

Aus der Klinik für Gastroenterologie und gastrointestinale Onkologie  
(Prof. Dr. med. V. Ellenrieder)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Eine Analyse zur Expression  
detoxifizierender und cytoprotektiver  
Proteine in der durch Thioacetamid  
geschädigten Leber der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Hartmut Swoboda

aus

Heidelberg

Göttingen 2017

Dekan:	Prof. Dr. H. K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. S. Mihm
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. H. Dihazi
Drittreferent/in:	Prof. Dr. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 07.11.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel " Eine Analyse zur Expression detoxifizierender und cytoprotektiver Proteine in der durch Thioacetamid geschädigten Leber der Ratte" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....  
(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Cholangiokarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Therapie.....	1
1.1.2 Pathophysiologie des Cholangiokarzinoms.....	2
1.1.3 Verfügbare Zelllinien und Gewebe zur Untersuchung des Cholangiokarzinoms .....	5
1.1.4 Proteomanalysen des Cholangiokarzinoms.....	6
1.2 Giftungs- und Entgiftungsfunktion der Leber .....	7
1.3 Das Lebertoxin Thioacetamid.....	8
1.4 Zielsetzung und Fragestellung.....	10
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1 Materialien .....	11
2.1.1 Chemikalien .....	12
2.1.2 Puffer und Lösungen .....	14
2.1.3 Geräte .....	16
2.2 Methoden.....	18
2.2.1 Tierversuch "TAA-induziertes iCC in der Ratte" .....	18
2.2.2 Histologische Bewertung der durch TAA geschädigten Leber.....	19
2.2.3 Präparation, Darstellung und Identifikation von Proteinen.....	20
2.2.4 Die RNA-Analyse.....	24
2.2.5 Bioinformatische Auswertung.....	27
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
3.1 Tierversuch.....	29
3.2 Histologische Auswertung der geschädigten Rattenleber .....	29
3.3 Proteomanalyse der geschädigten Rattenleber.....	31
3.3.1 Proteine mit signifikant veränderter Phosphorylierung .....	31
3.3.2 Proteine mit signifikant veränderter Gesamtmenge .....	36
3.4 Einteilung der identifizierten Proteine nach Funktionsgruppen .....	41
3.5 Detoxifizierende und cytoprotektive Proteine.....	42
3.5.1 Detoxifizierende Proteine mit signifikant veränderter Gesamtmenge .....	42
3.5.2 Detoxifizierende Proteine mit signifikant veränderter Phosphorylierung .....	51
3.6 Regulation auf Transkriptionsebene.....	54
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>59</b>

---

4.1	Leberschädigung und Induktion eines CC durch wiederholte Gaben von TAA .....	59
4.2	Signifikant veränderte detoxifizierende und cytoprotektive Proteine in der durch TAA chronisch geschädigten Rattenleber .....	59
4.2.1	S-formylglutathione hydrolase (ESD) .....	60
4.2.2	Aryl sulfotransferase (ST1A1) und die Sulfotransferase (ST1C1) .....	60
4.2.3	Liver carboxylesterase 4 (EST4).....	61
4.2.4	Omega-amidase (NIT2).....	61
4.2.5	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2 (AKR7A2).....	62
4.2.6	Peroxiredoxin 1 (PRDX1).....	62
4.2.7	Catalase (CAT).....	63
4.3	mRNA-Expression und Proteinmenge.....	65
4.4	Grenzen der 2DE-Gelanalyse .....	66
4.5	Fazit .....	68
4.6	Verwendung von Proteinsignaturen als Biomarker .....	68
4.7	Ausblick.....	69
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>70</b>
5.1	Deutsch .....	70
5.2	English.....	71
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>80</b>
7.1	Spotratios aller 2DE-Gele.....	80
7.2	Identifizierte Proteine mit Funktion.....	88
7.3	Peptidsequenzen der identifizierten Proteine .....	96

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel Thioacetamid.....	8
Abbildung 2: Repräsentative Hämatoxylin-Eosin-Färbungen .....	30
Abbildung 3: Mastergel-Phosphofärbung.....	32
Abbildung 4: Mastergel-Silberfärbung.....	37
Abbildung 5: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der ST1A1 nach 2DE und Silberfärbung.....	44
Abbildung 6: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der EST4 nach 2DE und Silberfärbung.....	45
Abbildung 7: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der AKR7A2 nach 2DE und Silberfärbung.....	46
Abbildung 8: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der ST1C1 nach 2DE und Silberfärbung.....	47
Abbildung 9: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der ESD nach 2DE und Silberfärbung.....	48
Abbildung 10: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der NIT2 nach 2DE und Silberfärbung.....	49
Abbildung 11: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe des PRDX1 nach 2DE und Silberfärbung.....	50
Abbildung 12: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der ESD nach 2DE und Phosphofärbung.....	52
Abbildung 13: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der CAT nach 2DE und Phosphofärbung.....	53
Abbildung 14: Expression der <i>Aryl sulfotransferase (ST1A1)</i> mRNA.....	55
Abbildung 15: Expression der <i>Liver carboxylesterase 4 (EST4)</i> mRNA.....	56
Abbildung 16: Expression der <i>Sulfotransferase 1C1 (ST1C1)</i> mRNA.....	56
Abbildung 17: Expression der <i>S-formylglutathione hydrolase (ESD)</i> mRNA.....	57
Abbildung 18: Expression der <i>Omega-amidase NIT2 (NIT2)</i> mRNA.....	57
Abbildung 19: Expression der <i>Catalase (CAT)</i> mRNA.....	58
Abbildung 20: Expression des <i>Peroxiredoxin 1 (PRDX1)</i> mRNA.....	58

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bekannte genetische Aberrationen und veränderte Signalwege des CC .....	4
Tabelle 2: Übersicht von bisher durchgeführten Proteomanalysen zum CC .....	7
Tabelle 3: Verwendete Materialien.....	11
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien .....	12
Tabelle 5: Verwendete Gerätschaften .....	16
Tabelle 6: Einteilung der Leberschädigung in Stadien gemäß Desmet <i>et al.</i> (Desmet <i>et al.</i> 1994) .....	20
Tabelle 7: Zusammensetzung eines 12 %igen Acrylamid-Trenngels .....	22
Tabelle 8: Zusammensetzung eines 4 %igen Acrylamid-Sammelgels .....	22
Tabelle 9: Verwendete Primer zur RNA-Analyse .....	26
Tabelle 10: Verwendete Software.....	27
Tabelle 11: Proteinspots in 2DE-Gelen mit erhöhter Intensität in der Phosphofärbung.....	34
Tabelle 12: Proteinspots in 2DE-Gelen mit verminderter Intensität in der Phosphofärbung .....	35
Tabelle 13: Proteinspots in 2DE-Gelen mit verminderter Intensität in der Silberfärbung .....	38
Tabelle 14: Proteinspots in 2 DE-Gelen mit erhöhter Intensität in der Silberfärbung.....	40
Tabelle 15: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine nach Funktionsgruppen.....	41
Tabelle 16: Ratios der in der Silberfärbung veränderten Proteinspots zum Mastergel .....	43
Tabelle 17: Ratios der in der Phosphofärbung veränderten Proteinspots zum Mastergel .....	51
Tabelle 18: Anzahl der Tiere in der PCR-Analyse.....	54

## Abkürzungsverzeichnis

2DE	zweidimensionale Gelelektrophorese
ACN	Acetonitril
AKR7A2	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2
APS	Ammoniumpersulfat
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAT	Catalase
CC	Cholangiokarzinom
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlormethan/Tetrachlorkohlenstoff
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan- sulfonat)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ESD	S-formylglutathione hydrolase
EST4	Liver carboxylesterase 4
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HE	Hämatoxylin/Eosin
i.p.	intraperitoneal
iCC	intrahepatisches Cholangiokarzinom
IP	isoelektrischer Punkt
IPG	immobilisierter pH-Gradient
M	molar
max.	maximal
min.	minimal
Min.	Minuten
miRNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA



---

MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
NIT2	Omega-amidase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRDX1	Peroxiredoxin 1
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
ST1A1	Aryl sulfotransferase 1A1
ST1C1	Sulfotransferase 1C1
TAA	Thioacetamid
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Cholangiokarzinom

Das Cholangiokarzinom (CC) ist nach dem hepatozellulären Karzinom der zweithäufigste primäre maligne Lebertumor und für 10-25 % aller hepatobiliären Tumoren und für 3 % aller gastrointestinalen Tumoren verantwortlich (Tyson und El-Serag 2011). Nach der heute gängigen Klassifikation des CC unterscheidet man das intrahepatische CC (iCC) vom extrahepatischen CC, welches sich noch weiter in ein hiläres und ein distales CC differenzieren lässt (Malhi und Gores 2006). Morphologisch differenziert man drei Arten des Wachstums: raumfordernd, periductal infiltrierend sowie intraductal wachsend. Des Weiteren sind diverse detailliertere intra- und extrahepatische Einteilungen bekannt, die hier keine nähere Betrachtung finden sollen (Lim und Park 2004; Nakanuma *et al.* 2010). In den meisten Fällen handelt es sich dabei um ein Adenokarzinom, gefolgt von papillären und mucinösen Karzinomen (Tyson und El-Serag 2011).

### 1.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Therapie

Aufgrund eines groß angelegten *Surveillance, Epidemiology and End Results Programm* (SEER) stammen die meisten Daten über die Epidemiologie des CC und eventueller Risikofaktoren aus den USA. Aus Europa stehen vereinzelte nationale Studien, zum Beispiel aus Dänemark, zur Verfügung, welche eine ähnliche Datenlage wie die der USA präsentieren (Welzel *et al.* 2007). Demnach ist das CC ein Tumor, der meist nach dem 40. Lebensjahr auftritt und seinen Höhepunkt in der 7. Lebensdekade aufweist. Männer sind mit einem Faktor von 1,2 bis 1,5 etwas häufiger betroffen als Frauen. Die Inzidenz in den westlichen Ländern stieg über die letzten Jahrzehnte von 0,46 auf aktuell 1,4 pro 100.000 Einwohner (Cancer Statistics Review, 1975-2011 - SEER Statistics). Im asiatischen Raum, insbesondere im südost-asiatischen Raum wie Thailand, findet sich eine deutlich höhere Inzidenz von 113 pro 100.000 Einwohner bei Männern und 50 pro 100.000 Einwohner bei Frauen (Shaib und El-Serag 2004). Die Prognose für ein karzinomfreies Überleben ist weiterhin schlecht. Die Fünfjahresüberlebensrate liegt im Durchschnitt bei 18 % und konnte bei Resektabilität im besten Fall auf bis zu 40 % gesteigert werden (Cancer Statistics Review, 1975-2011 - SEER Statistics).

Als gesicherte Risikofaktoren gelten in den westlichen wie auch in den asiatischen Ländern die parasitäre Infektion mit *Opisthorchis viverrini*, angeborene Gallengangszysten, eine primär sklerosierende Cholangitis, eine Hepatholithiasis und Toxine wie Thorotrast (Tyson und El-Serag 2011). Vor allem die parasitäre Infektion sowie die kongenitalen Gallengangszysten sind für das endemische Auftreten des CC im asiatischen Raum

verantwortlich (Tyson und El-Serag 2011). Als weitere mögliche Risikofaktoren werden Hepatitis C in den westlichen sowie Hepatitis B in den asiatischen Ländern gesehen. Weitere mögliche Risikofaktoren sind Leberzirrhose, Diabetes, Alkohol und vereinzelte genetische Prädispositionen (Tyson und El-Serag 2011). Die überwiegende Zahl aller CC entsteht allerdings sporadisch und kann keinem der genannten Risikofaktoren eindeutig zugeordnet werden (Tyson und El-Serag 2011).

Die einzige kurative Therapie des CC mittels radikaler chirurgischer Resektion ist nur in frühen, lokal begrenzten Stadien möglich. Eine Chemotherapie kommt bisher nur in palliativer Absicht zum Einsatz (Kolligs *et al.* 2008).

Somit ist das CC eine seltene Erkrankung der Leber mit einer großen Heterogenität in Bezug auf Ursache, Verlauf und epidemiologische Verteilung sowie einer sehr schlechten Prognose mit einer medianen Überlebenszeit von vier Monaten bei Inoperabilität oder Metastasierung (Park *et al.* 2009). Mit einer Chemotherapie aus Gemcitabine und Cisplatin konnte die Überlebenszeit bei Inoperabilität im Durchschnitt auf 11,7 Monate verlängert werden (Valle *et al.* 2010). Aufgrund der späten klinischen Auffälligkeiten und einer damit einhergehenden späten Diagnose ist die Inoperabilität häufig. Ein spezifischer Tumormarker steht bisher nicht zur Verfügung, weshalb die meisten Erkrankungen erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden. Der bisher verfügbare Serummarker, das Carboanhydrat-Antigen 19-9 (CA19-9), eignet sich mit einer Sensitivität von 40-70 %, einer Spezifität von 50-80 % und einer Vorhersagegenauigkeit von 16-40 % nur bedingt zur Diagnose (Khan *et al.* 2012). Daraus ergeben sich bisher sehr eingeschränkte Therapiemöglichkeiten (Razumilava und Gores 2014).

## 1.1.2 Pathophysiologie des Cholangiokarzinoms

### 1.1.2.1 Vorläuferzellen des CC

Als Vorläuferzellen des CC werden drei große Gruppen in der Literatur diskutiert: Cholangiozyten, hepatische Stammzellen und Hepatozyten (Razumilava und Gores 2014). Es ist nicht abschließend geklärt, ob das CC aus Cholangiozyten oder auch aus Leberstammzellen, den hepatischen Progenitorzellen, entsteht. Progenitorzellen können sich in Cholangiozyten und Hepatozyten differenzieren (Roskams 2006). Ebenfalls wird beschrieben, dass ausgereifte Hepatozyten bei gestörtem Notch-Signalweg entdifferenzieren und sich zu einem CC entwickeln können (Fan *et al.* 2012).

### 1.1.2.2 Bedeutung der Entzündung

Wie bei anderen Tumorentitäten geht man davon aus, dass die Cholangiokarzinogenese ein mehrstufiges Geschehen (*multistep carcinogenesis*) ist, das meist seinen Ursprung in einem chronisch-inflammatorischen Prozess hat und über eine Fibrose zu einer Zirrhose und weiter zu einem Karzinom führt (Zabron *et al.* 2013). Über die Rolle der Entzündungsmechanismen in der Cholangiokarzinogenese bieten Zabron *et al.* (2013) eine

Übersicht. Im Vordergrund stehen laut dieser Arbeit vor allem Entzündungsmediatoren wie Interleukin-6 (IL-6), Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Stickstoffmonoxid (NO) (Zabron *et al.* 2013). Auch Gallensäuren wie Deoxycholsäure und Oxysterol fördern die Entzündung, indem sie den *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) aktivieren und die Expression von COX-2 induzieren (Yoon *et al.* 2004).

#### 1.1.2.3 Die am häufigsten beschriebenen genetischen Alterationen des iCC

Eine Übersicht über bisher beschriebene Mutationen (APC, DCC, OGG1, p53, k-ras, BRAF, TGF $\beta$ R1, SMAD4) und eine Beteiligung verschiedener Signalwege (PI3K/Akt-, EGFR-, TGF- $\beta$ 1-, Hippo-, Hedgehog-, Notch-Signalweg) sowie eine prozentuale Verteilung in Bezug auf das iCC bieten Geynisman und Catenacci (2012). Eine Zusammenfassung dieser Arbeit ist in Tabelle 1 dargestellt. Einflüsse des proapoptotischen p53 und des antiapoptotischen bcl2 werden in der Literatur analog zu anderen Tumorentitäten ebenfalls beschrieben (Nault und Zucman-Rossi 2011).

Tabelle 1: Bekannte genetische Aberrationen und veränderte Signalwege des CC

Genetische Aberrationen	Art der Aberration	Häufigkeit bei Patienten
EGFR ( <i>Epidermal growth factor receptor/ ErbB1</i> )	Amplifikation	6 %
EGFR ( <i>Epidermal growth factor receptor/ ErbB1</i> )	Mutation	8 %
KRAS <i>Protooncogene</i>	Mutation	13 %
ROS-1 ( <i>Protooncogene tyrosine-protein kinase ROS</i> )	Translokation	8 %
BRAF ( <i>Serine/ threonine- protein kinase B-Raf</i> )	Mutation	8 %
AKT <i>Protein Kinase B</i>	Mutation	1 %
PI3KCA ( <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i> )	Mutation	9 %
MET <i>Protooncogene, receptor tyrosine kinase</i>	Mutation	5 %
HER-2/neu ( <i>Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2</i> )	Amplifikation	8 %
IDH ( <i>Isocitrate dehydrogenase</i> )	Mutation	10 %
Veränderte Signalwege	Häufigkeit bei Patienten	
VEGF ( <i>Vascular endothelial growth factor</i> )	Zusammen bei 30-50 %	
Notch ( <i>Notch-receptor signaling pathway</i> )		
Hedgehog ( <i>Hedgehog signaling pathway</i> )		
NF-κB ( <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> )		

Zusammenfassung der erwähnten genetischen Aberrationen.

Art der Mutation und Häufigkeit des Vorkommens in Patientenproben

(Geynisman und Catenacci 2012).

### 1.1.3 Verfügbare Zelllinien und Gewebe zur Untersuchung des Cholangiokarzinoms

Bisherige Forschungsergebnisse zum CC wurden unter Verwendung von verschiedenen CC-Zelllinien, CC-Tiermodellen und humanem Tumormaterial erzielt. Diese Zelllinien und Gewebe stehen für die Untersuchung der diversen Pathomechanismen und deren Zusammenspiel zur Verfügung.

#### 1.1.3.1 CC-Zelllinien

Die ersten humanen Zelllinien von Cholangiokarzinomzellen wie z.B. HaChol-Y1 wurden bereits 1985 kultiviert (Yamaguchi *et al.* 1985). Seitdem wurden 17 weitere Zelllinien etabliert, wobei 14 humanen Ursprungs sind und drei Zelllinien aus Ratten gewonnen wurden (Zabron *et al.* 2013). Zelllinien bieten den Vorteil einer gezielten Untersuchung der Zellen bezüglich ihres Entwicklungs- und Differenzierungsstands sowie ihrer Reaktion auf äußere Einflüsse wie Chemotherapeutika oder induzierende Stoffe wie Wachstumsfaktoren, ohne dass das Ergebnis durch eine Interaktion mit anderen Zelltypen verfälscht wird. Jedoch kann der Einfluss des umgebenden Gewebes sowie der molekulare Einfluss eingewanderter Zellen in Zelllinien nicht berücksichtigt werden (Zabron *et al.* 2013). Aus diesem Grund wurden Versuche unternommen, Cholangiokarzinomzellen in eine Matrix aus Typ 1-Kollagen mit klonierten *α-smooth muscle actin positive myofibroblastic cells* (SMA-positive CAF's) einzubetten, um die Mikroumwelt zu simulieren. Erste Ergebnisse aufgrund von Wachstumsmustern und spezifischen Genexpressionen erscheinen vielversprechend (Campbell *et al.* 2012).

#### 1.1.3.2 Primäres humanes Probenmaterial

Proben, welche direkt aus Patienten gewonnen werden, stellen eine Möglichkeit der direkten Untersuchung des CC *in situ* dar. Diese werden durch ultraschallgesteuerte Punktionen, intraoperative Entnahme oder *ex vivo* gewonnen. Aufgrund verschiedener Faktoren wie Alter, genetische Dispositionen sowie unterschiedlich vorliegende Risikofaktoren zeigen die Untersuchungsergebnisse der aus Patienten gewonnenen Gewebeproben jedoch eine sehr große Variabilität (Zabron *et al.* 2013). Gleichwohl spielt die Untersuchung von humanem Probenmaterial, speziell für die Untersuchung auf Tumormarker und Verlaufparameter der Tumorerkrankung, eine relevante Rolle (Zabron *et al.* 2013). Ein Nachteil von Proben, die mitsamt des den Tumor umschließenden Gewebes entnommen werden und daher aus allen sich dort befindlichen Zellen bestehen, ist, dass Ergebnisse nicht ausschließlich auf die Cholangiokarzinomzellen zurückzuführen sind, sondern auch auf die Stromazellen des Tumors. Diesen Einfluss versucht man mit Hilfe der *Laser Capture Microdissection* (LCM), bei der das CC unter dem Mikroskop aus dem umgebenden Gewebe herausgeschnitten wird, zu minimieren (Santos *et al.* 2010). Neben den direkten Leberbiopsaten werden auch Gallenflüssigkeit (Lankisch *et al.* 2011) und Urin

(Metzger *et al.* 2013) von Patienten mit einem CC nach potentiellen Tumormarkern untersucht.

### 1.1.3.3 CC-Tiermodelle

Publizierte Übersichtsarbeiten über bisher etablierte Tiermodelle unterscheiden grundsätzlich vier Ansätze. Erstens Xenograft-Modelle, bei denen eine Transplantation von humanen Cholangiokarzinomzellen in Wirbeltieren wie Hamster, Mäuse oder Ratten vorgenommen wird (Ko *et al.* 2013). Zweitens die Induktion der Karzinogenese durch die Infektion der Tiere mit dem Leberegel *Opisthorchis viverrini* (Ko *et al.* 2013). Drittens die Verwendung von genveränderten Tieren wie z.B. p53-defiziente Mäuse (Ko *et al.* 2013). Und viertens die direkte Leberschädigung von Versuchstieren durch Hepatotoxine wie Furan, Tetrachlormethan oder Thioacetamid (TAA) (Sirica *et al.* 2009; Ko *et al.* 2013). Kombinationen dieser vier Ansätze werden ebenfalls beschrieben (Sirica *et al.* 2009).

Ein Vorteil von Tiermodellen ist die Möglichkeit, Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Cholangiokarzinogenese vornehmen zu können. Weitere Vorteile der Tiermodelle sind das Vorhandensein einer Reliabilität aufgrund von Tieren aus derselben Population, eine definierte Ursache der Karzinogenese sowie die Untersuchung des Tumorwachstums in seiner orthotopen Umgebung (Bousette *et al.* 2008).

Ein Nachteil von aus Tiermodellen gewonnenen Daten ist die begrenzte Übertragbarkeit auf die humane Pathologie. So musste in Bezug auf das CC eine Phase II-Studie mit Sorafenib aufgrund ausbleibender Wirkung frühzeitig abgebrochen werden, obwohl die Therapie in CC-Zelllinien und CC-Xenograft-Modellen Wirkung zeigte (El-Khoueiry *et al.* 2012).

### 1.1.4 Proteomanalysen des Cholangiokarzinoms

Häufig verwendete Methoden zur Erforschung der molekularen und genetischen Veränderungen des CC aus Blut, Gallenflüssigkeit oder histologischen Präparaten sind histologische und immunhistologische Verfahren wie Western Blot, die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH), zum Beispiel zur Untersuchung von Chromosomenaberrationen, die Analyse von microRNA (miRNA), welche als nichtkodierende RNA eine wichtige Rolle in der Genregulierung spielt, sowie die Proteomanalyse (Razumilava und Gores 2014).

In dieser Studie führten wir eine Proteomanalyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2DE) der durch TAA geschädigten Rattenleber zu verschiedenen Zeitpunkten der Leberschädigung bis hin zur Entwicklung eines CCs durch. Bei der Proteomanalyse mittels 2DE werden die Proteine des Totalhomogenats des zu untersuchenden Gewebes mit Hilfe von immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen) aufgetrennt. Nach der isoelektrischen Fokussierung des Proteingemischs kann direkt dessen Auftrennung in eine zweite Dimension mittels SDS-Polyacrylamid-

Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgen. In der ersten Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (IP), in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (MW) getrennt. Dies ermöglicht eine Abbildung des Proteoms innerhalb der methodisch gesetzten Grenzen in Bezug auf pH-Wert und Größe der Proteine in einzelne Proteinspots.

In der Literatur finden sich verschiedene Proteomanalysen mit Bezug auf das CC. Sie alle untersuchen humanes Tumorgewebe, Zelllinien, Gallenflüssigkeit oder Urin. Exemplarische Arbeiten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht von bisher durchgeführten Proteomanalysen zum CC

<b>Autoren</b>	<b>Untersuchtes Material</b>
(Lankisch <i>et al.</i> 2011)	Galle (human)
(Srisomsap <i>et al.</i> 2004)	Zelllinie (human)
(Jeon <i>et al.</i> 2011)	Tumorgewebe (human)
(Santos <i>et al.</i> 2010)	Tumorgewebe (human)
(Metzger <i>et al.</i> 2013)	Urin (human)

Aufgeführt sind die Studien mit Autor und untersuchtem Material.

## 1.2 Giftungs- und Entgiftungsfunktion der Leber

Die Entgiftungsfunktion oder auch Detoxifikation der Leber ist für die Entfaltung einer schädigenden Wirkung von Toxinen wie TAA von entscheidender Bedeutung (Koen *et al.* 2013). Sie wird zum größten Teil vom glatten endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten durch Biotransformation geleistet. Durch Biotransformation werden nicht ausscheidbare Stoffe so umgewandelt, dass sie vom Körper über die Niere oder die Galle ausgeschieden werden können. Zu diesen nicht ausscheidbaren Stoffen gehören körpereigene Stoffwechselprodukte (Alkohole, Amine und Carbonsäuren) genauso wie körperfremde Stoffe, sogenannte Xenobiotika, wie zum Beispiel Arzneimittel oder auch aufgenommene Toxine wie TAA (Drenckhahn 2008).

Die Biotransformation gliedert sich in zwei Phasen. In der ersten Phase wird an den zu eliminierenden Stoff eine reaktive Gruppe (z.B. Hydroxyl- oder Thiolgruppe) durch eine Oxidations- oder Reduktionsreaktion angehängt. Dies geschieht zum größten Teil durch Enzyme der Cytochrom-P450-Familie. Weitere beteiligte Enzyme können Dehydrogenasen wie die Alkoholdehydrogenase sein. Der Großteil dieser Enzyme reagiert substratspezifisch. In der zweiten Phase folgt die Konjugation, wobei die neu entstandene funktionelle Gruppe mit einem polaren Stoff wie zum Beispiel Taurin, Glycin,



Glucuronsäure oder Glutathion verbunden wird. Weitere Konjugationspartner sind Sulfat-, Methyl-, Acyl- oder Acetylreste sowie Aminosäuren. Dadurch werden die zu eliminierenden Stoffe polarisiert und damit wasserlöslich gemacht, um sie für den Organismus ausscheidbar zu machen. Die Ausscheidung in die Gallenflüssigkeit geschieht dann meist durch sogenannte Multi-Drug-Resistance-Transporter, die die konjugierten Stoffe ATP-abhängig in die Galle sezernieren (Drenckhahn und Christ 2008). Doch in der Biotransformation geschieht es oft, dass Xenobiotika erst durch die Konjugation zu wirksamen bzw. giftigen Verbindungen umgewandelt werden. Bei vielen Arzneimitteln ist dieser Effekt gewünscht und wird gezielt eingesetzt. Bei anderen Stoffen führt diese Aktivierung zu einer stark toxischen Wirkung, welche durch die Hepatozyten selbst verursacht wird. In diesem Fall spricht man nicht von einer Entgiftungsfunktion, sondern von der Giftungsfunktion oder auch Toxifikation der Leber. Letzteres trifft auf TAA zu, welches durch Oxidation mit Sauerstoff mittels des Enzyms Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) giftig wird (Kang *et al.* 2008).

### 1.3 Das Lebertoxin Thioacetamid

Schon 1958 wurde die durch TAA-induzierte Cholangiokarzinogenese in der Ratte beschrieben (Grant und Rees 1958). 2004 publizierten Yeh *et al.* dann ein Tiermodell, in dem es in Sprague-Dawley-Ratten zur Ausbildung eines iCC durch die orale Gabe von in Trinkwasser gelöstem TAA (300 mg/l) kam (Yeh *et al.* 2004). Dieses Tiermodell wurde in der Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen etabliert und weiter modifiziert (Mansuroglu *et al.* 2009).

Der Einfluss von TAA auf die Leberschädigung und Cholangiokarzinogenese wird deutlich, wenn die Entgiftungsfunktionen der Leber, wie nachfolgend dargestellt, berücksichtigt werden.

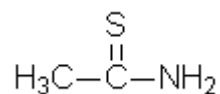


Abbildung 1: Strukturformel Thioacetamid

TAA ist ein Carbonsäureamid mit der Summenformel  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NS}$  und einer molaren Masse von 75,14 g/mol. Die Strukturformel von TAA ist in der Abbildung 1 dargestellt. TAA wurde 1945 zum ersten Mal als Pestizid gegen die Orangenfäule beschrieben (Childs und Siegler 1945). Schon früh beobachtete man die lebertoxische sowie profibrinogene Wirkung von TAA. Eine Zusammenfassung der damaligen Forschung vollzieht Brodehl (1961) mit seinem Artikel „Thioacetamid in der experimentellen Leberforschung“. Darin wird die Schädigung in verschiedenen Organen wie Niere, Herz, Lunge und insbesondere der Leber beschrieben. Untersucht wurden sowohl die Auswirkungen von TAA nach einer

einmaligen Gabe in hoher Dosis als auch die wiederholte oder auch „chronische“ Gabe von TAA in kleinen Dosen. Brodehl zeigte außerdem, dass das TAA nicht im Körper akkumuliert, sondern innerhalb von 24 h zu ca. 80 % über den Harn wieder ausgeschieden wird. Bei einer akut hepatotoxischen Dosis von 200 mg/kg Körpergewicht wurden, ähnlich wie auch bei hepatotoxischen Dosen von Tetrachlormethan (CCl<sub>4</sub>), typische zentrilobuläre Läppchennekrosen beschrieben. Bei einer „chronischen“ Gabe über mehrere Monate wurden profibrinogene und prozirrhotische Wirkungen sowie die Entstehung eines CC aber auch von hepatozellulären Karzinomen beschrieben (Brodehl 1961). Unklar war über längere Zeit, ob das Toxin TAA selbst oder einer seiner Metaboliten für die Leberschädigung verantwortlich war. Die direkte Kanzerogenität von TAA durch zum Beispiel eine DNA-Schädigung konnte durch mehrere Studien schließlich ausgeschlossen werden. Vielmehr führen die TAA-Metaboliten und die durch sie ausgelösten molekularbiologischen Vorgänge zu einer Schädigung der DNA (Arni 1989). Die Kinetik von TAA und dessen Umwandlung durch Oxidasen wurde 1977 beschrieben (Hunter *et al.* 1977). TAA (CH<sub>3</sub>-C(S)NH<sub>2</sub>) wird demnach erst zu TAA-sulfoxid (CH<sub>3</sub>-C(SO)NH<sub>2</sub>) und dann weiter zu dem sehr reaktiven TAA-di-S-oxid (CH<sub>3</sub>-C(SO<sub>2</sub>)NH<sub>2</sub>) oxidiert. Diese Metaboliten binden kovalent an verschiedene Makromoleküle der Hepatozyten und stören dadurch die Zellfunktion (Sarma *et al.* 2012). Als für die Giftung von TAA verantwortliche Enzyme wurden CYP2E1 (Wang *et al.* 2000) sowie FAD-Monooxygenasen identifiziert (Chieli und Malvaldi 1984). Heute ist man sich einig, dass die chronische TAA-Exposition zu einer Zunahme des oxidativen Stresses und nachfolgend zu einer Zellschädigung führt. Bei einer herabgesetzten Aktivität der natürlichen cytoprotektiven Proteine wie Gluthation und Peroxidasen kommt es zudem zur Lipoperoxidation, was die Zell- und Mitochondrienmembran schädigt und schließlich zur Nekrose oder Apoptose der Zelle und so zu einem chronischen inflammatorischen Prozess führt (Staňková *et al.* 2010).

Zusammenfassend ist TAA ein wasserlösliches Hepatoxin, welches sich für die Induktion eines Leberkarzinoms in Tieren eignet. Somit besteht unter Verwendung eines Tiermodells die Möglichkeit, Leberschädigungen im Stadium der Fibrose über die Zirrhose bis hin zur Entwicklung eines Tumors zu verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen.

## 1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Die Stoffwechselfvorgänge in der Leber sind für die Giftung von TAA verantwortlich und führen im Tiermodell zu einer chronischen Entzündung, welche über einen multistep-Prozess in einem Karzinom endet. Bisherige Studien in Tiermodellen untersuchten meist gezielt einzelne Proteine und Signalwege. Untersuchungen des Proteoms von CC wurden bislang nur in CC-Zelllinien, Gallenflüssigkeit und Patientenproben durchgeführt, wobei letztere meist nur das finale Tumorstadium im Vergleich zu dem tumorumgebenden Gewebe oder im Vergleich zu gesundem Lebergewebe untersuchten, nicht jedoch die möglicherweise vorangehenden unterschiedlichen Stadien der Leberschädigung.

Die vorliegende Arbeit ergab die Möglichkeit, die Cholangiokarzinogenese von der akuten Leberschädigung über die Stadien der Fibrose und Zirrhose bis hin zur Entstehung eines CC im Sinne einer engmaschigen Verlaufsstudie der Cholangiokarzinogenese untersuchen zu können. Hierfür wurden unbehandelte und mit TAA behandelte männliche Sprague-Dawley-Ratten über einen Zeitraum von 18 Wochen behandelt und in Abständen von vier Wochen geopfert. Die Lebern wurden histologisch in die verschiedenen Fibroestadien gemäß dem deskriptiven Score nach Desmet und Scheuer (Desmet *et al.* 1994) eingeteilt. Nachfolgend wurden die Gewebeprobe homogenisiert und das Proteom sowie der Phosphorylierungsstatus zu den jeweiligen Stadien untersucht.

Folgende konkrete Fragen sollten hierbei beantwortet werden:

Welche Proteine sind im Verlauf der Cholangiokarzinogenese in ihrem Phosphorylierungsstatus signifikant verändert?

Welche Proteine sind im Verlauf der Cholangiokarzinogenese in ihrer Gesamtmenge signifikant verändert?

Ergeben sich Hinweise auf Veränderungen in bestimmten funktionellen Proteingruppen und/oder Signalwegen, welche das Verständnis über die Pathogenese des CC verbessern könnten?

Können potentielle Biomarker für eine frühzeitige Diagnose oder Prognose eines iCC identifiziert werden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Gebrauchswaren wurden für diese Studie verwendet und von den ebenfalls in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Herstellern bezogen.

Tabelle 3: Verwendete Materialien

<b>Gebrauchswaren</b>	<b>Hersteller</b>
Combitips plus® 0,1ml	Eppendorf AG, München
Eppendorf-Cups	Eppendorf AG, München
Falcon-Röhrchen	Eppendorf AG, München
Filterpapier	Eppendorf AG, München
Gelgießplatten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate mit Barcode (0,1ml)	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Mikropistille Kimble® Kontes Disposable Pellet pestles, blau polypropylen	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
ReadyStrip™ IPG Strip	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TipOne®Filter Tips 100µl (steril)	STARLAB GmbH, Hamburg
TipOne®RPT Filter Tips 10µl (steril)	STARLAB GmbH, Hamburg
TipOne®RPT Filter Tips 1000µl (steril)	STARLAB GmbH, Hamburg
UVette® 220-1600nm	Eppendorf AG, Hamburg

### 2.1.1 Chemikalien

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Chemikalien wurden für diese Studie verwendet und von den ebenfalls in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Herstellern bezogen.

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt
Acetonitril (ACN)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) 37,5:1	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Ampholyte 3/10	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ampuwa	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Bio-Rad Protein Lösung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenol-Blau	Merck KGaA, Darmstadt
Butanol	Merck KGaA, Darmstadt
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat CHAPS	AppliChem GmbH, Darmstadt
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eosinlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol, vergällt	Chemie-Vertrieb Hannover, Hannover
Fast SYBR®Green Master Mix	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Formaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
HCl	AppliChem GmbH, Darmstadt
Iodoacetamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Merck KGaA, Darmstadt
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Mineralöl	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat-pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Precision Plus Protein All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pro-Q® Diamond phosphoprotein gel stain	Invitrogen, Eugene, USA
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Rinderserumalbumin (BSA)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Silbernitrat	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	USB Corporation, Cleveland, USA
Thiourea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
TRIzol® Reagent	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt

## 2.1.2 Puffer und Lösungen

Die im Nachfolgenden aufgeführten Puffer und Lösungen wurden für diese Studie verwendet.

### 2.1.2.1 Proteinaufbereitung

Lyse-Puffer:	7 M Urea 2 M Thiourea 4 % (w/v) CHAPS 1 % (w/v) DTT 2 % (v/v) Ampholyte 10 mM PMSF 1 % (v/v) Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 1 % (v/v) Phosphatase Inhibitor Cocktail 2
PBS	137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat; 1,76 mM Kaliumdihydrogenphosphat
Bromphenolblaulösung:	0,25 % (w/v) BPB 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
Rehydrationspuffer:	7 M Urea 2 M Thiourea 4 % (w/v) CHAPS 0,2 % (w/v) DTT 1 % (v/v) Ampholyte 0,25 % (w/v) BPB
Äquilibrierungspuffer 1:	6 M Urea 30 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,15 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,25 % (w/v) BPB 15 mM DTT
Äquilibrierungspuffer 2:	6 M Urea 30 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,15 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,25 % (w/v) BPB 40 g/l Iodoacetamid

### 2.1.2.2 Elektrophorese

Elektrophoresepuffer 5x:	25 mM Tris/HCl (pH 8,3) 0,192 M Glycin 0,5 % (w/v) SDS
--------------------------	--

### 2.1.2.3 Phosphofärbung

Fixierung:	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure
Entfärber:	20 % (v/v) ACN 5 % (v/v) Natriumacetat (50 mM, pH 4)

### 2.1.2.4 Silberfärbung

Waschlösung 1:	50 % (v/v) Ethanol
Waschlösung 2:	30 % (v/v) Ethanol
Sensitizer:	0,8 mM Natriumthiosulfat
Silberfärbung:	12 mM Silbernitrat 0,026 % (v/v) Formaldehyd
Entwickler:	6 % (w/v) Natriumcarbonat 0,0185 % (v/v) Formaldehyd 16 $\mu$ M Natriumthiosulfat
Lagerungspuffer:	5 % (v/v) Essigsäure

### 2.1.2.5 In-Gel-Verdau

Entfärbe-Lösung:	30 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) 100 mM Natriumthiosulfat
Trypsin-Verdau-Puffer:	Ammoniumbicarbonat (1 M) 25 $\mu$ l Trypsin (10 ng/ $\mu$ l)
Verdau-Puffer ohne Trypsin:	5 $\mu$ l CaCl <sub>2</sub> (1 M) 25 $\mu$ l Ammoniumbicarbonat (1 M)



### 2.1.3 Geräte

Die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Geräte wurden für diese Studie verwendet und von den ebenfalls in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Herstellern bezogen.

Tabelle 5: Verwendete Gerätschaften

Geräte	Hersteller
Eiswanne	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Eppendorf Pipette Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipette Research	Eppendorf AG, Hamburg
Fluoreszenz-Scanner FLA 5100	Fuji Film
Geltrockner, Model 583	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelelektrophoresekammer Protean® II xi Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Handhomogenisator Kimble® Kontes Pellet pestles cordless motor	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Homogenisator Ultra-Turrax	IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Kryomicrotom Leica CM30505	Leica GmbH, Benzheim
Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Photometer ECOSYS® FS-1020D	Kyocera, Kyoto, Japan
Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt
Netzteil Elektrophorese Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protean IEF Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Scanner P3600 A3 Pro	Mustek Systems Inc., Hsin-Chu, Republik China auf Taiwan
Schüttelmaschine MS1 Minishaker	Schütt Labortechnik, Göttingen
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Stickstoffbehälter	KGW-Isotherm, Karlsruhe
Thermal Printer DPU-414	Seiko Instruments Inc., Chiba, Japan
Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg

---

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Vakuumzentrifuge Univapo 150 H	UniEquip GmbH, Martinsried/München
Waagen	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Biofuge 15	Heraeus Sepatech, Osterode

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierversuch “TAA-induziertes iCC in der Ratte“

Das Tierexperiment wurde von der Arbeitsgruppe um Dr. med. Frank Schultze mehrmals von 2007 bis 2011 durchgeführt. Unter anderem gemeinsam mit Herrn cand. med. Christian Riedel und Dorothea Fey. Für das Tierexperiment wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 200-250 g und einem Alter von vier Wochen von den Laborausstattern Charles River (Sulzfeld, Deutschland) und Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen gehalten und unterlagen einem 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus. Futter und Wasser standen den Tieren frei zur Verfügung. Die Tierpflege erfolgte gemäß den Vorschriften zur Labortierhaltung der Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen und unter Berücksichtigung der gesetzlichen Regelungen des Niedersächsischen Landesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES). Der Tierschutzantrag wurde nach §8 des Tierschutzgesetzes vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit zuvor genehmigt (Aktenzeichen: 33.14-42502-01-055.05).

Das Tierexperiment wurde anhand eines modifizierten Protokolls von Yeh *et al.* durchgeführt (Yeh *et al.* 2004). Hierfür wurden die Tiere in eine Kontrollgruppe (n = 5) und eine Experimentalgruppe (n = 25) eingeteilt. Die Versuchstiere erhielten in Trinkwasser gelöstes TAA (500 mg/l), während die Kontrolltiere ausschließlich reines Trinkwasser erhielten. Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde wöchentlich dokumentiert. Alle vier Wochen wurden fünf Tiere aus der Experimentalgruppe sowie ein Kontrolltier, wie oben beschrieben, geopfert. Kriterium für die Auswahl der Tiere zu den jeweiligen Zeitpunkten war hierbei das Körpergewicht. Die fünf leichtesten Versuchstiere zum jeweiligen Zeitpunkt wurden geopfert. Der Tierversuch wurde über 18 Wochen durchgeführt, so dass am Ende Proben für die Wochen 4, 8, 12, 16 und 18 vorlagen. In der 16. Versuchswoche hatten 50 % der Tiere eine fortgeschrittene Leberzirrhose und 50 % der Tiere einen Lebertumor, so dass die verbliebenen Versuchstiere vorzeitig in der 18. Versuchswoche geopfert wurden. Alle Tiere wurden mittels Pentobarbital i.p. narkotisiert und nach einem medianen Laparotomieschnitt durch Eröffnen der Vena cava inferior geopfert. Die Leber wurde entnommen, zerteilt, mit einer isotonen NaCl-Lösung gewaschen und bei minus 196 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebeproben wurden anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

## 2.2.2 Histologische Bewertung der durch TAA geschädigten Leber

### 2.2.2.1 Kryoschnitte und HE-Färbung

Die bei -80 °C gelagerten Gewebeproben wurden mit Tissue-Tek® Medium (Sakura Finetek, Heppenheim) in einem Kryomicrotom (Leica CM30505, Leica GmbH, Benzheim) fixiert und von jeder Gewebeprobe 5 µm dicke Schnittserien angefertigt. Die Kryoschnitte wurden anschließend auf Objektträger transferiert, in eiskaltem Aceton fixiert und anschließend mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt. Die Färbung erfolgte nach folgendem Vorgehen:

- Schnitte 5 Min. bei Raumtemperatur auftauen lassen
- 5 Min. in Bidest geben
- 10 Min. mit Mayers Hämalaun färben
- 10 Min. unter fließendem Leitungswasser waschen
- kurz mit Bidest waschen (3-4 x ↓)
- 1 Min. 30 Sec. mit Eosin färben
- waschen mit Bidest (5-6 Waschzyklen)
- 1 Min. in 95 % Et-OH geben
- 1 Min. in 100 % Et-OH geben
- 5 Min. in 100 % Et-OH geben
- mind. 5 Min. in Xylol geben
- eindeckeln mit Mounting-Medium (z.B. Entellan, Merck, 1.07960)

Da bei den Versuchstieren eines jeden Zeitpunktes interindividuelle Unterschiede der Leberschädigung festzustellen waren, erfolgte deren Einteilung nicht nach Behandlungsdauer, sondern nach dem histologischen Stadium der Leberschädigung.

### 2.2.2.2 Einteilung in Fibrose-Stadien nach Desmet und Scheuer

Die histologische Beurteilung erfolgte gemäß der Stadieneinteilung nach Desmet und Scheuer, dargestellt in der Tabelle 6. Es erfolgte die Einteilung in Stadium 0 (keine Fibrose, Kontrollgruppe), Stadium 1, Stadium 2, Stadium 3, Stadium 4 (Desmet *et al.* 1994) und in eine Tumorgruppe. Die Evaluation der Schnitte erfolgte sowohl im eigenen Labor als auch durch einen unabhängigen Pathologen.

Tabelle 6: Einteilung der Leberschädigung in Stadien gemäß Desmet *et al.* (Desmet *et al.* 1994)

<b>Stadium (nach Desmet <i>et al.</i>)</b>
0 = keine Fibrose
1 = minimal leichte portale Bindegewebsvermehrung
2 = mild, verstärkte portale Bindegewebsvermehrung mit leichter bindegewebiger Ausziehung
3 = mäßiggradig, portale Bindegewebsvermehrung mit Bildung einzelner inkompletter und auch kompletter Septen
4 = schwergradig, Ausbildung zahlreicher kompletter Septen mit Übergang in Zirrhose

Die behandelten Tiere wurden dann den folgenden 4 Gruppen zugeteilt:

- 1 = Fibrose
- 2 = beginnende Zirrhose
- 3 = Zirrhose
- 4 = Tumor

### 2.2.3 Präparation, Darstellung und Identifikation von Proteinen

Um eine Veränderung oder Denaturierung der Proteine zu verhindern, wurden sämtliche nachfolgenden Arbeitsschritte auf Eis bzw. mit auf 4 °C vorgekühlten Geräten und Lösungen durchgeführt.

#### 2.2.3.1 Die Proteinextraktion

Die Proteinextraktion geschah aus Leberstücken, die bei -80 °C gelagert wurden. Das gefrorene Gewebe wurde in eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in Lyse-Puffer bei Raumtemperatur in einem 2-ml-Eppendorfgefäß mit Hilfe des Homogenisators Ultra-Turrax lysiert. Nach 60 Min. Äquilibrierungszeit wurde die Suspension für 10 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Die entstandene Interphase wurde in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Um die Proteinausbeute zu erhöhen, wurde das verbleibende Pellet/Sediment wieder mit Lyse-Puffer resuspendiert, für 30 Min. in Lyse-Puffer äquilibriert und mit 13000 rpm bei 4 °C erneut zentrifugiert. Die erneute Interphase wurde abgenommen und mit der ersten Interphase vereinigt. Die Proteinlösung wurde bei -80 °C für alle weiteren Experimente gelagert.

### 2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford mit dem Reagenz Bio-Rad-Protein-Assay quantifiziert (Bradford 1976). Der Test besteht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie-Brilliant-Blau von 470 nm nach 595 nm bei Bindung von Proteinen in saurem Milieu, welches mit dem Photometer ECOSYS® FS-1020D der Firma Kyocera gemessen wurde. Um die genaue Konzentration zu messen, wurde eine Standardkurve mit Hilfe einer BSA-Lösung erstellt, deren Proteinkonzentration bekannt ist. Die dadurch entstandene Referenzgerade ermöglicht die Berechnung der Proteinkonzentration der zu untersuchenden Probe.

### 2.2.3.3 Die 2D Gelelektrophorese

Die 2DE wurde von O'Farrell 1975 entwickelt (O'Farrell 1975). Hierbei werden in der ersten Dimension die Proteine aufgrund ihrer Nettoladung (Isoelektrischer Punkt) aufgetrennt, um dann in einem zweiten Schritt nach ihrem Molekülgewicht durch eine SDS-Gelelektrophorese weiter differenziert zu werden.

#### 2.2.3.3.1 Isokussierung

Wir führten die 2DE nach einem modifizierten Protokoll von Weiss und Görg durch (Weiss und Görg 2009).

Hierzu wurden 150 µg Protein der oben gewonnen Proteinsuspensionen mit dem Reha-Puffer auf 330 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Beladung eines 17 cm langen immobilisierten pH-Gradienten (IPG)-Streifens, mit einem nichtlinearen pH-Bereich von 3-10, mit der Puffer-Protein Lösung. Nach 1 h wurden die IPG-Streifen mit Mineralöl überschichtet und es erfolgte für 16 h die passive Rehydratation der Streifen.

Im Anschluss wurde die isoelektrische Fokussierung mit dem Protean IEF Cell bei 32000 Vh und Raumtemperatur durchgeführt. Dann wurden die IPG-Streifen für 35 Min. in Äquilibrationspuffer 1 äquilibriert. Das darin enthaltene DTT erhält die funktionelle Form von Proteinen in dem es die Sulfhydryl-Gruppen schützt und somit die Oxidation und Bildung von Disulfidbrücken verhindert. Des Weiteren zerstört es Disulfidbrücken und „entfaltet“ Proteine. Anschließend wird mit dem Äquilibrationspuffer 2 ebenfalls für 35 Min. äquilibriert. Das darin enthaltene Iodacetamid alkyliert die nun freien Sulfhydrylgruppen irreversibel und fixiert somit die Proteine für die nun folgende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Das im Äquilibrationspuffer 2 enthaltene BPB dient als Lauflängenreferenz in der SDS-PAGE.

#### 2.2.3.3.2 SDS-Gelelektrophorese

Um die nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennten und vorbereiteten Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurden denaturierende SDS-Page-Gele nach Laemmli mit einem Tris-Glycin-Puffersystem verwendet (Laemmli 1970). Diese bestehen aus einem 12 %igen

Trenn- und einem 4 %igen Sammelgel, die gemäß Tabelle 7 und Tabelle 8 hergestellt wurden. Das in den Puffern und den Gelen enthaltene SDS sorgt für eine gleichmäßige negative Ladung der Proteine und zerstört die nichtkovalenten Bindungen und führt somit zu einer Linearisierung der Proteine. Das Polyacrylamid fungiert als Sieb. Somit laufen alle Proteine im elektrischen Feld aufgrund der einheitlichen negativen Ladung in Richtung Anode und trennen sich im Idealfall nur noch aufgrund ihrer Molekülmasse auf.

Tabelle 7: Zusammensetzung eines 12 %igen Acrylamid-Trenngels

Reagenz	Volumen
$\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$	24,65 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	32,1 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	19,25 ml
10 % SDS	1,1 ml
10 % APS	385 $\mu\text{l}$
TEMED	25,5 $\mu\text{l}$

Tabelle 8: Zusammensetzung eines 4 %igen Acrylamid-Sammelgels

Reagenz	Volumen
$\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$	4,4 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	0,78 ml
1,5 M Tris (pH 6,8)	0,75 ml
10 % SDS	60 $\mu\text{l}$
10 % APS	30 $\mu\text{l}$
TEMED	6 $\mu\text{l}$

Das Trenngel wurde mit APS und TEMED versetzt und in ein XL-System der Firma Bio-Rad gegossen. Zur Polymerisation wurde die Lösung mit Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Butanol durch mehrmaliges Spülen mit  $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$  entfernt. Das Sammelgel wurde ebenfalls mit APS und TEMED versetzt und auf das Trenngel gegossen. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde der rehydrierte IPG-Streifen vorsichtig mit 2 Spateln in das Sammelgel gedrückt. Anschließend wurden 5  $\mu\text{l}$  des Molekulargewichtsmarkers Precision Plus Protein All Blue auf ein Filterpapier aufgetragen und auf der linken Seite eines jeden Polyacrylamidgels neben dem IPG-Streifen aufgelegt.

Die SDS-PAGE erfolgte bei 4 °C und einer Spannung von 105 Volt für etwa 17 h mit dem oben genannten Elektrophoresepuffer.

#### 2.2.3.4 Die Phospho- und Silberfärbung der 2DE-Polyacrylamidgele

Die post-translationale Modifikation von Proteinen mittels Phosphorylierung ist neben vielen anderen Modifikationen nach bisherigen Erkenntnissen die Häufigste. Die Phosphorylierung an bestimmten Aminosäuren führt dabei meist zu einer Ladungsänderung und damit zu einer Änderung der Eigenschaften des Proteins wie zum Beispiel seiner enzymatischen Aktivität oder der Proteinfaltung. Des Weiteren ist die Phosphorylierung verantwortlich für verschiedene Zellprozesse wie Signalwege, Differenzierung oder Abbau von Proteinen (Hunter 2000). Um eventuell regulierte Proteine zu entdecken, wurde mit Hilfe der Phosphofärbung der Phosphorylierungsstatus der Proteine untersucht. Anschließend wurden mit Hilfe der Silberfärbung die Proteine auf den Gelen gefärbt und somit sichtbar. Im Vergleich mit anderen silbergefärbten Gelen ließ sich so eine Aussage über die Quantität eines Proteins machen.

Die 2DE-Polyacrylamidgele wurden für die Färbeschritte in Färbekammern gelegt und für mindestens 1 h mit 250 ml Fixierungslösung fixiert. Es folgten drei Waschschrte mit jeweils 250 ml  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  für jeweils 10 Min. Dann folgte die Phosphoprotein färbung mit Ready Solution Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain nach Herstellerangaben. Alle oben genannten Arbeitsschritte der Phosphofärbung bis einschließlich des Scannens der Gele mit dem Fluoreszenz-Scanner FLA 5100 bei einer Wellenlänge von 532 nm erfolgten im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Für die Silberfärbung wurden die Gele in zwei Schritten zuerst mit den Waschlösungen 1 und 2 für jeweils 20 Min. gewaschen. Dann folgte der Sensitizer für exakt 60 Sek. und drei Waschgänge mit  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  für jeweils 20 Sek. um den Sensitizer wieder zu entfernen. Die immer frisch angesetzte Silberfärbung wurde nun für 20 Min. auf die Gele gegeben, bevor auch diese wieder mit drei Waschschrten à 20 Sek. mit  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  wieder entfernt wurde. Die anschließende Entwicklung wurde nach 2-10 Min. mit Hilfe der Fixierungslösung gestoppt. Die Gele wurden direkt im Anschluss mit dem Scanner P3600 A3 Pro der Firma Mustek Systems Inc. digitalisiert und in Lagerungspuffer aufgehoben, bis sie mit Hilfe des Gel Dryer, Model 583 von Bio-Rad bei 82 °C über 2,5 h getrocknet wurden.

#### 2.2.3.5 Auswertung der Proteinspots in den 2DE-Polyacrylamidgelen

Die densitometrische Quantifikation der Proteinspot-Intensität, normalisiert zur Gesamtintensität aller Proteinspots eines Polyacrylamidgels, erfolgte mittels der Software Delta2D gemäß den Herstellerangaben (Luhn *et al.* 2003). Auswahlkriterium für eine massenspektrometrische Identifizierung von veränderten Proteinspots innerhalb des Phosphoprotein-/Protein-Profiles waren signifikante Unterschiede der Proteinspot-Intensität zwischen den mit durch TAA geschädigten Ratten und den Ratten aus der Kontrollgruppe.



### 2.2.3.6 Proteinidentifikation

Die Proteinidentifikation geschah durch eine ESI-Massenspektrometrie. Hierzu mussten die Proteine in den 2DE-Gelen entfärbt und verdaut werden. Dies geschah entsprechend nach modifiziertem Protokoll von Shevchenko (Shevchenko *et al.* 1996). Zuerst wurden die zu identifizierenden Spots aus den getrockneten Gelen ausgeschnitten und mit einer frisch hergestellten Entfärbelösung für ca. 15 Min. entfärbt. Nach erfolgter Entfärbung folgten zwei Waschgänge und die Äquilibrierung mit Hilfe von einer 0,1 mol/l Ammoniumbicarbonat-Lösung für 20 Min. Anschließend wurde Acetonitril im Verhältnis 1:1 hinzugefügt und weitere 15 Min. inkubiert. Es folgte die Entfernung der Lösung und die Trocknung mittels der Vakuumzentrifuge. Dann folgte der In-Gel-Verdau. Hierzu wurden die getrockneten Polyacrylamid-Gelstücke mit Trypsin-Verdau-Puffer für 45 Min. auf Eis und anschließend bei 37 °C mit Verdau-Puffer ohne Trypsin über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der gewonnene Überstand in einem neuen Eppendorfgefäß mittels Vakuumzentrifuge getrocknet.

Um die restlichen Peptide aus den Polyacrylamid-Gelstücken zu extrahieren, wurden diese mit einer 0,1 %igen TFA-Lösung bedeckt und für 30 Min. in ein Ultraschall-Wasserbad gestellt. Der gewonnene Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mittels Vakuumzentrifuge getrocknet. Dieser Schritt wurde insgesamt drei Mal mit ansteigendem ACN-Anteil wiederholt. Zunächst mit einer Lösung von 30 % ACN und 70 % 0,1 %iger TFA-Lösung, danach mit einer Lösung aus 60 % ACN und 40 % 0,1 %iger TFA-Lösung und schließlich mit 100 % ACN. Die einzeln gewonnenen Überstände wurden vereinigt, getrocknet und bei -20 °C gelagert.

Die massenspektrometrische Identifizierung der Peptide erfolgte durch das Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Henning Urlaub.

## 2.2.4 Die RNA-Analyse

### 2.2.4.1 Die RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus dem Lebergewebe geschah mit Hilfe von Trizol nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987). Nachdem das Gewebestück in 300 µl Trizol mittels eines Handhomogenisator von Kimble® homogenisiert wurde, folgte die Trennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation für 5 Min. bei 13000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform inkubiert und so die RNA extrahiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 Min. bei 13000 rpm und 4 °C konnte die obere klare Phase mit der RNA abgenommen werden. Aus diesem Überstand wurde mit Hilfe von 500 µl Isopropanol die RNA gefällt und anschließend für 10 Min. bei 13000 rpm und 4 °C durch Zentrifugation pelletiert. Nach einem Waschgang mit 75 % Ethanol und Trocknung bei Raumtemperatur konnte das Pellet in RNase freiem Ampuwa

gelöst werden. Die Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren erfolgte mit dem Photometer ECOSYS® FS-1020D von Kyocera bei einer Wellenlänge von 260 nm. Anschließend erfolgte sofort die Umschreibung in cDNA.

Die Reverse Transkription zu cDNA und der Ausschluß von gDNA mit Hilfe einer DNase erfolgte mit dem Qiagen-Kit: Qiagen QuantiTect Reverse Transcription. Die gewonnene cDNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

#### 2.2.4.2 Die Real-Time PCR

Die Primer wurden mit Hilfe des Primer Design Tools der NCBI „Primer Blast“ festgelegt, mit Hilfe des Programms Oligo Calc überprüft und von der Firma Invitrogen bezogen. Die bei -80 °C gelagerte cDNA wurde auf Eis aufgetaut und anschließend gevortext. In eine durchsichtige 96-Wells-Platte der Firma Bio-Rad wurde der Fast SYBR-Green Master Mix mit Ampuwa® nach Herstellerangaben und den jeweiligen Primer-Paaren im Überschuss vorgelegt. Ausgehend von der vorherigen RNA-Konzentrationsbestimmung wurde 6,4 ng cDNA in die Wells dazugegeben. Die PCR selbst erfolgte in einem StepOnePlus™ nach Standardeinstellungen. Diese bestehen aus einer Enzymaktivierung mit einer Dauer von 20 Sek. bei 95 °C., einer Denaturierung für 3 Sek. bei 95 °C und einer Annealing- und Elongationsperiode von 30 Sek. bei 60 °C. Abgeschlossen wurde die PCR mit einer automatischen Schmelzkurvenanalyse. Verwendet wurden die Primer in Tabelle 9.

Tabelle 9: Verwendete Primer zur RNA-Analyse

<b>Protein (Genname)</b>	<b>Primersequenz 5' → 3'</b>	<b>T<sub>m</sub> [°C]</b>	<b>Produkt- länge [bp]</b>
<i>Aryl sulfotransferase</i> ( <i>ST1A1</i> )	Forward: CTTCCTTGAGTTCAAATGTCCAG	57,63	250
	Reverse: CATGAAGTTCTCCAAGAAGCTGT	58,93	
<i>Liver carboxylesterase</i> <i>4 precursor</i> ( <i>EST4</i> )	Forward: TGTGGATCCATGGAGGTGGAATGAC	64,38	152
	Reverse: TCCCCTGCTGTGTTCATCCCCTG	66,29	
<i>Sulfotransferase 1C1</i> ( <i>ST1C1</i> )	Forward: CTGATGATCTCCTTATGCAACC	57,31	188
	Reverse: CATTITGTTAGCCAGATCCAGAC	57,76	
<i>S-formylglutathione</i> <i>hydrolase</i> ( <i>ESD</i> )	Forward: CITGTGGTCATTGCTCCTGATAC	59,38	168
	Reverse: GAGTTGTGGAAGCTCCTCTGTTA	59,99	
<i>Omega-amidase NIT2</i> ( <i>NIT2</i> )	Forward: CAAGAATCCAAAACACTGAGTCC	57,89	171
	Reverse: AGTGGTCATATTGAAAGCTCCAG	58,48	
<i>Catalase</i> ( <i>CAT</i> )	Forward: GTGTTTGAGCATATTGGGAAGAG	57,76	208
	Reverse: GGCTATGGATAAAGGATGGAAAC	57,03	
<i>Peroxiredoxin 1</i> ( <i>PRDX1</i> )	Forward: GGATTCTCACTTCTGTCATCTGG	58,56	164
	Reverse: TAATAAAGAGGCCCTGAAAGAG	57,63	

RNA-Primer mit Proteinname, Genname in Kursiv, Primersequenz der Primerpaare, Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) in °C und Länge des Amplikons in Basenpaaren (bp).

## 2.2.5 Bioinformatische Auswertung

### 2.2.5.1 Verwendete Software

Die gewonnenen Daten wurden mit der Software Scaffold 3 bearbeitet und mit der Protein-Datenbank Uniprot.org kontrolliert und abgeglichen. Die in Tabelle 10 aufgeführte Software wurde für diese Studie verwendet und von den ebenfalls in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Herstellern bezogen.

Tabelle 10: Verwendete Software

<b>Programme</b>	<b>Hersteller</b>
Delta 2D	DECODON GmbH, Greifswald, Germany
Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Graph Pad Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Scaffold 3	Proteome Software Inc. Portland, OR, USA

### 2.2.5.2 Massenspektrometrische Auswertung

Mit der Software Scaffold 3 erfolgte die Auswertung der Ergebnisse der Massenspektrometrie und die Identifizierung der einzelnen Proteine in den untersuchten Spots. Hierbei wurden nur spezifische Peptide berücksichtigt, welche mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90 % einem Protein zuzuordnen waren. Das Protein mit den meisten Peptiden wurde in die engere Auswahl genommen. Anschließend erfolgte die Betrachtung bezüglich mehrfacher Aufführung in nahe gelegenen Spots, um Kontaminationen von benachbarten Spots und Laufzeitfehler zu berücksichtigen. Im dritten Schritt wurden die theoretisch berechneten MW und IP mit den experimentell auf den Gelen vorhandenen Werten verglichen. Falls kein Ausschluss eines Proteins in einem Spot möglich war, wurden beide in Frage kommenden Proteine in der Auswertung genannt und berücksichtigt.

### 2.2.5.3 Statistische Auswertung

Die quantitativ erhobenen Werte für die Proteinmenge und den Phosphorylierungsstatus wurden in Form eines Scatterplots mit Median gezeigt. Die Menge der RNA wurde mit Hilfe des arithmetischen Mittelwertes  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5 (Version 5.01). Aufgrund der kleinen Gruppengrößen wurde die Normalverteilung mit Hilfe eines Shapiro-Wilks Tests geprüft. Bei positivem Ergebnis wurden dann die Daten mit Hilfe eines einfachen ungepaarten t-Tests analysiert, welcher einen F-Test zur Varianzanalyse mit beinhaltet. Die Signifikanzen werden von Graph Pad Prism für wie folgt angegeben:

> 0,05 nicht signifikant (ns); 0,01 to 0,05 signifikant (\*); 0,001 to 0,01 hoch signifikant (\*\*); < 0,001 höchst signifikant (\*\*\*)

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Tierversuch**

Das Experiment wurde mit 25 männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem Ausgangsgewicht von 200-250 g begonnen. Sie erhielten wie, unter Kapitel 2.2.1 erwähnt, TAA in ihr Trinkwasser gemischt. Im Abstand von vier Wochen wurden die jeweils leichtesten Tiere geopfert. Zwei Tiere verstarben spontan vor Beendigung des Experiments und wurden deshalb nicht berücksichtigt. Zwei weitere Tiere zeigten in der histologischen Begutachtung nach der Opfierung einen Misch tumor mit Anteilen eines hepatozellulären Karzinoms, weshalb sie ebenfalls aussortiert wurden. 21 Tiere konnten somit in die weitere Auswertung übernommen werden und wurden in die einzelnen Gruppen, wie unter Kapitel 2.2.2.2 beschrieben, eingeteilt.

### **3.2 Histologische Auswertung der geschädigten Rattenleber**

In der histologischen Begutachtung zeigten sich in der Kontrolle ein gleichmäßiges Leberparenchym mit intakten Portalfeldern ohne Bindegewebssepten sowie die gezeigten verschiedenen Stadien der Leberschädigung wie in Abbildung 2 dargestellt. Die Fibrose zeigte sich durch eine Bindegewebszunahme. In der Gruppe der beginnenden Zirrhose bildeten sich erste Bindegewebssepten aus, welche dann im Zirrhosestadium in komplette Bindegewebsbrücken übergingen. Das Stadium des Gallengangkarzinoms zeigte sich mit dem typischen Bild eines Tumors mit Zerstörung der Grundstruktur der Leber.

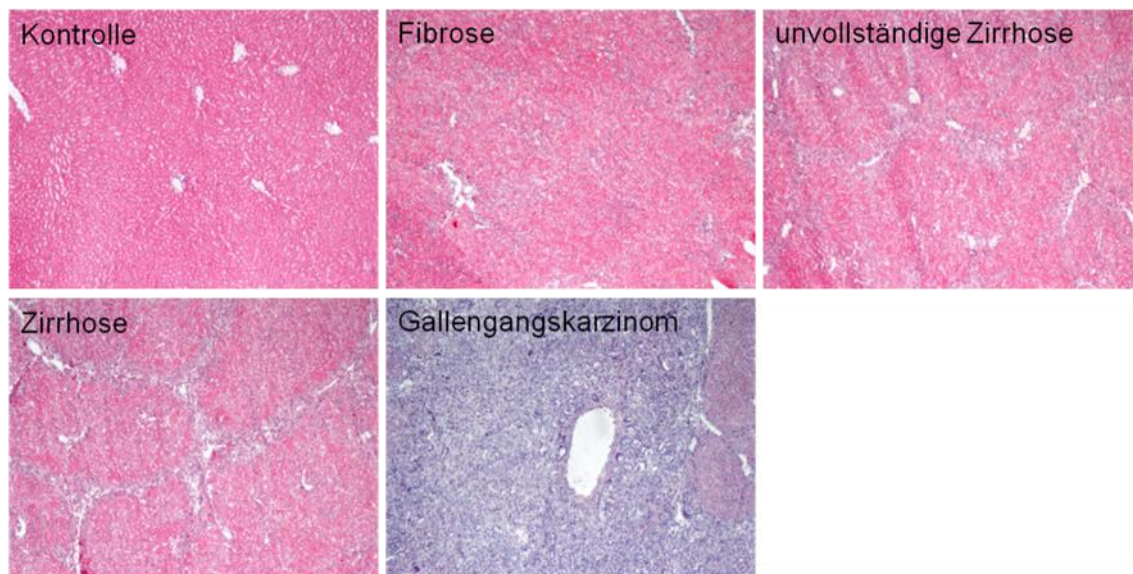


Abbildung 2: Repräsentative Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

HE-Färbungen von Kryoschnitten der Leber in den verschiedenen Stadien der durch TAA induzierten Leberschädigung, 40-fache Vergrößerung.

Nach der histologischen Beurteilung und Einteilung in die Gruppen Fibrose, beginnende Zirrhose, Zirrhose und Tumor ergab sich folgende Einteilung der Tiere.

Kontrolle	n = 3
Fibrose	n = 3
beginnende Zirrhose	n = 5
Zirrhose	n = 7
Tumor	n = 3

### 3.3 Proteomanalyse der geschädigten Rattenleber

Zur Untersuchung des Proteoms und des Phosphoproteoms wurden Gesamthomogenate von Leberstücken der mit TAA behandelten Sprague-Dawley-Ratten mittels 2DE aufgetrennt und zuerst eine Phosphoproteinfärbung und anschließend eine Silberfärbung, wie oben beschrieben, durchgeführt. Das Gel einer Leberprobe eines jeden Tieres wurde mit der Software Delta2D analysiert. Das Gel einer Leberprobe eines Kontrolltieres, abgebildet in Abbildung 4, wurde als Mastergel definiert. Anschließend wurde jeder einzelne Spot jedes analysierten Gels gegen den jeweiligen Spot des Mastergels ins Verhältnis gesetzt. Die gemessenen Spotdichten der einzelnen Spots des Mastergels wurden als Referenz verwendet und als 1 definiert, um die anderen Spots ins Verhältnis zu setzen. Hieraus errechnete sich ein Verhältnis der Spotdichten, welches als Spotratio definiert ist. Alle Proteine mit einer Spotratio Veränderung  $\geq 1,5$  oder  $\leq 0,5$  in mindestens einem Tier wurden identifiziert und Funktionsgruppen zugeordnet. Die ausführlichen Tabellen der einzelnen Ratios der veränderten Spots aller Tiere, finden sich als Quantitation Tables im Anhang unter Kapitel 7.1.

Zur Vereinheitlichung wurde im Folgenden die Datenbank UniProt als Referenz für die Schreibweise der Proteine in Englisch herangezogen.

#### 3.3.1 Proteine mit signifikant veränderter Phosphorylierung

Die Abbildung 3 zeigt exemplarisch das eingescannte Bild des Mastergels nach einer Phosphoproteinfärbung. Die in dieser Studie im Vergleich zum Mastergel veränderten Proteinspots (Zusammenfassung aller Gele der mit TAA behandelten Sprague-Dawley-Ratten) wurden mit Pfeilen markiert.



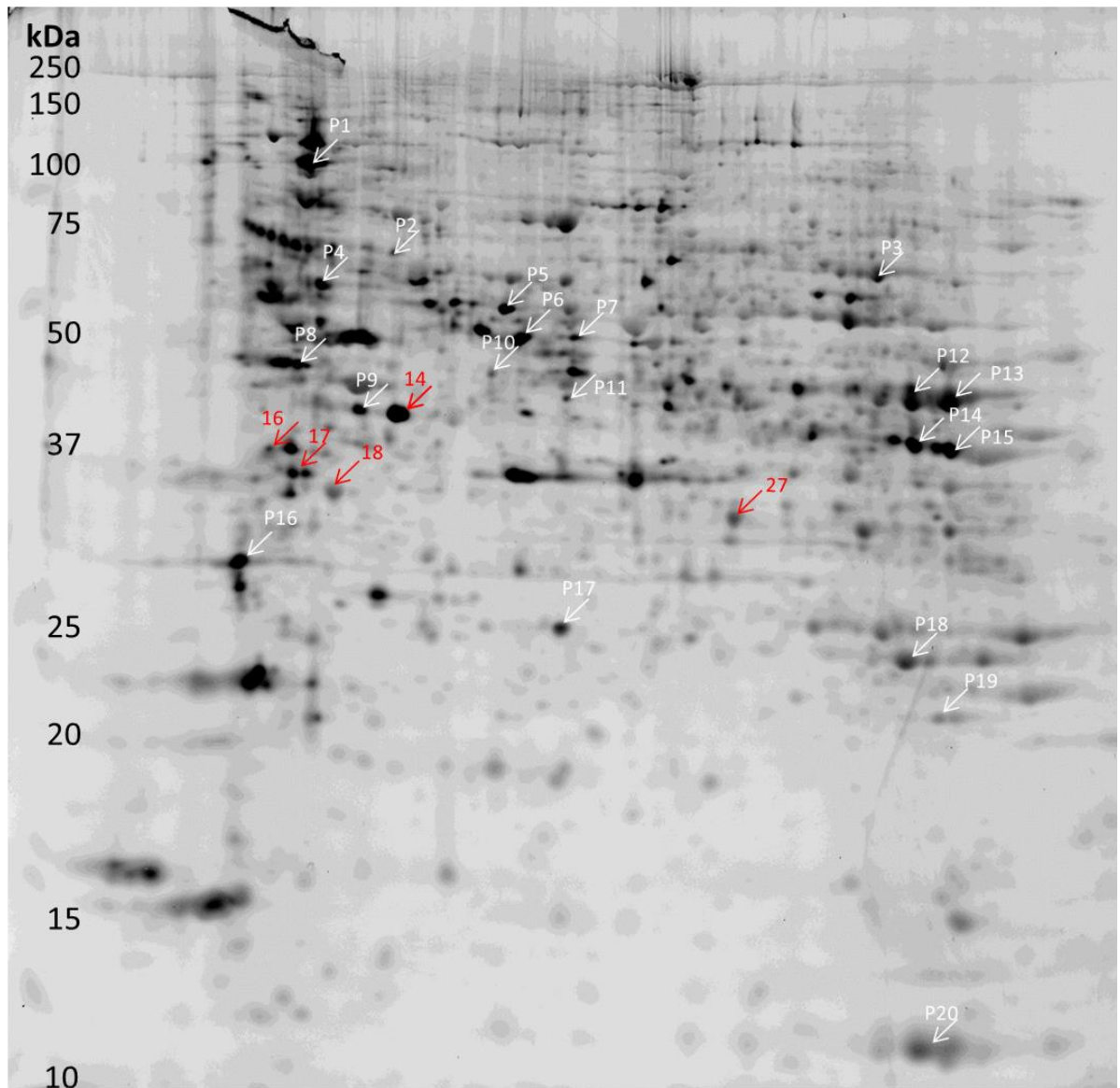


Abbildung 3: Mastergel-Phosphofärbung

Exemplarisches 2DE-Gel nach Phosphofärbung (Mastergel). Mit Pfeilen (weiß) markiert sind identifizierte Proteinspots, die im Abgleich mit dem Mastergel im Phosphorylierungsstatus signifikant verändert sind sowie die Proteinspots (rot), die sowohl in der Phosphofärbung als auch in der Silberfärbung signifikant verändert sind. (Daten hier nicht gezeigt).

In den Gelen mit Phosphofärbung konnten insgesamt 25 Spots mit verändertem Phosphorylierungsstatus identifiziert werden. Es wurden nach oben genannten Kriterien acht mit vermehrter und 17 mit verminderter Phosphorylierung identifiziert.

Da die gefundenen Proteinspots in der Phosphofärbung nur unter einem Fluoreszenz-Scanner sichtbar sind, wurden die digitalen Bilder des Gels mit den eingescannten Bildern der Silberfärbung desselben Gels mit Hilfe der Software Delta2D übereinander gelegt und die korrespondierenden Spots ermittelt. Diese konnten dann ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

Nach erfolgter Massenspektrometrie durch die Arbeitsgruppe Prof. Dr. Henning Urlaub des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie in Göttingen erfolgte der Abgleich der gefundenen Peptidsequenzen mit der Proteindatenbank Uniprot.org. Die gefundenen Peptidsequenzen und deren Übereinstimmung mit dem angenommenen Protein finden sich im Anhang unter Kapitel 7.3. Des Weiteren wurde die Übereinstimmung des theoretisch errechneten MW und des IP des Proteins aus der Datenbank mit der Position auf dem entsprechenden Gel verglichen. Eine ausführliche Tabelle mit einer Auflistung der Funktion der einzelnen Proteine ist im Anhang unter Kapitel 7.2 zu finden.

#### 3.3.1.1 Proteinspots mit erhöhter Intensität nach Phosphofärbung

Tabelle 11 zeigt alle durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine in den Proteinspots mit erhöhter Spotratio. In der Tabelle dargestellt sind die Identifikationsnummer des jeweiligen Proteins in der Proteindatenbank Uniprot sowie das auf dem Gel experimentell bestimmte und in Uniprot errechnete MW und der IP. Wie in Kapitel 2.2.5.2 beschrieben, wurde ein Proteinspot bei mehreren in Frage kommenden Proteinen pro Proteinspot mehrfach aufgeführt.

Tabelle 11: Proteinspots in 2DE-Gelen mit erhöhter Intensität in der Phosphofärbung

Proteinspots in 2DE-Gelen mit <u>erhöhter</u> Intensität in der Phosphofärbung der Rattenleber unter einer chronischen TAA-Exposition			
Spot Nr.	Mascot-Proteinname / Uni-Prot Acc.Nummer(n)	MW[kDa] Uniprot/Experiment	IP Uniprot/Experiment
P1	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i> / P34058	83,15003 / 90	4,97 / 4,4
P1	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i> / P82995	84,68372 / 90	4,93 / 4,4
P2	<i>60 kDa Heat shock protein, mitochondrial</i> / P63039	57,92578 / 70	5,35 / 5,0
P4	<i>Tubulin alpha-1C chain</i> / Q6AYZ1	49,93737 / 55	4,96 / 4,4
P5	<i>Glycerate kinase</i> / Q0VVK3	55,18747 / 50	5,84 / 5,7
P8	<i>NSFL1 cofactor p47</i> / O35987	40,67996 / 44	5,04 / 4,4
P8	<i>N-myc downstream regulated gene 2, isoform CRA_c</i> / Q8VBU2	40,64799 / 44	5,16 / 4,4
P10	<i>Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial</i> / B2RZ24	47,38776 / 43	6,06 / 5,6
P10	<i>Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial</i> / Q5EBA9	41,720.98 / 43	5.64 / 5,6
P10	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G</i> / Q5RK09	35,51985 / 43	5,70 / 5,6
P16	<i>Fructose-bisphosphate aldolase B</i> / P00884 / Q66HT1	39,48692 / 29 39,52499 / 29	8,67 / 4,0 8,67 / 4,0
P16	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Z</i> / Q3B7D1	38,35234 / 29	5,37 / 4,0
17	<i>Elongation factor 1-delta</i> / Q68FR9	31,19892 / 34	4,94 / 4,4

Proteinspots in 2DE-Gelen mit erhöhter Intensität in der Phosphofärbung der Rattenleber unter einer chronischen TAA-Exposition mit Spotnr. Analog zu Abb. 4, Proteinname, Datenbanknummer, MW in kDa und IP jeweils theoretisch errechnet aus der Datenbank Uniprot und im Gel experimentell bestimmt. In Rot die Spots mit Veränderung in der Phospho- und Silberfärbung.

## 3.3.1.2 Proteinspots mit verminderter Intensität in der Phosphofärbung

Tabelle 12 zeigt alle durch Massenspektrometrie identifizierten Proteine in den Proteinspots mit verminderter Spotratio. In der Tabelle dargestellt sind die Identifikationsnummer des jeweiligen Proteins in der Proteindatenbank Uniprot sowie das auf dem Gel experimentell bestimmte und in Uniprot errechnete MW und der IP. Wie in Kapitel 2.2.5.2 beschrieben, wurde ein Proteinspot bei mehreren in Frage kommenden Proteinen pro Proteinspot mehrfach aufgeführt.

Tabelle 12: Proteinspots in 2DE-Gelen mit verminderter Intensität in der Phosphofärbung

Proteinspots in 2DE-Gelen mit <u>verminderter</u> Intensität in der Phosphofärbung der Rattenleber unter einer chronischen TAA-Exposition			
Spot Nr.	Mascot-Proteinname / Uni-Prot Acc.Nummer(n)	MW[kDa] Uniprot/Experiment	IP Uniprot/Experiment
P3	<i>Catalase</i> / P04762	59,62601 / 62	7,15 / 8,2
P3	<i>Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing)</i> / Q4KLZ6	59,44395 / 62	7,12 / 8,2
P6	<i>Phenylalanine-4-hydroxylase</i> / P04176	51,69060 / 58	5,77 / 5,8
P7	<i>Alpha-enolase isoform 1</i> / P04764 /	46,99667 / 48	6,16 / 6,2
	/ Q5BJ93	47,12786 / 48	6,16 / 6,2
P9	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1</i> / P19112	39,47817 / 39	5,54 / 4,8
P9	<i>UBX domain-containing protein 1</i> / Q499N6	33,58152 / 39	5,22 / 4,8
P11	<i>Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor</i> / P12007	43,09743 / 41	6,12 / 6,2
P12	<i>Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1</i> / O09171	44,97641 / 46	8,02 / 8,5
P12	<i>Argininosuccinate synthase</i> / P09034	46,49631 / 46	7,63 / 8,5
P12	<i>Multifunctional protein ADE2</i> / P51583	46,96500 / 46	7,93 / 8,5
P13	<i>Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1</i> / O09171	44,97641 / 43	8,02 / 8,8
P13	<i>Argininosuccinate synthase</i> / P09034	46,49631 / 43	7,63 / 8,8
P13	<i>Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)</i> / P13437	41,87092 / 43	8,09 / 8,8
P14	<i>Fructose-bisphosphate aldolase B</i> / P00884	39,48692 / 37	8,67 / 8,5
	/ Q66HT1	39,52499 / 37	8,67 / 8,5
P15	<i>Fructose-bisphosphate aldolase B</i> / P00884	39,48692 / 37	8,67 / 8,8
	/ Q66HT1	39,52499 / 37	8,67 / 8,8
P15	<i>Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial</i> / Q5XIC0	38,94940 / 37	8,47 / 8,8
P17	<i>Triosephosphate isomerase</i> / P48500	26,71771 / 25	7,06 / 6,2

**Proteinspots in 2DE-Gelen mit verminderter Intensität in der Phosphofärbung der Rattenleber unter einer chronischen TAA-Exposition**

Spot Nr.	Mascot-Proteinname / Uni-Prot Acc.Nummer(n)	MW[kDa] Uniprot/Experiment	IP Uniprot/Experiment
P18	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Z</i> / Q3B7D1	38,35234 / 24	5,37 / 8,5
P19	<i>Actin, gamma 1 propeptide-like</i> / P63259	41,79284 / 21	5,31 / 8,8
	/ P60711	41,73673 / 21	5,29 / 8,8
P20	<i>Fatty acid-binding protein, liver</i> / P02692	14,27252 / 11	7,79 / 8,7
14	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1</i> / P19112	39,47817 / 39	5,54 / 5,0
16	<i>Nucleophosmin</i> / P13084	32,56007 / 36	4,62 / 4,3
18	<i>Regucalcin</i> / Q03336	33,38985 / 33	5,27 / 4,6
27	<i>Aryl sulfotransferase</i> / P17988	33,90604 / 33	6,37 / 7,2
27	<i>S-formylglutathione hydrolase</i> / B0BNE5	31,36368 / 33	6,44 / 7,2

Proteinspots in 2DE-Gelen mit verminderter Intensität in der Phosphofärbung der Rattenleber unter einer chronischen TAA-Exposition mit Spotnr. Analog zu Abb. 4, Proteinname, Datenbanknummer, MW in kDa und IP jeweils theoretisch errechnet aus der Datenbank Uniprot und im Gel experimentell bestimmt. In Rot die Spots mit Veränderung in der Phospho- und Silberfärbung.

### 3.3.2 Proteine mit signifikant veränderter Gesamtmenge

Anschließend an die Phosphofärbung erfolgte die Silberfärbung der 2DE-Gele. Die Abbildung 4 zeigt exemplarisch das eingescannte Bild des silbergefärbten Mastergels mit den jeweils auffällig veränderten Spots. Die in dieser Studie im Vergleich zum Mastergel veränderten Proteinspots in allen Gelen der mit TAA behandelten Ratten wurden mit Pfeilen markiert.

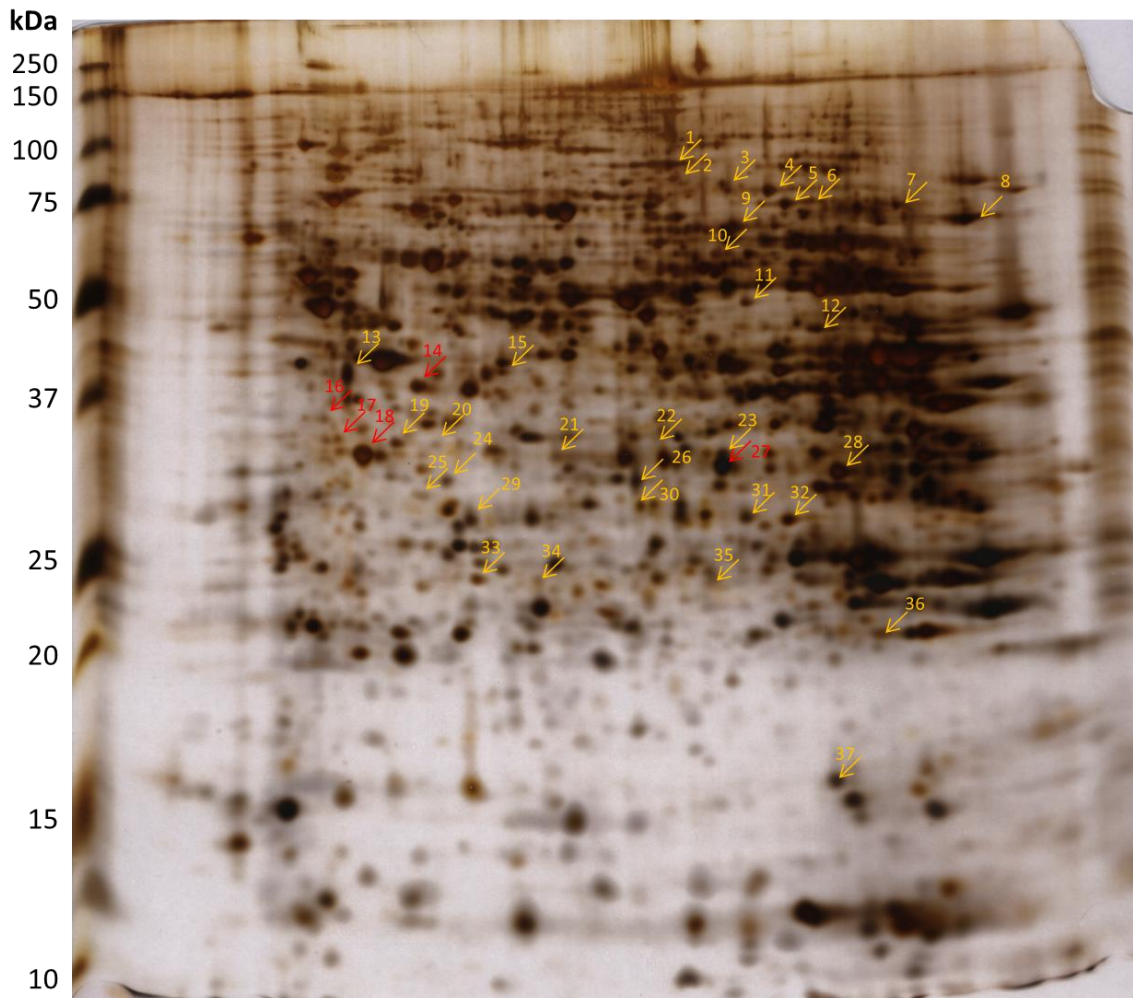


Abbildung 4: Mastergel-Silberfärbung. Exemplarisches 2DE-Gel nach Silberfärbung (Mastergel). Mit Pfeilen (orange) markiert sind die signifikant veränderten und identifizierte Proteinspots, die im Abgleich mit dem Mastergel in der Proteinmenge verändert erscheinen sowie die Proteinspots 14, 16, 17, 18 und 27 (rot), welche auch in der Phosphofärbung signifikant verändert sind (Daten hier nicht gezeigt).

Es konnten insgesamt 37 Spots mit veränderter Intensität der Silberfärbung identifiziert werden. Es wurden 27 Spots mit verminderter und zehn Spots mit vermehrter Intensität in der Silberfärbung identifiziert.

### 3.3.2.1 Proteinspots mit verminderter Intensität in der Silberfärbung

Es erfolgte analog zu der Phosphofärbung die Auswertung und Analyse der einzelnen Spots in den silbergefärbten Gelen mit Hilfe von Delta2D, Massenspektrometrie und der Datenbank Uniprot.org. Die in der Intensität verminderten Spots wurden in der Tabelle 13, wie unter Kapitel 3.3.1 beschrieben, dargestellt.

Tabelle 13: Proteinspots in 2DE-Gelen mit verminderter Intensität in der Silberfärbung

Proteinspots in 2DE-Gelen mit <u>verminderter</u> Intensität in der Silberfärbung der Rattenleber unter einer chronischen TAA-Exposition			
Spot Nr.	Mascot-Proteinname / Uni-Prot Acc. Nummer(n)	MW[kDa] Uniprot/Experiment	IP Uniprot/Experiment
1	<i>Dimethylglycine dehydrogenase precursor, isoform CRA_b</i> / Q5RKL4	95,97739 / 90	6,77 / 6,9
2	<i>Radixin</i> / Q5WQV5 / Q5PQK5	68,57182 / 85 68,54381 / 85	5,95 / 7,0 5,95 / 7,0
3	<i>Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial</i> / Q5I0C3	74,90839 / 80	6,21 / 7,3
3	<i>Lamin A, isoform CRA_b</i> / P48679	73,99227 / 80	6,54 / 7,3
4	<i>Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1</i> / P18163	78,17868 / 80	6,60 / 7,6
5	<i>Urocanase domain containing 1</i> / D3ZIC2	74,68730 / 72	6,58 / 7,8
6	<i>Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain</i> / Q68FT7	65,65127 / 75	6,63 / 8,0
6	<i>Urocanase domain containing</i> / D3ZIC2	74,68730 / 75	6,58 / 8,0
7	<i>Acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain, isoform CRA_a</i> / P97562 / F1LNW3	82,96070 / 72 76,74677 / 72	7,64 / 8,6 7,63 / 8,6
7	<i>similar to hypothetical protein FLJ21963 (predicted), isoform CRA_b</i> / D3ZDV3	74,67520 / 72	8,83 / 8,6
8	<i>Solute carrier family 25, member 13 (citrin) / F1LZW6</i>	74,38284 / 70	8,86 / 9,2
8	<i>APOBEC1 complementation factor</i> / Q923K9	65,61985 / 70	8,81 / 9,2
9	<i>Bucsl protein</i> / B5DFA3	65,35704 / 67	7,57 / 7,4
9	<i>Stress-induced-phosphoprotein</i> / O35814	62,57010 / 67	6,40 / 7,4
10	<i>Liver carboxylesterase 4 precursor</i> / Q64573	60,36000 / 60	6,31 / 7,2
10	<i>Glutaminase 2 (liver, mitochondrial), isoform CRA_a</i> / P28492	64,66085 / 60	6,64 / 7,2
11	<i>Aldehyde dehydrogenase family 5, subfamily A1 / P51650</i>	52,18867 / 50	6,40 / 7,5
12	<i>Homogentisate 1, 2-dioxygenase</i> / Q6AYR0	49,89991 / 46	6,67 / 8,0
13	<i>Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1</i> / P18163	78,17868 / 40	6,60 / 4,4
14	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase 1</i> / P19112	39,47817 / 39	5,54 / 5,0
15	<i>Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial</i> / Q5EBA9	41,72098 / 41	5,64 / 5,6
15	<i>Erlin-2</i> / B5DEH2	37,71037 / 41	5,54 / 5,6

**Proteinspots in 2DE-Gelen mit verminderter Intensität in der Silberfärbung der Rattenleber unter einer chronischen TAA-Exposition**

Spot Nr.	Mascot-Proteinname / Uni-Prot Acc. Nummer(n)	MW[kDa] Uniprot/Experiment	IP Uniprot/Experiment
18	<i>Regucalcin</i> / Q03336	33,38985 / 33	5,27 / 4,6
19	<i>Ketimine reductase mu-crystallin homolog</i> / Q9QYU4	33,55425 / 34	5,34 / 4,8
23	<i>Aryl sulfotransferase</i> / P17988	33,90604 / 33	6,37 / 7,4
23	<i>3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase</i> / P23457	37,02756 / 33	6,67 / 7,4
24	<i>Aspartoacylase-2</i> / Q5M876	35,41932 / 31	5,42 / 5,2
26	<i>Sulfotransferase 1C1</i> / P50237	35,76391 / 41	6,10 / 6,6
27	<i>Aryl sulfotransferase</i> / P17988	33,90604 / 33	6,37 / 7,2
27	<i>S-formylglutathione hydrolase</i> / B0BNE5	31,36368 / 33	6,44 / 7,2
28	<i>Chain A, Methyltransferase</i> / P13255	32,41784 / 32	7,21 / 8,2
28	<i>Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial precursor</i> / P97519	31,40251 / 32	7,50 / 8,2
29	<i>Estrogen sulfotransferase, isoform 2</i> / P52845/ / P49889	35,36469 / 29 35,41574 / 29	5,57 / 5,4 5,57 / 5,4
30	<i>Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8, isoform CRA_b</i> / Q6MGB5	26,79060 / 29	6,10 / 6,7
30	<i>Proteasome subunit alpha type-1</i> / P18420	29,51750 / 29	6,14 / 6,7
31	<i>L-xylulose reductase</i> / Q920P0	25,71972 / 29	6,83 / 7,5
32	<i>Omega-amidase NIT2</i> / Q497B0	30,70099 / 29	6,90 / 7,8
33	<i>Indolethylamine N-methyltransferase</i> / D3ZNJ5	29,49478 / 24	5,74 / 5,4

Proteinspots in 2DE-Gelen mit verminderter Intensität in der Silberfärbung der Rattenleber unter einer chronischen TAA-Exposition mit Spotnr. Analog zu Abb. 5, Proteinname, Datenbanknummer, MW in kDa und IP jeweils theoretisch errechnet aus der Datenbank Uniprot und im Gel experimentell bestimmt. In Rot die Spots mit Veränderung in der Phospho- und Silberfärbung.



## 3.3.2.2 Proteinspots mit erhöhter Intensität in der Silberfärbung

Ebenso wurden die Proteinspots mit erhöhter Intensität in der Silberfärbung aufgearbeitet. Die Proteinspots mit erhöhter Intensität sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Proteinspots in 2 DE-Gelen mit erhöhter Intensität in der Silberfärbung

<b>Proteinspots mit <u>erhöhter</u> Intensität in der Silberfärbung der Rattenleber unter einer chronischen TAA-Exposition in 2DE-Gelen</b>			
<b>Spot Nr.</b>	<b>Mascot-Proteinname / Uni-Prot Acc. Nummer(n)</b>	<b>MW[kDa] Uniprot/Experiment</b>	<b>IP Uniprot/Experiment</b>
<b>16</b>	<i>Nucleophosmin</i> / P13084	32,56007 / 36	4,62 / 4,3
<b>17</b>	<i>Elongation factor 1-delta</i> / Q68FR9	31,19892 / 34	4,94 / 4,4
<b>20</b>	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-1</i> / B2GUZ5	32,77858 / 34	5,44 / 5,2
<b>21</b>	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i> / O88989	36,35192 / 33	6,16 / 6,0
<b>21</b>	<i>Delta-aminolevulinic acid dehydratase</i> / P06214	36,03159 / 33	6,31 / 6,0
<b>22</b>	<i>Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2</i> / Q8CG45	40,67524 / 34	8,35 / 6,8
<b>25</b>	<i>Chain A, Crystal Structure Analysis Of The Sodium-Bound Annexin A4</i> / P55260	35,71748 / 30	5,30 / 5,0
<b>34</b>	<i>Preornithine carbamoyl transferase</i> / P00481 / Q5M897	36,17663 / 24	6,66 / 5,9
		39,57373 / 24	9,25 / 5,9
<b>35</b>	<i>Triosephosphate isomerase</i> / P48500	26,71771 / 24	7,06 / 7,2
<b>35</b>	<i>Glutathione S-transferase Mu 2</i> / B6DYQ2 / P08010	25,70262 / 24	6,91 / 7,2
		25,57143 / 24	7,31 / 7,2
<b>36</b>	<i>Chain A, Crystal Structure Analysis Of Rat Hbp23 Peroxiredoxin I</i> , / Q63716	22,10941 / 21	8,27 / 8,5
<b>37</b>	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i> / P19804	17,15179 / 16	7,12 / 8,2

Proteinspots mit erhöhter Intensität in der Silberfärbung der Rattenleber unter einer chronischen TAA-Exposition mit Spotnr. Analog zu Abb. 5, Proteinname, Datenbanknummer, molekularem Gewicht (MW) in kDa und isoelektrischem Punkt (IP) jeweils theoretisch errechnet aus der Datenbank Uniprot und im Gel experimentell bestimmt. In Rot die Spots mit Veränderung in der Phospho- und Silberfärbung.

### 3.4 Einteilung der identifizierten Proteine nach Funktionsgruppen

Nach erfolgreicher massenspektrometrischer Identifizierung aller nach unseren Kriterien als verändert detektierten Proteinspots aus der Phospho- und der Silberfärbung wurden die ermittelten Proteine anhand der in Uniprot beschriebenen Funktionen verschiedenen Funktionsgruppen zugewiesen (dargestellt in Tabelle 15). Proteine mit multiplen Funktionen wurden mehrfach, in den jeweils entsprechenden Gruppen, berücksichtigt.

Tabelle 15: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine nach Funktionsgruppen

Funktionsgruppe		Anzahl der Proteine ↓verminderte Spotratio ↑erhöhte Spotratio in beiden Färbungen	Prozentuale Verteilung gerundet
Stoffwechsel	Proteinstoffwechsel	13 (9↓ 4↑)	16 %
	Kohlenhydratstoffwechsel	11 (7↓ 4↑)	13 %
	Fettstoffwechsel	9 (9↓ 0↑)	11 %
	Aminosäurenstoffwechsel	9 (9↓ 0↑)	11 %
			ges.51 %
Detoxifizierende und cytoprotektive Protein		8 (6↓ 2↑)	10 %
Transportproteine		6	7 %
Zellzyklus		5	6 %
Harnstoffzyklus		4	5 %
Signaltransduktion		4	5 %
Nukleosidstoffwechsel		3	2 %
Chaperones		2	2 %
Steroidsynthese		2	2 %
Atmungskette		2	2 %
Cytoskelett		2	2 %
Gallensäureproduktion		2	2 %

Hier zeigt sich, dass es sich bei 51 % der gefundenen Proteine um Proteine des zellulären Metabolismus handelt. Dabei wurden Proteine des Aminosäure-, des Fett-, des Kohlenhydrat- sowie des Proteinstoffwechsels unterschieden. In dieser Studie zeigten sich die Proteine des Amino- und des Fettstoffwechsels mit jeweils neun vermindert und keinen

vermehrt exprimierten Proteinen deutlich herunter reguliert. Der Kohlenhydratstoffwechsel ist in der Mehrzahl seiner Proteine ebenfalls in der Gesamtmenge vermindert zu finden, jedoch nicht so deutlich vermindert wie bei den zuvor beschriebenen Gruppen. Die Proteine der Proteinsynthese, der Modifikation und des Proteinabbaus, welche unter der Gruppe des Proteinstoffwechsels zusammengefasst wurden, sind mit neun verminderten und vier vermehrt exprimierten Proteinen ebenfalls in ihrer Mehrzahl vermindert. Aufgrund ihrer weit gestreuten Aufgaben und ihrem ubiquitären Vorkommen schienen diese Proteine in Bezug auf die Cholangiokarzinogenese am wenigsten spezifisch, so dass diese nicht näher betrachtet wurden.

### 3.5 Detoxifizierende und cytoprotektive Proteine

Als größte Gruppe der verändert gefundenen Proteine nach den Stoffwechselproteinen, wurde mit acht verschiedenen Proteinen und einem Anteil von 10 % an allen identifizierten Proteinen, die detoxifizierenden und cytoprotektiven Proteine ermittelt. Die hier identifizierten Proteine zählen in erster Linie zu den detoxifizierenden Proteinen von Xenobiotika und zu den cytoprotektiven Proteinen, welche für die Elimination von frei werdenden Radikalen verantwortlich sind und in einer durch TAA induzierten Cholangiokarzinogenese eine wichtige Rolle spielen könnten. Von diesen Proteinen war die Gesamtmenge der *S-formylglutathione hydrolase* (ESD), der *Aryl sulfotransferase* (ST1A1), der *Sulfotransferase 1C1* (ST1C1), der *Liver carboxylesterase 4 precursor* (EST4) und der *Omega-amidase NIT2* (NIT2) vermindert. Die Menge an *Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2* (AKR7A2) sowie des *Peroxiredoxin 1* (PRDX1) zeigte sich erhöht. Mit vermindertem Phosphorylierungsstatus wurde identifiziert: *Aryl sulfotransferase* (ST1A1) und *Catalase* (CAT).

Auf den folgenden Seiten wurde für diese Proteine die Proteinexpression in den einzelnen Stadien untersucht.

Der Verlauf wurde in Form eines Scatterplots mit allen Tieren und jeweils einem exemplarischen Spot pro Stadium gezeigt. Auf eine statistische Auswertung wurde verzichtet, da bei teilweise nur drei Tieren pro Gruppe die Grundvoraussetzungen für eine statistische Auswertung nicht erfüllt waren.

#### 3.5.1 Detoxifizierende Proteine mit signifikant veränderter Gesamtmenge

Tabelle 16 zeigt als Übersicht die gemessenen Verhältnisse der Spotdichten der einzelnen Proteinspotintensitäten in der Silberfärbung der genannten Proteine zum Mastergel.

Tabelle 16: Ratios der in der Silberfärbung veränderten Proteinspots zum Mastergel

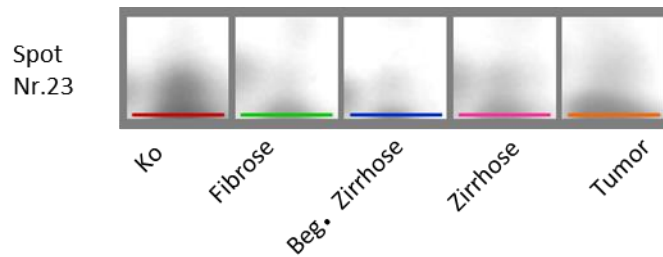
Silberfärbung	Anzahl / Spot	ST1A1	EST4	Akr7a2	ST1c1	ESD	NIT2	PRDX1
Kontrolle	n = 3	1	1	1	1	1	1	1
		0,72373	0,87712	1,03918	1,19054	1,22674	0,96677	0,98022
		0,73177	0,97277	1,33792	1,22889	1,24067	1,37919	1,21622
Fibrose	n = 3	0,23548	0,57037	2,19979	0,30993	0,51593	0,39087	1,9447
		0,28616	0,4593	3,26793	0,15941	0,47807	0,51599	1,94014
		0,19143	0,39163	2,01761	0,21629	0,47268	0,34068	1,94052
beginnende Zirrhose	n = 5	0,13062	0,51362	2,36363	0,28112	0,40635	0,20022	1,89205
		0,0946	0,61004	1,95966	0,13114	0,58113	0,48634	1,8333
		0,20541	0,40565	1,35906	0,36659	0,62428	0,45295	1,81484
		0,35423	0,9423	1,5406	0,27234	0,79094	0,65373	1,74064
		0,15229	0,56401	1,99211	0,32895	0,90726	0,20905	1,52677
Zirrhose	n = 7	0,3337	0,48528	2,05279	0,30116	0,75044	0,39027	2,00024
		0,39112	0,43737	1,98499	0,20682	0,6513	0,65637	1,92806
		0,48819	0,42591	1,68608	0,39408	0,68352	0,62031	1,9356
		0,57052	0,65445	2,3072	0,55153	0,71879	1,06856	1,29323
		0,41711	0,42796	2,28245	0,3326	0,45668	0,46342	1,26819
		0,40196	0,88228	2,57351	0,22476	0,77483	0,36869	1,75481
		0,29002	0,49498	2,13748	0,12782	0,55478	0,39542	1,41845
Tumor	n = 3	0,28851	0,45023	3,36946	0,10746	0,47094	0,22287	1,86502
		0,62832	0,84451	2,45015	0,52037	0,86443	0,56433	1,30293
		0,43839	0,47846	2,31998	0,63626	0,78864	0,93742	0,87955

Anzahl der ausgewerteten Gele pro Spot. Rot: Werte  $\leq 0,5$ . Grün: Werte  $\geq 1,5$ . *Aryl sulfotransferase* (ST1A1); *Liver carboxylesterase 4* (EST4); *Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2* (AKR7A2); *Sulfotransferase 1C1* (ST1c1); *S-formylglutathione hydrolase* (ESD); *Omega-amidase* (NIT2); *Peroxisredoxin 1* (PRDX1)

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 5 bis Abbildung 11) ist ein Spot des jeweiligen Proteins exemplarisch für jedes Stadium dargestellt sowie die Werte der Tabelle 16 in Form eines Scatterplots.

### 3.5.1.1 Aryl sulfotransferase (ST1A1)

A)



B)

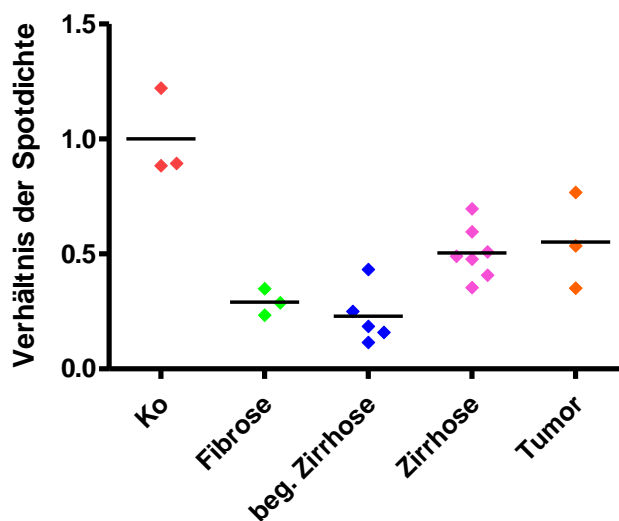


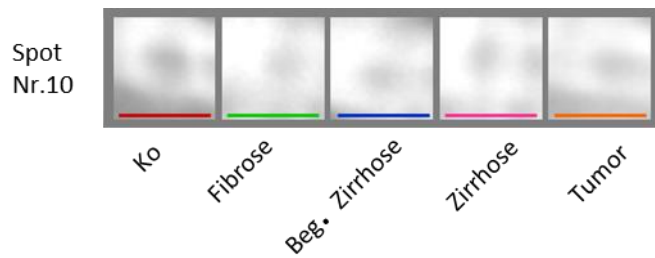
Abbildung 5: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der ST1A1 nach 2DE und Silberfärbung

A) Exemplarischer Spotverlauf jeweils eines Tieres aus der Kontrollgruppe (rot), aus der Fibrosegruppe (grün), aus der Gruppe der beginnenden Zirrhose (blau), aus der Gruppe der Zirrhose (rosa) und aus der Tumorgruppe (orange); B) Scatterplot der Verhältnisse der Spotdichten (quantifiziert mittels Software delta2D) aller Tiere der jeweiligen Gruppen in Bezug zum Mastergel mit Mittelwert. Farbkodierung identisch wie in A).

Im Verlauf der ST1A1 zeigt sich eine Abnahme der Proteinquantität bis auf 29 % der Kontrollgruppe im Stadium der beginnenden Zirrhose mit einem Wiederanstieg auf 55 % im Stadium des CC.

## 3.5.1.2 Liver carboxylesterase 4 precursor (EST4)

A)



B)

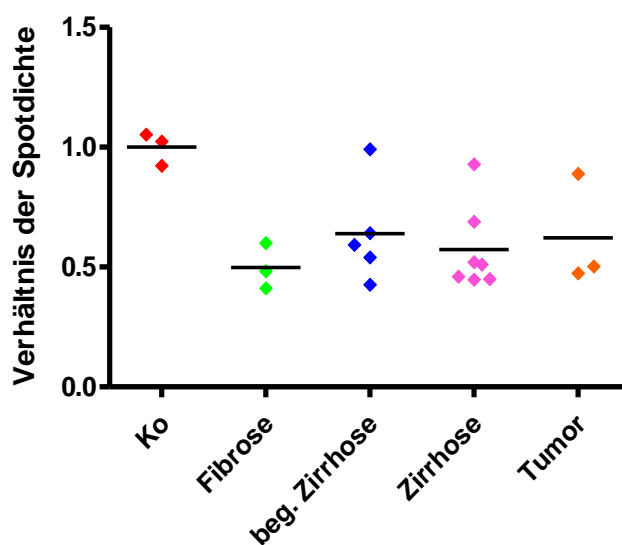


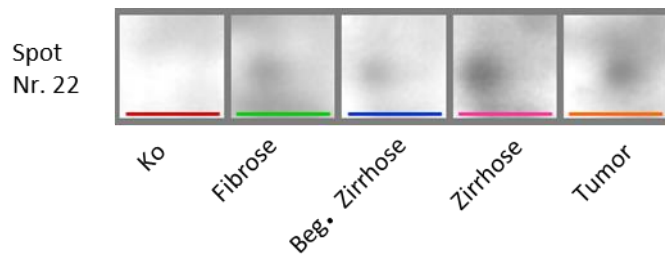
Abbildung 6: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der EST4 nach 2DE und Silberfärbung

A) Exemplarischer Spotverlauf jeweils eines Tieres aus der Kontrollgruppe (rot), aus der Fibrosegruppe (grün), aus der Gruppe der beginnenden Zirrhose (blau), aus der Gruppe der Zirrhose (rosa) und aus der Tumorgruppe (orange); B) Scatterplot der Verhältnisse der Spotdichten (quantifiziert mittels Software delta2D) aller Tiere der jeweiligen Gruppen in Bezug zum Mastergel mit Mittelwert. Farbkodierung identisch wie in A).

Im Verlauf der EST4 zeigt sich eine Abnahme der Proteing Gesamtmenge im Stadium der Fibrose auf 49 % und verbleibt nahezu in allen weiteren Stadien auf diesem Wert. Auffällig ist, dass in jedem Stadium jeweils ein Tier nur eine Minderung um 10 % aufweist.

## 3.5.1.3 Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2 (AKR7A2)

A)



B)

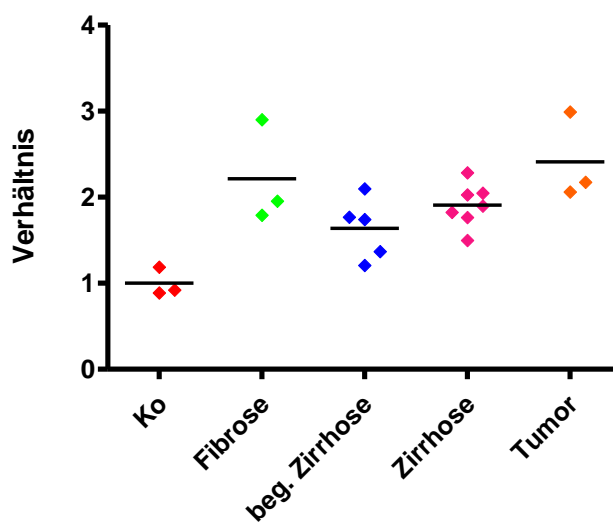


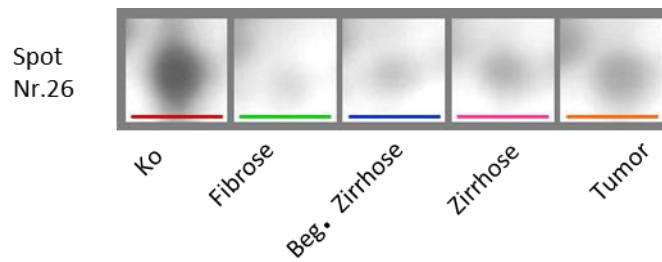
Abbildung 7: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der AKR7A2 nach 2DE und Silberfärbung

A) Exemplarischer Spotverlauf jeweils eines Tieres aus der Kontrollgruppe (rot), aus der Fibrosegruppe (grün), aus der Gruppe der beginnenden Zirrhose (blau), aus der Gruppe der Zirrhose (rosa) und aus der Tumorgruppe (orange). B) Scatterplot der Verhältnisse der Spotdichten (quantifiziert mittels Software delta2D) aller Tiere der jeweiligen Gruppen in Bezug zum Mastergel mit Mittelwert. Farbkodierung identisch wie in A).

Im Verlauf der chronischen Exposition mit TAA zeigt sich eine Zunahme der AKR7A2 im Stadium der Fibrose auf 220 %. Anschließend fällt die Gesamtmenge des Proteins in den Stadien der Zirrhose leicht ab und liegt im Tumorstadium bei 240 % der Gesamtmenge der Kontrollgruppe.

## 3.5.1.4 Sulfotransferase 1c1 (ST1C1)

A)



B)

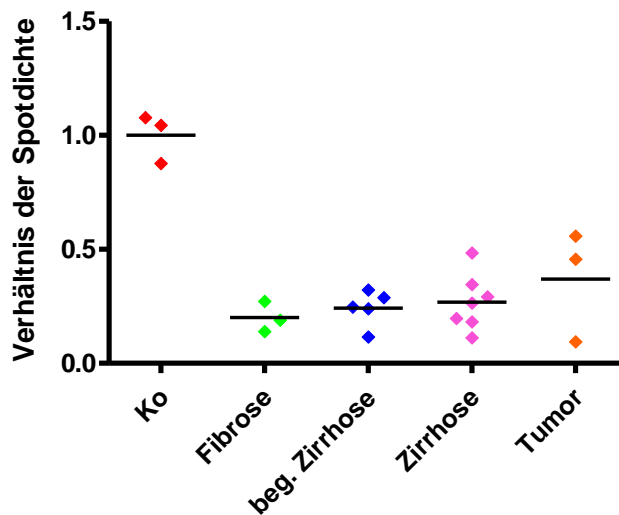


Abbildung 8: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der ST1C1 nach 2DE und Silberfärbung

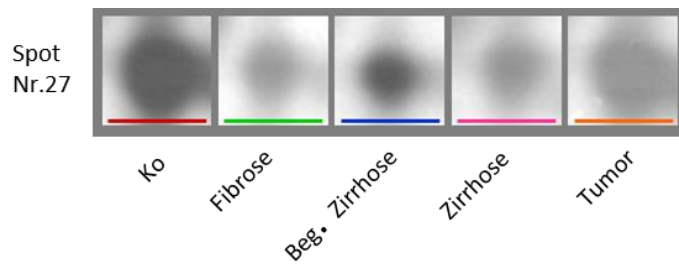
A) Exemplarischer Spotverlauf jeweils eines Tieres aus der Kontrollgruppe (rot), aus der Fibrosegruppe (grün), aus der Gruppe der beginnenden Zirrhose (blau), aus der Gruppe der Zirrhose (rosa) und aus der Tumorgruppe (orange); B) Scatterplot der Verhältnisse der Spotdichten (quantifiziert mittels Software delta2D) aller Tiere der jeweiligen Gruppen in Bezug zum Mastergel mit Mittelwert. Farbkodierung identisch wie in A).

Unter Einfluss des TAA zeigt sich eine massive Abnahme der ST1C1 auf 20 % des Ausgangswertes im Stadium der Fibrose. Trotz eines leichten Anstiegs auf 37 % im Tumorstadium bleibt die ST1C1 über alle Stadien deutlich in ihrer Gesamtmenge vermindert.



## 3.5.1.5 S-formylglutathione hydrolase (ESD)

A)



B)

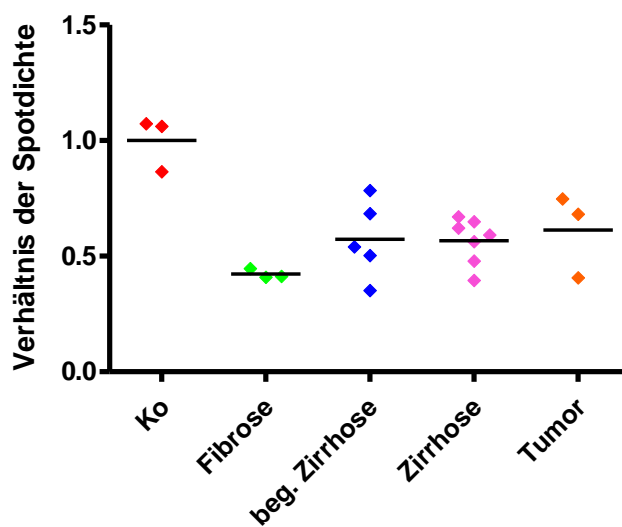


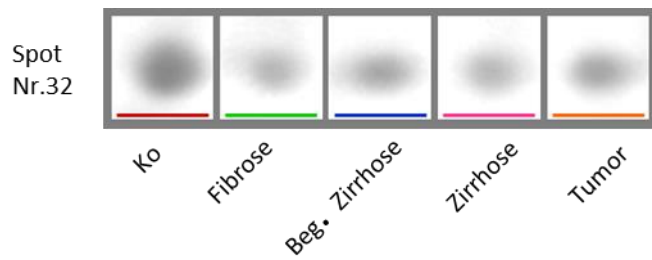
Abbildung 9: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der ESD nach 2DE und Silberfärbung

A) Exemplarischer Spotverlauf jeweils eines Tieres aus der Kontrollgruppe (rot), aus der Fibrosegruppe (grün), aus der Gruppe der beginnenden Zirrhose (blau), aus der Gruppe der Zirrhose (rosa) und aus der Tumorgruppe (orange); B) Scatterplot der Verhältnisse der Spotdichten (quantifiziert mittels Software delta2D) aller Tiere der jeweiligen Gruppen in Bezug zum Mastergel mit Mittelwert. Farbkodierung identisch wie in A).

Die ESD zeigt eine Abnahme der Quantität im Stadium der Fibrose um mehr als die Hälfte auf 42 %, um sich dann im Stadium der Zirrhose bei 57 % des Ausgangswertes bis 61 % im Tumorstadium einzupendeln.

## 3.5.1.6 Omega-amidase (NIT2)

A)



B)

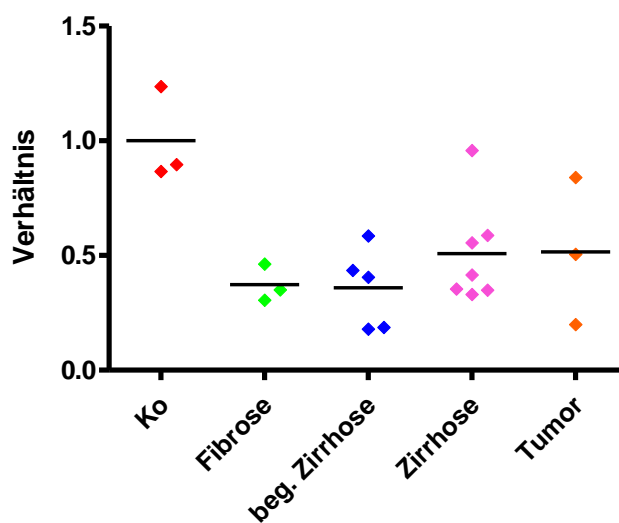


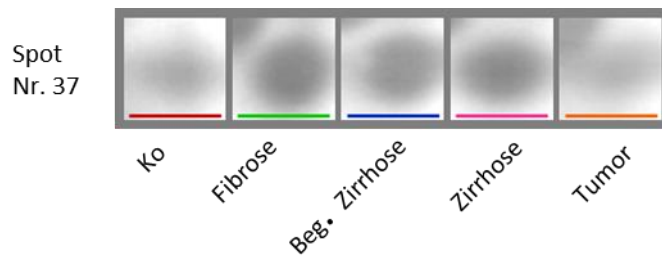
Abbildung 10: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der NIT2 nach 2DE und Silberfärbung

A) Exemplarischer Spotverlauf jeweils eines Tieres aus der Kontrollgruppe (rot), aus der Fibrosegruppe (grün), aus der Gruppe der beginnenden Zirrhose (blau), aus der Gruppe der Zirrhose (rosa) und aus der Tumorgruppe (orange); B) Scatterplot der Verhältnisse der Spotdichten (quantifiziert mittels Software delta2D) aller Tiere der jeweiligen Gruppen in Bezug zum Mastergel mit Mittelwert. Farbkodierung identisch wie in A).

Auch die NIT2 zeigt sich in der Quantität vermindert. In der Gruppe der beginnenden Zirrhose und Zirrhose liegt eine Verminderung der Proteinmenge um 65 % vor. Die Tumorgruppe zeigt in diesem Fall eine sehr große Streuung mit 50 % des Ausgangswertes als Median.

## 3.5.1.7 Peroxiredoxin 1 (PRDX1)

A)



B)

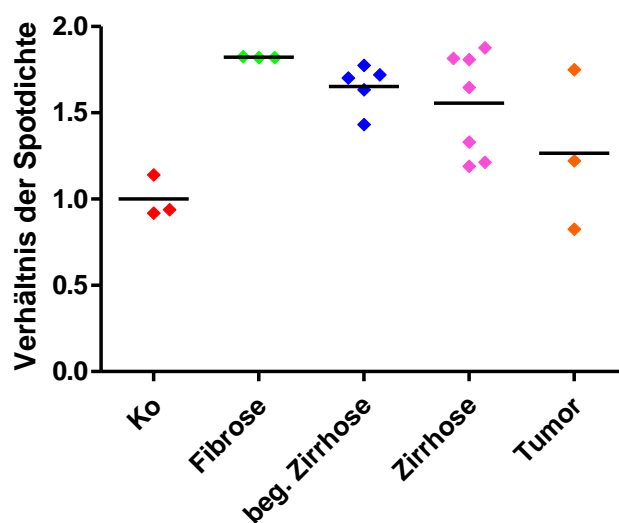


Abbildung 11: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe des PRDX1 nach 2DE und Silberfärbung

A) Exemplarischer Spotverlauf jeweils eines Tieres aus der Kontrollgruppe (rot), aus der Fibrosegruppe (grün), aus der Gruppe der beginnenden Zirrhose (blau), aus der Gruppe der Zirrhose (rosa) und aus der Tumorgruppe (orange); B) Scatterplot der Verhältnisse der Spotdichten (quantifiziert mittels Software delta2D) aller Tiere der jeweiligen Gruppen in Bezug zum Mastergel mit Mittelwert. Farbkodierung identisch wie in A).

Als weiteres detoxifizierendes Protein zeigt sich PRDX1 deutlich erhöht. Die Werte steigen in den fibrotischen Organen auf bis zu 182 % an. Ähnlich hoch liegt die Expression des Proteins in der Gruppe der Tiere mit beginnender Zirrhose bei 170 %. Auch Tiere mit Zirrhose mit 165 % und Tiere mit Tumoren mit 122 % zeigen noch eine erhöhte Expression des PRDX1 in Bezug auf den Ausgangswert.

### 3.5.2 Detoxifizierende Proteine mit signifikant veränderter Phosphorylierung

Tabelle 17 zeigt die Ratios der einzelnen Proteinspots mit Phosphofärbung im Verhältnis zum Mastergel in der Phosphofärbung.

Tabelle 17: Ratios der in der Phosphofärbung veränderten Proteinspots zum Mastergel

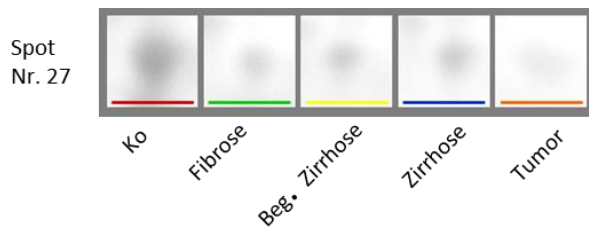
Phosphofärbung	Anzahl / Spot	ESD	CAT
<b>Kontrolle</b>	<b>n = 3</b>	1	1
		1,19306	0,75954
		0,96867	0,82837
<b>Fibrose</b>	<b>n = 3</b>	0,27511	0,35118
		0,2297	0,31203
		0,15931	0,4306
<b>beginnende Zirrhose</b>	<b>n = 5</b>	0,29687	0,49311
		0,35985	0,67134
		0,39328	0,51086
		0,55878	0,97954
		0,61352	0,58233
<b>Zirrhose</b>	<b>n = 7</b>	0,2362	0,40761
		0,337	0,7431
		0,20151	0,53169
		0,47899	0,41597
		0,14103	0,42916
		0,29344	0,50745
		0,22348	0,5272
<b>Tumor</b>	<b>n = 3</b>	0,17001	0,46978
		0,20112	0,37906
		0,75382	0,44035

Anzahl der ausgewerteten Gele pro Spot. Rot: Werte  $\leq 0,5$ ;

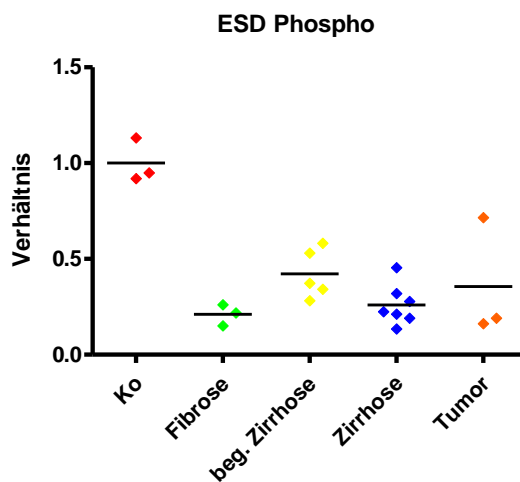
*S-formylglutathione hydrolase* (ESD); *Catalase* (CAT)

## 3.5.2.1 S-formylglutathione hydrolase (ESD) Phosphofärbung

A)



B)



C)

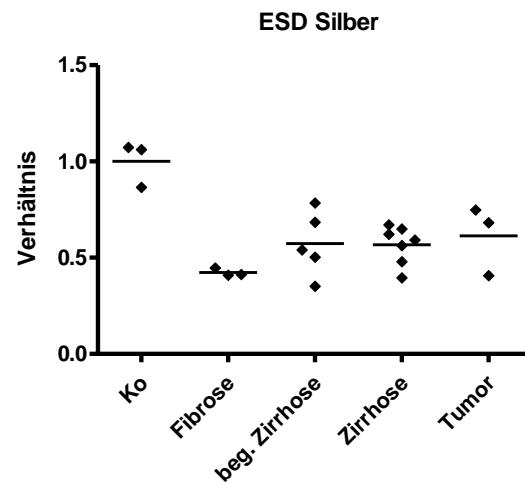


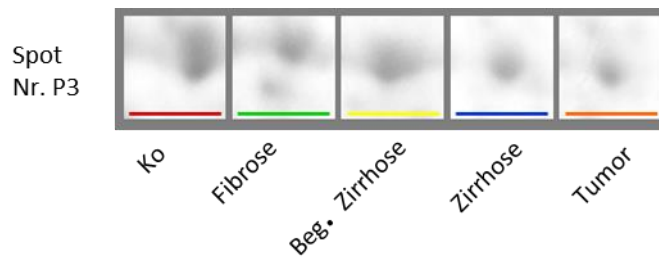
Abbildung 12: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der ESD nach 2DE und Phosphofärbung

A) Exemplarischer Spotverlauf jeweils eines Tieres aus der Kontrollgruppe (rot), aus der Fibrosegruppe (grün), aus der Gruppe der beginnenden Zirrhose (blau), aus der Gruppe der Zirrhose (rosa) und aus der Tumorgruppe (orange); B) Scatterplot der Verhältnisse der Spotdichten (quantifiziert mittels Software delta2D) aller Tiere der jeweiligen Gruppen in Bezug zum Mastergel mit Mittelwert. Farbkodierung identisch wie in A. ; C) Scatterplot der Verhältnisse der Spotdichten der Silberfärbung (Vergleiche Abbildung 9).

In der Gruppe der beginnenden Zirrhose zeigt sich eine deutliche Verminderung der ESD auf 42 % und in der Gruppe der Zirrhose sogar eine Verminderung auf 26 %. Dies entspricht sehr ähnlichen Tendenzen im Vergleich zur Silberfärbung. In der Tumorgruppe zeigt sich eine Verminderung der Expression der ESD auf 36 %. Um das noch einmal zu veranschaulichen, wurde rechts der Spotverlauf des Silbergels noch einmal mit dargestellt.

## 3.5.2.2 Catalase (CAT) Phosphofärbung

A)



B)

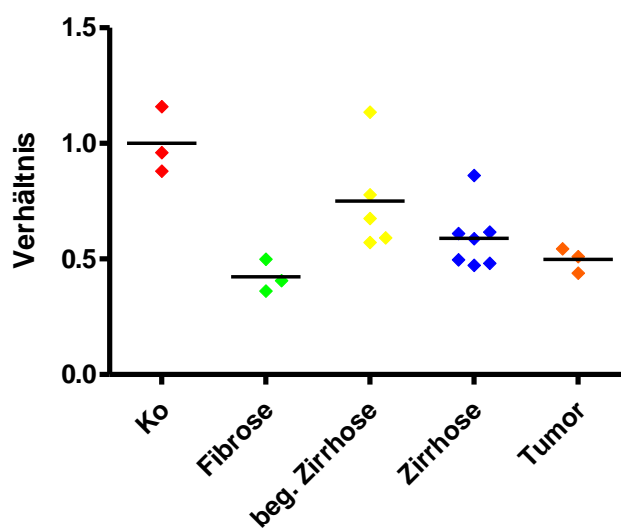


Abbildung 13: Qualitative und quantitative Auswertung der Proteinspotverläufe der CAT nach 2DE und Phosphofärbung.

A) Exemplarischer Spotverlauf jeweils eines Tieres aus der Kontrollgruppe (rot), aus der Fibrosegruppe (grün), aus der Gruppe der beginnenden Zirrhose (blau), aus der Gruppe der Zirrhose (rosa) und aus der Tumorgruppe (orange); B) Scatterplot der Verhältnisse der Spotdichten (quantifiziert mittels Software delta2D) aller Tiere der jeweiligen Gruppen in Bezug zum Mastergel mit Mittelwert. Farbkodierung identisch wie in A).

In der Gruppe der Tiere mit Fibrose zeigt sich mit 42 % der Intensität eine deutliche Abnahme des Phosphorylierungsstatus der CAT. Betrachtet man die niedrigsten Werte der Gruppe der Tiere mit Zirrhose, so ergibt sich wie in der Tumorgruppe eine im Vergleich mit der Kontrollgruppe um etwa 50 % reduzierte Intensität in der Phosphofärbung.

### 3.6 Regulation auf Transkriptionsebene

Im Laufe des Experiments interessierte, ob die quantitativen Unterschiede der untersuchten Proteine aufgrund veränderten Abbaus oder veränderter Expression zu Stande kommen. Um eine veränderte Expression, d.h. eine Regulation auf Transkriptionsebene, zu untersuchen, wurden die Transkripte, wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben, mittels Real-Time PCR quantifiziert. Die einzelnen Proben wurden immer als Duplikate gemessen. Die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben wurden gemittelt. Anschließend wurden die einzelnen Gruppen mit einem einfachen t-Test gegen die Kontrollgruppe verglichen, welche als 1 definiert wurde. Die Gruppe der Tiere mit beginnender Zirrhose ( $n = 3$ ) erfüllte nicht die Voraussetzungen für eine statistische Betrachtung mittels t-Test.

Für die folgenden PCR-Analysen wurde die in Tabelle 18 dargestellte Anzahl an Tieren pro Stadium benutzt. Die Proben stammen aus verschiedenen Durchläufen des Experiments.

Tabelle 18: Anzahl der Tiere in der PCR-Analyse

Stadium	Anzahl der Tiere
Kontrolle	$n = 4$
Fibrose	$n = 4$
beginnende Zirrhose	$n = 3$
Zirrhose	$n = 6$
Tumor	$n = 5$

Bei den mRNA-Mengen zeigt sich in der Gruppe der Fibrose eine signifikante Reduzierung für *ST1A1* auf 41 % und für *NIT2* auf 29 % sowie eine hoch signifikante Reduzierung mit über 80 % für *ST1C1* und *CAT*.

In der Gruppe der beginnenden Zirrhose zeigen sich für die PCR-Analysen von *ST1A1*, *EST4* und *NIT2* eine deutliche Abnahme der mRNA-Menge sowie eine fast vollständige Supprimierung der *ST1C1* mit einer Reduktion um 95 %.

Eine hoch signifikante Verminderung der mRNA-Menge in der Gruppe der Zirrhose um mehr als 50 % zeigen *ST1A1*, *EST4*, *NIT2* und *CAT*. Die *ST1C1* bleibt auch im Stadium der Zirrhose weiter um 95 % reduziert.

In der Gruppe der Tumortiere zeigen sich *ST1A1*, *EST4*, *CAT* als signifikant vermindert. *NIT2* zeigt sich mit einer Reduzierung um mehr als 70 % als hoch signifikant reduziert und *ST1C1* bleibt mit nur 6 % auch in der Tumorgruppe höchst signifikant vermindert.

Für *ESD* und *PRDX1* zeigt sich in allen Gruppen keine signifikante Veränderung der mRNA-Menge.

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 14 – Abbildung 20) sind die quantitativen Auswertungen der PCR-Analyse dargestellt.

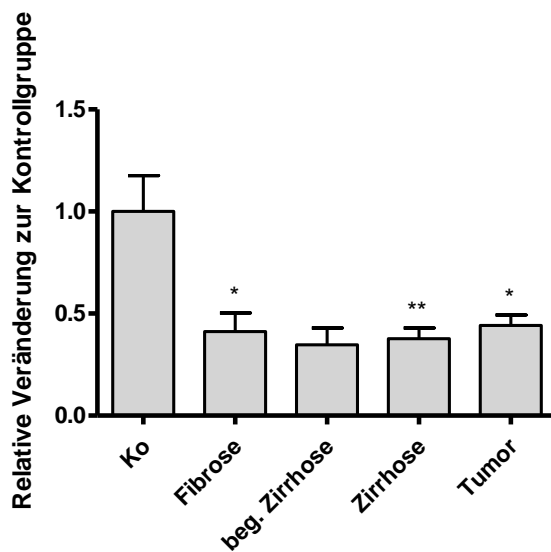


Abbildung 14: Expression der *Aryl sulfotransferase (ST1A1)* mRNA

Quantitative Analyse der PCR-Ergebnisse der *ST1A1*.

$\Delta\Delta CT$ -Werte gegen Kontrollgruppe. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ .

Fibrose ( $0,41 \pm 0,09$ ;  $p \leq 0,05$ ), Zirrhose ( $0,38 \pm 0,05$ ;  $p \leq 0,01$ ), Tumor ( $0,44 \pm 0,05$ ;  $p \leq 0,05$ ).



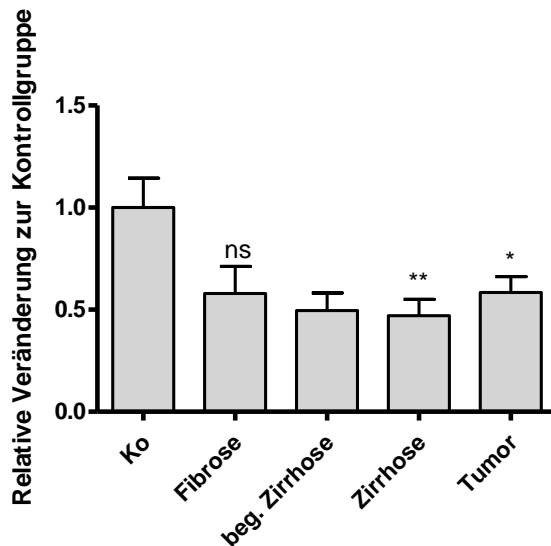


Abbildung 15: Expression der *Liver carboxylesterase 4 (EST4)* mRNA

Quantitative Analyse der PCR-Ergebnisse der EST4.

$\Delta\Delta CT$ -Werte gegen Kontrollgruppe. \* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; ns nicht Signifikant.

Zirrhose ( $0,47 \pm 0,08$ ;  $p \leq 0,01$ ), Tumor ( $0,58 \pm 0,08$ ;  $p \leq 0,05$ )

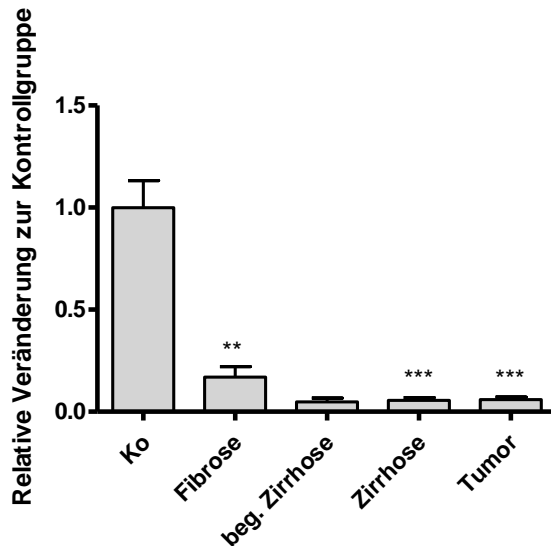


Abbildung 16: Expression der *Sulfotransferase 1C1 (ST1C1)* mRNA

Quantitative Analyse der PCR-Ergebnisse der ST1C1

$\Delta\Delta CT$ -Werte gegen Kontrollgruppe. \*\*  $p \leq 0,01$ . \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Fibrose ( $0,17 \pm 0,05$ ;  $p \leq 0,01$ ), Zirrhose ( $0,06 \pm 0,01$ ;  $p \leq 0,001$ ), Tumor ( $0,06 \pm 0,01$ ;  $p \leq 0,001$ )

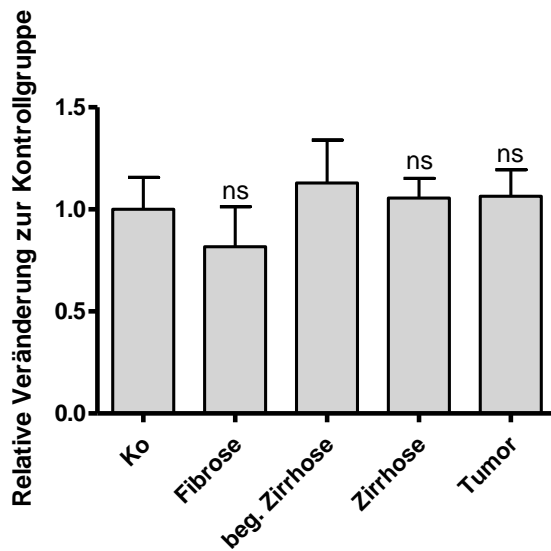


Abbildung 17: Expression der *S-formylglutathione hydrolase (ESD)* mRNA

Quantitative Analyse der PCR-Ergebnisse der ESD.

$\Delta\Delta CT$ -Werte gegen Kontrollgruppe. ns = nicht signifikant.

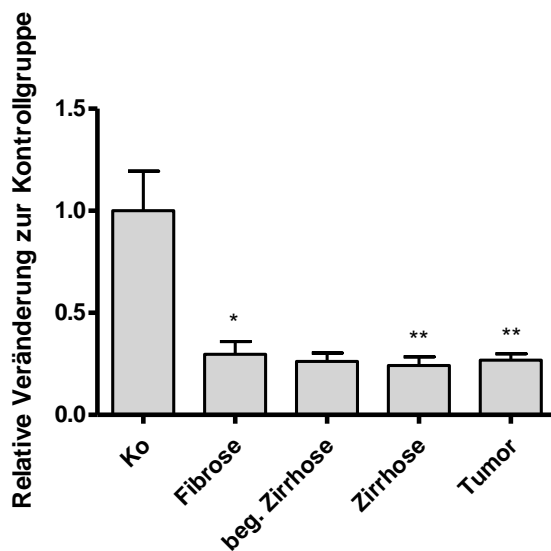


Abbildung 18: Expression der *Omega-amidase NIT2 (NIT2)* mRNA

Quantitative Analyse der PCR-Ergebnisse NIT2.

$\Delta\Delta CT$ -Werte gegen Kontrollgruppe. \* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Fibrose ( $0,29 \pm 0,06$ ;  $p \leq 0,05$ ), Zirrhose ( $0,24 \pm 0,04$ ;  $p \leq 0,01$ ), Tumor ( $0,27 \pm 0,03$ ;  $p \leq 0,01$ )

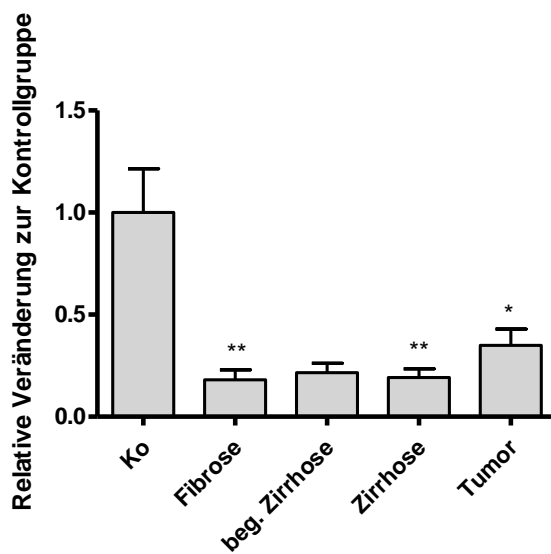


Abbildung 19: Expression der *Catalase (CAT)* mRNA

Quantitative Analyse der PCR-Ergebnisse der CAT.

$\Delta\Delta CT$ -Werte gegen Kontrollgruppe. \* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Fibrose( $0,18 \pm 0,05$ ;  $p \leq 0,01$ ), Zirrhose ( $0,20 \pm 0,04$ ;  $p \leq 0,01$ ), Tumor ( $0,34 \pm 0,08$ ;  $p \leq 0,05$ )

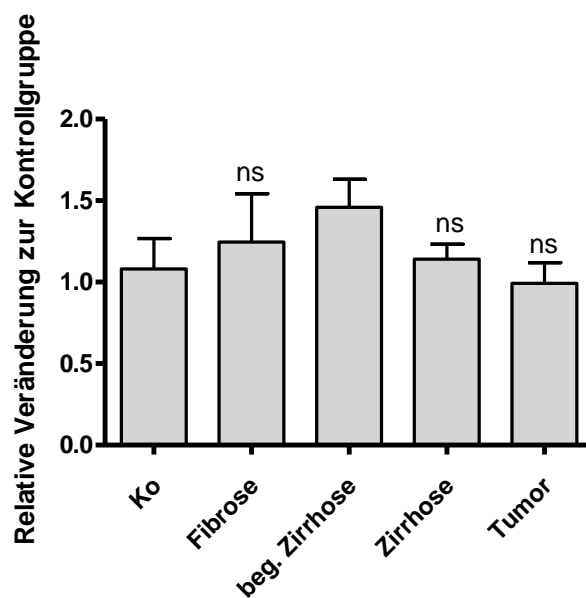


Abbildung 20: Expression des *Peroxiredoxin 1 (PRDX1)* mRNA

Quantitative Analyse der PCR-Ergebnisse PRDX1

$\Delta\Delta CT$ -Werte gegen Kontrollgruppe. Ns: nicht signifikant

## 4 Diskussion

### 4.1 Leberschädigung und Induktion eines CC durch wiederholte Gaben von TAA

In dieser Promotionsarbeit wurden die Veränderungen des Proteoms und des Phosphorylierungsstatus der Proteine der Leber unter dem chronischen Einfluss von TAA untersucht. In der Literatur wurde beschrieben, dass TAA sowohl für eine Leberfibrose und Leberzirrhose (Low *et al.* 2004) als auch für die Entwicklung eines CC verantwortlich ist (Yeh *et al.* 2004). Diese Erkenntnis konnte im vorliegenden Rattenmodell sowohl auf histologischer als auch auf molekularer Ebene bestätigt werden.

Wichtig ist zu erwähnen, dass nicht TAA selbst, sondern dessen Metabolite, das TAA-S-Oxid und das TAA-S-Dioxid, mit ihren kovalenten Bindungen an Proteine für die hepatotoxischen Veränderungen verantwortlich sind (Sarma *et al.* 2012).

In der Proteomuntersuchung dieses Rattenmodells wurden mit Hilfe der Analyse von 2DE-Gelen insgesamt 38 veränderte Proteinspots identifiziert, davon 27 mit verminderter und zehn mit erhöhter Intensität nach Silberfärbung. In der Untersuchung des Phosphorylierungsstatus wurden 25 veränderte Proteinspots identifiziert, davon acht mit erhöhter und 17 mit verminderter Intensität nach Phosphofärbung (siehe Kapitel 3.3.2 und Kapitel 3.3.1)

### 4.2 Signifikant veränderte detoxifizierende und cytoprotektive Proteine in der durch TAA chronisch geschädigten Rattenleber

Es wurden acht Proteine identifiziert, welche für die Detoxifikation/Cytoprotektion verantwortlich sind. Für diese Proteine wurden in den jeweiligen Stadien die Ergebnisse der 2DE-Analyse aufgearbeitet und deren Genexpression mit Hilfe der Real-time PCR quantifiziert. Anschließend wurde die aktuelle Literatur unter dem Aspekt der detoxifizierenden und cytoprotektiven Funktion sowie der erforschten potentiellen Beteiligung an der Tumorgenese zusammengefasst.

In der 2DE-Analyse wurden in der Gruppe der detoxifizierenden und cytoprotektiven Proteine als in der Gesamtmenge signifikant verändert identifiziert: *S-formylglutathione hydrolase* (ESD), *Aryl sulfotransferase* (ST1A1), *Sulfotransferase 1C1* (ST1C1), *Liver carboxylesterase 4 precursor* (EST4) und *Omega-amidase NIT2* (NIT2) in verminderter Menge. Mit erhöhter Menge wurden identifiziert: *Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2* (AKR7A2) und *Peroxiredoxin 1* (PRDX1). Mit vermindertem Phosphorylierungsstatus wurden identifiziert: *S-formylglutathione hydrolase* (ESD) und *Catalase* (CAT).

#### 4.2.1 S-formylglutathione hydrolase (ESD)

ESD in der Ratte zeigt hohe Ähnlichkeiten in Bezug auf Funktion und Vorkommen wie die Esterase D-Familie im Menschen. Sie findet sich vor allem in der Plazenta, der Niere, der Leber und in Erythrozyten und spielt als Serinhydrolase eine wichtige Rolle in der Entgiftung von Formaldehyd in Verbindung mit Glutathion (Harms *et al.* 1996). Formaldehyd fällt während vieler Stoffwechselfvorgänge als Intermediat an und wird sofort durch Enzyme wie ESD abgebaut. In *in vitro*-Studien wurde die kanzerogene Wirkung von Formaldehyd aufgrund genotoxischer Effekte bewiesen (Bolt und Morfeld 2013). So führt eine Abnahme von ESD, wie in dieser Studie beobachtet (siehe Kapitel 3.5.1.5), zu einer Abnahme der Formaldehyd-Elimination, was in der Folge zu einem genotoxischen Effekt auf die Zelle führt und somit das Karzinomrisiko erhöht. Somit kommt unter diesem Aspekt ESD eventuell als möglicher Biomarker für ein CC in Frage.

ESD wird unter anderem als genetischer Marker für das Vorliegen eines Morbus Wilson oder eines Retinoblastoms diskutiert (Lee und Lee 1986). Des Weiteren wird ESD als möglicher Biomarker für Tumoren mit einer K-ras-Mutation diskutiert. In den K-ras-Mutanten G12V und G13D fand man eine erhöhte Expression von ESD, was zu der Theorie führt, dass diese Tumorzellen eine erhöhte Toleranz gegenüber Formaldehyd besitzen und so einen Wachstumsvorteil erhalten (Recktenwald *et al.* 2008). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität von ESD mit der Ausprägung eines *high-grade*-Adenokarzinoms der Lunge korreliert (Wiedl *et al.* 2011), welches in 20-30 % aller nichtkleinzelligen Lungenadenokarzinome eine K-ras-Mutation beinhaltet (Meng *et al.* 2013). Diese Theorie ist jedoch auf das in der vorliegenden Studie untersuchte Rattenmodell aufgrund einer als vermindert gefundenen Menge von ESD nicht übertragbar.

Der Verlauf der Phosphofärbung ähnelt im Fall der ESD sehr dem Verlauf der Silberfärbung (siehe Abb. 13). Somit muss man davon ausgehen, dass allein aufgrund einer Verminderung der Gesamtproteinmenge eines Spots sich auch die Phosphofärbung im gleichen Sinne verändert, weshalb die Phosphorylierung der ESD nicht weiter verfolgt wurde.

#### 4.2.2 Aryl sulfotransferase (ST1A1) und die Sulfotransferase (ST1C1)

ST1A1 und ST1C1 gehören zur Sulfotransferase 1-Familie und erfüllen verwandte Funktionen. Die Sulfotransferase 1-Familie ist die am häufigsten im Menschen vorkommende Familie der Sulfotransferasen. Ihre Vertreter verwenden 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) als Sulfonat-Donor, um Stoffe wie Katecholamine, phenolische Verbindungen und Neurotransmitter sowie verschiedene Xenobiotika mit einer Sulfatgruppe zu konjugieren und somit deren Abbau oder Ausscheidung zu unterstützen (Gamage *et al.* 2003). Während für ST1C1 bisher kein Zusammenhang mit einer Tumorerkrankung diskutiert wurde, ist ST1A1 im

Zusammenhang mit vielen verschiedenen Tumorarten wie Tumoren der Lunge, des Urogenitaltrakts sowie kolorektaler Tumoren diskutiert worden. So wurde der Arg213His Polymorphismus von ST1A1, welcher zu einer Minderung der enzymatischen Aktivität führt, in einer Metastudie bei Homozygotie als Grund für einen bis zu 10 %-Risikoanstieg für die oben genannten Tumoren genannt (Xiao *et al.* 2014). In Bezug auf die Leber zeigte eine Studie die Abnahme von ST1A1 als möglichen Biomarker für ein frühes hepatozelluläres Karzinom, wie auch als Prognosefaktor für das klinische Resultat (Yeo *et al.* 2010). In der hier vorliegenden Studie zeigte sich eine deutliche Abnahme von ST1A1 und ST1C1 bereits ab der frühen Schädigung über alle Gruppen des Rattenmodells sowie auch eine verminderte Expression der mRNA für beide Sulfotransferasen in allen Gruppen. Somit scheint ST1A1 - in Übereinstimmung mit aus der Literatur bekannten Erkenntnissen - als potentieller Kandidat zur Verwendung als Biomarker zur Erkennung des frühen CC in Frage zu kommen.

#### 4.2.3 Liver carboxylesterase 4 (EST4)

EST4 ist in erster Linie an der Entgiftung von Xenobiotika sowie der Umwandlung von verschiedenen Ester- und Amidverbindungen beteiligt. Des Weiteren spielt sie eine Rolle in der Veresterung von Cholesterin (Parathath *et al.* 2011). Als wichtiges Enzym für die Aktivierung von Prodrugs, wie Irinotecan oder Capecitabine, rückt die Carboxylesterase immer weiter in den Fokus der pharmakologischen Forschung, um eine Behandlung mit Prodrugs zu verbessern und somit den Erfolg der Therapie zu steigern (Hatfield *et al.* 2008). EST4 wurde in dieser Studie in der Proteinmenge wie in der relativen Veränderung der mRNA vermindert gefunden. Da Veresterung im Abbau von TAA oder in der Cholangiokarzinogenese aller Wahrscheinlichkeit nach keine Rolle spielt, bleibt die verminderte Expression unklar.

#### 4.2.4 Omega-amidase (NIT2)

NIT2 wurde in der Ratte als die Omega-amidase identifiziert (Krasnikov *et al.* 2009) und ist *in vivo* für die Umwandlung der potentiell toxischen Substanzen  $\alpha$ -Ketoglutaramat und  $\alpha$ -Ketosuccinamat in die biologisch nutzbaren Verbindungen  $\alpha$ -Ketoglutarat und Oxalacetat verantwortlich. Diese Substanzen entstehen bei der Transaminierung der Aminosäuren Glutamin und Asparagin. Außerdem wurde eine Beteiligung der Omega-amidase am Schwefel- und Stickstoffmetabolismus diskutiert (Krasnikov *et al.* 2009). Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Überexpression von NIT2 zu einem G2-Zellarrest führt und NIT2 somit als Tumorsuppressor in HeLa Zellen fungiert. In derselben Arbeit wird auch eine Verminderung der Expression für NIT2 für das Karzinom der Leber, des Kolons, des Magens und der Mama gezeigt (Lin *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich NIT2 in allen Stadien der Leberschädigung in der Proteinmenge vermindert. Ebenso wurde auf transkriptionaler Ebene eine verminderte Menge an mRNA festgestellt, was im Rückschluss als eine Herunterregulierung der Genexpression interpretiert werden kann.

Dies könnte für einen Verlust der Tumorsuppression und der Detoxifikationsrate in der Cholangiokarzinogenese sprechen und somit NIT2 als eventueller Biomarker für das frühe CC in Frage kommen.

#### 4.2.5 Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2 (AKR7A2)

In dieser Promotionsarbeit zeigte sich - neben den bereits erwähnten verminderten Proteinen - AKR7A2 als Protein, welches in dieser Studie während der Leberschädigung und in der Cholangiokarzinogenese vermehrt exprimiert wird. Es gehört zu der Familie der Aldo-Keto-Reduktasen und ist neben dem NADPH-abhängigen Abbau von potentiell toxischen Keton- und Aldehydverbindungen zu einwertigen bzw. zweiwertigen Alkoholen und daher für den Metabolismus vieler Xenobiotika zuständig (Praml *et al.* 2008). Der Name des Proteins ergibt sich aus der Fähigkeit, die proteinbindende Form von Aflatoxin B1 in die nicht proteinbindende Form eines Dialkohols zu überführen. Im Gehirn ist AKR7A2 hauptverantwortlich für die Synthese des Neurotransmitters Gamma-hydroxybutyrat aus dem Vorläufer Succinylsäure-Semialdehyd (Lyon *et al.* 2007). Als metabolisierendes Enzym von Xenobiotika kommt ihm ebenfalls eine Funktion in der Aktivierung von Prodrugs zu. So werden z. B. die Chemotherapeutika Daunorubicin und Doxorubicin von AKR7A2 zu ihren aktiven Metaboliten umgewandelt. Eine Verbindung zum TAA-Metabolismus oder der Cholangiokarzinogenese ist hiermit zum ersten Mal beschrieben. Aus der aktuellen Literatur ist der Anstieg der AKR7A2 nicht zu erklären und muss weiter untersucht werden.

#### 4.2.6 Peroxiredoxin 1 (PRDX1)

In erhöhter Proteinmenge wurde PRDX1 gefunden. In Säugern werden sechs Isoformen des Peroxiredoxins unterschieden. Sie alle sind in erster Linie für den Abbau von Wasserstoffperoxidverbindungen verantwortlich, unterscheiden sich aber in ihrer funktionellen Gruppe oder ihrem Vorkommen in den einzelnen Zellkompartimenten (Rhee *et al.* 2005). Es konnte gezeigt werden, dass PRDX1 eng mit der Catalase, welche in dieser Studie in veränderter Phosphorylierung gefunden wurde, in den Abbau von Peroxidverbindungen verknüpft ist. So zeigt PRDX1 eine höhere Affinität bei kleineren Mengen  $H_2O_2$ , jedoch führen sehr hohe Spiegel an  $H_2O_2$  zu einer „Überoxidierung“ und in Folge deren zum Abbau von PRDX1. Bei höheren Konzentrationen übernimmt dann die Catalase den vermehrten Abbau von  $H_2O_2$  (Neumann *et al.* 2009). Des Weiteren wurde in der Literatur beschrieben, dass PRDX1 ambivalente Einflüsse auf den Zellzyklus sowie die Tumorgenese ausübt. Auf der einen Seite wird, je nach Tumorart, PRDX1 als Tumorsuppressor beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass PRDX1 den Tumorsuppressor PTEN vor Oxidation schützt und somit eine Aktivierung des Protein Kinase B (PKB/AKT) Signalwegs verhindert und damit ebenso die Deregulierung des H-Ras- und ErbB-2 Signalwegs, z.B. im Mammakarzinom verhindert (Cao *et al.* 2009). PRDX1 fungiert ebenfalls als Tumorsuppressor durch die Deaktivierung von c-Abl und

c-myc (Mu *et al.* 2002). So wurde die vermehrte Expression von PRDX1 ebenfalls als ein günstiger Prognosefaktor beim Plattenkarzinom des Ösophagus und Blasenkarzinoms beschrieben (Hoshino *et al.* 2007; Quan *et al.* 2006). Auf der anderen Seite gilt die vermehrte Expression von PRDX1 bei anderen Tumorentitäten als ein negativer Prognosefaktor mit vermehrtem Wachstum und erhöhtem Rezidivrisiko. So wurde eine vermehrte Expression von PRDX1 beim Zungen-, Pankreas- und Leberkarzinom als negativer Prognosefaktor beschrieben (Yanagawa *et al.* 2005; Cai *et al.* 2015; Sun *et al.* 2015). Beim Lungenkarzinom wurde die vermehrte Expression von PRDX1 im Serum sogar als signifikanter Biomarker mit einer ungünstigen Prognose beschrieben (Jiang *et al.* 2014).

In einer Studie zum CC mittels Zelllinien und Patientengewebe wurde die vermehrte Expression von PRDX1 hingegen als ein prognostisch günstiger Faktor identifiziert. So wurde zuerst PRDX1 in CC-Zelllinien mittels 2DE und Massenspektrometrie als überexprimiert festgestellt und anschließend dieses Ergebnis mit Leberproben von Patienten mit einem diagnostizierten CC verglichen. Da diese Patientenproben aus Asien stammen, war in den meisten Fällen *O. viverrini* die Ursache des CC. Bei Patienten mit erhöhtem PRDX1 lag die mediane Überlebenszeit nach Diagnose bei 38 Wochen im Vergleich zu 29 Wochen bei erniedrigtem PRDX1 (Yonglitthipagon *et al.* 2012). In dem hier vorliegenden Modell ist, wie unter Kapitel 3.5.1.7 gezeigt, PRDX1 in den Gruppen der Fibrose und beginnenden Zirrhose deutlich bis auf das 1,8 fache erhöht und fällt dann langsam bis zur Tumorgruppe ab, bleibt jedoch signifikant erhöht. Somit ist PRDX1 als ein möglicher Biomarker in der Cholangiokarzinogenese in Betracht zu ziehen.

#### 4.2.7 Catalase (CAT)

In der Gruppe der detoxifizierenden Proteine wurde ein Protein identifiziert, die CAT, welches nur im Phosphorylierungsstatus verändert war und sich in der Silberfärbung, also in der Proteinmenge, unverändert fand. CAT findet sich in fast allen aeroben Organismen und gehört zu der Gruppe der Häm-enhaltenden Enzyme. Die CAT ist, vergleichbar zu PRDX1, in den Zellen für die Homöostase des potentiell toxisch wirkenden Wasserstoffperoxids, welches bei Bedarf zu Wasser und Sauerstoff gespalten wird, verantwortlich. So kann CAT in allen Situationen, bei denen es vermehrt zu reaktiven Sauerstoffverbindungen kommt, regulierend eingreifen. Des Weiteren wurde CAT bei vielen weiteren detoxifizierenden Prozessen wie z.B. Indolverbindungen diskutiert (Vetrano *et al.* 2005).

In bisherigen Studien wurden mehrere Transkriptionsfaktoren, wie Sp1/NF-Y, PPAR  $\gamma$ , Oct-1 und FoxM1 identifiziert, welche die CAT regulieren. Identisch zur Regulation von PRDX1 wird CAT auch durch den Protein Kinase B (PKB/Akt)/ Forkhead Box Signalweg reguliert (Glorieux *et al.* 2014). Es konnte außerdem in Studien gezeigt werden, dass die Überexpression von CAT mit einem vermehrten Zellwachstum einhergeht, wobei



der zugrundeliegende Mechanismus bisher nicht exakt aufgeklärt werden konnte (Takeuchi *et al.* 1995). Eine mögliche Interpretation bietet die folgende Diskussion.

In jüngeren Studien wurde die fördernde Wirkung von erhöhten  $H_2O_2$ -Spiegeln auf die Wachstumsraten von Tumoren untersucht. In Zelllinien mit humanen Mammakarzinomzellen wurde gezeigt, dass nur geringfügig erhöhte  $H_2O_2$ -Spiegel zu einem vermehrten Wachstum der Tumorzellen führen. Gleichzeitig wird eine Aktivitätsabnahme von CAT unter leicht erhöhten  $H_2O_2$ -Spiegeln und eine Herunterregulierung des Tumorsuppressors Protein Phosphatase 2A, welcher über Phosphorylierung für die Suppression von antiapoptotischen Signalwegen wie den Akt-Signalweg verantwortlich ist, beschrieben. Somit führt eine leichte Erhöhung von  $H_2O_2$ -Spiegeln zu einer Aktivitätsabnahme von CAT, was die komplette Depletion von  $H_2O_2$  verhindert und somit zu einer Dephosphorylierung des anti-apoptotischen Akt führt, was dann zum Zellwachstum beiträgt (Sen *et al.* 2012). In derselben Studie wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der CAT-Menge zu einem  $H_2O_2$ -Abfall und zur Apoptose dieser Zellen führt.

In einer weiteren Studie konnte in Zellkulturen von Neuronen gezeigt werden, dass bei einer ausgeprägten Hypoxie ebenfalls der das Zellüberleben fördernde Akt-Signalweg dephosphoryliert wird. Dieser wiederum führt dazu, dass CAT in der Menge vermehrt exprimiert wird (Huang *et al.* 2013).

Somit kann zusammenfassend angenommen werden, dass die über CAT und PRDX1 regulierten  $H_2O_2$ -Spiegel in wenig erhöhten Konzentrationen zu einer Aktivitätsabnahme und in hohen Konzentrationen zu einer vermehrten Expression von CAT führen und somit über antiapoptotische Mechanismen zu einem Tumorwachstum beitragen.

In der hier vorliegenden Studie fand sich die CAT in der Silberfärbung nicht unter den veränderten Spots, weshalb von keiner signifikanten Änderung der Proteinmenge ausgegangen wird. Die Aktivität der CAT wird jedoch maßgeblich über die Phosphorylierung reguliert. So konnte gezeigt werden, dass durch eine Hypoxie im Gewebe eine Zunahme der Phosphorylierung der CAT durch die Protein Kinase C $\delta$  induziert wird, was zu einer Strukturänderung von einer Dimer- zu einer aktiveren Tetramerstruktur führt und so zu einer Zunahme der  $H_2O_2$ -Elimination beiträgt (Rafikov *et al.* 2014).

Im Umkehrschluss führt eine Abnahme der Phosphorylierung, wie in der hier vorliegenden Studie, zu einer Abnahme der CAT-Aktivität und damit zu erhöhten  $H_2O_2$ -Spiegeln, welche wie oben beschrieben das Zellwachstum fördern. Die CAT fand sich in diesem Modell ebenfalls auf der Transkriptionsebene herunter reguliert, was eine Genregulierung vermuten lässt. Doch wurde die CAT, wie oben beschrieben, nicht in veränderter Proteinmenge gefunden. Mögliche Ursachen dieses Ergebnisses sollen im Kapitel 4.3 näher beleuchtet werden.

### 4.3 mRNA-Expression und Proteinmenge

In Bezug auf die Ergebnisse der Catalase soll hier noch einmal der Zusammenhang zwischen mRNA- und Proteinmenge näher beleuchtet werden.

Der Weg von der DNA über die mRNA zum Protein gilt als zentrales Dogma der Molekularbiologie. Er führt über die Transkription der DNA zur mRNA, welche weiterverarbeitet und von Ribosomen in Aminosäureketten translatiert wird, die anschließend zu funktionellen Proteinen gefaltet werden. Man kann also sagen, dass prinzipiell einer Veränderung der Menge eines Proteins eine Veränderung seiner Genexpression und damit der Transkription in mRNA vorausgeht. Degradiert werden die Proteine entweder durch Endozytose in Lysosomen (Ciechanover 2007) oder durch Ubiquitinierung und anschließenden Abbau in Proteasomen (Glickman und Ciechanover 2002). So können durch präzise Regulation des Gleichgewichts zwischen Synthese und Abbau die Mengen einzelner Proteine den zellulären Umständen angepasst werden. Vergleicht man aber die Menge der produzierten mRNA, also das Transkriptom, mit der Menge identifizierter Proteine, dem Proteom, so findet man nur eine geringe Korrelation zwischen der mRNA und der Proteinmenge einzelner Proteine (Maier *et al.* 2009). Diese Korrelation wurde in mehreren Studien untersucht wie z.B. in der Hefe (Gygi *et al.* 1999), der Maus (Ghazalpour *et al.* 2011) oder Zelllinien mit NIH3T3-Maus-Fibroblasten (Schwanhäusser *et al.* 2011). So wird in einem Review im Schnitt nur eine Korrelation mit dem Korrelationskoeffizienten  $R^2 = 0,4$  angegeben (Abreu *et al.* 2009), was mit den Ergebnissen der oben genannten jüngeren Studien übereinstimmt. R als Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen null und eins annehmen, wobei null keiner Korrelation und eins einer linearen Korrelation entspricht. Dies bedeutet, dass nur 40 % aller Proteinveränderungen mit Veränderungen der mRNA signifikant bestimmt werden können. Deshalb kann man nicht von einem linearen Zusammenhang zwischen Transkription und Translation ausgehen. Posttranskriptionelle Prozesse wie der mRNA-Transport, der Einfluss von regulatorischen Proteinen, die Aktivität der für die Translation notwendigen Faktoren und auch die Menge der translatierenden Ribosomen oder miRNA, welche an die betreffende mRNA bindet und damit die Translation hemmt oder für die Degradation der mRNA sorgt, sind von Protein zu Protein verschieden. Ein weiterer wichtiger Faktor in der Protein/mRNA-Korrelation sind deren unterschiedliche Halbwertszeiten. So liegt die durchschnittliche Halbwertszeit einer mRNA bei 2,6-7 h und die eines Proteins bei 46 h (Vogel und Marcotte 2012). Je nach Funktion des Proteins variieren die Halbwertszeit und die Korrelation ebenfalls. So konnte gezeigt werden, dass z.B. Proteine des Stoffwechsels eine sehr hohe Halbwertszeit und Korrelation besitzen, während regulatorische Proteine sehr schnell wieder abgebaut werden (Schwanhäusser *et al.* 2011). Tendenziell kann man aber sagen, dass eine Änderung der mRNA auf eine Änderung auf der Proteinsseite hinweist.

So können 30 % bis 85 % der Veränderungen der Proteinmenge, mit einer Änderung in der mRNA-Expression in Verbindung gebracht werden. Die anderen 15 % bis 70 % sind durch posttranskriptionelle und posttranslationale Prozesse zu erklären (Abreu *et al.* 2009). Zusammenfassend kann man in Bezug auf diese Studie sagen, dass, ausgehend von der mRNA-Menge, keine Vorhersage bezüglich der Proteinmenge gemacht werden kann, da die Regulation der posttranskriptionellen und translationalen Prozesse sowie der Abbau der Proteine mindestens so viel Einfluss auf die Proteinkonzentration hat wie die Transkription, sehr wohl aber eine Tendenz überprüfbar ist. Zuletzt ist noch zu erwähnen, dass die angewandten Methoden selbst ein Rauschen in die Ergebnisse mit einbringen und ihre Limitationen ausweisen. Dies bezieht sich vor allem auf die Ergebnisse der Proteinmengen bei der Proteinanalyse mittels 2DE-Gelen.

#### 4.4 Grenzen der 2DE-Gelanalyse

Nachdem in Genomprojekten das gesamte Genom eines Gewebes oder eines Lebewesens untersucht worden war, wurden Projekte mit dem Ziel gestartet, dasselbe für das gesamte Proteom zu etablieren. Doch wie in dem Kapitel 4.3 beschrieben, ist das Proteom nicht etwas Statisches, sondern befindet sich immer im Gleichgewicht und passt sich den Gegebenheiten an. So wird es immer Unterschiede von Zelle zu Zelle und auch von Tier zu Tier geben. Die posttranslationale Modifikation, z.B. durch Acetylierung, Phosphorylierung etc., lässt die mögliche Zahl an Proteinvarianten weit über die der vorhandenen Gene steigen (Huber 2003).

Allein die Voraussetzungen, welche die 2DE-Analyse mit sich bringt, schließen die Analyse von einzelnen Proteingruppen aus. So wurde in dieser Promotionsarbeit ein IPG-Streifen mit einem pH-Wert von 3 bis 10 benutzt. Folglich können z.B. Proteine mit einem sehr hohen IP-Wert sich nicht weiter aufteilen und somit auch nicht auf dem Gel als separate Punkte dargestellt werden. Ebenso stellen stark hydrophobe Proteine oder auch membrangebundene Proteine eine Herausforderung dar. Hierfür müsste man gezielte Vorarbeiten in Form von Anreicherung und Auflösung der zellulären Membranen leisten und anschließend z.B. IPG-Streifen mit anderen pH-Grenzen auswählen. Auch die Wahl der SDS-Gel-Zusammensetzung spielt eine große Rolle. So wurde in diesen Experimenten ein 12 %iges Acrylamid-Gel benutzt, welches nach Herstellerangaben einen optimalen Bereich für Proteine mit einer Molekülgröße von 20 kDa bis 100 kDa aufweist.

Ein weiteres Problem stellen die verschiedenen Mengen einzelner Proteingruppen dar. So finden sich in Datenbanken von Proteomanalysen viele Proteine, welche innerhalb einer Zelle in großer Menge vorliegen, wie z.B. Stoffwechselproteine, Matrixproteine und zytoskeletale Proteine. Diese Proteine können in solch großer Anzahl vorliegen, dass nur in kleinen Mengen vorliegende Proteine mit identischem MW und IP im 2-DE Gel überdeckt werden und somit in einem Spot mehrere Proteine zu finden sind (Gygi *et al.* 2000). Diese

so verdeckten Proteinspots sind einer quantitativen Auswertung nicht zugänglich, da sie nicht als eigenständiger Proteinspot abgebildet werden.

Die *Human Proteom Organization* HUPO stellte in einer Pilotstudie, bei der fünf Labore dasselbe Proteom untersuchten, fest, dass von 551 insgesamt gefundenen Proteinen 79 % nur jeweils in einem der Labore als signifikant verändert gefunden worden waren (Meyer und Hamacher 2006). Um Ursachen der fehlenden Reliabilität zu identifizieren, führte die Arbeitsgruppe um Sandra Fuxius aus Berlin mehrere Experimente durch. Hierbei wurden signifikante Veränderungen aufgrund eines t-Tests bei identischen Proben untersucht. Dabei konnten unter anderem folgende Fehlerquellen ausgemacht werden:

- I. 42 % aller Spots zeigten sich bei zwei verschiedenen Durchläufen in ihrer Spotdichte verändert.
- II. 16 % aller Spots zeigten sich verändert, wenn ein anderes Kammersystem benutzt wurde.
- III. 19 % aller Spots zeigten sich verändert, wenn verschiedene IPG-Chargen desselben Herstellers verwendet wurden (Fuxius *et al.* 2008).

Die absoluten Abweichungen wurden nicht quantifiziert. Das Problem mit den verschiedenen Durchläufen löste die Arbeitsgruppe, indem sie ein System etablierte, bei der für 24 2DE-Gele alle Arbeitsschritte, von der IPG-Beladung bis zur Färbung, simultan verlaufen. Das Problem der IPG-Streifen umging die Arbeitsgruppe, indem man fortlaufend nummerierte IPG-Streifen benutzte, welche aus derselben Charge eines Herstellers stammten. Mit diesem großen Aufwand konnte die Quote an falsch signifikant veränderten Proteinspots auf 5 % reduziert werden.

Des Weiteren wurden sogenannte Poweranalysen durchgeführt, um zu ermitteln, welche quantitativen Änderungen erkannt werden können. Dazu wurden 2DE-Gele mit einer Beladung von 200 µg Protein und mit einer Beladung von 250 µg Protein aus derselben Probe verglichen und dabei untersucht, wie viele Spots als signifikant erkannt werden können. Hierbei konnte man nur 50 % der detektierten Proteinspots als signifikant verändert finden. Um eine signifikante Veränderung bei 90 % aller Proteinspots zu erhalten, muss die Beladung um mindestens 50 % variieren (Eravci *et al.* 2007).

In Bezug auf diese Untersuchung wurden in der hier vorliegenden Studie folgende Aspekte umgesetzt. Es wurde ein System benutzt, mit dem man 4 Gele gleichzeitig bearbeiten kann. Die Färbung erfolgte jedoch weiterhin nacheinander von Hand. Bei den IPG-Streifen wurden Streifen derselben Charge verwendet. Bei der Auswertung wurden nur solche Spots untersucht welche in mindestens einer Gruppe um mindestens 50 % verändert waren.

Zusammenfassend kann man sagen, dass vor allem Proteine mit einem hohen IP und hydrophobe Proteine, sowie sehr große und sehr kleine Proteine nur mit größerem Aufwand dargestellt werden können. So liegen auch alle in der vorliegenden Arbeit identifizierten Proteine in einem Größenbereich von 14 bis 96 kDa und einem IP-Bereich

von 4,6 bis 8,67. Vor allem Proteine mit einer geringen Mengenänderung oder mit einer insgesamt kleinen Menge sind ebenfalls mit der klassischen 2DE-Methode nur mit einer geringen Reliabilität zu evaluieren.

#### 4.5 Fazit

Mit den in diesem Modell identifizierten Proteinen konnte abschließend gezeigt werden, dass viele dieser Proteine nicht nur eine detoxifizierende Wirkung besitzen, sondern über diverse Wege auch am Zellwachstum und an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind und dass eine Veränderung dieser Proteine mit einer Karzinogenese vereinbar ist. Dies zeigt auch noch einmal die Wichtigkeit der Proteomforschung, um komplexe Zusammenhänge in verschiedenen Geweben zu identifizieren.

Die oben diskutierten Proteine sind in der Literatur oft als mögliche Biomarker für Tumoren anderer Entitäten als des CC beschrieben. Deshalb wird, resultierend aus den erhobenen Ergebnissen vorgeschlagen, dass einzelne Proteine weniger als isolierte Tumormarker für einen spezifischen Tumor heranzunehmen sind, da einzelne Marker in vielen verschiedenen Tumorentitäten ebenfalls verändert auftreten können, sondern spezifische Proteinsignaturen für eine spezifischere Tumorzuzuordnung zu evaluieren sind.

#### 4.6 Verwendung von Proteinsignaturen als Biomarker

Für die Diagnose, die Vorhersage des Verlaufs (Prognose) und die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf eine Therapie (Prädiktion) von Karzinomerkrankungen ist die moderne Medizin auf Biomarker angewiesen. Bisher konzentrierte sich die Suche auf ein einzelnes Protein, welches spezifisch für den jeweiligen Tumor sein könnte. Wie in der Einleitung erwähnt, ist z. B. für das CC bisher solch ein spezifischer Biomarker mit zufriedenstellender Sensitivität und Spezifität nicht gefunden worden. Oftmals sind, wie aus der Diskussion zu ersehen, nicht nur einzelne Signalwege oder Proteinfunktionen in einem Tumor gestört. Eher spielt eine Vielzahl an pathogenen Zuständen in einem Karzinomgeschehen eine Rolle und beeinflusst damit die Entstehung und Ausbreitung des Tumors. Deshalb zielen die unten genannten jüngsten Studien mit Hilfe der Proteomanalyse auf die Entdeckung von sogenannten Proteinsignaturen, welche hochspezifisch für eine Tumorentität sind. Eine Kombination mehrerer Proteine, die in einer ganz bestimmten Konstellation gefunden werden, sollen die Diagnose und Vorhersage von bestimmten Tumorerkrankungen verbessern. So konnte z.B. für das dreifach rezeptornegative Mammakarzinom eine Proteinsignatur aus elf Proteinen identifiziert werden, welches eine Prognoseeinteilung zulässt (Liu *et al.* 2014). Mit Hilfe der *Reverse Phase Protein Microarray*-Technik ist es auch mittlerweile möglich, eine große Anzahl an Proben in kurzer Zeit zu analysieren (Packeisen *et al.* 2003). So wurde am DKFZ in Heidelberg im Jahr 2016 ein Test für die klinische Anwendung entwickelt, um beim

Blasenkarzinom Verlaufsuntersuchungen zu ersetzen. Bisher wurden Patienten mit Zustand nach Blasenkarzinom in regelmäßigen Abständen einer Blasenspiegelung unterzogen. Bei diesem vom DKFZ entwickelten Test soll die Konstellation von 20 Proteinen eine Vorhersage über das Wiederauftreten des Blasenkarzinoms ermöglichen und somit in Zukunft die Blasenspiegelungen als Verlaufskontrolle ersetzen (Srinivasan *et al.* 2014). Ähnliches wird auch für das Mammakarzinom versucht (Sonntag *et al.* 2014).

Als Resultat der hier vorliegenden Arbeit wird als Biomarker für die Entstehung und als prognostischer Faktor für die Cholangiokarzinogenese bereits im frühen Stadium der Schädigung eine Proteinsignatur aus ESD (vermindert), ST1A1 (vermindert), NIT2 (vermindert), PRDX1 (erhöht) und CAT (vermindert phosphoryliert) vorgeschlagen.

## 4.7 Ausblick

Nach Auswertung der detoxifizierenden Proteine und deren potentieller Rolle in der Karzinogenese stellt sich die Frage, welche Veränderungen des Proteoms auf die Metabolite des TAAs und welche auf die Anwesenheit des CC zurückzuführen sind. Hierfür muss eine Proteomanalyse mit einer zeitlich begrenzten Einwirkung des TAAs durchgeführt werden, um direkte Zielproteine des TAAs zu identifizieren. Anschließend sollte eine Proteomanalyse des CC ohne Einfluss von TAA stattfinden. Ebenso müssten in diesem Tiermodell die bisher im CC beschriebenen genetischen Aberrationen und veränderten Signalwege untersucht werden. Eine Verbesserung der Identifizierung von CC typischen Proteinen mit Hilfe der Laser Mikrodisektion, bei der nur Cholangiokarzinomzellen untersucht werden, ist ebenfalls ein nächster Schritt zur Präzisierung der Ergebnisse in diesem Rattenmodell. Vor allem die Verbesserung der Reliabilität der Gele sowie die Durchführung einer Poweranalyse sollten Beachtung finden. Des Weiteren sollte die Validierung der möglichen Proteinsignatur zur Prädiktion eines CC erfolgen. Hierzu müssten mehrere Durchläufe gestartet und eine größere Anzahl an Tieren eingesetzt werden, um eine statistisch verlässliche Aussage treffen zu können. Des Weiteren sollte die weitere Validierung der Proteinsignatur aus ESD (vermindert), ST1A1 (vermindert), NIT2 (vermindert), PRDX1 (erhöht) und CAT (vermindert phosphoryliert) anhand humaner Tumorproben erfolgen.

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Deutsch

Die zugrundeliegenden molekularen und zellulären Veränderungen in der Entstehungsphase des intrahepatischen Cholangiokarzinoms (iCC) sind bisher nur teilweise verstanden. Diverse Mutationen (*APC*, *DCC*, *OGG1*, *p53*, *k-ras*, *BRAF*, *TGF $\beta$ R1*, *SMAD4*) und eine Beteiligung verschiedener Signalwege (PI3K/Akt-, EGFR-, TGF- $\beta$ 1-, Hippo-, Hedgehog-, Notch-, Wnt-Signalweg) wurden bislang in Bezug auf das iCC beschrieben. Hierbei ist noch nicht geklärt, ob dem iCC möglicherweise eine Adenom-Karzinom-Sequenz zugrunde liegt bzw. zu welchem Zeitpunkt welche Signalwege auf Proteinebene gestört sind.

Ziel dieses Projekts war eine Analyse des Proteoms und der Phosphorylierung des Proteoms der Leber während der durch das wasserlösliche Hepatotoxin Thioacetamid (TAA) induzierten Cholangiokarzinogenese. Hierfür wurde ein Rattenmodell mit männlichen Sprague-Dawley-Ratten etabliert, welche ausschließlich Trinkwasser erhielten, dem TAA zugegeben war, und somit dem TAA chronisch ausgesetzt waren. Parallel dazu wurde eine Gruppe mit Kontrolltieren gehalten, welche nur sauberes Trinkwasser erhielt. Die Tiere wurden nach 4, 8, 12, 16 und 18 Wochen geopfert und entsprechend der Leberschädigung histologisch in die Gruppen Fibrose, beginnende Zirrhose, Zirrhose und CC eingeteilt. Die Analyse der Veränderung der Proteinmengen und des Phosphorylierungsstatus wurde mit Hilfe von 2DE-Gelen und anschließender Massenspektrometrie durchgeführt. Hierbei wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den behandelten Tieren insgesamt 38 Proteine mit einer mindestens 1,5-fach veränderten Abundanz und 25 Proteine mit einer mindestens 1,5-fachen Veränderung ihres Phosphorylierungsstatus identifiziert. Die Proteine wurden nach Funktionsgruppen sortiert. Nach den am Metabolismus beteiligten Proteinen, welche einen Anteil von 52 % aller identifizierten Proteine ausmachten, bildeten detoxifizierende und cytoprotektive Proteine mit 10 % Anteil die zweitgrößte Gruppe. Diese Gruppe beinhaltet die Proteine *S-formylglutathione hydrolase* (ESD), *Aryl sulfotransferase* (ST1A1), *Sulfotransferase 1C1* (ST1C1), *Liver carboxylesterase 4 precursor* (EST4) und *Omega-amidase NIT2* (NIT2) in verminderter Menge. Mit erhöhter Menge wurden *Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2* (AKR7A2) und *Peroxiredoxin 1* (PRDX1) identifiziert. Mit vermindertem Phosphorylierungsstatus zeigte sich *S-formylglutathione hydrolase* (ESD) und *Catalase* (CAT). Für diese Proteine wurde anschließend die Genexpression durch Quantifizierung der spezifischen Transkripte mit Hilfe einer RT-PCR bestimmt und die aktuellste Literatur zusammengefasst. Damit war es möglich, die Veränderung des Proteoms und des Phosphorylierungsstatus in der

Cholangiokarzinogenese in der Ratte unter dem Einfluss von TAA zu zeigen und das Rattenmodell als Modell für das Cholangiokarzinom zu bestätigen.

Als Fazit aller Ergebnisse dieser Arbeit wird eine Proteinsignatur aus ESD (vermindert), ST1A1 (vermindert), NIT2 (vermindert), PRDX1 (erhöht) und CAT (vermindert phosphoryliert) als diagnostischer und prognostischer Biomarker für die Cholangiokarzinogenese vorgeschlagen.

## 5.2 English

The understanding of underlying molecular and cellular mechanisms during development of an intrahepatic cholangiocarcinoma (iCC) is far from being complete. Connections of various mutations (*APC*, *DCC*, *OGG1*, *p53*, *k-ras*, *BRAF*, *TGF $\beta$ 1*, *SMAD4*) and the involvement of several signalling pathways (PI3K/Akt-, EGFR-, TGF- $\beta$ 1-, Hippo-, Hedgehog-, Notch-, Wnt-pathway) with iCC have been described. However, it is still unclear whether the underlying mechanism resembles an adenoma-carcinoma sequence and also at which timepoint which specific signalling pathway is disturbed on the proteome level. The aim of this study was the analysis of the proteome and the phospho-proteome of the liver during cholangiocarcinogenesis, induced by thioacetamid (TAA), a water-soluble hepatotoxin. For this purpose, a rat model of male Sprague-Dawley-rats, which were chronically exposed to TAA in the drinking water, was established. Animals were sacrificed after 4, 8, 12 and 16 weeks and assigned to four groups (fibrose; beginning cirrhosis; cirrhosis; cholangiocarcinoma), based on histological evaluation of liver sections. Further analysis was performed by two-dimensional gel electrophoresis with subsequent mass spectrometry. A total of 38 proteins were identified to be different in protein amount by a factor of more than 1.5, in contrast to the control animal group. Furthermore, 25 proteins were found to differ in the degree of phosphorylation by a factor of more than 1.5, in contrast to the control animal group. The majority of the identified proteins (52 %) could be assigned to a group of proteins, performing metabolic functions; followed by a group of proteins (10 %) related to detoxification and cytoprotection. This second group of proteins comprised S-formylglutathione hydrolase (ESD), Aryl sulfotransferase 1A1 (ST1A1), Sulfotransferase 1C1 (ST1C1), Liver carboxylesterase 4 (EST4) and Omega-amidase NIT2 (NIT2), which were found to be reduced in amounts, compared to the control. The proteins Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2 (AKR7A2) and Peroxiredoxin 1 (PRDX1) also belong to the group of proteins related to detoxification and cytoprotection and were found in increased amounts within this study. S-formylglutathione hydrolase (ESD) as well as Catalase (CAT) were found with reduced degree of phosphorylation. These candidates were further analysed by quantification of the expression of their corresponding genes by mRNA-level determination using RT-PCR. Extensive literature research on the identified candidate proteins is summarized and discussed. In summary, the present study reveals changes in the proteome and the



phospho-proteome during TAA-induced cholangiocarcinogenesis in the rat and furthermore confirms the selected rat model being a valid model system to study cholangiocarcinoma.

In conclusion, the results of the presented study propose the usage of a protein pattern, consisting of a combination of decreased ESD, ST1A1 and NIT2, increased PRDX1 as well as reduced phosphorylation of CAT instead of a single protein to be used as biomarker for cholangiocarcinogenesis and for prognostic purposes.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abreu R de S, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C (2009): Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* 5, 1512–1526
- Arni P (1989): Review on the genotoxic activity of thioacetamide. *Mutat Res Genet Toxicol* 221, 153–162
- Bolt HM, Morfeld P (2013): New results on formaldehyde: the 2nd International Formaldehyde Science Conference (Madrid, 19-20 April 2012). *Arch Toxicol* 87, 217–222
- Bousette N, Gramolini AO, Kislinger T (2008): Proteomics-based investigations of animal models of disease. *Proteomics Clin Appl* 2, 638–653
- 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
- Brodehl J (1961): Thioacetamid in der experimentellen Leberforschung. *Klin Wochenschr* 39, 956–962
- Cai CY, Zhai LL, Wu Y, Tang ZG (2015): Expression and clinical value of peroxiredoxin-1 in patients with pancreatic cancer. *Eur J Surg* 41, 228–235
- Campbell DJW, Dumur CI, Lamour NF, DeWitt JL, Sirica AE (2012): Novel Organotypic Culture Model of Cholangiocarcinoma Progression. *Hepato Res* 42, 1119–1130
- Cancer Statistics Review, 1975-2011 - SEER Statistics. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2011/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/); Zugriff am 26.08.2014
- Cao J, Schulte J, Knight A, Leslie NR, Zagodzoon A, Bronson R, Manevich Y, Beeson C, Neumann CA (2009): Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity. *EMBO J* 28, 1505–1517
- Chieli E, Malvaldi G (1984): Role of the microsomal fad-containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide S-oxide. *Toxicology* 31, 41–52
- Childs JF, Siegler EA (1945): Compounds for Control of Orange decays. *Science* 102, 68
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156–159
- Ciechanover A (2007): Intracellular protein degradation from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and on to human diseases and drug targeting: Nobel Lecture, December 8, 2004. *Ann N Y Acad Sci* 1116, 1–28
- Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ (1994): Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepato Baltim Md* 19, 1513–1520
- Drenckhahn D: Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band1: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. 17. durchgesehene Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2008

- El-Khoueiry AB, Rankin CJ, Ben-Josef E, Lenz H-J, Gold PJ, Hamilton RD, Govindarajan R, Eng C, Blanke CD (2012): SWOG 0514: A phase II study of sorafenib in patients with unresectable or metastatic gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma. *Invest New Drugs* 30, 1646–1651
- Eravci M, Fuxius S, Broedel O, Weist S, Eravci S, Mansmann U, Schluter H, Tiemann J, Baumgartner A (2007): Improved comparative proteome analysis based on two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 7, 513–523
- Fan B, Malato Y, Calvisi DF, Naqvi S, Razumilava N, Ribback S, Gores GJ, Dombrowski F, Evert M, Chen X, Willenbring H (2012): Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *J Clin Invest* 122, 2911–2915
- Fuxius S, Eravci M, Broedel O, Weist S, Mansmann U, Eravci S, Baumgartner A (2008): Technical strategies to reduce the amount of „false significant“ results in quantitative proteomics. *Proteomics* 8, 1780–1784
- Gamage NU, Duggleby RG, Barnett AC, Tresillian M, Latham CF, Liyou NE, McManus ME, Martin JL (2003): Structure of a Human Carcinogen-converting Enzyme, SULT1A1 Structural and Kinetic Implications of Substrate Inhibition. *J Biol Chem* 278, 7655–7662
- Geynisman DM, Catenacci DVT (2012): Toward Personalized Treatment of Advanced Biliary Tract Cancers. *Discov Med* 14, 41–57
- Ghazalpour A, Bennett B, Petyuk VA, Orozco L, Hagopian R, Mungrue IN, Farber CR, Sinsheimer J, Kang HM, Furlotte N, et al. (2011): Comparative Analysis of Proteome and Transcriptome Variation in Mouse. *PLoS Genet* 7, e1001393
- Glickman MH, Ciechanover A (2002): The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol Rev* 82, 373–428
- Glorieux C, Auquier J, Dejeans N, Sid B, Demoulin J-B, Bertrand L, Verrax J, Calderon PB (2014): Catalase expression in MCF-7 breast cancer cells is mainly controlled by PI3K/Akt/mTor signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 89, 217–223
- Grant HC, Rees KR (1958): The precancerous liver; correlations of histological and biochemical changes in rats during prolonged administration of thioacetamide and butter yellow. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a biological character. G B* 148, 117–136
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999): Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol Cell Biol* 19, 1720–1730
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R (2000): Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9390–9395
- Harms N, Ras J, Reijnders WN, van Spanning RJ, Stouthamer AH (1996): S-formylglutathione hydrolase of *Paracoccus denitrificans* is homologous to human esterase D: a universal pathway for formaldehyde detoxification? *J Bacteriol* 178, 6296–6299
- Hatfield MJ, Wierdl M, Wadkins RM, Potter PM (2008): Modifications of human carboxylesterase for improved prodrug activation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4, 1153–1165
- Hoshino I, Matsubara H, Akutsu Y, Nishimori T, Yoneyama Y, Murakami K, Sakata H, Matsushita K, Ochiai T (2007): Tumor suppressor Prdx1 is a prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma patients. *Oncol Rep* 18, 867–871

- Huang Y, Zitta K, Bein B, Steinfath M, Albrecht M (2013): An insert-based enzymatic cell culture system to rapidly and reversibly induce hypoxia: investigations of hypoxia-induced cell damage, protein expression and phosphorylation in neuronal IMR-32 cells. *Dis Model Mech* 6, 1507–1514
- Huber LA (2003): Is proteomics heading in the wrong direction? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 74–80
- Hunter AL, Holscher MA, Neal RA (1977): Thioacetamide-induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J Pharmacol Exp Ther* 200, 439–448
- Hunter T (2000): Signaling--2000 and beyond. *Cell* 100, 113–127
- Jeon YE, Lee SC, Paik SS, Lee KG, Jin SY, Kim HR, Yoo CW, Park HM, Han SY, Choi DH, Kim HK (2011): Histology-directed matrix-assisted laser desorption/ionization analysis reveals tissue origin and p53 status of primary liver cancers. *Pathol Int* 61, 449–455
- Jiang H, Wu L, Mishra M, Chawsheen HA, Wei Q (2014): Expression of peroxiredoxin 1 and 4 promotes human lung cancer malignancy. *Am J Cancer Res* 4, 445–460
- Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Wongpoomchai R, Chusiri Y, Gonzalez FJ, Fukushima S (2008): Role of CYP2E1 in thioacetamide-induced mouse hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 228, 295–300
- Khan SA, Emadossadaty S, Ladeb NG, Thomas HC, Elliott P, Taylor-Robinson SD, Toledano MB (2012): Rising trends in cholangiocarcinoma: is the ICD classification system misleading us? *J Hepatol* 56, 848–854
- Ko KS, Peng J, Yang H (2013): Animal models of cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 29, 312–318
- Koen YM, Sarma D, Hajovsky H, Galeva NA, Williams TD, Staudinger JL, Hanzlik RP (2013): Protein Targets of Thioacetamide Metabolites in Rat Hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 26, 564–574
- Kolligs FT, Zech CJ, Schönberg SO, Schirra J, Thasler W, Graeb C, Beuers U, Wilkowski R, Jacobs T, Böck S, et al. (2008): [Interdisciplinary diagnosis of and therapy for cholangiocarcinoma]. *Z Für Gastroenterol* 46, 58–68
- Krasnikov BF, Chien C-H, Nostramo R, Pinto JT, Nieves E, Callaway M, Sun J, Huebner K, Cooper AJL (2009): Identification of the putative tumor suppressor Nit2 as  $\gamma$ -amidase, an enzyme metabolically linked to glutamine and asparagine transamination. *Biochimie* 91, 1072–1080
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
- Lankisch TO, Metzger J, Negm AA, Voßkuhl K, Schiffer E, Siwy J, Weismüller TJ, Schneider AS, Thedieck K, Baumeister R, et al. (2011): Bile proteomic profiles differentiate cholangiocarcinoma from primary sclerosing cholangitis and choledocholithiasis. *Hepatology* 53, 875–884
- Lee EY, Lee WH (1986): Molecular cloning of the human esterase D gene, a genetic marker of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6337–6341
- Lim JH, Park CK (2004): Pathology of cholangiocarcinoma. *Abdom Imaging* 29, 540–547

- Lin C-H, Chung M-Y, Chen W-B, Chien C-H (2007): Growth inhibitory effect of the human NIT2 gene and its allelic imbalance in cancers. *FEBS J* 274, 2946–2956
- Liu NQ, Stingl C, Look MP, Smid M, Braakman RBH, De Marchi T, Sieuwerts AM, Span PN, Sweep FCGJ, Linderholm BK, et al. (2014): Comparative proteome analysis revealing an 11-protein signature for aggressive triple-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 106, djt376
- Low TY, Leow CK, Salto-Tellez M, Chung MCM (2004): A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. *PROTEOMICS* 4, 3960–3974
- Luhn S, Berth M, Hecker M, Bernhardt J (2003): Using standard positions and image fusion to create proteome maps from collections of two-dimensional gel electrophoresis images. *Proteomics* 3, 1117–1127
- Lyon RC, Johnston SM, Watson DG, McGarvie G, Ellis EM (2007): Synthesis and Catabolism of  $\gamma$ -Hydroxybutyrate in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells ROLE OF THE ALDO-KETO REDUCTASE AKR7A2. *J Biol Chem* 282, 25986–25992
- Maier T, Güell M, Serrano L (2009): Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett* 583, 3966–3973
- Malhi H, Gores GJ (2006): Cholangiocarcinoma: Modern advances in understanding a deadly old disease. *J Hepatol* 45, 856–867
- Mansuroglu T, Ramadori P, Dudás J, Malik I, Hammerich K, Füzesi L, Ramadori G (2009): Expression of stem cell factor and its receptor c-Kit during the development of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Lab Invest* 89, 562–574
- Meng D, Yuan M, Li X, Chen L, Yang J, Zhao X, Ma W, Xin J (2013): Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer Amst Neth* 81, 1–10
- Metzger J, Negm AA, Plentz RR, Weismüller TJ, Wedemeyer J, Karlsen TH, Dakna M, Mullen W, Mischak H, Manns MP, Lankisch TO (2013): Urine proteomic analysis differentiates cholangiocarcinoma from primary sclerosing cholangitis and other benign biliary disorders. *Gut* 62, 122–130
- Meyer HE, Hamacher M (2006): Quintessence from proteomics networks--the HUPO Brain Proteome Project Pilot Studies. *Proteomics* 6, 4887–4889
- Mu ZM, Yin XY, Prochownik EV (2002): Pag, a Putative Tumor Suppressor, Interacts with the Myc Box II Domain of c-Myc and Selectively Alters Its Biological Function and Target Gene Expression. *J Biol Chem* 277, 43175–43184
- Nakanuma Y, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Xu J, Ikeda H (2010): Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. *World J Hepatol* 2, 419–427
- Nault J-C, Zucman-Rossi J (2011): Genetics of hepatobiliary carcinogenesis. *Semin Liver Dis* 31, 173–187
- Neumann CA, Cao J, Manevich Y (2009): Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle* 8, 4072–4078
- O'Farrell PH (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007–4021

- Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H (2003): Demystified...tissue microarray technology. *Mol Pathol MP* 56, 198–204
- Parathath S, Dogan S, Joaquin VA, Ghosh S, Guo L, Weibel GL, Rothblat GH, Harrison EH, Fisher EA (2011): Rat Carboxylesterase ES-4 Enzyme Functions as a Major Hepatic Neutral Cholesteryl Ester Hydrolase. *J Biol Chem* 286, 39683–39692
- Park J, Kim M-H, Kim K, Park DH, Moon S-H, Song TJ, Eum J, Lee SS, Seo DW, Lee SK (2009): Natural History and Prognostic Factors of Advanced Cholangiocarcinoma without Surgery, Chemotherapy, or Radiotherapy: A Large-Scale Observational Study. *Gut Liver* 3, 298–305
- Praml C, Schulz W, Claas A, Mollenhauer J, Poustka A, Ackermann R, Schwab M, Henrich K-O (2008): Genetic variation of Aflatoxin B1 aldehyde reductase genes (AFAR) in human tumour cells. *Cancer Lett* 272, 160–166
- Quan C, Cha E-J, Lee H-L, Han KH, Lee KM, Kim W-J (2006): Enhanced expression of peroxiredoxin I and VI correlates with development, recurrence and progression of human bladder cancer. *J Urol* 175, 1512–1516
- Rafikov R, Kumar S, Aggarwal S, Hou Y, Kangath A, Pardo D, Fineman JR, Black SM (2014): Endothelin-1 stimulates catalase activity through the PKC $\delta$ -mediated phosphorylation of serine 167. *Free Radic Biol Med* 67, 255–264
- Razumilava N, Gores GJ (2014): Cholangiocarcinoma. *Lancet* 383, 2168–2179
- Recktenwald CV, Kellner R, Lichtenfels R, Seliger B (2008): Altered Detoxification Status and Increased Resistance to Oxidative Stress by K-Ras Transformation. *Cancer Res* 68, 10086–10093
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005): Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38, 1543–1552
- Roskams T (2006): Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* 25, 3818–3822
- Santos AD, Court M, Thiers V, Sar S, Guettier C, Samuel D, Br  chot C, Garin J, Demaugre F, Masselon CD (2010): Identification of Cellular Targets in Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma Using Laser Microdissection and Accurate Mass and Time Tag Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 9, 1991–2004
- Sarma D, Hajovsky H, Koen YM, Galeva NA, Williams TD, Staudinger JL, Hanzlik RP (2012): Covalent Modification of Lipids and Proteins in Rat Hepatocytes, and In Vitro, by Thioacetamide Metabolites. *Chem Res Toxicol* 25, 1868–1877
- Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M (2011): Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342
- Sen S, Kawahara B, Chaudhuri G (2012): Maintenance of higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, and its mechanism of action to induce growth in breast cancer cells: important roles of bioactive catalase and PP2A. *Free Radic Biol Med* 53, 1541–1551
- Shaib Y, El-Serag HB (2004): The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 24, 115–125
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850–858

- Sirica AE, Dumur CI, Campbell DJW, Almenara JA, Ogunwobi OO, Dewitt JL (2009): Intrahepatic Cholangiocarcinoma Progression: Prognostic Factors and Basic Mechanisms. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* 7, S68–S78
- Sonntag J, Bender C, Soons Z, der Heyde S von, König R, Wiemann S, Sinn H-P, Schneeweiss A, Reißbarth T, Korf U (2014): Reverse phase protein array based tumor profiling identifies a biomarker signature for risk classification of hormone receptor-positive breast cancer. *Transl Proteomics* 2, 52–59
- Srinivasan H, Allory Y, Sill M, Vordos D, Alhamdani MSS, Radvanyi F, Hoheisel JD, Schröder C (2014): Prediction of recurrence of non muscle-invasive bladder cancer by means of a protein signature identified by antibody microarray analyses. *Proteomics* 14, 1333–1342
- Srisomsap C, Sawangareetrakul P, Subhasitanont P, Panichakul T, Keeratichamroen S, Lirdprapamongkol K, Chokchaichamnankit D, Sirisinha S, Svasti J (2004): Proteomic analysis of cholangiocarcinoma cell line. *Proteomics* 4, 1135–1144
- Staňková P, Kučera O, Lotková H, Roušar T, Endlicher R, Červinková Z (2010): The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro. *Toxicol In Vitro* 24, 2097–2103
- Sun Y-L, Cai J-Q, Liu F, Bi X-Y, Zhou L-P, Zhao X-H (2015): Aberrant expression of peroxiredoxin 1 and its clinical implications in liver cancer. *World J Gastroenterol* 21, 10840–10852
- Takeuchi A, Miyamoto T, Yamaji K, Masuho Y, Hayashi M, Hayashi H, Onozaki K (1995): A Human Erythrocyte-derived Growth-promoting Factor with a Wide Target Cell Spectrum: Identification as Catalase. *Cancer Res* 55, 1586–1589
- Tyson GL, El-Serag HB (2011): Risk Factors of Cholangiocarcinoma. *Hepatol Baltim Md* 54, 173–184
- Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthony A, Maraveyas A, Madhusudan S, Iveson T, Hughes S, Pereira SP, et al. (2010): Cisplatin plus Gemcitabine versus Gemcitabine for Biliary Tract Cancer. *N Engl J Med* 362, 1273–1281
- Vetrano AM, Heck DE, Mariano TM, Mishin V, Laskin DL, Laskin JD (2005): Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Catalase. *J Biol Chem* 280, 35372–35381
- Vogel C, Marcotte EM (2012): Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 13, 227–232
- Weiss W, Görg A (2009): High-resolution two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 564, 13–32
- Welzel TM, Mellekjaer L, Gloria G, Sakoda LC, Hsing AW, Ghormli LE, Olsen JH, McGlynn KA (2007): Risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma in a low-risk population: A nationwide case-control study. *Int J Cancer* 120, 638–641
- Wiedl T, Arni S, Roschitzki B, Grossmann J, Collaud S, Soltermann A, Hillinger S, Aebersold R, Weder W (2011): Activity-based proteomics: identification of ABHD11 and ESD activities as potential biomarkers for human lung adenocarcinoma. *J Proteomics* 74, 1884–1894
- Xiao J, Zheng Y, Zhou Y, Zhang P, Wang J, Shen F, Fan L, Kolluri VK, Wang W, Yan X, Wang M (2014): Sulfotransferase SULT1A1 Arg213His Polymorphism with Cancer Risk: A Meta-Analysis of 53 Case-Control Studies. *PLoS ONE* 9

- Yamaguchi N, Morioka H, Ohkura H, Hirohashi S, Kawai K (1985): Establishment and characterization of the human cholangiocarcinoma cell line HChol-Y1 in a serum-free, chemically defined medium. *J Natl Cancer Inst* 75, 29–35
- Yanagawa T, Omura K, Harada H, Ishii T, Uwayama J, Nakaso K, Iwasa S, Koyama Y, Onizawa K, Yusa H, Yoshida H (2005): Peroxiredoxin I expression in tongue squamous cell carcinomas as involved in tumor recurrence. *Int J Oral Maxillofac Surg* 34, 915–920
- Yeh C-N, Maitra A, Lee K-F, Jan Y-Y, Chen M-F (2004): Thioacetamide-induced intestinal-type cholangiocarcinoma in rat: an animal model recapitulating the multi-stage progression of human cholangiocarcinoma. *Carcinogenesis* 25, 631–636
- Yeo M, Na YM, Kim DK, Kim YB, Wang HJ, Lee JA, Cheong JY, Lee KJ, Paik Y-K, Cho SW (2010): The loss of phenol sulfotransferase 1 in hepatocellular carcinogenesis. *Proteomics* 10, 266–276
- Yonglitthipagon P, Pairojkul C, Chamgramol Y, Loukas A, Mulvenna J, Bethony J, Sripa B (2012): Prognostic significance of peroxiredoxin 1 and ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 in cholangiocarcinoma. *Hum Pathol* 43, 1719–1730
- Yoon J-H, Canbay AE, Werneburg NW, Lee SP, Gores GJ (2004): Oxysterols induce cyclooxygenase-2 expression in cholangiocytes: implications for biliary tract carcinogenesis. *HepatoL Baltim Md* 32, 732–738
- Zabron A, Edwards RJ, Khan SA (2013): The challenge of cholangiocarcinoma: dissecting the molecular mechanisms of an insidious cancer. *Dis Model Mech* 6, 281–292



## **7 Anhang**

### **7.1 Spotratrios aller 2DE-Gele**

Spotratios jedes einzelnen gemessenen Spots. Mit Spotlabel in der Originalauswertung. Der Spotnummer der analysierten Proteine. Bezeichnung der einzelnen Tiere. Rot: Mehr als 50 % reduziert. Orange: weniger als 50 % verändert. Grün: Mehr als 50 % vermehrt.



Silber	Fused / 03																			
	user defined label `Fused` Spotnummer																			
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Kontrolle	0-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0-0	0,82223	1,18138	0,91757	0,78538	0,9743	0,97285	0,70533	0,94309	0,61437	0,80411									
	0-2	0,94735	1,33496	1,03218	0,94847	0,88693	0,95998	0,79441	1,10836	0,70709	0,8305									
	1-1	0,21494	0,18872	0,56167	0,39931	0,53805	3,32048	1,86335	0,45143	0,37646	1,61107									
	2-4	0,01522	0,29207	0,33648	0,3364	0,23047	3,35946	1,67388	0,53914	0,3239	0,41997									
	2-0	0,34706	0,19597	0,52746	0,55727	0,53662	3,25405	2,26009	0,59269	0,23556	1,95402									
Fibrose	3-0	0,76303	0,62647	0,49593	0,4263	0,7362	2,60626	1,55868	0,57385	0,06573	1,68946									
	1-0	0,70865	0,31007	0,49861	0,31333	0,39974	2,45517	1,07213	0,73578	0,48709	1,17506									
	4-3	0,62707	0,35404	0,60432	0,43585	0,54827	2,24561	1,50438	0,54674	0,40355	1,30736									
	4-2	0,81502	0,61922	0,73291	0,60527	0,64052	3,12281	1,52877	0,63303	0,44252	1,5371									
	5-0	0,63757	0,32031	0,50106	0,22158	0,55278	2,11353	0,88548	0,44444	0,23093	0,96386									
	1-2	0,39859	0,32734	0,50257	0,38248	0,63947	2,3115	1,78395	0,49962	0,27861	1,62622									
Zirrrose	5-1	0,90302	0,75065	0,44067	0,46198	0,69083	2,16625	1,5779	0,58263	0,35953	2,11155									
	3-3	0,41915	0,24403	0,5213	0,44712	0,54384	1,90529	1,36842	0,78727	0,30308	1,32504									
	2-2	0,83258	1,08373	0,75436	0,78522	0,83117	1,888	1,67102	0,77426	0,55463	1,40723									
	3-2	0,70787	0,34082	0,55741	0,36641	0,64719	2,71212	1,8463	0,54268	0,32501	1,73754									
	5-3	0,31108	0,22558	0,59509	0,26824	0,60561	0,31755	1,82973	0,49446	0,27529	1,94348									
	4-1	1,13971	0,23763	0,92727	0,3096	0,74812	2,84375	1,91003	0,48574	0,71092	2,60441									
Tumor	2-1	0,73834	0,55753	0,48461	0,29565	0,77489	2,93215	1,43495	0,44975	0,18759	1,69773									
	2-3	0,42714	0,53263	0,5768	0,30714	0,63193	1,25622	1,26724	0,62117	0,32024	2,05043									
	5-2	0,74695	0,7374	0,56546	0,75206	0,88894	2,02587	1,02532	0,72245	0,54913	1,40482									

Silber	Fused / 03										
	user defined label 'Fused'										
	Spotnummer										
Kontrolle	0-3	1,90379	1,58383	0,65629	0,7685	2,13889	0,5855	0,80478	0,52227	0,61844	0,58218
	0-0	685	253	903	633	636	260	904	1023	641	280
	0-2	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Fibrose	0-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0-0	0,73892	1,03918	0,72373	0,73251	1,11126	1,19054	1,22674	1,22868	1,06014	0,73961
	0-2	0,97195	1,33792	0,73177	0,82314	0,79971	1,22889	1,24067	1,0899	0,62892	0,72297
	1-1	1,87635	2,19979	0,23548	0,22558	1,84071	0,30993	0,51593	0,29164	0,38214	0,67312
	2-4	1,85589	3,26793	0,28616	0,07171	1,31359	0,15941	0,47807	0,48279	0,45655	0,17875
	2-0	2,17623	2,01761	0,19143	0,25023	1,69571	0,21629	0,47268	0,49297	0,35889	0,55325
beginnende Zirrhose	3-0	2,18336	2,36363	0,13062	0,29307	1,98859	0,28112	0,40635	0,3731	0,6763	0,40379
	1-0	1,77687	1,95966	0,0946	0,14843	1,34063	0,13114	0,58113	0,53259	0,35257	0,42947
	4-3	2,33863	1,35906	0,20541	0,22613	1,56848	0,36659	0,62428	0,50799	0,8101	0,65267
	4-2	2,03229	1,5406	0,35423	0,34726	1,14812	0,27234	0,79094	0,78351	0,6286	0,38589
	5-0	2,10208	1,99211	0,15229	0,23168	1,25343	0,32895	0,90726	0,6284	0,22898	0,31787
	1-2	2,34736	2,05279	0,3337	0,67608	2,32541	0,30116	0,75044	0,39571	0,19469	0,3941
Zirrhose	5-1	2,00779	1,98499	0,39112	0,38568	1,88709	0,20682	0,6513	0,6132	0,22155	0,66992
	3-3	2,43801	1,68608	0,48819	0,41663	1,84798	0,39408	0,68352	0,43186	0,49434	0,70181
	2-2	1,37915	2,3072	0,57052	0,5949	2,78733	0,55153	0,71879	0,39188	0,42969	0,5152
	3-2	1,80396	2,28245	0,41711	0,83935	2,29001	0,3326	0,45668	0,46269	0,14205	0,3916
	5-3	1,62936	2,57351	0,40196	0,39177	2,28973	0,22476	0,77483	0,44234	0,31639	0,42706
	4-1	1,61919	2,13748	0,29002	0,65843	2,3352	0,12782	0,55478	0,37208	0,35668	0,16373
	2-1	1,99179	3,36946	0,28851	0,09524	1,50074	0,10746	0,47094	0,5076	0,20857	0,38655
	2-3	1,53449	2,45015	0,62832	1,42559	2,43459	0,52037	0,86443	0,01077	0,61559	0,42714
Tumor	5-2	1,58534	2,31998	0,43839	0,84999	1,95023	0,63626	0,78864	0,39574	0,67032	0,3432



Phospho	Fused / 03										1,67122
	user defined label 'Fused'										
	Spotnummer										
Kontrolle	0-3	1	16	17	18	27	1,94336	1,77827	0,33821	1,01497	1,67122
	0-0	0,82094	1,05766	1,11953	1,24748	1,19306	0,76218	1,13793	0,75954	0,67538	1,06758
	0-2	0,87731	1,00904	0,82504	1,16533	0,96867	0,67384	0,9206	0,82837	0,67185	1,10109
Fibrose	1-1	0,14078	3,11739	1,60034	0,11484	0,27511	1,56823	1,44364	0,35118	0,9847	1,28991
	2-4	0,10896	2,97122	1,7024	0,08121	0,2297	1,52013	2,00083	0,31203	0,74129	0,84242
	2-0	0,11451	3,52428	1,68127	0,14191	0,15931	1,42852	2,17361	0,4306	0,6782	1,07332
beginnende Zirrhose	3-0	0,10116	2,9587	1,37111	0,26952	0,29687	1,86872	1,67437	0,49311	1,04246	2,03152
	1-0	0,13388	2,02282	0,89538	0,28244	0,35985	1,78729	1,22269	0,67134	0,81045	1,16099
	4-3	0,20297	2,25497	1,61617	0,2229	0,39328	1,59297	2,20406	0,51086	1,37623	1,40262
	4-2	0,23249	2,36861	1,15814	0,18937	0,55878	1,98288	0,62931	0,97954	0,81351	1,24805
	5-0	0,21329	2,81774	1,86251	0,31992	0,61352	1,5568	1,57876	0,58233	0,90747	1,09535
Zirrhose	1-2	0,18969	2,29934	1,42208	0,12246	0,2362	1,52812	1,82791	0,40761	1,37442	1,65559
	5-1	0,23423	1,7419	1,17779	0,30943	0,337	2,05	1,71995	0,7431	0,95245	1,28554
	3-3	0,24518	2,4355	1,18886	0,17267	0,20151	1,73352	1,62513	0,53169	1,01408	1,37196
	2-2	0,54968	2,07001	1,45347	0,06865	0,47899	1,21142	1,11637	0,41597	1,81715	2,31762
	3-2	0,24222	3,30355	1,74743	0,07959	0,14103	0,90003	2,39637	0,42916	1,80077	1,62486
	5-3	0,22357	1,0097	1,72348	0,13012	0,29344	0,13708	3,04439	0,50745	0,78041	1,50414
	4-1	0,10969	2,41542	1,25121	0,23896	0,22348	0,85654	1,42297	0,5272	1,28052	2,39051
Tumor	2-1	0,08057	3,49259	1,33568	0,20005	0,17001	1,56168	1,50844	0,46978	1,42563	1,47598
	2-3 X	0,26646	1,73426	1,29848	0,13183	0,20112	1,30292	0,87657	0,37906	1,48439	1,66552
	5-2	0,73737	2,14024	1,40039	0,36395	0,75382	1,07977	1,29229	0,44035	1,57015	1,56949

Phospho	Fused / 03												
	user defined label 'Fused'												
	Spotnummer												
Kontrolle	0-3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0-0	1,02547	1,14694	1,18639	0,74338	1,38138	0,27413	0,33441	0,32063	0,39519	0,46194		
	0-2	0,92172	1,08855	403	448	410	443	435	452	478	483		
Fibrose	1-1	0,3581	1,85195	1,18639	0,74338	1,38138	0,27413	0,33441	0,32063	0,39519	0,46194		
	2-4	0,48294	1,34561	403	448	410	443	435	452	478	483		
	2-0	0,25333	1,7974	1,08855	0,78662	1,06249	0,70398	1,00204	0,99189	1,10597	1,21997		
beginnende Zirrhose	3-0	0,42745	0,4652	1,30587	0,41748	1,6406	0,0393	0,37462	0,61346	0,29497	0,38929		
	1-0	0,34329	0,3474	1,10243	0,66582	1,52346	0,05632	0,74741	0,77775	0,5808	0,4888		
	4-3	0,38506	0,28777	1,62207	0,43137	2,25402	0	0,48646	0,59358	0,48703	0,54019		
	4-2	0,4059	0,23165	1,09765	0,68298	1,74738	0,13645	0,32622	0,94546	0,35829	0,5039		
	5-0	0,50115	0,56503	1,65128	0,70047	1,93777	0,41856	0,70401	0,52591	0,46881	0,46304		
Zirrhose	1-2	0,31127	0,29054	1,47027	0,56848	0,70334	0,09861	0,30783	0,40649	0,37435	0,37748		
	5-1	0,3887	0,4549	1,0246	0,55014	1,67308	0,19415	0,65634	0,98643	0,50718	0,63642		
	3-3	0,41705	0,61559	1,18397	0,66137	1,15755	0,33407	0,80251	0,5502	0,48423	0,54459		
	2-2	0,48272	0,42148	1,03007	0,55577	0,59094	0,2473	0,45867	0,45356	0,52806	0,7058		
	3-2	0,32414	0,32698	2,12196	0,52865	1,68756	0,00123	0,33848	0,33166	0,35097	0,40502		
Tumor	5-3	0,36886	0,37317	0,81664	0,50777	1,55367	0,12683	0,39969	0,41085	0,4979	0,44826		
	4-1	0,37531	0,39404	1,29974	0,5093	1,22059	0,17382	0,16774	0,56064	0,26626	0,3187		
	2-1	0,28024	0,54529	1,80336	0,36877	1,1612	0,29461	0,21444	0,45087	0,29567	0,28174		
2-3 X		0,42264	0,51931	1,94467	0,48204	1,32443	0,21144	0,59488	0,42303	0,3829	0,56451		
	5-2	0,49442	0,60817	1,49694	0,89429	0,60067	0,43346	0,57146	0,57977	0,62284	0,73992		

Phospho	Fused / 03 user defined label 'Fused' Spotnummer	1,16035		0,76751		0,32283		0,4671		0,33169	
		592		624		652		676		737	
		P16		P17		P18		P19		P20	
Kontrolle	0-3	1		1		1		1		1	
	0-0	1,14517		1,22116		0,92029		1,1521		0,8787	
	0-2	1,23417		1,313		1,26797		1,10449		0,90101	
Fibrose	1-1	1,58575		0,35432		0,29546		0,56141		0,69077	
	2-4	1,42637		0,56655		0,06786		0,23152		0,53123	
	2-0	1,7893		0,43406		0,23132		0,4401		0,50957	
beginnende Zirrhose	3-0	1,45797		0,15735		0,48159		0,59004		0,59933	
	1-0	1,00992		0,49385		0,79429		0,59484		0,81336	
	4-3	1,84497		0,6544		0,55264		0,80843		0,94448	
Zirrhose	4-2	1,41984		0,62422		0,86247		0,53339		0,82726	
	5-0	1,3149		0,95556		0,68865		0,70542		0,48728	
	1-2	1,27551		0,61852		0,32512		0,31235		0,58898	
Tumor	5-1	0,93842		0,51791		0,92043		0,52545		0,83375	
	3-3	1,31464		0,55499		0,45098		0,70463		0,67481	
	2-2	1,53175		1,16742		0,37949		0,54399		0,62332	
Tumor	3-2	1,37994		0,58788		0,2198		0,32515		0,24185	
	5-3	1,85643		0,67227		0,26459		0,67579		0,43617	
	4-1	1,3011		0,31776		0,76615		0,74283		0,71904	
Tumor	2-1	1,52793		0,24224		0,40804		0,52263		0,50751	
	2-3 X	1,96873		0,74212		0,17253		0,10483		0,36	
	5-2	1,64089		1,24482		0,24733		0,22979		0,34473	



## 7.2 Identifizierte Proteine mit Funktion

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Protein Molekulargewichtt Da /kDa	iP	Funktion
1	Dimethylglycine dehydrogenase precursor, isoform CRA_b downregulated <a href="#">Q5RKL4</a>	95977.39 / 90	6,77 / 6,9	Katalysiert N,N-Dimethylglycin zusammen mit einem Akzeptor und Wasser zu N-Methylglycin (Sarcosin), Formaldehyd und reduziertem Akzeptor  Metabolismus von Glycin, Serin und Threonin
2	Radixin downregulated <a href="#">Q5WQV5</a> <a href="#">Q5POK5</a>	68571.82 / 85 68543.81 / 85	5,95 / 7,0 5,95 / 7,0	Verbindet möglicherweise Aktinfilamente mit der Plasmamembran
3	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">Q5I0C3</a>	74908.39 / 80	6,21 / 7,3	Katalysiert ATP mit 3-Methylcrotonoyl-CoA und Bicarbonat zu ADP, Phosphat und 3-Methylglutaconyl-CoA
3	Lamin A, isoform CRA_b [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">P48679</a>	73992.27 / 80	6,54 / 7,3	Bestandteil der inneren Kernmembran. Mitverantwortung für Kernentwicklung, Chromatinorganisation.  Kann glatte Muskelzellen vorzeitig altern lassen.
4	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">P18163</a>	78178.68 / 80	6,60 / 7,6	Aktiviert langkettige Fettsäuren sowohl für die Synthese zellulärer Lipide, wie auch für den eigenen Abbau
5	Urocanase domain containing 1 [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">D3ZIC2</a>	74687.30 / 72	6,58 / 7,8	Histidinkatabolismus: Abbau von Urocanat zu Hydroxy-Imidazol-Propionat
6	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">Q68F17</a>	65651.27 / 75	6,63 / 8,0	Verknüpft Phenylalanin mit der entsprechenden tRNA
6	Urocanase domain containing 1 [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">D3ZIC2</a>	74687.30 / 75	6,58 / 8,0	Histidinkatabolismus: Abbau von Urocanat zu Hydroxy-Imidazol-Propionat
7	Acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain, isoform CRA_a [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">P97562</a> <a href="#">E1LNW3</a>	82.960,70 / 72 76746.77 / 72	7,64 / 8,6 7,63 / 8,6	Katalysiert Dehydrierung von (25R)-3-alpha,7-alpha,12-alpha-trihydroxy-5-beta-cholestan-26-oyl-CoA und Wasser mit einem Akzeptor zu (24R,25R)-3-alpha,7-alpha,12-alpha,24-tetrahydroxy-5-beta-cholestan-26-oyl-CoA und dem reduziertem Akzeptor (Gallensäuremetabolismus)
7	Similar to hypothetical protein FLJ21963 (predicted), isoform CRA_b [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">D3ZDV3</a>	74675.20 / 72	8,83 / 8,6	hypothetical protein

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Protein Molekulargewicht Da / kDa	iP	Funktion
8	Solute carrier family 25, member 13 (citrin) [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">F1LZW6</a>	74382.84 / 70	8,86 / 9,2	Austausch von Aspartat gegen Glutamat und ein Proton über die innere Mitochondrienmembran
8	APOBEC1 complementation factor [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">Q923K9</a>	65619.85 / 70	8,81 / 9,2	Editing der ApoB-RNA (Einführung eines Stoppcodons)
9	Bucs1 protein [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">B5DFA3</a>	65357.04 / 67	7,57 / 7,4	Katalysiert ATP mit Fettsäure und CoA zu AMP, Diphosphat und Acyl-CoA
9	Stress-induced-phosphoprotein 1 [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">Q35814</a>	62570.10 / 67	6,40 / 7,4	Vermittelt die Verknüpfung der Chaperone Hsc70 und Hsp90
10	Liver carboxylesterase 4 precursor [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">Q64573</a>	60360.00 / 60	6,31 / 7,2	Entgiftung von Xenobiotika
10	Glutaminase 2 (liver, mitochondrial), isoform CRA_a [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">P28492</a>	64660.85 / 60	6,64 / 7,2	Katalysiert L-Glutamin mit Wasser zu L-Glutamat und Ammoniak
11	Aldehyde dehydrogenase family 5, subfamily A1 [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">P51650</a>	52188.67 / 50	6,40 / 7,5	Abbau von GABA
12	Homogentisate 1, 2-dioxygenase [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">Q6AYR0</a>	49899.91 / 46	6,67 / 8,0	Umbau von Homogentisat zu 4-Maleylacetoacetat (Abbau von Tyrosin und Phenylalanin)
13	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">P18163</a>	78178.68 / 40	6,60 / 4,4	Aktivierung von Fettsäuren für Synthese von Membranlipiden oder für $\beta$ -Oxidation
14	Fructose-1,6-bisphosphatase 1 [Rattus norvegicus] downregulated (also in phospho) <a href="#">P19112</a>	39478.17 / 39	5,54 / 5,0	Fructose-1,6-bisphosphat+Wasser zu Fructose-6-phosphat und Phosphat (Gluconeogenese)
15	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">Q5EBA9</a>	41720.98 / 41	5,64 / 5,6	GTP+Succinat+CoA zu GDP, Phosphat und Succinyl-CoA (reversibel, Citratzyklus)
15	Erlin-2 [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">B5DEH2</a>	37710.37 / 41	5,54 / 5,6	Vermittelt den Abbau am ER von Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor (ERAD-Pathway)

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Protein Molekulargewicht Da /kDa	iP	Funktion
16	Nucleophosmin [Rattus norvegicus] upregulated (also in phospho) <a href="#">P13084</a>	32560.07 / 36	4,62 / 4,3	Ribosomgenese Zentrosomverdopplung Proteintransport Histonzusammenlagerung Zellzykluskontrolle Regulation von p53 und ARF und APEX1
17	Elongation factor 1-delta [Rattus norvegicus] upregulated (also in phospho) <a href="#">Q68FR9</a>	31198.92 / 34	4,94 / 4,4	Proteinsynthese
18	Regucalcin [Rattus norvegicus] downregulated (also in phospho) <a href="#">Q03336</a>	33389.85 / 33	5,27 / 4,6	Unterdrückung von Ca-Signal Kontrolle des Zellzyklus Verringert Proteinsynthese Erhöht Cysteinprotease und Superoxid-Dismutase (Vitamin C-Synthese, Pentosephosphatweg)
19	Mu-crystallin homolog [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">Q9QYU4</a>	33554.25 / 34	5,34 / 4,8	Schilddrüsenhormonbindung
20	F-actin-capping protein subunit alpha-1 [Rattus norvegicus] upregulated <a href="#">B2GUZ5</a>	32778.58 / 34	5,44 / 5,2	Bindung am wachsenden Ende von Aktinfilamenten und Blockade weiteren Wachstums
21	Malate dehydrogenase, cytoplasmic [Rattus norvegicus] upregulated <a href="#">Q88989</a>	36351.92 / 33	6,16 / 6,0	Malat zu Oxalacetat (Citratzyklus, Gluconeogenese)
21	Delta-aminolevulinic acid dehydratase [Rattus norvegicus] upregulated <a href="#">P06214</a>	36031.59 / 33	6,31 / 6,0	Synthese von Tetrapyrrolringen (Hämoglobinsynthese)
22	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2 [Rattus norvegicus] upregulated <a href="#">Q8CG45</a>	40675.24 / 34	8,35 / 6,8	Schutz vor Aflatoxin B1 Umwandlung von Succinat Semialdehyd zu $\gamma$ -Hydroxybutansäure (Neurotransmitter)
23	Aryl sulfotransferase downregulated <a href="#">P17988</a>	33906.04 / 33	6,37 / 7,4	Phase-II-Enzyme der Biotransformation (Detoxifikation)
23	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">P23457</a>	37027.56 / 33	6,67 / 7,4	Androgen- und Estrogensynthese C21-Steroidsynthese (Gallensäureproduktion)

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Protein Molekulargewicht Da / kDa	iP	Funktion
24	Aspartoacylase-2 [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">Q5M876</a>	35419.32 / 31	5,42 / 5,2	Deacetylierung von Acylaspartat und Thioalkoholen
25	Chain A, Crystal Structure Analysis Of The Sodium-Bound Annexin A4 At 1.58 Å Resolution upregulated <a href="#">P55260</a>	35717.48 / 30	5,30 / 5,0	Membranfusion Exozytose
26	Sulfotransferase 1C1 [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">P50237</a>	35763.91 / 41	6,10 / 6,6	Sulfatierung von Xenobiotika und körpereigenen Stoffen (Aktivierung karzinogener Wirkung von Hydroxylaminen)
27	Aryl sulfotransferase downregulated (also in phospho) <a href="#">P17988</a>	33906.04 / 33	6,37 / 7,2	Phase-II-Enzyme der Biotransformation (Detoxifikation)
27	S-formylglutathione hydrolase [Rattus norvegicus] downregulated (also in phospho) <a href="#">B0BNE5</a>	31363.68 / 33	6,44 / 7,2	Detoxifikation von Formaldehyd
28	Chain A, Methyltransferase downregulated <a href="#">P13255</a>	32417.84 / 32	7,21 / 8,2	SAM+Glycin zu N-Methylglycin (Sarcosin) und S-adenosyl-L-homocysteine Regulation von SAM -Konzentration
28	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial precursor [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">P97519</a>	31402.51 / 32	7,50 / 8,2	Abbau von HMG-CoA Metabolismus von verzweigt-kettigen Aminosäuren (Leucin) Energiegewinnung aus Fetten und Aminosäuren
29	Estrogen sulfotransferase, isoform 2 [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">P52845</a> <a href="#">P49889</a>	35364.69 / 29 35415.74 / 29	5,57 / 5,4 5,57 / 5,4	Sulfatierung von Estrogen und Estradiol
30	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8, isoform CRA_b [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">Q6MGB5</a>	26790.60 / 29	6,10 / 6,7	Estradiol in Estron (reversibel) Synthese von Fettsäuren
30	Proteasome subunit alpha type-1 [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">P18420</a>	29517.50 / 29	6,14 / 6,7	Proteinabbau
31	L-xylulose reductase [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">Q920P0</a>	25719.72 / 29	6,83 / 7,5	Reduktion von Pentosen, Tetrosen und Triosen, vor allem Xylulose (Interaktion mit Phosphatidylinositol)

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Protein Molekulargewicht Da /kDa	iP	Funktion
32	Omega-amidase NIT2 [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">Q497B0</a>	30700.99 / 29	6,90 / 7,8	Monoaminocarboxylsäuren werden in Dicarboxylate und Ammoniak gespalten (Umwandlung von giftige in nutzbare Substanzen)
33	Indolethylamine N-methyltransferase [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">D3ZNI5</a>	29494.78 / 24	5,74 / 5,4	N-Methylierung von Tryptamin und strukturverwandte Verbindungen
34	Preornithine carbamoyl transferase [Rattus norvegicus] upregulated <a href="#">P00481</a> <a href="#">Q5M897</a>	36176.63 / 24 39573.73 / 24	6,66 / 5,9 9,25 / 5,9	Ornithin und Carbamoylphosphat zu Citrullin (Harnstoffzyklus)
35	Triosephosphate isomerase [Rattus norvegicus] upregulated <a href="#">P48500</a>	26717.71 / 24	7,06 / 7,2	Glykolyse und Gluconeogenese
35	Glutathione S-transferase Mu 2 [Rattus norvegicus] upregulated <a href="#">B6DYQ2</a> <a href="#">P08010</a>	25702.62 / 24 25571.43 / 24	6,91 / 7,2 7,31 / 7,2	Detoxifikation
36	Chain A, Crystal Structure Analysis Of Rat Hbp23PEROXIREDOXIN I, Cys52ser Mutant upregulated <a href="#">Q63716</a>	22109.41 / 21	8,27 / 8,5	Reduktion von Wasserstoffperoxid
37	Nucleoside diphosphate kinase B [Rattus norvegicus] upregulated <a href="#">P19804</a>	17151.79 / 16	7,12 / 8,2	Nucleosidtriphosphatsynthese Senkung der Aktivität von Rho-GTPase
P1	Heat shock protein HSP 90-beta upregulated <a href="#">P34058</a>	83150.03 / 90	4,97 / 4,4	Chaperon Zellzykluskontrolle via p53
P1	Heat shock protein HSP 90-alpha upregulated <a href="#">P82995</a>	84683.72 / 90	4,93 / 4,4	Chaperon
P2	60 kDa Heat shock protein, mitochondrial upregulated P63039	57925.78 / 70	5,35 / 5,0	Chaperon

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Protein Molekulargewicht Da /kDa	iP	Funktion
<b>P3</b>	Catalase downregulated <a href="#">P04762</a>	59626.01 / 62	7,15 / 8,2	Schutz vor Wasserstoffperoxid Fördert Zellwachstum
<b>P3</b>	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD- AMP lyase (cyclizing) downregulated <a href="#">Q4KLZ6</a>	59443.95 / 62	7,12 / 8,2	Lipidsynthese Glykolyse Glycerin-3-phosphat-Shuttle
<b>P4</b>	Tubulin alpha-1C chain upregulated <a href="#">Q6AYZ1</a>	49937.37 / 55	4,96 / 4,4	Mikrotubulusaufbau
<b>P5</b>	Glycerate kinase upregulated <a href="#">Q0VVK3</a>	55187.47 / 50	5,84 / 5,7	Serinsynthese
<b>P6</b>	Phenylalanine-4-hydroxylase downregulated <a href="#">P04176</a>	51690.60 / 58	5,77 / 5,8	Tyrosinsynthese
<b>P7</b>	Alpha-enolase isoform 1 downregulated <a href="#">P04764</a> <a href="#">Q5BI93</a>	46996.67 / 48 47127.86 / 48	6,16 / 6,2 6,16 / 6,2	Glykolyse
<b>P8</b>	NSFL1 cofactor p47 upregulated <a href="#">Q35987</a>	40679.96 / 44	5,04 / 4,4	Mitose
<b>P8</b>	N-myc downstream regulated gene 2, isoform CRA_c upregulated <a href="#">Q8VBU2</a>	40647.99 / 44	5,16 / 4,4	Zellzyklus
<b>P9</b>	Fructose-1,6-bisphosphatase 1 downregulated <a href="#">P19112</a>	39478.17 / 39	5,54 / 4,8	Fructose-1,6-bisphosphat zu Fructose-6- phosphat (Gluconeogenese)
<b>P9</b>	UBX domain-containing protein 1 downregulated <a href="#">Q499N6</a>	33581.52 / 39	5,22 / 4,8	Proteinabbau
<b>P10</b>	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial upregulated <a href="#">B2RZ24</a>	47387.76 / 43	6,06 / 5,6	ATP+Succinat+CoA zu ADP, Phosphat und Succinyl-CoA

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Protein Molekulargewicht Da / kDa	iP	Funktion
P10	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial upregulated <a href="#">Q5EBA9</a>	41720.98 / 43	5,64 / 5,6	GTP+Succinat+CoA zu GDP, Phosphat und Succinyl-CoA (reversibel, Citratzyklus)
P10	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G upregulated <a href="#">Q5RK09</a>	35519.85 / 43	5,70 / 5,6	Proteinsynthese
P11	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor downregulated <a href="#">P12007</a>	43097.43 / 41	6,12 / 6,2	Metabolismus verzweigt-kettiger Aminosäuren
P12	Betaine--homocysteine S- methyltransferase 1 downregulated <a href="#">O09171</a>	44976.41 / 46	8,02 / 8,5	Methioninsynthese aus Homocysteine
P12	Argininosuccinate synthase downregulated <a href="#">P09034</a>	46496.31 / 46	7,63 / 8,5	Harnstoffzyklus
P12	Multifunctional protein ADE2 downregulated <a href="#">P51583</a>	46965.00 / 46	7,93 / 8,5	Purinsynthese
P13	Betaine--homocysteine S- methyltransferase 1 downregulated <a href="#">O09171</a>	44976.41 / 43	8,02 / 8,8	Methioninsynthese aus Homocysteine
P13	Argininosuccinate synthase downregulated <a href="#">P09034</a>	46496.31 / 43	7,63 / 8,8	Harnstoffzyklus
P13	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl- Coenzyme A thiolase), isoform CRA_f downregulated <a href="#">P13437</a>	41870.92 / 43	8,09 / 8,8	$\beta$ -Oxidation
P14	Fructose-bisphosphate aldolase B downregulated <a href="#">P00884</a> <a href="#">Q66HT1</a>	39486.92 / 37 39524.99 / 37	8,67 / 8,5 8,67 / 8,5	Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat
P15	Fructose-bisphosphate aldolase B downregulated <a href="#">P00884</a> <a href="#">Q66HT1</a>	39486.92 / 37 39524.99 / 37	8,67 / 8,8 8,67 / 8,8	Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Protein Molekulargewicht Da /kDa	iP	Funktion
<b>P15</b>	Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial downregulated <a href="#">Q5XIC0</a>	38949.40 / 37	8,47 / 8,8	Abbau ungesättigter Fettsäuren
<b>P16</b>	Fructose-bisphosphate aldolase B upregulated <a href="#">P00884</a> <a href="#">Q66HT1</a>	39486.92 / 29 39524.99 / 29	8,67 / 4,0 8,67 / 4,0	Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat
<b>P16</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Z upregulated <a href="#">Q3B7D1</a>	38352.34 / 29	5,37 / 4,0	Proteinabbau
<b>P17</b>	Triosephosphate isomerase downregulated <a href="#">P48500</a>	26717.71 / 25	7,06 / 6,2	Umwandlung von Dihydroxyacetonphosphat in Glycerinaldehyd-3-phosphat
<b>P18</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Z downregulated <a href="#">Q3B7D1</a>	38352.34 / 24	5,37 / 8,5	Proteinabbau
<b>P19</b>	Actin, gamma 1 propeptide-like [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">P63259</a> <a href="#">P60711</a>	41792.84 / 21 41736.73 / 21	5,31 / 8,8 5,29 / 8,8	Aktinpolymerisation
<b>P20</b>	Fatty acid-binding protein, liver [Rattus norvegicus] downregulated <a href="#">P02692</a>	14272.52 / 11	7,79 / 8,7	Bindung freier Fettsäuren und Bilirubin

\*Quelle: <http://www.uniprot.org/>



### 7.3 Peptidsequenzen der identifizierten Proteine

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
1	Dimethylglycine dehydrogenase precursor, isoform CRA_b <a href="#">Q5RKL4</a>	Q5RKL4	38/59	K.AGMRDVLLEK.S R.ANRIVNAAGFWAR.E K.ARESYGFNNIVGYPK.E R.DGLLFGPYESQEK.M R.DGLLFGPYESQEKMK.L R.DLEGSYYLR.Q R.DLEGSYYLRQER.D R.EGQESPPSPEWK.D R.EGQESPPSPEWKDR.A K.ELFESDLDR.I R.ESYGFNNIVGYPK.E R.ESYGFNNIVGYPKEER.F R.FAGRPTQR.V R.GGYDVEIR.N K.GKVIGNTTSGSYSYSIQK.S K.GQDSTQLLDHLCANVIPK.V K.ISDIPVTAIR.I R.ITEHVEAAMEMVPVLK.K R.IVNAAGFWAR.E K.KIHYSIK.L R.LATTPERVDEFK.Y R.LATTPERVDEFKYQMTR.T R.LEEETGQVVGFFHQPGSIR.L K.LQASWVAHGVPFGFK.E K.LTSEDLSDDVFK.F R.NITDELGVLGVAGPYAR.R K.NYPATHIQEPLVLTEPTR.T K.SLKISDIPVTAIR.I R.TNWFEPVGSEYK.Q K.VGFINISHMLTPR.G R.VGVIDLSPFGK.F R.VGVIDLSPFGKFNK.G K.VIGNTTSGSYSYSIQK.S R.VSGLYKILESK.C R.WIEEA AVR.G K.WTTTQYTEAK.A K.WTTTQYTEAKAR.E R.YGKWTITQYTEAK.A

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
1	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial <a href="#">P07756</a>	CPSM	10/13	K.AADTIGYPVMIRS K.AFAMTNQILVER.S K.ATGYPLAFIAAK.I K.GLNSESVTEETLR.Q K.GNDVLVIECNLR.A R.GQNQPVLNITNR.Q K.IFAEAVQKA R.SAYALGGLGSGICPNK.E K.TVLMNPNIASVQTNEVGLK.Q K.VVAVDCGIKNNVIRL
2	Radixin <a href="#">Q5WQV5</a> <a href="#">Q5PQK5</a>	Q5WQV5 Q5PQK5	21/25	R.AAEEAKSAIAK.Q K.ALELEQER.Q K.APDFVFYAPR.L K.AQKELEEQTR.K R.DETKKTQNDVLHAENVK.A R.EDSMMEYLK.I K.FVIKPIDK.K K.IALLEEAK.K K.IALLEEAKK.K K.KENPLQFK.F R.KPDTIEVQQMK.A K.KTQNDVLHAENVK.A R.LRQIEEQTMK.A K.NQEQLAAELAEFTAK.I K.QLQALSSELAQAR.D K.QRIDEFEAM.- K.SAIAKQAADQMK.N R.SEEERVTTETQK.N R.SEEERVTTETQKNER.V K.TQNDVLHAENVK.A R.VTMDAELEFAIQPNTTGK.Q
2	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial <a href="#">P07756</a>	CPSM	8/8	K.AADTIGYPVMIRS K.CLGLTEAQTR.E K.ELSEPSSTR.I K.GLNSESVTEETLR.Q R.GQNQPVLNITNR.Q K.TLGVDFIDVATK.V R.TSINVVR.H R.VSQEHPVVLTK.F
3	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial <a href="#">Q510C3</a>	MCCA	25/33	K.EFQEQLSAR.R K.ESVCQAALGLILK.E R.HAPLVEFEVEEV.- R.IAAGEKIPLSQEEIPLQGHAFEAR.I

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				K.IGYPVMIK.A K.IIEEAPAPGIDPEVR.R K.IPLSQEEIPLQGHAFEAR.I R.KMGVQSVAVYSEADR.N K.KSFNDDAMLIEK.F K.KVFFSEGAQANR.H R.LGEAAVRA K.LVVWASDR.Q K.LVVWASDRQSALS.K.L K.MGVQSVAVYSEADR.N K.QEGIIIFIGPPSTAIR.D R.QGDEVSVHYDPMIAK.L R.RLGEAAVRA R.RLNISYTR.N R.SEKEFQEQLSAR.R K.SFNDDAMLIEK.F K.SIMAAAGVPVVEGYHGNDQSDE CLK.E R.TNVDFLLR.L K.VFFSEGAQANR.H K.VLIANRGEIACR.V K.YLSPVSAEGTQGGTIAPMTGTIE K.V
3	Lamin A, isoform CRA_b <a href="#">P48679</a>	LMNA	10/11	K.EGDLLAAQAR.L R.GSHCSSSGDPAEYNLR.S R.ITESEEVVSR.E R.LADALQELR.A K.LLEGEER.L R.NSNLVGAAHEELQQSRI R.SGAQASSTPLSPTRI R.SLETENAGLR.L R.SVGGSGGSGFDNLVTR.S R.TALINATGEEVAMR.K
4	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 <a href="#">P18163</a>	ACSL1	33/55	K.AELSVIFADKPEK.A K.AILEDMMVK.L K.AILEDMMVKLGK.N K.ALEDLGR.V K.ALKPPCDLSMQSVEVTGTTEGVR .R K.ALKPPCDLSMQSVEVTGTTEGVR R.S K.CGVEIIGLK.A K.GAMVTHQNIMNDCSGFIK.A K.GEGEVCVK.G R.GFQGSFEELCR.N R.GIQVSNDBGPLGSR.K

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				R.GQKCGVEIIGLK.A R.IFGQANTSVK.R R.IFGQANTSVKR.W K.IGFFQGDIR.L K.IIVIMDSYDNDLVER.G K.IIVIMDSYDNDLVERGQK.C K.IQSSLGGKVR.L K.LAQGEYIAPEK.I K.LAQGEYIAPEKIENIYLR.S K.LLLEGVENK.L K.LLLEGVENKLTPELKI.I R.LLMDDLK.V R.LMITGAAPVSATVLTFLR.A K.LVDVEDMNYQAAK.G K.LVDVEDMNYQAAKGEGEVCVK. G R.MPELIDIR.Q K.NAGLKPFEQVK.G K.QVAEMAECIGSALIQK.G R.SQIDELYSTIK.- R.SQIDELYSTIKI.- R.TMYDGFQR.G K.VLQPTIFPVVPR.L
5	Urocanase domain containing 1 <a href="#">D3ZIC2</a>	D3ZIC2	22/37	R.AGADVEKK.G K.AIADGVKASVK.L K.APVVLSR.D R.AYPIEQYPCR.T R.DHHDVSGTDSPFRE R.EAAKHQLVVGSQLR.I R.FCPSIEMR.A K.IKAPVVLSR.D R.ILYSDQK.G R.ILYSDQKGR.V K.LLLEFAQELR.Q K.LQYMDNIR.W R.LVITNGMVIPNYSSR.T R.MMLSWDVSNGVAR.R K.NLVQESLR.R R.RYLGIEDLAGK.V R.TPDLSPEEEQLALR.N R.VAIAVAINQAIASGKI K.VFVTSGLGGMSGQAQAK.A R.WAGVPHAPVR.T R.YFPPDVQK.L R.YLGIEDLAGK.V

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
6	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain <a href="#">Q68FT7</a>	Q68FT7	12/13	K.AQGASDVVLYK.I K.ASAGSAFFPGR.C K.AVHIGNPK.T R.CAEIFVGGQSIGK.L K.LFEISDIVVQDPSK.D R.NIFIECTGTDLT.K.A K.QIISKEQGNV.K.A K.TAEFQVAR.T R.TTLLPGLL.K.T K.TYTIANQFPL.NK.L K.VGIKETPANLAK.L R.YDSFIELQE.K.L
6	Urocanase domain containing 1 <a href="#">D3ZIC2</a>	D3ZIC2	11/16	R.AYPIEQYPCRT R.DHHHDVSGTDSPPFR.E K.HQLVVGSQLR.I K.LLALFAQELR.Q K.IQYMDNIR.W R.LVITNGMVIPNYSSR.T K.NLVQESLR.R R.TPDLSPEEEQLALR.N R.VAIAVAINQAIASGK.I K.VFVTSGLGGMSGAAK.A R.YLGIEDLAGK.V
7	Acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain, isoform CRA_a <a href="#">P97562</a> <a href="#">F1LNW3</a>	ACOX2 F1LNW3	32/40	R.ATASCTYE GENTVLYLQVAR.F K.ATFADFCAQGAEICR.R K.ATFADFCAQGAEICRR.A R.CPDVYTTAWAYVSTR.L R.CSAQTAADFR.C R.DFSLPELHALSTGMK.A R.EAFDILLPLIR.K R.EAFDILLPLIRK.D K.EAVEKLDKEPEIQR.V R.EELYEDAIQK.R R.FAEVLPDGTYQR.L R.HGMHAFIVPIRS K.ILEYQTQQK.L R.KVESIIQSDPVFNLK.K R.KVESIIQSDPVFNKK.L K.LAWSLGWSEDGPER.I K.LDKEPEIQR.V R.LFEWAQK.S R.LFEWAQKSPANTQENPAYK.K R.LGTPQSNYLGMLVTR.V K.LSGLPTLVAR.A

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				R.LTNILDGGLPNTVLR.R R.LTNILDGGLPNTVLR.R.K K.SGVDQHDAWNQTTVIHLQAAK.A R.SLEDHTPLPGITVGDIGPK.M R.SLGSDEQIAK.W R.SLGSDEQIAKWGQLCK.N K.SPANTQENPAYK.K K.SPANTQENPAYK.Y K.VESIIQSDPVFNLK.K K.VESIIQSDPVFNLK.L R.VSLGDTWSWQVHPDIDSER.H
7	Similar to hypothetical protein FLJ21963 (predicted), isoform CRA_b <a href="#">D3ZDV3</a>	D3ZDV3	25/36	K.AAEQISWYKPWTK.T R.AIRQQDPGAALGK.Q K.ATISYKEVLEQVSK.L R.CDVETLEWSK.K R.CDVETLEWSK.V K.CVPGYNVMILDDNMQK.L R.DLDWEEEMAK.A K.DVNATEEQVLEEIVK.H K.EVLEQVSK.L K.EVLEQVSKLAGVLVK.Q R.FKTLFVAGER.C K.GHVPLALCVLK.K K.IAIIYDSPVTDTK.A R.IGAIHSLIFGGFASK.E K.KDVNATEEQVLEEIVK.H R.KVEYMPLEELRI R.QQDPGAALGK.Q R.QSIGPVAAFR.N R.SLGNIVVK.L K.TLFVAGERCDVETLEWSK.K R.VDDVINVAGHR.I K.VEYMPLEELRI R.VLAEHGVAALFTAPTIRA K.VPLMSGR.D K.VVVTASFGIEPGR.K
8	Solute carrier family 25, member 13 (citrin) <a href="#">F1LZW6</a>	F1LZW6	27/68	K.AGKGEVTFEDVR.Q R.AGQTTYSGVTDCFRK R.AGQTTYSGVTDCFRK.I K.DVEVTKEEFALAAQK.F K.EEFALAAQK.F K.GEVTFEDVR.Q R.GLLPQLLGVAPK.A R.IAPLEEGMLPFNLAEAR.Q

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				K.ILREEGPK.A R.ITLPAPNPDHVGGYK.L K.IYSTLAGSR.K K.IYSTLAGSRK.D R.KIYSTLAGSR.K K.LAVATFAGIENK.F R.IQVAGEITTGPR.V K.LTVNDFVR.D R.MTLADIER.I K.NSFDCFKK.V K.QAFVQR.D K.QAFVQRDNAK.T K.RADPAELK.A R.STGSFVGELMYK.N K.TVELLSGVVDQTK.D R.VSALSVVR.D K.VTAIDFR.D R.YEGFFGLYR.G R.YLNIFGESQPNPK.T
8	APOBEC1 complementation factor <a href="#">Q923K9</a>	A1CF	9/12	R.DLFEDELIPLCEK.I R.EIYMNVPVGAAGVR.G K.LAPQILEEICQK.N R.LLGVCASVDNCR.L K.QLNNEYEIR.N R.TGYSLVQENGQR.K K.VTEGVVDVIVYPSAADK.T K.VTEGVVDVIVYPSAADKTK.N K.YGGPPPQWDITTPPER.G
9	Bucs1 protein <a href="#">B5DFA3</a>	B5DFA3	21/36	R.AANVFEQTCGLQHGDR.L K.AILPFDIQIIDEK.G K.AIVTTDSLVEVESVASECPGLK.T K.DPMVIFFTSGTTGYPK.M K.GNILPPNTEGYIGIR.I R.GPGPALWWVNDQGDEIK.W K.HNQGLAFR.S R.IQMSQAK.A R.KVEFVSELPK.T R.LALILPR.V K.MKDPMVIFFTSGTTGYPK.M R.NKEFGQI.- R.RAANVFEQTCGLQHGDR.L R.SASPDHTCVK.S R.SDDVINASGYR.I K.SVTAPYKYPR.K

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				R.TGVIFIPGTAQMK.A K.TSEVECGDFYNSGDR.A K.VIVETL.FK.Y R.VPEWWLVTVGCIR.T K.YPITQCLAAPAVYR.M
9	Stress-induced-phosphoprotein 1 <a href="#">Q35814</a>	STIP1	13/22	K.AIEVGRENRE K.ALDLDSSCK.E K.ALDLDSSCKEADGYQR.C R.AMADPEVQQIMSDPAMRL K.DCEEICIQLEPTFIK.G K.EGLQNMEAR.L K.ELGNDAYK.K R.ELIEQLQNKPSDLGTK.L K.GNECFQKGDYPQAMK.H R.IGNSYFKEERY R.LAYINPDLALEEK.N R.LILEQM.QK.D K.LMDVGLAIR.-
10	Liver carboxylesterase 4 precursor <a href="#">Q64573</a>	EST4	28/41	K.AEEVAFWTQLLAK.R R.AISESGVVFLPGLLTK.D R.AISESGVVFLPGLLTKDVRPAAK. Q R.DAGAPTYMYEYQYYPSFSSPQRP K.H R.DGASEEEIKLSK.M R.DGILAFIGDVFSIPSVMVSR.D R.DNKESYHFLSTVVDNVVL.PK.D R.DNKESYHFLSTVVDNVVL.PKDP K.E K.EEYLQIGATTQSQRL K.EILAEKNFNTVPYIVGINK.Q R.FAPPQPAEPWSFVK.N K.FASLYGIPEDIIPVAIEK.Y K.FASLYGIPEDIIPVAIEKYR.K R.GLPHWPQYDQKEEYLQIGATTQ QSQR.L K.GSDDSIKIR.D K.HVVGDHADDLYSVFGAPILR.D R.LGIWGGFFSTGDEHSR.G R.LKAEVAFWTQLLAK.R R.LPVMVWIHGGGMTLGGASTYDG R.V K.MAITLLEK.F R.MNDLLTNR.K K.NFNTVPYIVGINK.Q K.QECGWLLPTMMGFVPADVELD KK.M



#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				K.QIADMAGCETTTSAIVHCLR.Q R.QKTEEEELLEIMK.K K.VLGKYVSLEGVTQSVAVFLGVFP AKPPLGSLR.F R.VLSAYENVVVVAIQYR.L K.YVSLEGVTQSVAVFLGVFPFAKPP LGSLR.F
10	Glutaminase 2 (liver, mitochondrial), isoform CRA_a <a href="#">P28492</a>	GLSL	19/23	K.ATGLQTS DPR.L K.CVSSNIVLLTQAFR.K R.FALSAVDMEQK.D R.FALSAVDMEQKDYDSR.T K.FVGKEPSGLR.Y R.IFEDAKELTG GK.V K.IPFCLQSCVKPLTYAISVSTLGT DY VHK.F R.LGDLLFYTIAEGQER.I R.LGDLLFYTIAEGQERIPHK.F K.LLQDYHDSYMLSETQAEVAAET LSK.E K.LSLNEEGIPHNPMVNAG AIVVSS LIK.M K.LVSLFNFHNYDNL.R.H R.MVQESSGGLLDRELFQK.C R.NKTVVNLFFAAYSGDVSALR.R K.SNPDLWGVSLCTVDGQR.H R.TALHVAAAEGHIDVVK.F K.TVVNLLFAAYSGDVSALR.R K.TVVNLLFAAYSGDVSALRR.F K.VAAYIPHLAK.S
11	Aldehyde dehydrogenase family 5, subfamily A1 <a href="#">P51650</a>	SSDH	14/16	R.AAYDAFSSWK.E K.EVGEVLC TDPLVSK.I K.FRNAGQTCVCSNR.F K.GATVVTGGKR.H R.GDSFVGGR.W R.GIHDSFVTK.F K.IITAESGKPLK.E K.ISFTGSTATGK.I K.LGTVADCGVPEAR.A K.LGTVADCGVPEARAAVRA R.RVYGDIIYTS AK.D R.VGNGFEEGTTQG PLINEK.A R.WLP TPATFPVYDPASGAK.L K.YGIDEYLEVK.Y
12	rCG52860, isoform CRA_b <a href="#">Q6AYR0</a>	Q6AYR0	16/24	R.CFYNSDGD FLIVPQK.G R.CFYNSDGD FLIVPQK GK.L R.CPGSLPK.G

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				K.CWEPLQAHFTPTSR.S R.DFLIPVAWYEDR.Q R.FSVDVFEETR.G K.GQNNPQICPYNLYAEQLSGSAFT CPR.N K.LLIYTEFGK.M K.MFLQPNEICVIQR.G R.NCMSEFMGLIK.G R.QVPGGFTVINKYQGK.L R.SNNGLAVHIFLCNSSMENR.C K.TCGCLDEDYK.C K.VDFVSLHTLCGAGDIR.S K.YISGFGNECASEDPR.C K.YISGFGNECASEDPRCPGSLPK.G
13	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 <a href="#">P18163</a>	ACSL1	6/6	K.CGVEIIGLK.A R.GIQVNDGPCLGSR.K K.IGFFQGDIL.L K.IIVIMDSYDNDLVER.G K.IILEGVENK.L K.VLQPTIIPVVR.L
14	Fructose-1,6-bisphosphatase 1 <a href="#">P19112</a>	F16P1	19/42	K.AGGLATTGNEDILDIVPTEIHQK. A K.AGGTGEMTQLLNSLCTAIK.A K.AISSAVR.Q K.DFDPAINEYIQRK K.DFDPAINEYIQRK.K K.FPPDNSAPYGARY R.FVLEEGR.K K.GNIYSINEGYAK.D R.KAGGTGEMTQLLNSLCTAIK.A K.KFPPDNSAPYGARY R.KKFPDNSAPYGARY K.KKGNISINEGYAK.D K.LDILSNDLVINMLK.S R.LLYECNPIAYVMEK.A R.QAGIAQLYGIAGSTNVTGDQVK K.L K.SRPSLPLQSR.A R.TLVYGGIFLYPANK.K K.TSANEPSEKDALQPGR.N R.YVGSVMADVHR.T
15	Succinyl-CoA ligase [GDP- forming] subunit beta, mitochondrial <a href="#">B1H270</a> <a href="#">Q68FT4</a>	B1H270 Q68FT4 Q5EBA9 Q499V7	19/25	K.ACQELELK.V K.ACQELELKVPLVVRL K.AQILAGGR.G K.DIFAMDDKSENEPIENEAAAR.Y

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
	<a href="#">Q5EBA9</a> <a href="#">Q499V7</a>			K.EQIDIFEGIK.D K.ESQVYQAFK.L R.ETYLAILMDR.S R.FFVASTAKEAQEAAK.R K.IDATQVEVNPFGETPEGQVVCF DAK.I K.INFDDNAEFR.Q R.LEGTINVQEAQNILK.S K.LLTSDPK.V R.LNAKEIVLK.A R.MAENLGFLGSLK.N K.SENEPIEENEAAR.Y K.SSGLPITSAVDLEDAAK.K K.SSGLPITSAVDLEDAAKK.A K.VMVAEALDISR.E K.VVGQLAQQMIGYNLTK.Q
15	Erlin-2 <a href="#">B5DEH2</a>	ERLN2	7/8	K.ADAECYTALK.I K.ISEIEDAAFLAR.E K.I.GFGLLEDEPLETATKDN.- K.SVQITLQTDEVK.N K.VAQVAEITYGQK.V R.VTKPNIPEAIR.R K.VVEKEAETER.K
16	Nucleophosmin <a href="#">P13084</a>	NPM	9/12	K.GPSSVEDIK.A K.GPSSVEDIKAK.M K.MQASIEKGGSLPK.V K.MQASIEKGGSLPKVEAK.F R.SAPGGGNKVPQK.K K.SVRDTPAKNAQK.S K.TPKGPSSVEDIK.A K.TPKGPSSVEDIKAK.M K.VDNDENEHQSLR.T
17	Elongation factor 1-delta <a href="#">Q68FR9</a>	EF1D	10/14	R.ATAPQQTQHVSPMR.Q R.FYEQMNGPVTAGSR.Q R.GVVQDLQQAISK.L R.IASLEVENQNLR.G K.LQIQCVVEDDK.V K.LVPVGYGIR.K R.QENGASVILR.D R.SIQLDGLVWGASK.L K.SLAGSSGPGASSGPGGDHSDLIVR .I K.VGTDLLEEEITK.F

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
18	Regucalcin <a href="#">Q03336</a>	RGN	37/82	R.CGESPVWEEASK.C R.CGESPVWEEASKCLLFVDIPSK.T R.CGESPVWEEASKCLLFVDIPSKTV CR.W K.CLLFVDIPSK.T K.CLLFVDIPSKTVCR.W K.DEQIPDGMCIDVEGK.L R.DGMSAEGLLR.Q R.DGMSAEGLLRQPDAGNIFK.I R.DGMSAEGLLRQPDAGNIFKITGL GVK.G K.DYSEMYVTCAR.D R.ENYRCGESPVWEEASK.C R.FNDGKVDPAGR.Y K.GIAPYSYAG.- R.HQGSLSLFPDHSVK.K R.HQGSLSLFPDHSVKK.Y R.LDPETGKR.L K.LPVDKTTSCCFGGK.D K.LPVDKTTSCCFGGKDYSEMYVT CAR.D R.LQTVKLPVDK.T R.LQTVKLPVDKTTSCCFGGK.D K.LWVACYNGGR.V K.MEKDEQIPDGMCIDVEGK.L K.NNRFNDGKVDPAGR.Y R.QPDAGNIFK.I R.QPDAGNIFKITGLGVK.G R.QSGGYVATIGTK.F K.RLQTVKLPVDK.T K.TTSCCFGGK.D K.TTSCCFGGKDYSEMYVTCAR.D R.TVYKMEKDEQIPDGMCIDVEGK .L R.VGVDAPVSSVALR.Q R.VGVDAPVSSVALRQSGGYVATIG TK.F R.VIRLDPETGK.R R.VIRLDPETGKR.L R.VQRVGVDPVSSVALR.Q R.YFAGTMAEETAPAVLER.H K.YFDQVDISNGLDWSLDHK.I
19	mu-crystallin homolog <a href="#">Q9QYU4</a>	CRYM	9/15	R.ELDDELMK.Q K.FASSVQGDVR.V R.GFLGVMPAYSAAEDALTTK.L K.GPDGGVMQPVR.T

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				K.QAVLYVDSR.E K.RTAAVSAIATK.F K.SLGMAVEDLVAAK.L R.TAAVSAIATK.F R.TVVVPAK.H
20	F-actin-capping protein subunit alpha-1 <a href="#">B2GUZ5</a>	CAZA1	5/6	K.DVQDSVTVSNEVQTAK.E K.EASDPQPEDVDGGLK.S K.FTITPPTAQVVGVLK.I R.LLLNNDNLLR.E R.QLPVTR.T
21	Malate dehydrogenase, cytoplasmic <a href="#">O88989</a>	MDHC	6/8	K.DLDVAVLVGSMPR.R K.IFKSQGAALEK.Y R.KLSSAMSAAK.A K.IGVTADDVK.N K.LSSAMSAAK.A K.VIVVGNPANTNCLTASK.S
21	Delta-aminolevulinic acid dehydratase <a href="#">P06214</a>	HEM2	5/5	K.AGAFDLR.T R.CVLIFGVPSR.V K.DEQGSAADESDSPTIEAVR.L R.LAEVALAYAK.A R.TAVLESMTAFR.R
22	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2 <a href="#">Q8CG45</a>	ARK72	5/6	K.ANPWDGK.S R.MDASASAATVR.A R.QVETELLPCR.Y R.RMDASASAATVR.A K.TTYGTSAPSMTSAALR.W
23	Aryl sulfotransferase <a href="#">P17988</a>	ST1A1	10/13	K.CPGVPSGLETLEETPAPR.L K.DVVVSYYNFYNMAK.L K.EWWELR.H R.FDAHAK.T K.NTFIVAQNER.F K.TMTDCDFK.F K.TMTDCDFKFR.C K.VIYIAR.N K.VKVIYIAR.N R.VPFLEFK.C
23	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase <a href="#">P23457</a>	DIDH	7/7	K.DIILVSYCTLGSSR.D R.DKTWVDQK.S R.GVVPLIR.S K.SIGVSNFNCR.Q K.SKDIIIVSYCTLGSSR.D K.SPVLLDDDPVLCIAIAK.K

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				R.YQLQR.G
24	Aspartoacylase-2 <a href="#">Q5M876</a>	ACY3	11/19	R.AELFSQMR.A R.AQELNQLLGPK.G K.IRISVPALPGLTPSSTQTP.- R.LFQFEPPTESYSMDSVSK.N R.LQDHDHDFEPLRPGEPIFK.L K.NGISLELGPQPQGVLR.A K.RAQELNQLLGPK.G R.TF'IL'FLGSTATPDDPYEVKR.A R.TTDGHLTGTVHSR.L R.VAFLKSEK.I R.VAVTGGTHGNEMCGVYLAR.Y
25	Chain A, Crystal Structure Analysis Of The Sodium-Bound Annexin A4 At 1.58 A Resolution <a href="#">P55260</a>	ANXA4	11/12	K.AASGFNATEDAQVLR.K R.DEGNYLDDALVK.Q K.DIEQSIK.S K.FLSILCSR.N K.GLGTDDSTLIR.V R.INQTYQQQYGR.S R.ISQKDIEQSIK.S R.KVLLILCGGDD.- K.QDAQDLYEAGEK.R K.QDAQDLYEAGEKR.W R.VLVSLTAGGR.D
26	Sulfotransferase 1C1 <a href="#">P50237</a>	ST1C1	6/9	K.DLHLGEQDLQPETRE R.EVNGILMSK.L K.FLEKDISEEVLNK.I K.IIYVAR.N K.MAGSNITFR.T K.MAGSNITFRTEL.-
27	Aryl sulfotransferase <a href="#">P17988</a>	ST1A1	22/43	R.APIYARVPFLEFK.C K.CGRAPIYAR.V K.CPGVPSGLETLEETPAPRL K.CPGVPSGLETLEETPAPRLK.T K.DVVVSYYNFYNMAK.L K.EWWELR.H R.FDAHYAK.T K.GTTGDWKN'TFTVAQNER.F K.ILEFLGR.S R.KGTTGDWKN'TFTVAQNER.F K.KILEFLGR.S R.NAKDVVVSYYNFYNMAK.L K.N'TFTVAQNER.F

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				K.NTFITVAQNERFDAHYAK.T K.THLPLSLLPQSLLDQK.V K.THLPLSLLPQSLLDQKVK.V K.TMTDCDFK.F K.TMTDCDFKFR.C K.TMTDCDFKFRCEL.- K.VIYIAR.N K.VKVIYIAR.N R.VPFLEFK.C
27	S-formylglutathione hydrolase <a href="#">BOBNE5</a>	ESTD	6/6	K.AFNGYLGPDQSK.W K.AYDATCLVK.S K.FAIYLPPQAESAK.C K.SGCQQAASEHGLVVIAPDTSR.G R.SVSAFAPICNPVLCPWGK.K K.SYSGPQIDILIDQGK.D
28	Chain A, Methyltransferase <a href="#">P13255</a>	GNMT	24/110	K.AHMTLDYTVQVPGAGR.D K.AHMTLDYTVQVPGAGRDGAP GFSK.F K.AWLLGLLR.Q R.DGAPGFSK.F R.DGAPGFSKFR.L K.DITTSVLTVNK.A K.GDQSEHR.L R.LALKNIASMVRPGLLVIDHR.N K.MLKYALKER.W K.NIASMVRPGLLVIDHR.N K.NIYYKSDLTK.D K.NIYYKSDLTKDITTSVLTVNK.A R.NYDYILSTGCAPPK.N R.NYDYILSTGCAPPKNIYYK.S R.NYDYILSTGCAPPKNIYYKSDL TK.D K.SDLTKDITTSVLTVNK.A R.SLGVA AEGIPDQYADGEAAR.V R.TAEYKAWLLGLLR.Q R.TRSLGVA AEGIPDQYADGEAAR. V R.VLDVACGTGVDSIMLVEEGFSVT SVDASDK.M R.VWQLYIGDTR.S R.VWQLYIGDTRSR.T K.WVIEEANWLTLDK.D K.YALKER.W
28	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial precursor <a href="#">P97519</a>	HMGCL	14/17	K.EVSIFGAASELFTR.K K.EVSIFGAASELFTRK.N R.FDGMQAARA

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				K.FPGINYPVLTTPNMK.G K.GFEEAVAAGAK.E K.GIQKFPGINYPVLTTPNMK.G R.GYVSCALGCPYEGK.V R.GYVSCALGCPYEGKVSPAK.V K.IVEVGPR.D K.IIDMLSEAGLPVIEATSFVSPK.W K.LLEAGDFICQALNR.K K.LLEAGDFICQALNRK.T K.NVNCSEESFQR.F R.VKIVEVGPR.D
29	Estrogen sulfotransferase, isoform 2 <a href="#">P52845</a> <a href="#">P49889</a>	ST1E2 ST1E3	8/17	K.CKEDALFNRI R.DPSAELVDR.I R.FEEHYQQMK.D R.IIQHTSFQEMK.N K.LIEFLER.D K.LIEFLERDPSAELVDR.I R.NEDLINGIK.Q K.NNPCITNYSMLPETMIDLK.V
30	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8, isoform CRA_b <a href="#">Q6MGB5</a>	DHB8	10/18	K.AGVIGLTQTAARE R.CNSVLPGFIA TPMTQK.M R.GSIINISSIVGK.V K.GTFLVTQAAAQALVSSGGR.G K.HAAFQADVSEGPAAK.R K.HAAFQADVSEGPAAKR.L R.LAAEGAAVAACDLDGAAAQDTV R.L R.LLGNGPSEDRE R.SALALVTGAGSGIGR.A K.VGNIGQTNYASSK.A
30	Proteasome subunit alpha type-1 <a href="#">P18420</a>	PSA1	7/7	R.ALRETLPAEQDLTTK.N K.AQPSQAADEPAEK.A R.IHQIEYAMEAVK.Q R.KAQPSQAADEPAEKADPEMEH.- R.LVSLIGSK.T R.LVSLIGSKTQIPTQR.Y R.NQYDNDVTWSPQGR.I



#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
31	L-xylulose reductase <a href="#">Q920P0</a>	DCXR	10/19	R.ALTNHTVYCSTK.G R.ALVTGAGKGIGR.S R.AVVQVSQIVAR.G K.EACDTSFNVNFR.A K.GALDMLTK.V R.GVPGAI NVSSQASQR.A R.STVLALQAAGA QVVAVSR.T R.TREDLDSLVR.E K.VMALELGPHK.I R.VNAVNP TVVMTPMGR.A
32	Omega-amidase NIT2 <a href="#">Q497B0</a>	NIT2	25/63	R.ACSLVR.E R.ADLYSVESK.K R.ADLYSVESKKP.- K.AGTEETILYSDIDLK.K K.AGTEETILYSDIDLKK.L R.ARAVDNQVYVATASPAR.D R.ARAVDNQVYVATASPARDEK.A R.AVDNQVYVATASPAR.D R.AVDNQVYVATASPARDEK.A K.ENSYLIGGSIPEEDDGK.L R.FAELAQIYAR.R R.FAELAQIYARR.G K.IHLFDIDVPGK.I K.ITFQESK.T K.KLSEVAK.E R.LALIQLQVSSIK.S R.LALIQLQVSSIKSDNTR.A K.LSEIRQQIPILK.Q K.LYNTCAVFGPDGNLLVK.H K.QGANIVSLPECFNSPYGTNYFPE YAEK.I R.QQIPILKQK.R K.RADLYSVESK.K K.RADLYSVESKKP.- K.TLSPGDSFSTFDTPYCR.V R.VGLGICYDMR.F
33	Indolethylamine N- methyltransferase <a href="#">D3ZJ5</a>	D3ZJ5	4/6	K.AIQDAGFQVLR.C R.EHATDYTPQNLQELQK.W K.FSGVYLEKETVEK.A K.VYMGGEDYEKEFTPK.D

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
34	Preornithine carbamoyl transferase <a href="#">P00481</a> <a href="#">Q5M897</a>	OTC Q5M897	5/5	K.GYEPDPNIVK.L K.LAEQYAK.E R.LQAFQGYQVTMK.T R.LSMTNDPLEAAR.G R.VLSSMTDAVLAR.V
35	Triosephosphate isomerase <a href="#">P48500</a>	TPIS	7/10	K.CNVSEGVAQCTR.I R.HIFGESDELIGQK.V R.IIYGGSVTGATCK.E K.LDEREAGITEK.V K.LPADTEVVCAPPTAYIDFAR.Q K.TATPQQAQEVHEK.L K.VTNGAFTGEISPGMIK.D
35	Glutathione S-transferase Mu 2 <a href="#">B6DYQ2</a> <a href="#">P08010</a>	B6DYQ2 GSTM2	6/8	K.HNLCGETEEER.I R.IRVDVLENQAMDTRL K.ITQSNAILR.Y R.LFLEYTDTSYEDK.K R.VDVLENQAMDTRL K.YSMGDAPDYDR.S
36	Chain A, Crystal Structure Analysis Of Rat Hbp23PEROXIREDOXIN I, Cys52ser Mutant <a href="#">Q63716</a>	PRDX1	10/11	K.ADEGISFR.G K.ATAVMPDGQFK.D K.DISLSDYK.G R.GLFIIDDK.G R.GLFIIDDKGILR.Q R.LVQAFQFTDK.H K.QGGLGPMNIPLVSDPK.R K.QGGLGPMNIPLVSDPKR.T R.QITINDLPVGR.S R.SVDEILR.L
37	Nucleoside diphosphate kinase B <a href="#">P19804</a>	NDKB	9/14	R.ASEEHK.K K.EIGLWFKPEELIDYK.S R.GDFCIQVGR.N R.GLVGEIHK.R R.GLVGEIHKR.F R.NIIHGSDSVESAEK.E R.TFIAIKPDGVQR.G R.VMLGETNPADSKPGTIR.G K.YMNSGPVAMVWEGLNVVK.T
P1	Heat shock protein HSP 90-beta <a href="#">P34058</a>	HS90B	42/60	R.ADHGEPGR.G R.ADHGEPGRGTK.V K.ADLINNLGTIAK.S K.ADLINNLGTIAKSGTK.A R.ALLFIPR.R

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				R.APFDLFENKK.K K.AQALRDNSTMGYMAAK.K R.DNSTMGYMAAK.K K.EDQTEYLEER.R K.EFDGKSLVSVTK.E K.EGLELPEDEEEK.K K.EGLELPEDEEEKK.K K.EKYIDQEELNK.T R.ELISNASDALDK.I R.ELISNASDALDKIR.Y R.EMLQQSKILK.V K.EQVANSAFVER.V K.EQVANSAFVERVR.K K.FYEAFSK.N K.FYEAFSKNLK.L R.GVVDSDELPLNISR.E R.GVVDSDELPLNISREMLQQSK.I K.IEDVGSDEEDDSGKDK.K K.IEDVGSDEEDDSGKDKK.K R.IMKAQALR.D K.KVEKVTISNR.L K.LGIHEDSTNR.R K.LGIHEDSTNRR.R K.LYVRR.V K.NNIKLYVR.R R.NPDDITQEEYGEFYK.S R.RAPFDLFENK.K R.RLSELLR.Y K.SIYYITGESK.E K.SIYYITGESKEQVANSAFVER.V K.SLTNDWEDHLAVK.H K.SLVSVTK.E R.TLTLVDTGIGMTK.A R.YESLTDPSK.L R.YESLTDPSKLDGK.E R.YHTSQSGDEMTSLSEYVSR.M K.YIDQEELNK.T
P1	Heat shock protein HSP 90-alpha <a href="#">P82995</a>	HS90A	16/20	K.ADLINNLGTTIAK.S K.ADLINNLGTTIAKSGTK.A R.APFDLFENR.K R.DNSTMGYMAAK.K K.DQVANSAFVER.L K.EDQTEYLEER.R K.EGLELPEDEEEK.K

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				K.EGLELPEDEEEKK.K K.EKYIDQEELNK.T R.ELISNSSDALDK.I R.ELISNSSDALDKIR.Y R.EMLQQSKILK.V K.FYEQFSK.N K.FYEQFSKNIK.L R.GVVDSEDLPLNISR.E R.GVVDSEDLPLNISREMLQQSK.I R.IMKAQALR.D K.KVEKVVVSNR.L K.LGIHEDSQNR.K R.LVTSPCCIVTSTYGWTANMER.I K.LYVRR.V K.NNIKLYVR.R R.NPDDITNEEYGEFYK.S R.RAPFDLFENR.K R.TDTGPEMGR.G R.TLTIVDTGIGMTK.A K.TLVSVTK.E R.YESLTDPSK.L R.YESLTDPSKLD SGK.E K.YIDQEELNK.T R.YYTSASGDEM VSLK.D R.YYTSASGDEM VSLKDYCTR.M
P2	<b>60 kDa Heat shock protein, mitochondrial</b> <a href="#">P63039</a>	CH60	12/13	R.AAVEEGIVLGGCALLR.C K.APGFGDNR.K R.GYISPYFINTSK.G K.LSDGVAVLK.V K.LVQDVANNITNEEAGDGT TTTAT VLARS K.NAGVEGLIVEK.I R.TVIIEQSWGSPK.V K.VGEVIVTK.D K.VGGTSDVEVNEK.K K.VGGTSDVEVNEKK.D K.VGLQVVAVK.A R.VTDALNATR.A

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
P3	Catalase <a href="#">P04762</a>	CATA	48/163	K.AKVFEHIGKR.T R.APQKPDVLTGGGNPIGDK.L R.APQKPDVLTGGGNPIGDK.LNI MTAGPR.G K.AVKNFTDVHPDYGAR.V R.DAMLFPSFIHSQK.R R.DAMLFPSFIHSQKR.N K.DAQLFIQR.K K.EAETFPFNPFDLTK.V K.EQRAPQKPDVLTGGGNPIGDK LNIMTAGPR.G K.FHYKTDQGIK.N K.FHYKTDQGIK.NLPVEEAGR.L R.FNSANEDNVTQVR.T R.FSTVAGESGSADTVR.D K.FYTEDGNWDLVGNNTPIFFIR.D K.GAGAFGYFEVTHDITR.Y K.GAGAFGYFEVTHDITRYSK.A R.GPLLVDVVFTEMAHFDR.E R.GPLLVDVVFTEMAHFDRER.I R.HRLGPNYLQIPVNCYPYR.A R.KAVKNFTDVHPDYGAR.V R.LAQEDPDYGLR.D R.LCENIANHLK.D R.LCENIANHLKDAQLFIQR.K R.LCENIANHLKDAQLFIQRK.A R.LFAYPDTHR.H R.LFAYPDTHRHR.L R.LGPNYLQIPVNCYPYR.A R.LGPNYLQIPVNCYPYR.V K.LNIMTAGPR.G K.LVNANGEAVYCK.F K.NAIHTYVQAGSHIAAK.G K.NFTDVHPDYGAR.V K.NLPVEEAGR.L K.NLPVEEAGRLAQEDPDYGLR.D R.NPANYFAEVEQMAFDPSNMPPGI EPSPDK.M K.RFNSANEDNVTQVR.T K.RLCENIANHLKDAQLFIQR.K K.RTPIAVR.F K.TDQGIK.NLPVEEAGR.L R.TFYTKVLNEEER.K R.VANYQR.D K.VFEHIGK.R

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				K.VFEHIGKR.T K.VLNEEER.K K.VLNEEERK.R R.VQALLDQYNSQKPK.N R.VVHAKGAGAFGYFEVTHDITR.Y K.VWPHKDYPLIPVGK.L
P4	Tubulin alpha-1C chain <a href="#">Q6AYZ1</a>	TBA1C	16/25	R.AVCMLSNTTAIAEAWAR.L R.AVFVDLEPTVIDEVR.T K.DVNAAIATIK.T K.DVNAAIATIKTK.R K.DYEEVGADSAEGDDEGEY.- K.EDAANNYAR.G R.EDMAALEK.D K.EIIDLVLDR.I R.GHYTIGK.E R.IHFPLATYAPVISAEEK.A R.NLDIERPTYTNLNR.L K.TIGGGDDSFNTFFSETGAGK.H R.TIQFVDWCPIGFK.V K.VGINYQPPTVVPGGDLAR.V K.VGINYQPPTVVPGGDLARVQR.A K.YMACCLLYR.G
P5	Glycerate kinase <a href="#">Q0VGK3</a>	GLCTK	7/8	R.AAQAIQQLAER.L R.AAVELAGK.Q R.GATIQELNTR.K K.GPVCLLAGGEPTVQLQGSGK.G R.NQELALR.V R.VAAACLTSSTAERPLEEEAK.L R.VAQFYGLLAR.V
P6	Phenylalanine-4-hydroxylase <a href="#">P04176</a>	PH4H	33/84	K.AYGAGLLSSFGEQYCLSDKPK.L K.DEYEFFTYLDK.R K.DEYEFFTYLDKR.T R.DFLGGLAFR.V R.DKEKNTVPWFPR.T R.EDNIPQLEDVSQLQCTCTGFR.L R.FANQILSYGAELDADHPGFK.D R.FANQILSYGAELDADHPGFKDPV YR.A R.HGQPIPR.V K.IIADSINSEVGILCNALQK.I R.KQFADIAYNYR.H R.LFEENDINLTHIESRPSR.L

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				K.I.L.PLELEK.T R.LNKDEYEFFTYLDK.R R.LNKDEYEFFTYLDKR.T R.LRPVAGLLSSR.D R.NDIGATVHELSD K.QFADIAYNYR.H K.QTWGTVFR.T R.RKQFADIAYNYR.H R.SFAQFSQEIGLASLGAPDEYTEK.L K.SLRNDIGATVHELSD K.TACQEYSVTEFQPLYVAESFSD AK.E K.TACQEYSVTEFQPLYVAESFSD AKEK.V R.TFAATIPRPFSVR.Y K.THACYEHNHIFP LLEK.Y R.TIQELDR.F R.VEVL DNTQQLK.I R.VEYTEEEK.Q R.VEYTEEEKQTWGTVFR.T R.VFHCTQYIR.H K.VRTFAATIPRPFSVR.Y R.YDPYTQRVEVL DNTQQLK.I
P7	Alpha-enolase isoform 1 <a href="#">P04764</a> <a href="#">Q5BJ93</a>	ENOA Q5BJ93	12/14	K.AGYTDQVVIGMDVAASEFYR.A K.DATNVGDEGGFAPNILENK.E R.EIFDSRGNPTVEVDLYTAK.G R.IEEELGSKAK.F R.IGAEVYHNLK.N K.KLNVVEQEK.I K.LNVVEQEK.I K.SCNCLLK.V R.SGETEDTFIADLVVGLCTGQIK.T K.TIAPALVSK.K K.VNQIGSVTESLQACK.L R.YITPDQLADLYK.S
P8	NSFL1 cofactor p47 <a href="#">Q35987</a>	NSFIC	15/18	K.ASSILINEAEPTTNIQIR.L R.DLIHDQDEEEEEEGQR.F K.EANLLNAVIVQR.L R.EFVAVTGAEEDR.A R.EFVAVTGAEEDRAR.F K.EHGAVAVR.V R.GEVPALR.R R.LGAAPPEESAYVAGER.R R.LGAAPPEESAYVAGERR.R K.LGSTAPQVLNTSSPAQQAENEAK

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				.A R.RGEVPAELR.R R.SGQQIVGPPR.K K.SPNELVDDLK.G R.SYQDPSNAQFLESIR.R K.TGFSLDNGDLR.S
P8	N-myc downstream regulated gene 2, isoform CRA_c <a href="#">Q8VBU2</a>	NDRG2	5/5	K.CPVMLVVGDAQPHEDAVVECNS K.L R.DLNFER.G K.LDPTQTSFLK.M K.MADSGGQPQLTQPGK.L R.TASLTAASIDGSR.S
P9	Fructose-1,6-bisphosphatase 1 <a href="#">P19112</a>	F16P1	13/18	K.AGGTGEMTQLLNSLCTAIK.A K.AISSAVR.Q K.DALQPGR.N K.DFDPAINEYIQR.K K.FPPDNSAPYGARY K.GNIYSINEGYAK.D K.KNIYSINEGYAK.D R.KTSANEPSEKDALQPGR.N R.QAGIAQLYGIAGSTNVTGDQVK. K K.SRPSLPLPQSR.A R.TLVYGGIFLYPANK.K K.TSANEPSEKDALQPGR.N R.YVGS MVADVHR.T
P9	UBX domain-containing protein 1 <a href="#">Q499N6</a>	UBXN1	5/5	R.AQKYGGTVGSR.S R.LPDGTSLTQTFR.A R.QGQELSAAR.Q R.SPPATDPGPVPSSPR.Q K.YGGTVGSR.S
P10	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial <a href="#">F1LM47</a> <a href="#">B2RZ24</a> <a href="#">F1M6A4</a>	F1LM47 B2RZ24 F1M6A4	10/12	K.AQVLGGR.G K.AVSSQMIGQK.L K.EPVDIIEGVK.K R.EYYFAITMERS R.ICNQVLVCER.K K.IIACDDLDEAAK.M K.INFDSNSAYR.Q K.ISEIVTLAK.E K.SSDEAYAIK.K K.SSDEAYAIKK.L



#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
P10	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial <a href="#">B1H270</a> <a href="#">Q68FT4</a> <a href="#">Q5EBA9</a> <a href="#">Q499V7</a>	B1H270 Q68FT4 Q5EBA9 Q499V7	7/8	K.AQILAGGR.G R.LEGTINVQEAQNILK.S K.LLTSDPK.V R.MAENLGFLGSLK.N K.SENEPIENEAAARY K.SSGLPITSAVDLEDAAK.K K.VVGQLAQQMIGYNLTK.Q
P10	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G <a href="#">Q5RK09</a>	EIF3G	6/6	R.ADDNATIR.V K.CVTSELLK.G K.EKLPGELEPVQAAQNK.T K.ELAEQLGLSTGEK.E K.LPGELEPVQAAQNK.T R.VTNLSEDTR.E
P11	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor <a href="#">P12007</a>	IVD	10/12	R.ACDEGHITAK.D R.AFNADFR.- R.DAKLYEIGGGTSEVR.R K.FVQENLAPK.A R.GITAFIVEK.D R.GSNTCELVFEDCK.V K.IGQFQLMQGK.M K.LYEIGGGTSEVR.R K.TDLTAVPASR.G K.VPAANILSQESK.G
P12	Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1 <a href="#">O09171</a>	BHMT1	28/52	K.AGAAIVGVNCHFDPSTSLQTIK.L K.AGPWTPEAAVEHPEAVR.Q R.AGSNVMQITFTFYASEDK.L R.AGSNVMQITFTFYASEDKLENR.G R.AIAEELAPER.G R.AIAEELAPERGFPPASEK.H R.ALFEKQK.F K.AYLMSQPLAYHTPDCGK.Q K.EATTEQQLR.A R.EAYNLGVR.Y K.EGLEAAR.L K.GAAELMQQK.E K.GAAELMQQKEATTEQQLR.A R.GNYVAEK.I R.GNYVAEKISGQK.V R.GNYVAEKISGQKVNEAACDIAR.Q K.IFHQQLEVMK.K K.ISGQKVNEAACDIAR.Q R.KEYWQNLR.I

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				R.LKAYLMSQPLAYHTPDCGK.Q K.LMKEGLEAAR.L R.QVADEGDALVAGGVSQTPSYLSC K.S R.QVADEGDALVAGGVSQTPSYLSC KSETEVK.K R.QVADEGDALVAGGVSQTPSYLSC KSETEVKK.I K.TSGKPIAATMCIGPEGDLHGVSP GECAVR.L K.VNEAACDIAR.Q R.WDIQKYAR.E R.YIGGCCGFEPYHIR.A
P12	Argininosuccinate synthase <a href="#">P09034</a>	ASSY	28/46	K.APNTPDVLEIEFK.K K.APNTPDVLEIEFKK.G K.EDFEER.K R.EGAKYVSHGATGK.G R.FELTCYSLAPQIK.V K.GQVYILGR.E K.GRNDLMEYAK.Q K.GVPVKVTNVK.D K.HGVGRIDIVENR.F R.IDIVENR.F R.IDIVENRFIGMK.S K.KGVPVKVTNVK.D R.KQVEIAQR.E R.KQVEIAQREGAK.Y K.KVFIEDVSK.E R.LQSKVTAK.- R.MPEFYNR.F R.NDLMEYAK.Q K.QHGIPVTPK.S K.QVEIAQR.E K.QVEIAQREGAK.Y K.TQDPAKAPNTPDVLEIEFK.K K.TQDPAKAPNTPDVLEIEFKK.G K.VIAPWR.M K.VQSVFKGQVYILGR.E R.YLLGTSLARPCAR.K K.YVSHGATGK.G K.YVSHGATGKGNDQVR.F

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
P12	Multifunctional protein ADE2 <a href="#">P51583</a>	PUR6	20/26	K.ACGNFGIPCELR.V K.AEYEGDGIPTVFAVAGR.S R.ASKLNTWISLK.Q K.DDANNDPQWSEEQLIAAK.F R.DLKEVTPEGLQMVKK.N K.DQITAGNAAR.K K.EIVLADVIDNDSWRL K.EVTPEGLQMVK.K K.EVTPEGLQMVKK.N K.EVYELLDSPGR.V K.GPDETLR.I R.IATGSFLK.R R.IATGSFLKR.N K.IEFGVDVTTK.E K.KACGNFGIPCELR.V K.LNTWISLK.Q K.TKEVYELLDSPGR.V R.VLLQSKDQITAGNAAR.K R.VTSAHKGPDETLR.I R.VVVLMGSTSDLGHCEKI
P13	Betaine--homocysteine S- methyltransferase 1 <a href="#">O09171</a>	BHMT1	43/214	K.AGAAIVGVNCHFDPSTSLQTIK.L K.AGAAIVGVNCHFDPSTSLQTIKL MK.E K.AGPWTPEAAVEHPEAVR.Q R.AGSNVMQITFTFYASEDK.L R.AGSNVMQITFTFYASEDKLENR.G R.AGSNVMQITFTFYASEDKLENRG NYVAEK.I R.AIAEELAPER.G R.AIAEELAPERGFPPASEK.H R.ARKEYWQNL.R K.AYLMSQPLAYHTPDCGK.Q K.EATTEQQLR.A R.EAYNLGVR.Y K.EYWQNL.R K.GAAELMQQK.E K.GAAELMQQKEATTEQQLR.A R.GNYVAEK.I R.GNYVAEKISGQK.V R.GNYVAEKISGQKVNEAACDIAR. Q R.GYVKAGPWTPEAAVEHPEAVR. Q K.HGSWGSGLDMHTKPWIR.A R.IASGRPYNPSMSPDAWGVTK.G K.IFHQQLEVFMK.K

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				K.IFHQQLEVFMKK.N K.ISGQKVNAAACDIAR.Q R.KEYWQNLRI K.KIFHQQLEVFMK.K K.KIFHQQLEVFMKK.N R.LKAYLMSQPLAYHTPDCGK.Q K.LMKEGLEAARL R.LNAGEVVIGDGGFVFALEK.R R.LNAGEVVIGDGGFVFALEKR.G R.LVKAGAAIVGVNCHFDPSTSLQT IK.L K.QGFIDLPEFPFGLEPR.V R.QVADEGDALVAGGVSQTPSYLSC K.S R.QVADEGDALVAGGVSQTPSYLSC KSETEVK.K R.QVADEGDALVAGGVSQTPSYLSC KSETEVKK.I K.SETEVKK.I K.TSGKPIAATMCIGPEGDLHGVSP GECAVRL R.VATRWDIQKYAR.E K.VNEAACDIAR.Q R.WDIQKYAR.E K.YAREAYNLGVR.Y R.YIGGCCGFEPYHIR.A
P13	Argininosuccinate synthase <a href="#">P09034</a>	ASSY	32/49	K.APNTPDVLEIEFK.K K.APNTPDVLEIEFKK.G K.DG'THSTSLDLFMYLNEVAGK.H K.EDFEAR.K R.EGAKYVSHGATGK.G K.EQGYDVIAYLANIGQK.E K.FAELVYTGFWHSPECFVR.H R.FELTCYSLAPQIK.V K.GNDQVRFELTCYSLAPQIK.V K.GQVYLGR.E K.GRNDLMEYAK.Q K.GRNDLMEYAKQHGIPIVTPK.S K.GVPVKVTNVK.D K.HGVGRIDIVENR.F R.IDIVENR.F R.IDIVENRFIGMK.S K.KGVPVKVTNVK.D R.KQVEIAQR.E R.KQVEIAQREGAK.Y K.KVFIEDVSK.E

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				R.IQSKVTAK.- R.MPEFYNR.F R.NDLMEYAK.Q R.NDLMEYAKQHGIPIVTPK.S K.QVEIAQR.E K.SPWSMDENLMHISYEAGILENPK. N K.TQDPAKAPNTPDVLEIEFK.K K.TQDPAKAPNTPDVLEIEFKK.G K.VQVSVFKGQVYILGR.E K.VTNVKDGTTHSTSLDLFMYLNE VAGK.H K.YVSHGATGK.G K.YVSHGATGKGNQVRF
P13	Acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase), isoform CRA_f <a href="#">P13437</a>	THIM	32/62	R.AALSAGKVPPETIDSVIVGNVMQ SSSDAAYLAR.H K.AANEAGYFNEEMAPIEVKTK.K K.AGLSLKDMDLIDVNEAFAPQFLA VQK.S K.DAEVVLCGGTESMSQSPYSVR.N K.DFTATDLTEFAARA K.DMDLIDVNEAFAPQFLAVQK.S R.EDCDRYALQSQR.W K.EGTVTAGNASGMSDGAGVVIIAS EDAVK.K K.EGTVTAGNASGMSDGAGVVIIAS EDAVKK.H K.EGTVTAGNASGMSDGAGVVIIAS EDAVKKHNFTPLAR.V R.GVFIVAAK.R R.GVFIVAAKR.T K.HNFTPLAR.V R.ITAHLVHEL.R R.ITAHLVHELRR.R K.KHNFTPLAR.V R.LCGSGFQSIVSGCQEICK.D K.LEDTLWAGLTDQHVK.L K.LPMGMTAENLAAK.Y K.RTPFGAYGGLK.D K.SLDLDPK.T K.SLDLDPKTNVSGGAIALGHPLG GSGR.I K.TNVSGGAIALGHPLGGSGR.I R.TPFGAYGGLK.D R.VGVPTETGALTLNRL K.VPPETIDSVIVGNVMQSSDAAYL AR.H R.VVG YFVSGCDPAIMGIGVPAIT

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				GALK.K R.VVGYFVSGCDPAIMGIGPVPALT GALKK.A R.WKAANEAGYFNEEMAPIEVK.T R.YALQSQR.W K.YNISREDCDR.Y K.YNISREDCDRYALQSQR.W
P14	Fructose-bisphosphate aldolase B <a href="#">P00884</a> <a href="#">Q66HT1</a>	ALDOB Q66HT1	14/27	R.ALQASALAAWGGK.A K.ATQEAFMK.R K.ATQEAFMKR.A K.ELSEIAQR.I K.ETTIQGLDGLSER.C K.GILAADESVGTMGNR.L R.IKVENTEENR.R R.IKVENTEENRR.Q R.ISDQCSSLAIQENANALAR.Y K.KATQEAFMKR.A K.KDGVDFGK.W K.LDQGGAPLAGTNK.E K.LSFSYGR.A K.VLAAVYK.A
P15	Fructose-bisphosphate aldolase B <a href="#">P00884</a> <a href="#">Q66HT1</a>	ALDOB Q66HT1	16/37	R.ALQASALAAWGGK.A K.ATQEAFMK.R K.ATQEAFMKR.A K.ELSEIAQR.I K.ETTIQGLDGLSER.C R.FPALTSEQK.K K.GILAADESVGTMGNR.L K.GIVVGIKLDQGGAPLAGTNK.E R.IKVENTEENR.R R.ISDQCSSLAIQENANALAR.Y K.KATQEAFMKR K.KDGVDFGK.W K.KELSEIAQR.I K.LDQGGAPLAGTNK.E K.LDQGGAPLAGTNKETTIQGLDGLSER.C K.LSFSYGR.A
P15	Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial <a href="#">Q5XIC0</a>	ECI2	5/10	K.AAEMLLFGK.K R.ATQQDFENAMNQVK.L K.GILVTSEGGITK.I K.LHAVNEEECTTLR.A R.QNYVDLVSSLSSESSEASSQGK.G

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
P16	Fructose-bisphosphate aldolase B <a href="#">P00884</a> <a href="#">Q66HT1</a>	ALDOB Q66HT1	18/37	R.ALQASALAAWGGK.A K.ATQEAFMK.R K.ATQEAFMKR.A R.CAQYKKDGVDFGK.W K.DGVDFGKWR.A K.ELSEIAQR.I K.ETTIQGLDGLSER.C R.FPALTSEQKK.E K.GILAADESVGTMGNR.L K.GILAADESVGTMGNRLQRI R.IKVENTEENR.R R.ISDQCPSLAIQENANALAR.Y R.IVANGKGILAADESVGTMGNR.L K.KATQEAFMKR.A K.KELSEIAQR.I K.LDQGGAPLAGTNK.E K.LDQGGAPLAGTNKETTIQGLDGLSER.C K.LSFSYGR.A
P16	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Z <a href="#">Q3B7D1</a>	UBE2Z	5/7	R.DIMSIYKEPPPGMFVVPDVTVDMTK.I K.IHALITGPFDTPEYEGGFVFR.C R.LHNENAEMDSDSSSSGTETDLHGSLRV.- K.LMTTGNNIVR.F K.SFLEYDFYEVACK.D
P17	Triosephosphate isomerase <a href="#">P48500</a>	TPIS	3/3	K.CNVSEGVAQCTR.I K.IAVAAQNCYK.V R.IYGGSVTGATCK.E
P19	Actin, gamma 1 propeptide-like <a href="#">P63259</a> <a href="#">P60711</a>	ACTG ACTB	5/5	K.AGFAGDDAPRA K.EITALAPSTMK.I R.KYSVWIGGSILASLSTFQQMWISK.Q K.MTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGR.T K.SYELPDGQVITIGNER.F
P20	Fatty acid-binding protein, liver <a href="#">P02692</a>	FABPL	15/57	K.AMGLPEDLIQK.G K.AMGLPEDLIQKGGK.D K.AVVKMEGDNK.M K.AVVKMEGDNKMVITTFK.G K.DIKGVSEIVHEGK.K K.DIKGVSEIVHEGKK.V K.GVSEIVHEGK.K K.GVSEIVHEGKK.V K.MEGDNKMVITTFK.G

#	Mascot-Proteinname (Uni-Prot Acc. Nummer)	Spot Label	Passende Peptide	Sequenzen der passenden Peptide
				K.SVTEFNGDITNTMTLGDIVYK. R K.SVTEFNGDITNTMTLGDIVYKR .V K.VIHNEFTLGEECELETMTGEK.V K.VIHNEFTLGEECELETMTGEKV K.A K.VKLTITYGSK.V K.YQVQSQENFEPFMK.A



## **Danksagung**

Danken möchte ich Frau Prof. Mihm, die nach etlichen Turbulenzen meine Promotionsarbeit übernommen hat und unserem Promotor Herr Prof. Oppermann, der diesen Weg unterstützt hat.

Ganz besonders danken möchte ich meinem Betreuer Dr. med. Frank Schultze, der mich und meinen Kollegen Christian Riedel in der ganzen Zeit nicht aufgegeben und mit uns trotz aller Schwierigkeiten das Ganze über die Bühne gebracht hat.

Ein weiterer Dank geht an unsere MTA Dorothea Fey, die immer unsere gute Seele war, und uns bei allen Versuchen betreut hat.

Mein größter Dank an Frau Dr. rer. nat. Bettina Bareth. Sie hat mit ganz viel Rat und Tat an dieser Promotion mitgewirkt.

Dafür an alle meinen herzlichsten Dank.

## Lebenslauf

Mein Name ist Hartmut Swoboda. Ich wurde am 15.10.1983 in Heidelberg als zweiter Sohn eines Ärztepaares geboren. Im Jahr 1985 zogen meine Eltern Gisela und Wolfgang Swoboda mit mir und meinem Bruder Peter nach Balingen am Fuße der Schwäbschen Alb. Dort besuchte ich den evangelischen Kindergarten, die Sichelschule während meiner Grundschulzeit und das Allgemeine Gymnasium Balingen bis zur Mittleren Reife. Anschließend wechselte ich für die Oberstufe an das Technische Gymnasium, an dem ich 2003 meine Hochschulreife in Form des allgemeinen Abiturs erreichte. Von Oktober 2003 bis einschließlich Oktober 2004 leistete ich meinen Grundwehrdienst bei der Bundeswehr in der Abteilung ABC/SeS mit Sitz in Sonthofen und nahm während dieser Zeit mit Erfolg an der Offiziersprüfung teil. Ohne das Offizierspatent anzunehmen, schied ich aus der Bundeswehr aus und begann im Frühjahr 2005 eine Ausbildung zum Rettungssanitäter in Berlin. Nach mehreren Bewerbungen für einen Medizinstudienplatz absolvierte ich die Rettungsdienstschule in Karlsruhe und ließ mich zum Rettungsassistenten ausbilden. Beim Roten Kreuz in Balingen arbeitete ich als Rettungsassistent bis zu meinem Studienbeginn im Frühjahr 2008. Meine Eltern förderten mich sportlich schon sehr früh. So kam ich mit vier bereits in die Turnabteilung der TSG Balingen, in der ich bis heute Mitglied bin. Meine musikalische Ausbildung begann ich im Alter von fünf Jahren an der Blockflöte und begann mit sechs Jahren mit Trompetenunterricht. Mit 21 wechselte ich zum Horn, das ich während meines Studiums im Medizinerorchester der Universitätsmedizin Göttingen spielte. Dieses leitete ich als Vorstand für vier Jahre von 2009-2013. 2014 beendete ich erfolgreich mein Studium der Humanmedizin. Während meines Studiums war ich Mitglied in der Fachschaft der Universitätsmedizin und übernahm in dieser Zeit Verantwortung als Mitglied im Studierendenparlament und als Mitglied in der Studienkommission. Nach abgeschlossenem Staatsexamen begann ich meine Weiterbildung zum Allgemeinmediziner in der Abteilung der Gefäß- und Viszeralchirurgie der UMG bei Prof. Ghadimi und wechselte 2015 zu den Sanakliniken Biberach. Dort setzte ich meine Ausbildung zunächst im Bereich der Orthopädie und anschließend im Bereich der Inneren Medizin fort.