum in ihrer Konzentration um den Faktor  $10^{10}$  unterscheiden können (Anderson and Anderson 2002). Da bei Raumtemperatur ein Fortschreiten enzymatischer Abbauvorgänge zu befürchten ist, wurden durch Aliquotierung Auftau- bzw. Einfrierzyklen reduziert. Nach der Blutentnahme wurden die Serumproben aliquotiert, d.h. auf 100  $\mu$ l Einheiten aufgeteilt, um das Serum in kleinen Mengen bereit zu halten. Von jedem Patientenserum wurden 500  $\mu$ l Serum genutzt. Zur Erstellung der Gruppen „*responder*“ und „*non-responder*“ werden je 5 Seren à 500  $\mu$ l vermengt. Die Gesamtmenge von 2,5 ml Serum wurde auf 100  $\mu$ l Aliquots aufgeteilt und zusätzlich von jedem Patientenserum ein Aliquot (100  $\mu$ l) für die SELDI-Analyse eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei - 80 °C.

#### 2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Die Chemikalien wurden von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Roche AG (Mannheim), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim) und Bio-Rad GmbH (München) bezogen. MEK Ethanol stammte aus der Apotheke der Universitätsmedizin Göttingen. Reinstwasser (Milli-Q) wurde aus einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore (Billerica, USA) bezogen.

**Proteinbiochemische Lösungen**

Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
BSA-Standard	Sigma 1 mg/ml in Milli-Q
Rehydratationspuffer	8 M Harnstoff, 1 % (w/v) CHAPS, 0,2 % Ampholyte pH 3-10, DTT 15 mM, Bromphenolblau 5 µl
Äquilibrierungspuffer I (DTT)	6 M Urea, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 2 % (w/v) SDS, 20 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) DTT, 0,001 % Bromphenolblau
Äquilibrierungspuffer II (IAA)	6 M Urea, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 2,5 % (w/v) Iodacetamid, 0,001 % Bromphenolblau
Ampholyte-Stammlösung	Bio-Lyte® pH 3-10, Bio-Rad, München Bio-Lyte® pH 5-8, Bio-Rad, München
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	181,71 g/l Tris-HCl
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	60,57 g/l Tris-HCl
Rotiphorese Gel 30 (37,5 :1)	Carl Roth, Karlsruhe
Reinstwasser	Ampuwa®, Wasser für Injektionszwecke
APS-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
5 x Tris-Glycin Elektrophoresepuffer	125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 0,5 % (w/v) SDS
20 x MOPS-Puffer	Bio-Rad, München
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, 186 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
TBS	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4
TBS-T	TBS + 0,02 % Tween-20
ECl-Reagenz Western Lightning® Plus	Perkin Elmer, Waltham
Fixierlösung	40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	Roti®-Blue (5x Konzentrat)
Lysepuffer	9,5 M Urea, 4 % (w/v) CHAPS, 50 mM DTT
Pro-Q 300 Stain Kit	Emerald-Gel
Pro-Q Components A und B	Vorratslösung, Oxidationslösung

**Antikörper**

Name	Host	Hersteller
Anti-Hp antibody	rabbit	Sigma
Katalog-Nr. H8636		
Anti-Apolipoprotein C3	rabbit	Genway
Katalog-Nr. 18-271-81023		
Anti-Apolipoprotein A2	rabbit	Genway
Katalog-Nr. 18-511-245354		
Anti-Vitamin-D-binding-Protein	rabbit	Abcam
Katalog-Nr. ab65636		

**Marker**

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

**Chromatographie**

Buffer A Equil/Load/Wash	1l Agilent 5185-5987
Buffer B Elution	1l Agilent 5185-5988

**Massenspektrometrie**

Procines modifiziertes Trypsin	Promega, Mannheim
Trypsinpuffer	1 mM HCl



Verdaupuffer	10m mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , Ca <sup>2+</sup>
Entfärbelösung	50 % (v/v) ACN in H <sub>2</sub> O
Entwässerung	100 % ACN
Extraktionslösung	60 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA in H <sub>2</sub> O
Matrix	gesättigte 2,5-Dihydroxybenzoesäurelösung Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.1.3 Geräte

Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht	Halb-Mikroküvetten
Photometer	Perkin Elmer, Waltham	Lambda 25
Kühlbare Tischzentrifuge	Sigma, Osterode	Sigma1-15PK, Rotor12132H
Ultrafiltrationskonzentratoren	Sartorius Stedim, Göttingen	Vivaspin 15 5000 MWCO Vivaspin 4 5000 MWCO
Isoelektrisches Fokussiersystem	Bio-Rad, München	Protean IEF Cell
IPG-Streifen	Bio-Rad, München	Ready Strip™ IPG-Streifen 11cm, pH4-7 und pH3-10NL
<b>Elektrophoresesystem</b>		
20 cm x 20 cm	Bio-Rad, München	Protean II®
13 cm x 8 cm	Bio-Rad, München	Criterion®
8 cm x 6 cm	Bio-Rad, München	Mini-Protean®
Fertiggele Criterion®	Bio-Rad, München	12 % Bis-Tris IPG 10 % Bis-Tris IPG 12 % Bis-Tris 18-well
<b>Immunoblotsystem</b>		
Immunblotmembran	Bio-Rad, München	Mini Trans Blot Cell
Filterpapier	GE Healthcare	Immobilon-P <sup>5Q</sup> Membran
Temperiereinheit	Bio-Rad, München	Whatman, Standard
Spannungsquellen	Uniequip, Meadowpine	Unijet 2
	Bio-Rad, München	Power-Pack 1000
	Gibco, Karlsruhe	Power Supply PS3002
	LBB, Uppsala	2301 Macrodrive 1
	Pharmacia, Uppsala	ECPS 2000/300
Gelfärbeschalen	Nalgene, Rochester	22,5 x 22,5 cm
	Nalgene, Rochester	12,5 x 12,5 cm
	Roth, Karlsruhe	14,3 x 10 cm
Rotationsschüttler	GFL, Burgwedel	GFL 3005
Ungekühlte Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg	Centrifuge 5415D Rotor 14198
Kühlbare Tischzentrifuge	Sigma, Osterode	Sigma 1-15PK Rotor 12132-H
Geldokumentationssystem	Fujifilm, Düsseldorf	Fuji FLA 5100
pH-Meter	Sartorius, Göttingen	Basic pH Meter pB-11
<b>Chromatographie</b>		
HPLC-System	Shimadzu, Duisburg	LC-10 AS
Shimadzu LC-10-Serie		SIL-10 A FRC-10A CTO-10A CBM-10A SPD-MC10A
Depletionssäule	Agilent, Böblingen	Agilent Hu-14, 4,6 x 10 mm
Ultrafiltrationskonzentratoren 4 ml	Agilent, Böblingen	Vivaspin 5 000 MWCO
Ultraschallbad	Bradelin, Berlin	Sonorex Super
<b>Massenspektrometrie</b>		
MALDI-TOF	Applied Biosystems	Voyager-DE STR
Massenflugzeitanalysator		

## 2.1.4 Software

### Gelbearbeitung und Auswertung

Delta 2-D Version 3.4	Decodon AG, Greifswald
Image J	National Institutes of Health
Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH
Adobe Illustrator	Adobe Systems GmbH
Delta 2-D Version 3.4	Decodon AG
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc.
Microsoft Excel	Microsoft Deutschland GmbH

## 2.1.5 Patientenkollektiv

Auf der Grundlage des positiven Ethikvotums (Antragsnummer 14/12/07) wurden in der rheumatologischen Ambulanz der Universitätsmedizin Göttingen seit April 2008 bis zum Beginn der Laborarbeiten im März 2009 RA-Patienten nach der Aufklärung und Einwilligung in Studie „Analyse prognostischer Faktoren für die TNF $\alpha$ -Antagonisten-Therapie bei Rheumatoider Arthritis“ eingeschlossen. Dem Studienplan folgend (Tabelle 3) wurde zunächst eine Anamnese erhoben und die Ein- und Ausschlusskriterien erfasst. Die klinischen Werte (DAS28, Laborkontrollen) wurden vor der Studie in Woche 0, nach Woche 4, 8, 12 und 24 erhoben. Die Serumproben für die Durchführung der Serumproteomanalyse wurden zu Studienbeginn, in Woche 12 und Woche 24 unter ETA-Therapie gesammelt.

Tabelle 3 Studienplan für den Ablauf der Studie

	Visite 1 screening	Visite 2 baseline V0	Visite 3 4. Woche	Visite 4 8. Woche	Visite 5 12. Woche V5	Visite 6 24. Woche V6
Anamnese	X	--	--	--	--	--
Demographie	X	--	--	--	--	--
Untersuchung	X	X	X	X	X	X
Begleitmedikation	X	X	X	X	X	X
Studienaufklärung	X	--	--	--	--	--
Vitalparameter	X	X	X	X	X	X
DAS 28	X	X	X	X	X	X
HAQ Score	X	X	X	X	X	X
Nebenwirkungen	--	--	X	X	X	X
Röntgen Thorax*	X	--	--	--	--	--
Elektrokardiogramm	X	--	--	--	--	--
Schwangerschaftstest	X	--	--	--	--	--
Tuberkulin Test (MM)	X	--	--	--	--	--
Labor **	X	X	X	X	X	X
<b>Serum Proteomics</b>	--	<b>X</b>	--	--	<b>X</b>	<b>X</b>

\* Röntgen Thorax gültig bis zu 6 Monate vor Studienbeginn

\*\* großes Blutbild, klinische Chemie (CK, ALT, AST,  $\gamma$ Gt, Glukose, Gesamtprotein, Kalium, Natrium, Calcium, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, CRP), BSG, Immunologisches Labor (RF, anti-CCP-AK)

Für die Teilnahme an der Studie mussten die Patienten folgende Einschlusskriterien erfüllen: Das Mindestalter für eine Teilnahme an der Studie betrug 18 Jahre und bei Frauen unter 45 Jahren musste ein negativer Schwangerschaftstest vorliegen, bzw. während der Studienteilnahme eine adäquate Empfängnisverhütung gewährleistet werden. Die definitive Diagnose

der RA musste seit mehr als 6 Monaten laut ACR-Kriterien bestehen und einer funktionellen Klasse 1-3 zuzuordnen sein (Hochberg et al. 1992). Der Patient musste mehr als drei druckdolente und geschwollene Gelenke bei der körperlichen Untersuchung angeben und die globale Einschätzung der Krankheitsaktivität anhand der visuellen Analogskala musste kleiner als 40 mm sein. Wichtigste zu nennende Voraussetzung ist, dass der Proband auf die Behandlung mit mindestens 10 mg/Woche MTX und ein weiteres Basistherapeutikum als konventionelle Basistherapie nicht abgesprochen hat. Die einzuhaltende Auswaschphase für konventionelle Basistherapeutika (Gold, Sulfasalazin, Azathioprin, Cyclosporin A, Cyclophosphamid) betrug vier Wochen und drei Monate bei einer Vorbehandlung mit Leflunomid sowie mit anderen Biologika (Infliximab, Adalimumab, Abatacept).

Die Kortikoiddosis musste innerhalb der letzten vier Wochen vor Studieneinschluss mit max. 10 mg/Tag Prednisolon-Äquivalent stabil sein.

Ausschlusskriterien waren schwere systemische Infektionen (aktive oder Z.n. Tuberkulose), hohe Infektneigung (Diabetes mellitus), schwere kardiovaskuläre Erkrankungen (Myokardinfarkt innerhalb der letzten sechs Monate, Herzinsuffizienz ab NYHA °III, Kardiomyopathie, mechanischer Herzklappenersatz), schwere Lungenfunktionsstörungen ( $FEV_1/FVC < 40 \%$ ) sowie eine COPD mit  $pCO_2 > 50$  mmHg. Des Weiteren konnten Patienten mit schweren Lebererkrankungen, chronischer Niereninsuffizienz (Kreatinin  $> 130 \%$  der Norm), mit schweren hämatologischen Erkrankungen (HB  $< 9$  g/dl, Hkt  $< 27 \%$ ) oder einer Leukämie sowie bei neurologischen Erkrankungen (Multiple Sklerose, Optikusneuritis, Myelitis) nicht in die Studie eingeschlossen werden. Bei Vorliegen von Malignomen innerhalb der letzten fünf Jahre vor Studieneinschluss war eine Teilnahme nicht möglich, wobei für nicht-metastasierende Hauttumoren eine Grenze von 12 Monaten galt. Große operative Eingriffe innerhalb von sechs Monaten vor der Studie, Antikoagulation, vorbestehende Allergien gegen ETA oder Enbrel®-Inhaltsstoffe, Drogen- und Alkoholabusus und Schwangerschaft sowie Stillzeit schlossen eine Teilnahme an der Studie aus.

Des Weiteren führten Erkrankungen wie progressive systemische Sklerose, Psoriasisarthritis, Ankylosierende Spondylitis, Dermatomyositis, Systemischer Lupus Erythematodes, Rheumatisches Fieber, Gichtarthritis, akute infektiöse Arthritis, Reiter-Syndrom, Polyneuropathie, Sarkoidose, Multiples Myelom, Leukämie, Lymphome, Agammaglobulinämie oder der funktionellen Klasse IV nach Hochberg zum Ausschluss aus der Studie. Ebenfalls stellten die medikamentösen Behandlungen mit anderen Basistherapeutika als MTX, eine Therapie mit Leflunomid oder anderen Biologika innerhalb der letzten drei Monate vor dem Studieneinschluss oder eine Therapie innerhalb des letzten Monats mit Azathioprin, Hydroxychloroquin oder Sulfasalazin Ausschlusskriterien dar.

Die Dosierung und Applikation von 50 mg ETA erfolgte entsprechend den Herstellerangaben einmal wöchentlich subkutan.

Die Begleittherapien des Patienten werden bezüglich Indikation, Tagesdosis und Applikationsart dokumentiert. Die Gabe von Analgetika, Kortikoiden und MTX war erlaubt, wenn NSAR und COX-2-Inhibitoren in ihrer Dosis bis zu zwei Wochen vor Studienbeginn stabil waren. Vor jeder Visite war eine zwölfstündige Pause der analgetischen Medikation einzuhalten. Eine Dosissteigerung führte zur Einstufung als *non-responder*.

Bei den oralen Kortikosteroiden war eine Dosis von 10 mg/Tag oder 0,2 mg/kg Körpergewicht pro Tag Prednison-Äquivalent zulässig. Auch diese Dosis musste bis zu vier Wochen vor Studieneinschluss und im Studienverlauf stabil sein.

Steroidstoßtherapien waren nicht zulässig und führten ebenso wie die Dosissteigerung zur Klassifikation als *non-responder*. Lokale intraartikuläre Injektionen waren erlaubt, wobei das betroffene Gelenk bei allen folgenden Visiten als schmerzhaft und geschwollen zu klassifizieren war. Alle Daten wurden in anonymisierter Form dokumentiert.

Nachdem die Ein- und Ausschlusskriterien geprüft und der Patient ausführlich über den Inhalt der Studie aufgeklärt wurde (Patienteninformationsbogen), musste er eine Einwilligung zur Teilnahme (Einverständniserklärung) an der Studie unterzeichnen.

Zum Zeitpunkt der Untersuchungsdurchführung im März 2009 waren insgesamt 18 Patienten in die Studien eingeschlossen. Zwei Patienten schieden aus der Studie aus und sechs hatten ihre Therapie noch nicht beendet.

Mit zehn Patienten, die sich mindestens in Woche 24 der Therapie befanden, fand die Durchführung der 2D-Gel-Analysen statt. Für die DIGE-Gele waren die zehn Seren in zwei Gruppen aufgeteilt worden. Fünf Patienten waren der *responder* Gruppe und fünf der *non-responder* Gruppe zugeordnet worden, im Folgenden nur: *responder* und *non-responder*.

Im Western-Blot-Experiment wurden acht depletierte Einzelseren von *respondern* zum Zeitpunkt V0 und V6 und acht Seren von *non-respondern* zum Zeitpunkt V0 untersucht. Außerdem wurden die vier Gruppen-Seren: *responder V0*, *non-responder V0*, *responder V6*, *non-responder V6* (siehe 3.2.3) analysiert.

Im der SELDI-Analyse wurden zu den Zeitpunkten V0, V5 und V6 sieben *non-responder* und acht *responder* untersucht. Die Patientenrekrutierung soll solange fortgesetzt werden, bis ca. 100 Patienten in die monozentrische, prospektive Studie eingeschlossen sind.

### **2.1.6 Methodische Einflüsse auf die Analysen**

Die Analysen wurden im Vorfeld durch die Patientenauswahl, Probenentnahme und die anschließenden Bearbeitungsschritte beeinflusst. Da einige Patienten die Studie nicht beendeten oder zum Analysezeitpunkt noch nicht bei V6 angekommen waren, war die Patientenauswahl eingeschränkt und lag bei zehn bzw. 16 geeigneten Probanden.

---

Die HUPO (*Human Proteome Organisation*) verfasste eine Liste von präanalytischen Variablen, um proteomische Betrachtung von Serum oder Plasma zu standardisieren. Generell sollten die Serum- und Plasmaproben aliquotiert werden und die Anzahl der Auf- und Abtauzyklen möglichst gering gehalten werden. Protaseinhibitoren zur Verhinderung des enzymatischen Abbaus können in Betracht gezogen werden, doch diese interferieren mit der Massenspektrometrie (Rai et al. 2005). Es wurden in dieser Arbeit keine Inhibitoren eingesetzt, so dass trotz Minimierung der Auf- und Abtauzyklen die Ergebnisse u. a. durch unterschiedliche Standzeiten bei der Abnahme des Serums beeinflusst worden sein könnten.

### 2.1.7 Chromatographie

Wie bereits im Abschnitt 2.1 dargestellt, ist das menschliche Serum ein komplexes Biogemisch. Da die reichlich vorhandenen Proteine das Serum quantitativ dominieren, wurde der Einsatz eines allgemeinen bioanalytischen Verfahrens zur Trennung von komplexen Substanzgemischen - die Chromatographie - nötig (Abbildung 13).

Das in dieser Arbeit angewendete chromatographische Verfahren *Hu-14* von Agilent Technologies® versprach 14 der häufigsten Proteine abzureichern und den Analysebereich im 2D-Gel zu verbessern (Depletion). Der maskierende Effekt der *high abundant* Proteine wurde durch die Depletion minimiert (Mrozinski et al. 2008).

Mit Hilfe der Immunoaffinitätschromatographie im HPLC-System (*High Performance Liquid Chromatography*) wurde es möglich, den Analysefokus auf die im Serum wenig konzentrierten Proteine legen zu können.

Wichtigstes Chromatographieprinzip war die Interaktion der zu trennenden „mobilen Phase“ mit einer definierten und funktionalisierten „stationären Phase“ auf einem beliebigen Trägermaterial. Zu unterscheiden waren Flüssigkeits- von der Gaschromatographie, die Biogemische in ihre Bestandteile auftrennen konnten.

Auf der Trennsäule trat die zu trennende Mischung (Analyt) und das zugesetzte Laufmittel (Puffer A als mobile Phase) in Wechselwirkung mit einer spezifisch definierten stationären Phase. Die stationäre Phase war eine Trennsäule mit Trägermaterial (z.B. Cellulose). Auf der Oberfläche des Trägermaterials befanden sich kovalent gebundene funktionelle Gruppen (Lottspeich and Zobras 1998). In diesem Fall waren die funktionellen Gruppen auf der Trennsäule polyklonale Antikörper gegen die 14 *high abundant* Serumproteine (Mrozinski et al. 2008). Beim Durchlaufen der mobilen Phase durch bzw. über die Trennsäule herrschte ein hoher Druck. Durch molekulare Interaktion zwischen flüssiger und stationärer Phase kam es zur Bindung der Zielmoleküle über die Antikörper an die Säule, so dass selektiv diese Serumoleküle (namentlich genannt in Abbildung 13) vorerst zurückgehalten wurden. Die Durchlauffraktion (*low abundant* Proteine) passierte die Säule ungehindert, so dass die Fraktionen voneinander getrennt wurden (Lottspeich and Zobras 1998).

Das Trennverfahren dauerte ungefähr 80 min.

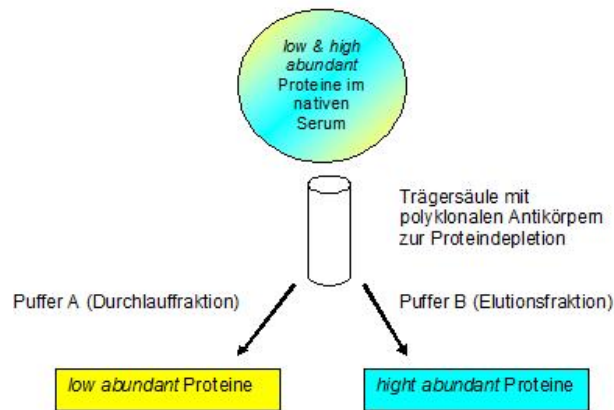


Abbildung 13: Depletion von *high abundant* Proteinen mittels Affinitätschromatographie. Bei Bindung der *high abundant* Proteinfraction über polyklonalen Antikörper auf einem Trägermaterial wird die Gesamtproteinfraction in zwei Teile getrennt. In der Durchlaufaktion finden sich die Proteine, die im Serum in nur geringen Konzentrationen vorhanden sind. Die Liganden auf der Säule halten zunächst die häufig vorkommenden Proteine zurück und trennen das Serum in die *low*- und *high abundant* Proteinfraction (Lottspeich and Zobras 1998; Mrozinski et al. 2008).

### 2.1.7.1 Charakteristika der Immunoaffinitätsäule

Der Effekt der chromatographischen Depletion von Serum ist schematisch in Abbildung 14 dargestellt und basiert auf den Grundlagen der Immunoaffinitätschromatographie (Abschnitt 2.1.7). Im Fall der verwendeten Trennsäule (Human-14® 4,6 x 100 mm) von Agilent Technologies wurden mittels hoch affinen polyklonalen Antikörpern die 14 *high abundant* Proteine aus dem Serum abgetrennt, so dass eine gute Darstellung und Analyse des Proteoms der *low abundant* Proteinfraction möglich war.

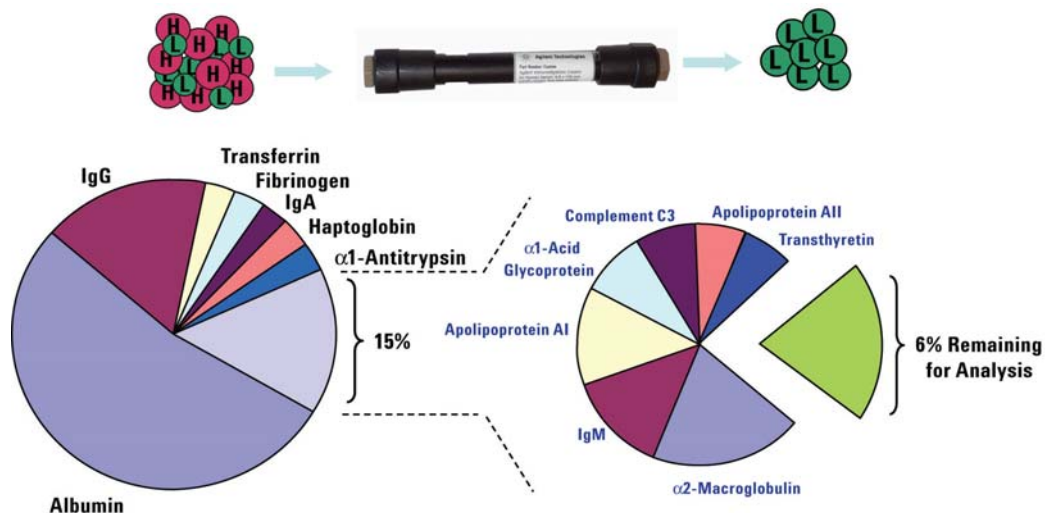


Abbildung 14: Human-14-Immunoaffinitätsäule zur Proteindepletion. Mit Hilfe der Chromatographie wird die Anzahl an Serumproteinen reduziert. Es entstehen die Proteinfraction der *low*- und *high abundant* Proteine. Die *low abundant* Proteine (6 % der Gesamtserumproteine, hier grün) befanden sich im Durchlauf, weil sie nicht an die Säule gebunden haben. Sie sind nach der Depletion zur weiteren Analyse nutzbar (Mrozinski et al. 2009, S. 2).

Die Säule hatte eine Kapazität für 200 Läufe und konnte effektiv insgesamt 8000 µl Serum depletieren. Zur Entfernung möglicher Präzipitate wurde das humane Serum zuvor im Verhältnis 1:5 mit dem Äquilibrierpuffer verdünnt und durch einen 0,22 µm Filter gefiltert. Das Injektionsvolumen des verdünnten und gefilterten Serums betrug 200 µl.

Nach Spülung des Systems mit destilliertem Wasser, Puffer A und B, begann das Sammeln der *low abundant* Proteinfraktion (Durchlaufraktion). In dieser Zeit waren die *high abundant* Proteine an die Säule gebunden. Nach 20 min erfolgte durch Puffer B das Auffangen der Elutionsfraktion. D.h. die *high abundant* Proteine, die via Antikörper an die Säule gebunden hatten, wurden von der Säule gelöst. Nach Neutralisation und Reäquilibration der Säule mit Puffer A erfolgte anschließend der zweite Lauf um insgesamt 400 µl Serum über die Säule zu depletieren. Die Proben wurden dann weiterverarbeitet.

Der Vergleich der 2D-Gele mit Nativserum und mit der *low-* und *high abundant* Fraktion zeigte, dass sich die Depletion stark auf das Proteinmuster im 2D-Gel auswirkte (3.1.1).

## **2.1.8 Proteinbiochemische Methoden zur Vorbereitung der 2D-Gelelektrophorese**

Aufgrund hydrophober Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen wurden Proteine in ihrer natürlichen Tertiär- und Quartärstruktur gehalten. Durch Zugabe von chaotropen Substanzen (griech. "chaos" = Unordnung und "tropos") wurden diese hydrophoben Kräfte (durch welche z.B. Speiseöl „auf“ dem Wasser schwimmt) aufgehoben. Die Löslichkeit eines Proteins in wässriger Lösung hing von der Zusammensetzung und Charakteristik der Aminosäureseitenketten des jeweiligen Proteins ab. Lagen vorrangig hydrophobe, unpolare Seitenketten vor, war die Löslichkeit in wässrigen Lösungen gering.

Bei polaren, hydrophilen Residuen war die Löslichkeit hingegen gut. Um eine gute Löslichkeit von Proteinen in wässrigen Lösungen zu erreichen, musste eine ausreichende Solubilisierung der Proteine erfolgen (Schrattenholz 2001).

Bei der Zugabe eines kurzkettigen, organischen Lösungsmittels (Methanol, Ethanol, Aceton, u.a.) wurde die Hydratationskraft der wässrigen Lösung herabgesetzt und die Proteine konnten aufgrund ihrer freigelegten Seitenketten über Van-der-Waals- oder elektrostatische Kräfte miteinander interagieren und aggregieren. Diese Aggregate sedimentierten bei Zentrifugation zu einem Proteingemisch (Pellet), so dass die Proteine durch Dekantieren des Überstands von der wässrigen Lösung getrennt werden konnten.

### **2.1.8.1 Acetonfällung**

Bei der Acetonfällung wurde die zu fällende Probe im Verhältnis von 1:3 mit eisgekühltem Aceton vermischt und bei -20 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Proben mit ca. 2 ml Volumen für 45 min mit 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Ausbilden eines Pelletts am Boden des Eppendorfgefäßes wurde der Überstand dekantiert, das Pellet 30 min bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in Lysepuffer gelöst und bis zur späteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 2.1.8.2 Ankonzentrierung und Entsalzung mit Harnstoff

Als Alternative zur Acteonfällung wurde Harnstoff eingesetzt. Nach dem Zugeben von 6 M Harnstoff zur Serumprobe, wurde sie anschließend durch Zentrifugation mit Konzentratoren auf ein Volumen von weniger als 100  $\mu\text{l}$  eingengt. Bei der Konzentratoren durch Vivaspin4® Konzentratoren handelte es sich um eine Ultrafiltration über eine Membran. Durch die Zentrifugalkräfte wurde das Serum durch die Membran gepresst, so dass eine Proteinlösung entstand, die alle Proteine mit einem Molekulargewicht  $< 5000 \text{ Da}$  enthielt. Durch sukzessives Addieren von Harnstoff konnte die Probe entsalzt und konzentriert werden. Die Entsalzung war eine weitere wichtige Voraussetzung für die einwandfreie elektrische Fokussierung der Serumproben, da Salzablagerungen im IPG-Streifen (immobilisierter-pH-Gradient) die Leitfähigkeit und Spannung veränderten und somit die Auftrennung der Proteine störten (siehe S. 49). In dieser Arbeit wurden die *low* und *high abundant* Fraktionen der Serumdeplete unterschiedlicher Volumina mit 5000 g bei 4 °C mit Vivaspin4®-Konzentratoren und 6 molar Harnstoff auf weniger als 100  $\mu\text{l}$  konzentriert. Je nach Probenbeschaffenheit und Proteinkonzentration dauerte die Zentrifugation bis zu 4 Stunden.

Die Solubilisierung (Löslichkeitserhöhung) und Denaturierung von Proteinen war eine wichtige Voraussetzung, um Proteine nach ihrer Ladung im 2D-Gel trennen zu können.

### 2.1.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Bevor die Proteinlösung zur isoelektrischen Fokussierung (IEF) auf die IPG-Streifen gegeben werden konnte, musste die absolute Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden. Die Angabe der Proteinkonzentration erfolgte in  $[\mu\text{g}/\mu\text{l}]$ . Um in unbekanntem Lösungen die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde sich photometrischer Techniken bedient und davon profitiert, dass Proteine mit Coomassie® Brilliant Blau reagierten und somit semiquantitativ messbar wurden. Durch Verschiebung von Absorptionsspektren und mit Hilfe von Eichkurven bekannter Protein-Wasser-Gemische wurden unbekannte Proteinkonzentrationen bestimmbar. Dazu im Folgenden ein kurzer Einblick über die Grundlagen der Photometrie und der Bradford-Methode zur Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford 1976).

Die Bestimmung der Konzentrationen gelöster Moleküle in Lösungen beruhte darauf, dass Moleküle eingestrahles Licht einer bestimmten Wellenlänge (monochromatisches Licht) absorbieren. Diese Lichtabsorption war unter bestimmten Bedingungen (vollständige Lösung der Moleküle und Vermeidung von Lichtstreuung) proportional zur Konzentration der gelösten Moleküle. Die Intensität von eintretendem Licht in eine Küvette nahm beim Durchgang durch die vorgelegte Lösung (welche eine vorher definierte Proteinmenge enthielt) ab.

Die Intensität des austretenden Lichts ist die Transmission  $T$  (Probendurchlässigkeit). Für den negativen dekadischen Logarithmus der Transmission wurde der Begriff Extinktion ( $E$ ) eingeführt.  $E$  ist die Verminderung der Lichtintensität, die im Photometer gemessen wurde.



Zur Berechnung der Konzentration kam dann das Lambert-Beer'sche Gesetz zur Anwendung. Außerdem wurden Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ), Wellenlänge des Lichtes und der Temperatur berücksichtigt.

Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes war sehr viel höher als der des reinen Farbstoffes. Also konnte mit hoher Empfindlichkeit durch die Bildung des Komplexes gegen das freie Farbreagenz eine Zunahme der Absorption bei 595 nm gemessen werden.

Die photometrische Messung der Komplexbildung war ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung, da bei konstanter Küvettendichte die Extinktion einer Lösung direkt proportional zu der Konzentration des gelösten Stoffes war. Es wurden die Mittelwerte von Extinktionsmessungen von Proteingemischen herangezogen und in Beziehung zu der Eichkurve gesetzt, um auf die Proteinkonzentration Rückschluss zu ziehen.

#### 2.1.8.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Proteinkonzentration im depletierten und konzentrierten Serum zu bestimmen, wurde das Protokoll zur Proteinbestimmung nach Bradford angewendet.

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250® bildete in saurer Lösung einen Komplex mit kationischen, nichtpolaren und hydrophoben Aminosäureseitenketten der Proteine. Durch die Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffes von 470 nm zu 595 nm (Bradford 1976). Bei dieser Wellenlänge wurden im Photometer Extinktionsveränderungen gemessen und die Proteinkonzentration konnte berechnet werden. Zuerst wurde im Verhältnis 1:5 eine Färbelösung angesetzt (10 ml Bradford-Reagenz zu 40 ml Wasser). Dazu wurde zunächst in Halbmikro-Küvetten (10\*5\*45 mm von Sarstedt Nürnberg) die Standardlösung nach folgendem Pipettierschema (Tabelle 4) mit einer Stammlösung von Bovinem Serum Albumin (BSA) [1 mg/ml] versetzt, um eine Kalibrierungskurve zu erstellen.

Tabelle 4: Bradford-Pipettierschema

BSA [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	Färbelösung [ $\mu\text{l}$ ]
0	1000
2	998
4	996
6	994
8	992
10	990

Durch die Korrelation der Zunahme der Absorption des Protein-Farbstoffgemisches im Vergleich zur bekannten Konzentration des Standardproteins konnte eine Kalibrierungskurve erstellt werden. Die Extinktionen des Gemisches aus Standardreagenz und BSA wurden im Photometer Lambda 2 (Perkin-Elmer&CoGmbH, Stuttgart) dreifach bestimmt. Mit Excel wurde für jede Standardkurve eine Funktionsgleichung bestimmt. Anhand der Steigung der Geraden, durch die gemessenen Extinktionen pro Probe, der Probenverdünnung, dem Probenvolumen und dem Standardwert des Proteinfarbgemisches errechnete sich die Konzentration der zu bestimmenden Proteinprobe. Die errechnete Proteinkonzentration in [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] war für das Erstellen von Western Blots und 2D-Gelen notwendig. Bei der *low abundant* Fraktion war eine Ver-

dünnung des Serums mit Wasser von 1:5 ausreichend, bei der *high abundant* Fraktion wurden Verdünnungen von 1:50 eingesetzt. Das zur Messung verwendete Probenvolumen betrug 3-5  $\mu\text{l}$ . Nach der Berechnung der Proteinkonzentration wurden Proben entweder direkt verarbeitet oder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## **2.1.9 Elektrophoretische Methoden für die Gelelektrophorese**

Die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese 2D-SDS-PAGE gilt als leistungsstärkste analytische Methode zur charakteristischen Trennung von Proteingemischen. Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf der Eigenschaft geladener Moleküle (hier in Flüssigkeit gelöste Proteine) sich in einem angelegten elektrischen Feld durch eine definierte Matrix zu bewegen und aufgrund ihrer Ladung ein unterschiedliches Wanderungsverhalten im 2D-Gel zu zeigen (Schrattenholz 2001). Für die Wanderung in polymeren Matrices gelten komplizierte Gesetzmäßigkeiten, die im Folgenden vereinfacht dargestellt sind.

### **2.1.9.1 Ladungsunterschiede und pI-Wert**

Grundsätzlich waren Proteine als Polyelektrolyte anzusehen, d.h. sie wiesen ein individuell unterschiedliches Muster an geladenen Aminosäureresten auf. Die Ladung dieser Aminosäurereste war abhängig vom pH-Wert des umgebenden Milieus. Bei dem pH-Wert, bei dem das Protein genau gleich viele positive wie negative Ladungen in den Seitenketten hatte, war es ladungsneutral. Diesen Zustand bezeichnete man als isoelektrischen Punkt (pI-Wert) eines Proteins (Westermeier 2004). Für jedes Protein gab es genau einen charakteristischen pI-Wert, welcher in Titrationskurven ermittelt wird.

Der pI-Wert war maßgebend für die isoelektrische Fokussierung (IEF), bei der die Proteine der zu untersuchenden Probe gemäß ihrer Nettoladung aufgetrennt wurden. Die Nettoladung eines Proteins setzte sich dabei aus dem relativen Gehalt saurer und basischer Aminosäureseitenketten und dem umgebenden pH-Wert zusammen. Die IEF oder „1. Dimension“ wurde auch nur als „Fokussierung“ bezeichnet und wird in Abschnitt 2.1.9.5 beschrieben.

### **2.1.9.2 Massenunterschiede**

Der zweite Parameter zur Proteintrennung war die molekulare Masse ( $M_r$ ). Durch verschiedene molekulare Massen hatten Proteine ein unterschiedliches Wanderungs- und Wechselwirkungsverhalten in Matrices. Die  $M_r$  wurde in der „2. Dimension“ (Auftrennung nach Molekulargewicht) genutzt und wird in Abschnitt 2.1.9.7 beschrieben (Schrattenholz 2001).

### **2.1.9.3 Chemisch-physikalische Unterschiede**

Als drittes Charakteristikum nutzte die IEF die adsorptiv-physikalischen Wechselwirkungen (hydrophob, hydrophil) von Proteinen mit Matrixmolekülen aus. Die charakteristischen Amino-

säurereste von Proteinen hatten ihre eigenen Affinitäts-, Retentions- und Bindungseigenschaften und reagierten auf Chips, Matrizes und chromatographischen Oberflächen unterschiedlich und bestimmen vor allem die Zeit der Protein-Matrix-Wechselwirkung.

Des Weiteren war die räumliche Struktur (Proteinkonformation) charakteristisch. Sie spielte im Folgenden eine untergeordnete Rolle, denn die Proteine lagen nicht in ihrer natürlichen Konformation vor, da in der Probenvorbereitung mittels denaturierender Substanzen die Proteine entfaltet wurden (Schrattenholz 2001).

#### **2.1.9.4 Gelmatrix**

Für die Auftrennung nach  $pI$  und  $M_r$  wurden Matrizes vorgelegt, welche aus porösen Polymeren bestanden. Der pH-Gradient im IPG-Streifen wurde durch amphotere Substanzen (bifunktionelle Immobiline mit mehreren positiven und negativen Ladungen) erzeugt, die kovalent an die Gelmatrix gebunden waren (Westermeier et al. 1983). Die Gelmatrix war auf eine Trägerfolie aufpolymerisiert und wurde im getrockneten und gefrorenen Zustand geliefert (IPG-Streifen). Der vorgefertigte Gelstreifen der Firma Bio-Rad ermöglichte die Fokussierung des Proteingemisches im Bereich von pH 4-7 oder auch 3-10.

Es handelte sich dabei um einen standardisierten pH-Gradienten, der für alle Streifen gleich war. Somit wurde Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der 1. Dimension sicherstellt.

In der 2. Dimension (SDS-PAGE) etablierte eine Acrylamidmatrix eine Art „Gitternetz“, durch das die Proteine je nach Größe schnell oder langsam durchwandern konnten.

In beiden Fällen lag eine Matrix mit inerten chemisch-adsorptiven Eigenschaften zugrunde (Schrattenholz 2001).

#### **2.1.9.5 Die 1. Dimension**

Für die Durchführung einer der 2D-Elektrophorese wurden die Serumproben zuerst depletiert (2.1.7), dann konzentriert, entsalzt und denaturiert.

Nach der Proteinbestimmung (2.1.8.4) wurde berechnet, wie viel  $\mu l$  Proteinprobe aufzutragen waren, um 150  $\mu g$  Protein auf den IPG-Streifen zur Fokussierung zu geben.

Die Differenz zu 175  $\mu l$  wurde mit Rehydratationspuffer aufgefüllt, in einem Reaktionsgefäß vermischt und in die Fokussierkammer gegeben. Nach luftblasenfreiem Auflegen des IPG-Streifens zog die Lösung 30 min bei Raumtemperatur in das Gel ein.

Anschließend wurden die Streifen zur Isolierung mit Mineralöl (Bio-Rad®) beschichtet, um ein Austrocknen der Streifen zu verhindern. Die Dauer der Fokussierung endete im Erreichen von 50.000 Vh, meistens dauerte der Vorgang ca. 22,5 Stunden Tabelle 5.

Sowie eine Spannung an dem IPG-Streifen angelegt war, wanderte das Protein zu seinem  $pI$ , wo es immobil wurde und sich anreicherte.

Tabelle 5: Fokussierprogramm für die erste Dimension

Schritt	Voltstärke [V]	Gradient	Zeit [h]	Funktion
	-	-	12	Rehydratation bei 20°C
1/5	500	Rapid	1	Proteineintritt
2/5	1000	Rapid	1	Proteineintritt
3/5	2000	Linear	1	Fokussierung
4/5	8000	Rapid	4-5	Fokussierung
5/5	500	rapid	~12h	„Stepp&hold“, fixiert die IEF bei 50 000 Vh

### 2.1.9.6 Äquilibration

Nach erfolgreicher isoelektrischer Fokussierung ließ man das Öl vom IPG-Steifen ablaufen. Der Streifen wurde nun für jeweils 20 min in Äquilibrationpuffer I und II inkubiert, um die Reoxidation freier Sulfhydrylgruppen zu verhindern und die zur Solubilisierung eingesetzten Stoffe zu entfernen.

Ohne eine Äquilibration konnte es zur Interaktion der Acrylamidmatrix mit den Proteinen während der Fokussierung und in der „2. Dimension“ kommen. Der Äquilibrationpuffer I enthielt 100 mg DTT, welches die Cysteinreste der Proteinketten reduzierte.

Im Äquilibrationpuffer II war 400 mg Iodacetamid (IAA) gelöst, wodurch die Proteinseitenketten alkyliert wurden. Diese beiden Inkubationen waren notwendig, damit sich während der „2. Dimension“ reduzierte Disulfidbrücken nicht wieder verbinden konnten.

### 2.1.9.7 Die 2. Dimension

Die SDS-PAGE war der nächste Schritt bei der Trennung von Proteinen im 2D-Gel. Wie in der Einführung erwähnt, konnten Proteine neben dem  $pI$  auch nach dem Molekulargewicht ( $M_r$ ) im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei band das anionische Detergenz SDS (welches stark denaturierend wirkte) die Proteine und überdeckte deren Eigenladung. Alle Proteine lagen dann einheitlich negativ geladen vor.

Die Trennung im elektrischen Feld erfolgte ausschließlich nach der Größe des Proteins (Laemmli 1970). Durch Zugabe des reduzierenden Agens DTT wurden die Disulfidbrücken aufgespalten und die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins aufgebrochen. Alle Proteine waren komplett denaturiert und entfaltet. Allein die Peptidkettenlänge bedingte die Wanderungsverhalten des Proteins und damit seine Position im 2D-Gel.

Proteine mit großer molekularer Masse ( $M_r$ ) bildeten lange und negativ geladene Polypeptidketten, die andersartig mit der Matrix wechselwirkten als kurze Ketten. Lange Ketten hatten eine größere Reibung und wanderten langsam durch das Gel, was zur Proteinablagerung im oberen Gelbereich führte. Leichte Proteine mit geringer  $M_r$  wanderten schnell und weit auf dem Gel. Sie lagerten sich im unteren Gelbereich ab (Abbildung 15).

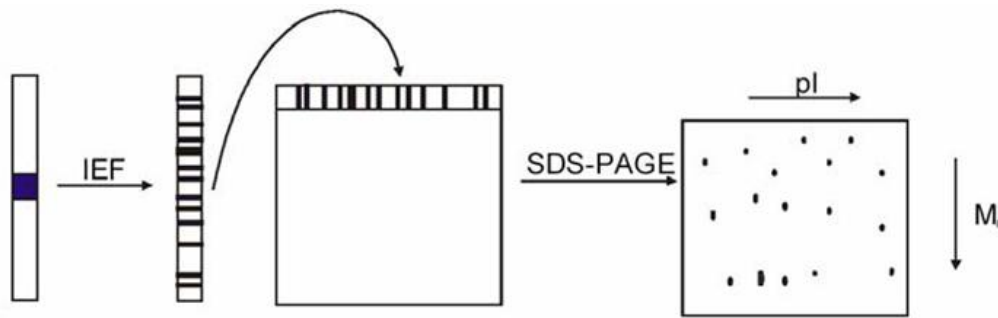


Abbildung 15: Schematische Darstellung der 2D-Gelelektrophorese. Nach der Auftrennung der Proteine nach ihrem pI-Wert (links im Bild), erfolgt in der SDS-PAGE die Auftrennung nach molekularer Masse. Das Ergebnis ist ein 2D-Gel in dem die Serumproteine nach Masse und Ladung aufgetrennt vorliegen.

Zur Auftrennung wurden die denaturierten Proben auf ein Gel aus Polyacrylamid aufgetragen, woran eine Spannung angelegt wurde. Das Gel fungierte dabei als eine Art Sieb. Kleine Proteine wanderten schnell durch die Matrix des Gels, während große Proteine länger brauchten. Die Siebwirkung des Gels hing dabei maßgeblich von der Konzentration des Acrylamids und dessen Quervernetzung ab.

Es wurden in dieser Arbeit für die 2D-Gele kommerziell verfügbare Criterion<sup>®</sup>-Gele (13 cm x 8 cm, 12 % Bis-Tris Gele mit einer Vertiefung für 11 cm lange IPG-Streifen) von Bio-Rad verwendet. Als Marker kam der PageRuler<sup>™</sup> Unstained Protein Ladder<sup>®</sup> von Fermentas zum Einsatz. Criterion<sup>®</sup> Gele verfügten über ein gelinternes Reduktionsmittel. Bei neutralen Gießbedingungen (pH 6,5-pH 6,8) förderte dies die Protonierung der Cysteinresiduen und verhinderte eine Reoxidierung (Graham et al. 2005). Die Laufzeit betrug etwa zwei Stunden (15 min bei 100 V; 1,45 h bei 200 V).

### 2.1.10 Färbungsmethoden für 2D-Gele

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Gel sichtbar zu machen und einscannen zu können, wurden die Spots in den Gelen mit verschiedenen Methoden angefärbt. Je nach Proteincharakteristik (z.B. Protein-Zuckerstrukturen) kamen unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Die in der Arbeit verwendeten Färbungen sind im Folgenden dargestellt.

Flamingofärbung: Die Flamingo<sup>®</sup>- Färbung (Bio-Rad) war eine Methode zur fluoreszenzba-sierten Proteinfärbung. Nach der Gelelektrophorese wurde das 2D-Gel in Fixierlösung fixiert und anschließend für fünf Stunden in der Flamingo<sup>®</sup>- Färbelösung inkubiert (Dihazi et al. 2009).

Coomassiefärbung: Nach der 2D-SDS-PAGE wurde das Gel zwei Stunden in Fixierlösung fixiert und anschließend zwei Mal ca. 20 min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation von mindestens 12 Stunden in der kolloidalen Coomassie-Färbelösung. Die Coomassiefärbung kam im Anschluss an die Flamingo<sup>®</sup>-Färbung und dem Scannen der Gele zum Einsatz, um Proteinspots auszuschneiden und zu identifizieren.

Silberfärbung: Zur Silberfärbung lagerten die Gele über Nacht in Fixierlösung. Zu Beginn der Färbung wurden die Gele zwei Mal 20 min mit 50 %igem Ethanol, danach ein Mal 20 min in 30 %igem Ethanol gewaschen. Die Silber-Sensibilisierung erfolgte für nur 60 sec mit 0,02 % Natriumkarbonat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$ ). Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}$  für 20 je sec. Es folgte nun die Silberfärbung für 20 min mit 0,2 % Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) und 0,026 % Formaldehyd ( $\text{CH}_2\text{O}$ ). Daran schloss sich wieder ein Waschschrift mit  $\text{H}_2\text{O}$  (3 Mal 20 sec) an. Bis zum gewünschten Ergebnis wurde die Silberfärbung nun mit 6 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,0185 %  $\text{CH}_2\text{O}$  und 16  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$  entwickelt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 %igem Methanol und 12 %iger Essigsäure gestoppt (Shevchenko et al. 1996). Direkt im Anschluss erfolgte das Scannen und Ausschneiden der Spots, da sich die Gele immer weiter verfärbten und später für eine Analyse nicht mehr zu verwenden waren.

Glykoproteinfärbung: Zur Färbung von Glykoproteinen kam Pro-Q<sup>®</sup> Emerald-Reagenz nach dem mitgelieferten Protokoll zum Einsatz. Dieses spezielle Färbekit konnte in Western Blots und 2D-Gelen spezifisch Proteinglykosylierungen sichtbar machen. Das Pro-Q<sup>®</sup> Emerald-Reagenz reagierte mit oxidierten Kohlenhydratgruppen, in diesem Fall mit Periodat. Diese Verbindung erzeugte ein fluoreszierendes Signal an Proteinen mit Glykosylierung. Die Qualität der Färbung hing besonders von der adäquaten Gelfixierung, dem Abwaschen von SDS, sowie der Entfernung der Periodatreste nach der Oxidationsreaktion ab. Zuerst wurden aus den gelieferten Komponenten des Emerald-Kits Stammlösungen erstellt. Die Stammlösung bestand aus 6 ml DMF was zu dem Pro-Q Emerald<sup>®</sup>-Reagenz gemischt und bei -20 °C gelagert wurde. Die Fixierlösung bestand aus 500 ml Methanol und 100 ml Essigsäure auf einen Liter Wasser. Zum Waschen der Gele wurde eine Waschlösung aus 3 %igem Essigsäure hergestellt. Zur Herstellung der Oxidationslösung benutzte man 250 ml der 3 %iger Eisessiglösung und gab sie zur Periodsäure. Der Glykoproteinmarker (Candy Cane<sup>®</sup> Standard) wurde hergestellt aus 0,5  $\mu\text{l}$  CandyCane<sup>®</sup>-Reagenz und 7,5  $\mu\text{l}$  Probenpuffer. Dies wurde vermischt und 4 min bei 95 °C gekocht. Zur Darstellung der Glykoproteinstrukturen erfolgte eine normale 2D-Gelelektrophorese. Es folgte eine Inkubation des Gels in 100 ml Fixierlösung auf dem Schüttler für zwei Mal 45 min. Es musste sichergestellt werden, dass alle SDS-Reste abgewaschen sind. Nach der Inkubation in Fixierlösung, wurde das Gel zwei Mal 20 min bei leichtem Schütteln im Waschpuffer inkubiert. Damit der Pro-Q<sup>®</sup>-Farbstoff an die Glykoproteine binden konnte, mussten die Kohlenhydrate oxidiert werden. Dazu wurde das Gel 30 min in 25 ml der Oxidationslösung bei leichtem Schütteln inkubiert und dann drei Mal 20 min in 100 ml Waschlösung gewaschen. Aus der Stammlösung wurde frische Pro-Q<sup>®</sup> Färbelösung hergestellt (1 ml Stammlösung zu 50 ml des Färbereagenz zugeben). Je ein Gel wurde mit 25 ml Färbelösung für 120 min inkubiert. Die Färbung erfolgte für mindestens 90 min im Dunkeln. Das intensivste Fluoreszenzsignal wurde nach 120 min erreicht.

**2D-DIGE:** Das Proteinexpressionsmuster des Serums konnte mit Hilfe der DIGE-Technik (*differential in-gel electrophoresis*) quantitativ verglichen und analysiert werden. Die Probenvorbereitung erfolgt wie beschrieben (2.1.8.2). Vor der Gelelektrophorese wurden die zu vergleichenden Proteinproben mit spektral voneinander trennbaren Fluoreszenzfarbstoffen (Cy<sup>TM</sup> Dyes) gekoppelt. Dazu wurden das Protokoll und die Herstellerangaben von GE Healthcare benutzt. Die Arbeitsschritte werden im Folgenden kursorisch beschrieben.

Die Kopplung der zu vergleichenden Proben erfolgte mit zwei Farbstoffen, die strukturell ähnlich aufgebaut waren und trotzdem spektral voneinander trennbare Signale erzeugten. Bei Detektion über einen Scanner ist eine Quantifizierung des Fluoreszenzsignals möglich. Die Farbstoffe durften das Laufverhalten der Proteine bei der elektrophoretischen Auftrennung nicht beeinflussen. Die Dyes hatten NHS-Ester-Gruppen, die mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrests am Protein reagierten (nukleophile Substitution). Dabei kam es unter Amidbildung zur kovalenten Bindung zwischen Protein und Farbstoff (Mindes 2007; Timms and Cramer 2008; Westermeier and Scheibe 2008).

Ziel der Färbung war, in ein und demselben 2D-Gel zwei Proben gleichzeitig nach pI und M<sub>r</sub> aufzutrennen und direkt quantitativ miteinander vergleichen zu können.

Nach der Depletion und Entsalzung der *low abundant* Proteinfraction wurden die Proteine mit dem Dye gekoppelt. Für die Kopplungsreaktionen zwischen Protein und Farbstoff war ein maximales Volumen von 10  $\mu$ l vorgeschrieben, wobei die Proteinkonzentration der Proben aber mindestens 5  $\mu$ g/ $\mu$ l betragen musste. Das Probenvolumen wurde auf 50  $\mu$ g Protein hochgerechnet und die Differenz zum Maximalvolumen von 10  $\mu$ l pro Kopplungsansatz mit Lysepuffer aufgefüllt.

Die Dyes waren in einer Stammlösung von 1 nmol/ $\mu$ l erhältlich. Die Arbeitslösung des Dyes setzte sich aus 4  $\mu$ l Farbstoff und 6  $\mu$ l DMF zusammen. Es ergab sich eine Farbstoffkonzentration von 400 pmol/ $\mu$ l, die mit der Proteinlösung vermengt wurde, die 50  $\mu$ g Protein enthielt.

Zum Dye und der Proteinprobe wurde noch 1  $\mu$ l 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 addiert und der Ansatz 30 min auf Eis und im Dunklen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1  $\mu$ l einer 10 mM Lysinlösung gestoppt. Nach 10 min wurden die Proben mit 90  $\mu$ l Rehydratationspuffer aufgefüllt, vermischt und in eine Fokussierwanne gegeben. Die nachfolgenden Arbeitsschritte glichen denen einer regulären 2D-SDS-PAGE.

Die Digitalisierung der Gele erfolgte mit dem Fuji FLA-5100 Fluoreszenz-Laser-Scanner. Dieser Scanner verfügt über mehrere Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen zur Detektion der Signale der Fluoreszenzfarbstoffe. Es wurde ein digitales Bild des Fluoreszenzsignals generiert. Dieser Scan wurde im Anschluss mit dem Program 2D-Delta ausgewertet. Dabei wurde von jedem Protein in dem Gel aus einer Vielzahl von Messparametern (relatives Verhältnis der normierten Spotintensität, Standardabweichung und der Student's t-Test) errechnet, ob eine Proteinregulation vorlag oder nicht (Dihazi et al. 2009).

## 2.1.11 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Technik, die zur chemischen Komponentenanalyse benutzt wird, wobei das Messprinzip auf der Detektion der unterschiedlichen Masse-Ladungs-Verhältnisse von Molekülen beruht (Abbildung 16).

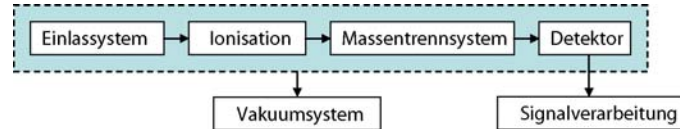


Abbildung 16: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers. Die Hauptbestandteile eines Massenspektrometers sind eine Ionenquelle, die die Moleküle in geladene Ionen transformiert, ein Masseanalysator, der die Ionen unter Einwirkung eines elektrischen Feldes in ihre Massen aufteilt, und ein Detektor, der die Ionen detektiert und in ein messbares elektrisches Signal umwandelt

In dieser Arbeit wurde die Massenspektrometrie zur Identifikation von Proteinen mittels *peptide mass fingerprinting* (PMF) durch *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry* Analyse (MALDI-TOF-MS) genutzt. Diese Technik wurde von Franz Hillenkamp und Michael Karas (Hillenkamp and Karas 1990) zur Identifizierung von Proteinen entwickelt und optimiert. Sie findet in heutigen Proteomanalysen Anwendung. Bis zur Identifizierung eines Proteinspots aus einem 2D-Gel waren viele Teilschritte abzuarbeiten, die im Folgenden dargestellt werden. Die Bearbeitungsschritte wurden auf das Minimum gekürzt, um Kontaminationen mit Keratin zu vermeiden. Das Verdauprotokoll mit Trypsin ist im Folgenden dargestellt (Hellman et al. 1995; Dihazi et al. 2009).

### 2.1.11.1 Trypsinverdau von Proteinen

Um Proteine aus 2D-Gelen identifizieren zu können, mussten sie als erstes genau aus dem Gel ausgeschnitten werden. Dazu wurde die Spitze einer 100 µl-Pipettenspitze mit einem Skalpell so abgeschnitten, dass die Spitze einen Durchmesser von 2 mm hatte. Die einzelnen Spots wurden mit dieser Hohlzahn aus dem Gel herausgestochen und in nummerierten Eppendorfgefäßen für den anschließenden tryptischen Verdau gelagert.

Für den Verdau von Gel-Spots mit Trypsin zur Identifizierung waren mehrere Arbeitsschritte wichtig: Zuerst musste das ausgeschnittene Gelstück je nach Grad der Färbung mit Coomassie bis zu vier Mal mit jeweils 100 µl Wasser gewaschen werden. Zur Entfärbung des Gelstückes war es mit 15 µl 50 % (v/v) Acetonitril (ACN) für mindestens 15 min zu inkubieren. Durch die Zugabe von 15 µl 100 % ACN wurde das Gelstück entwässert. Nach 60 min wurde das ACN abgezogen, 10 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat für 5 min und 10 µl 100 % ACN für 15 min pipettiert. Dann wurden die Proben für 60 bis 90 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Stammlösung für den Trypsinverdau wurde aus porcinem Trypsin von Promega hergestellt, wobei Trypsin in 1mM HCL auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl verdünnt war. Diese Stammlösung war bei -20 °C für drei Monate lagerungsfähig. Für den Verdau wurden 12 µl dieser Stammlösung mit 100 µl Trypsin Verdaulösung (970 µl Wasser,



25 µl Ammoniumbikarbonat und 5 µl 1 M Calciumchlorid) vermischt. Alle Gelstücke wurden mit 7 µl dieser Trypsinlösung überschichtet und es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Es folgte dann die Extraktion im Ultraschallbad, ein Mal 30 min mit 30 %igem, dann 30 min mit 60 %igem ACN (Hellman et al. 1995).

Abbildung 17 fasst die Schritte vom Protein aus dem 2D-Gel zum Peptidgemisch zusammen.

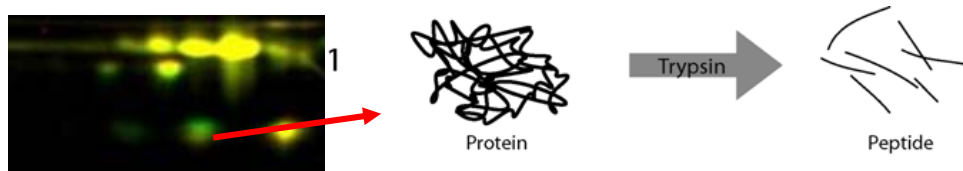


Abbildung 17: Erster Schritt zur Proteinidentifikation mit MALDI ist der Protein-Trypsinverdau. Nach der SDS-PAGE und dem Ausschneiden der Spots erfolgte durch den Einsatz des Enzyms Trypsin die Spaltung der Proteine aus dem Gel in einzelne Peptidstücke. Die enzymatische Aktivität von Trypsin sorgte dafür, dass immer nach basischen Aminosäuren (Lysin und Arginin) eine Peptidbindung gelöst wurde. Daraus entstand dann ein Peptidgemisch, das für genau ein Protein charakteristisch war und mit MALDI identifiziert werden konnte.

Im Anschluss wurde die flüssige Peptidprobe auf eine Metallplatte pipettiert (Abbildung 18).

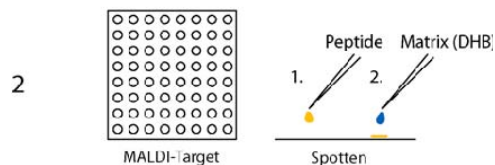


Abbildung 18: Nach dem Trypsinverdau wurde die Peptidlösung auf eine Metallplatte pipettiert. Es wurden 1,4 µl des Peptidextraktes und 0,7 µl einer gesättigten 2,5-Dihydroxybenzoesäure-Lösung (DHB) auf eine Metallplatte pipettiert und gut getrocknet. Es kam zur Kokristallisation von DHB- Matrix und Peptiden. Die Tropfen mussten gut getrocknet sein, bevor die Platte im MALDI-Gerät analysiert werden konnte.

### 2.1.11.2 Erfassung der Spektren und Proteinidentifikation

Die Messung der Peptidspektren erfolgte mit dem Voyager-DE-STR Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems. Es wurde im Positivmodus mit einer Beschleunigungsspannung von 20.000 V gemessen (Abbildung 19).

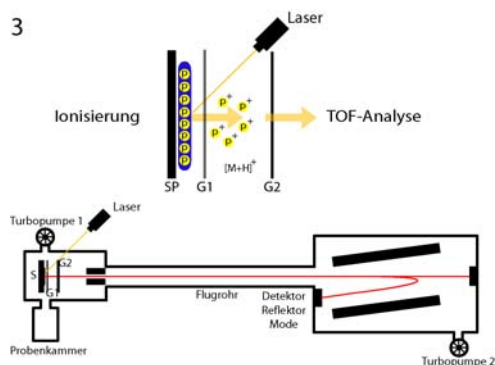


Abbildung 19: Analyse von Peptiden im Flugzeitmassenspektrometer. Durch Laserbeschuss wurden Peptide auf der Metallplatte ionisiert und im Flugrohr beschleunigt. Die Ionisierung funktionierte durch die Absorption der Laser-Lichtenergie durch die DHB-Matrix. Gleichzeitig wurde ein Teil der Energie auf den Analyt (hier Peptide) übertragen. Beim Energietransfer wurden entweder Protonen hinzugefügt  $[M+H]^+$  und der Analyt in ein geladenes Teilchen überführt und beschleunigt. Durch das Anlegen von Spannung wurden die von einem Laser ionisierten Peptide beschleunigt. Der Führungsdraht leitete die freigesetzten Ionen und führte sie gebündelt auf einen Detektor. Pro Messung wurden mehrere Spektren akkumuliert. Über das Flugrohr gelangen die Peptide zum Detektor, wo die Peptidmasse im TOF-Analysator analysiert wird.

Damit das Ion detektiert und nicht durch den Zusammenprall mit einem anderen Teilchen abgebremst wurde, musste die Flugbahn unter Vakuumbedingungen bereitgestellt werden (Dihazi et al. 2009).

Nach der Messung und Akkumulation mehrerer Spektren eines Spots, erfolgt eine Verarbeitung der Daten in verschiedenen Datenbanken. Nach dem Prinzip des „Peptid-Fingerabdruck“ (PMF) wurden im Datenbankabgleich (Swiss-Prot) aus den Spektren Proteine identifiziert (Abbildung 20). Die Vorverarbeitung der Spektren übernahm das halbautomatische Programm *Mascot Wizzard* (Perkins et al. 1999).

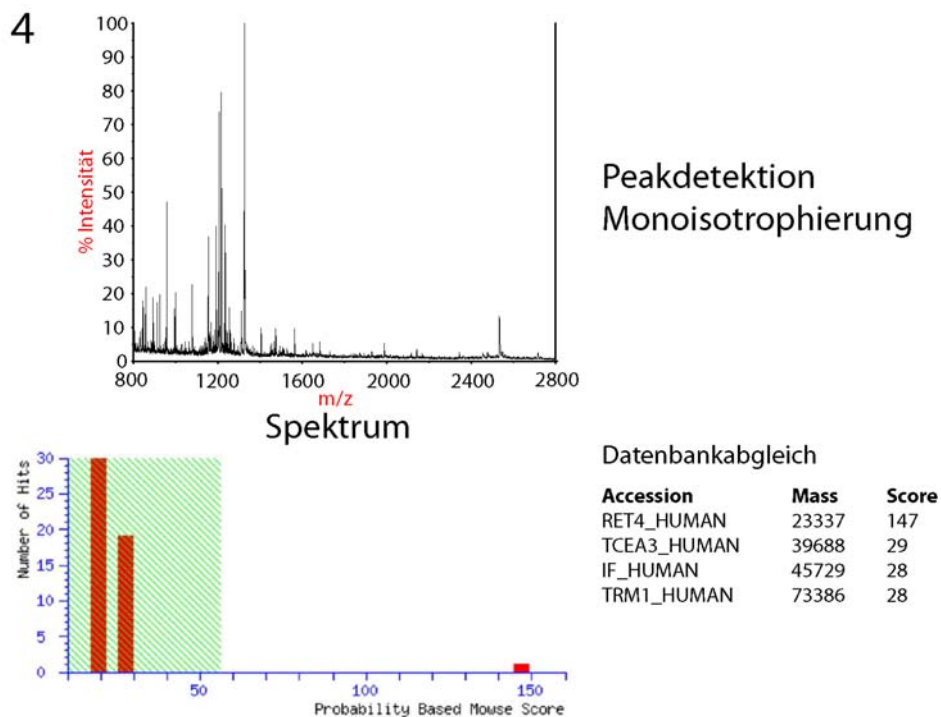


Abbildung 20: Parameter aus der MALDI-Analyse wurden mit Daten aus Swiss-Prot verglichen. Um ein Protein zu identifizieren, wurden die Parameter der MS-Spektren mit den bereits vorhandenen aus der SWISS-Prot Datenbank verglichen. Ein Protein galt (bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05) als identifiziert, wenn die MOWSE Signifikanzgrenze von 55 überschritten war.

### 2.1.12 Surface-Enhanced Laser Desorption Ionisation

Die Proteomanalyse mit SELDI ermöglicht die selektive Absorption (Zurückhaltung) von Proteinen auf einer soliden chromatographisch beschaffenen Unterlage (*Chip*). In diesem Fall wurde eine hydrophobe Vorlage als Bindungsfläche verwendet (H50® Chips der Firma CIPHERGEN). Durch die einheitliche Bindung der Proteine an die Bindungsfläche entstand ein reproduzierbares Signal.

Nach Bindung des nicht-depletierten Proteingemisches an den *Chip* und Ionisierung der Proteine wurde mittels MALDI-TOF die Detektion und Molekulargewichtsbestimmung des Proteingemisches möglich. Das Besondere an dieser Methode war die direkte Akquirierung von Protein- und Peptidspektren ( $m/z$ -Zahlen) aus nicht vorbehandelten Seren.

### 2.1.12.1 Vorbereitung, Auftragen und Messung der Proben

Es wurde eine Proteinkonzentration von 70 - 80  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  benötigt. Die verwendete Waschlösung war 1 % Trifluoressigsäure (TFA). Nach gründlicher Reinigung von Bioprocessor und Membran wurden die Chips zwei Mal 10 min mit 150  $\mu\text{l}$  1 % TFA unter Schütteln äquilibriert um die chromatographische Oberfläche zu aktivieren. Weitere Arbeitsschritte zeigt (Abbildung 21).

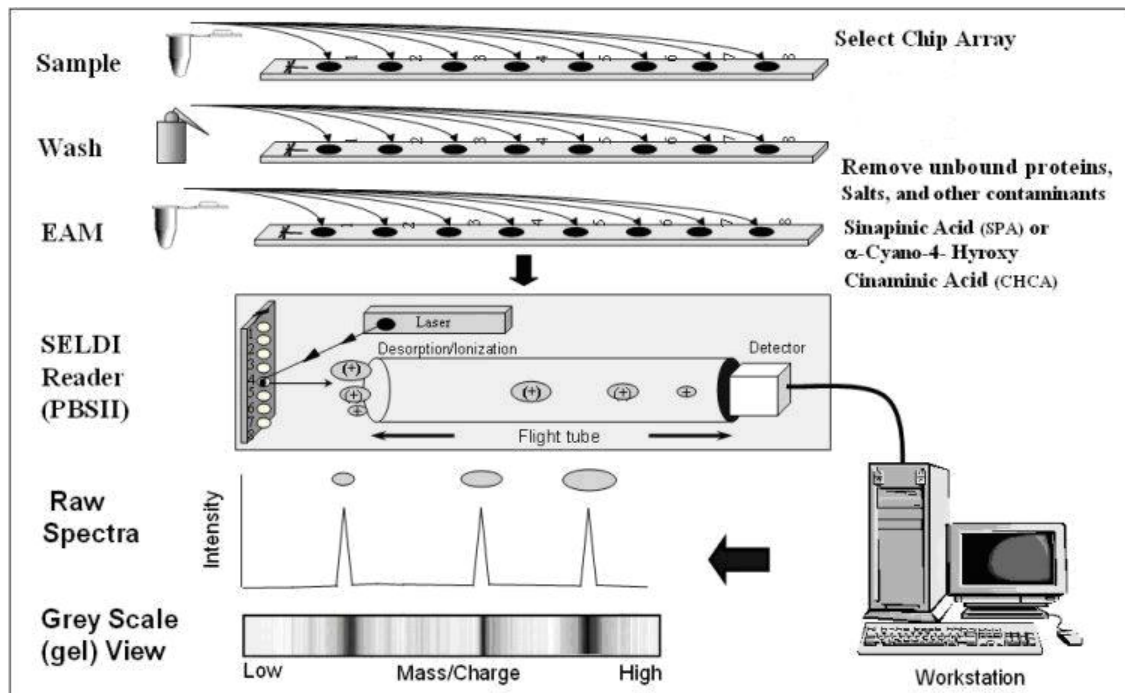


Abbildung 21: Schematische Auflistung der Vorbereitungsschritte zur Messung mit SELDI. 4  $\mu\text{l}$  der Probe wurde mit 206  $\mu\text{l}$  TFA vermischt und davon pro Spot 100  $\mu\text{l}$  aufgetragen, wobei keine Luftblasen zwischen *Chip*oberfläche und Probe entstehen durften. Es wurde pro Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt. In mehreren Waschschritten wurden ungebundene Proteine, die die Messung stören konnten, abgewaschen. Die Inkubation auf dem Schüttler erfolgte für 2 Stunden. In dieser Zeit banden die Proteine an die *Chip*oberfläche. Im Anschluss folgten drei Waschschritte mit 150  $\mu\text{l}$  1 % TFA und am Ende ein Mal mit destilliertem Wasser. Auf jeden Spot wurde nun Siapinsäure-Matrix aufgetragen (zweimal jeweils 1 $\mu\text{l}$ ). Nachdem die Proben und die Matrix eingetrocknet waren, konnte gemessen werden. Jedem Spot wurde mit SELDI eine *m/z*-Zahl zugeordnet. Zur Messung der Spektren war es wichtig die Proben beim Messen der Spektren entsprechend der Gruppe (hier *responder* oder *non-responder*) zu benennen, um sie bei der Auswertung und dem Gruppenvergleich beliebig miteinander vergleichen zu können. Quelle der Graphik am 04.04.2010: <http://www.evms.edu/evms-virginia-prostate-center/overview-of-the-seldi-system.html>

### 2.1.12.2 Messung der Chips und statistische Auswertung

Die Messung eines SELDI-Chips dauerte ca. 15 min. Nach Akquirieren der SELDI-Spektren wurden die Spektren normalisiert und alle Peaks detektiert. Im Biomarker *detection modus* wurden die *Peaks* aller Gruppen nach ihrer Peakintensität und dem *m/z*-Wert statistisch ausgewertet (Hutchens and Tai-Tung 1993; Wright 2002). Im Modus Biomarkermuster konnten sowohl graphische als auch eine tabellarische Ansicht der *Peaks* erstellt werden. Alle *Peak*intensitäten die einen *p*-Wert kleiner 0,05 aufwiesen und im Spektrum gut erkennbar waren, wurden in das Programm *Prism* importiert, auf ihre Signifikanz getestet und graphisch dargestellt.

### 2.1.13 Western Blot

Den Transferprozess von Proteinen auf eine Membran unter Beibehaltung der relativen Position und der Auflösung wird als *Blotten* bezeichnet. Der Begriff Western Blot (WB) bezieht sich auf den Transfer von Proteinen aus einer Gelmatrix auf eine Trägermembran (Towbin et al. 1992). Der Ablauf eines Western Blots ist im Folgenden dargestellt und orientiert sich an dem gängigen Laborprotokoll (Dihazi et al. 2009).

Die *high abundant* Proteine des Serums wurden depletiert und die Proteinkonzentration mit dem Bradford Assay bestimmt. 40 µg Proteinprobe wurde durch Zugabe von Wasser und Probenpuffer auf ein einheitliches Volumen gebracht und bei 97 °C auf dem Schüttler für 10 min gekocht.

Für die Gelelektrophorese wurden eigene Gele gegossen, wobei ein Gel immer aus einem Trenn- und einem Sammelgel bestand. Für die WBs wurden 15 %ige Trenngele gegossen: 5 ml H<sub>2</sub>O, 5 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 und 10 ml Acrylamid wurden vermischt und entgast, um Luftblasen im Gel zu vermeiden. Zum Start der Polymerisation zum Trenngel wurden zügig 200 µl 10 % SDS, 100 µl 10 APS und 10 µl TEMED zugegeben und die beginnende polymerisierende Lösung zwischen die Glasplatten pipettiert.

Das 4 % ige Sammelgel setzte sich aus 15 ml H<sub>2</sub>O, 6,3 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 und 3,3 ml Acrylamid zusammen. Zum Start der Polymerisation erfolgte die Zugabe von 125 µl 10 % APS, 250 µl 10 % SDS und 25 µl TEMED. In das sich polymerisierende Sammelgel wurde ein Trennkamm eingesteckt, um 10 Geltaschen à 10 mm zu erzeugen. In eine Geltasche wurde später genau 20 µl der Serumprobe pipettiert.

Die Herstellung der Trenn- und Sammelgele erfolgte am Vortag. Unter einem feuten Tuch in Aulfolie gepackt, wurden die Gele bei 4 °C im Kühlraum gelagert, um ein Austrocknen zu verhindern.

Es erfolgte die Auftrennung der Proteinproben im Trenngel nach Molekulargewicht (1D-WB). Die Proben wurden für eine Stunde bei 180 V laufen gelassen, bis der mitlaufende Marker den Unterrand des Gels erreichte.

Es wurden als WB-Variante auch 2D-WB erstellt, um auch Proteinisoformen genauer untersuchen zu können. Durch den hohen Glykosylierungsanteil einiger Serumproteine ergaben sich bei der 2D-SDS-PAGE oft keine einzelnen, klar abgrenzbaren Spots, sondern häufig nicht scharf von einander trennbare Proteinkonglomerate.

Nach der Fokussierung von 40 µg Protein auf einem 7 cm IPG-Streifen (pH 4-7) wurde analog zum 1D-WB eine Fokussierung in der zweiten Dimension (2.1.9.7) durchgeführt. Im 2D-WB waren dann selektiv nur die Proteinisoformen eines Proteins zu sehen.

Bei Vorbereitung für 2D-WB entfiel die Erstellung des Sammelgels, da die IPG-Streifen nach der Fokussierung direkt auf die Geloberkante gelegt wurden.

Das Auftragen einer Schicht Butanol ermöglichte die Herstellung einer geraden Gel-Oberkante. Bei den 2D-WB handelte es sich um 12 %ige Gele.

Die Proteine lagen nach der Elektrophorese nach Molekulargewicht aufgetrennt in dem Gel und die Arbeitsschritte waren nun bei 1D und 2D-WB identisch. Die Proteine mussten über einen Elektronentransfer auf eine Membran übertragen werden, wozu es vertikale Elektrophoresekammern gab.

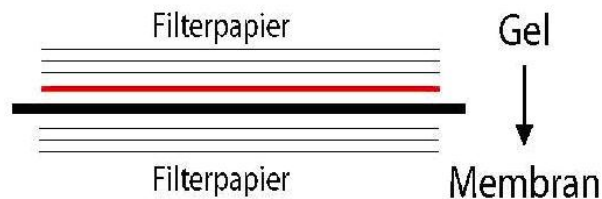


Abbildung 22: Elektronentransferprinzip im WB.

Bei *Blotten* werden Proteine in ihrer exakten Elektrophoreseposition der ersten Dimension auf eine PVDF-Membran übertragen.

Gel und Membran wurden zwischen zwei Filterpapiere und zwei Fliespapiere gelegt, die mit Transferpuffer getränkt waren. Das erhaltene Paket aus Gel, Membran, Filterpapier und Schwämmen wurde in die Mini-Trans®-Blot Kammer eingesetzt, mit Transferpuffer aufgefüllt und eisgekühlt über Nacht bei 40 V „geblottet“.

Nach dem Übertragen der Proteine ist die Membran zu trocknen und mit Milchpuffer abzusättigen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nicht gebundener Antikörper wurde anschließend durch Waschen mit Waschpuffer entfernt.

Es folgte eine Inkubation über Nacht mit einem gegen das nachzuweisende Protein gerichteten spezifischen Erstantikörper (1. AK) im Kühlraum bei 4°C unter leichtem Schütteln.

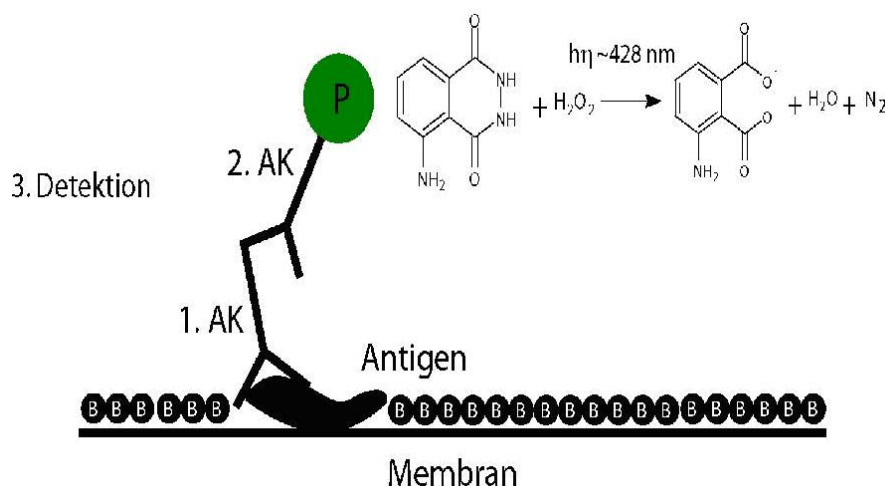


Abbildung 23: Kopplung des sekundären Antikörpers.

Im Anschluss an die Inkubation mit einem für das Antigen spezifischen Erstantikörper, folgte die Inkubation mit einem spezifischen Sekundärantikörper, welcher an den 1. AK gebunden hat. Der Sekundärantikörper war mit einer Peroxidase gekoppelt. In der Peroxidase-reaktion erfolgte die Umsetzung von Luminol unter Freisetzung von Licht.

Dadurch war ein Fluoreszenzsignal des nachzuweisenden Proteins im Scanner sichtbar und auch quantifizierbar.

## 3 Ergebnis

### 3.1 Vorbemerkung

Die Ergebnisse der Arbeit lassen sich in mehrere Teilbereiche gliedern: Zunächst werden die Ergebnisse zur Methodenoptimierung dargestellt. Es folgen Angaben zu den zehn im DIGE-Gel untersuchten Patienten, die vor Beginn der Laboranalysen als *responder* und *non-responder* klassifiziert wurden. Danach erfolgt die Vorstellung der in dieser Arbeit identifizierten Proteine. Nach der statistischen Auswertung der Proteinregulation in den DIGE-Gelen werden die Ergebnisse der Western Blots und der Glykoproteinfärbungen vorgestellt.

#### 3.1.1 Optimierung der Gelqualität

Da das Serum ein komplexes Biogemisch ist, wurden alle Serumproben vor der Proteomanalyse vorbehandelt (depletiert). Dadurch erfolgt eine Reduktion der Proteinanzahl, um eine gute Gel-Qualität zu erreichen. Beim Vergleich der Proteinmuster elektrophoretisch aufgetrennter Seren wurde deutlich, dass sich die 2D-Gele deutlich voneinander unterschieden, je nachdem ob sie vorbehandelt (depletiert) wurden oder nicht (Nativserum).

Dies wird deutlich bei dem Vergleich der folgenden 2D-Gele (Abbildung 24 bis Abbildung 27). Die Albuminbanden bei 60 – 70 kDa (roter Kreis) dominierten das undepletierte Serum (Abbildung 24). Es bestand ohne Depletion die Gefahr, dass *high abundant* Proteine (wie z.B. Albumin) andere Proteine im 2D-Gel überlagern.

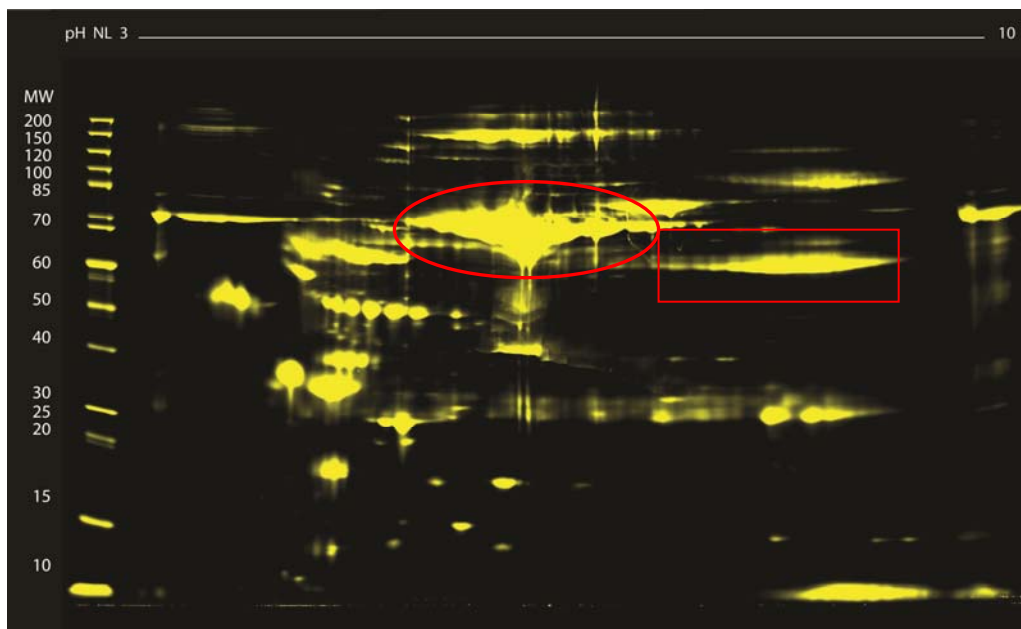


Abbildung 24: Das 2D-Gel zeigt das Proteom eines nicht-depletierten Serums. Auf einem 11 cm IPG-Steifen (pH 3-10, Bio-Rad) wurden 150 µg Protein nach pI-Wert aufgetrennt. Nach der Fokussierung erfolgte die SDS-PAGE zur Auftrennung nach  $M_r$ . In dem 2D-Gel sind vor allem die häufig vorkommenden Serumproteine zu sehen. Es ist dominiert von den Banden des humanen Albumins (roter Kreis) oder von Immunglobulinen (roter Kasten). Es besteht die Gefahr, dass die Sicht auf wenig vorhandene Proteine versperrt ist.



Die nach der (in 2.1.7 beschriebenen) Trennung des Serums entstehenden *low* und *high abundant* Proteinfractionen sind in Abbildung 25 und Abbildung 27 dargestellt.

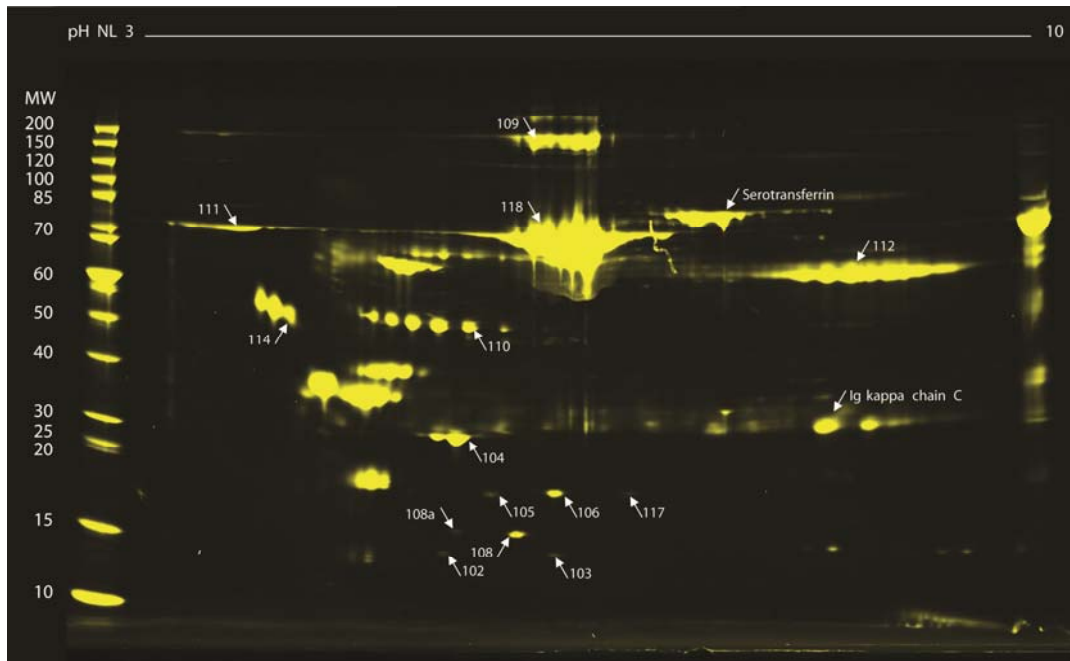


Abbildung 25: Das 2D-Gel zeigt die *high abundant* Proteinfraction von Serum. Nach der Abtrennung der *low abundant* Proteinfraction (Depletion) wurden 150 µg Protein der *high abundant* Fraktion auf einem 11 cm IPG-Steifen (pH 3-10, Bio-Rad) nach pI-Wert aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte die SDS-PAGE zur Auftrennung der Proteine nach  $M_r$ . Das obige 2D-Gel enthält vor allem Albumin und Immunglobuline (*high abundant* Proteine). Durch ihre Anwesenheit können kleine Proteine überlagert werden. Die Identifikation der nummerierten Proteine erfolgte mit MALDI-TOF. Die Ergebnisse der Proteinidentifikation sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Spot	SwissProt ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI [-]	MOWSE [-]	SC[%]	+/-Da
101	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	76	19	0,3
103	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	57	12	0,5
104	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-1	30759	5,56	245	75	0,3
105	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	60	19	0,3
106	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	83	17	0,5
108	TTHY_HUMAN	Transthyretin	15991	5,52	161	73	0,2
108a	TTHY_HUMAN	Transthyretin	15991	5,52	131	65	0,5
109	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	130	25	0,5
110	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	72	26	0,4
111	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	236	50	0,5
112	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C regi	36596	8,46	66	43	0,5
114	A1AG2_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein	23873	4,93	60	23	0,4
<b>117</b>	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	64	21	0,5
118	ALBU_HUMAN	Serum albumin	71317	5,92	152	42	0,4
119	IGKC_HUMAN	IG kappa chain C	36596	7,6	120	39	0,5

Abbildung 26: MADLI-Identifikation der *high abundant* Proteine. Die in Abbildung 25 nummerierten Proteine wurden nach dem Trypsinverdau mit MALDI-TOF (2.1.11) identifiziert. Nun ist die Zuordnung eines im 2D-Gel auffälligen spots zu einem Protein möglich. So wurde z.B. die große Proteinbande mit der Nummer 118 als das *high abundant* Protein Albumin identifiziert.

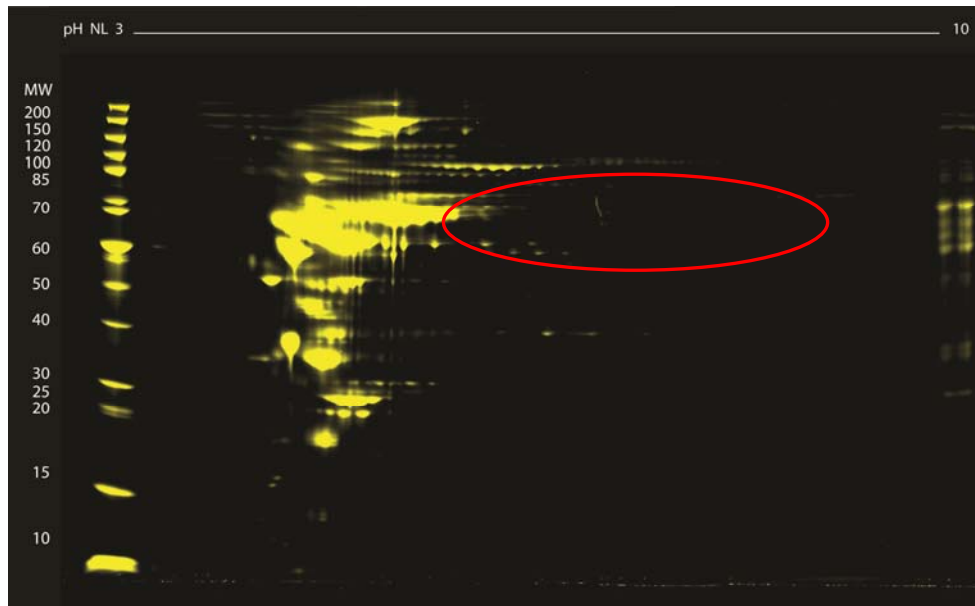


Abbildung 27: Das 2D-Gel zeigt die *low abundant* Fraktion von Serum. Nach der Gewinnung von *low abundant* Proteinen durch Depletion und der Fokussierung von 150 µg Protein auf einem 11 cm IPG-Steifen (pH 3-10, Bio-Rad) und anschließender SDS-PAGE, zeigt sich das Proteinmuster der *low abundant* Proteine. Die Verringerung der Proteinanzahl durch die Abtrennung der häufig vorkommenden Proteine wie Albumin (ursprünglich dort vorhanden, wo im roten Kreis nun keine Proteine zu sehen sind) führt dazu, dass kleinere Proteine im 2D-Gel sichtbar wurden.

Der Vergleich der 2D-Gele zeigte, dass es sinnvoll war alle Seren vor der Proteomanalyse in die zwei Fraktionen zu trennen (Depletion). Damit war es möglich sich ein gutes Bild über Proteinregulationen in der *low abundant* Proteinfraction zu verschaffen. Zur weiteren Optimierung der 2D-Gelqualität wurde in dieser Arbeit die Konzentration und Solubilisierung von Serumproteinen nicht mit Aceton sondern mit Harnstoff vorgenommen. In Vorexperimenten mit Aceton-Proteinfällung gab es Probleme mit der Löslichkeit der Proteinpellets im Lysepuffer und es waren störende Streifen im 2D-Gel sichtbar, die durch Salzverunreinigungen entstanden waren (hier nicht gezeigt). Statt der Acetonfällung kamen zur Konzentrierung und Solubilisierung der Proteine Vivaspin4® Konzentratoren und Harnstoff zum Einsatz (2.1.8.2).

### 3.1.2 Patienten im DIGE-Gel-Vergleich

Die Klassifizierung der Patienten als *responder* und *non-responder* erfolgte anhand der Verbesserung des DAS28 im Vorfeld der Analyse des Serumproteoms. Die fünf im DIGE-Gel untersuchten *responder* waren Frauen im Alter zwischen 47 und 71 Jahren (Mittelwert 59,4). Die Patientinnen hatten sehr unterschiedlich hohe DAS28-Ausgangswerte: Die Werte lagen vor der Therapie zwischen 3,67 und 7,54. Interessant ist, dass die Abnahme des DAS28 bis zum Zeitpunkt V6 in allen Fällen deutlich größer als 1,2 war, so dass bei den *respondern* nach EULAR-Kriterien von einer „guten“ Therapieantwort gesprochen werden kann. Die fünf im DIGE-Gel untersuchten *non-responder* waren zwischen 47 und 72 Jahren alt (Mittelwert 57,4). Die drei Frauen und zwei Männer lagen mit ihren DAS28-Ausgangswerten sehr dicht beieinander (zwischen 4,57 und 5,73). Sie blieben trotz ETA-Therapie größer als 4,49.



## 3.2 Überblick über die Ergebnisse der Proteomanalyse

Bei der Suche eines Biomarkers für das Ansprechen auf eine Therapie mit ETA sind mehrere Proteine bei der Proteomanalyse aufgefallen. Die Abbildung 28 dient als Überblick über die Ergebnisse der Proteomicsuntersuchung der Arbeit „Analyse prognostischer Faktoren für die TNF $\alpha$ -Antagonisten-Therapie bei Rheumatoider Arthritis“.

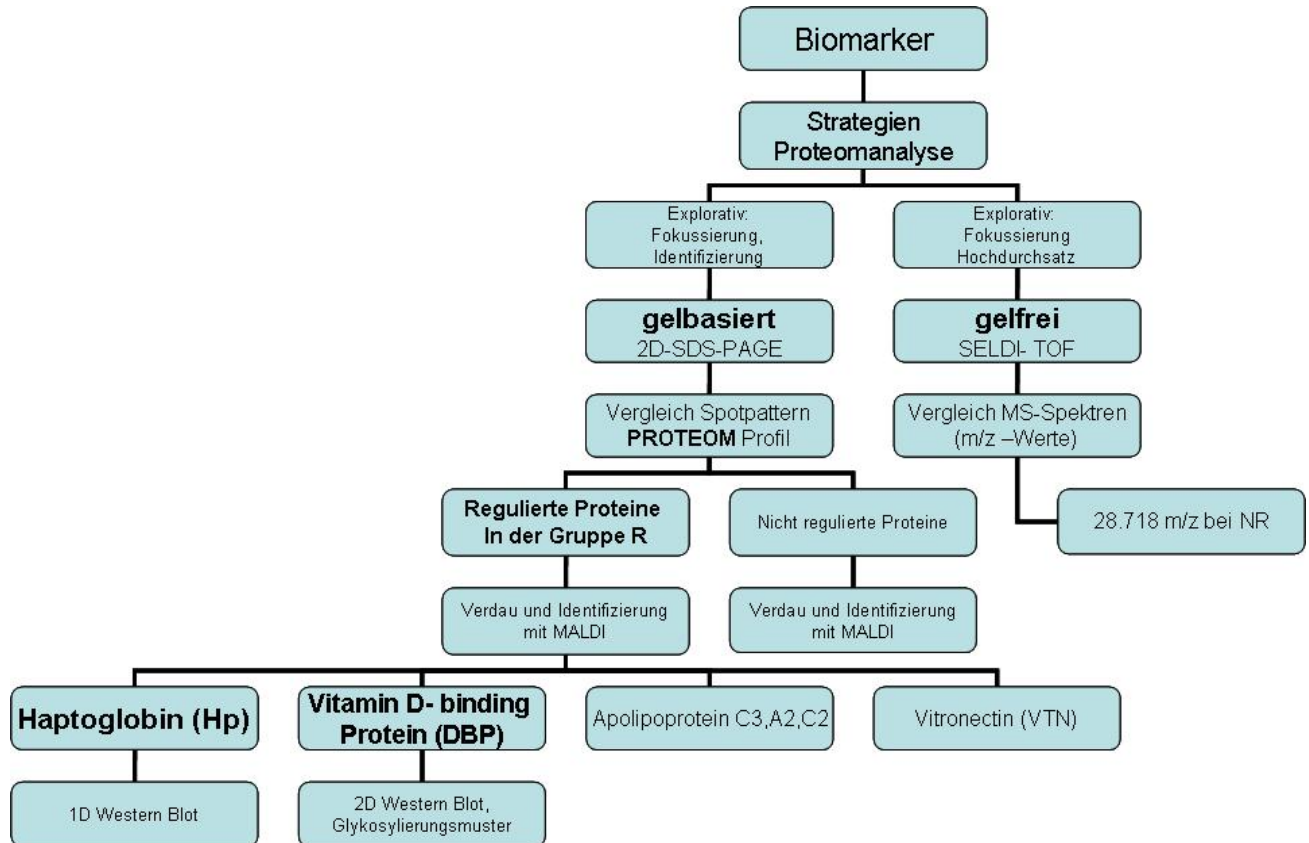


Abbildung 28: Übersicht zu den Ergebnissen der Laborarbeiten.

In der vorliegenden Arbeit wurden gelfreie und gelbasierte Proteomicsmethoden zur Detektion eines Biomarkers benutzt. Im DIGE-Gel, im WB und in der SELDI-Analyse wurden Proteine detektiert, die potentiell *responder* von *non-responder* unterscheiden können.

In den 2D-DIGE-Gelen waren die Proteine Vitamin-D-binding Protein, Haptoglobin, Vitronectin,  $\alpha_1$ -Antitrypsin und verschiedene Apolipoproteine bei den *respondern* vermehrt vorhanden.

Im 2D-WB zeigte sich ein charakteristisches Glykosylierungsmuster des Vitamin-D-binding Protein.

Außerdem war in der SELDI-Untersuchung zum Zeitpunkt V0 das Protein mit dem Wert 28.718 m/z charakteristisch für die *non-responder*.

In den nächsten Abschnitten werden zunächst zwei DIGE-Gele gezeigt (V0 und V6), die zur Analyse der Proteinregulation herangezogen wurden. Aus den DIGE-Gelen V5 und V6 wurden die Serumproteine mit MALDI identifiziert und werden hier vorgestellt.

### 3.2.1 Gelbasierte Proteomics

Die DIGE-Gele (Abbildung 29 und Abbildung 30) zeigen das Serumproteomprofil vor dem Beginn der ETA-Therapie und am Studienende. Die Gele zeigen, dass sich das Proteomprofil unter ETA-Therapie verändert und dass bei Serumproteinen Regulationen vorliegen.

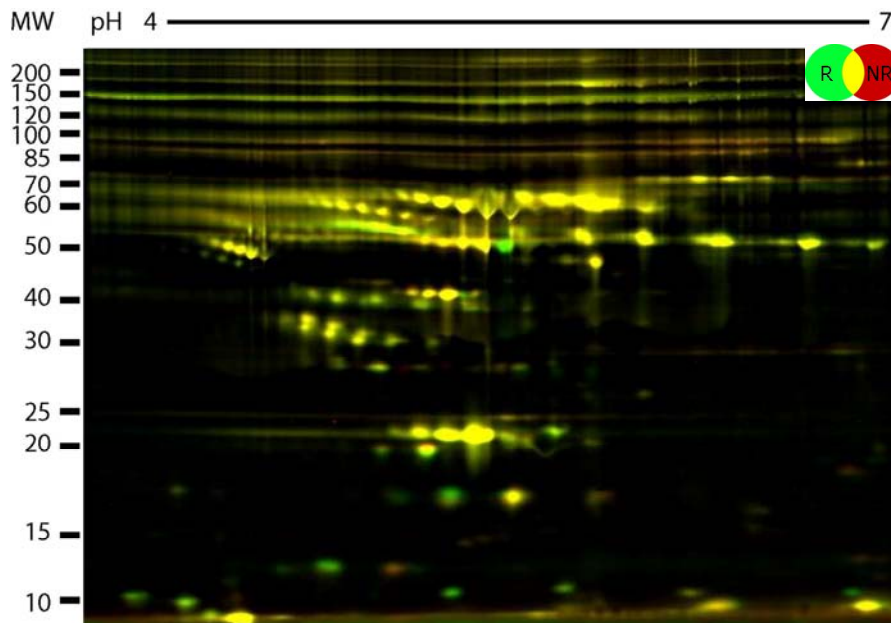


Abbildung 29: Proteomprofil der *responder* und *non-responder* vor Therapiebeginn (V0). Zur Erstellung des DIGE-Gels wurden 50 µg Protein mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt und auf einem 11 cm IPG-Steifen (pH 4-7, Bio-Rad) fokussiert. Nach der SDS-PAGE und dem Einscannen wurde ein Farbcode festgelegt: In dem DIGE-Gel sind die Proteine der *responder* grün, die *non-responder* rot und gleich viel vorhandene Proteine gelb dargestellt. Es sind einige grüne Proteine im 2D-Gel auffällig, die nur bei den *respondern* vorhanden sind. Diese Auffälligkeit vor dem Beginn der ETA-Therapie zeichnet die *responder* aus.

Im Vergleich zum Analysezeitpunkt vor der ETA-Therapie zeigte das DIGE-Gel in Woche 24 der Therapie (V6) ein anderes Proteomprofil (Abbildung 30).

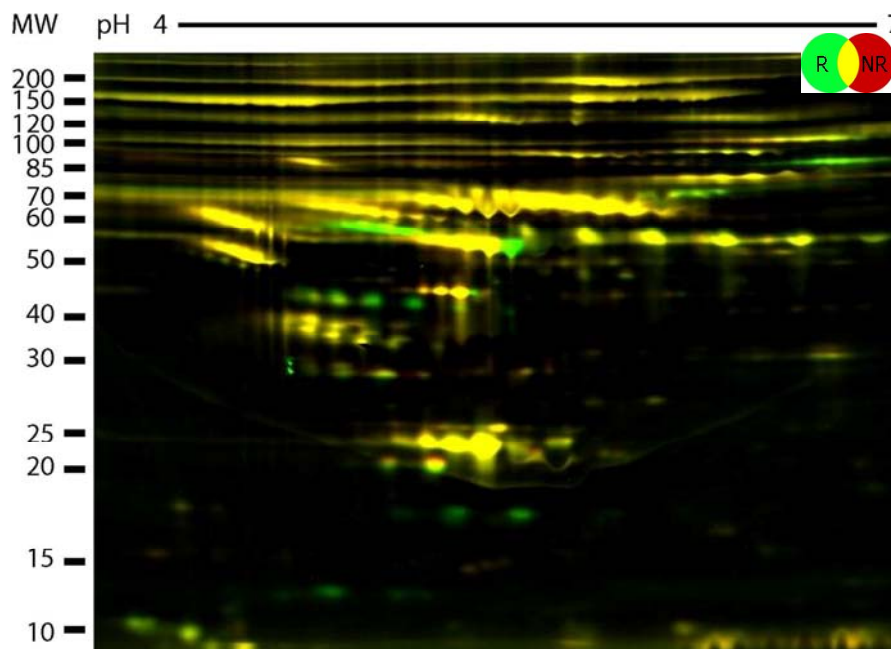


Abbildung 30: Proteomprofil der *responder* und *non-responder* unter ETA-Therapie (V6). Zur Erstellung des DIGE-Gels wurden 50 µg Protein mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt und auf einem 11 cm IPG-Steifen (Bio-Rad, pH 4-7) fokussiert. Nach der SDS-PAGE und dem Einscannen wurde ein Farbcode festgelegt: In dem DIGE-Gel sind die Proteine der *responder* grün, die *non-responder* rot und gleich viel vorhandene Proteine gelb dargestellt. Zum Zeitpunkt V6 sieht das Proteinmuster anders aus als vor der ETA-Behandlung. Es sind bei den *respondern* sowohl neue Proteine vermehrt, als auch einige Proteine weniger vorhanden.

---

Es gab folgende Unterschiede zwischen den Analysezeitpunkten V0 und V6:

Es gab Proteine, die bei den *respondern* und *non-respondern* gleichmäßig vorhanden waren. Sie erschienen im DIGE-Gel gelb und boten vor der ETA-Therapie keine Möglichkeit die beiden Gruppen zu unterscheiden. Im Verlauf der Therapie war dann das Protein aber bei den *respondern* vermehrt vorhanden und bot nun die Möglichkeit die *responder* zu erkennen.

Es gab auch die Variante, dass ein Protein bereits vor der ETA-Behandlung vermehrt bei den *respondern* vorhanden war und somit zur Unterscheidung von *respondern* und *non-respondern* nutzbar war. Im Verlauf der Therapie blieb die Proteinregulation bestehen oder nahm ab.

Um die regulierten Proteine konkret benennen zu können, wurden die Proteine aus den DIGE-Gelen identifiziert.

Es folgt zunächst die Darstellung der Proteinidentifikation und dann die statistische Auswertung der Proteinregulation.

Der Begriff „*spot*“ steht für ein aus dem 2D-Gel ausgeschnittenes und identifiziertes Protein.

Ein Teil der Proteinidentifikation erfolgte am MALDI-TOF Gerät der Proteomics AG im UMG und nach Protokoll der Proteomics AG (Dihazi et al. 2009).

Nach einem anderen Protokoll wurden außerdem zur Verifizierung der Identifizierungsergebnisse die Proteine aus drei DIGE-Gelen im Max-Planck Institut Göttingen identifiziert (Jahn et al. 2006).

### **3.2.2 Identifizierung der Serumproteine mit MALDI**

Anschaulich sind Proteinregulationen (verstärkt oder vermindert) in einem unterschiedlichen Proteinmuster in 2D-DIGE-Gelen. Die DIGE-Gele wurden zur Visualisierung des Proteomprofils eingescannt, in einem dreifarbigem Farbcode digitalisiert und eine quantitative Auswertung der normierten Spotintensitäten mit 2D-Delta durchgeführt.

Nach der Erstellung von 2D-Gelen (z.B. das 2D-Gel in Abbildung 31) erfolgte die massenspektrometrische Identifikation der Proteine mit MALDI-TOF (2.1.11).

Aus sechs DIGE-Gelen und zwei Gelen mit Flamingofärbung wurden insgesamt 229 Proteine identifiziert. Es wurden 35 verschiedene Proteine gefunden. Nicht alle Identifikationsergebnisse werden in dieser Arbeit gezeigt.

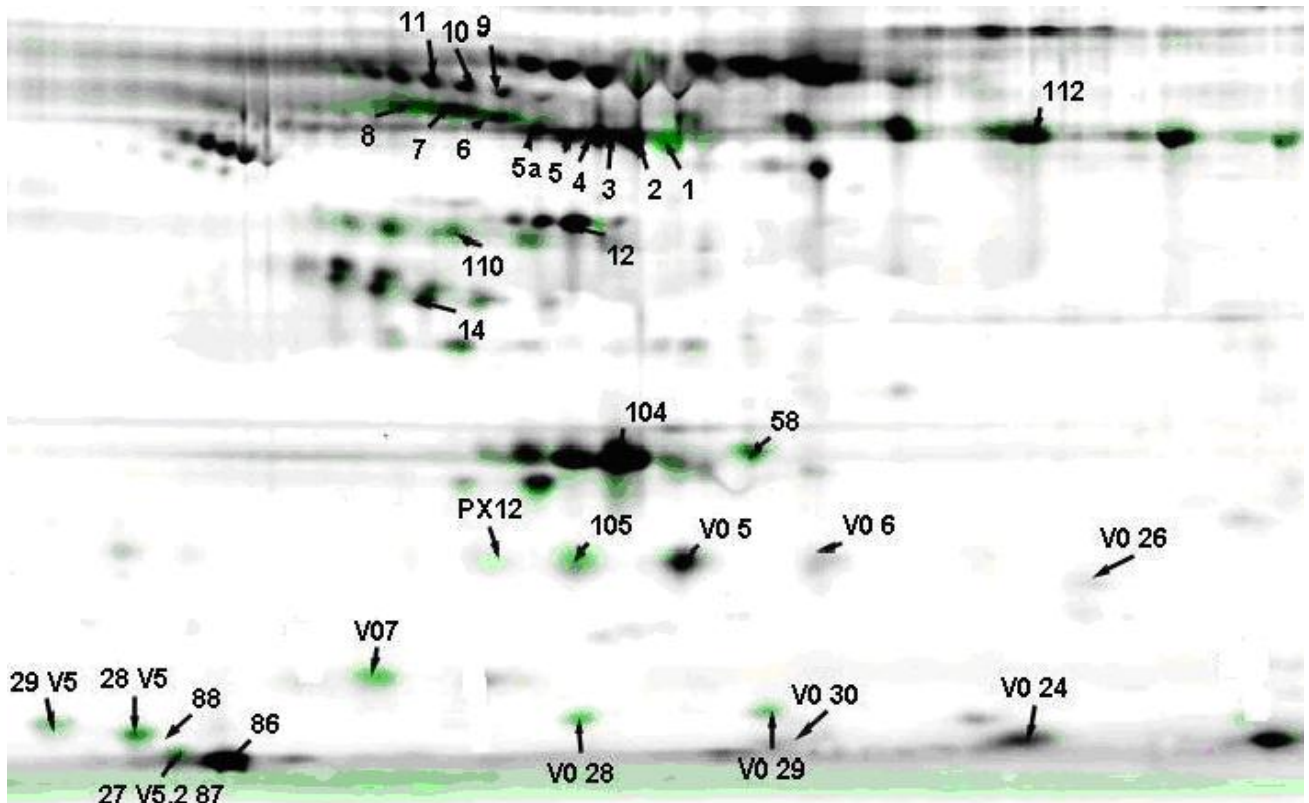


Abbildung 31: Proteinidentifikation der Proteine aus dem DIGE-Gel V0 mit MALDI-TOF. Zur Erstellung des DIGE-Gels wurden 50 µg Protein mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt und auf einem 11 cm IPG-Steifen (pH 4-7, Bio-Rad) fokussiert. Nach der SDS-PAGE und dem Einscannen wurde ein Farbcode festgelegt: Die vermehrt vorhandenen Proteine der *responder* erscheinen grün, während die gleichmäßig vorhandenen Proteine schwarz angefärbt sind. Die einzelnen Proteine wurden zur Identifikation nummeriert und mit MALDI identifiziert. Tabelle 6 zeigt die Identifikationsergebnisse. Es ist auffällig, dass die Proteinnummern 1-5a alle das Ergebnis Vitamin-D-binding Protein ergaben, obwohl die Spots im Gel an unterschiedlicher Position aufzufinden waren. Auch die Protein 9-11 (Kinninogen) und 6-8 ( $\alpha_1$ -Antitrypsin) ergaben gleiche Identifikationsergebnisse. Es handelt sich hierbei um Proteinisoformen, die sich nur minimal in ihrem pI-Wert unterscheiden. Sie entstehen wenn Proteine posttranslational modifiziert werden und unterschiedlich geladene Proteinseitenketten haben. Es ändert sich dann die Ladung des Proteins, während das Molekulargewicht gleich bleibt (Seo and Lee 2004). Speziell bei den Isoformen des Vitamin-D-binding Proteins handelt es sich um Unterschiede im Grad der Proteinglykosylierung. Aufgrund von Proteinisoformen wurden insgesamt mehr Proteine mit MALDI analysiert als verschiedene Proteine identifiziert werden konnten.

Tabelle 6: Identifizierung der Proteinspots.  
Ein MOWSE-Wert >55 zeigt Proteinidentität an.

Spot	SwissProt ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI [-]	MOWSE [-]
V0 5	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45177	6,13	75
V0 6	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45177	6,13	103
V07	HPT_HUMAN	Haptoglobin related	38983	6,13	59
V012	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A4	45371	5,28	830
V014	CLUS_HUMAN	Clusterin	52461	6,02	91
V024	SAA_HUMAN	Serum Amyloid A Protein	13524	7,9	37
V026	HPT_HUMAN	Haptoglobin-related	38983	6,13	74
V028	HPT_HUMAN	Haptoglobin-related	38983	6,13	99
V029	HPT_HUMAN	Haptoglobin-related	38983	6,13	87
V030	SAA_HUMAN	Serum Amyloid A Protein	13524	6.28	41

Spot	SwissProt ID	Protein Beschreibung	Masse [Da]	pI [-]	MOWSE [-]	SC[%]
1	VTDB_HUMAN	Vitamin-D-binding Protein	54526	5,4	68	24
2	VTDB_HUMAN	Vitamin-D-binding Protein	54526	5,4	58	21
3	VTDB_HUMAN	Vitamin-D-binding Protein	54526	5,4	98	23
4	VTDB_HUMAN	Vitamin-D-binding Protein	54526	5,4	198	51
5	VTDB_HUMAN	Vitamin-D-binding Protein	54526	5,4	128	39
5a	VTDB_HUMAN	Vitamin-D-binding Protein	54526	5,4	101	26
6	A1AT_HUMAN	$\alpha$ -1-antitrypsin	46878	5,37	144	48
7	A1AT_HUMAN	$\alpha$ -1-antitrypsin	46878	5,37	212	63
8	A1AT_HUMAN	$\alpha$ -1-antitrypsin	46878	5,37	95	30
9	KNG_HUMAN	Kininogen-1	72996	6,34	94	22
10	KNG_HUMAN	Kininogen-1	72996	6,34	60	22
11	KNG_HUMAN	Kininogen-1	72996	6,34	90	27
12	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,92	176	49
21	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,92	164	43
22	ALBU_HUMAN	Serum Albumin	71317	5,92	195	47
27	APOC2_HUMAN	Apolipoprotein C-2	11277	4,72	72	59
28	APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C3	10845	5,23	32	27
29	VTNC_HUMAN	Vitronektin	54271	5,5	107	25
105	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	60	19
110	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45861	6,13	72	26
112	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region C	36596	8,46	66	43



Abbildung 32 zeigt ein DIGE-Gel zum Zeitpunkt V6. Aus diesem Gel wurden 60 Proteinspots ausgeschnitten und im MPI Göttingen nach Protokoll von Jahn et al. 2006, S.94ff identifiziert.

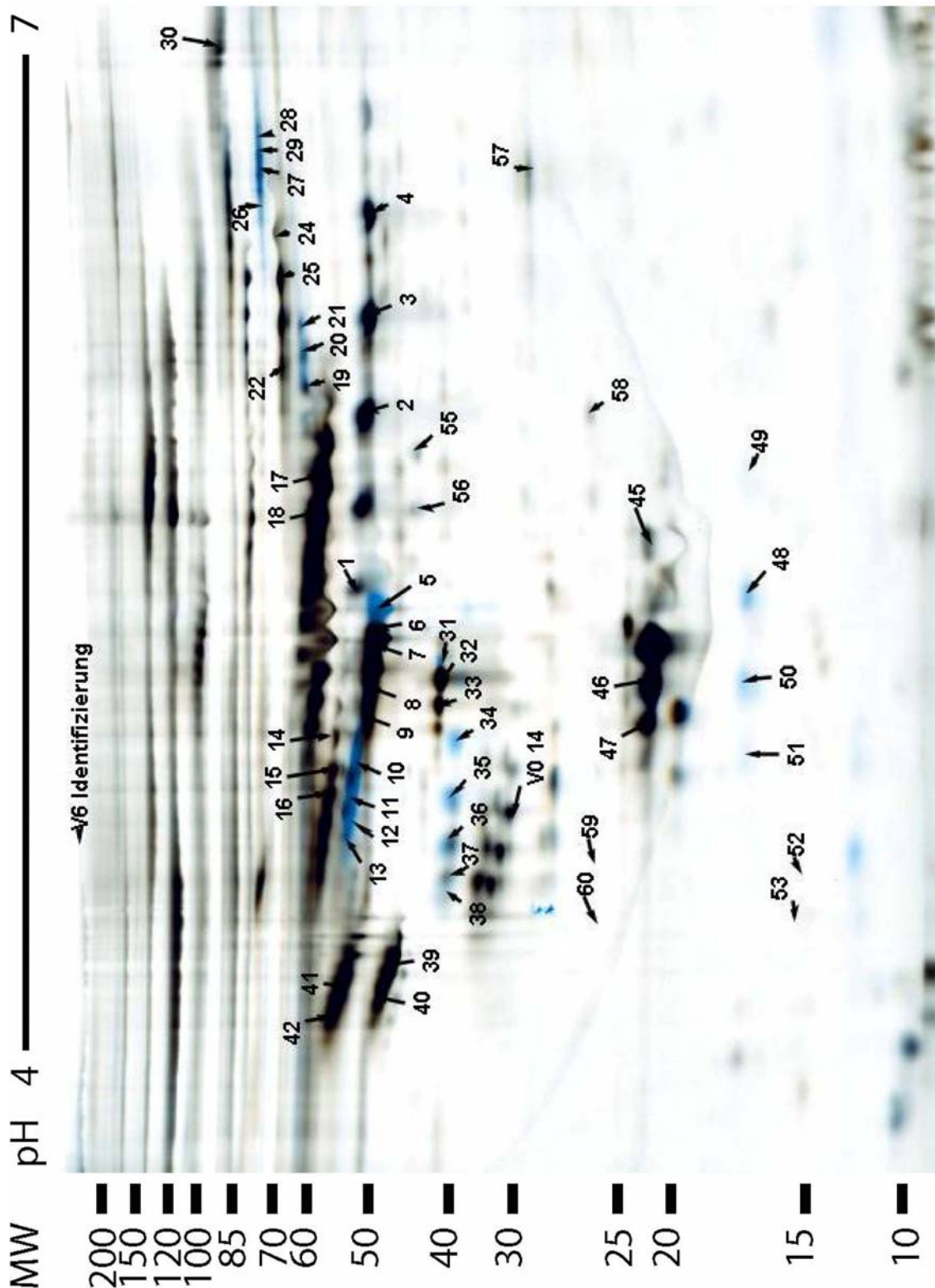


Abbildung 32: DIGE-Gel zur Identifizierung der Proteinspots zum Zeitpunkt V6. Zur Erstellung des DIGE-Gels wurden 50 µg Protein mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt und auf einem 11 cm IPG-Steifen (pH 4-7, Bio-Rad) fokussiert. Nach der SDS-PAGE und dem Einscannen wurde der Farbcode so festgelegt, dass die vermehrt vorhandenen Proteine der *responder* blau dargestellt sind. Gleichmäßig vorhandene Proteine sind schwarz dargestellt. Die MPI-Ergebnisse bestätigen die eigenen Identifikationen. Es zeigten sich erneut Proteinisoformen des Vitamin-D-binding-Protein. Dies liegt bei den *respondern* stark vermehrt vor und gibt ein tief blaues Signal. Die Identifikationsergebnisse zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7: Identifikationsliste für die Proteine aus Abbildung 32.

V6 Spots	1-60	Reck 2, S 40										
number	Protein name	Gene name	UniProtKB	Swiss-Prot	Mass	CPI	PMF-Score	PMF SC	MS/MS Score	MS/MS Sequ	Peptides	
1	Beta-2-glycoprotein 1	APOH	P02749	APOH_HUMAN	39584	8.34	119	65	109	11	2	
2	Beta-2-glycoprotein 1	APOH	P02750	APOH_HUMAN	39584	8.34	105	61	11	15	3	
3	Beta-2-glycoprotein 1	APOH	P02751	APOH_HUMAN	39584	8.34	133	62	172	15	3	
4	Beta-2-glycoprotein 1	APOH	P02752	APOH_HUMAN	39584	8.34	168	64	173	15	3	
5	Vitamin D-binding protein	GC	P02774	VTDB_HUMAN	54526	5.4	288	68	161	10	2	
6	Vitamin D-binding protein	GC	P02774	VTDB_HUMAN	54526	5.4	301	68	289	14	4	
7	Vitamin D-binding protein	GC	P02774	VTDB_HUMAN	54526	5.4	316	68	335	14	4	
8	Vitamin D-binding protein	GC	P02775	VTDB_HUMAN	54526	5.4	322	70	197	10	3	
9	Vitamin D-binding protein	GC	P02776	VTDB_HUMAN	54526	5.4	195	68	169	14	3	
10	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	P01009	A1AT_HUMAN	46878	5.37	213	56	266	12	3	
11	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	P01009	A1AT_HUMAN	46878	5.37	247	63	194	9	2	
12	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	P01009	A1AT_HUMAN	46878	5.37	196	51	131	9	2	
13	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	P01009	A1AT_HUMAN	46878	5.37	175	51	178	11	3	
14	Kininogen-1	KNG1	P01042	KNG1_HUMAN	72996	6.34	140	26	35	6	3	
15	Kininogen-1	KNG1	P01042	KNG1_HUMAN	72996	6.34	116	27	134	7	3	
16	Kininogen-1	KNG1	P01042	KNG1_HUMAN	72996	6.34	114	26	111	4	2	
17	Hemopexin	HPX	P02790	HEMO_HUMAN	52385	6.55	246	59	226	12	4	
18	Hemopexin	HPX	P02790	HEMO_HUMAN	52385	6.55	235	58	194	8	3	
19	Apolipoprotein C-III	APOC3	P02656	APOC3_HUMAN	10845	5.23			176	27	2	
20	Apolipoprotein C-III	APOC3	P02656	APOC3_HUMAN	10845	5.23			125	27	2	
21	uncertain											
22	Antithrombin-III	SERPINC1	P01008	ANT3_HUMAN	53025	6.32	99	43	61	2	1	
23	uncertain											
24	Antithrombin-III	SERPINC1	P01008	ANT3_HUMAN	53025	6.32	111	40	99	10	2	
25	Antithrombin-III	SERPINC1	P01008	ANT3_HUMAN	53025	6.32	143	43	109	5	2	
26	Serotransferrin	TF	P02787	TRFE_HUMAN	79280	6.81	241	44	36	4	1	
27	Serotransferrin	TF	P02787	TRFE_HUMAN	79280	6.81	266	56	58	2	1	
28	Serotransferrin	TF	P02787	TRFE_HUMAN	79280	6.81	260	45	64	3	1	
29	Serotransferrin	TF	P02787	TRFE_HUMAN	79280	6.81	314	50	46	4	1	
30	Plasminogen	PLG	P00747	PLMN_HUMAN	93247	7.04	375	60	130	5	3	
31	Apolipoprotein A-IV	APOA4	P06727	APOA4_HUMAN	45371	5.28	361	57	173	13	4	
32	Apolipoprotein A-IV	APOA4	P06727	APOA4_HUMAN	45371	5.28	313	66	307	13	4	
33	Apolipoprotein A-IV	APOA4	P06727	APOA4_HUMAN	45371	5.28	278	61	292	13	4	
34	Haptoglobin	HP	P00738	HPT_HUMAN	45861	6.13	74	27	64	5	2	
35	Zinc-alpha-2-glycoprotein	AZGP1	P25311	ZA2G_HUMAN	34079	5.57	159	51	94	12	2	
36	Hemopexin	HPX	P02790	HEMO_HUMAN	52385	6.55	139	51	61	4	2	
37	Zinc-alpha-2-glycoprotein	AZGP1	P25311	ZA2G_HUMAN	34079	5.57	132	58	22	11	0	
38	Zinc-alpha-2-glycoprotein	AZGP2	P25311	ZA2G_HUMAN	34079	5.57	84	42	55	7	1	
39	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	P02765	FETUA_HUMAN	40098	5.43	85	38	247	9	3	
40	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	P02765	FETUA_HUMAN	40098	5.43	83	38	237	9	3	
41	Alpha-1-antichymotrypsin	SERPINA3	P01011	AACT_HUMAN	47792	5.33	207	45	201	10	3	
42	Alpha-1-antichymotrypsin	SERPINA3	P01011	AACT_HUMAN	47792	5.33	146	47	204	10	4	
43	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG	P04217	A1BG_HUMAN		5.58	151	49				
44	uncertain											
45	Apolipoprotein A-I	APOA1	P02647	APOA1_HUMAN	30759	5.5	201	63	255	18	4	
46	Apolipoprotein A-I	APOA1	P02647	APOA1_HUMAN	30759	5.5	186	61	187	16	4	
47	Apolipoprotein A-I	APOA1	P02647	APOA1_HUMAN	30759	5.5	200	64	206	16	4	
48	Haptoglobin	HP	P00738	HPT_HUMAN	45861	6.13	67	18	30	6	1	
49	Haptoglobin	HP	P00738	HPT_HUMAN	45861	6.13			123	18	1	
50	uncertain											
51	uncertain											
52	Beta-lactoglobulin	GN=LGB	P02754	LACB_BOVIN	20269	4.93	114	73	157	12	2	
53	Beta-lactoglobulin	GN=LGB	P02754	LACB_BOVIN	20269	4.93	96	71	191	23	2	
54	Apolipoprotein A-I	GN=APOA1	P02647	APOA1_HUMAN	30759	5.5	200	65	177	12	3	
55	Complement factor I	GN=CFI	P05156	CFAI_HUMAN	68071	7.72	98	29	75	6	2	
56	Complement factor I	GN=CFI	P05156	CFAI_HUMAN	68071	7.72	79	27	132	27	2	
57	Complement C4-A	GN=C4A	1618	CO4A_HUMAN	194247	6.65	69	13	96	2	2	
58	uncertain											
59	uncertain											
60	uncertain											

Es wurde unter den 229 identifizierten Proteinen bei elf Proteinen eine vermehrte Proteinexpression gefunden. Davon waren sieben Proteine um mindestens das Doppelte mehr im Serum der *responder* vorhanden.



### 3.2.2.1 Proteomanalyse zur Biomarkeridentifikation vor Beginn der ETA-Behandlung (V0)

Die DIGE-Gele vor Behandlungsbeginn (V0) zeigten Proteinexpressionsunterschiede bei Vitamin-D-binding Protein (DBP), Haptoglobin, Vitronektin (VTN)- und Apolipoprotein C3-Fragmenten (Abbildung 33).

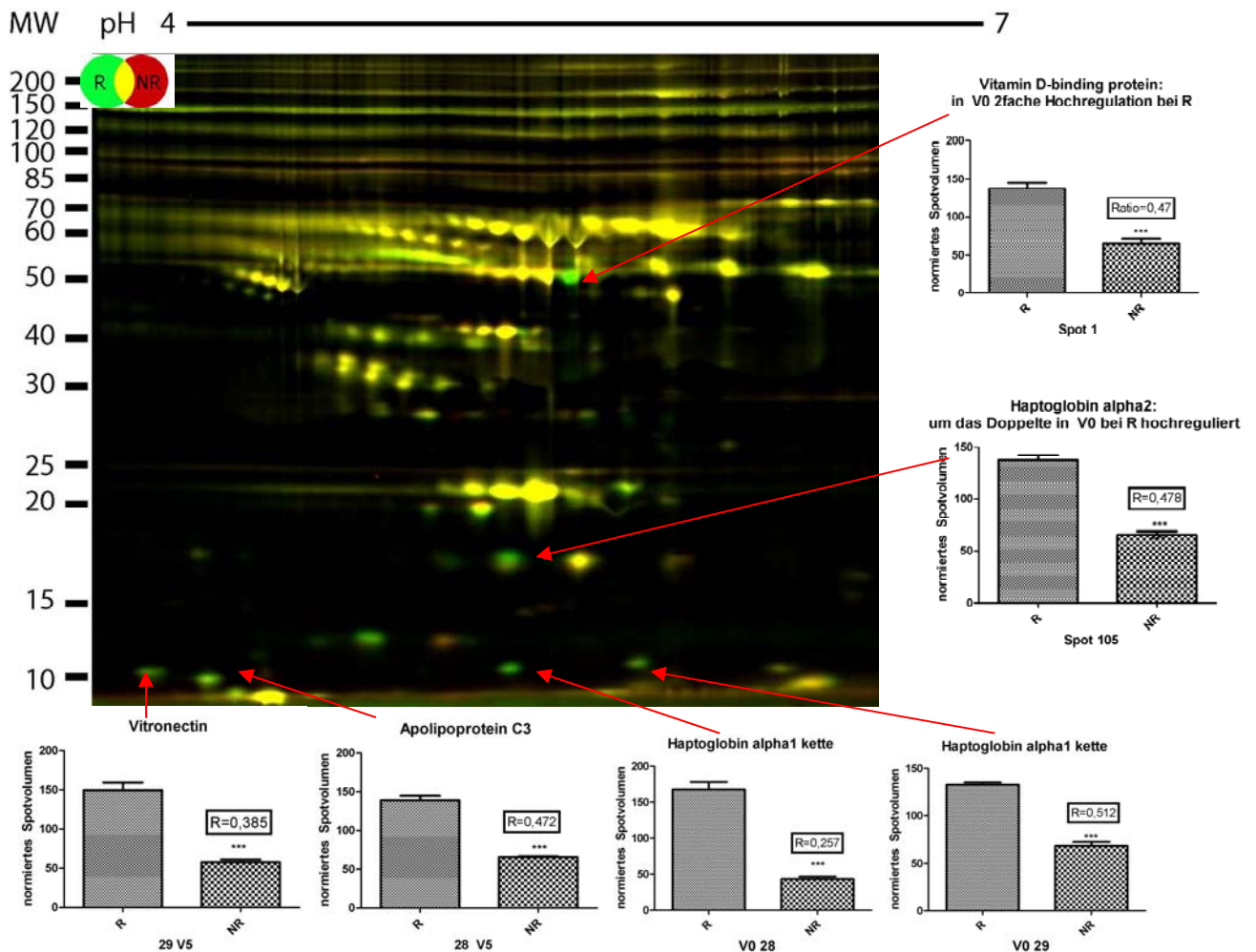


Abbildung 33: Analyse des Serumproteoms zum Zeitpunkt V0 im DIGE-Gel. Zur Erstellung des DIGE-Gels wurden 50 µg Protein mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt und auf einem 11 cm IPG-Steifen (pH 4-7, Bio-Rad) fokussiert. Nach der SDS-PAGE und dem Einscannen wurde der Farbcode so festgelegt, dass die *responder* grün, die *non-responder* rot und gleich stark vorhandene Proteine gelb dargestellt sind. Die Spotnummerierung bezieht sich auf Abbildung 31 auf S. 55.

Es sind die normierten Spotvolumen von *respondern* und *non-respondern* graphisch aufgetragen. Das Verhältnis (R) bezieht sich auf den Quotienten der beiden Mittelwerte und gibt die relativen Expressionsunterschiede an. Als Kriterium für eine signifikante Proteinregulation galt ein Quotient der normierten Spotintensitäten ( $< 0.5$ ) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von mindestens 0.05.

Die Patientengruppe *responder* zeigte beim Vitamin-D-binding Protein eine zweifache Zunahme der Regulation mit einem Verhältnis (R) von 0.47 ( $p = 0,001$ ). Das bedeutet, dass das Vitamin-D-binding Protein bei den *respondern* doppelt so viel vorhanden ist.

Außerdem vermehrt vorhanden sind bei den *respondern* folgende Proteine: Vitronektin-Fragment (R= 0.38), Apolipoproteinfragment C3 (R= 0.4), Haptoglobin- $\alpha_1$ -Kette (R= 0.25), Haptoglobin- $\alpha_2$ -Kette (R= 0.47).

Es fielen im DIGE-Gel auch Proteinfragmente von Apolipoprotein A2 und C2 bei den *respondern* auf, welche aber in der statistischen Auswertung nicht signifikant reguliert waren.



### 3.2.2.2 Proteomanalyse zur Biomarkeridentifikation unter ETA-Behandlung (Woche 12, V5)

Das Proteomprofil veränderte sich seit dem Therapiebeginn. Nach 12 Wochen ETA-Therapie (V5) zeigten sich im unteren Gel-Bereich keine Proteinregulationen mehr (Abbildung 34).

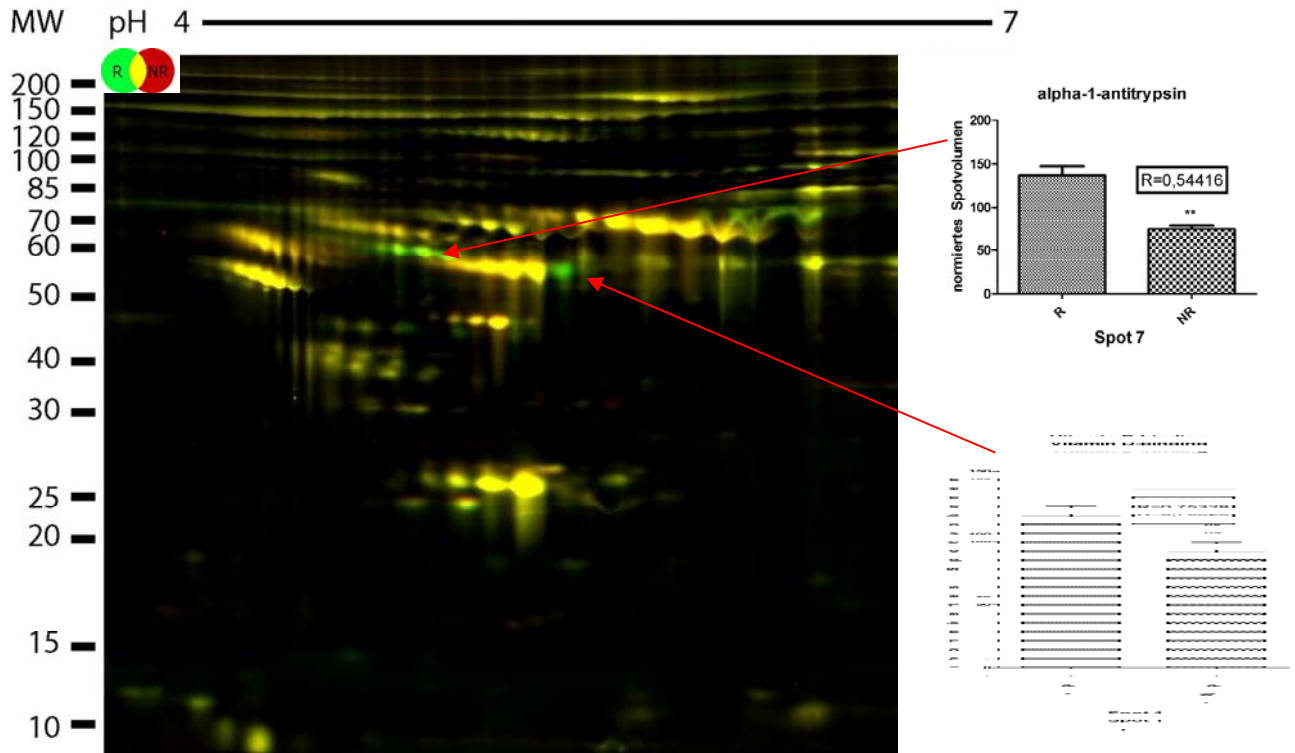


Abbildung 34: Analyse des Serumproteoms zum Zeitpunkt V5 im DIGE-Gel. Zur Erstellung des DIGE-Gels wurden 50 µg Protein mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt und auf einem 11 cm IPG-Steifen (pH 4-7, Bio-Rad) fokussiert. Nach der SDS-PAGE und dem Einscannen wurde der Farbcode so festgelegt, dass die *responder* grün, die *non-responder* rot und gleich stark vorhandene Proteine gelb dargestellt sind. Die Nummerierung bezieht sich auf Abbildung 31 auf S. 55. Es wurden die normierten Spotvolumina von *respondern* und *non-respondern* graphisch aufgetragen. Das Verhältnis (R) bezieht sich auf den Quotienten der beiden Mittelwerte und gibt die relativen Expressionsunterschiede an. Als Kriterium für eine signifikante Proteinregulation galt ein Quotient der normierten Spotintensitäten ( $< 0.5$ ) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von mindestens 0.05.

Zum Zeitpunkt V5 zeigte sich keine statistisch signifikante Regulation beim Vitamin-D-binding Protein ( $R= 0.75$ ).

Das Protein  $\alpha_1$ -Antitrypsin liegt auf der Regulationsgrenze ( $R= 0.544$ ). Es erscheint als neues auffälliges Protein bei den *respondern*.

Im unteren Gelbereich sind keine Proteine mehr auffällig. Die noch in V0 dort vorhandenen Proteine sind nicht mehr nachweisbar, was an einer Abnahme der Proteinregulation liegt.

### 3.2.2.3 Proteomanalyse zur Biomarkeridentifikation unter ETA-Behandlung (Woche 24, V6)

Im DIGE-Gel unter ETA-Therapie (V6, Abbildung 35) stellt sich das Proteomprofil wiederum verändert dar. Im unteren Gel-Bereich sind wieder signifikante Proteinregulationen sichtbar und es kommt mit dem Protein  $\alpha_1$ -Antitrypsin ein neues charakteristisches Protein bei den *respondern* dazu.

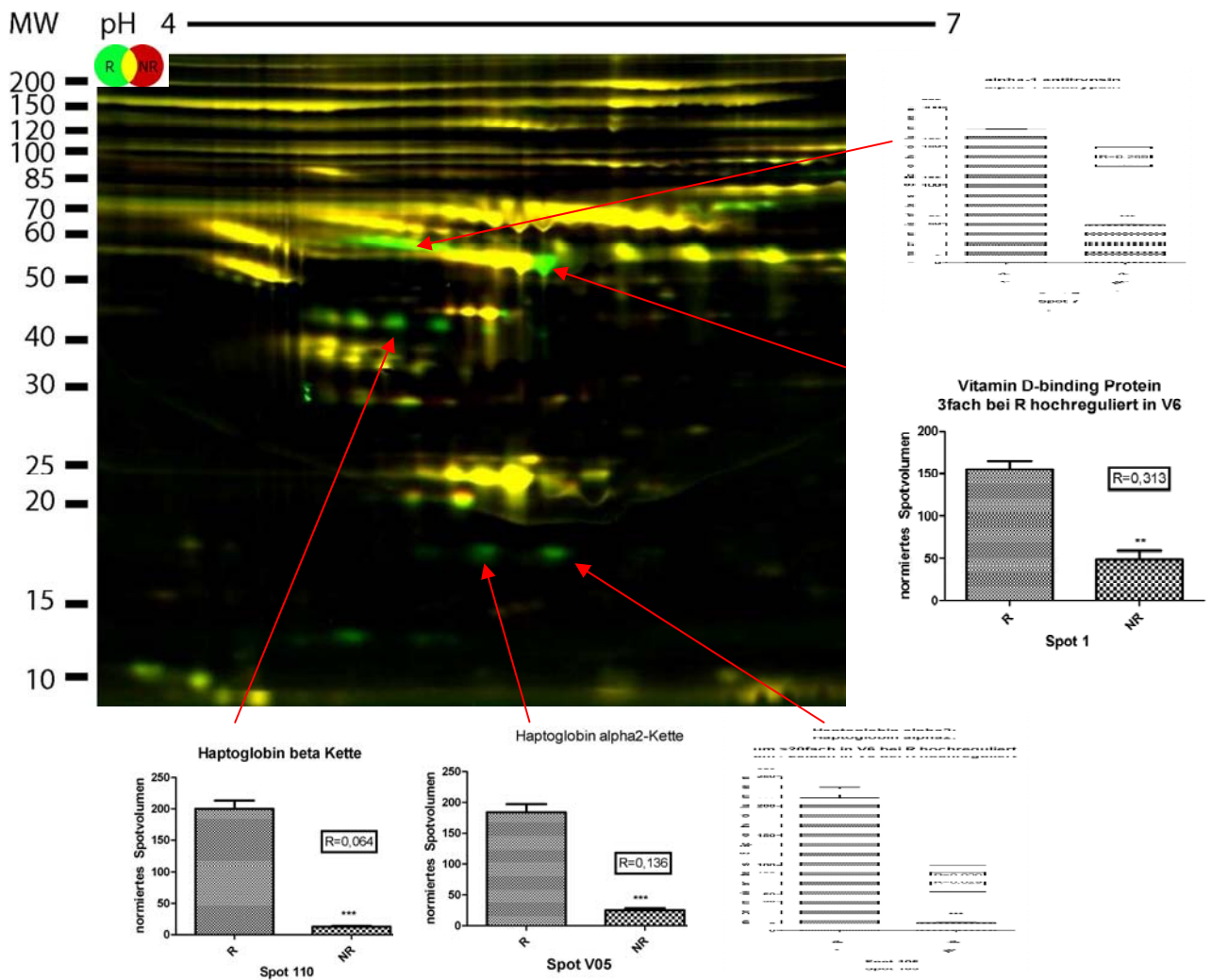


Abbildung 35: Analyse des Serumproteoms zum Zeitpunkt V6 im DIGE-Gel.

Zur Erstellung des DIGE-Gels wurden 50  $\mu$ g Protein mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt und auf einem 11 cm IPG-Steifen (pH 4-7, Bio-Rad) fokussiert. Nach der SDS-PAGE und dem Einscannen wurde der Farbcode so festgelegt, dass die *responder* grün, die *non-responder* rot und gleich stark vorhandene Proteine gelb dargestellt sind. Die Nummerierung bezieht sich auf Abbildung 31 auf S. 55.

Es sind die normierten Spotvolumen von *respondern* und *non-respondern* graphisch aufgetragen. Das Verhältnis (R) bezieht sich auf den Quotienten der beiden Mittelwerte und gibt die relativen Expressionsunterschiede an. Als Kriterium für eine signifikante Proteinregulation galt ein Quotient der normierten Spotintensitäten ( $< 0.5$ ) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von mindestens 0.05. Zum Zeitpunkt V6 waren die Proteine DBP ( $R = 0.313$ ), Haptoglobin  $\alpha_2$ -Kette ( $R = 0.029$ ) und ( $R = 0.136$ ), Haptoglobin  $\beta$ -Kette ( $R = 0.06$ ) und  $\alpha_1$ -Antitrypsin ( $R = 0.269$ ) bei den *respondern* vermehrt vorhanden. Das Protein  $\alpha_1$ -Antitrypsin kommt als neues reguliertes Protein bei den *respondern* dazu und charakterisiert die *responder*.

Im unteren Gelbereich waren keine signifikanten Regulationen zu verzeichnen, wie das Verhältnis (R) aus der statistischen Auswertung anzeigte: Apolipoprotein A1 (Spot 104,  $R = 0.9$ ), Apolipoprotein A2 (Spot 86,  $R = 0.95$ ), Apolipoprotein C2 (Spot 27,  $R = 0.83$ ), Apolipoprotein C3 (Spot 28,  $R = 0.7$ ). Vitronektin (Spot 29) ist gar nicht mehr nachweisbar.

Zusammenfassend zeigt Abbildung 36, dass die Proteinregulation der zu unterscheidenden Patienten vor der Therapie unterschiedlich ist und sie sich unter der Therapie verändert.

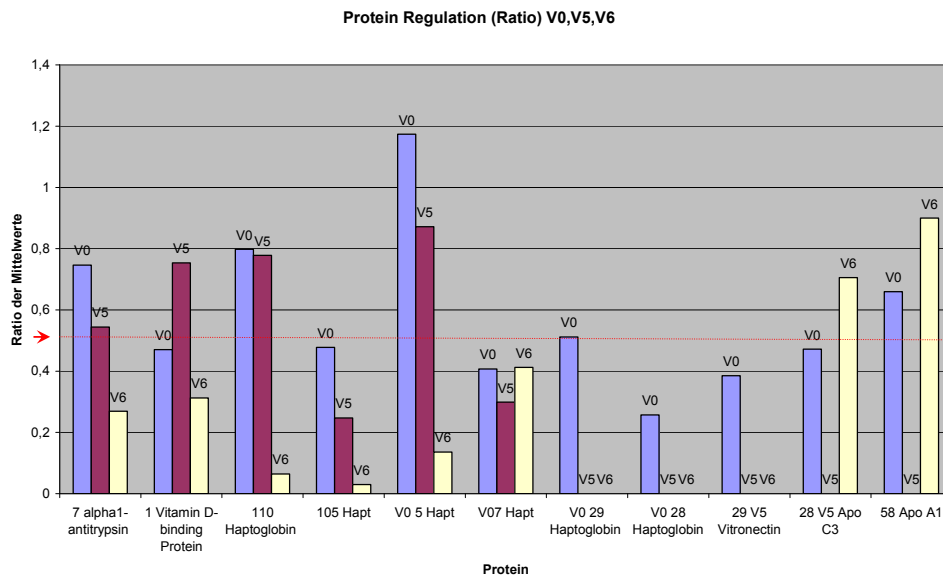


Abbildung 36: Darstellung der Regulation elf im Therapieverlauf regulierter Proteine. Auf der x-Achse sind die Proteine zu den drei Zeitpunkten V0, V5 und V6, auf der y-Achse die jeweilige Ratio der Proteinregulation aufgetragen. Als Regulationsgrenze ist der Wert 0.5 mit einer strichelten roten Linie eingetragen. Liegt ein Protein oberhalb der Linie, ist es weder bei den *respondern* noch bei den *non-respondern* vermehrt vorhanden. Es fallen besonders Vitamin-D-binding Protein, Haptoglobin und  $\alpha_1$ -Antitrypsin bei den *respondern* auf. Der Quotient von DBP liegt in V0 und V6 unterhalb der Regulationsgrenze, d.h. DBP ist bei den *respondern* konstant in höheren Konzentrationen als bei den *non-respondern* vorhanden. Die Hp-Ketten sind bei den *respondern* sowohl vor als auch unter der Therapie auffällig und im Serum vermehrt vorhanden.

Zur Verifizierung der Proteinregulation wurden die im DIGE-Gel regulierten Proteine in 1D- und 2D-WB Experimenten untersucht (3.2.3).

### 3.2.3 Ergebnisse der 1D-Western Blot

Nachdem im DIGE-Gel bei den *respondern* die Proteine Haptoglobin, Vitamin-D-binding Protein und Fragmente von Apolipoproteinen und Vitronectin vermehrt vorhanden waren, wurden Analysen mit 1D-WB durchgeführt. Mit spezifischen Antikörpern gegen die regulierten Proteine wurden zunächst die depletierten Seren der *responder* und *non-responder* zu den Zeitpunkten V0 und V6 auf die Wiederholbarkeit der Proteinregulation im WB getestet. Diese *responder/non-responder* Proben sind die identisch mit den im DIGE-Gel verwendeten Seren. Zusätzlich wurde danach jedes einzelne Serum im WB analysiert. Da aus technischen Gründen in einem WB immer acht Proben getestet werden konnten wurde zunächst die Einzelseren der Patienten 2, 4, 6 und 9 (*responder*) und 1, 3, 5 und 7 (*non-responder*) untersucht. Zur Validierung erfolgte dann das Hinzuziehen „neuer“ Patienten, die noch nicht im DIGE-Gel enthalten waren: 10, 11, 16, 18 (*responder*) und 8, 13, 15, 17 (*non-responder*). Jedes Serum wurde vor dem WB depletiert, um gleiche Voraussetzungen wie bei den DIGE-Gelen zu schaffen. Pro WB wurden drei Wiederholungen zur Auswertung gemacht. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit der Software ImageJ.

### 3.2.3.1 Untersuchung der Seren mit Anti-Haptoglobin-Antikörper

Bei den WB von *respondern* und *non-respondern* mit dem Anti-Haptoglobin-Antikörper zeigte sich im 1D-WB (Abbildung 37) für Haptoglobin ein ähnlicher Regulationsverlauf in V0 und V6, wie es in den DIGE-Gelen zu sehen war.

Die Durchführung des WB erfolgte nach Protokoll (Dihazi et al. 2009). In der Gruppe *responder* sind Seren der Patienten 2, 4, 6, 9 enthalten. Die *non-responder* Gruppe setzt sich aus Seren der Patienten 1, 3, 5, 7 zusammen.

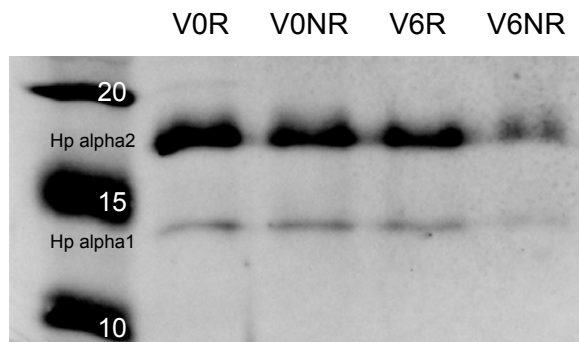
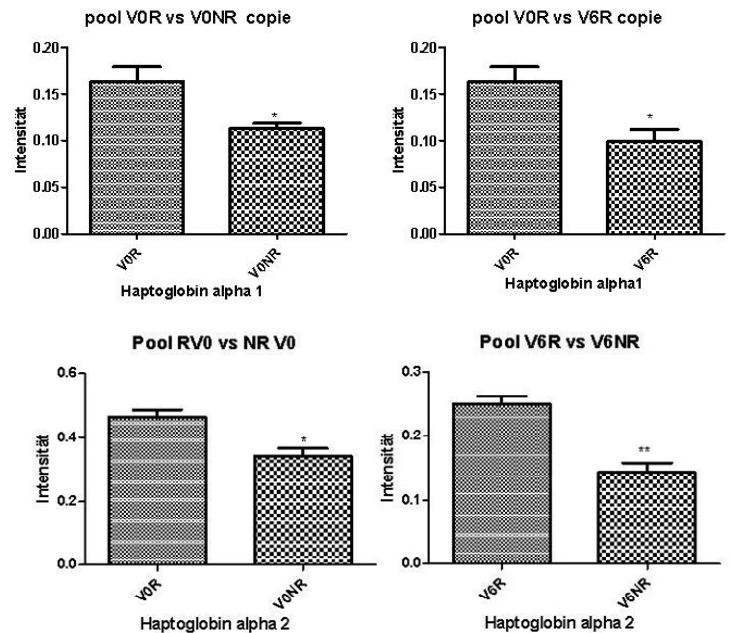


Abbildung 37: WB *responder* (R) und *non-responder*. In die Geltaschen wurde 20 µl Lösung (bestehend aus Probenpuffer und 40 µg Protein) pipettiert.

Es zeigte sich eine vermehrte Intensität der  $Hp\alpha_2$ - und  $Hp\alpha_1$ -Banden bei den *respondern* in V0. Außerdem ist die Abnahme der Intensität der  $Hp\alpha_1$ -Kette bei den *respondern* im Verlauf der Therapie ersichtlich.

Es erschließt sich ebenso eine Zunahme der  $Hp\alpha_2$ -Kette in V6 bei den *respondern*. In diesem Sinne bestätigt der WB die Proteinregulation von Haptoglobin aus dem DIGE-Gel.



Bei der Untersuchung der einzelnen Seren mit dem Anti-Haptoglobin-Antikörper konnte der obige Verlauf bei einigen (nicht aber bei allen) Patienten gefunden werden (Abbildung 38).

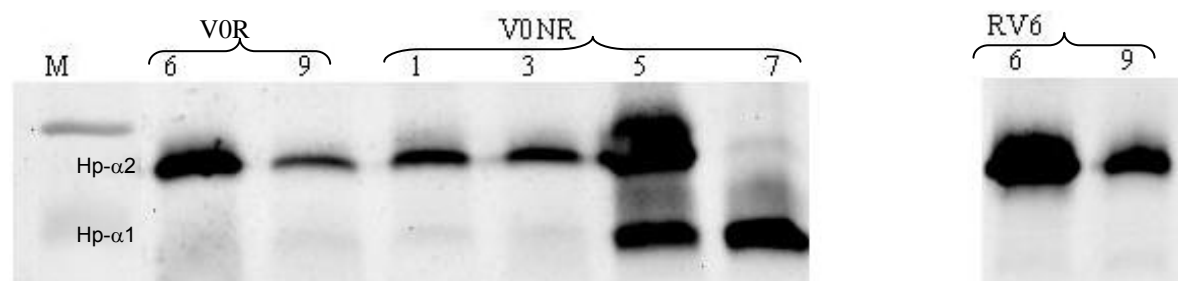


Abbildung 38: WB zum Vergleich von Einzelseren.

Auch hier wurden 40 µg Protein in die Geltaschen pipettiert, nach Molekulargewicht aufgetrennt und auf eine Membran übertragen (*geblottet*).

Links im Bild ist die Intensität der Hp-Ketten zum Zeitpunkt V0 bei den *respondern* 6 und 9 und den *non-respondern* 1, 3, 5, 7 zu sehen. Rechts im Bild sind Seren der *responder* 6 und 9 zum Zeitpunkt V6. Dieser WB zeigte, dass die Bandenintensität der  $Hp\alpha_2$ -Kette bei den Patienten 6 und 9 von V0 bis V6 zunimmt. Das korreliert mit einer Zunahme des Proteins im Serum.

Die *non-responder* lassen sich WB nicht von den *respondern* durch eine verminderte Intensität der  $Hp\alpha_2$ -Kette unterscheiden, denn auch bei den *non-respondern* ist die  $Hp\alpha_2$ -Kette vorhanden.

Die „neuen“ Patienten 10, 11, 16, 18 (*responder*) und 8, 13, 15, 17 (*non-responder*) zeigten auch keinen einheitlichen Verlauf des Proteins, so dass keine allgemeingültige Aussage über die Hp-Regulation unter ETA-Therapie getroffen werden kann.

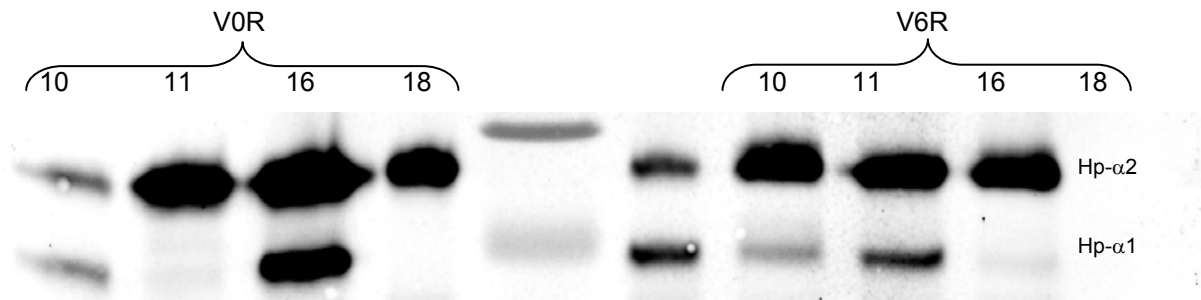


Abbildung 39: WB zum Vergleich von V0 *responder* mit V6 *responder* bei weiteren Einzelseren. Es wurden 40 µg Protein nach Molekulargewicht aufgetrennt und *geblottet*. In diesem WB war ersichtlich, dass die *responder* 10, 11, 16, 18 eine starke Expression der Hp- $\alpha_2$ -Kette aufweisen. Eine Zunahme der Bandenintensität von V0 bis V6 ist aber nur bei Patient 10 eindeutig erkennbar.

Bei den Patienten 6, 9, 10, 11 und 18 war aufgrund des WB eine Zunahme der Bandenintensität von Hp- $\alpha_2$  zu vermuten. Die statistische Auswertung zeigt nur bei Patient 9 und 10 eine statistisch signifikante der Zunahme der Bandenintensität.

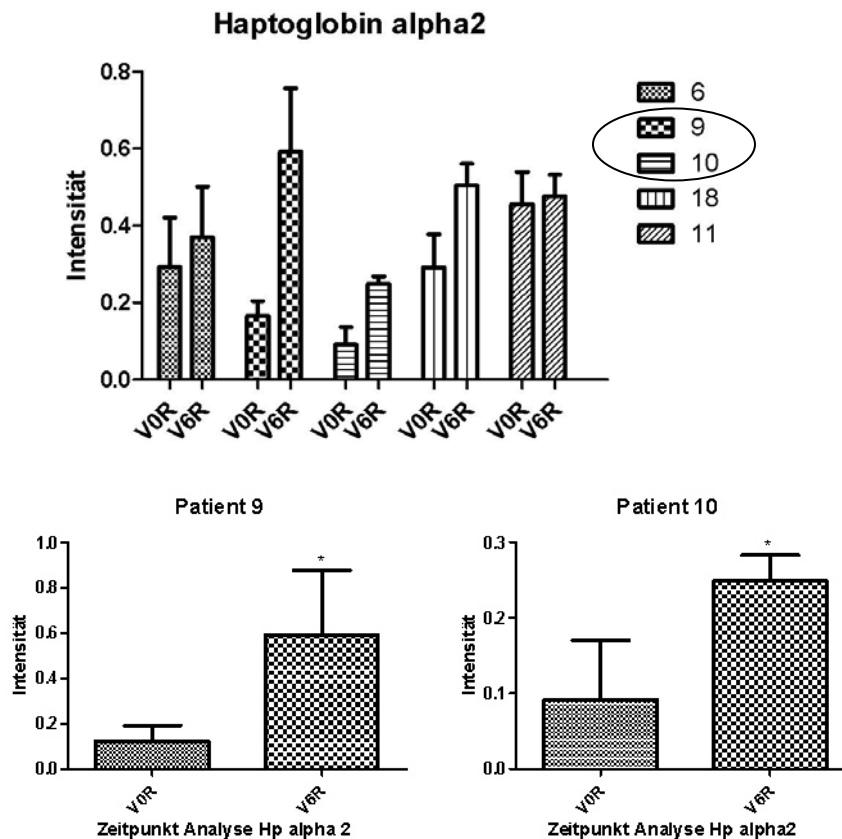


Abbildung 40: Statistische Auswertung der Bandenintensitäten von der Hp $\alpha_2$ -Kette. Die Auswertung zeigt eine Zunahme der Proteinregulation der Hp $\alpha_2$ -Kette von V0 bis V6 bei den *respondern* 6, 9, 10, 11 und 18. Insgesamt fünf aller 16 analysierten Seren zeigten eine Zunahme der Intensität der Hp $\alpha_2$ -Kette, wobei nur bei Patient 9 und 10 die Steigerung der Expression signifikant war.

Im DIGE-Experiment war ein Abfall der  $\text{Hp}\alpha_1$ - Kette im Therapieverlauf zu beobachten. Es sollten im WB Hinweise gesucht werden, ob sich dieser Regulationsverlauf bei Einzelseren bestätigt.

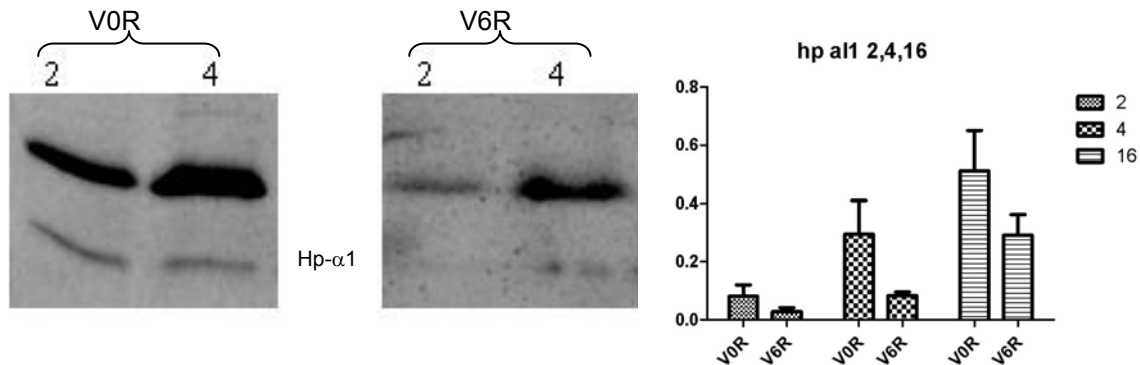


Abbildung 41: Regulation der Haptoglobin  $\alpha_1$ - Kette bei den *respondern* im Therapieverlauf. Der WB zeigt, dass Haptoglobin  $\alpha_1$ -Kette vor der Therapie bei den Patienten 2 und 4 vorhanden war. Im Verlauf der Therapie verliert die Band an Intensität und ist im Serum von Patient 2 und 4 weniger vorhanden. Auch in der statistischen Auswertung zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme der Signalintensität im WB. Die Beobachtung deckt sich mit dem Verlauf von des Haptoglobin  $\alpha_1$  Proteins im DIGE-Gel. Auch bei Patient 16 ließ sich ein signifikanter Abfall von der Haptoglobin- $\alpha_1$ -Kette zeigen. Dieser Nachweis gelang jedoch nicht bei weiteren Seren. So lässt sich keine verallgemeinernde Aussage zum Rückgang der Proteinregulation der  $\text{Hp}\alpha_1$ - Kette treffen.

Für die Proteinketten des Haptoglobin ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) lässt sich zusammenfassend bei einzelnen Patienten der Verlauf des DIGE-Gels zeigen, jedoch ist eine Verallgemeinerung nicht möglich. Es ergab sich aber der Hinweis, dass bei den 16 untersuchten Seren die Haptoglobin-Phänotypen charakteristisch verteilt waren und sich den *respondern* oder *non-respondern* zuordnen ließen (Abbildung 42).

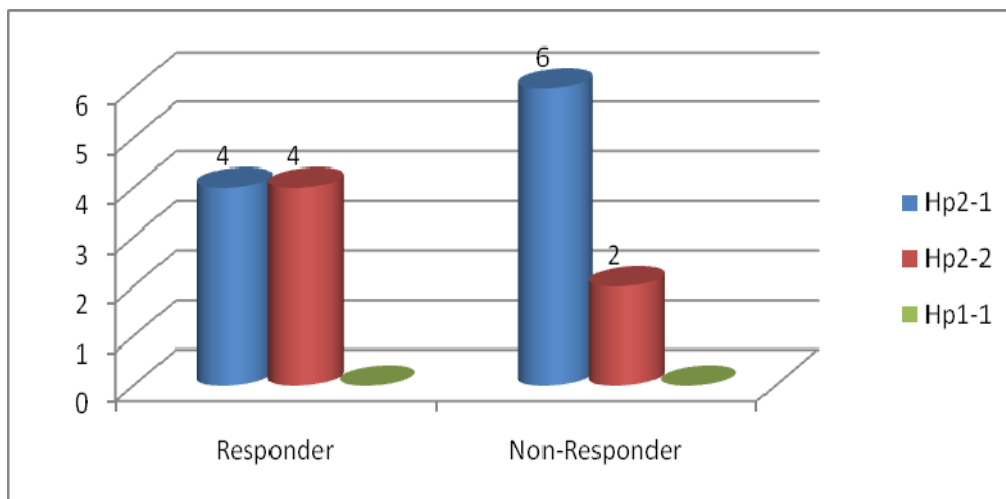


Abbildung 42: Verteilung der Hp-Phänotypen bei 16 Patienten. Bei 16 untersuchten Patienten war auffällig, dass es bei den *non-respondern* häufiger den Haptoglobin Phänotyp 2-1 gibt. Keiner der Untersuchten hat den Phänotyp Hp1-1.

Der genetische Polymorphismus für die Haptoglobin- $\alpha$ -Ketten macht es interessant, die Phänotypen und Regulation der Patienten in einer großen Kohorte zu untersuchen.

Im DIGE-Gel sind auch die Proteine Apolipoprotein A2, Vitronektin und Apolipoprotein C3 aufgefallen.

Es wurden alle Seren der verschiedenen Patienten im WB mit spezifischen Antikörpern (Anti-Apolipoprotein C 3 und A 2, Anti-Vitronektin-Antikörper) auf Proteinregulationen und Unterscheidungsmerkmale untersucht.

Mit dem Anti-Apolipoprotein A 2 Antikörper wurden die *respondern* in V0 und V6 untersucht, wobei bei zwei *responder* Seren (2, 9) das Protein eine intensive Bande zeigte. Die Bandenintensität fiel im Verlauf der Therapie bis (V6) ab. In der statistischen Auswertung war der Abfall der Regulation jedoch nicht statistisch signifikant.

Der WB mit dem Anti-Vitronektin-Antikörper zum Nachweis einer Regulation dieses Proteins konnte nicht durchgeführt werden, da der Antikörper das Fragment bei 10 kDa nicht detektierte, sondern nur das intakte Protein im Bereich von 55 kDa.

Als ein weiteres auffälliges Protein im unteren Bereich des DIGE-Gels, wurde ein Fragment von Apolipoprotein C3 im WB mit dem spezifischen Antikörper untersucht. Im WB der *responder* und *non-responder* konnte auch zu Beginn der Therapie ein quantitativer Unterschied im C3 Fragment nachgewiesen werden. Die Abnahme der Regulation bei den *respondern* war im WB zu sehen, aber nicht statistisch signifikant belegbar.

Alle WB-Ergebnisse der Proteine im unteren Gelbereich waren statistisch nicht signifikant und lassen keine allgemeingültige Aussage zu (dazugehörige WB hier nicht gezeigt).



### 3.2.4 Vergleich der DBP-Isoformen im 2D-Western Blot

Vitamin-D-binding Protein und seine Proteinglykosylierungen wurden im 2D-WB untersucht. Abbildung 43 zeigt den Vergleich der *responder* und der *non-responder* zum Zeitpunkt V0.

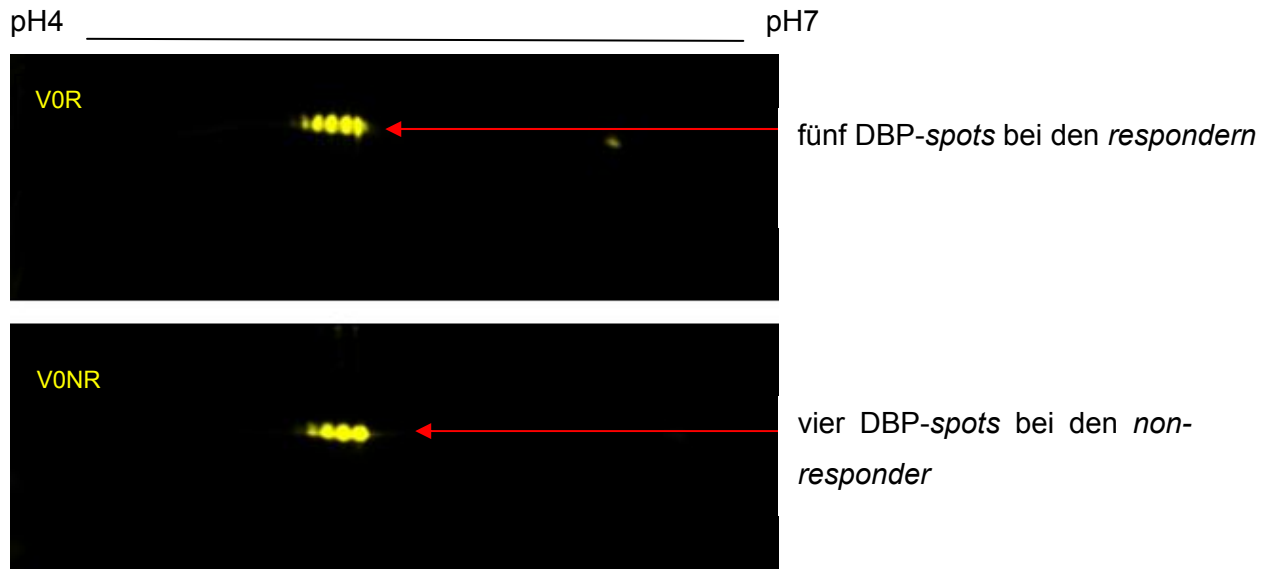


Abbildung 43: Vergleich der DBP-Isoformen der *responder* und *non-responder* (V0) im 2D-WB. 50 µg Proteinprobe wurde auf einem 7 cm IPG-Streifen mit pH 4-7 (Bio-Rad) fokussiert. Nach der Fokussierung wurde eine Auftrennung nach Molekulargewicht durchgeführt und dann dem WB-Protokoll gefolgt (Dihazi et al. 2009). Die *responder* und *non-responder* unterscheiden sich in der Anzahl an DBP-spots. Die *responder* haben einen fünften prominenten DBP-spot, der den *non-responder* fehlt.

Der 2D-WB der *non-responder* zum Zeitpunkt V6 sieht identisch aus wie zum Zeitpunkt V0 (Bild hier nicht gezeigt), d.h. das DBP-Muster der *non-responder* veränderte sich während der ETA-Therapie nicht.

Beim Vergleich der *responder* zu den Zeitpunkten V0 und V6 fällt eine Veränderung des DBP-Musters auf, denn die Intensität und Größe des Proteins nimmt zu (Abbildung 44).

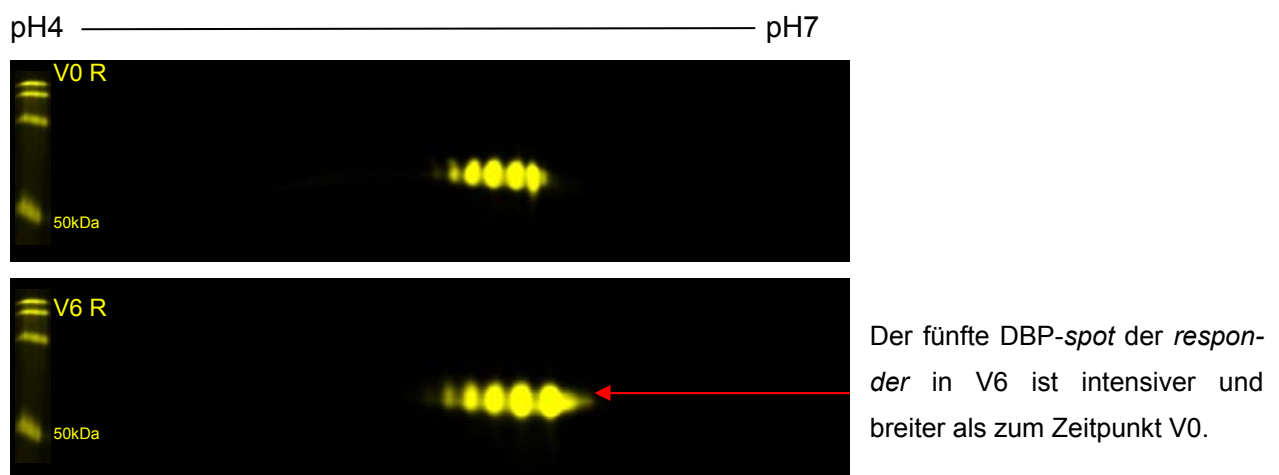


Abbildung 44: Vergleich der DBP-Isoformen der *responder* (V0 und V6). 50 µg Proteinprobe wurde auf einem 7cm IPG-Streifen mit pH 4-7 (Bio-Rad) fokussiert. Nach der Fokussierung wurde eine Auftrennung nach Molekulargewicht durchgeführt und dann dem WB-Protokoll gefolgt. Es zeigt sich eine Zunahme der Intensität des fünften DBP bei den *respondern*. Das Protein ist größer und intensiver als vor Therapiebeginn.



### 3.2.4.1 Glykosylierungsfärbungen

Es zeigten sich im 2D-WB Unterschiede in der Anzahl der DBP-*spots* und in ihrer Gel-Position, was auf einen Unterschied im Grad der Proteinglykosylierung hinweisen könnte. Dieser Unterschied der Proteinkonfiguration kann es möglich machen *responder* und *non-responder* voneinander zu unterscheiden.

Um verschiedene Glykosylierungsmuster des DBP im 2D-Gel zu zeigen, wurden sie erst mit einer speziellen Glykoproteinfärbung und dann zur Spotzuordnung mit Flamingo gefärbt.

Die Proteine in Abbildung 45 sind unterschiedlich signalintensiv angefärbt. Das zeigt, dass es möglich ist unterschiedlich stark glykosylierte Proteine voneinander zu differenzieren.

pH 4 (Anode)

pH7 (Kathode)

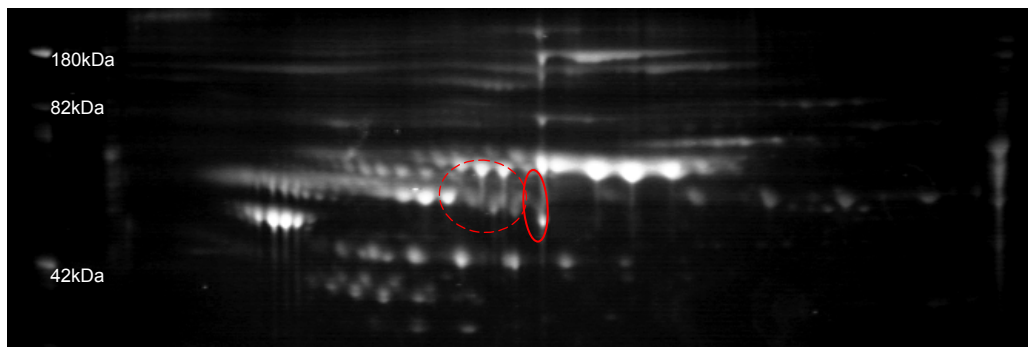


Abbildung 45: Die Glykoproteinfärbung zeigt das Glykosylierungsmuster der *responder* in V0. Stark glykosylierte Proteine haben einen hohen Anteil an Sialsäure und damit viele negative Ladungen und bleiben somit in der Elektrophorese weiter bei der Anode (=links im Gel) liegen. Hier-von ist bei den *respondern* nur ganz links ein *spot* zu sehen (gestricheltes Oval). Bei Verfolgung der DBP-Isoformen nach links (Richtung Anode), nimmt die Intensität der Glykoproteinfärbung zu. Das korreliert mit der Zunahme der Proteinglykosylierung (gestricheltes Oval).

Der fünfte DBP-*spot* der *responder*, welcher im 2D-WB auffiel, ist in der Glykoproteinfärbung nicht zu sehen (rotes oval in Abbildung 45). In dieser Glykoproteinfärbung erscheint der *responder-spot* nicht, weil er keine starke Glykosylierung hat.

In der Flamingofärbung des identischen Gels ist der charakteristische fünfte DBP-*spot* der *responder* an seiner zu erwartenden Position jedoch zu sehen (rotes Oval in Abbildung 46).

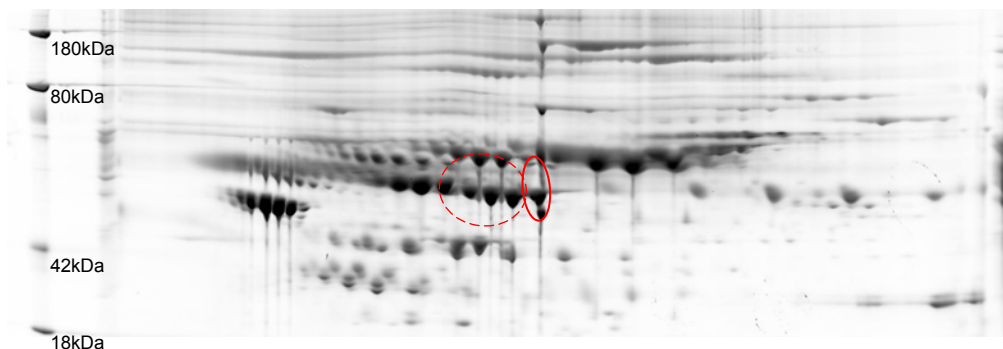


Abbildung 46: Flamingofärbung des 2D-Gels der *responder* vor der Therapie (V0). 150 µg Proteinprobe wurde auf einem 11cm IPG-Streifen mit pH 4-7 (Bio-Rad) fokussiert und die SDS-PAGE durchgeführt. Nach der Gelfärbung mit Flamingo, ist der fünfte DBP der *responder* eindeutig an der zu erwartenden Gel-Position zu sehen.

Das *responder*-DBP (mit weniger Glykosylierungen) liegt näher an der Kathode, da es weniger negativ geladene Sialsäure aufweist.

Das DBP der *responder* ist insgesamt positiver geladen als glykosyliertes DBP. Daher ist zu schlussfolgern, dass bei den *respondern* wenig Glykosylierungen am DBP vorhanden sind und damit die geringe Glykosylierung ein Charakteristikum der *responder* ist.

pH 4 (Anode)

pH7 (Kathode)

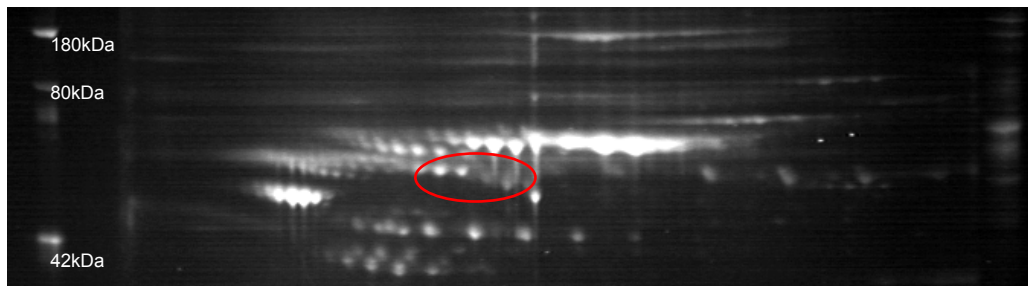


Abbildung 47: Glykosylierungsmuster der *non-responder* vor der Behandlung (V0). 150 µg Proteinprobe wurde auf einem 11 cm IPG-Streifen mit pH 4-7 (Bio-Rad) fokussiert und die SDS-PAGE durchgeführt. Nach der Glykoproteinfärbung sind nur vier glykosylierte DBP bei den *non-respondern* zu sehen.

In der Glykosylierungsfärbung der *non-responder* sind vier Spots dem DBP zuzuordnen. Sie sind im sauren Gelbereich lokalisiert, signalintensiv und damit stark glykosyliert. Diese stark glykosylierten Vitamin-D-binding Proteine können zum Makrophagen-aktivierenden Faktor deglykosyliert werden. Diese Deglykosylierung kann einige interessante Effekte im Rahmen der RA haben (4.1.3.2).

### 3.3 Gelfreie Proteomics

Es konnten im SELDI-Experiment, in dem sieben Seren von *non-respondern* und acht Seren von *respondern* miteinander verglichen wurden, Unterschiede zum Zeitpunkt V0 detektiert werden. Die Gruppe der *non-responder* ließ sich statistisch signifikant durch ein Protein bei 28.718 m/z von den *respondern* unterscheiden (Abbildung 48).

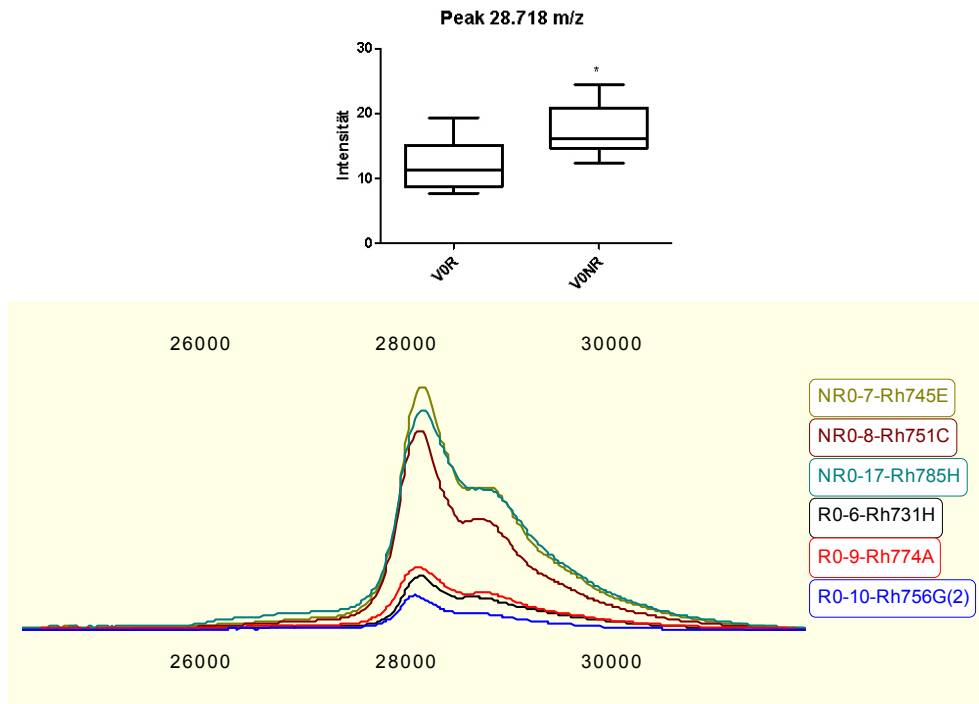


Abbildung 48: Die Auswertung der Proteinintensitäten im SELDI-Experiment. Das Protein mit dem m/z-Wert 28.718 ist bei den *non-respondern* vermehrt vorhanden und charakterisiert diese Gruppe.

Die vermehrte Intensität des für die *non-responder* charakteristischen Proteins bei 28.718 m/z lässt sich eindrucksvoll in Form eines Elektrophorese-Gels darstellen (Abbildung 49).



Abbildung 49: Geldarstellung des SELDI-peak bei 28.718 m/z. Es lässt sich ablesen, dass das Protein in diesem Gelbereich eine vermehrte Intensität bei den *non-respondern* hat.

## 4 Diskussion

In der Diskussion werden zunächst beispielhaft Biomarker vorgestellt, die mit proteomischen Methoden bei verschiedenen Erkrankungen gefunden wurden. Im Bereich der onkologischen Forschung wurden bereits viele Studien mit Proteomics durchgeführt. Aus dem Bereich der proteomischen Biomarkerforschung bei der RA liegen hingegen nur wenige Daten vor. Unter Einbeziehung der Bedeutung posttranslationaler Proteinmodifikationen und im Hinblick auf die Ätiologie der RA, erfolgen im zweiten Abschnitt die Charakterisierung der in dieser Arbeit gefundenen Proteine und Überlegungen zu deren Nutzbarkeit als Biomarker für das Ansprechen auf eine Anti-TNF $\alpha$ -Therapie.

### 4.1 Gelbasierte Proteomics

In den folgenden zwei Abschnitten wurden Ergebnisse von Studien ausgewählt, die mithilfe der 2D-Gel-Technik Biomarker für verschiedene Erkrankungen nachgewiesen haben. Die Ergebnisgrundlage zur Biomarkerdetektion ist bei onkologischen Proteomicsstudien ausführlicher als im Bereich der RA. Bei den vorhandenen Studien geht es vor allem um Biomarker zur Früherkennung der RA vor Krankheitsausbruch.

Die Proteomicsanalyse dieser Arbeit hat aber das Ziel, einen geeigneten Biomarker zur Prognoseeinschätzung der Wirksamkeit einer Anti-TNF $\alpha$ -Therapie bei RA zu detektieren.

#### 4.1.1 Biomarker bei Karzinom- und Autoimmunerkrankungen

Wie in Abschnitt 1.2.2 eingeführt, ist der Einsatz von Biomarkern zur Früherkennung von Krebserkrankungen essentiell für einen frühen Behandlungsbeginn und damit zur Prognoseverbesserung. Bei der 2D-Gel-Untersuchung des Proteoms von Tumorzellen wurde als Marker für den prognostisch schlechtesten Krankungsverlauf beim bronchialen Adenokarzinom die Phosphoglycerinkinase 1 gefunden (Chen et al. 2003).

In weiteren 2D-Gel-Untersuchungen mit Serum von Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen wurden die vermehrte Regulation von Proteinen wie  $\alpha_1$ -Antitrypsin und Haptoglobin (Hamrita et al. 2009), Serum Amyloid A (Camafeita et al. 2009), Apolipoprotein A1 und ein Fragment des Komplementfaktor C3 beschrieben (Steel et al. 2003). Das vermehrte Vorhandensein von Haptoglobin fiel auch in 2D-Gelanalysen bei Autoimmunerkrankungen auf. Es wurde bei 2D-Gelanalysen, WB und ELISA im Serum von Patienten mit Transplantatabstoßungsreaktion (GvHD) nach Stammzelltransplantation entdeckt, dass Patienten mit Phänotyp Hp2-2 dazu prädisponiert waren eine GvHD zu erleiden. Danach sind Hp-Polymorphismen mit dem Auftreten einer GvHD assoziiert (McGuirk et al. 2009). Bei der Autoimmunerkrankung Neuromyelitis Optica geht die Entzündung im Liquor mit einer im 2D-Gel nachweisbaren vermehrten Regulation der Haptoglobin- $\alpha$ -Kette einher (Bai et al. 2009).

---

Auch in dieser Arbeit kann die vermehrte Hp-Expression mit einer Autoimmunerkrankung in Zusammenhang gebracht werden.

#### 4.1.2 Bisherige Biomarkerdetektion bei RA

Bei gelbasierten RA-Proteomicsstudien wurden bisher sowohl synoviale Fibroblasten (SF) und Synovialflüssigkeit als auch Serumproben von RA-Patienten untersucht.

Das Proteinexpressionsprofil mononukleärer Zellen (PBMCs) von Gesunden und Erkrankten wurde in 2D-Gelen analysiert, wobei 18 um das Doppelte regulierte Proteine (u.a. Fibrinogen  $\gamma$ , Hitzschockprotein 5A, Ribonuklein K) bei RA-Patienten gefunden wurden. Einige der identifizierten Proteine spielen bei der RA-Pathogenese eine Rolle (Dotzlaw et al. 2004).

In der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten waren krankheitsspezifische Proteine wie Fibronectin, Smephorin 7, GRB7, Galektin-1, Apolipoprotein A1 und Peroxiredoxin 2 überexprimiert, das Protein Vimentin hingegen vermindert exprimiert (Kim et al. 2006). Außerdem fielen bei der Untersuchung von Synovialflüssigkeiten signifikante Mengen Calcidiol (25-(OH) $D_3$ ), Calcitriol (25-(OH) $_2D_3$ ) und Vitamin-D-binding Protein (DBP) auf. Eine lokale Produktion von Vitamin D-Metaboliten oder ihre Diffusion aus dem Serum in die Synovialflüssigkeit könnte dies erklären (Fairney et al. 1987).

Die Untersuchung von SF hingegen erwies sich in folgenden Arbeiten als geeignetes Verfahren zur Identifikation potentieller Biomarker: Zur Unterscheidung von Patienten mit RA oder Osteoarthritis (OA) wurde im 2D-Gel das Protein Calgranulin A (syn. S100A8 oder MRP8) im synovialen Gewebe überexprimiert gefunden. (Tilleman et al. 2005 b). Basierend auf differentieller Proteomanalyse von SF und Plasma in 2D-Gelen wurden auch S100 Proteine identifiziert, die RA- von OA-Patienten unterscheidbar machten.

Der Plasmaspiegel des Heterokomplex S100A8/A9 (MRP14) korreliert mit dem Spiegel in synovialen Fibroblasten von RA-Patienten. Damit würde die Bestimmung des S100A8/9-Plasmaspiegels dazu dienen, RA von anderen entzündlichen Gelenkerkrankungen und der OA zu unterscheiden. Außerdem diene der Serumspiegel von S100A8/A9 zur Wirksamkeitskontrolle bei Anti-TNF $\alpha$ -Therapien (Drynda et al. 2004). In einer weiteren Arbeit zur Biomarkerdetektion war ebenfalls MRP14 bei RA-Patienten vermehrt vorhanden. Außerdem waren die Proteine Ubiquitin und SAA, Transthyretin und Apolipoprotein A1 bei RA-Patienten in ihrer Regulation signifikant erhöht. Diese Proteine können bei der Pathogenese eine wichtige Rolle spielen und ihre Bestimmung könnte bei der Diagnose, Evaluation der Krankheitsaktivität und Identifikation neuer Therapieziele maßgebend sein (An et al. 2005).

Die 2D-Gel-Untersuchung von Plasma vor und nach einer Akut-Phase-Reaktion (in diesem Fall ausgelöst durch eine Typhus-Impfung) zeigte, dass sich das Proteomprofil von RA-Patienten und Gesunden unterschied. Das Muster der Proteinregulation bei einer Typhus-

impfung ähnelt dem Proteomprofil einer chronisch-entzündlichen Erkrankung. Nach Impfung von RA-Patienten lag eine vermehrte Regulation der Proteine SAA, Hp $\alpha_2$ , - $\alpha_1$  und - $\beta$  vor. Die Proteine Transthyretin, DBP, Apolipoprotein A1 und A4 waren bei geimpften RA-Patienten weniger vorhanden (Doherty et al. 1998).

In einer anderen 2D-Gelanalyse wurde gezeigt, dass Autoantikörper gegen  $\alpha$ -Aldolase und  $\alpha$ -Enolase mit der RA assoziiert waren. Es wurde herausgearbeitet, dass die citrullinierte  $\alpha$ -Enolase als Autoantigen fungierte. Die Citrullinierung gilt als posttranslationale Modifikation und kann den Verlust der Fähigkeit des Immunsystems zur Selbst- und Fremdunterscheidung ausgelöst haben. Es ist möglich, dass auch andere immunogene PTM Auslöser für die RA sind. Diese können mit Proteomics dargestellt und identifiziert werden (Lambrecht et al. 2008).

### 4.1.3 Gelbasierte Proteomics zur Biomarkerdetektion (DIGE)

Wie in der Einleitung thematisiert, ist die 2D-Gelelektrophorese und insbesondere die DIGE-Technik ein aussichtsreicher Ansatz zur Analyse des Serumproteomprofils und zur Biomarkerdetektion. Es wurde im DIGE-Gel bei den *respondern* eine signifikante Regulation der Proteine Haptoglobin (Hp) und Vitamin-D-binding Protein (DBP) festgestellt. Diese Proteine wurden bereits in verschiedenen Zusammenhängen als Biomarker diskutiert (4.1.2) was belegt, dass es grundsätzlich möglich ist, mit proteomischen Methoden einen Biomarker für das Therapieansprechen auf eine ETA-Therapie zu finden. Es folgt die Darstellung der Funktionen von Hp, DBP und der Beeinflussung des Immunsystems durch PTM.

In dieser Arbeit lagen zum Zeitpunkt V0 auch vermehrte Regulationen der Proteinfragmente Vitronektin, Apolipoprotein C3 und  $\alpha_1$ -Antitrypsin vor. Diese Proteine werden nicht thematisiert, da ihre Funktionen im Zusammenhang mit der RA von untergeordnetem Interesse sind.

#### 4.1.3.1 Haptoglobin

Die hepatische Synthese des positiven Akut-Phase-Proteins Haptoglobin (Hp) wird durch die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 und TNF $\alpha$  induziert. Das von den drei Hauptallelen Hp<sup>1S</sup>, Hp<sup>1F</sup> und Hp<sup>2</sup> auf Chromosom 16 kodierte Polypeptid wird als ganze Kette synthetisiert und dann in zwei  $\alpha$ -Ketten und eine  $\beta$ -Kette gespalten. Die  $\beta$ -Kette ist die Bindungsstelle für Hämoglobin (Hb) und konstant, weil sie von drei identischen Allelen codiert wird. Die  $\alpha$ -Ketten unterliegen einem genetischen Polymorphismus. Die Allele Hp<sup>1S</sup> und Hp<sup>1F</sup> (*fast* und *slow*) unterscheiden sich nur in einer Aminosäure und kodieren für die Hp $\alpha_1$ -Ketten.

Ein Produkt aus nicht-homologen *crossing over* von Hp<sup>1F</sup> und Hp<sup>1S</sup> ist das Hp<sup>2</sup> Allel, welches die Hp $\alpha_2$ -Ketten kodiert. In 2D-Gelen bilden die Hp $\alpha_2$ -Ketten drei (Hp $\alpha_1$ -Ketten ein bis drei) Proteinspots, die sich etwas im pI unterscheiden und im unteren Bereich des 2D-Gels zu sehen sind. Wegen der Sequenzähnlichkeit der Allele die drei Phänotypen (Hp1-1, 2-1, 2-2)

unterschieden, die sich je nach Kettenzusammensetzung ergeben, wie Abbildung 50 zeigt (Mikkat et al. 2004).

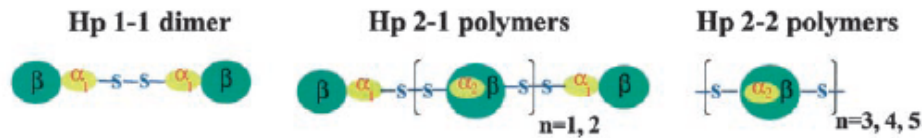


Abbildung 50: Hp-Struktur: Disulfidbrücken verbinden kovalent die einzelnen Hp-Ketten. Durch die Kombination der Ketten entstehen drei mögliche Polymere (Ye et al. 2003). α<sub>1</sub>-Ketten haben ein Molekulargewicht von 8,9 kDa, α<sub>2</sub>-Ketten von 16 kDa (Langlois and Delanghe 1996).

Das Protein Hp war in dieser Untersuchung bei den *respondern* um mehr als das Doppelte vorhanden. Dies war vor und auch am Ende der Therapie der Fall, wobei besonders die verstärkte Regulation der Hpα<sub>2</sub>-Ketten auffielen. Die *responder* könnten von den in der Literatur beschriebenen und im Folgenden dargestellten positiven Hp-Effekten profitieren. Hp könnte synergistisch zur ETA-Therapie zur klinischen Verbesserung der RA beitragen.

Die bekannteste Funktion von Haptoglobin ist die Bindung von freiem Hämoglobin (Langlois and Delanghe 1996). Damit wird z.B. nach Hämolyse der renale Eisenverlust und eine Schädigung der Glomerula verhindert, denn Hp-Hb-Komplexe werden nicht ausgeschieden (Polticelli et al. 2008). Neben seiner Funktion als Hämolysemarker hat Hp durch die Komplexbildung von Hb auch eine antibakterielle Funktion, denn Bakterien brauchen Eisen für ihren Stoffwechsel. Darüber hinaus würde freies Eisen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beitragen, was Entzündungen verstärken und Zellschäden an Membranen durch Lipidoxidation verursachen würde. Bindet Hp an aktivierte Makrophagen wird die ROS-Generierung und indirekt die TNFα-Produktion verhindert (Theilgaard-Monch et al. 2006). Hb-Bindung und antioxidative Kapazität sind abhängig vom Phänotyp und ist bei Hp2-2 durch ineffektive Hb-Bindung gemindert, so dass für Hp2-2 eine größere Gefahr von oxidativem Stress ausgeht (Gutteridge 1987; Langlois and Delanghe 1996).

Eine effiziente Angiogenese ist ein wichtiger Vorgang bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen. Hp fördert Gefäßwachstum (proangiogenetische Wirkung) und vermindert dadurch hypoxiebedingte Schäden. Hp2-2-Phänotypen mit einer guten Angiogenese können besser auf Hypoxie reagieren (Cid et al. 1993; Langlois and Delanghe 1996). Hp hemmt die Prostaglandinsynthese und damit Schmerzentstehung. Die Hemmung ist beim Hp1-1 Phänotyp am effektivsten (Beisembaeva et al. 1990).

Hp bindet und präzipitiert Proteine, die nach Hitze- und Gewebsschaden oder oxidativem Stress fehlgefaltet sind und verhindert, dass defekte Proteine toxische Akkumulationen bilden. Hp trägt dazu bei nach Entzündungen (lokal oder systemisch) die Gewebshomöostase wieder herzustellen (Theilgaard-Monch et al. 2006; Polticelli et al. 2008). Hp hat durch die Fähigkeit die Reaktivität von Lymphozyten zu hemmen (Lange 1992) und ihre Proliferation

---

und funktionelle Differenzierung zu beeinflussen, auch immunoregulatorische Funktion und trägt zum Erhalt der Homöostase bei antigeninduzierter Entzündung bei (Huntoon et al. 2008). Darüber hinaus kann bei dem Zerfall von Hp eine abnorme Funktion des Proteins ausgelöst werden. Die Hp $\alpha$ -Kette kann dann mit dem Immunsystem interferieren, weil sie strukturelle Ähnlichkeit mit dem humanen 7S Ig aufweist. Dadurch könnte Hp $\alpha$  die zelluläre Immunantwort als potenter Immunosuppressor beeinflussen (Ye et al. 2003).

Diese Funktion käme den *respondern* in Kombination mit ETA zugute, denn TNF $\alpha$  und die Hp $\alpha$ -Kette unterdrücken Entzündungsreaktionen.

Auch auf die TNF $\alpha$ -Konzentration hat das Protein einen interessanten Effekt. Hp wird in neutrophilen Granulozyten gespeichert. Bei der Bindung von TNF $\alpha$  während einer Akut-Phase-Reaktion an Neutrophile, wird konzentrationsabhängig eine Hp-Freisetzung ausgelöst: je mehr TNF $\alpha$  bindet, desto mehr Hp wird ausgeschüttet (Berkova et al. 1999).

Das würde im Sinne eines negativen *Feed-back* Mechanismus die inflammatorischen Effekte von TNF $\alpha$  begrenzen und somit synergistisch zu ETA wirken.

Die drei Hp-Phänotypen sind wichtig für die biologische Funktion des Proteins und scheinen für bestimmte Erkrankungen zu prädisponieren. Die Hp-Polymorphismen sind assoziiert mit der Prävalenz und klinischen Manifestationen von entzündlichen Erkrankungen (Wassell 2000). Besonders der Phänotyp Hp2-2 ist mit der Entwicklung inflammatorischer Erkrankungen assoziiert (Lai et al. 2007). Der Einfluss der Hp-Phänotypen auf Immunoreaktivität wird aber unterschiedlich bewertet. Anfang der 80er Jahre war man noch der Auffassung, dass Hp bei der aktiven RA zwar vermehrt in Serum und Synovialflüssigkeit vorhanden ist, jedoch die Phänotypen nicht auffällig verteilt waren (Sitton and Dixon 1983). Zwei Jahre später wurde ein Zusammenhang zwischen dem Hp<sup>2</sup>-Gen und Autoimmunerkrankungen beschrieben, denn das Hp<sup>2</sup>-Gen wurde häufiger in RA-Familien gefunden als das Hp<sup>1</sup>-Gen (Dahlqvist and Fröhlander 1985). Generell soll bei Autoimmunerkrankungen der Phänotyp Hp2-2 überrepräsentiert sein, da er immunoreaktiver ist und PGE<sub>2</sub> nicht effektiv gehemmt wird (Langlois and Delanghe 1996).

Zusammengefasst wirkt Hp antioxidativ, proangiogen, antientzündlich und immunoregulatorisch (Langlois and Delanghe 1996; Dobryzycka 1997; Theilgaard-Monch et al. 2006; Ogawa et al. 2007).

Diese Hp-Funktionen können Heilungsprozesse positiv beeinflussen. Es resultiert die Hypothese, dass die *responder* von der vermehrten Hp-Expression in V0 und unter ETA-Therapie profitieren, da alle Hp-Funktionen der Wiederherstellung von Gewebshomöostase dienen. Eine Hp-Phänotypisierung ist eine Möglichkeit um zu testen, welcher Phänotyp am häufigsten in der RA-Kohorte repräsentiert ist und ob sich signifikante Häufungen bei *respondern* oder *non-respondern* ergeben. Anhand einer Hp-Phänotypisierung ergäbe sich ein guter Biomarker zur Unterscheidung zwischen potentiellen *respondern* und *non-respondern*.



#### 4.1.3.2 Vitamin-D-binding Protein

Vitamin-D-binding Protein (DBP) war in den DIGE-Gelen dieser Arbeit bei den ETA-*respondern* vor der Therapie vermehrt vorhanden. Dies war für die *responder* auch unter ETA-Therapie charakteristisch. Außerdem fiel ein Unterschied im Grad der DBP-Glykosylierung auf, denn das DBP der *responder* war weniger stark glykosyliert als das der *non-responder*.

DBP, auch als Gc-Protein bezeichnet, ist ein Protein multifunktionseller Natur (White and Cooke 2000) und gehört zur  $\alpha_2$ -Globulinfraktion. DBP hat abhängig vom Grad der posttranslationalen Glykosylierung ein Molekulargewicht von 50 bis 52 kDa (Speeckaert et al. 2006).

Beim Gesunden liegt die Plasmakonzentration bei 300-600  $\mu\text{g/ml}$ . Täglich werden hepatisch ca. 10 mg/kg Körpergewicht gebildet, wobei die Synthese während der Schwangerschaft und unter Östrogentherapie gesteigert ist. Bei Leber- und Nierenerkrankungen sowie Malnutrition findet sich aufgrund geringer Synthese und renalen Verlust eine erniedrigte DBP-Plasmakonzentration.

DBP findet sich in vielen Geweben und unterliegt einem schnellen Proteinabbau (Plasmahalbwertszeit 2,5 Tage). Der wichtigste Ligand ist Calcidiol (Halbwertszeit 12 Tage). Der DBP-Calcidiol-Komplex wird in Leber, Lunge und Gastrointestinaltrakt sowie in Muskeln und Knochen abgebaut bzw. renal ausgeschieden. Im Verlauf des Lebens hat DBP einen konstanten Plasmaspiegel, ohne saisonalen Schwankungen zu unterliegen. Er ist im Serum gut messbar, morgens mit niedrigeren Konzentrationen als abends. Die Konzentration wird weder von einer Calcium- noch Vitamin-D<sub>3</sub>-Substitution beeinflusst (Speeckaert et al. 2006). Mit diesen Eigenschaften ist DBP grundsätzlich als Biomarker geeignet.

Der Genlocus von DBP auf Chromosom 4 ist polymorph. Drei dominante Allele codieren für DBP, nämlich Gc1f (*fast* in der IEF), Gc1s (*slow*) und Gc2. Den drei verschiedenen Phänotypen ordnen Forscher verschiedene Anfälligkeiten bzw. Widerstandsfähigkeiten gegenüber Erkrankungen und unterschiedliche Proteinfunktionen zu (Hartwig et al. 1982; White and Cooke 2000). Der Unterschied der Phänotypen beruht auf einzelnen Aminosäuresubstitutionen, die eine unterschiedliche Proteinladung bedingen. Auf die Unterscheidung der DBP-Phänotypen wird nach der Beschreibung der Vitamin D- und Aktinbindungsfunktion Bezug genommen.

DBP hat eine Bindungsstelle für Vitamin-Vorstufen und eine für G-Aktin. Bei Zelluntergang durch Lyse oder mechanische Einflüsse fällt extrazellulär freies G- und F-Aktin an.

DBP verhindert die unkontrollierte Polymerisation von G-Aktin in arteriellen Gefäßen und verhindert damit Aktin-Mikroembolien, welche zu Organdysfunktion führen können. Die Aktinbindung ist eine zentrale Aufgabe von DBP, wobei alle DBP-Phänotypen etwa gleiche Bindungsaffinität haben (White and Cooke 2000; Head et al. 2002). Mit Zelluntergang bei

---

Sepsis, Trauma oder Organdysfunktion geht ein Absinken der DBP-Konzentration einher, da es freies Aktin bindet. Eine verminderte initiale DBP-Konzentration ist mit einer schlechten Prognose für Patienten assoziiert (Speeckaert et al. 2006). Das Fazit ist, dass bei Zelluntergang und gleichzeitig erniedrigtem Serum-DBP ein erhöhtes Risiko für Aktinembolien und vaskulären Schaden besteht (White and Cooke 2000).

Auch das Protein Gelsolin bindet freies Aktin, nämlich F-Aktin. Es wurde gezeigt, dass die Gelsolin-Plasmakonzentrationen bei RA-Patienten, bei akuter Verletzung und Entzündung erniedrigt sind. Bei Sepsis und Verbrennungen im Tierversuch verbesserte sich die Prognose durch die Gelsolin-Gabe. Eine verminderte DBP-Konzentration in Kombination mit viel freiem Aktin und Aktin-Gelsolin-Komplexen in synovialen Gewebe zeigte, dass das Bindungsprotein im Gelenk „aufgebraucht“ wurde, es also protektiv und antiinflammatorisch wirkt (Osborn et al. 2008).

Die *responder* haben in der vorliegenden Studie durch das vermehrt vorhandene DBP potentiell eine höhere Kapazität zur Aktinbindung zum Schutz vor zu starker Aktinpolymerisation und vaskulär-embolischen Schäden. Die erhöhte DBP-Konzentration bei den *respondern* trägt hypothetisch dazu bei, Schäden zu minimieren, die durch Zellnekrosen entstehen. Diese Voraussetzung im *responder*-Proteomprofil unterstützt die ETA-Wirkung.

Die namensgebende Hauptaufgabe von DBP ist Bindung, Solubilisierung und Transport von Vitamin D-Metaboliten. Im Gegensatz zu anderen hydrophoben Hormonbindungssystemen, ist DBP im Serum etwa 20-fach höher konzentriert als seine Liganden. Diese für Serumbindungsproteine ungewöhnlich hohe Konzentration weist auf vielfältige biologische Aufgaben des DBP hin (White and Cooke 2000; Speeckaert et al. 2006).

Unter physiologischen Bedingungen liegen nahezu alle Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolite proteingebunden vor, was die Pharmakokinetik von Vitamin D stark beeinflusst. An DBP gebundene Metabolite haben verminderten Zugang zu Zielzellen und sind dem hepatischen und renalen Abbau nicht zugänglich. Dies verlängert die Vitamin D-Halbwertszeit, was die physiologische Bedeutung des Vitamins und seines Bindungsproteins unterstreicht (Speeckaert et al. 2006).

Der Zusammenhang zwischen dem Spiegel des aktiven Vitamin D<sub>3</sub> und der RA-Pathogenese ist im Knochenstoffwechsel, in der Aktivierung des NFκB-Signalwegs und der Beeinflussung des Immunsystems zu sehen.

Dabei ist wichtig, dass DBP den Transport von aktivem Vitamin D<sub>3</sub> und seinen Vorstufen zu allen Effektorzellen sichert. Im Blut bindet DBP die Vitamin D<sub>3</sub>-Vorstufen und transportiert sie zur Leber, wo sie in Calcidiol umgewandelt werden. Nach dem Transport zur Niere wird der Calcidiol-DBP-Komplex im Glomerulum filtriert und in komplexierter Form über einen Megalintransporter ins Nierenepithel zurückresorbiert. Nicht an DBP gebundenes Vitamin D geht im Urin verloren. Im Nierenepithel findet die enzymatische Aktivierung von Calcidiol zu

---

Calcitriol statt. Fehlt DBP, ist die Ausscheidung von Vitamin-D-Vorstufen erhöht und der Calcitriolspiegel sinkt. Das hat Auswirkungen auf die Calcium- und Phosphathomöostase (Parathormonveränderung). Bei Vitamin D<sub>3</sub>-Mangel kommt es zum Abfall des Calcium- und Phosphatspiegels. Reaktiv steigt das Parathormon an und erhöht (durch Abbau von Knochensubstanz) den freien Ca<sup>2+</sup>-Spiegel im Blut. Freies Calcium verstärkt den NFκB-Signalweg, was wiederum zu ROS-Bildung und Entzündungsreaktion führt (Höck 2009).

Da Vitamin D<sub>3</sub> durch Hemmung von TH<sub>1</sub>-T-Zellen auch die Ausschüttung von IL-1, IL-6 und TNFα hemmt, kann D<sub>3</sub> als körpereigener Immunmodulator angesehen werden. Vitamin D<sub>3</sub> und PTH sind außerdem negativ mit der Krankheitsaktivität korreliert, d.h. je höher der Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel, desto geringer ist die Krankheitsaktivität.

Niedrige Vitamin D<sub>3</sub>-Level bei RA-Patienten führen zu einer negativen Ca<sup>2+</sup>-Bilanz und Hemmung des Knochenaufbaus. Ebenso begünstigen niedrige Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel den Progress der RA (Oelzner et al. 1998). Daher werden Therapien mit D-Hormonen (Alfacalcidol, Calcitriol) zur Behandlung von RA als Beitrag zur Krankheitsmodifizierung empfohlen (Schacht 2000).

Zellstress, ROS, intrazellulär erhöhtes Ca<sup>2+</sup> und erhöhte TNFα-Spiegel führen zur Aktivierung der NFκB-Signalkaskade, welche zur Induktion von Entzündung und Zellapoptose führt (1.1.2). Ein ausreichender Vorrat an Calcidiol ist wichtig, um den durch NFκB aktivierten Entzündungsprozess einzudämmen. Zusätzlich hemmt aktives Vitamin D<sub>3</sub> proinflammatorische Enzyme und erhöht damit körpereigene antioxidative Reserven, fördert die Immuntoleranz und wirkt Autoimmunprozessen entgegen.

Bei chronischer NFκB-Aktivierung etabliert sich ein entzündliches Milieu mit viel freiem Ca<sup>2+</sup>, viel nitrosativ-oxidativem Stress, einer dauerhaft ungünstigen Verschiebung des Redoxgleichgewichts und hohen TNFα-Spiegeln, so dass es bei Vorhandensein entsprechender Kofaktoren zur Entwicklung degenerativer, kardiovaskulärer und rheumatischer Erkrankungen wie z.B. der RA kommen kann. Die negativen Folgen des NFκB-Signalwegs können durch die Gabe von Vitamin D<sub>3</sub> und Ca<sup>2+</sup> verhindert werden (Höck 2009).

Soweit lässt sich festhalten, dass DBP und Vitamin D<sub>3</sub> den Knochenstoffwechsel, Immunsystemfunktionen und Entzündungsreaktionen positiv beeinflussen (Speeckaert et al. 2006). Die hohen DBP-Konzentration und die daraus folgende hohe Vitamin D-Verfügbarkeit können einen positiven Einfluss auf die *responder* haben, weil davon auszugehen ist, dass die gute Transportkapazität für Vitamin D-Vorstufen bei den *respondern* eine gute Heilungsgrundlage darstellt und DBP synergistisch mit ETA der RA entgegenwirkt.

Wie in den vorherigen Abschnitten angeführt, beeinflusst DBP das Immunsystem und postranslationale Modifikationen an diesem Bindungsprotein können immunogene Reaktionen auslösen.

---

Unter dem Aspekt, dass die RA wahrscheinlich durch autoimmunreaktive Vorgänge ausgelöst wird ist es interessant zu prüfen, ob die Glykosylierungen am DBP die *responder* (mit überexprimiertem, aber weniger glykosylierten DBP) und die *non-responder* (stark glykosyliertes DBP) voneinander unterscheidbar machen und welchen Effekt posttranslationale Modifikationen des Bindungsproteins auf das Immunsystem haben könnten.

In der Literatur gibt es Hinweise, dass die Proteinglykosylierung eine Schlüsselrolle bei der Immunsystemregulation, d.h. bei der Entwicklung, dem Überleben und der Reaktivität von T-Zellen, spielt (Seo and Lee 2004).

Am Beispiel vom IgG wird gezeigt, dass aufgrund von Proteinglykosylierung bzw. Deglykosylierung das Immunsystem beeinflusst wird und eine erhöhte Anfälligkeit gegen Erkrankungen anzunehmen ist. Die N-Glykosylierung von IgG ist essentiell für seine Bindung an alle F<sub>c</sub>γ-Rezeptoren. So kann deglykosyliertes bzw. desialisiertes IgG in vivo keine Immunantwort mehr auslösen. Damit haben Glykosylierung und Sialisierung des IgG-Proteins Auswirkung auf die Effektivität der Immunabwehr (antiinflammatorische Wirkung).

Um die Bedeutung von Proteinglykosylierungen für diese Arbeit hervorzuheben sei erwähnt, dass bei RA-Patienten die F<sub>c</sub>-Fragmente des IgGs vermindert sialisiert und galaktosyliert vorliegen, woraus eine unterschiedlich starke Interaktion mit dem (oft hochtitrigen) Rheumafaktor resultiert. Bereits im frühen Stadium der RA ist am IgG keine Galaktose mehr vorhanden (G0-Status). RA-Patienten sind mit einem positiven prädiktiven Wert von 94 % anhand eines positiven Rheumafaktors und G0-Status erkennbar.

Testpersonen mit normaler IgG-Glykosylierung und negativem Rheumafaktor haben ein geringeres Risiko an RA zu erkranken. D.h. die Deglykosylierung von IgG prädisponiert für die RA-Entstehung und ein verändertes Glykosylierungsmuster kann die Entstehung von Autoimmunerkrankungen fördern und vorhersagbar machen (Gornik and Lauc 2008).

Ebenso bewirkt der vermehrte Östrogeneinfluss bei einer Schwangerschaft, dass das IgG physiologisch vermehrt glykosyliert vorliegt, was einen positiven Effekt auf die RA hat. Es wurden unter Schwangerschaften RA-Remissionen beobachtet, was mit einem hohen Anteil von Glykosylierungen am IgG (aufrecht erhalten eines antiinflammatorischen Milieus) zu tun haben könnte. Demgegenüber gelten IgGs, die ihre Sialsäure verloren haben, als proinflammatorisch (Wuhrer et al. 2007).

Diese Studienergebnisse zur verminderten Proteinglykosylierungen geben Anlass zu überprüfen, welche Auswirkungen die DBP-Glykosylierung haben kann und ob Veränderungen der Glykosylierung einen Effekt auf das Ansprechen auf die ETA-Therapie haben können. Nicht nur die Tatsache, dass vermehrt DBP bei den *respondern* vorhanden ist spielt eine Rolle, sondern auch, dass DBP bei diesen weniger stark glykosyliert ist.

Grundsätzlich sind die DBP-Phänotypen Gc1 und Gc2 unterschiedlich stark glykosyliert. Es wurde gezeigt, dass das enzymatische Abspalten von DBP-Zuckern (Deglykosylierung) zur Entstehung des Makrophagen-aktivierenden-Faktors (MAF) führt (Rehder et al. 2009).

Die humanen Gc1 Proteine haben eine O-Glykosylierung mit einem linearen Trisaccharid, wobei die relevanten Strukturen Galaktose und Sialinsäure sind (Abbildung 51). Aus dieser O-Glykosylierung kann bei aktivierten T- und B-Zellen durch Deglykosylierung MAF entstehen.

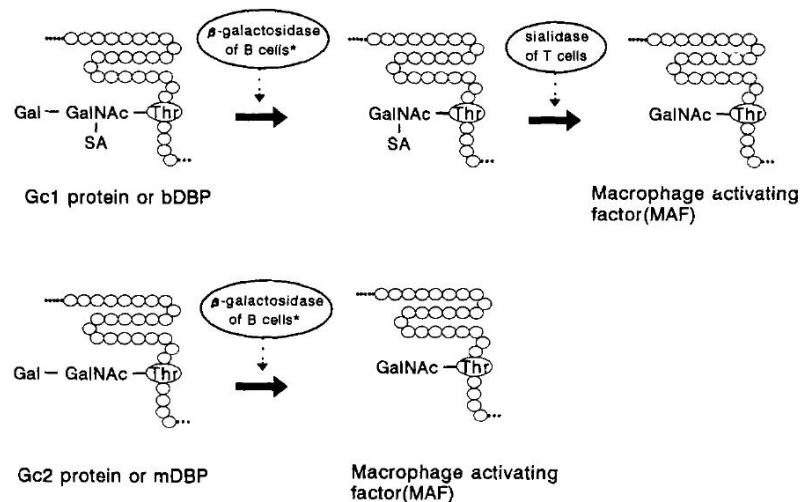


Abbildung 51: Das Modell zeigt die enzymatische Deglykosylierung von DBP zu MAF. Lläuft eine Akut-Phase-Reaktion ab, werden T- und B-Zellen aktiviert. B-Zellen haben auf ihrer Oberfläche das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, welches Galaktose abspaltet. T-Zellen haben das Enzym Neu1-Sialidase zur Abspaltung von Sialinsäure (Yamamoto and Naraparaju 1996). Liegt eine hohe Aktivität der B- bzw. T-Zellen vor, wird viel glykosyliertes DBP (syn. Gc-precursor) in MAF umgewandelt, was zum Effekt hat, dass die Makrophagenaktivität weiter ansteigt.

Beim humanen Gc2 Protein gibt es nur eine Glykosylierungsstelle für ein Disaccharid mit Galaktose. Gc2 Proteine haben kein Trisaccharid gebunden und nur 10 % sind überhaupt glykosyliert (Borges et al. 2008). 20% der Bevölkerung ist vom Genotyp Gc2, bei dem eine Mutation am Lysin vorliegt. Diese Mutation erklärt, warum am Gc2 Protein kein O-glykosydisch gebundenes Trisaccharid gebunden ist (Rehder et al. 2009).

Da im Disaccharid des Gc2 Protein keine Sialinsäure enthalten ist, ist es weniger negativ geladen und daher weiter im basischen Gelbereich lokalisiert (Yamamoto et al. 2009). Zur Entstehung von MAF muss bei Gc2 Proteinen nur Galaktose abgespalten werden, also ist nur die Aktivität  $\beta$ -Galaktosidase nötig (Yamamoto et al. 1996).

Es gibt die Ansicht, dass Gc2 Homozygote mit einem nicht-glykosylierten DBP über den MAF-Mechanismus keine relevante Zahl an Makrophagen aktivieren können (White and Cooke 2000). Das Fehlen von Sialinsäure beim Gc2 Phänotyp soll grundsätzlich die Bildung von MAF ausschließen. Danach gibt es für Gc2 Phänotypen keine Makrophagenaktivierung mit DBP (Haddad 1995).

Eine andere Hypothese besagt, dass bei Gc2 Phänotypen sogar noch schneller MAF generiert werden kann, weil nur ein Enzym ( $\beta$ -Galaktosidase) nötig ist. (Abbas et al. 2008).

---

Sicher aber ist, dass beide Phänotypen über die B- und T-Zell-Enzyme MAF bilden und damit die Aktivität von Makrophagen erhöhen können. Die Kapazität zur MAF-Bildung aber scheint umso höher, je größer die Menge an O-glykosydisch gebundenem Trisaccharid am DBP ist.

Zusätzlich zum proinflammatorischen Effekt von MAF wurde beschrieben, dass DBP (wenn es zu MAF deglykosyliert wird) auch antiangiogentische, antitumoröse und antiproliferative Wirkungen hat (Kanda et al. 2002).

Die Enzyme zur Deglykosylierung des DBP stammen – wie oben erwähnt - entweder von während der Akut-Phase-Reaktion aktivierten B- und T-Zellen oder sogar aus Zellen eines Primärtumors, der damit einen zweiten Tumor am Wachstum hindern kann. So können Tumorzellen glykosyliertes und potentiell antitumoröses DBP inaktivieren, so dass kein MAF mehr entstehen kann (Kisker et al. 2003).

Das DBP der *responder* hat in den Versuchen eine geringere Glykosylierung gezeigt, während das DBP bei den *non-respondern* stärker glykosyliert war. Die Frage ist ob, sich die Gruppen zuverlässig anhand des DBP-Phänotyps unterscheiden lassen.

Durch deglykosyliertes DBP bei den *non-respondern* könnte die proinflammatorische Wirkung von MAF im Vordergrund stehen und sich in einer verstärkten Makrophagenaktivität sowie konsekutiv erhöhtem TNF $\alpha$ -Spiegel äußern. Wegen der dann bei den *non-respondern* erhöhten Entzündungsaktivität ist ein schlechteres Ansprechen auf ETA möglicherweise erklärbar. Die B- und T-Zell-Enzyme sind im RA-Entzündungsprozess aktiviert und spalten das glykosylierte DBP zu MAF und unterhalten zusätzlich die ablaufende Entzündungsreaktion im Sinne eines positiven *Feed-back* Mechanismus.

Die zusätzliche Makrophagenaktivierung und die daraus folgende TNF $\alpha$ -Produktion, das antiangiogentische und antiproliferative Milieu unterstützen die RA-Persistenz bei den *non-respondern* und wirken sich negativ auf den Behandlungserfolg mit ETA aus.

Um die Fragestellung dieser Arbeit nach einem Merkmal zur Unterscheidung der *responder* und *non-responder* zu klären, bietet es sich an, zu messen, wie gut aus glykosyliertem DBP (DBP-*precursor*) MAF gebildet werden kann. Die Höhe der DBP-*precursor* Aktivität ist über die Superoxidgenerierung (nmol/min/10<sup>6</sup>Phagozyten) in einem Assay messbar und ist umso höher, je größer die Gc-*precursor* Aktivität ist. Eine hohe Gc-*precursor* Aktivität (wie bei den *non-respondern* zu erwarten) ginge mit einer starken Superoxidproduktion einher.

*Responder* müssten über geringe bis gar keine DBP-*precursor* Aktivität verfügen, weil sie wenig glykosyliertes DBP haben. Bei den *respondern* ist durch die verminderte Glykosylierung eine weniger ausgeprägte MAF-Entstehung wahrscheinlich und es könnten synergistisch zur ETA-Therapie die positiven, therapieunterstützenden Effekte von DBP essentiell für den Behandlungserfolg sein.

---

Durch geringere MAF-Entstehung haben *responder* keinen weiteren Aktivierungsweg für Makrophagen und somit auch eine TNF $\alpha$ -Quelle weniger. Diejenige Patientengruppe, die vor Therapiebeginn eine niedrigere *Gc-precursor* Aktivität aufzeigt, könnte dann als *responder* klassifiziert werden.

Außerdem wäre denkbar, direkt die Enzymaktivität von  $\beta$ -Galaktosidase und Sialidase zu bestimmen, um einen Rückschluss auf die Gruppenzugehörigkeit zu ermöglichen. Die Enzyme  $\beta$ -Galaktosidase und Sialidase müssten im Aktivitätsassay bei *non-respondern* eine hohe Aktivität zeigen, da viel MAF aus glykosylierten DBP gebildet werden kann.

Eine DBP-Phänotypisierung der RA-Kohorte wäre interessant um zu analysieren ob DBP-Phänotypen mit der Gruppe *responder* oder *non-responder* in der gesamten Studienkohorte korrelieren.

Dass eine Zuordnung von DBP-Phänotypen zur Anfälligkeit gegenüber chronischen Erkrankungen möglich ist zeigt z.B., dass der DBP-Phänotyp mit Anfälligkeit und Schweregrad der COPD (chronisch obstruktive Bronchitis) assoziiert ist. Es liegt eine verminderte Frequenz von Gc2 Phänotypen bei COPD-Patienten vor und homozygote Gc1 Phänotypen sind stärker gefährdet eine COPD zu entwickeln (Speeckaert et al. 2006). Die unterschiedlichen Phänotypen mit ihrer unterschiedlichen Kapazität zur MAF-Bildung scheinen entweder für eine chronische Erkrankung zu prädisponieren oder davor zu schützen.

Bezogen auf die RA wurde festgestellt, dass sich das Gc2 Allel bei RA-Patienten etwas häufiger findet als bei Kontrollgruppen, jedoch ohne statistische Relevanz (Papiha and Pal 1985; Kahl et al. 1989).

Es wurden Theorien vorgestellt die behaupten, dass z.B. der Gc2 Phänotyp (hier hypothetisch die *responder*) wegen fehlender Trisaccharid-Glykosylierung per se kein MAF produzieren könne. Somit wäre durch eine Phänotypisierung eine gute Möglichkeit gegeben, um *responder* zu identifizieren.

Dem widerspricht hingegen die Theorie, dass Gc2 Phänotypen (nur mit einer Galaktose glykosyliert) zwar weniger Zuckerstrukturen haben, aber dennoch schneller als der Gc1 Phänotyp und mit nur einem Enzym zu MAF umgewandelt werden können. Hier könnte ergänzend zur Phänotypisierung eine Messung der Superoxid-Produktion (*Gc-precursor* Aktivität) zur Unterscheidung der Gruppen angeschlossen werden.

Bezogen auf DBP-Phänotypen und MAF-Produktion wurden Studien vorgestellt, nach denen besonders der Gc1 Phänotyp effektiv MAF produzieren kann. Möglicherweise ist die Glykosylierung von DBP bei den *non-respondern* auf die Gc1 Konfiguration zurückzuführen, die stark mit Di- und Trisacchariden glykosyliert sind. Gc1 Phänotypen würden nach dem hier vorgestellten Konzept als *non-responder* gelten und haben aufgrund ihres Proteomprofils geringe Chancen von einer ETA-Therapie zu profitieren.

Zusammengenommen lässt sich die Hypothese formulieren, dass ETA nicht zum Therapieerfolg führen könnte, weil sich bei den *non-respondern* durch zusätzlich aktivierte Makrophagen und eine weitere TNF $\alpha$ -Quelle ein insgesamt höheres Entzündungslevel etabliert hat. Die stark glykosylierten Vitamin-D-binding Proteine und ein niedriges Hp-Level wirken der Entzündung weder entgegen noch synergistisch mit ETA, so dass die chronische Entzündung durch Deglykosylierung von DBP endogen unterhalten wird. Erkennbar wären die *non-responder* an einer hohen Kapazität zur Superoxidproduktion und einem spezifischen Hp- und DBP-Phänotyp, der an einer größeren Kohorte zu bestätigen bleibt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es sich bei *non-respondern* um Gc1 Phänotypen und/oder Hp2-1 Phänotypen handelt. Bei den *respondern* (potentiell Gc2 Phänotyp) herrscht durch eine gute Aktinbindungskapazität, gute Vitamin D-Verfügbarkeit und die hohe Haptoglobinexpression ein antientzündliches, antioxidatives und angiogentisches [zumindest nicht zusätzlich proinflammatorisches] Milieu, was die Wirkung von ETA unterstützt.

Es könnte durch die Bestimmung des Gc- und Hp- Phänotypen zusammen mit den Enzymaktivitätsassays eine Voraussage auf die ETA-*response* möglich sein.

## 4.2 Gelfreie Proteomics

Die folgenden Abschnitte thematisieren bisherige Ergebnisse von Proteomicsstudien, die mithilfe von gelfreien Techniken (SELDI) erzielt wurden. Es werden beispielhaft Biomarker zur Karzinom- und RA-Früherkennung vorgestellt, wobei die RA-Studienanzahl sehr klein ist.

### 4.2.1 Biomarkerdetektion bei Karzinomen

Bei Nierenkarzinompatienten wurden mit SELDI z.B. die Proteine SAA, Hp und ein unidentifizierter Proteinpeak als krankheitsspezifisch beschrieben. Die Autoren der Studie sprechen der SELDI-Technik großes Potential zu, Biomarker reproduzierbar und krankheitsspezifisch zu detektieren (Tolson et al. 2004). Bei der Untersuchung von Patienten, die ein Prostatakarzinom hatten, wurde im SELDI-Experiment der *peak* bei 8.946 m/z mit einer höheren Intensität im Serum gefunden und als Apolipoprotein A2 identifiziert (Malik et al. 2005). Im Bereich der gynäkologischen Tumoren wurde mit SELDI in Seren von Patientinnen mit Ovarialkarzinomgruppe eine zweifache Überexpression der Hp $\alpha_2$ -Kette gefunden (Ye et al. 2003).

### 4.2.2 Bisherige Biomarkerdetektion bei RA

Mit einer SELDI-Untersuchung des Plasmas von RA-Patienten wurden die Proteine SAA und Transthyretin als Marker zur Unterscheidung von aktiver und inaktiver RA identifiziert (Naishiro et al. 2007). Aus Synovialflüssigkeit von RA- und OA-Patienten wurden Proteinprofile mit SELDI untersucht, wobei als stärkstes Signal bei RA-Patienten ein Protein bei 10.850 m/z detektiert wurde. Dieses Protein war bei RA-Patienten vermehrt vorhanden und wurde



als MRP8 (S100A8) identifiziert. Hohe MRP8-Serumspiegel gelten bei RA als krankheitsassoziiert. Die Ergebnisse dienen als Beleg, dass SELDI gut zur Identifikation von Proteinen nutzbar ist, die bei spezifischen Erkrankungen vermehrt vorhanden sind (Uchida et al. 2002). Ebenfalls das Protein MRP8 wurde mit SELDI als ein Marker zum Aufdecken allgemeiner entzündlicher Prozesse entdeckt. Darüber hinaus korreliert das Protein mit dem anti-CCP Titer von RA-Patienten. Die Autoren bezeichnen nicht einzelne SELDI-Peaks, sondern eine Kombination aus mehreren als realistische RA-Frühmarker (de Seny et al. 2005).

Ganz im Sinne einer Kombination von *m/z-peaks* fanden Liu et al. in einer SELDI-Analyse von Serum vier verschiedene *m/z*-Werte zur Unterscheidung Gesunder und RA-Patienten (Liu et al. 2008). S100A8 galt in vielen Studien als vielversprechender Biomarker. Alle S100 Proteine wurden als rheumatische Biomarker in verschiedenen Zusammenhängen identifiziert und sind in verschiedenen autoimmun und entzündlich bedingten Erkrankungen von Bedeutung. Die Autoren betonen aber, dass S100 Proteine als Biomarker für rheumatische Erkrankungen im Allgemeinen, nicht aber als spezifische RA-Marker zu verstehen sind (Lambrecht et al. 2008).

Für eine Behandlung der RA mit Medikamenten der traditionellen japanischen Medizin wurde mit SELDI die H $\rho_{\alpha_1}$ -Kette als Plasmabiomarker für die Klassifizierung als *responder* und *non-responder* identifiziert (Ogawa et al. 2007).

Alle bisher gezeigten Studienergebnisse stellen aber keine Marker für das Ansprechen auf eine Anti-TNF $\alpha$ -Therapie dar. Es kommt nur die folgende Studie dem Interesse am nächsten, einen prädikativen Biomarker zur Vorhersage auf den Erfolg einer ETA-Therapie zu finden: Bei einer mit ETA behandelten RA-Patientengruppe, wurde ein Biomarker-Set mit 24 Proteinen detektiert, welches eine Vorhersage der *response* auf ETA ermöglichte. Das Fazit war, dass eine Kombination von Autoantikörpern, Zytokinen und Proteinmarkern bei RA-Patienten auf eine ETA-*response* oder *non-response* hinweisen (Hueber et al. 2009).

### 4.2.3 Ergebnisse der gelfreien Serumanalytik mit SELDI

Die SELDI-Untersuchung dieser Arbeit liefert den Hinweis, dass der Proteinpeak bei 28.718 *m/z* charakteristisch für die untersuchten Seren der *non-responder* ist.

Wie die vorangegangenen vorgestellten Studien belegen, ist es wahrscheinlicher im SELDI-Experiment in einer ausreichend großen Kohorte eine Kombination mehrerer Proteine als Biomarker zu definieren und nicht nur einen einzelnen Proteinpeak.

Außerdem ist es aussichtsreicher, die gefundenen Proteine zusammen mit weiteren Markern zu benutzen, um Patienten als *responder* bzw. *non-responder* zu klassifizieren.

Um eine valide Aussage zum prädiktiven Wert des Proteins bei 28.718 *m/z* machen zu können, bedarf es einer weiteren SELDI-Untersuchung zur Biomarkerdetektion an einer ausreichend großen Patientenkohorte aus der vorliegenden Studie.

## 5 Zusammenfassung

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die unbehandelt zu Knochendestruktionen führt und mit einem Funktionsverlust der betroffenen Gelenke einhergeht. Die Ätiologie der Erkrankung ist unklar, wobei pathogenetisch am wahrscheinlichsten eine Fehlregulation des Immunsystems anzunehmen ist. Mit 1 % Prävalenz ist die RA die häufigste Gelenkerkrankung in den westlichen Industrieländern.

Neben der symptomatischen Therapie mit NSAR, Kortikosteroiden und DMARDs gibt es seit 10 Jahren mit dem Einsatz von Biologika (TNF $\alpha$ - und IL-Antagonisten) eine spezifische Therapie, um die Progression der RA zu stoppen. Dabei zeigten Studien eine gute Wirksamkeit des TNF $\alpha$ -Antagonisten Etanercept.

Aus bisher ungeklärten Gründen kommt es jedoch bei 30 - 40 % der behandelten RA-Patienten zu einem Therapieversagen (*non-response*).

Es ist bislang noch nicht gelungen *responder* und *non-responder* vor Beginn der nebenwirkungsreichen und teuren Biologikatherapie zu charakterisieren und zu identifizieren.

Die Studie hat zum Ziel, mithilfe proteomischer Methoden im Patientenserum das individuelle Proteom zu analysieren und serologische Biomarker zu detektieren, die es möglich machen, vor Therapiebeginn die potentiellen *responder* von den *non-respondern* zu unterscheiden.

Das Serum der RA-Patienten wurde in den zwei Gruppen (*responder* und *non-responder*) mit 2D-DIGE-Gelen vor dem Therapiebeginn und unter der Therapie in Woche 12 bzw. 24 analysiert und die Proteinregulation quantitativ ausgewertet.

Bei den insgesamt 229 identifizierten Serumproteinen ergaben sich insgesamt 35 verschiedene Proteine. Zu identischen Identifizierungsergebnissen kann es durch Doppelbestimmungen und dem Vorhandensein von Proteinisoformen kommen. Bei Proteinisoformen liegt das identische Protein mit nur geringen Modifikationen vor. Durch posttranslationale Modifikationen (wie z.B. die Glykosylierung) kommt es zu unterschiedlichen Ladungen von Proteinen und damit zu unterschiedlichen Positionen im 2D-Gel.

In der Gruppe der *responder* fielen im DIGE-Gel zum Zeitpunkt V0 elf Proteine auf, die eine vermehrte Expression im Vergleich zur *non-responder* Gruppe aufwiesen.

Für die *responder* war die Proteinregulation von Haptoglobin, Vitamin-D-binding Protein,  $\alpha$ 1-Antitrypsin, Vitronektin und Apolipoprotein C3 vor bzw. während der ETA-Therapie charakteristisch. Die genannten Proteine waren bei den *respondern* überexprimiert, bzw. ihre Regulation veränderte sich im Therapieverlauf.

Im gelfreien Untersuchungsansatz mit SELDI fiel zum Zeitpunkt V0 bei den *non-respondern* das Protein mit dem m/z- Wert 28.718 auf.

Haptoglobin und Vitamin-D-binding Protein stellten in dieser Untersuchung eine Möglichkeit dar, *responder* von *non-respondern* zu unterscheiden, sodass weitere Untersuchungen dieser Proteine mit Western Blot durchgeführt wurden. In diesen Versuchen zeigten sich für die Haptoglobin-Ketten uneinheitliche Proteinregulationen.

Der Haptoglobin Phänotyp hingegen könnte eine Möglichkeit zur Unterscheidung der Gruppen darstellen, da besonders der Hp2-1 Phänotyp bei den *non-respondern* gehäuft auftrat.

Im 2D-WB und in Färbungen der Glykoproteinstrukturen von DBP ergaben sich Hinweise, dass das DBP von *respondern* und *non-respondern* unterschiedlich stark glykosyliert ist.

Die *non-responder* wiesen ein vermehrt glykosyliertes DBP auf, das DBP der *responder* war weniger stark glykosyliert.

Daraus ergibt sich die Hypothese, dass durch die verstärkte DBP-Glykosylierung und unter den persistierenden, entzündlichen Bedingungen die bei den *non-respondern* vorherrschen, eine vermehrte Deglykosylierung des DBP stattfinden könnte, was zu einer vermehrten Makrophagenaktivierung führt und eine weitere TNF $\alpha$ -Quelle zur Unterhaltung des Entzündungsprozesses darstellt.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass sich mit den gewählten Methoden mehrere Proteine nachweisen lassen, die bei *respondern* bzw. *non-respondern* charakteristisch exprimiert sind.

Zusammenfassend könnten der Hp-Phänotyp und der DBP-Phänotyp sowie die Glykosylierungsstruktur von Vitamin-D-binding Protein eine Möglichkeit darstellen, *responder* und *non-responder* vor dem Beginn einer Anti-TNF $\alpha$ -Therapie voneinander zu unterscheiden.

Bei den *non-respondern* liegt eine stärkere Glykosylierung des DBP vor und sie sind häufiger vom Hp2-1 Phänotyp.

Die *responder* verfügen in ihrem Proteomprofil neben einem schwach glykosylierten, aber dafür vermehrt vorhandenen DBP, über eine vermehrte Hp-Expression. Den *respondern* kommen unter der ETA-Therapie die positiven Effekte von DBP und Hp zusätzlich zur TNF $\alpha$ -Blockade zugute.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine Untersuchung des Serums einer größeren RA-Kohorte mit SELDI und DIGE-Gelen gute Möglichkeiten bietet, die hier diskutierten Proteine als Marker zu bestätigen und sogar weitere Biomarker zu finden.

Die Haptoglobin- und DBP-Phänotypisierung dieser RA-Patienten-Kohorte hat das Potential, als Biomarker zur Identifikation von *respondern* und *non-respondern* zu dienen.

# 6 Anhang: Messwerttabellen

## Messwerttabellen der DIGE-Experimente

01 07 09 Spotquantifizierung V0 DIGE Gel																					
Responder V0								Non-Responder V0								NR/R	R/NR				
1	2	3	4	mean	median	rsd	n	1	2	3	4	mean	median	rsd	n	Ratio	Ratio	t-test	Spot/Identifikation		
119,0932	145,8329	150,2671	136,613	137,952	141,2229	8,6625	4	75,8254	44,8247	64,7528	74,1805	64,8958	69,4666	19,006	4	0,47	2,12	99,968	1 Vitamin D-binding		
95,62067	95,89965	91,98577	90,2142	93,4301	93,80322	2,5846	4	105,007	105,52	106,122	107,716	106,091	105,821	0,9592	4	1,136		99,984	10 Kininogen		
131,2205	127,4908	144,988	146,354	137,513	138,1043	6,0196	4	61,6245	59,3362	71,1888	71,1435	65,8232	66,384	8,2096	4	0,479	2,09	99,998	105 Hp alpha2		
112,1322	110,3019	108,1338	109,219	109,947	109,7603	1,3428	4	82,9054	83,1133	93,0904	92,2373	87,8366	87,6753	5,5071	4	0,799		99,972	110 Hp beta		
93,31706	92,85449	92,14321	91,7842	92,5247	92,49885	0,6463	4	108,809	111,024	106,127	106,244	108,051	107,527	1,8731	4	1,168	0,86	99,999	2 Vit D- binding		
130,1525	127,5578	147,4285	150,636	138,944	138,7905	7,3364	4	63,8688	64,0552	67,8258	66,6001	65,5875	65,3276	2,5669	4	0,472	2,13	99,998	28 V5 Apolipo C3		
131,7672	126,0144	135,8989	136,668	132,587	133,8331	3,1886	4	60,2754	60,9744	73,5679	76,5371	67,8387	67,2711	10,752	4	0,512	1,95	99,999	V0 29 Hapt alpha1		
139,8966	128,6795	174,2558	155,218	149,513	147,5574	11,445	4	52,9705	60,4985	51,4595	65,5388	57,6168	56,7345	9,9159	4	0,385	2,6	99,988	29 V5 Vitronectin		
93,05613	88,40052	88,51094	84,348	88,5789	88,45573	3,4788	4	108,809	111,024	106,127	106,544	116,169	117,048	119,261	5,6704	4	1,321		99,948	30 SAA	
116,4884	115,7405	122,7769	123,463	119,617	119,6327	2,9436	4	76,7013	74,3008	82,6516	82,8607	79,1286	79,6764	4,7091	4	0,662		99,999	58 Apolipoprotein A1		
78,79111	81,29985	67,64452	69,0731	74,2021	73,9321	7,9941	4	135,567	130,919	125,723	122,414	128,655	128,321	3,895	4	1,734		99,998	V0 6 Hapt		
115,8249	117,8477	121,6701	125,687	120,257	119,7589	3,137	4	79,7498	75,9746	83,2747	80,978	79,9943	80,3639	3,3042	4	0,665	1,49	99,999	7 alpha1-antitrypsin		
128,071	97,20577	132,2524	134,402	122,983	130,1617	12,242	4	78,3003	126,637	82,2326	77,8778	91,262	80,2664	22,457	4	0,742	1,35	92,598	88 Vitronectin		
140,9405	131,6474	134,1222	136,144	135,713	135,133	2,5143	4	44,2741	49,54	81,3032	77,6274	63,1862	63,6837	26,013	4	0,466		99,971	??		
162,8988	139,5892	170,8434	256,675	182,502	166,8711	24,294	4	16,1287	42,6163	53,9037	14,4766	31,7813	29,3725	53,381	4	0,174		99,848	???		
140,6132	129,5665	167,4316	158,95	149,14	149,7818	9,9828	4	41,6734	41,7963	58,9627	66,7881	52,3051	50,3795	20,89	4	0,351		99,99	PX12		
92,96054	91,67393	89,69925	90,2742	91,152	90,97404	1,3903	4	109,818	112,546	108,442	106,795	109,4	109,13	1,9269	4	1,2	0,83	99,999	V024 SAA		
94,65018	94,76266	88,32968	89,9663	91,9272	92,30821	3,0884	4	107,02	107,185	109,402	107,946	107,888	107,565	0,8724	4	1,174	0,85	99,991	V0 5 Hp alpha2		
140,945	135,4291	150,5119	148,365	143,813	144,655	4,1737	4	49,7958	49,686	66,2971	68,6247	58,6009	58,0465	15,184	4	0,407	2,4	99,999	V07 Hp-related		
152,9827	146,4146	181,5301	188,989	167,479	167,2564	10,822	4	37,6659	36,4054	49,3591	48,7437	43,0435	43,2048	14,005	4	0,257	3,89	99,997	V0 28 Hp alpha1		
																wenn Ratio > 2, dann R/NR -->bei R hochreguliert					
																wenn Ratio < 0,5 dann R/NR -->bei NR runterreguliert					

01 07 09																			
Responder V5								Non-Responder V5								NR/R			
1	2	3	4	mean	median	rsd	n	1	2	3	4	mean	median	rsd	n	Ratio	t-test	spot ID	
104,3718	148,7794	108,3969	93,8595	113,8519	106,3844	18,3152	4	95,2698	52,7556	92,0325	102,9906	85,7621	93,6512	22,6997	4	0,75	86,1	1	Vitamin D binding Protein
99,73944	99,47319	101,2978	99,242	99,93813	99,60631	0,80502	4	100,193	101,235	99,9378	101,1157	100,62	100,654	0,56047	4	1,01	72,57	10	Kininogen
106,1582	106,3965	107,984	112,376	108,2286	107,1903	2,30539	4	92,7207	91,972	93,8537	91,39199	92,4846	92,3464	0,99492	4	0,85	99,99	104	Apolipoprotein A1
116,9694	121,7249	135,4866	123,475	124,414	122,6	5,48299	4	80,6056	75,1777	77,8989	84,88156	79,641	79,2523	4,49887	4	0,64	99,99	12	Albumin
91,37459	91,77251	89,33583	88,4069	90,22246	90,35521	1,54898	4	110,619	110,063	108,295	108,8595	109,459	109,461	0,84521	4	1,21	100	3	Vitamin D binding Protein
110,0851	109,1155	114,355	112,487	111,5106	111,2858	1,83851	4	86,15	85,9386	89,8201	89,218	87,7817	87,684	1,99582	4	0,79	100	58	Apolipoprotein A1
127,9372	111,067	151,0869	157,02	136,7777	139,512	13,4497	4	71,9616	87,2995	70,2365	68,21856	74,429	71,099	10,1411	4	0,54	99,84	5a=7	alpha-1-antitrypsin
92,0234	92,52703	92,78181	94,7073	93,00987	92,65442	1,09372	4	111,183	109,536	105,378	103,6172	107,429	107,457	2,84122	4	1,16	99,98	V012	Apolipoprotein A4
101,5846	102,7626	100,9883	102,207	101,8857	101,896	0,65259	4	97,4214	95,4128	98,467	97,45331	97,1886	97,4373	1,14021	4	0,95	99,93	V014	Clustern
112,3517	113,914	109,1138	118,049	113,3571	113,1328	2,83596	4	84,5002	82,5862	96,201	89,50923	88,1992	87,0047	5,97083	4	0,78	99,96	110	Haptoglobin

01 07 09																			
Responder V5								Non-Responder V5								NR/R			
1	2	3	4	mean	median	rsd	n	1	2	3	4	mean	median	rsd	n	Ratio	t-test	spot ID	
104,3718	148,7794	108,3969	93,8595	113,8519	106,3844	18,3152	4	95,2698	52,7556	92,0325	102,9906	85,7621	93,6512	22,6997	4	0,75	86,1	1	Vitamin D binding Protein
99,73944	99,47319	101,2978	99,242	99,93813	99,60631	0,80502	4	100,193	101,235	99,9378	101,1157	100,62	100,654	0,56047	4	1,01	72,57	10	Kininogen
106,1582	106,3965	107,984	112,376	108,2286	107,1903	2,30539	4	92,7207	91,972	93,8537	91,39199	92,4846	92,3464	0,99492	4	0,85	99,99	104	Apolipoprotein A1
116,9694	121,7249	135,4866	123,475	124,414	122,6	5,48299	4	80,6056	75,1777	77,8989	84,88156	79,641	79,2523	4,49887	4	0,64	99,99	12	Albumin
91,37459	91,77251	89,33583	88,4069	90,22246	90,35521	1,54898	4	110,619	110,063	108,295	108,8595	109,459	109,461	0,84521	4	1,21	100	3	Vitamin D binding Protein
110,0851	109,1155	114,355	112,487	111,5106	111,2858	1,83851	4	86,15	85,9386	89,8201	89,218	87,7817	87,684	1,99582	4	0,79	100	58	Apolipoprotein A1
127,9372	111,067	151,0869	157,02	136,7777	139,512	13,4497	4	71,9616	87,2995	70,2365	68,21856	74,429	71,099	10,1411	4	0,54	99,84	5a=7	alpha-1-antitrypsin
92,0234	92,52703	92,78181	94,7073	93,00987	92,65442	1,09372	4	111,183	109,536	105,378	103,6172	107,429	107,457	2,84122	4	1,16	99,98	V012	Apolipoprotein A4
101,5846	102,7626	100,9883	102,207	101,8857	101,896	0,65259	4	97,4214	95,4128	98,467	97,45331	97,1886	97,4373	1,14021	4	0,95	99,93	V014	Clustern
112,3517	113,914	109,1138	118,049	113,3571	113,1328	2,83596	4	84,5002	82,5862	96,201	89,50923	88,1992	87,0047	5,97083	4	0,78	99,96	110	Haptoglobin

Tabelle 8: Spotquantitäten der regulierten Proteine der DIGE-Gele V0, V5, V6.

Vergleich von depletiertem Serum der responder mit den non-respondern. 1,2,3,4 (Gelnummer), mean (Mittelwert), median (Median), (rsd) Standardabweichung, n (Anzahl der eingerechneten Messerte), Ratio (Quotient der Mittelwerte der Vergleichsgruppen). Spotquantitäten sind in Volumen-Prozent angegeben.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbas S, Linseisen J, Slanger T, Kropp S, Mutschelknauss EJ, Flesch-Janys D and Chang-Claude J (2008): The Gc2 allele of the vitamin D binding protein is associated with a decreased postmenopausal breast cancer risk, independent of the vitamin D status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 1339-1343
- Aebersold R and Goodlett DR (2001): Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* 101, 269-295
- Agrawal S, Misra R and Aggarwal A (2007): Autoantibodies in rheumatoid arthritis: association with severity of disease in established RA. *Clin Rheumatol* 26, 201-204
- An Y, Pu H, He SZ and Li ZG (2005): [Identification of biomarkers in serum of early rheumatoid arthritis by proteomic methods]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 85, 1261-1265
- Anderson NL and Anderson NG (2002): The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 1, 845-867
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS (1988): The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31, 315-324
- Atkinson AJ, Colburn W, DeGruttola V, DeMets D, Downing G, Hoth D, Oates J, Peck C, Schooley R, Spilker B (2001): Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69, 89-95
- Bai S, Liu S, Guo X, Qin Z, Wang B, Li X and Qin Y (2009): Proteome analysis of haptoglobin in cerebrospinal fluid of neuromyelitis optica. *Mol Biol Rep* 37, 1619-1625
- Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, Schiff MH, Keystone EC, Genovese MC, Wasko MC, Moreland LW, Weaver AL (2000): A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 343, 1586-1593
- Beisembayeva RU, Mursagalieva AT, Dzhumaliev LM, Shaikenov TE and Mevkh AT (1990): Identification of haptoglobin as an endogenous inhibitor of prostaglandin H synthase in the cytosol fraction of primary cells from sheep vesicular glands. *FEBS Lett* 269, 125-127
- Bennett MR, Ravipati N, Ross G, Nguyen MT, Hirsch R, Beekman RH, Rovner L and Devarajan P (2008): Using proteomics to identify preprocedural risk factors for contrast induced nephropathy. *Proteomics Clin Appl* 2, 1058-1064
- Berkova N, Gilbert C, Goupil S, Yan J, Korobko V and Naccache PH (1999): TNF-induced haptoglobin release from human neutrophils: pivotal role of the TNF p55 receptor. *J Immunol* 162, 6226-6232
- Bernhard J and Villiger PM (2001): Rheumatoide Arthritis: Pathogenese und Pathologie. *Schweizerisches Medizin-Forum (SMF)* 8, 179-183
- Beutler B (1999): The Role of Tumor Necrosis Factor in Health and Disease. *J Rheumatol* 26, 16-21
- Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL and Montori V (2006): Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* 295, 2275-2285
- Borges CR, Jarvis JW, Oran PE and Nelson RW (2008): Population studies of Vitamin D Binding Protein microheterogeneity by mass spectrometry lead to characterization of its genotype-dependent O-glycosylation patterns. *J Proteome Res* 7, 4143-4153
- 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, 248-254
- Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, van Vollenhoven R, Sharp J, Perez JL and Spencer-Green GT (2006): The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* 54, 26-37
- Brennan FM, Maini RN and Feldmann M (1998): Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 20, 133-147

- Camafeita E, Lamas JR, Calvo E, López JA and Fernández-Gutiérrez B (2009): Proteomics: New insights into rheumatic diseases. *Proteomics Clin Appl* **3**, 226-241
- Cantaert T, De Rycke L, Bongartz T, Matteson EL, Tak PP, Nicholas AP and Baeten D (2006): Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: crucial...but not sufficient! *Arthritis Rheum* **54**, 3381-3389
- Chen G, Gharib TG, Wang H, Huang CC, Kuick R, Thomas DG, Shedden KA, Misek DE, Taylor JM, Giordano TJ (2003): Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13537-13542
- Choy EH and Panayi GS (2001): Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **344**, 907-916
- Cid MC, Grant DS, Hoffman GS, Auerbach R, Fauci AS and Kleinman HK (1993): Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J Clin Invest* **91**, 977-985
- Coombes KR, Morris JS, Hu J, Edmonson SR and Baggerly KA (2005): Serum proteomics profiling--a young technology begins to mature. *Nat Biotechnol* **23**, 291-292
- Cronstein BN (2005): Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev* **57**, 163-172
- Dahlqvist SR and Frøhlander N (1985): Haptoglobin Groups and Rheumatoid Arthritis. *Hum Hered* **35**, 207-211
- Dayer JM (2002): Interleukin 1 or tumor necrosis factor-alpha: which is the real target in rheumatoid arthritis? *J Rheumatol Suppl* **65**, 10-15
- de Hoog CL and Mann M (2004): Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **5**, 267-293
- Depper JM and Zvaifler NJ (1981): Epstein-Barr virus. Its relationship to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **24**, 755-761
- de Seny D, Fillet M, Meuwis MA, Geurts P, Lutteri L, Ribbens C, Bours V, Wehenkel L, Piette J, Malaise M (2005): Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum* **52**, 3801-3812
- Despres N, Boire G, Lopez-Longo FJ and Menard HA (1994): The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **21**, 1027-1033
- Dihazi H, Dihazi GH, Nolte J, Meyer S, Jahn O, Muller GA and Engel W (2009): Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells: comparative proteomic approach. *J Proteome Res* **8**, 5497-5510
- Dobryszczycka W (1997): Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **35**, 647-654
- Doherty NS, Littman BH, Reilly K, Swindell AC, Buss JM and Anderson NL (1998): Analysis of changes in acute-phase plasma proteins in an acute inflammatory response and in rheumatoid arthritis using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 355-363
- Dotzlaw H, Schulz M, Eggert M and Neeck G (2004): A pattern of protein expression in peripheral blood mononuclear cells distinguishes rheumatoid arthritis patients from healthy individuals. *Biochim Biophys Acta* **1696**, 121-129
- Drynda S, Ringel B, Kekow M, Kuhne C, Drynda A, Glocker MO, Thiesen HJ and Kekow J (2004): Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract* **200**, 165-171
- Fairney A, Straffen AM, May C and Seifert MH (1987): Vitamin D metabolites in synovial fluid. *Ann Rheum Dis* **46**, 370-374
- Fernandez-Suarez A, Reneses S, Wichmann I, Criado R and Nunez A (2005): Efficacy of three ELISA measurements of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med* **43**, 1234-1239
- Fuchs HA (1993): The use of the disease activity score in the analysis of clinical trials in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **20**, 1863-1866
- Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, van Zeben D, Kerstens PJ, Hazes JM, Zwinderman AH, Roodman CD, Han KH, Westedt ML (2005): Clinical and radiographic



- outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis: a randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum* 52, 3381-3390
- Gornik O and Lauc G (2008): Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers* 25, 267-278
- Gornik O, Dumic J, Flogel M and Lauc G (2006): Glycoscience -- a new frontier in rational drug design. *Acta Pharm* 56, 19-30
- Graham DR, Garnham CP, Fu Q, Robbins J and Van Eyk JE (2005): Improvements in two-dimensional gel electrophoresis by utilizing a low cost "in-house" neutral pH sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis system. *Proteomics* 5, 2309-2314
- Gutteridge JM (1987): The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 917, 219-223
- Haddad JG (1995): Plasma vitamin D-binding protein (Gc-globulin): multiple tasks. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53, 579-582
- Hamby SE and Hirst JD (2008): Prediction of glycosylation sites using random forests. *BMC Bioinformatics* 9, 500
- Hamrita B, Chahed K, Trimeche M, Guillier CL, Hammann P, Chaieb A, Korbi S and Chouchane L (2009): Proteomics-based identification of alpha1-antitrypsin and haptoglobin precursors as novel serum markers in infiltrating ductal breast carcinomas. *Clin Chim Acta* 404, 111-118
- Hartwig C, Walburgis P, Wilhelm P, Johann W and Angelika G (1982): Analysis of the genetic variants of the human Gc system (VDBP) by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 3, 342-345
- Head JF, Swamy N and Ray R (2002): Crystal structure of the complex between actin and human vitamin D-binding protein at 2.5 Å resolution. *Biochemistry* 41, 9015-9020
- Hellman U, Wernstedt C, Gonez J and Heldin CH (1995): Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* 224, 451-455
- Hillenkamp F and Karas M (1990): Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol* 193, 280-295
- Hochberg MC, Chang RW, Dwosh I, Lindsey S, Pincus T and Wolfe F (1992): The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35, 498-502
- Höck AD (2009): Nukleärer Faktor kappa B (NF-κB), Vitamin D und intrazelluläres Calcium. Zitiert nach Zusammenfassung des Vortrages (gehalten am 23.05.2009). in: CFS/ME-Fachtagung des Fatigatio e.V., Würzburg 23.05.2009, S. 117-127
- Hueber W, Tomooka BH, Batliwalla F, Li W, Monach PA, Tibshirani RJ, Van Vollenhoven RF, Lampa J, Saito K, Tanaka Y (2009): Blood autoantibody and cytokine profiles predict response to anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 11, R76
- Huntoon KM, Wang Y, Eppolito CA, Barbour KW, Berger FG, Shrikant PA and Baumann H (2008): The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity. *J Leukoc Biol* 84, 170-181
- Hutchens TW and Tai-Tung Y (1993): New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Commun Mass Spectrom* 7, 576-580
- Hyrich KL, Watson KD, Silman AJ and Symmons DP (2006): Predictors of response to anti-TNF-alpha therapy among patients with rheumatoid arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Rheumatology (Oxford)* 45, 1558-1565
- Jahn O, Hesse D, Reinelt M and Kratzin HD (2006): Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 386, 92-103
- Kahl LE, Kamboh MI, Decroo S and Ferrell RE (1989): Alpha-1-antitrypsin (PI) and vitamin-D binding globulin (GC) phenotypes in rheumatoid arthritis: absence of an association. *Dis Markers* 7, 71-78
- Kanda S, Mochizuki Y, Miyata Y, Kanetake H and Yamamoto N (2002): Effects of vitamin D(3)-binding protein-derived macrophage activating factor (GcMAF) on angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 94, 1311-1319

- Keystone EC, Kavanaugh AF, Sharp JT, Tannenbaum H, Hua Y, Teoh LS, Fischkoff SA and Chartash EK (2004): Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. *Arthritis Rheum* 50, 1400-1411
- Kim CW, Cho EH, Lee YJ, Kim YH, Hah YS and Kim DR (2006): Disease-specific proteins from rheumatoid arthritis patients. *J Korean Med Sci* 21, 478-484
- Kisker O, Onizuka S, Becker CM, Fannon M, Flynn E, D'Amato R, Zetter B, Folkman J, Ray R, Swamy N (2003): Vitamin D binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) inhibits angiogenesis and tumor growth in mice. *Neoplasia* 5, 32-40
- Klareskog L, van der Heijde D, de Jager JP, Gough A, Kalden J, Malaise M, Martin Mola E, Pavelka K, Sany J, Settas L (2004): Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 363, 675-681
- Kooloos WM, de Jong DJ, Huizinga TW and Guchelaar HJ (2007): Potential role of pharmacogenetics in anti-TNF treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Drug Discov Today* 12, 125-131
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lai YA, Lai IH, Tseng CF, Lee J and Mao SJ (2007): Evidence of tandem repeat and extra thiol-groups resulted in the polymeric formation of bovine haptoglobin: a unique structure of Hp 2-2 phenotype. *J Biochem Mol Biol* 40, 1028-1038
- Lambrecht S, Tilleman K, Elewaut D and Deforce D (2008): Proteomics in rheumatology: The beginning of a fairy tale? *Proteomics Clin Appl* 2, 411-419
- Lange V (1992): Haptoglobin polymorphism-not only a genetic marker. *Anthropol Anz* 50, 281-302
- Langlois MR and Delanghe JR (1996): Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 42, 1589-1600
- Lee DM and Weinblatt ME (2001): Rheumatoid arthritis. *Lancet* 358, 903-911
- Liu W, Li X, Ding F and Li Y (2008): Using SELDI-TOF MS to identify serum biomarkers of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 37, 94-102
- Löffler G, Petrides PE and Heinrich PC: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Heidelberg 2007
- Lottspeich F and Zobras H: *Bioanalytik*. Spektrumverlag, Berlin 1998
- Maini R, Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, Smolen J, Emery P, Harriman G, Feldmann M (1999): Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. *Lancet* 354, 1932-1939
- Malik G, Ward MD, Gupta SK, Trosset MW, Grizzle WE, Adam BL, Diaz JI and Semmes OJ (2005): Serum levels of an isoform of apolipoprotein A-II as a potential marker for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11, 1073-1085
- Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, Sjoberg O, van Vollenhoven R, Klareskog L and Ronnelid J (2008): Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum* 58, 36-45
- McGuirk J, Hao G, Hou W, Abhyankar S, Williams C, Yan W, Yuan J, Guan X, Belt R, Dejarnette S (2009): Serum proteomic profiling and haptoglobin polymorphisms in patients with GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Hematol Oncol* 2, 17
- Meri S and Baumann M (2001): Proteomics: posttranslational modifications, immune responses and current analytical tools. *Biomol Eng* 18, 213-220
- Mertens M and Singh JA (2009): Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Rheumatol* 36, 1118-1125
- Mielants H and Van den Bosch F (2009): Extra-articular manifestations. *Clin Exp Rheumatol* 27, 56-61



- Mikkat S, Koy C, Ulbrich M, Ringel B and Glocker MO (2004): Mass spectrometric protein structure characterization reveals cause of migration differences of haptoglobin alpha chains in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 4, 3921-3932
- Minden J (2007): Comparative proteomics and difference gel electrophoresis. *Biotechniques* 43, 739, 741, 743 passim
- Mrozinski P, Zolotarjova N and Chen H (2008): Human Serum and Plasma Protein Depletion – Novel High-Capacity Affinity Column for the Removal of the “Top 14” Abundant Proteins. DOI: 5989-7839EN
- Muller-Ladner U, Gay RE and Gay S (2000): Activation of synoviocytes. *Curr Opin Rheumatol* 12, 186-194
- Muller GA, Muller CA and Dihazi H (2007): Clinical proteomics--on the long way from bench to bedside? *Nephrol Dial Transplant* 22, 1297-1300
- Naishiro Y, Suzuki C, Kimura M, Yamamoto M, Takahashi H, Sohma H, Hori T, Shinomura Y, Kokai Y and Imai K (2007): [Plasma analysis of rheumatoid arthritis by SELDI]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 30, 145-150
- Nestorov I (2005): Clinical Pharmacokinetics of Tumor Necrosis Factor Antagonists. *J Rheumatol* 32, 13-18
- Newsome G (2002): Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 update. *J Am Acad Nurse Pract* 14, 432-437
- Nienhuis RL and Mandema E (1964): A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor. *Ann Rheum Dis* 23, 302-305
- Nogueira L, Sebbag M, Vincent C, Arnaud M, Fournie B, Cantagrel A, Jolivet M and Serre G (2001): Performance of two ELISAs for antifilaggrin autoantibodies, using either affinity purified or deimmunized recombinant human filaggrin, in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 60, 882-887
- O'Dell JR (2004): Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350, 2591-2602
- Oelzner P, Muller A, Deschner F, Huller M, Abendroth K, Hein G and Stein G (1998): Relationship between disease activity and serum levels of vitamin D metabolites and PTH in rheumatoid arthritis. *Calcif Tissue Int* 62, 193-198
- Ogawa K, Kojima T, Matsumoto C, Kamegai S, Oyama T, Shibagaki Y, Muramoto H, Kawasaki T, Fujinaga H, Takahashi K (2007): Identification of a predictive biomarker for the beneficial effect of a Kampo (Japanese traditional) medicine keishibukuryogan in rheumatoid arthritis patients. *Clin Biochem* 40, 1113-1121
- Osborn TM, Verdrengh M, Stossel TP, Tarkowski A and Bokarewa M (2008): Decreased levels of the gelsolin plasma isoform in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10, R117
- Papiha SS and Pal B (1985): Gc (vitamin D binding protein) subtypes in rheumatoid arthritis. *Hum Genet* 70, 278-280
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM and Cottrell JS (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567
- Polticelli F, Bocedi A, Minervini G and Ascenzi P (2008): Human haptoglobin structure and function--a molecular modelling study. *FEBS J* 275, 5648-5656
- Pratt AG, Isaacs JD and Matthey DL (2009): Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 23, 37-48
- Prevoe ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB and van Riel PL (1995): Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38, 44-48
- Rai AJ, Stemmer PM, Zhang Z, Adam BL, Morgan WT, Caffrey RE, Podust VN, Patel M, Lim LY, Shipulina NV (2005): Analysis of HUPO PPP reference specimens using SELDI-TOF mass spectrometry: multi-institution correlation of spectra and identification of biomarkers. *Proteomics* 5, 3467-3474
- Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U and van Venrooij WJ (2003): Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 2741-2749

- Rehder DS, Nelson RW and Borges CR (2009): Glycosylation status of vitamin D binding protein in cancer patients. *Protein Sci* 18, 2036-2042
- Renz-Polster H, Krautzig S and Braun J: *Basislehrbuch Innere Medizin*. 3; Urban & Fischer, München 2004
- Rose HM, Ragan C and et al. (1948): Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 68, 1-6
- Roudier J (2006): HLA-DRB1 genes and extraarticular rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 8, 103
- Schacht E (2000): [Osteoporosis in rheumatoid arthritis--significance of alfacalcidol in prevention and therapy]. *Z Rheumatol* 59 Suppl 1, 10-20
- Schrattenholz A: *Methoden der Proteomforschung, Molekulare Analyse der Proteinexpression*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 2001
- Scott DL, Delamere JP, Jones LJ and Walton KW (1981): Significance of laminar antikeratin antibodies to rat oesophagus in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 40, 267-271
- Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessiere C, Girbal E, Durieux JJ and Serre G (1995): The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 95, 2672-2679
- Seo J and Lee KJ (2004): Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol* 37, 35-44
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O and Mann M (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858
- Sitton NG and Dixon JS (1983): Haptoglobin phenotypes. *Ann Rheum Dis* 42, 356
- Sondag-Tschroots IR, Aaij C, Smit JW and Feltkamp TE (1979): The antiperinuclear factor. 1. The diagnostic significance of the antiperinuclear factor for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 38, 248-251
- Speeckaert M, Huang G, Delanghe JR and Taes YE (2006): Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism. *Clin Chim Acta* 372, 33-42
- Srinivas PR, Srivastava S, Hanash S and Wright GL, Jr. (2001): Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem* 47, 1901-1911
- Steel LF, Shumpert D, Trotter M, Seeholzer SH, Evans AA, London WT, Dwek R and Block TM (2003): A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 3, 601-609
- Takayanagi H, Oda H, Yamamoto S, Kawaguchi H, Tanaka S, Nishikawa T and Koshihara Y (1997): A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 279-286
- Theilgaard-Monch K, Jacobsen LC, Nielsen MJ, Rasmussen T, Udby L, Gharib M, Arkwright PD, Gombart AF, Calafat J, Moestrup SK (2006): Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood* 108, 353-361
- Tilleman K and Deforce D (2008): Proteomics in rheumatology. *Expert Rev Proteomics* 5, 755-759
- Tilleman K, Deforce D and Elewaut D (2005 a): Rheumatology: a close encounter with proteomics. *Rheumatology (Oxford)* 44, 1217-1226
- Tilleman K, Van Beneden K, Dhondt A, Hoffman I, De Keyser F, Veys E, Elewaut D and Deforce D (2005 b): Chronically inflamed synovium from spondyloarthritis and rheumatoid arthritis investigated by protein expression profiling followed by tandem mass spectrometry. *Proteomics* 5, 2247-2257
- Timms JF and Cramer R (2008): Difference gel electrophoresis. *Proteomics* 8, 4886-4897
- Tolson J, Bogumil R, Brunst E, Beck H, Elsner R, Humeny A, Kratzin H, Deeg M, Kuczyk M, Mueller GA (2004): Serum protein profiling by SELDI mass spectrometry: detection of multiple variants of serum amyloid alpha in renal cancer patients. *Lab Invest* 84, 845-856
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1992): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Bio-technology* 24, 145-149

- Uchida T, Fukawa A, Uchida M, Fujita K and Saito K (2002): Application of a novel protein biochip technology for detection and identification of rheumatoid arthritis biomarkers in synovial fluid. *J Proteome Res* 1, 495-499
- van de Putte LB, Atkins C, Malaise M, Sany J, Russell AS, van Riel PL, Settas L, Bijlsma JW, Todesco S, Dougados M (2004): Efficacy and safety of adalimumab as monotherapy in patients with rheumatoid arthritis for whom previous disease modifying antirheumatic drug treatment has failed. *Ann Rheum Dis* 63, 508-516
- van Gestel AM, Anderson JJ, van Riel PL, Boers M, Haagsma CJ, Rich B, Wells G, Lange ML and Felson DT (1999): ACR and EULAR improvement criteria have comparable validity in rheumatoid arthritis trials. American College of Rheumatology European League of Associations for Rheumatology. *J Rheumatol* 26, 705-711
- Vencovsky J, Machacek S, Sedova L, Kafkova J, Gatterova J, Pesakova V and Ruzickova S (2003): Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62, 427-430
- Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, van Venrooij WJ and Menard HA (2004): Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* 6, R142-150
- Waalder E (2007): On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. 1939. *Apmis* 115, 422-438; discussion 439
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL and Humphery-Smith I (1995): Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16, 1090-1094
- Wassell J (2000): Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab* 46, 547-552
- Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, Teoh LA, Fischkoff SA and Chartash EK (2003): Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum* 48, 35-45
- Westermeier R (2004): Isoelectric focusing. *Methods Mol Biol* 244, 225-232
- Westermeier R and Scheibe B (2008): Difference gel electrophoresis based on lys/cys tagging. *Methods Mol Biol* 424, 73-85
- Westermeier R, Postel W, Weser J and Gorg A (1983): High-resolution two-dimensional electrophoresis with isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *J Biochem Biophys Methods* 8, 321-330
- White P and Cooke N (2000): The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol Metab* 11, 320-327
- Willburger R, Muller K and Knorth A (2006): Zertifizierte medizinische Fortbildung: Pharmakologische Therapie der rheumatoiden Arthritis. *Dtsch Arztebl* 103, A48-57
- Wright GL, Jr. (2002): SELDI proteinchip MS: a platform for biomarker discovery and cancer diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2, 549-563
- Wuhrer M, Stam JC, van de Geijn FE, Koeleman CA, Verrips CT, Dolhain RJ, Hokke CH and Deelder AM (2007): Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum. *Proteomics* 7, 4070-4081
- Wyeth: Produktmonographie. Enbrel bei rheumatischen Erkrankungen., WBP, Münster 2009
- Yamamoto N and Naraparaju VR (1996 ): Role of vitamin D3-binding protein in activation of mouse macrophages. *J Immunol* 157, 1744-1749
- Yamamoto N, Naraparaju VR and Asbell SO (1996): Deglycosylation of serum vitamin D3-binding protein leads to immunosuppression in cancer patients. *Cancer Res* 56, 2827-2831
- Yamamoto N, Ushijima N and Koga Y (2009): Immunotherapy of HIV-infected patients with Gc protein-derived macrophage activating factor (GcMAF). *J Med Virol* 81, 16-26
- Ye B, Cramer DW, Skates SJ, Gygi SP, Pratomo V, Fu L, Horick NK, Licklider LJ, Schorge JO, Berkowitz RS (2003): Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 9, 2904-2911
- Zimny-Arndt U, Schmid M, Ackermann R and Jungblut PR (2009): Classical proteomics: two-dimensional electrophoresis/MALDI mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 492, 65-91

---

## Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlich bei Prof. Dr. G.A. Müller, Prof. Dr. S. Blaschke, PD Dr. H. Dihazi und der Firma Wyeth Biopharma und für die Möglichkeit bedanken, dass ich meine medizinische Doktorarbeit im Rahmen des Projektes „Analyse prognostischer Faktoren für die TNF $\alpha$ -Antagonisten-Therapie bei Rheumatoider Arthritis“ habe durchführen können.

Neben der rein praktischen Betreuung im Forschungslabor danke ich auch für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung bei der Erstellung von Projektpräsentationen (Powerpoint und Kongressposter) sowie die Erstellung der schriftlichen Dissertationsarbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. S. Blaschke für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit, bei dem Wyeth Symposium in Bad Nauheim (August 2009) zum einen und zum anderen beim Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie in Köln (September 2009) das Projekt vorzustellen zu dürfen.

Ich bedanke mich herzlich bei dem Team der Proteomics Arbeitsgemeinschaft von PD Dr. Dihazi für die nette Zusammenarbeit. Allen voran danke ich Elke Brunst-Knoblich für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Laborarbeit! Asima Bibi, Marwa Eltoweissy, Ivana Pesic und Gry Helene Dihazi danke ich für Unterstützung bei Laborarbeiten und das konstruktive und freundschaftliche Arbeitsklima.

Dank gilt ebenfalls Olaf Jahn vom Max-Planck Institut Göttingen für die Proteinidentifizierungsarbeiten, dem Team des Routinelabors, Gabriele Wolf für die Probenaufbewahrung und Probenbereitstellung, sowie Gabriela Hermanns für Patienten- und Studieninformationen.

Herzlichen Dank an Dr. Jan-Hendrik Streich für die Einführung in das Arbeiten mit DIGE, HPLC und 2D-Delta und den damit guten Einstieg in die Projektarbeit, sowie das gemeinsame Erleben der Kongresstagung der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie 2009 in Köln.

---

## Lebenslauf

Am 24.02.1985 wurde ich, Kathinka Annina Rinke, als erste Tochter von Birgit Arndt-Rinke und Reinhard Rinke in Kassel geboren.

Ich wuchs zusammen mit meiner drei Jahre jüngeren Schwester Carmen Rinke in Kassel auf. Dort besuchte ich die Grundschule „Am Warteberg“ von 1991 bis 1995. Danach war ich von 1995 bis 2001 Gymnasialschülerin an der Gesamtschule „Hegelsberg“ in Kassel.

Von 2001 bis Juni 2004 besuchte ich das Oberstufengymnasium „Jacob-Grimm Schule“ in Kassel, wo ich in den Fächern Englisch, Wirtschaftswissenschaften, Deutsch und Biologie das Abitur absolvierte.

Von August 2004 bis März 2005 war ich beruflich als Volleyballspielerin beim Schweizer Bundesligaclub VBC Biel/Bienne in der Schweiz beschäftigt.

Im April 2005 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen und absolvierte im März 2007 das „Physikum“.

Bis zum Ende des achten Semesters studierte ich regulär in Göttingen und nahm im Rahmen meiner Dissertationsarbeit im Sommersemester 2009 ein „Freisemester“. Die Studienzeit zwischen März 2009 und Oktober 2009 investierte ich in die Durchführung der experimentellen Arbeiten im Labor und in der Präsentation der Ergebnisse bei einem Symposium in Bad Nauheim und beim Kongress für Rheumatologie in Köln.

Die letzten zwei Studiensemester beende ich regulär und beginne im August 2010 das Praktische Jahr. Das Chirurgie-Tertial absolviere ich in Nouméa (Neukaledonien). Den ersten Teil des Tertials Innere Medizin mache ich im Universitätsklinikum Göttingen, den zweiten Teil des Tertials absolviere ich am Universitätsklinikum Genf (Schweiz). Für das Wahlfach-Tertial mit dem Schwerpunkt Neurologie werde ich ebenfalls am Universitätsklinikum Göttingen sein.

Im Herbst 2011 werde ich zur Examensprüfung „Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung“ antreten.