

Proteomics in der modernen Toxikologie – Identifizierung,  
Charakterisierung und Prävalidierung von Protein-Biomarkern zur  
verbesserten Vorhersage von Leberkanzerogenese

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von

Kerstin Fella  
aus Offenbach am Main

Frankfurt (2005)  
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Michael Karas

Prof. Dr. Michael Arand

Datum der Disputation: 13. Januar 2006

*„Immer muss der Wissende darauf gefasst sein, später einmal wünschen zu müssen, er hätte nicht oder anders gehandelt.“ (Hans Jonas)*

*Meinen Eltern gewidmet*

# INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung .....	VIII
Verzeichnis verwendeter Abkürzungen .....	X
Verzeichnis verwendeter Maßeinheiten .....	XI
<b>A EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Was ist „Toxicoproteomics“? .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Analyse des Proteoms .....	1
1.2 Die Aufgaben der klassischen und modernen Toxikologie .....	2
1.2.1 Prüfmethode in der klassischen Toxikologie .....	3
1.2.2 Ansätze in der modernen Toxikologie .....	6
1.3 Proteomics in der modernen Toxikologie .....	8
1.3.1 Biomarker in der Toxikologie .....	9
<b>2 Methoden der Proteomforschung .....</b>	<b>10</b>
2.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese .....	10
2.2 MALDI-Massenspektrometrie (MALDI-MS) .....	12
2.2.1 Prinzip von MALDI-MS .....	12
2.2.2 Proteinidentifizierung .....	14
2.2.3 Quantitative Massenspektrometrie .....	14
2.2.3.1 Strategien zur Quantifizierung .....	15
2.2.3.2 iTRAQ-Technologie .....	16
2.3 Flüssigchromatographie .....	18
2.4 SELDI-Proteinchip-Technologie .....	19
<b>3 Chemische Kanzerogenese: Die Leber im Fokus .....</b>	<b>21</b>
3.1 Wirkungsweise chemischer Kanzerogene .....	21
3.2 Die Leber als zentrales Organ im Fremdstoffmetabolismus .....	23
3.3 Präneoplastische Veränderungen in der Leber .....	25
3.4 Modellversuch mit N-Nitrosomorpholin .....	27
<b>B ZIELSETZUNG .....</b>	<b>29</b>
<b>C MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
<b>1 Verwendete Materialien .....</b>	<b>30</b>
1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	30
1.2 Kits .....	31
1.3 Geräte und Gebrauchsmaterialien .....	32
1.4 Software .....	33
<b>2 Tierstudien .....</b>	<b>34</b>
2.1 Behandlung der Tiere .....	34
2.2 Probenentnahme .....	35
<b>3 Proteinextraktion aus tierischem Gewebe .....</b>	<b>35</b>
3.1 Komplette Extraktion .....	36
3.2 Partielle Extraktion .....	36

<b>4</b>	<b>Bestimmung der Proteinkonzentration</b> .....	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen</b> .....	<b>37</b>
5.1	Eindimensionale Gelelektrophorese .....	38
5.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese .....	38
5.2.1	Trennung in der ersten Dimension .....	38
5.2.2	Äquilibrierung.....	39
5.2.3	Präparation von Polyacrylamidgelen .....	39
5.2.4	Trennung in der zweiten Dimension .....	40
5.3	Proteinfärbung .....	41
5.3.1	Fluoreszenzfärbung.....	41
5.3.2	Silberfärbung nach Heukeshoven.....	41
5.3.3	Coomassiefärbung .....	42
5.3.4	Zinkfärbung.....	42
5.4	Digitalisierung von 2-DE-Gelen.....	42
5.5	Computergestützte Bildanalyse .....	43
<b>6</b>	<b>Massenspektrometrische Proteinidentifizierung</b> .....	<b>44</b>
6.1	Proteolytische Spaltung von Proteinen .....	44
6.1.1	Verdau im Gel.....	44
6.1.2	Verdau in Lösungen .....	45
6.2	MALDI-MS .....	45
6.2.1	Probenvorbereitung.....	45
6.2.2	Präparation des Proben Tellers .....	45
6.2.3	Datenaquisition.....	45
6.2.4	Datenbanksuche.....	46
<b>7</b>	<b>Chromatographische Trennung von Proteinen</b> .....	<b>47</b>
7.1	Zweidimensionale Trennung.....	47
7.1.1	Ionenaustausch-Chromatographie .....	47
7.1.2	Umkehrphasen-Chromatographie .....	47
7.2	Gelfiltration .....	48
<b>8</b>	<b>SELDI-MS</b> .....	<b>49</b>
8.1	Chipvorbereitung .....	49
8.1.1	Ionenaustauscher-Chips.....	49
8.1.2	Metallaffinitäts-Chips .....	50
8.1.3	Gold-Chips.....	50
8.2	Erstellung von Proteinprofilen der Leberlysate .....	51
8.3	Datenaquisition und Analyse der Spektren.....	51
<b>9</b>	<b>Quantitative MS mittels iTRAQ-Technologie</b> .....	<b>52</b>
9.1	Probenvorbereitung .....	52
9.2	Chromatographische Auftrennung der Peptide.....	53
9.3	Protein-Identifizierung und -Quantifizierung.....	53
<b>10</b>	<b>Elution von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen</b> .....	<b>54</b>
<b>11</b>	<b>Immunoblotting</b> .....	<b>56</b>
<b>12</b>	<b>Genexpressionsanalyse</b> .....	<b>57</b>
12.1	Isolierung von RNA aus Gewebe.....	57
12.2	Quantifizierung und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren .....	58
12.3	Reverse Transkription.....	58
12.4	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR .....	59

<b>D</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>62</b>
<b>1</b>	<b>Histopathologie</b> .....	<b>63</b>
1.1	Tierstudie 1: Histopathologische Befunde .....	63
1.2	Tierstudie 2: Histopathologische Befunde .....	65
<b>2</b>	<b>2D-Elektrophorese – MALDI-MS</b> .....	<b>66</b>
2.1	Qualitäts- und Datenanalyse der 2-DE-Gele .....	66
2.1.1	<i>Spot</i> -Detektion in 2-DE-Gelen .....	66
2.1.2	<i>Gel-Matching</i> .....	67
2.1.3	Differentielle Analyse der 2-DE-Gele .....	69
2.2	Protein-Identifizierung aus 2-DE-Gelen zur Standardisierung .....	71
2.3	Tierstudie 1: Differentielle Analyse der 2-DE-Gele .....	73
2.3.1	Differentiell exprimierte Proteine Tag 1 .....	73
2.3.2	Differentiell exprimierte Proteine Woche 3.....	75
2.3.3	Differentiell exprimierte Proteine Woche 25.....	76
2.3.4	Identifizierung prädiktiver Biomarker .....	77
2.4	Tierstudie 2: : Differentielle Analyse der 2-DE-Gele .....	79
2.4.1	Differentiell exprimierte Proteine.....	80
2.5	Deregulierte Proteine zu frühen Zeitpunkten beider Studien .....	83
<b>3</b>	<b>Western Blotting</b> .....	<b>85</b>
<b>4</b>	<b>Quantitative Massenspektrometrie</b> .....	<b>87</b>
4.1	Einfluss des Extraktions-Verfahrens auf die quantitative MS.....	87
4.2	Vorfractionierung durch Gelfiltration .....	89
4.3	Ermittlung der Reproduzierbarkeit der iTRAQ-Methode .....	92
4.4	Differentielle Analyse mittels iTRAQ-Reagenzien.....	94
<b>5</b>	<b>SELDI-MS</b> .....	<b>97</b>
5.1	Ermittlung der geeigneten Chip-Präparationsbedingungen .....	97
5.2	Tierstudie 1: Differentielle Analyse der Proteinprofile .....	99
5.3	Tierstudie 2: Differentielle Analyse der Proteinprofile .....	102
<b>6</b>	<b>Ansätze zur Identifizierung von Proteinen, repräsentiert durch Signale in SELDI-Spektren</b> .....	<b>103</b>
6.1	Chromatographische Trennung zur Identifizierung von Proteinen aus SELDI-Signalen.....	103
6.2	Elution von intakten Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	107
6.3	Korrelation von identifizierten Proteinen mit SELDI-Signalen .....	113
<b>7</b>	<b>Genexpressionsanalyse</b> .....	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenführung von Einzelergebnissen</b> .....	<b>120</b>
8.1	Ergebnisse der 2-DE/MS-Analyse und des Western Blottings .....	120
8.2	Ergebnisse der 2-DE/MS- und iTRAQ-Analyse .....	121
8.3	Ergebnisse der 2-DE/MS- und Genexpressionsanalyse.....	123
8.4	Ergebnisse der SELDI-Analyse und der histopathologischen Untersuchungen .....	125
<b>E</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>126</b>
<b>1</b>	<b>Tierstudie und Histopathologie</b> .....	<b>126</b>
<b>2</b>	<b>2-D-Elektrophorese/MALDI-MS</b> .....	<b>128</b>
2.1	Methodik .....	128
2.2	Differentielle Expressionsanalyse .....	131
2.2.1	Akut toxische NNM-Effekte.....	132

---

2.2.2	Subakute und chronisch toxische NNM-Effekte.....	134
2.2.3	Prädiktive Protein-Biomarker .....	138
2.2.4	NNM-Effekte in Tierstudie 2.....	140
2.2.4.1	Effekte im Verlauf der Zeit .....	140
2.2.4.2	Dosisabhängigkeit der NNM-Effekte .....	141
<b>3</b>	<b>SELDI .....</b>	<b>143</b>
3.1	Methodik .....	143
3.2	Differentiell exprimierte Signale .....	145
3.3	SELDI und Proteinidentifizierung .....	148
<b>4</b>	<b>Prävalidierung der 2-DE/MS-Biomarker .....</b>	<b>151</b>
4.1	Prävalidierung durch Western Blotting.....	152
4.2	Prävalidierung durch quantitative MS .....	153
4.3	Vergleich der Gen- und Proteinexpression .....	158
4.4	Fazit der Biomarker-Prävalidierung .....	163
<b>F</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>165</b>
<b>G</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>167</b>
<b>H</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>170</b>
<b>I</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>180</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>204</b>
	<b>Publikationen .....</b>	<b>205</b>

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 2002 bis Juli 2005 als externe Dissertation der Universität Frankfurt am Institut für Toxikologie der Merck KGaA in Darmstadt durchgeführt. Allen, die zu ihrem Gelingen beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Bei Merck wurde meine Arbeit von Frau Dr. Michaela Kröger, Leiterin der Abteilung Toxikoproteomics, betreut. Ihr gilt besonderer Dank für drei Jahre konstruktiver Zusammenarbeit, für das in mich gesetzte Vertrauen, für die stets offene Tür, verbunden mit intensiven fachlichen Diskussionen, sowie für die Korrektur meiner Arbeit.

Herrn Professor Dr. Michael Karas vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Frankfurt möchte ich sowohl für die freundliche und überaus unkomplizierte Betreuung als auch für die Begutachtung meiner extern angefertigten Arbeit herzlich danken.

Ebenfalls Dank gebührt Herrn Dr. Peter-Jürgen Kramer, Leiter des Instituts für Toxikologie, für meine Anstellung als Doktorandin sowie die Genehmigung zahlreicher Weiterbildungen.

Herrn Prof. Michael Arand danke ich, dass er sich als Zweitgutachter zur Verfügung gestellt hat.

Darüber hinaus gilt mein herzlicher Dank Herrn Dr. Matthias Glückmann für die Unterstützung bei unzähligen MS-Messungen, für die Beantwortung aller MS-bezogenen Fragen, für fachliche Anregungen und insbesondere für die konstruktive Kritik bei der Durchsicht meiner Arbeit.

Bettina von Eiff, Yvonne Walter, Ute Knapp und Christina Fränkle danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und die Unterstützung im Labor.

Des Weiteren danke ich Dr. Philip Hewitt und Dr. Stefan Müller für ihre stete Hilfsbereitschaft. Phil danke ich darüber hinaus für die Korrekturen zahlreicher englischer Texte.

Herzlich danken möchte ich Stephanie Simon, Nadine Zidek, Gregor Tuschl, Jens Hrach, Francois Busquet, Jürgen Beigel, Manuel Ammerschläger und allen anderen früheren und jetzigen Mitarbeitern der Moltox, mit denen ich in den drei Jahren einen Büroplatz teilen durfte und die ein hervorragendes Arbeitsklima geschaffen haben, das mich auf meinem Weg sehr motiviert hat. Ebenso danke ich Claudia Clement und Margret Kling für ihren Beitrag zu dem guten Arbeitsklima und die offenen Ohren für alle organisatorischen Belange.

Dank gebührt außerdem Frau Dr. Carina Ittrich vom DKFZ Heidelberg und Suse Beyer, die sich immer wieder bemüht haben, mir die Welt der Biostatistik verständlich zu machen.



Herrn Jörg Hiller danke ich, dass er stets für alle Fragen rund um den Computer zur Verfügung stand und sich um die schnellstmögliche Problem-Lösung bemüht hat.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. Jürgen Hellmann für die Durchführung der Tierstudien danken. Die Mitarbeiter von Applied Biosystems Dietmar Waidelich, Dietrich Merkel und Volker Krufft, die mir bei den Messungen helfend zur Seite gestanden haben, sind ebenfalls dankend zu erwähnen.

Meinen Mädels Silke, Conny, Zieni und Anke danke ich aufrichtig für ihre seelische und moralische Unterstützung.

Allen voran aber gilt der Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern für ihre großartige und bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen. Ohne ihre Ermutigung wäre diese Arbeit nie entstanden.

Liebevoller Dank gilt Christian für seine unerschütterliche Geduld mit mir.

## Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

ACN	Acetonitril
ADK	Adenosinkinase
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
AN	<i>Accession Number</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHAPS	3-[N-(Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfat
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizimsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COMT	Catechol O-Methyltransferase
DNA	<i>Desoxy ribonucleic acid</i>
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
EU	Europäische Union
FAPH	Ameisensäure/Acetonitril/Isopropanol/Wasser
F16P	Fruktose-1,6-Bisphosphatase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT	Fourier-Transform-Ionen-Cyclotron
GIST	<i>Global Internal Standard Technology</i>
GLP	<i>Good Laboratory Practice</i>
GPDA	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase
GST-P	Glutathion S-Transferase, placentare Form
3-HAO	3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSP	Hitzeschockprotein
ICAT	<i>Isotope-Coded Affinity Tagging</i>
ICH	<i>International Conference of Harmonisation</i>
ICPL	<i>Isotope-Coded Protein Label</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
iTRAQ	<i>Isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation</i>
KG	Körpergewicht
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LD <sub>50</sub>	mittlere letale Dosis
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie

---

Mudpit	<i>Multi-dimensional Protein Identification Technology</i>
MTD	Maximal Tolerierte Dosis
MUP	<i>Major urinary</i> Vorläufer-Protein
MW	<i>Molecular Weight</i>
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NNM	N-Nitrosomorpholin
OD	Optische Dichte
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDI	<i>Protein-Disulfidisomerase</i>
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
PRG	Peptid-reaktive Gruppe
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals</i>
RF	Regulationsfaktor
RLFB	<i>Rat Liver Foci Bioassay</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rRNA	<i>Ribosomal RNA</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SAX	<i>Strong Anionic Exchanger</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
SELDI	<i>Surface Enhanced Laser Desorption and Ionisation</i>
SILAC	<i>Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture</i>
SMP-30	Senescence Marker Protein
SPA	Sinapinsäure
SUAC	N-Hydroxyarylamino-Sulfotransferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>Time of Flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
vgl	vergleiche
WCX	<i>Weak Cationic Exchanger</i>
2-DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese

## Verzeichnis verwendeter Maßeinheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Å	Angström
Da	Dalton
dpi	<i>dots per inch</i>
g	Gramm

h	Stunde(n)
Hz	Hertz
k	Kilo
l	Liter
m	Meter
M	Molarität
m/v	Gewicht pro Volumen
min	Minute(n)
ppm	<i>parts per million</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
sec	Sekunde(n)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen

# A EINLEITUNG

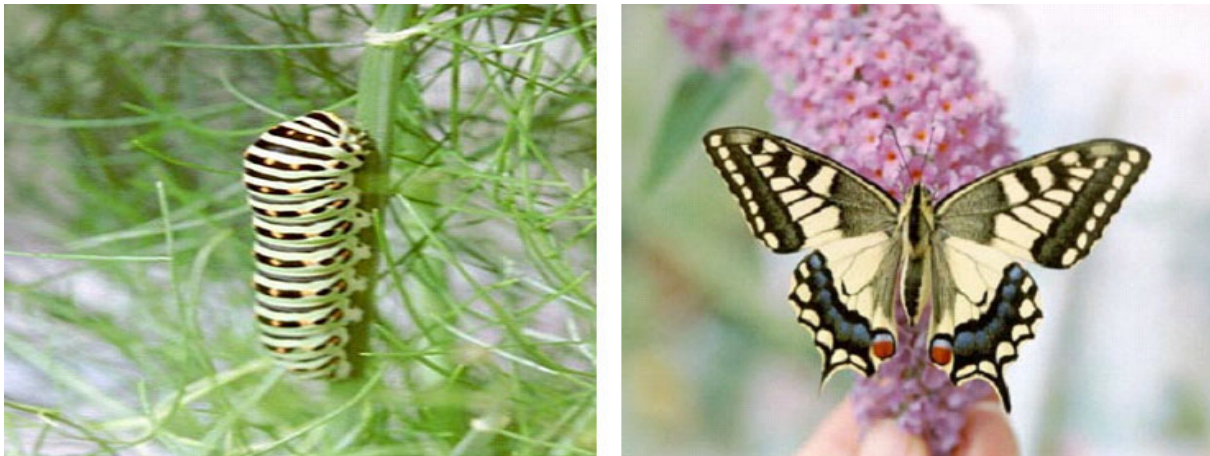
## 1 Was ist „Toxicoproteomics“?

Der Begriff *Toxicoproteomics* erschien zum ersten Mal 2002 in einer Publikation von Lasantha Bandara und Sandy Kennedy (Bandara, 2002) und beschreibt die Verschmelzung von klassischen Testsystemen der Toxikologie mit der Disziplin der globalen Proteinexpressionsanalysen.

### 1.1 Die Analyse des Proteoms

Der Begriff „Proteom“ wurde 1994 vom Australier Marc Wilkins auf einem Kongress in Siena definiert als die Gesamtheit aller **Proteine**, die von einem **Genom** zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus exprimiert werden. Im Gegensatz zum zeitlich konstanten Genom ist das Proteom in Abhängigkeit von inneren und äußeren Faktoren eine dynamische und flexible Größe (Anderson und Anderson, 1998). Die Proteomanalyse ist daher eine Momentaufnahme und basiert auf der Annahme, dass biologische Prozesse und Systeme durch qualitative und quantitative Charakterisierung der Expressionsmuster der Proteine beschrieben werden können. Dabei gestaltet sich die Analyse des Proteoms wesentlich komplexer als die des Genoms. Schätzungen gehen davon aus, dass 30.000 humane Gene in ca. 100.000 Transkripten resultieren (Harrison, 2002). Jedes dieser Transkripte kann durch alternatives *Splicing* zu verschiedenen Proteinen translatiert werden (Harrison, 2002). Komplexität und Dynamik der exprimierten Proteine erhöhen sich noch zusätzlich durch mögliche posttranslationale Modifizierungen wie Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Methylierungen oder Acetylierungen, die alle die Proteine in ihrer Funktion und Aktivität entscheidend beeinflussen können. Protein-Interaktionen wie beispielsweise die Bildung von Multi-Protein-Komplexen tragen des Weiteren zur Dynamik der Proteinmuster bei. Da sich zudem kleinste Veränderungen von äußeren wie inneren Faktoren im Proteom widerspiegeln, ist die genaue Kenntnis über den Zustand des zu untersuchenden Systems eine wichtige Voraussetzung für Proteomanalysen. Einem einzigen Genom können so theoretisch unendlich viele Proteome zugeordnet werden, was sich sehr eindrucksvoll am Beispiel von Raupe und Schmetterling

(Abbildung A-1) zeigen lässt, die beide ein identisches Genom, aber grundverschiedene Proteome besitzen.



**Abbildung A-1: Raupe und Schmetterling des Pfauenauges (Quelle: [www.schmetterling-raupe.de](http://www.schmetterling-raupe.de))**

Beide Organismen haben dasselbe Genom, aber sehr unterschiedliche Proteome.

## 1.2 Die Aufgaben der klassischen und modernen Toxikologie

*„Alle Dinge sind Gift und nichts ohne Gift;  
allein die Dosis macht, dass ein Ding kein  
Gift ist.“* (Paracelsus, 1493-1541)

Der Begriff Toxikologie geht auf die griechischen Worte *toxicon* (Gift) und *logos* (Lehre) zurück. Wie diese Definition zeigt, beschäftigt sich die Toxikologie mit den schädlichen Wirkungen chemischer wie auch natürlicher Stoffe auf Mensch und Umwelt. Die experimentelle Toxikologie befasst sich mit der Aufgabe, Schadwirkungen von Substanzen zu erkennen und zu beschreiben. Dazu erfolgt die Durchführung definierter toxikologischer Prüfungen, die für die behördliche Zulassung von Arznei- und Pflanzenschutzmitteln oder Anmeldung neuer Chemikalien gefordert werden<sup>1</sup>. Der Bereich der sogenannten regulatorischen Toxikologie befasst sich daher mit der Bewertung der experimentell erhobenen Befunde hinsichtlich des Gefährdungspotentials eines Stoffes, das sich für Mensch und Umwelt ergibt.

---

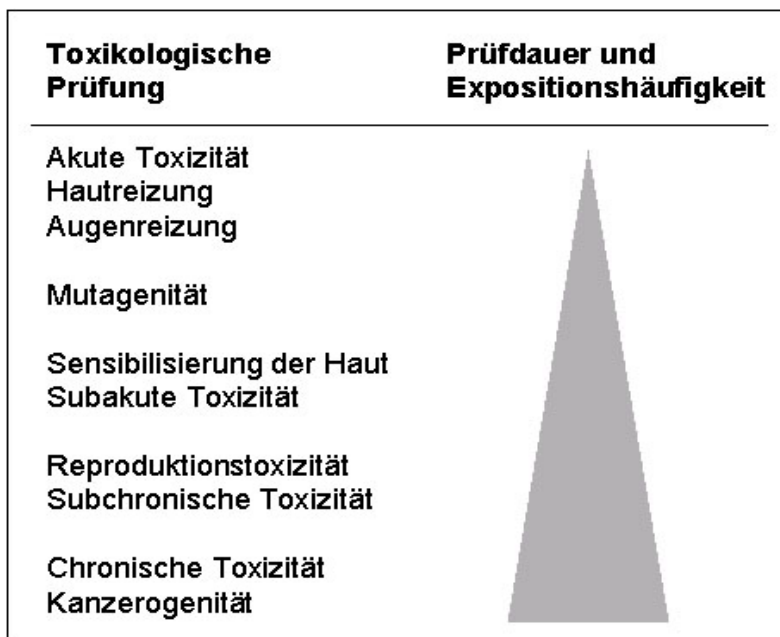
<sup>1</sup> Standardvorschriften zur Prüfung von Chemikalien und Pflanzenschutzmitteln sind in OECD-Richtlinien, Vorschriften zur Prüfung von Arzneimitteln in den ICH-Guidelines festgeschrieben (<http://www.oecd.org> und <http://www.ich.org>). Ein Aktualisierungsprozess sorgt dafür, dass die Methoden ständig an den technischen Fortschritt angepasst werden.

Als wichtigen Baustein für die wissenschaftliche Beurteilung der Gefährdung strebt die moderne Toxikologie nach der Aufklärung von Mechanismen der Toxizität. Dies impliziert das Verständnis der toxikologisch relevanten Vorgänge auf molekularer Ebene, das auch von Seiten der regulatorischen Toxikologie immer mehr gefordert wird.

Bei allen Ansätzen der modernen Toxikologie, alternative Methoden aufzuzeigen und zu entwickeln, beruhen die behördlich anerkannten Prüfungen zum großen Teil immer noch auf dem klassischen Tierversuch.

### 1.2.1 Prüfmethode in der klassischen Toxikologie

Zur behördlichen Registrierung oder Zulassung von Chemikalien, Pflanzenschutzmitteln, Arzneimitteln etc. notwendige toxikologische Untersuchungen, die vorrangig der Risikobewertung für den Menschen dienen und im Folgenden näher beschrieben werden sollen, lassen sich grob nach der Expositionsdauer der Versuchstiere gegenüber der Prüfsubstanz einteilen (Abbildung A-2).



**Abbildung A-2: Toxikologische Prüfmethode in Abhängigkeit der Expositionsdauer (modifiziert nach Kramer, von Landenberg, 2004).**

Während zur Prüfung auf akute Toxizität nur eine einmalige Applikation der Testsubstanz an die Versuchstiere notwendig ist, sind für die Prüfungen auf Mutagenität und subakute Toxizität wiederholte Verabreichungen erforderlich. Zur Prüfung auf subchronische und chronische Toxizität sowie Kanzerogenität erfolgt eine dauerhafte Behandlung der Versuchstiere mit den Testsubstanzen.

Die Prüfungen auf akute Toxizität sowie Haut- und Augenreizung sollen Schädigungsmuster nach einmaliger hoher Exposition aufzeigen. Indiziert sind diese Tests vor allem, um Risiken zu erfassen, die sich beispielsweise bei Transportunfällen oder Betriebsstörungen am Arbeitsplatz ergeben können. Sie

geben aber auch Aufschluss über die Höhe der Dosierungen in Folgestudien mit wiederholter Applikation. Am Ende des Versuchs werden die Tiere seziert und auf makroskopisch erkennbare Organveränderungen untersucht. Histologische Untersuchungen schließen sich bei spezifischen Fragestellungen an. Tabelle A-1 gibt Aufschluss über die Anzahl an Dosisgruppen und Versuchstieren, die für die einzelnen Prüfmethode zum Einsatz kommen.

**Tabelle A-1: Überblick über toxikologische Prüfungen und den Bedarf an Versuchstieren.**

Mit der Prüfung auf akute Toxizität über subakute, subchronische und chronische Toxizität bis hin zur Prüfung auf Kanzerogenität nehmen sowohl die Dauer der Behandlung der Versuchstiere mit den Testsubstanzen wie auch die Anzahl der Versuchstiere zu.

Prüfung	Expositions-dauer	Kontroll-gruppen	Dosis-gruppen	Tiere gleichen Geschlechts pro Gruppe	Tierzahl gesamt (beide Geschlechter)
Akute Toxizität	einmalig	-	3	3	18
Subakute Toxizität	28 Tage	1	3	5	40
Subchronische Toxizität	90 Tage	1	3	10	80
Chronische Toxizität	12 Monate	1	3	20	140
Kanzerogenität	18-24 Monate	1	3	50	400

Zur Prüfung auf subakute und subchronische Toxizität werden die Testsubstanzen über einen längeren Zeitraum täglich appliziert („28-Tage“ und „90-Tage-Test“, vgl. Tabelle A-1). Die Tests vermitteln Informationen über die Zielorgane und wesentliche toxische Wirkungen der Substanzen. Auch verzögert einsetzende Wirkungen, Reversibilität von Effekten und adaptive Prozesse des Organismus, beispielsweise durch Enzyminduktion, sind dadurch erfassbar. Darüber hinaus wird der „90-Tage-Test“ in der Routine eingesetzt, um für nachfolgende Kanzerogenitätsstudien die höchste Dosis festzulegen. Hämatologische, klinisch-biochemische und histopathologische Untersuchung aller Organe werden bei subakuter und subchronischer Toxizitätsprüfung zumindest in der höchsten Dosisgruppe standardmäßig durchgeführt.

Die Prüfung auf chronische Toxizität über einen Zeitraum von mindestens zwölf Monaten ist vor allem bei Stoffen angezeigt, die als Arzneimittel in einer Dauermedikation eingesetzt werden sollen. Aber auch Substanzen, durch die eine dauerhafte Exposition der Allgemeinbevölkerung möglich ist, wie Industriechemikalien, Nahrungsmittelzusatzstoffe, Pestizide oder Lösemittel, werden einer chronischen Prüfung unterzogen.



Häufig werden diese Prüfungen in Verbindung mit Kanzerogenitätsstudien durchgeführt. Bei dieser Art der Studie wird das Krebs erzeugende Potential von Substanzen im Langzeitversuch an Ratten oder Mäusen über die größte Spanne ihrer Lebenszeit geprüft. Kanzerogenitätsstudien stellen damit die zeitaufwendigsten Prüfmethode mit dem höchsten Bedarf an Versuchstieren dar. Sehr kritisch für die Durchführung von Kanzerogenitätsstudien ist die Wahl der höchsten Dosierung. Einerseits soll das vorzeitige Absterben der Versuchstiere aufgrund chronisch-toxischer Effekte verhindert werden, andererseits muss die applizierte Substanzmenge hoch genug sein, um in der Versuchstiergruppe eine messbare Tumorzinzidenz innerhalb der Lebenszeit der Tiere auszulösen (Eisenbrand und Metzler, 2002). Daher wird die höchste Dosis – wie bereits beschrieben – im vorangeschalteten „90-Tage-Test“ ermittelt und als maximal tolerierte Dosis (MTD) bezeichnet. Die MTD bezeichnet jene Dosis, die im „90-Tage-Test“ nicht mehr als 10% verzögerte Körpergewichtsentwicklung im Vergleich zur Kontrolle verursacht. Üblicherweise liegt sie um ein Vielfaches höher als die Dosis, der der Mensch tatsächlich jemals ausgesetzt ist.

Studien zur Reproduktionstoxikologie lassen sich bezüglich der Expositionsdauer nicht eindeutig in das oben aufgeführte Schema (Abbildung A-2) einordnen. Die Versuchstiere werden während definierter Stadien der Reproduktion mit der Prüfsubstanz behandelt, um dadurch ausgelöste Störungen im männlichen und/oder weiblichen Reproduktionssystem aufzuzeigen. Je nach betrachtetem Endpunkt (embryo-fetale Toxizität, Fertilität, postnatale Entwicklung) kann die Exposition über wenige Tage bis mehrere Monate erfolgen.

Sehr kurz hingegen ist die Behandlung der Tiere mit der Testsubstanz bei Mutagenitätsprüfungen. Daneben stehen zur Prüfung auf das DNA-schädigende Potential einer Substanz mittlerweile ganze Testbatterien *in-vitro* zur Verfügung, angeführt von etablierten Methoden wie dem klassischen Ames-Test (Ames, 1973).

### 1.2.2 Ansätze in der modernen Toxikologie

Bereits 1959 wurde von Russel und Burch (Russel und Burch, 1959) unter den Schlagwörtern „*replace, reduce, refine*“ ein Konzept zur Verminderung von Tierversuchen entwickelt: das „3-R-Konzept“. Es fordert den Ersatz von Tierversuchen durch *in-vitro*-Methoden, eine Verringerung der Anzahl an Versuchstieren sowie die Minderung ihres Leidens und eine verbesserte Versuchsdurchführung. Seither wurden immer mehr Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen entwickelt, von denen aber erst einige validiert und behördlich anerkannt sind (Spielmann, 1996). Dennoch gibt es erste Ansätze in der regulatorischen Toxikologie, denen das 3-R-Konzept zu Grunde liegt. Als nennenswertes Beispiel sei hier die Prüfung auf akute Toxizität von Substanzen angeführt. Ursprünglich sah diese Prüfung eine Steigerung der Dosierung bis zur mittleren letalen Dosis ( $LD_{50}$ ) vor. Sie ist definiert als die Einzeldosis einer Substanz, die den Tod von 50% der behandelten Tiere verursacht. Im heutigen Testverfahren wird der  $LD_{50}$ -Wert allerdings nicht mehr experimentell bestimmt, sondern vielmehr statistisch extrapoliert. Weiterhin existieren veränderte anerkannte *in-vivo*-Prüfmethoden zur Bestimmung der akuten Toxizität, die den Einsatz einer verminderten Anzahl an Versuchstieren erlauben (Spielmann, 1996).

Um unnötige Wiederholungen von in Zulassungs- und Registrierungsverfahren vorgeschriebenen Tierversuchen generell zu vermeiden, wurde der Versuch einer internationalen Standardisierung vorgenommen. Für Arzneimittel erfolgte dies 1991 auf der *International Conference of Harmonisation* (ICH, 1993). Standardvorschriften zur Prüfung von Chemikalien und Pflanzenschutzmitteln sind in den OECD-Richtlinien (OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*)-Report, 1996) festgeschrieben. Tierversuche, die nach OECD-Richtlinien durchgeführt wurden, müssen von allen OECD-Mitgliedsstaaten anerkannt werden.

Vor allem aufgrund verbesserter zell- und molekularbiologischer Methoden haben *in-vitro*-Testsysteme Einzug in viele Bereiche der Toxizitätsprüfungen gehalten. Einsatz bei Prüfung auf Reproduktionstoxizität, lokale Verträglichkeit, phototoxische Eigenschaften und Gentoxizität (Ames-Test, Chromosomenabberationstest) seien hier nur beispielhaft genannt. Die europäische Behörde ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) initiiert und fördert groß angelegte Studien zur Validierung von *in-vitro*-Tests als Ersatz für *in-vivo*-Methoden (Hartung, 2003).

Offen bleibt bei Anwendung von *in-vitro*-Methoden häufig immer noch die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. Zum einen lässt die unterschiedliche Ausstattung der Kultur-Zellen mit fremdstoffmetabolisierenden Enzymen und essentiellen Kofaktoren im Vergleich zum lebenden Organismus eine Vorhersage der Effekte im Menschen oft nicht zu. Zum anderen befinden sich Kulturzellen nicht im Verband mit anderen Zellarten, was ihre Reaktionen auf die Einwirkung von toxischen Substanzen grundlegend von den in die Struktur und Funktion eines kompletten Organismus eingebundenen Zellen unterscheiden kann. Für die *in-vivo*-Kanzergenitätsprüfungen existieren bisher keine Ersatzmöglichkeiten durch *in-vitro*-Methoden. Es gibt allerdings Bestrebungen, solche Langzeitstudien zu verkürzen, beispielsweise durch Applikation der Prüfsubstanz an transgene Mäuse über einen Zeitraum von 3-6 Monaten. Derzeit ergab sich dadurch aber noch keine bessere Erfassung der kanzerogenen Eigenschaften von Stoffen für den Menschen (Spielmann, 2004).

Das *Rat Liver Foci Bioassay* (RLFB) stellt ein verkürztes Prüfmodell zur Erfassung von Leberkanzerogenen Stoffeigenschaften dar (Bannasch, 1986, Ito, 1989, Williams, 1982). Als Indikator für ein krebserregendes Potential werden nach 6-12 Monaten Behandlungszeit definierte morphologische Veränderungen in der Rattenleber herangezogen, sogenannte *Foci*, die sich immunhistochemisch als herdförmige Ansammlungen veränderter Hepatozyten detektieren lassen. Nachteile des Systems liegen zum einen auf der alleinigen Anwendbarkeit auf Leberkrebs auslösende Stoffe. Zum anderen werden nicht-genotoxische Kanzerogene im RLFB oft nicht erfasst und daher falsch negativ bewertet, was fatale Folgen für den Menschen haben könnte (Melnick, 1993).

Abschließend lässt sich sagen, dass bei allen Bestrebungen, Experimente am Tier zu reduzieren, diese nach wie vor die Basis in der Toxikologie bilden, kombiniert mit Techniken der Histopathologie und der klinischen Biochemie. Auch wenn vermehrt *in-vitro*-Methoden in Prüfsysteme integriert werden, so fehlt letztlich häufig ein geeignetes Zellsystem, das toxische Effekte am Menschen verlässlich vorhersagen könnte. Sogenannte Alternativmethoden, insbesondere *in-vitro*-Tests, haben sich in der Toxikologie zu wertvollen Hilfsmitteln, aber auch nicht mehr, entwickelt. Gerade im Hinblick auf die aktuelle Chemikalienpolitik der Europäischen Union, die in einem Projekt mit der Bezeichnung REACH (*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*) zukünftig die Toxizitätsprüfung von annähernd 30.000

sogenannten Altstoffen vorsieht<sup>2</sup>, wird die Dringlichkeit zur Entwicklung von neuen Methoden in der Toxikologie deutlich.

### **1.3 Proteomics in der modernen Toxikologie**

Der Einsatz von proteinanalytischen Methoden in der Toxikologie, *Toxicoproteomics* (Bandara, 2002), bietet die Möglichkeit, komplexe biologische Prozesse direkt auf der Ebene der translatierten Proteine zu betrachten. Unter Einwirkung toxischer Substanzen sind Veränderungen der Proteinexpression oft sensitiver und treten im Verlauf der Exposition bereits zu einem früheren Zeitpunkt auf als die eigentlichen pathologischen Schädigungen. Diese manifestieren sich später und sind erst dann durch konventionelle histopathologische oder biochemische Analysen als toxikologische Endpunkte detektierbar (Bandara, 2002). Daher kann die Anwendung von Methoden der Proteomforschung zur Identifizierung von Protein-Biomarkern führen, die einen bestimmten toxischen Effekt charakterisieren (Kennedy, 2002, Hanash, 2003). Neue einzelne Biomarker können somit einerseits zur Aufklärung von toxischen oder kanzerogenen Wirkmechanismen beitragen. Andererseits liegt ein großes Potential in der Identifizierung multipler Biomarker, die als „molekulare Signaturen“ (Wetmore, 2004) zur früheren Vorhersage von toxischen Effekten definierter Substanzklassen beitragen können. Durch die Verbindung von toxischen Wirkungen mit bestimmten Proteinexpressionsmustern sollte es möglich sein, in der Zukunft neue Substanzen anhand prädiktiver Biomarker auf Toxizität zu prüfen (Kennedy, 2002).

Den größten Beitrag der differentiellen Proteom-Analysen in der Toxikologie zur Unterstützung konventioneller Methoden liefert die mögliche Aufklärung toxischer Mechanismen. Dadurch sind frühere und verbesserte Vorhersagen von substanzbedingten gesundheitlichen Risiken für Mensch und Umwelt möglich. Ethischen Grundsätzen würde damit durch weitere Reduzierung der Anzahl und vor allen Dingen der Dauer von Tierversuchen besser gerecht werden. Auf die mögliche Kosteneinsparung in Prozessen der Arzneimittel-Entwicklung sei nur am Rande hingewiesen.

---

<sup>2</sup> <http://www.umweltbundesamt.de/reach/forschung.htm>

### 1.3.1 Biomarker in der Toxikologie

Der Begriff „Biomarker“ wird je nach Disziplin in einem unterschiedlichen Kontext verwendet. Die derzeitigen Vorhaben im Bereich der *Toxicoproteomics*-Forschung zielen auf die Identifizierung neuer potentieller Biomarker, die einen bestimmten Mechanismus der Toxizität charakterisieren. Dabei handelt es sich um von der FDA (*Food and Drug Administration*) als „mögliche Biomarker“ definierte differentiell exprimierte Proteine (oder Gene)<sup>3</sup>, die von einzelnen Firmen oder Forschungsgruppen zur Charakterisierung definierter Zustände verwendet werden, aber deren Wert über die Grenzen des einzelnen Labors hinaus noch nicht gezeigt werden konnte (Bouchie, 2004). Ein wirklich „valider Biomarker“ muss gemäß der FDA eine weithin akzeptierte physiologische, toxikologische, pharmakologische oder klinische Signifikanz aufweisen. Nur unter diesen Bedingungen akzeptiert die FDA Biomarker, die die Zulassung neuer Arzneistoffe oder die Entscheidung über bestimmte Behandlungsstrategien maßgebend unterstützen können. Darüber hinaus sollte der in der Toxikologie verwendete „perfekte Biomarker“ (Kramer, 2005) spezifisch einen bestimmten Toxizitäts-Mechanismus charakterisieren. Er muss in einer ganzen Reihe experimenteller Spezies leicht detektierbar sein und sollte reproduzierbarer als auch sensitiver messbar sein als der Endpunkt der Toxizität selbst. Als frühe Biomarker sollten sie den Mechanismus der induzierten Toxizität widerspiegeln. Damit aus einem „möglichen Biomarker“ ein „valider“ oder „perfekter Biomarker“ wird, ist sowohl im präklinischen wie auch klinischen Forschungsbereich ein langer Prozess der Prävalidierung und Validierung mit Technologie-übergreifenden Maßnahmen in ausreichend großen Kollektiven notwendig (Bouchie, 2004, Kramer, 2005).

---

<sup>3</sup> FDA Guidance November 2003: “Pharmacogenomics data submissions.”

## 2 Methoden der Proteomforschung

Unabhängig davon, welche Technologie zur Anwendung kommt, die Proteomanalyse bedeutet eine große Herausforderung. Die Anzahl an Proteinen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen exprimiert werden, variiert zwischen einigen Tausend für Prokaryonten bis zu weit mehr als 10.000 für Eukaryonten (Görg, 2004). Der dynamische Bereich der Proteinkonzentration erstreckt sich über sechs bis sieben Zehnerpotenzen (Anderson und Anderson, 1998, Lottspeich, 1999). So können hochabundante Proteine mit bis zu  $10^5$  bis  $10^6$  Kopien pro Zelle vorhanden sein, währenddessen beispielsweise einige Rezeptormoleküle durch weniger als 100 Proteine pro Zelle repräsentiert werden (Görg, 2004).

Die Darstellung eines kompletten Proteoms bringt daher jede Analysemethode an die Grenzen ihrer Möglichkeiten. Mangels Bezugswerten, die ein Proteom als absolute Größe beschreiben könnten, wird es auch schwierig sein, zu erkennen, wann dieser Meilenstein tatsächlich erreicht ist (Aebersold und Mann, 2003). Letztlich greifen immer verschiedene Methoden ineinander, um den Zielen von Proteomics, der Auftrennung, Detektion und Identifizierung von Proteinen sowie dem Management und der Interpretation der Datenvielfalt, gerecht zu werden (Schrattenholz, 2004).

### 2.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) wurde bereits in den Siebziger Jahren unabhängig voneinander von den Arbeitsgruppen um Klose und O'Farrell entwickelt (Klose, 1975, O'Farrell, 1975). Sie erlaubt die simultane Auftrennung von Hunderten bis Tausenden von Proteinen. Je nach Gelgröße und verwendetem pH-Gradienten lassen sich mittels 2-DE heute bis zu 5.000 Proteine reproduzierbar separieren (Görg, 2004). Die 2-DE kombiniert zwei unterschiedliche Trennverfahren. In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), werden die Proteine in einem pH-Gradienten nach ihrer Ladung aufgetrennt. Sie wandern im elektrischen Feld durch eine großporige Gelmatrix bis zu der Stelle, die ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Dieser bezeichnet jenen pH-Wert, an dem die Nettoladung der zwitterionischen Proteine Null ist. Die Proteine werden so an ihrem isoelektrischen Punkt „fokussiert“.

Der pH-Gradient wurde zunächst durch sogenannte Trägerampholyte (Svensson, 1961) erzeugt. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes arrangierten sich die Trägerampholyte entsprechend ihres isoelektrischen Punktes zwischen Anode und Kathode, wodurch zwischen den Polen ein steigender pH-Gradient erzeugt wurde. Da der so aufgebaute Gradient aufgrund weiterer Dissoziation der Trägerampholyte über die Zeit nicht stabil war, gestaltete es sich äußerst schwierig, reproduzierbare 2-DE-Gele anzufertigen. Erst die Einführung von immobilisierten pH-Gradienten (Görg, 1988), bei denen die Ladungsträger kovalent mit dem Polyacrylamid der Trägermatrix verbunden sind, verbesserte die Reproduzierbarkeit der 2-DE-Gele entscheidend. Für das Ziel, quantitative Vergleiche zwischen verschiedenen Proteomzuständen anzustellen, war dieser Fortschritt ausschlaggebend und machte die 2-DE zur Methode der Wahl im Bereich der Proteomforschung (Sperling, 2001, Schrattenholz, 2004).

In der sich anschließenden zweiten Dimension erfolgt die Trennung der Proteine mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht (Shapiro, 1967). SDS ist ein anionisches Detergenz, das sich an die Polypeptidketten anlagert (1,4 g SDS pro g Protein) und den Proteinen so eine negative Gesamtladung verleiht. Demnach werden die Wanderungseigenschaften der Proteine im elektrischen Feld nur noch durch ihr Molekulargewicht und die Porengröße des Polyacrylamidgels bestimmt.

Die Proteine in den resultierenden zweidimensionalen Gelbildern können durch verschiedene Methoden wie Coomassie- (Neuhoff, 1988), Silber- (Merrill, 1979) oder Fluoreszenzfärbung (Rabilloud, 2001 und viele andere, zusammengefasst von Patton, 2000) detektiert werden. Ein Übersichtsartikel von Wendy Lauber (Lauber, 2001) beschreibt die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Methoden, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll.

Zur vergleichenden Analyse verschiedener Proteomzustände schließt sich eine computergestützte Auswertung der Gelbilder an. Diese umfasst die objektive Detektion der Protein-*Spots*, das *Matching* (Übereinanderlegen) mehrerer Gele zur Normalisierung und den quantitativen Vergleich der *Spot*-Intensitäten, um letztlich differentielle Expressionen ausfindig zu machen.

Die Kopplung der 2-DE als Separationstechnik mit Methoden der Massenspektrometrie Mitte der 90er Jahre (Yates, 2004) ermöglichte letztlich die beschleunigte Identifizierung von Proteinen und deren Peptidsequenzen sowie die

Charakterisierung posttranslationaler Modifizierungen (Sperling, 2001). Auf die Vorgehensweise zur Proteinidentifizierung wird im folgenden Kapitel (2.2.2) noch genauer eingegangen.

## 2.2 MALDI-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

### 2.2.1 Prinzip von MALDI-MS

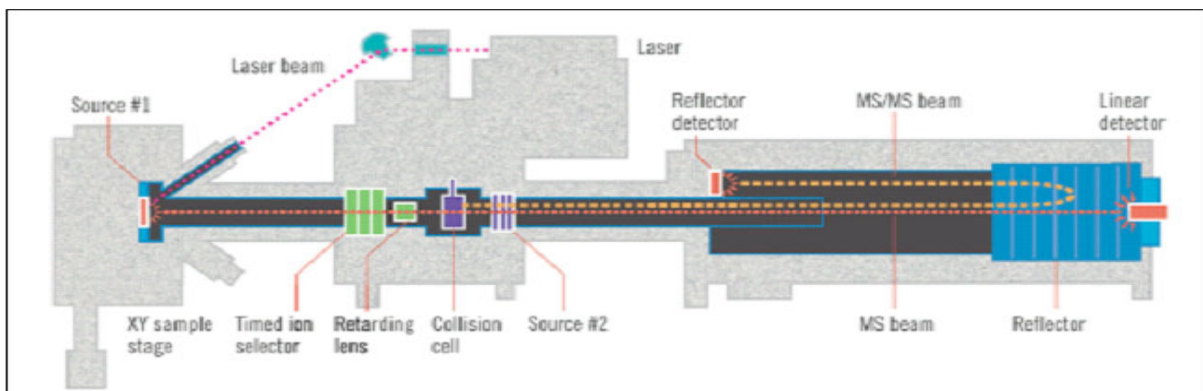
Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator, der das Masse-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) ionisierter Analyte misst, und einem Detektor, der die Anzahl von Ionen jedes  $m/z$ -Werts registriert. Matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionization (MALDI) (Karas und Hillenkamp, 1988) und Elektrosprayionisation (Fenn, 1989) sind die beiden am häufigsten verwendeten Techniken zur Freisetzung bzw. Ionisation von Peptiden und Proteinen. Fungiert MALDI als Ionenquelle, wird der Analyt durch Laserimpuls aus einer festen, kristallinen Matrix-Präparation freigesetzt und ionisiert. Als Matrices kommen niedermolekulare Verbindungen wie  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder Sinapinsäure (SPA) zum Einsatz. Die freigesetzten Ionen werden durch elektrische Felder in den Massenanalysator transferiert und zum Detektor geleitet. Als Analysatoren kommen vorrangig Flugzeitanalysatoren (TOF, *time of flight*) zum Einsatz, heute werden MALDI-Ionenquellen aber praktisch mit allen Massenspektrometertypen (Quadrupol-Ionenfallen, orthogonale Flugzeit-Geräte, Fourier-Transform-Ionen-Cyclotron-Analysatoren (FT-MS)) sowie als Hybridgeräte zur MS/MS-Analytik kommerziell angeboten (Aebersold und Mann, 2003). Im Kontext der Proteinidentifizierung, näher beschrieben in Abschnitt 2.2.2, sind die wichtigsten Eigenschaften, die Massenanalysatoren auf sich vereinen sollten, Sensitivität, gute Auflösung der Ionensignale, Massengenauigkeit und die Fähigkeit, ausgewählte Signale aus MS-Spektren eines enzymatisch gespalteten Proteins zu fragmentieren und als Tandem-Massenspektren (MS/MS) abzubilden.

MALDI als Ionenquelle wird häufig mit TOF-Analysatoren gekoppelt. Wie die Übersetzung des Begriffs TOF, Flugzeit, bereits verdeutlicht, messen diese Analysatoren die Zeit, die die Ionen benötigen, die Strecke von der Ionenquelle bis zum Detektor zurückzulegen. Sie ist in erster Näherung proportional zur Quadratwurzel aus  $m/z$ . TOF-Massenanalysatoren zeichnen sich durch eine gute Massengenauigkeit sowie eine hohe Auflösung aus (Ryan und Patterson, 2001). Die



Kopplung einer MALDI-Ionenquelle mit zwei TOF-Analysatoren, getrennt durch eine Kollisionszelle, charakterisiert die Klasse der TOF/TOF-Massenspektrometer (Medzihradzky, 2000), die heute vielfach für Proteomics-Anwendungen im Hochdurchsatzverfahren eingesetzt werden (Ryan und Patterson, 2001).

Abbildung A-3 veranschaulicht den schematischen Aufbau eines MALDI-TOF/TOF-Instruments, dem *4700 Proteomics Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), dessen Konfiguration die automatisierte Generierung von sowohl MS- als auch MS/MS-Spektren ermöglicht. Ein Festkörperlaser, operierend mit einer Frequenz von 200 Hz und einer Wellenlänge von  $\lambda = 355$  nm bewirkt die Freisetzung und Ionisierung des Analyten. Die entstandenen Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt, in den TOF-Analysator übergeführt und die Ankunftszeit am Detektor, der aus zwei Multikanalplatten (multichannel plates) besteht, registriert. Ionenoptische Elemente im Bereich der zweiten Ionenquelle erlauben die Auswahl der Vorläuferionen und die erneute Beschleunigung der durch metastabilen Zerfall oder Kollisions-induzierter Dissoziation entstandenen Fragmentationen im MS/MS-Modus.



**Abbildung A-3: Schematischer Aufbau des 4700 Proteomics Analyzer MALDI TOF/TOF Massenspektrometers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).**

Der Analyt wird in der ersten Ionenquelle (*Source #1*) durch einen Festkörperlaser (*Laser, Laser beam*) freigesetzt. Die entstandenen Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt, in den TOF-Analysator überführt und am Multikanalplatten-Detektor (*Linear detector* oder *Reflector detector*) nachgewiesen. Ionenoptische Elemente (*Timed ion selector, Retarding lens*) im Bereich der zweiten Ionenquelle (*Source #2*) erlauben die Auswahl der Vorläuferionen zur Fragmentierung in der Kollisionszelle (*Collision cell*) und die erneute Beschleunigung der Fragmentationen im MS/MS-Modus.

### 2.2.2 Proteinidentifizierung

Zur Identifizierung von unbekanntem Proteinen werden diese zunächst durch Einsatz von Proteasen enzymatisch in kürzere Peptidketten gespalten (Henzel, 1989, 1993). Bei Verwendung spezifischer Proteasen wie Trypsin erfolgt die Spaltung an definierten Aminosäuren. So werden die Polypeptidketten mit Trypsin stets hinter Lysin und Arginin in kleinere Fragmente zerlegt. Die Peptidfragmente werden der MS-Analyse zugeführt und als Ionensignale registriert. Das so erhaltene MS-Spektrum ionisierter Peptidfragmente eines Proteins wird als *Peptide Mass Fingerprint*-Spektrum (PMF) bezeichnet. Im Anschluss erfolgt die Identifizierung des jeweiligen Proteins durch den Abgleich der experimentell gemessenen  $m/z$ -Werte der ionisierten Peptide mit Werten in einer Proteinsequenzdatenbank (Jensen, 1997), die durch theoretische Proteolyse (*in-silico*-Verdau) der in der Datenbank eingetragenen Proteine berechnet werden. Für die Identifizierung von Proteinen aus MS/MS-Spektren gehen zusätzlich zu den  $m/z$ -Werten der selektierten Vorläuferionen-Signale auch die der Peptidfragmentation-Signale in die Datenbanksuche ein (Yates, 1995). Zum Abgleich mit den Werten in der Datenbank erfolgt daher zusätzlich eine *in-silico*-Fragmentierung der Peptidsequenzen des gleichen  $m/z$ -Werts. Der Erfolg einer Proteinidentifizierung ist abhängig von der Qualität der Massenspektren, der Genauigkeit der Datenbank, der Leistungsfähigkeit der gewählten Suchalgorithmen und der verwendeten Software. Als Proteinsequenz-Datenbanken stehen beispielsweise Swiss-Prot (<http://www.expasy.ch>) und NCBI nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Verfügung. Als Datenbanksuchalgorithmen, die im *Internet* frei zugänglich sind und denen zur Identifizierung von Proteinen unterschiedliche bioinformatische Berechnungsprinzipien zugrunde liegen, werden unter anderem Mascot (Perkins, 1999), MS-Fit und MS-Tag (Clausen, 1999) verwendet.

### 2.2.3 Quantitative Massenspektrometrie

Auch wenn die Massenspektrometrie mittlerweile eine der effektivsten analytischen Anwendungen darstellt, um das komplexe und dynamische Erscheinungsbild eines Proteoms abzubilden, so gestaltet sich die MS-basierte Quantifizierung von Proteinen eher schwierig (Lill, 2003). Intensitäten von MS-Signalen aus komplexen Peptidgemischen korrelieren nicht direkt und präzise mit der tatsächlich in einer Probe vorhandenen Menge des Analyten. Höher abundante Peptide beispielsweise

können die Ionisation von anderen negativ beeinflussen und damit ihre Signale unterdrücken (Knochenmuss, 1996). Speziell bei MALDI kann eine inhomogene Kristallisation von Matrix und der zu analysierenden Probe die korrekte Quantifizierung des Analyten verhindern. Zur verbesserten MS-basierten Quantifizierung wurden daher Strategien entwickelt, die sich auf interne Standards als Referenzgröße beziehen und die im folgenden Abschnitt kurz umrissen werden sollen.

### 2.2.3.1 Strategien zur Quantifizierung

Den meisten Strategien zur MS-basierten Quantifizierung liegt ein gemeinsames Prinzip zu Grunde. Die Proteine oder Peptide der zu vergleichenden Proben werden mit reinen Elementen oder Verbindungen unterschiedlicher Isotopenzusammensetzung markiert, die im MS-Spektrum anhand ihrer um einen definierten Wert differierenden  $m/z$ -Signale unterschieden werden können. Die Verhältnisse der Signalintensitäten der einzelnen detektierten Ionenpaare zueinander erlauben dann eine relative Quantifizierung der Ionensignale.

Mit metabolischer, enzymatischer sowie chemischer Isotopenmarkierung kommen generell drei verschiedene Arten der Peptid- bzw. Proteinmarkierung (*Labelling*) zum Einsatz (Lill, 2003, Aebersold und Mann, 2003), bevor diese der MS-Analyse zugeführt werden.

Beim metabolischen *Labelling* erfolgt die Inkorporierung von unterschiedlichen Isotopen in die Proteine während des zellulären Stoffwechsels.  $^{15}\text{N}$  (Oda, 1999),  $^{13}\text{C}$  (Stocklin, 2002) oder intakte isotopenmarkierte Aminosäuren (SILAC, *Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture*, Ong, 2002) werden dem Kulturmedium zugesetzt, so dass die Zellen diese dann im Verlauf der Proteinsynthese einbauen. Die vergleichende Analyse erfolgt mit Zellen, die in unverändertem Medium kultiviert werden. Markierte und nicht markierte Proteinextrakte der Zellen werden gemischt, woran sich die massenspektrometrische Identifizierung und Quantifizierung anschließt. Da die Strategie des metabolischen *Labellings* eine bestehende Stoffwechselaktivität voraussetzt, ist sie typischerweise nur auf proliferierende Kulturzellen anwendbar.

Bei der enzymatischen Isotopenmarkierung wird während des proteolytischen Proteinverdaus beim Übertragen eines Sauerstoffatoms aus dem Wasser auf die C-Termini der Peptide  $^{18}\text{O}$  anstelle von  $^{16}\text{O}$  in eine der zu analysierenden Proben

eingebaut. Isotopen-markierte Proben werden dann mit unveränderten verglichen (Schnolzer, 1996).

Chemisches *Labelling* erfolgt immer mit definierten synthetisierten Reagenzien. Bei der sehr häufig eingesetzten ICAT-Methode (*Isotope-Coded Affinity Tag Reagents*, Gygi et al., 1999) stehen für die vergleichende Quantifizierung zwei sich in ihrem Isotopen-Muster unterscheidende Reagenzien zur Verfügung. Die Derivatisierung der Proteine basiert dabei auf dem Umsetzen der Sulfhydryl-Gruppen in Cysteinen mit den Reagenzien. Weitere Methoden zur Kopplung von Isotopen-markierten Reagenzien mit definierten Aminosäuregruppen von Peptiden oder Proteinen wie GIST (*Global Internal Standard Technology*, Ji, 2000, Wang, 2001) und ICPL (*Isotope-Coded Protein Label*, Schmidt, 2005) sind beschrieben.

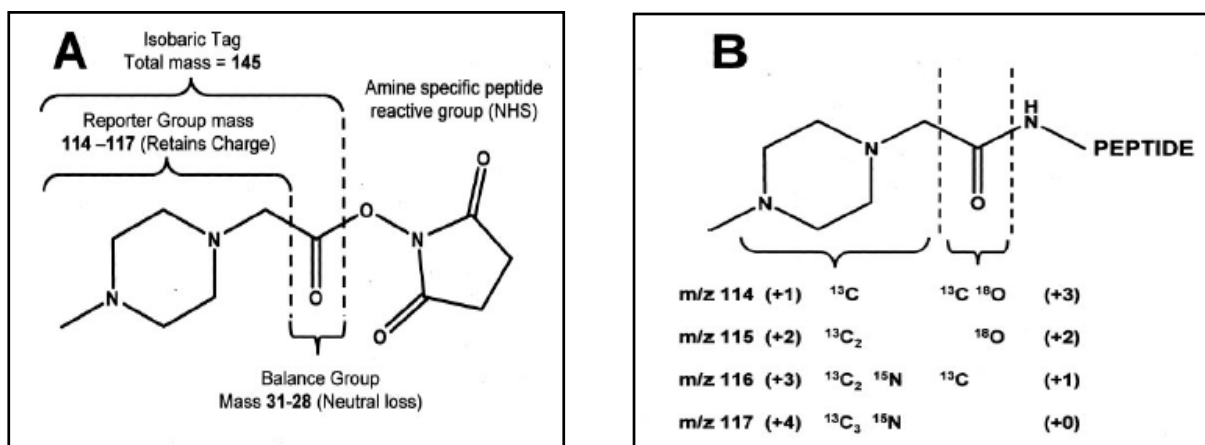
#### 2.2.3.2 iTRAQ-Technologie

Die von Applied Biosystems als weitere Strategie des chemischen *Labellings* entwickelten isobaren iTRAQ-Reagenzien (*isobaric Tagging for Relative and Absolute Quantitation*, Ross, 2004) reagieren mit allen N-terminalen Aminosäuren und Lysin-Seitenketten enzymatisch gespaltener Peptide. Die derivatisierten Peptide sind aufgrund der isobaren Zusammensetzung der Reagenzien im Massenspektrum nicht unterscheidbar, bilden aber nach Fragmentierung im MS/MS unterschiedliche niedermassige Ionensignale, anhand derer quantifiziert werden kann.

Verschiedene iTRAQ-Reagenzien stehen zur Verfügung, um bis zu vier Proben gleichzeitig innerhalb eines Experiments vergleichend zu analysieren. Die Reagenzien, in Abbildung A-4 in ihrer chemischen Zusammensetzung dargestellt, bestehen aus den drei Molekülteilen *Reporter*, *Balance* zuzüglich einer Peptid-reaktiven Gruppe (PRG). Über die PRG erfolgt die Umsetzung mit den freien terminalen Aminogruppen von Peptiden oder auch intakten Proteinen. *Reporter*- und *Balance*-Gruppe wurden in ihrer molekularen Zusammensetzung so konstruiert, dass sie für alle Reagenzien ein Gesamtmolekulargewicht von 145 Da aufweisen. Unterscheidbar sind sie nur anhand der Massen der einzelnen Molekülteile. So setzen sich *Reporter*- und *Balance*-Gruppe des ersten Reagenz aus einem Molekülteil mit der Masse von 114 Da und einem weiteren mit der Masse von 31 Da zusammen, die des zweiten Reagenz aus jeweils zwei Molekülteilen der Massen 115 und 30 Da usw. Durch das Gesamtmolekulargewicht von 145 Da ergeben also vier identische Peptide aus vier unterschiedlichen Proben, die mit jeweils einem der

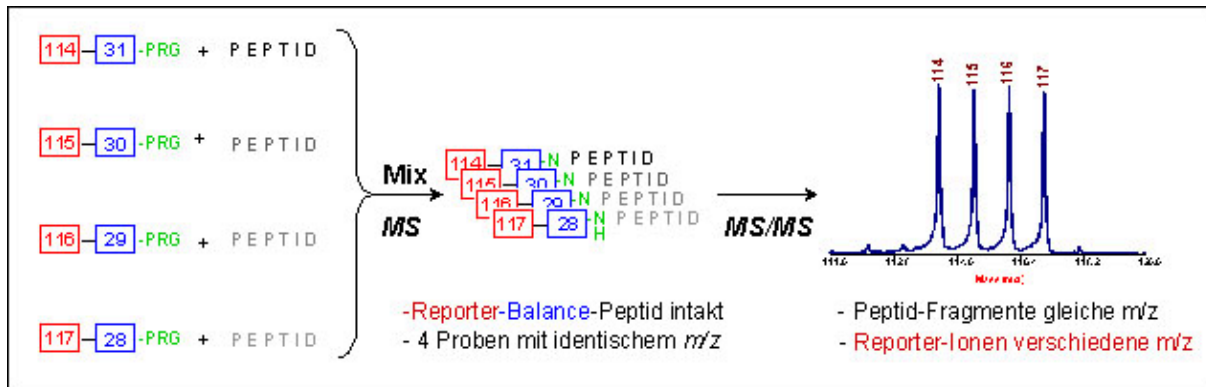
Reagenzien umgesetzt wurden, im MS-Spektrum ein einziges Ionensignal (Abbildung A-5). Wird dieses im Folgenden mittels MS/MS fragmentiert, kann zum einen über die Fragmentationensignale des Peptids das Protein durch Datenbanksuche identifiziert werden, zum anderen entstehen zusätzlich die Signale der *Reporter*-Gruppe mit den entsprechenden Massen 114, 115, 116 und 117 Da, die die quantitativen Verhältnisse des Peptids in den vier Proben widerspiegeln. Die *Balance*-Gruppe liegt im MS/MS-Prozess im ungeladenen Zustand vor und entzieht sich als Neutralverlust der massenspektrometrischen Vermessung.

Der MS-Analyse mittels iTRAQ-Reagenzien derivatisierter Peptide geht eine chromatographische Fraktionierung der markierten Proben voraus. Die aus verschiedenen Proben stammenden derivatisierten Peptide sind wiederum aufgrund der isobaren Zusammensetzung der Reagenzien bezüglich ihres Elutionsverhaltens identisch, was die simultane Identifizierung und Quantifizierung der aus allen vier Proben in einer Fraktion enthaltenen Peptide ermöglicht.



**Abbildung A-4: Chemische Zusammensetzung der iTRAQ-Reagenzien (Quelle: Ross, 2004).**

(A) Das komplette Molekül besteht aus einer *Reporter*-Gruppe (basierend auf N-Methylpiperazin), einer Massen-ausgleichenden *Balance*-Gruppe (Carbonylrest) und einer Peptid-reaktiven Gruppe (NHS-Ester). Die Gesamtmasse von *Reporter*- und *Balance*-Gruppe wird durch unterschiedliche Anreicherung von  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  und  $^{18}\text{O}$ -Atomen konstant gehalten (B). Das Molekulargewicht der *Reporter*-Gruppe beträgt daher je nach Isotopenverteilung 114, 115, 116 oder 117 Da, während die Masse der *Balance*-Gruppe in der Weise zwischen 28 und 31 Da variiert, dass beide Molekülteile gemeinsam für jedes der vier iTRAQ-Reagenzien ein Molekulargewicht von 145 Da aufweisen. Die in Klammern angegebenen Ziffern stehen für die Anzahl der in dem jeweiligen Molekülteil isotopisch angereicherter Zentren. Die Derivatisierung von freien Aminogruppen in Peptiden oder Proteinen erfolgt über die NHS-Ester-Gruppe durch Bildung einer Amid-Bindung. Nach Fragmentierung dieser Amid-Bindung im MS/MS-Modus liegt die *Balance*-Gruppe ungeladen vor (*Neutral loss*), während die Ladung an der *Reporter*-Gruppe verbleibt.



**Abbildung A-5: Konzept der Protein-Quantifizierung mit iTRAQ-Reagenzien (modifiziert nach Ross, 2004).**

Die freien Aminogruppen vier identischer Peptide der Sequenz PEPTID werden mit jeweils einem der vier iTRAQ-Reagenzien (114-31, 115-30, 116-29, 117-28) derivatisiert. Die Reaktion erfolgt dabei über die Peptid-reaktive Gruppe (PRG) unter Bildung eines Amids. Die Mischung der derivatisierten Peptide erscheint im MS-Modus als ein einziges Ionensignal (identischer  $m/z$ -Wert). Nach Fragmentierung des Signals werden die vier Reporter-Gruppen-Ionen mit unterschiedlichem  $m/z$ -Wert registriert (114, 115, 116, oder 117) und erlauben die Quantifizierung der Ionensignale zueinander, während die Peptidfragment-Ionen isobar bleiben und die Identifizierung ermöglichen.

## 2.3 Flüssigchromatographie

Neben der zweidimensionalen Gelelektrophorese finden im Umfeld der Proteomforschung hauptsächlich flüssigchromatographische Methoden zur Auftrennung komplexer Protein- oder Peptidgemische Verwendung. Das Prinzip der chromatographischen Separation basiert auf der Interaktion von Proteinen oder Peptiden mit der stationären und der mobilen Phase. Das Trennverhalten wird einerseits beeinflusst durch Veränderung der Eigenschaften der mobilen Phase wie die Variation der Pufferzusammensetzung und des pH-Werts. Andererseits bestimmt die Art des verwendeten Säulenmaterials die Trenncharakteristik. Zur optimalen Separation möglichst aller in einer Probe vorhandenen Proteine können mehrere chromatographische Trennschritte hintereinandergeschaltet werden, so dass sich ein mindestens zweidimensionales, wenn nicht sogar multidimensionales Verfahren ergibt. Sogenannte Ionenaustausch-, Umkehrphasen-, Größenausschluss-, Normalphasen- und Affinitätschromatographie können fast beliebig miteinander kombiniert werden. Für komplexe Proteinextrakte ergibt sich dadurch eine signifikante Reduktion der Komplexität (Issaq, 2002) und eine erhöhte Chance, individuelle Bestandteile aufzutrennen. Die Protein- oder Peptidtrennung mittels HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ist hoch sensitiv, reproduzierbar, verhältnismäßig schnell, quantitativ und leicht automatisierbar. Diese Aspekte werden häufig als Vorteil gegenüber der 2-DE angeführt (Issaq, 2001).

Bedeutsam für den Fortschritt und die Höhe des Probendurchsatzes in der Proteomanalytik ist die Möglichkeit, Flüssigchromatographie (LC, *Liquid Chromatography*) direkt mit MALDI- oder ESI-MS zu koppeln. Beide Ansätze werden einerseits angewendet, um das Proteom bestimmter Zellen oder Organismen so weit wie möglich aufzuklären (Opitck, 1997, 1998). Ein typisches Beispiel hierfür ist die in der Arbeitsgruppe um Yates entwickelte Technologie MUDPIT (*Multi-dimensional Protein Identification Technology*), bei der komplexe Peptidgemische mittels multidimensionaler Chromatographie separiert und mit einem Tandem-Massenspektrometer gekoppelt werden (Link, 1999). Auf diese Weise wurden 1500 Proteine im Hefeproteom identifiziert (Washburn, 2001). Andererseits wird die LC-MS-Kopplung auch für weniger „globale“ Fragestellungen eingesetzt, um beispielsweise durch Einsatz von Affinitätschromatographie bestimmte Peptide vor der MS-Analyse zu selektieren (Gygi, 1999, Geng, 2000, Ficarro, 2002) oder durch vorangehende 2-D-HPLC eine effektive Vorfraktionierung und damit eine Reduktion der Probenkomplexität zu erreichen (Moore, 1995).

## 2.4 SELDI-Proteinchip-Technologie

Eine Kombination aus Chromatographie und Massenspektrometrie repräsentiert die SELDI- (*Surface Enhanced Laser Desorption and Ionisation*) Proteinchip-Technologie (Ciphergen, Palo Alto, CA, USA). Sie wurde 1993 von Hutchens und Yip (Hutchens und Yip, 1993) begründet und beruht für die Freisetzung bzw. Ionisierung der Analyten auf dem MALDI-Prinzip (Karas und Hillenkamp, 1988), kombiniert mit einer funktionalisierten Oberfläche zur Anreicherung spezifischer Probenbestandteile. Zentrales Element des Systems ist ein Metallchip mit einer chromatographischen Oberfläche (anionisch, kationisch, hydrophob, hydrophil oder Metall-bindend), an der die adsorptive Retention definierter Gruppen von Proteinen basierend auf deren physikalisch-chemischen Eigenschaften erfolgt. Zur Durchführung spezifischer Interaktionsstudien stehen Chips mit biochemisch aktiven Oberflächen zur Verfügung.

Die Analyse der gebundenen Proteine erfolgt nach Zusatz von Matrixsubstanzen in einem TOF-Massenspektrometer. Das erhaltene Massenspektrum stellt eine Art Proteinprofil dar, einige Autoren sprechen daher von einem *Protein-Fingerprinting* (Veenstra und Conrads, 2003).

Ein bemerkenswerter Vorteil der SELDI-Technologie liegt darin, dass vor der MS-Messung keine Probenaufreinigung erforderlich ist. Serum- oder Urinproben, Zell- oder Gewebeextrakte werden zur Bindung der Proteine auf den Chips inkubiert, die Entfernung aller bei der MS-Analyse störenden Bestandteile wie Salze und Detergenzien sowie sämtlicher nicht gebundener Proteine erfolgt durch Zusatz von Waschpuffern.

Das Hauptanwendungsgebiet der SELDI-TOF-MS liegt in der Detektion von qualitativen und quantitativen Unterschieden im Proteinexpressions-Profil zwischen zwei oder mehreren Proben. So wurden in den vergangenen Jahren in der klinischen Forschung durch das vergleichende *Screening* von Patientenseren mittels SELDI Biomarker-Signale detektiert, deren Expressionsniveaus spezifisch bestimmte Krebsarten charakterisieren sollen (Srinivas, 2002, Merchant und Weinberger, 2000, Li, 2002, Rosenblatt, 2004). Potentielle diagnostische Marker für Krebs und andere Erkrankungen wurden ebenfalls auf diese Weise identifiziert (Carrette, 2003, Rosty, 2002). Die SELDI-Proteinchips finden des Weiteren – wenn auch untergeordnet - Anwendung zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen oder zur Analyse posttranslationaler Modifizierungen.

Bei der Betrachtung von SELDI-Massenspektren fällt auf, dass vorrangig Proteine mit niedrigem Molekulargewicht (< 20 kDa) detektiert werden. Daher wird die Methode oft als komplementär zur 2-DE angesehen, die kleine Proteine eher schlecht visualisiert. In Anbetracht des vorrangigen Einsatzes der SELDI-TOF-Technologie zur vergleichenden Messung von Signalintensitäten, wurde eine erhöhte Sensitivität zu Lasten von Massengenauigkeit und Auflösung erzielt (Veenstra, 2004). Allerdings bedingen Einbußen in diesen Faktoren sowie die fehlende Fähigkeit zur Fragmentierung von Ionensignalen, dass die auf den Chips gebundenen Proteine mittels SELDI nur schwer identifiziert werden können. Aus komplexen Gemischen wird dies wenn überhaupt erst möglich nach intensiven Aufreinigungsschritten, die das gewünschte Zielprotein isolieren und nach enzymatischem Verdau der „üblichen“ Identifizierung durch MS- oder MS/MS-Analyse in Hochleistungs-massenspektrometern zugänglich machen.



### 3 Chemische Kanzerogenese: Die Leber im Fokus

Krebserkrankungen gehören zu den dringlichsten und gefürchtetsten Problemen der heutigen Medizin. Neben Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zählen sie zu den häufigsten Todesursachen. Allein in Deutschland sterben jährlich etwa 200.000 Menschen an Krebs (Marquardt, Pfau, 2004).

Bis auf wenige Ausnahmen werden Krebserkrankungen durch exogene Faktoren ausgelöst. Chemische Substanzen in der Umwelt verursachen dabei die Mehrzahl der menschlichen Tumore; ionisierende Strahlen und onkogene Viren wie das humane Papillomavirus können das Wachstum von Krebszellen zwar auch auslösen, spielen aber prozentual gesehen im Vergleich zu chemischen Stoffen eine untergeordnete Rolle. Zusammenhänge zwischen dem Prozess der Krebsentstehung und der Einwirkung exogener Noxen sind ätiologisch am besten untersucht für die Entwicklung von Lungenkrebs durch Tabakrauch sowie Leberkarzinom durch Aflatoxin-kontaminierte Nahrung (Hoffmann, 1986, Murray und Lopez, 1997, Groopmann, 1988, Eaton, 1994).

Da die Leber in der Toxikologie ein zentrales Untersuchungsorgan darstellt, wird im Folgenden der Prozess der Leberkanzerogenese näher beleuchtet. Dabei wird auch auf die Wirkungsweise und Einteilung chemischer Kanzerogene eingegangen.

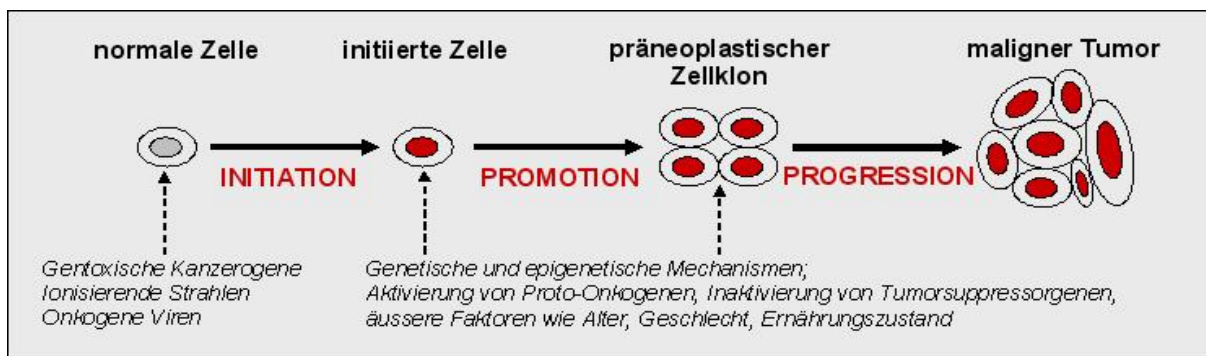
#### 3.1 Wirkungsweise chemischer Kanzerogene

Die chemische Kanzerogenese wird als ein Mehrstufen-Prozess mit langer Latenzzeit angesehen. Er lässt sich in drei Phasen einteilen: **Initiation**, **Promotion** und **Progression** (Abbildung A-6, Pitot, 1988). Initiation beschreibt die irreversible Veränderung des genetischen Materials, also mindestens eine Mutation innerhalb kurzer Zeit, die an die Tochterzellen weitergegeben wird. Nur bei hohen Dosen sehr potenter Kanzerogene reicht die Initiation alleine aus, um die Krebsentstehung anzustoßen.

Im Allgemeinen schließt sich jedoch der Prozess der Promotion an, bei dem initiierte Zellen über den Zeitraum von Wochen oder Monaten klonal amplifiziert werden. Die Wirkungen tumorpromovierender Substanzen können vermittelt werden über zytotoxische Mechanismen, über den Eingriff in für Wachstum und Differenzierung essentielle Signaltransduktionswege oder auch durch hormonartige

Wachstumsstimulation. Die Effekte der Tumorpromotion sind, ohne vorangegangene Initiation, nach Entzug des Stimulus weitgehend reversibel (Hendrich, 1986).

In der Phase der Progression entstehen durch weitere genetische und epigenetische Faktoren wie Aktivierung von Proto-Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen die eigentlich malignen Zellen mit der Fähigkeit zu invasivem Wachstum und Metastasierung. Bei Nagern vollzieht sich der Prozess der Progression über einen Zeitraum von mehreren Monaten, beim Menschen über Jahre oder sogar Jahrzehnte.



**Abbildung A-6: Mehrstufenmodell der Kanzerogenese.**

Durch **Initiation** wird das genetische Material einer Zelle irreversibel verändert. Im Prozess der **Promotion** werden initiierte Zellen über den Zeitraum von Wochen oder Monaten klonal amplifiziert, während in der sich anschließenden Phase der **Progression** die eigentlich malignen Zellen mit der Fähigkeit zu invasivem Wachstum und Metastasierung entstehen.

Chemische Kanzerogene gehören den unterschiedlichsten Stoffklassen an. Organische und anorganische Substanzen zählen genauso dazu wie Hormone, Kunststoffmaterialien, aber auch Fasern und Stäube (Marquardt, Pfau, 2004). Aufgrund ihrer im Folgenden erläuterten Wirkungsweise werden sie klassifiziert in DNA-reaktive (genotoxische) Stoffe und epigenetische (nicht-genotoxische) Substanzen.

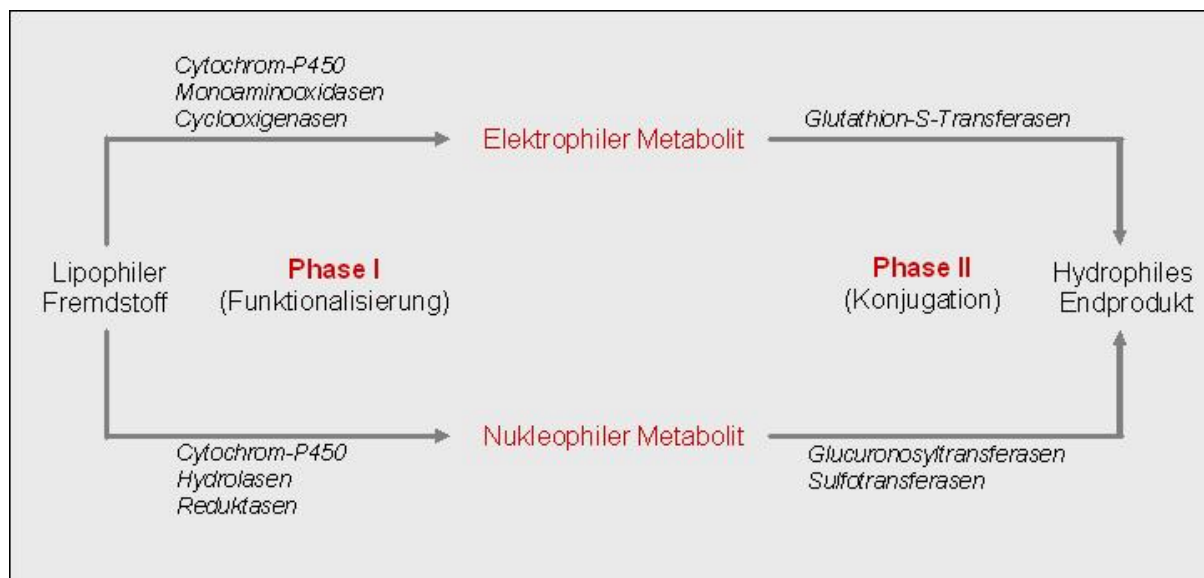
Genotoxische Kanzerogene lösen Mutationen aus, indem sie mit zellulären Makromolekülen - insbesondere mit DNA - interagieren, meist durch Adduktbildung oder Interkalation. Sogenannte direkte Kanzerogene sind chemisch hoch reaktiv. Sie sind stark elektrophil und reagieren spontan ohne vorherige Aktivierung mit dem Erbgut. Zu diesen Substanzen zählen DNA-alkylierende Verbindungen wie Dimethylsulfat, Bischlormethylether, Stickstoff-Lost und Methylnitrosoharnstoff sowie die Epoxide Ethylenoxid oder  $\beta$ -Propiolacton.

Indirekte genotoxische Kanzerogene hingegen müssen erst, meist in der Leber, metabolisch aktiviert werden. Da verschiedene Organismen über eine sehr unterschiedliche metabolische Kapazität verfügen können, wird verständlich, dass diese Art der Kanzerogene spezies- als auch organspezifische Effekte hervorrufen können. Typische Kanzerogene dieses Typs sind polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe mit Benzo[a]pyren als Leitsubstanz, polyzyklische aromatische Nitroverbindungen, aromatische Amine und N-Nitrosamine. Ebenfalls in diese Kategorie gehört N-Nitrosomorpholin (NNM), das in Ratten Leber- und Nierenkrebs erzeugen kann. Genotoxische Kanzerogene sind typische Tumor-Initiatoren; wenn sie sowohl initiiierende als auch tumorpromovierende Eigenschaften auf sich vereinen, werden sie als „komplette Kanzerogene“ bezeichnet.

Für epigenetische, also nicht-genotoxische Kanzerogene ist ein DNA-schädigender Effekt nicht nachweisbar. Sie stellen typische Tumorpromotoren dar, die ihre Wirkung über einen längeren Zeitraum und über vielfältige Mechanismen entfalten, die zumeist noch gar nicht vollständig aufgeklärt sind. Phenobarbital, chlorierte Kohlenwasserstoffe (DDT), Dioxine (TCDD), aber auch Hormone und Peroxisomenproliferatoren wie Clofibrat zählen zu dieser Substanzklasse.

### **3.2 Die Leber als zentrales Organ im Fremdstoffmetabolismus**

Lebende Organismen werden täglich Fremdstoffen ausgesetzt, für die keine körpereigene Verwendung im Energiestoffwechsel oder Substrathaushalt besteht. Um Akkumulationseffekte zu vermeiden, werden diese Stoffe bei Mensch und Tier im Allgemeinen entweder über die Niere (renal) oder die Galle (biliär) ausgeschieden. Voraussetzung hierfür ist eine ausreichende Wasserlöslichkeit der Verbindungen. Die Umwandlung von unpolaren lipophilen, aus dem Körper schlecht eliminierbaren Substanzen in hydrophile nieren- und gallengängige Spezies erfolgt durch Enzyme des Fremdstoffmetabolismus. Die Leber stellt hierbei das Hauptorgan für Metabolisierungsreaktionen dar. Sie enthält fremdstoffmetabolisierende Enzyme, die entweder eingebunden in die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums sowie der Mitochondrien (Monooxygenasen, Cyclooxygenasen, Glucuronyltransferasen) oder als lösliche Enzyme im Cytosol (lösliche Epoxidhydrolase, Esterasen, Glutathiontransferasen) auftreten. Die Metabolisierungsreaktionen werden in zwei Phasen eingeteilt (Abbildung A-7): Phase I und Phase II.



**Abbildung A-7: Phasen I und II des Fremdstoffmetabolismus (modifiziert nach Arand und Oesch, 2004).**

In Phase-I-Reaktionen werden durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionelle Gruppen in die Substanzen eingeführt, so dass je nach Art der Reaktion elektrophile oder nukleophile Metabolite resultieren. Diese werden in Phase-II-Reaktionen mit hydrophilen endogenen Bausteinen gekoppelt und können dann vorrangig über die Niere oder die Galle aus dem Organismus ausgeschieden werden.

In den Phase-I-Reaktionen, auch als Funktionalisierungsreaktionen bezeichnet, werden durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionelle Gruppen in die Substanzen eingeführt. Typische Phase-I-Enzyme sind Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen, Monoaminoxidasen, Cyclooxygenasen und Alkohol- oder Aldehyddehydrogenasen. In Phase-II-Reaktionen erfolgt die Kopplung der eingeführten funktionellen Gruppen mit hydrophilen endogenen Bausteinen wie Sulfatresten, Acetylgruppen, Glucuronsäure oder Glutathion (Konjugationsreaktionen), wodurch die Ausgangssubstanzen ausscheidbar werden. Katalysiert werden Phase-II-Reaktionen beispielsweise durch Sulfo- und Acetyltransferasen sowie Glucuronosyltransferasen oder Glutathion-S-Transferasen.

Durch Phase-I-Reaktionen entstehen je nach Eigenschaften der eingeführten funktionellen Gruppe elektrophile oder nukleophile Metabolite (Abbildung A-7). Vor allem stark reaktive elektrophile Intermediate wie Epoxide und  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen sind in der Lage, mit nukleophilen Verbindungen wie Proteinen, RNA und DNA zu reagieren. Im Klartext bedeutet dies, dass die fremdstoffmetabolisierenden Vorgänge, die im eigentlichen der Elimination von Substanzen aus dem Organismus dienen, in vielen Fällen zur Toxifizierung der Fremdstoffe führen können. Die in Abschnitt 3.1 beschriebenen indirekten

genotoxischen Kanzerogene werden auf diese Weise in den Leberzellen „metabolisch aktiviert“ und entfalten erst dann ihr mutagenes und Krebs erzeugendes Potential. So erfolgt beispielsweise die metabolische Aktivierung von NNM durch Cytochrom-P450-vermittelte  $\alpha$ -C-Hydroxylierung zu N-Nitroso-2-hydroxymorpholin (Manson, 1978), bevor reaktive Zerfallsprodukte dieser Verbindung mit DNA unter Bildung definierter Addukte reagieren (Glyoxal- und O<sup>6</sup>-Hydroxyethyldeoxyguanosin-Addukte, Loepky, 2002).

Alle Fremdstoffe, die über den Magen-Darm-Trakt in den systemischen Kreislauf des Organismus resorbiert werden, gelangen über das venöse Blut der Pfortader zunächst in die Leber. Die hier ablaufenden Reaktionen entscheiden, ob Substanzen in ihren gewünschten oder unerwünschten Wirkungen abgeschwächt oder verstärkt werden. Im Fall einer Toxifizierung von Substanzen ist die Leber durch ihre zentrale Stellung im Metabolisierungsprozess oftmals selbst Zielorgan der toxischen Effekte. Dadurch wird deutlich, dass Verständnis und Aufklärung molekularer Vorgänge in der Leber häufig im Mittelpunkt des Interesses klassischer toxikologischer wie auch moderner proteomanalytischer Fragestellungen stehen.

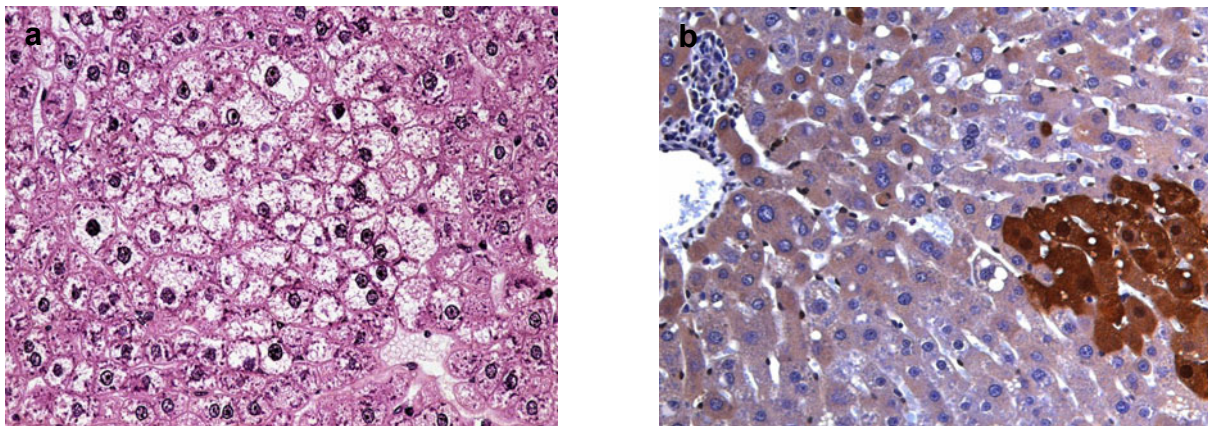
### **3.3 Präneoplastische Veränderungen in der Leber**

Leberkrebs in Form des hepatozellulären Karzinoms stellt weltweit die fünfthäufigste Krebsart dar (Su, 2003). In Afrika und Asien betreffen sogar 60% der Krebserkrankungen die Leber, was in diesen Ländern auf chronische Infektionen mit Hepatitis B- und C-Viren sowie auf Aflatoxin B1-kontaminierte Nahrungsmittel zurückzuführen ist. Die Hauptursache für Leberkrebs in den Industrienationen ist im Alkoholmissbrauch zu sehen (Bannasch, 2001), wenn auch durch Fernreisen zugezogene Hepatitis-Infektionen einen zunehmenden Beitrag leisten.

Der Prozess der chemisch induzierten Leberkanzerogenese ist am Nager am besten untersucht (Bannasch, 1980, Farber, 1980, Emmelot und Scherer, 1980, Pitot, 1980). Der sogenannte Rattenleber-Foci-Test (*Rat Liver Foci Bioassay*, RLFB) ist bereits in Kapitel 1.2.2 als verkürzte Prüfmethode auf kanzerogene Substanzeigenschaften mit Wirkung auf die Leber vorgestellt worden (Bannasch, 1986, Ito, 1989, Williams, 1982). In diesem Test werden nach Exposition von Ratten mit kanzerogenen Stoffen über einen definierten Zeitraum phänotypisch veränderte Leberzellen (Hepatozyten) als Endpunkte herangezogen. Diese Zelltypen treten nach einigen Wochen als herdförmige Ansammlungen (Foci) auf und können durch immunhistochemische

Methoden sichtbar gemacht werden (Abbildung A-8). Es wird davon ausgegangen, dass diese Foci frühe präneoplastische Veränderungen darstellen, die sowohl benignen Adenomen wie auch malignen Karzinomen vorausgehen (Bannasch, 2001).

Verschiedene phänotypisch differenzierbare Foci-Typen sind beschrieben (Bannasch, 1996), wobei sich nach Exposition mit genotoxischen Kanzerogenen der sogenannte klarzellige Fokus vorherrschend manifestiert. Von daher soll er an dieser Stelle auch näher beschrieben werden.



**Abbildung A-8: Foci veränderter Hepatozyten.**

(a) Klarzelliger Fokus, histochemische Färbung mit Hämalaun (H) und Eosin (E); H färbt Zellkerne, Kalk und Knorpelgewebe blau, E dagegen visualisiert Cytoplasma und Organellen in verschiedenen Ton-Abstufungen in rot. Das ungefärbte Cytoplasma zeigt die für die veränderten Hepatozyten charakteristische Glykogen-Speicherung (b): GST-P-positiver Fokus (braun gefärbte Zellen), immunhistochemische Detektion. Beide Färbungen wurden mit NNM-behandeltem Rattenlebergewebe in der histopathologischen Abteilung des Instituts für Toxikologie der Merck KGaA (Darmstadt) vorgenommen.

Der klarzellige, auch glykogenotisch-basophiler Fokus genannt, zeichnet sich in der frühen Phase seiner Bildung durch starke Glykogenspeicherung aus, die mit zahlreichen enzymatischen Veränderungen einhergeht. So können durch immunhistochemische Methoden eine verringerte Aktivität der Glukose-6-Phosphatase (Gössner und Friedrich-Freksa, 1964) sowie erhöhte Expression von Pyruvatkinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Hacker, 1982) detektiert werden. Die Veränderung dieser essentiellen Enzyme des zellulären Kohlenhydratstoffwechsels weist auf eine Verschiebung vom anabolen zum katabolen Stoffwechsel hin. Die Glukoneogenese schaltet zu Glykolyse und zum Pentose-Phosphat-Weg (Hacker, 1982, Klimek, 1984). Dadurch gewinnt die Leberzelle Energie, die sie für verstärkte Zellproliferation verwenden kann. Des

Weiteren können die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (Kalengayi, 1975) und die placentare Form der Glutathion-S-Transferase (GST-P) (Sato, 1984), beides Enzyme mit einer bedeutenden Rolle im Fremdstoffmetabolismus, in den Foci vermehrt nachgewiesen und daher als Marker für diese präneoplastischen Veränderungen herangezogen werden.

In Abhängigkeit von der Dosis und der Dauer der Behandlung mit dem genotoxischen Kanzerogen variiert die Zeit zwischen dem ersten Auftreten von Foci veränderter Hepatozyten und der tatsächlichen Manifestation von Adenomen und Karzinomen. In von Weber und Bannasch (1994a, b, c) durchgeführten Studien mit unterschiedlichen Behandlungsprotokollen (von einmaliger bis kontinuierlicher Exposition) und NNM als Modellsubstanz traten die frühesten Adenome/Karzinome nach 15 Wochen, die spätesten nach mehr als 50 Wochen auf.

Die in den Nagern vorrangig auftretenden präneoplastischen Veränderungen konnten mehrfach auch in der humanen Leber nachgewiesen werden (Altmann, 1994, Bannasch, 1997). Daher wird angenommen, dass der Prozess der Leberkanzerogenese in Nager und Mensch ähnlich verläuft, so dass die experimentellen Ergebnisse am Tier auch zur Vorhersage des kanzerogenen Potentials einer chemischen Substanz im Menschen herangezogen werden können.

### **3.4 Modellversuch mit N-Nitrosomorpholin**

Zur Induktion von Tumoren sowie frühen präneoplastischen Veränderungen in Rattenlebern wurde in der vorliegenden Arbeit ein Modellversuch mit NNM durchgeführt. Die durch die genotoxische Chemikalie induzierten Leberveränderungen sollten im Rahmen eines vom BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) geförderten Projektes mit proteomischen und genomischen Untersuchungsmethoden detektiert und in einen mechanistischen Zusammenhang mit dem Prozess der Leberkanzerogenese gestellt werden. Mehrere Partner waren an der Durchführung des Projekts, das unter dem Förderschwerpunkt „Ersatzmethoden zu Tierversuchen“ (Programm der Bundesregierung „Biotechnologie 2000“ vom 17. Juni 1998) stand, beteiligt. Während bei der Merck KGaA in Darmstadt Proteomics-Methoden zur Charakterisierung des veränderten Lebergewebes zum Einsatz kam, erstellte die Bayer AG in Wuppertal parallel Genexpressionsprofile derselben Proben durch cDNA-Chiptechnologie. Die

Zusammenführung der Ergebnisse sowie deren weitere biostatistische Auswertung erfolgten am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg.



## **B ZIELSETZUNG**

Die heutige moderne Toxikologie ist dem 3-R-Prinzip (Russel und Burch, 1959), einem Konzept zur Verminderung und Verkürzung von Tierversuchen, verpflichtet. Allerdings stellt insbesondere die für die Zulassung und Registrierung neuer Arzneistoffe oder Chemikalien behördlich geforderte Prüfung von Substanzen auf kanzerogene Eigenschaften immer noch einen langwierigen Prozess mit einem hohen Bedarf an Versuchstieren dar.

Daher sollte unter dem Einsatz von Methoden der Proteomforschung eine Identifizierung und Charakterisierung neuer Protein-Biomarker erfolgen, die eine verbesserte Vorhersage von Prozessen der chemisch induzierten Leberkanzerogenese erlauben. Motivation für diese Arbeiten war die Annahme, dass durch chemische Substanzen angestoßene molekulare Prozesse mit proteinanalytischen Methoden früher detektierbar sind als dies mit konventionellen toxikologischen Methoden möglich ist, welche vor allem die Prüfung von Substanzen im Tierversuch mit anschließender histopathologischer und klinisch-biochemischer Bewertung der toxischen Effekte vorsehen. Die Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob Proteomstudien die traditionelle Toxikologie mit einer verbesserten, insbesondere verkürzten Erkennung und Aufklärung toxischer Wirkmechanismen unterstützen können. In der Zukunft würde dies eine signifikante Verkürzung als auch Verbesserung von Tierversuchen bedingen. Dies sollte zudem eine Verringerung der Anzahl an Versuchstieren und damit letztendlich eine Einsparung von Kosten und Zeit mit sich bringen.

## C MATERIALIEN UND METHODEN

### 1 Verwendete Materialien

#### 1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid-Bis Fertiglösung (30%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril (ACN)	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (CHCA)	Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA, USA
$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (CHCA)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (CHCA)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Agarose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ameisensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumhydrogencarbonat	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Benzonase	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bioquant®-Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA) Stammlösung (2 mg/ml)	Pierce, Rockford, IL, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Butanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
CHAPS	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (96%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Hybond™-ECL™ Nitrocellulose Membrane</i> (0,45 $\mu$ m)	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
<i>Hyperfilm™ ECL</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
<i>Immobiline™ Dry Strips</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Iodacetamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mineralöl	BioRad, München, Deutschland
<i>MultiMark®</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt, Deutschland
N-Nitrosomorpholin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
<i>NuPAGE® Antioxidant</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>NuPAGE® LDS-Sample Buffer</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>NuPAGE® MES Running Buffer</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>NuPAGE® Novex Bis-Tris-Gele</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>NuPAGE® Reducing Agent</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>Phosphate Buffered Saline (PBS) (10x)</i>	BioRad, München, Deutschland
<i>Protease Inhibitor Cocktail Set III</i>	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
<i>18s-rRNA Ribosomal RNA control</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (1M)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure, rauchend	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS-Lösung (10%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Servalyte	Serva, Heidelberg, Deutschland
Silbernitratlösung (1M)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sinapinsäure	Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA, USA
Spermin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
<i>TaqMan® Universal Master Mix (20x)</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Taurin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Thioharnstoff	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-Base	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris/Glycin/SDS-Puffer (10x)	BioRad, München, Deutschland
Tris/HCl pH 8,8 (1,5 M)	BioRad; München, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Trypsin (modifiziertes Schweinetrypsin)	Promega, Madison, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
ZipTips™	Millipore, Eschborn, Deutschland

## 1.2 Kits

<i>1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR</i>	Roche, Basel, Schweiz
<i>Assay-on-Demand™ Gene Expression Assay Mix</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>Colloidal Blue Staining Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>ECL-Kit</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
<i>GelCode® E-Zinc™ Reversible Stain Kit</i>	Pierce, Rockford, IL, USA
<i>iTRAQ™ Reagent Multi-Plex Kit</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>LMW (Low Molecular Weight) Gel Filtration Calibration Kit</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Quiagen, Hilden, Deutschland

*Sequazyme Peptide Mass Standard Kit*

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

### 1.3 Geräte und Gebrauchsmaterialien

<i>ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Blotting-Kammer: <i>Power Pac 300</i>	BioRad, München, Deutschland
Blottingkassette	BioRad, München, Deutschland
<i>Concentrator 5301</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Entwicklermaschine: <i>Hyper Processor</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Ettan Dalt II Kammer	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
<i>Fiber Pads</i>	BioRad, München, Deutschland
Filmkassette	BioRad, München, Deutschland
Fraktionssammler <i>Frac-950</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
(Mikro) Fraktionssammler <i>Probot™</i>	Dionex, Sunnyvale, USA
Gelkammer: <i>Novex Mini-Cell</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gelkassetten	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
HPLC-System <i>ÄKTA Purifier</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
HPLC-System <i>HP 1090 II</i>	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
HPLC-System <i>Jasco 1580</i>	Dionex, Sunnyvale, USA
(nano) HPLC-System <i>UltiMate™</i>	Dionex, Sunnyvale, USA
<i>Hybond™ Blotting Paper</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
<i>IPGphor™ Strip Holder</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
<i>IPGphor™ Strip Holder Cleaning Solution</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
<i>IPGphor™-Zelle</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
MALDI-Probenteller für 100 und 576 Proben	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
MALDI-TOF Massenspektrometer ( <i>Voyager DE STR</i> )	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer ( <i>4700 Proteomics Analyzer</i> )	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>Mastercycler gradient</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikropistille	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop	NanoDrop Technologies, Rockland, USA
Plastibrand® Einmal-Küvetten	Brand, Gießen, Deutschland
Potter	B. Braun Biotech International, Mainz, Deutschland
Proteinchip® (Gold)	Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA, USA
Proteinchip® (IMAC)	Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA, USA
Proteinchip® (SAX)	Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA, USA
Proteinchip® (WCX)	Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA, USA
Säule (Kapillar-C18 Umkehrphase) <i>PepMap™</i> , 75µm Durchmesser	Dionex, Sunnyvale, USA
Säule (nano-Vorsäule) <i>PepMap™100</i>	Dionex, Sunnyvale, USA
Säule <i>Resource™ RPC 3 ml</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Säule <i>Resource™ S 1 ml</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Säule <i>Tricorn Superdex 200 10/300</i>	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Schüttler: <i>Unimax 1010</i>	VWR International, Darmstadt, Deutschland
SELDI-Bioprozessor	Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA, USA
SELDI-TOF Massenspektrometer (PBS II <i>ProteinChip Reader</i> )	Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA, USA
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Ultraschallbad  
Ultrazentrifuge Optima™ Max 130t rpm  
UV-Lampe: UV Transilluminator 2000  
Waage  
Zentrifuge: Centrifuge 5415R  
Zentrifuge: Multifuge 3 S-R

VWR International, Darmstadt, Deutschland  
Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland  
BioRad, München, Deutschland  
Sartorius, Goettingen, Deutschland  
Eppendorf, Hamburg, Deutschland  
Heraeus, Hanau, Deutschland

## 1.4 Software

*ABI Prism® 7000 SDS Software 1.0*  
*Data Explorer 4.0*  
*GPS-Explorer™ Software v3.0*  
*Mascot v1.7*  
*ProteinChip® Software*  
*ProteomWeaver 2.0*  
*Unicorn 5.0*

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA  
Applied Biosystems, Foster City, CA, USA  
Applied Biosystems, Foster City, CA, USA  
Matrix Science Ltd., London, England  
Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA, USA  
Definiens, München, Deutschland  
Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

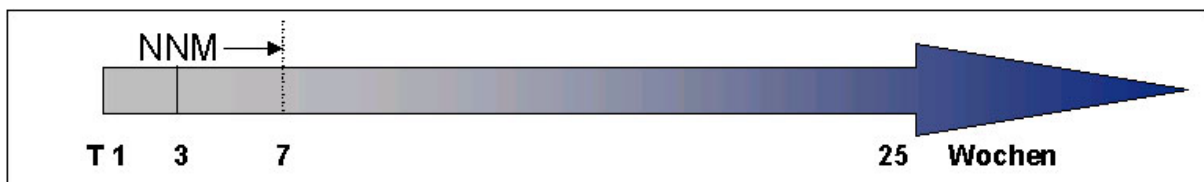
## 2 Tierstudien

Der in dieser Arbeit beschriebenen proteinanalytischen Untersuchung von Rattenlebergewebe liegen zwei Tierstudien zugrunde, die beide bei der Merck KGaA (Darmstadt) am Institut für Toxikologie in der pathologischen Abteilung durchgeführt wurden. Hierbei kamen die Grundsätze der „Guten Laborpraxis“ (GLP, vgl. Kapitel E, Abschnitt 1) zur Anwendung. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass auch sämtliche sich der Tierstudie anschließenden histopathologischen Bewertungen von Fachpersonal der Abteilung für Pathologie vorgenommen wurden.

### 2.1 Behandlung der Tiere

Für beide Tierstudien kamen zehn Wochen alte männliche Wistar Ratten zum Einsatz (Züchter Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland), die in Gruppen von je sechs Tieren zufällig auf die zur Verfügung stehenden Käfige verteilt wurden. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen, am Ende ihrer *In-Life*-Phase wurden sie durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet.

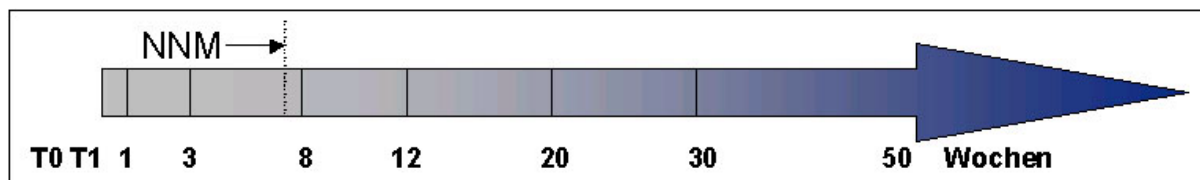
In der ersten Studie wurde den Tieren aus drei Gruppen täglich 20 mg/kg Körpergewicht N-Nitrosomorpholin (NNM) über das Trinkwasser verabreicht, während drei weitere unbehandelte Gruppen als Kontrollen fungierten. Die Sektion der Tiere der ersten Gruppe und die Bereitstellung deren Lebergewebes erfolgte nach bereits einem Tag der Behandlung, die der zweiten Gruppe nach drei Wochen. Der dritten Gruppe wurde die Chemikalie sieben Wochen lang verabreicht, gefolgt von einer behandlungsfreien Beobachtungsphase von 18 Wochen. Das Lebergewebe wurde hier also erst nach 25 Wochen entnommen. Die Sektion der Ratten aus den Kontrollgruppen erfolgte zeitgleich den korrespondierenden behandelten Gruppen (Abbildung C-1).



**Abbildung C-1: Tierstudie 1.**

Die Behandlung der Tiere mit NNM erfolgte über einen Zeitraum von sieben Wochen, gefolgt von 18 Wochen behandlungsfreier Beobachtungsphase. Die Lebern wurden zu den Zeitpunkten Tag 1, Woche 3 und Woche 25 entnommen.

Im Fall der zweiten Tierstudie wurde den Ratten täglich 12 mg/kg Körpergewicht NNM wiederum über das Trinkwasser verabreicht. Auch hier erfolgte die Exposition über einen Zeitraum von sieben Wochen, die behandlungsfreie Beobachtungsphase verlängerte sich jedoch auf 42 Wochen. Behandeltes Lebergewebe wie auch das von den entsprechenden Kontrolltieren wurde hierbei an acht verschiedenen Zeitpunkten bereitgestellt: Tag 1, Wochen 1, 3, 8, 12, 20, 30 und 50 (Abbildung C-2).



**Abbildung C-2: Tierstudie 2.**

Die NNM-Exposition der Ratten erfolgte über sieben Wochen, gefolgt von 42 Wochen behandlungsfreier Beobachtungsphase. Die Lebern wurden an acht verschiedenen Zeitpunkten entnommen: Tag 1, Wochen 1, 3, 8, 12, 20, 30 und 50.

## 2.2 Probenentnahme

Die Ratten wurden durch Inhalation von CO<sub>2</sub> getötet und durch einen Bauchschnitt entblutet. Für die durchzuführenden Untersuchungen wurden der linke und der mittlere Leberlappen entnommen. Ein Teil des linken Lappens wurde für die Proteomanalysen in Würfel von ca. 0,3 mm Kantenlänge geschnitten, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Für die histopathologischen Untersuchungen wurden je drei Scheiben (2-3 mm) jedes entnommenen Leberlappens in Formalin fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet und gefärbt (Hämalaun- und Eosinfärbung (HE) oder immunhistochemische Färbung).

## 3 Proteinextraktion aus tierischem Gewebe

Um Proteine aus tierischen Zellverbänden analytischen Methoden zugänglich machen zu können, müssen die Zellen zunächst mechanisch aufgeschlossen und anschließend die Proteine in Lösung gebracht werden.

Da sich die nativen Proteine der unterschiedlichen Zellkompartimente (Cytoplasma, Zellkern, Cytoskelett, Membranen) stark in ihrem Löslichkeitsverhalten unterscheiden, viele Membranproteine sogar nur sehr schwer solubilisierbar sind,

müssen stark denaturierende und reduzierende Pufferbedingungen gewählt werden, um möglichst viele gelöste Proteine im Extrakt zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit kamen zwei verschiedene Extraktionsverfahren zum Einsatz, zunächst eine Methode unter stringenten Pufferbedingungen, bei denen die Proteine aller Zellbestandteile gelöst werden sollten. Die Pufferzusammensetzung des zweiten Verfahrens wurde so gewählt, dass möglichst repräsentativ alle cytosolischen Proteine solubilisiert vorlagen.

### 3.1 Komplette Extraktion

Das Protokoll zur kompletten Extraktion von Proteinen aus tierischem Gewebe wurde in einer stets einzuhaltenden *Standard Operating Procedure* (SOP) festgeschrieben. Je 75-150 mg Lebergewebe wurde unter ständigem Hinzufügen von flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill pulverisiert und dadurch homogenisiert. Nach dem Verdampfen des flüssigen Stickstoffs erfolgte der Aufschluss der Zellen durch Zusatz von 125 µl Lysispuffer 1 und 875 µl Lysispuffer 2. Der so entstandene Extrakt inkubierte 1h lang bei Raumtemperatur (RT) und 500 rpm auf einem Thermomixer (Eppendorf). Nach 30minütiger Ultrazentrifugation (Beckmann Coulter) bei 10°C und 35.000 rpm wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C tiefgefroren.

Lysispuffer 1	
10 mM	Tris/HCl pH 7,5
1 mM	EDTA
200 mM	Saccharose
16% (v/v)	Benzonase (625 Einheiten)
3,2% (v/v)	Protease Inhibitor Cocktail

Lysispuffer 2	
7 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
4% (m/v)	CHAPS
40 mM	DTT
20 mM	Spermin
in	Aqua purificata

### 3.2 Partielle Extraktion

Bei den hier gewählten Pufferbedingungen wurde hauptsächlich eine Solubilisierung der cytosolischen Proteine und daher eine partielle Extraktion der Leberzellen erreicht. Dieses Verfahren wurde eingesetzt, wenn nachfolgende Analysen eine Verringerung der Probenkomplexität verlangten. Die Methode unterscheidet sich von



der in 3.1 beschrieben kompletten Extraktion nur insofern, dass Lysispuffer 1 und 2 durch einen Phosphatpuffer (pH 7) ersetzt wurden.

Phosphatpuffer	
20 mM	Kaliumphosphat pH 7
10 mM	Kaliumchlorid
10 mM	Natriumchlorid
16% (v/v)	Benzonase (625 Einheiten)
3,2% (v/v)	Protease Inhibitor Cocktail

## 4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration in den Leberzellextrakten erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Sie beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau G-250 an basische und aromatische Aminosäuren, wodurch sich dessen Absorptionsmaximum von  $\lambda = 465$  nm auf  $\lambda = 595$  nm verschiebt. Die Absorption der Probelösung bei  $\lambda = 595$  nm diente daher als Messgröße für den Proteingehalt und wurde mit einem Photometer (Eppendorf) bestimmt.

Zur Erstellung der Eichgeraden diente die Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung (1,0, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1 und 0,05 mg/ml).

Die zu bestimmenden Proben wurden in einem Bereich zwischen 1:10 und 1:100 mit Aqua purificata verdünnt. 25  $\mu$ l der verdünnten Proben wurden mit 1,25 ml Bioquant-Reagenz (Merck) versetzt, nach 5 min Inkubation bei RT in Küvetten (Brand) überführt und unter Angabe der eingesetzten Probenverdünnung photometrisch vermessen.

## 5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese) trennt Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Kleine Proteine wandern schneller durch die Poren der Gelmatrix als große. Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) wird zusätzlich noch eine isoelektrische Fokussierung (IEF) vorgeschaltet, die Proteine in einem pH-Gradienten aufgrund ihrer Ladung separiert.

Sowohl die ein- als auch die zweidimensionale Separation der Proteine erfolgte nach Anweisung einer SOP.

## 5.1 Eindimensionale Gelelektrophorese

Die eindimensionale SDS-PAGE erfolgte mit 4-12% NuPAGE Novex Bis-Tris-Gelen (Invitrogen) in einem MES SDS Laufpuffer-System. Pro Geltasche wurden hierbei 20 µl zuzüglich 2 µl *Reducing Agent* (Invitrogen) aufgetragen, wobei die Verdünnung aller Proben mit LDS-Probenpuffer (Invitrogen) erfolgte. Bei einer konstant angelegten Spannung von 200 Volt und einem Stromfluss von 125 mA/Gel betrug die Laufzeit ca. 40 min. Als Größenmarker wurden 7 µl MultiMark (Invitrogen) verwendet. Pro Gelkammer setzten sich die Laufpuffer folgendermaßen zusammen:

Außenpuffer	
40 ml	MES SDS <i>Running Buffer</i> (20x)
760 ml	Aqua purificata

Innenpuffer	
200 ml	Außenpuffer
0,5 ml	Antioxidant

## 5.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Aus den Tierstudien 1 und 2 standen Leberextrakte (Protokoll komplette Extraktion unter 3.1) von je sechs behandelten und sechs unbehandelten Proben pro Gruppe und pro Zeitpunkt zur Verfügung (vgl. Abschnitt 2.1). Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden von allen Proben 2-DE-Gele in je vier technischen Replikaten angefertigt. Die biologische Variabilität der Tiere untereinander wurde bereits durch die Wahl der Gruppengröße von sechs Tieren pro Gruppe ausgeglichen, so dass sich 48 2-DE-Gele pro Studienzeitpunkt ergaben.

Der so gewählte Versuchsansatz resultierte für Tierstudie 1 in 144, für Tierstudie 2 in 384 angefertigten 2-DE-Gelen.

### 5.2.1 Trennung in der ersten Dimension

Rehydrierung und IEF der Proteingemische erfolgten bei Raumtemperatur unter Verwendung einer IPGphor-Zelle (Amersham) auf 24 cm langen, mit einem immobilisierten pH-Gradienten (pH 4-7) versehenen Gel-Streifen (*Immobiline Dry Strips*, Amersham). Hierzu wurde jeweils 1 mg des Proteinextrakts mit Rehydrierungspuffer und einer Spur Bromphenolblau auf ein Volumen von 500 µl eingestellt und luftblasenfrei auf den IPG-Streifen (immobilisierte pH-Gradienten-Streifen) verteilt. Nach 10 Stunden Rehydrierung startete die isoelektrische Fokussierung zunächst 1 h bei 200V, gefolgt von 1 h bei 500V und 1 h bei 1000V.

Anschließend wurde die Spannung innerhalb 30 Minuten auf 8000V erhöht und die IEF noch 5 h fortgeführt.

Rehydrierungspuffer	
7 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
2% (m/v)	CHAPS
15 mM (m/v)	DTT
0,75% (v/v)	Servalyte
in	Aqua purificata

Äquilibriumspuffer	
6 M	Harnstoff
125 mM	Tris/HCl pH 7,5
2,5% (m/v)	SDS
30% (v/v)	Glycerol
in	Aqua purificata
+ 1% (m/v)	DTT (1. Schritt)
+ 5% (m/v)	Iodacetamid (2.Schritt)

### 5.2.2 Äquilibriumierung

Die Äquilibriumierung der Gelstreifen erfolgte nach Beendigung der IEF für 15 Minuten in je 10 ml Äquilibriumierungspuffer unter Zusatz von 1% DTT zur Reduktion vorhandener Disulfidbrücken. In einem zweiten Schritt wurde nochmals 15 Minuten mit dem gleichen Puffer inkubiert, wobei das DTT durch 5% Iodacetamid ersetzt wurde. Iodacetamid acetyliert dabei die freigesetzten Sulfhydrylgruppen und verhindert deren Rückreaktion zu Disulfiden. Dadurch kann keine Brückenbildung zwischen den Aminosäureketten mehr stattfinden.

### 5.2.3 Präparation von Polyacrylamidgelen

Zur Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension wurden 10%ige Polyacrylamidgele von 24 cm Länge, 20 cm Höhe und 1 mm Stärke hergestellt unter Verwendung einer Kammer (Amersham), die das simultane Gießen von bis zu 14 Gelen ermöglichte. Die Monomer-Lösung polymerisierte dabei in Gelkassetten (Amersham), bestehend aus zwei Glasplatten, die gemäß der Empfehlung des Herstellers in der Gieß-Kammer angeordnet wurden. Mit Hilfe eines Silikonschlauchs, verbunden mit einer 100 ml Spritze, wurde die Acrylamid-Lösung aus einem Erlenmeyerkolben so angesaugt, dass sich die Gießkammer von unten füllte. Nachfolgende Zugabe von *Displacing Solution* verhinderte das Zurückfließen der Gellösung aus der Kammer. Nach Beendigung des Einlaufvorgangs wurden die Gele mit 1 ml wassergesättigtem Butanol überschichtet und ca. 2 h bis zur vollständigen Polymerisation stehengelassen.

<b>10% Polyacrylamidgele</b>	
33,3% (v/v)	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
25% (v/v)	Acrylamid-Bis Fertiglösung, 30%
0,1% (w/v)	SDS
0,05 (v/v)	TEMED
0,06% (w/v)	APS
in	Aqua purificata

<b>Displacing Solution</b>	
25% (v/v)	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
50% (v/v)	Glycerol
Spur	Bromphenolblau
in	Aqua purificata

#### 5.2.4 Trennung in der zweiten Dimension

Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden mit Hilfe eines Spatels zwischen den Glasplatten auf den auspolymerisierten Polyacrylamid-Gelen platziert und mit 1 ml erwärmter Agarose-Lösung dort fixiert. Dabei durften keine Luftblasen zwischen Gel und Streifen entstehen. Die SDS-PAGE erfolgte bei Raumtemperatur in einer Ettan Dalt II Kammer (Amersham), die zunächst mit 7,5 l SDS-Tris-Glycin-Puffer gefüllt wurde. Danach wurden die Gelkassetten nach Anleitung des Herstellers in der Kammer angeordnet und mit 2,5 l Taurinpuffer überschichtet.

<b>Agaroselösung</b>	
1% (m/v)	Agarose
12,5% (v/v)	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
0,4% (m/v)	SDS
0,1% (m/v)	Bromphenolblau
in	Aqua purificata

<b>SDS-Tris-Glycin-Puffer</b>	
0,6% (m/v)	Tris-Base
2,8% (m/v)	Glycin
0,1% (m/v)	SDS
in	Aqua purificata

<b>Taurinpuffer</b>	
0,6% (m/v)	Tris-Base
2,5% (m/v)	Taurin
0,1% (m/v)	SDS
in	Aqua purificata

Das Laufprogramm startete für 30 min bei 5 Watt/Gel, gefolgt von ca. 5 h bei 15 Watt/Gel. Die Trennung wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Linie das untere Ende der Gele erreicht hatte. Die Gele wurden vorsichtig aus den Kassetten gelöst und gemäß der folgenden Färbemethode weiterverarbeitet. Dauerhafte Lagerung erfolgte in 20% Ethanol.

## 5.3 Proteinfärbung

### 5.3.1 Fluoreszenzfärbung

Die nach SOP durchgeführte Visualisierung der Proteine in den 2-DE-Gelen erfolgte nach einer Methode von Thierry Rabilloud (Rabilloud, 2001) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ruthenium.

Nach Fixierung der Gele für 30 min in je 300 ml Fixierlösung wurden sie 30 min in 20% Ethanol, zweimal 15 min in Aqua purificata und wiederum 30 min in 20% Ethanol gewaschen (je 300 ml). Die Färbung in je 300 ml Färbelösung erfolgte über Nacht.

Fixierlösung	
30 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Essigsäure
in	Aqua purificata

Färbelösung	
20% (v/v)	Ethanol
10 µl/l	10 nM Ruthenium
in	Aqua purificata

Nach der Färbung wurden die Gele 3x 10 min mit Aqua purificata gewaschen und in 20% Ethanol aufbewahrt.

### 5.3.2 Silberfärbung nach Heukeshoven

Zur Detektion elektrophoretisch separierter Proteine durch Silber kam die Färbemethode nach Heukeshoven (Heukeshoven, 1988) zum Einsatz.

Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden die Gele kurz mit Aqua purificata gewaschen, bevor sie 3 min unter Schütteln in *Farmer's Reducer* inkubierten. Um die nun entstandene gelbe Färbung wieder vollständig zu beseitigen, schlossen sich mehrere Waschschrte in Aqua purificata an (mindestens 5 x 5 min). Danach erfolgte für 1 h unter Schütteln die Inkubation in Silbernitratlösung. Nach kurzen Waschschrten in Aqua purificata (2x) und Natriumcarbonatlösung (1x) wurden die Proteine durch Zusatz der Entwicklerlösung angefärbt. Einige Tropfen Eisessig beendeten den Färbevorgang.

Farmer's Reducer	
0,4% (m/v)	Natriumthiosulfat
0,2% (m/v)	Kaliumhexacyanoferrat
in	Aqua purificata

Silbernitratlösung	
1,25% (v/v)	1M Silbernitratlösung
in	Aqua purificata

Natriumcarbonatlösung	
2,5% (m/v)	Natriumcarbonat
in	Aqua purificata

Entwicklerlösung	
2,5% (m/v)	Natriumcarbonat
0,03% (v/v)	Formaldehyd
in	Aqua purificata

Zum Entfärben von Silber-Gelen, unerlässlich zum Beispiel vor der massenspektrometrischen Analyse, wurden die Gele bis zum Verschwinden der Farbbanden in *Farmer's Reducer* inkubiert und anschließend wieder so lange in Aqua purificata gewaschen, bis die Gele klar und farblos waren.

### 5.3.3 Coomassiefärbung

Die Färbung von 1D-SDS-PAGE-Gelen mit kolloidalem Coomassie erfolgte mit dem *Colloidal Blue Staining Kit* (Invitrogen) wie vom Hersteller beschrieben.

### 5.3.4 Zinkfärbung

Bei der Visualisierung von Proteinen durch Zink kommt das Prinzip einer Negativfärbung zur Anwendung. Der Hintergrund des Gels erscheint undurchsichtig weiß, während die Proteine selbst als klare Banden oder *Spots* zurückbleiben und am besten vor einem dunklen Hintergrund sichtbar werden. Die Sensitivität dieser Methode liegt in dem Bereich der Silberfärbung und ist durch Zusatz von EDTA leicht reversibel. Die Durchführung der Methode erfolgte unter Zusatz von Färbelösung, gefolgt von Entwicklerlösung wie vom Hersteller beschrieben mit dem *GelCode E-Zinc Reversible Stain Kit* (Pierce).

Zur Entfärbung wurde die im *Kit* enthaltene Entfärbelösung ebenfalls wie vom Hersteller beschrieben eingesetzt. Alternativ konnte auch 50 mM EDTA-Lösung verwendet werden.

## 5.4 Digitalisierung von 2-DE-Gelen

Zur Visualisierung der fluoreszenzgefärbten Proteine wurden die 2-DE-Gele mit dem Fluoreszenz-Laser-Scanner Molecular Imager FX (BioRad) digitalisiert. Dies erfolgte mit einer Farbtiefe von 16 bit und einer Auflösung von 150 dpi. Durch Transformation der Gelbilder ins tif-Format wurden sie der nachfolgenden Auswertung zugänglich.

## 5.5 Computergestützte Bildanalyse

Die 2-DE-Gel-Bearbeitungssoftware ProteomWeaver 2.0 (Definiens) diente zur Auswertung der erhaltenen Gelbilder. Die Gele wurden dabei für jeden Studienzeitpunkt in getrennten Experimenten analysiert mit zwei Gruppen (Kontrollen und behandelte Proben) pro Experiment. Dies resultierte in 48 Gelen für jedes Experiment und 24 Gelen pro Gruppe. Zunächst wurde von ProteomWeaver eine automatische *Spot*-Detektion vorgenommen. Dazu wurde das Signal-Hintergrund-Verhältnis für die einzelnen *Spots* berechnet und als relative Intensität angegeben. Die zugrunde liegenden Parameter für die *Spot*-Detektion waren für die Analyse von fluoreszenzgefärbten Gelen optimiert. Anschließend erfolgte ein *Matching* aller Gele, d.h. die Software überlagerte jedes der 48 Bilder mit jedem anderen Bild und suchte nach gleichen *Spot*-Mustern. Nach Normalisierung der Daten auf den Median der Werte für die relativen Intensitäten wurden statistische Vergleiche zwischen den Gruppen ( $n = 24$ ) bezüglich expositionsbedingter Veränderungen der Proteinexpression angestellt. In die Auswertung mit einbezogen wurden dabei nur *Spots* mit relativen Intensitäten  $\geq 0,1$ , da nur diese mit bloßem Auge noch sichtbar waren und somit für eine mögliche nachfolgende Identifizierung ausgeschnitten werden konnten. Um zu gewährleisten, dass keine Artefakte bewertet wurden, beschränkte sich die Analyse des Weiteren auf *Spots*, die in mindestens 2/3 der Gele pro Gruppe detektiert wurden. Als statistisch signifikant galten Expressionsunterschiede zwischen Kontrolle und der jeweiligen behandelten Gruppe mit p-Werten  $\leq 0,02$  (berechnet mit dem Mann-Whitney-Test mit  $n = 24$ ). Hochreguliert, also überexprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe, waren Intensitätswerte, aus denen sich Regulationsfaktoren  $\geq 1,7$  ergaben, als herunterreguliert galten Regulationsfaktoren  $\leq 0,7$ .

## 6 Massenspektrometrische Proteinidentifizierung

### 6.1 Proteolytische Spaltung von Proteinen

Um Proteine massenspektrometrisch anhand ihres *Fingerprints* identifizieren zu können, müssen sie zunächst durch Einsatz definierter Endopeptidasen in Peptide gespalten („verdaut“) werden. In der vorliegenden Arbeit kam hierfür ausschließlich Trypsin (Promega) zum Einsatz, das Aminosäureketten C-terminal spezifisch hinter Lysin und Arginin spaltet.

#### 6.1.1 Verdau im Gel

Alle zu untersuchenden Protein-*Spots* und -Banden wurden aus den entsprechenden 1D- und 2D-Gelen mit Hilfe eines handgefertigten Werkzeugs ausgeschnitten (Lochstanze mit ca. 3 mm Durchmesser) und in Eppendorf *Tubes* überführt. Im Falle der fluoreszenzgefärbten Gele erfolgte dies unter Vorkehrung der entsprechenden Sicherheitsmaßnahmen über einer UV-Lampe (BioRad).

Silber- und Zink-gefärbte Gelstücke wurden zunächst nach in den Abschnitten 5.3.2 und 5.3.4 beschriebenen Protokollen entfärbt. Anschließend erfolgte der Protein-Verdau unabhängig von der Färbemethode wie im Folgenden erläutert, wobei auch dieses Protokoll in einer SOP festgeschrieben wurde.

Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden zur Beseitigung aller Verunreinigungen unter Schütteln bei 500 rpm auf einem Thermomixer (Eppendorf) einigen Waschschritten unterzogen (Tabelle C-1). Zunächst wurde die Gelstücke mehrfach in Ammoniumbicarbonatlösung inkubiert, gefolgt von zwei Waschschritten mit einer Mischung aus Ammoniumbicarbonatlösung und Acetonitril (1:1). Nachfolgender Zusatz von Acetonitril führte zur Denaturierung der Proteine.

**Tabelle C-1: Protokoll zur Vorbereitung des enzymatischen Protein-Verdaus.**

Dauer	Lösung	Menge	Wiederholungen
5 min	50 mM Ammoniumbicarbonat (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> )	je 100 µl	5-10
30 min	50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> /ACN (1:1)	je 100 µl	2
5 min	ACN (100%)	je 100 µl	1

Nach Entfernen des Acetonitrils wurden die Gelstücke in einer *Speed Vac* (Eppendorf) vollständig getrocknet. Zugabe von Trypsinlösung (10 µg/ml in 25 mM



NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung) in Schritten von je 10 µl erfolgte so lange, bis die Lösung von den Gelstücken nicht mehr aufgesaugt wurde. Nach vollständigem Überdecken der Gelstücke mit 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung erfolgte der Proteinverdau über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln auf dem Thermomixer.

### **6.1.2 Verdau in Lösungen**

Im Falle wenig komplexer Gemische können Proteine auch ohne vorherige Auftrennung mittels SDS-PAGE direkt in Lösung verdaut werden. Hierzu wurden die Proben zunächst in der *Speed Vac* (Eppendorf) zur Trockne eingedampft und der Rückstand anschließend in 4 µl ACN/H<sub>2</sub>O (1:1) und 8 µl 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung aufgenommen. Nach Zusatz von 8 µl Trypsinlösung (10 µg/ml in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung) erfolgte der Verdau wiederum über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln auf dem Thermomixer.

## **6.2 MALDI-MS**

### **6.2.1 Probenvorbereitung**

Um aus den tryptisch verdauten Proben noch vorhandene Reste von Salzen, Detergenzien und anderen bei der massenspektrometrischen Analyse störenden Bestandteile zu entfernen, erfolgte eine Aufreinigung mittels Umkehrphasen-Chromatographie auf C18 ZipTips (Millipore). Die Konditionierung der ZipTips sowie die Aufreinigung der Probe selbst wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### **6.2.2 Präparation des Proben Tellers**

Die Präparation des MALDI-Proben Tellers (Applied Biosystems) erfolgte mit der *dried droplet* Methode (Strupat, 1991). Hierzu wurde die Probe vom C18-Material der ZipTips auf die entsprechende Position des Proben Tellers mit ca. 4 µl 100% ACN/0,1% TFA in H<sub>2</sub>O (1:1) eluiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Zugabe von α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure als Matrix (2 mg/ml, gelöst in 100% ACN/0,1% TFA in H<sub>2</sub>O (1:1)), was eine simultane Trocknung von Probe und Matrix und daher eine homogene Kristallbildung gewährleistete.

### **6.2.3 Datenaquisition**

PMF-Spektren der proteolytisch gespaltenen Proteine wurden mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer Voyager-DE STR (Applied Biosystems) im Reflektor-Positiv-

Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV aufgenommen. Die Freisetzung bzw. Ionisation des Analyten erfolgte durch einen N<sub>2</sub>-Laser mit einer Frequenz von 20 Hz und einer Wellenlänge von  $\lambda = 337$  nm.

PMF- und MS/MS-Spektren wurden mit dem 4700 Proteomics Analyzer MALDI TOF/TOF Massenspektrometer (Applied Biosystems) generiert. Abbildung A-3 zeigte bereits dessen schematischen Aufbau. Der 4700 Proteomics Analyzer benutzt einen Festkörperlaser mit einer Frequenz von 200 Hz und einer Wellenlänge von  $\lambda = 355$  nm zur Freisetzung und Ionisation des Analyten. Die Aquisition der Spektren erfolgte ebenfalls im Reflektor-Positiv-Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV für PMF und 8 kV für MS/MS. Ionenoptische Elemente ermöglichten die Auswahl der Vorläuferionen-Signale und die erneute Beschleunigung der fragmentierten Peptide im MS/MS-Modus. Die Kollisionsenergie betrug dabei 1 kV, der Kollisionsgasdruck  $1 \times 10^6$  Torr.

Externe Massen-Kalibrierungen wurden mit einem Peptid-Standardgemisch (*Sequazyme Peptide Mass Standard Kit*, Applied Biosystems) vorgenommen. Interne Kalibrierungen erfolgten anhand der Autoproteolyseprodukte des für den Protein-Verdau eingesetzten Trypsins.

#### 6.2.4 Datenbanksuche

Nach Messungen am Voyager-DE STR erfolgte die Datenbanksuche zur Identifizierung der Proteine anhand der in den PMF-Spektren detektierten m/z-Werte unter Verwendung der Suchmaschine Mascot (Matrix Science Ltd.) auf den Datenbanken Swiss-Prot oder NCBIInr. Folgende Suchparameter wurden dabei gewählt: Spezies: Nager; Protease: Trypsin; fixe Modifikation: Carbamidomethylierung (bei Proteinen aus 2-DE-Gelen); variable Modifikation: Oxidation an Methionin; überlesene Schnittstelle der Protease: eine; Massentoleranz: 25 ppm (bei interner Kalibrierung).

Zur Identifizierung von Proteinen anhand ihrer MS/MS-Spektren nach Messung am 4700 Proteomics Analyzer erfolgten kombinierte PMF- und MS/MS-Suchen ebenfalls unter Verwendung von Mascot auf den Datenbanken Swiss-Prot und NCBIInr. Einige MS/MS-Suchen wurden auch auf MS-Tag ([www.prospector.ucsf.edu](http://www.prospector.ucsf.edu)) durchgeführt. Die Einstellungen zur Suche waren identisch zu den oben beschriebenen. Als Massentoleranz für die m/z-Werte der Peptidfragment-Ionensignale wurde 0,2 Da gewählt (externe Kalibrierung).

Konnte ein Protein anhand der gewählten Parameter nicht identifiziert werden, wurden die Einstellungen leicht modifiziert und die Suche wiederholt.

## 7 Chromatographische Trennung von Proteinen

### 7.1 Zweidimensionale Trennung

#### 7.1.1 Ionenaustausch-Chromatographie

Zur Reduktion der Probenkomplexität wurden die Proteine der Leberextrakte (Protokoll komplette Extraktion unter Abschnitt 3.1) mittels Kationenaustausch-Chromatographie aufgetrennt. Dies erfolgte mit dem HPLC-System Jasco 1580 (Dionex) unter Verwendung der Kationentauschersäule Resource S 1 ml (Amersham). 1000 µg Protein in 2 ml wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min über 100 min mit einem 10stufigen Gradienten separiert (nach 13 min Trennzeit wurde Laufmittel B in Schritten von 10% erhöht, jeweils für die Dauer von 10 Säulenvolumen). Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte mittels UV-Detektion bei  $\lambda = 280$  nm. Die Fraktionierung wurde manuell vorgenommen, orientiert an den Retentionszeiten der jeweilig detektierten Signale.

Laufmittel A	
0,025 M	Natriumacetat pH 4,5
8 M	Harnstoff

Laufmittel B	
0,025 M	Natriumacetat pH 4,5
8 M	Harnstoff
1 M	Natriumchlorid

#### 7.1.2 Umkehrphasen-Chromatographie

Die mittels Kationenaustausch-Chromatographie erhaltenen Fraktionen (7.1.1) wurden auf der Umkehrphasen-Säule Resource RPC 3 ml (Amersham) mit dem HPLC-System HP 1090 II (Agilent) weiter aufgetrennt. Dazu wurden 1-2 ml der Fraktionen eingespritzt und bei einer Flussrate von 1 ml/min über die Dauer von 70 min mit einem linearen Gradienten separiert (Tabelle C-2). Die UV-Detektion erfolgte bei  $\lambda = 220$  nm. Die Fraktionierung wurde wiederum manuell vorgenommen über die Retentionszeiten der jeweiligen Signale. Die erhaltenen Fraktionen wurden in der

*Speed Vac* (Eppendorf) bis zur Trockne eingengt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

**Tabelle C-2: Gestreckter linearer Gradient für Umkehrphasen-Chromatographie.**

Zeit (min)	Laufmittel A (%)	Laufmittel B (%)
0	100	0
13	100	0
19	70	30
49	40	60
55	0	100
65	0	100

Laufmittel A	
0,05%	TFA
in	Aqua purificata

Laufmittel B	
0,065%	TFA
in	Acetonitril

## 7.2 Gelfiltration

Die Auftrennung der nach partieller Extraktion (Abschnitt 3.2) erhaltenen Proteine mittels Größenausschluss-Chromatographie erfolgte mit einer ÄKTA Purifier HPLC-Anlage (Amersham) unter Verwendung der Gelfiltrationssäule Tricorn Superdex 200 10/300 GL (Amersham). Die Trennmatrix der Säule setzt sich aus quervernetzten Agarose- und Dextran-Einheiten zusammen und bildet ein Volumen von ca. 24 ml bei 300 mm Länge und 10 mm Durchmesser. Die Säule kann über einen breiten pH-Bereich eingesetzt werden und eignet sich am besten zur Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 10.000 und 600.000 Da. Die Äquilibration der Säule erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die in Laufpuffer verdünnten Proteinproben wurden innerhalb 90 min bei einer Flussrate von 0,5 ml/min nach Größe getrennt und fraktioniert. Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte mittels UV-Detektion bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . Die Fraktionierung unter Verwendung des Fraktionssammlers Frac-950 (Amersham) setzte nach 0,3 Säulenvolumen verzögert ein, wobei die Fraktionsgröße 0,5 bis 1,0 ml betrug.

Zur Kalibrierung der Säule wurden die Proteine eines Standardgemischs (*Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit*, Amersham) unter denselben Bedingungen ebenfalls chromatographisch aufgetrennt.

Laufpuffer Gelfiltration	
20 mM	Kaliumphosphat pH 7,0
10 mM	NaCl
10 mM	KCl

## 8 SELDI-MS

### 8.1 Chipvorbereitung

Die SELDI-Protein-Chips sind mit acht Probenapplikationspunkten versehen, die verschiedene chromatographische Oberflächen tragen. Zur Vorbereitung der Chips wurden bis zu 12 Stück parallel in einen „Bioprozessor“ eingespannt. Dieser hat das Format einer 96-*well* Platte und besteht aus einer Halterung für die Chips sowie einem Aufsatz, der die Applikationspunkte nach außen abdichtet und ermöglicht, bis zu 300 µl Volumen auf jeden Punkt aufzubringen. In Abhängigkeit der Eigenschaften der chromatographischen Oberflächen wurden die geeigneten Pufferzusammensetzungen zur Bindung der Proteine aus den Leberlysaten ermittelt. Ebenso erfolgte eine Optimierung der Proben-Inkubationszeiten sowie der Anzahl und Dauer von Waschvorgängen. Die evaluierten Bedingungen für die optimale Chipvorbereitung wurden in einer SOP festgeschrieben (Abschnitt 8.1.1 und 8.1.2) und strikt eingehalten.

#### 8.1.1 Ionenaustauscher-Chips

WCX- (*Weak Cationic Exchanger*, schwacher Kationentauscher) und SAX- (*Strong Anionic Exchanger*, starker Anionentauscher) Chips wurden zunächst für 10 min entsprechend ihrer Oberflächeneigenschaften mit 50 µl eines Präaktivierungspuffers äquilibriert (RT, 225 rpm auf einem Schüttler (VWR International)). Der Präaktivierungspuffer wurde dekantiert und 25-300 µl Probe, verdünnt in entsprechendem Bindepuffer (50-500 µg/ml), aufgetragen und 1h unter Schütteln (225 rpm) inkubiert. Nach dem Abkippen der Probelösung sorgten mehrere Waschschritte, 3x 7 min mit 300 µl Bindepuffer und 2x 1 min mit 300 µl Aqua purificata, für die Entfernung von nicht gebundenen Proteinen und störenden Bestandteilen. Die Chips wurden aus dem Bioprozessor ausgebaut und 30 min bei

Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden als Matrix 2x 0,7 µl Sinapinsäure (SPA in ACN/TFA (1% in H<sub>2</sub>O) 1:1) auf jeden der Probenpunkte appliziert und wiederum bei Raumtemperatur getrocknet.

Präaktivierungspuffer WCX	
10 mM	HCl

Präaktivierungspuffer SAX	
100 mM	Tris-HCl pH 8,5
0,05% (v/v)	Triton X-100

Bindepuffer WCX	
0,1 M	Natriumacetat pH 4,5
0,05% (v/v)	Triton X-100

Bindepuffer SAX	
100 mM	Tris-HCl pH 8,5
0,05% (v/v)	Triton X-100

### 8.1.2 Metallaffinitäts-Chips

Die Applikationspunkte der IMAC-Chips (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, immobilisierte Metallaffinitäts-Chromatographie) wurden zunächst mit je 50 µl „Ladepuffer“ 20 min bei RT und 225 rpm inkubiert. Dabei geht die Affinitätsoberfläche der Chips eine Komplexbindung mit den Metallionen im Ladepuffer ein, welche ihrerseits nach dem Probenauftrag die in den Proteinen enthaltenen Histidine binden. Zur Beseitigung überschüssiger Metallionen wurden die Chips 3x 5 min mit je 300 µl Aqua purificata gewaschen. Nach 5 min Inkubation bei 225 rpm mit je 300 µl IMAC-Bindepuffer wurden 25-300 µl Probe, verdünnt in Bindepuffer (50-500 µg/ml), aufgetragen und 1h unter Schütteln (225 rpm) inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Chip-Vorbereitung wie unter Abschnitt 8.1.1 beschrieben.

Ladepuffer IMAC	
100 mM	Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> )

Bindepuffer IMAC	
100 mM	NaCl
0,05% (v/v)	Triton X-100
in	PBS (1x)

### 8.1.3 Gold-Chips

Gold-Chips besitzen keine chromatographische Oberfläche. Sie fungieren mehr oder weniger als übliche MALDI-Probenteller im Format der Protein-Chips, um im SELDI-Massenspektrometer vermessen werden zu können. 1 µl der Probe und 1 µl gesättigte Matrix (SPA, in ACN/TFA (1% in H<sub>2</sub>O) 1:1) wurden gemäß der *dried*

*droplet* Methode (vgl. Abschnitt 6.2.2) auf die Probenpunkte appliziert und bei RT getrocknet.

## 8.2 Erstellung von Proteinprofilen der Leberlysate

Aus den beiden Tierstudien standen Leberextrakte von Kontrollen und unterschiedlich lang behandelten Proben zur Verfügung (Protokoll komplette Extraktion unter Abschnitt 3.1), die auf WXC-Chips vermessen wurden, um expositionsbedingte Unterschiede im Proteinprofil zu detektieren. Von Tierstudie 1, in der die Tiere mit einer hohen Dosis NNM behandelt wurden, erfolgte eine Analyse der Proben von Start- und Endpunkt der Studie (Tag 1 und Woche 25). Von den sechs Kontrollen und sechs behandelten Proben pro Gruppe und Zeitpunkt wurden zur Gewährleistung reproduzierbarer Ergebnisse Spektren in jeweils acht Replikaten erstellt.

Von Tierstudie 2 wurden von allen vorhandenen Extrakten Proteinprofile in vier technischen Replikaten angefertigt. Für acht Zeitpunkte und sechs Tieren pro Gruppe resultierte dies in 384 SELDI-Spektren.

Die WXC-Chips wurden dazu gemäß dem unter Abschnitt 8.1.1 beschriebenen standardisierten Protokoll mit jeweils 150 µl Probelösung (300 µg/ml in Bindepuffer) beladen.

## 8.3 Datenaquisition und Analyse der Spektren

Die SELDI-Spektren wurden mit dem *PBSII ProteinChip Reader* (Ciphergen) im Linear-Positiv-Modus vermessen. Die Ionisation der Analyten erfolgte dabei mit einem N<sub>2</sub>-Laser bei  $\lambda = 337$  nm.

Zur Daten-Analyse ist der *ProteinChip Reader* direkt mit der *ProteinChip Software* gekoppelt. Die Auswertung der von den Leberextrakten generierten Proteinprofile beinhaltete einen multiplen Vergleich aller Spektren hinsichtlich signifikanter Veränderungen der Intensitäten einzelner m/z-Signale in behandelten Leberlysaten im Vergleich zu den Kontrollen. Der *Biomarker Wizard*, ein in die Software integriertes Analyse-Werkzeug, ermöglichte ein *Clustern* der detektierten m/z-Signale über alle zu analysierenden Spektren. Gleiche m/z-Werte (mit einer tolerierten Abweichung von 0,3%) in verschiedenen Spektren wurden daher einem „Massen-Cluster“ zugeordnet und daraufhin relativ zueinander quantifiziert. Der *Biomarker Wizard* erleichterte die Visualisierung der Expressionsunterschiede zwischen den

Gruppen, indem in einer Grafik die einzelnen Signalintensitäten gegen die m/z-Werte der Massen-Cluster aufgetragen wurden. In der vergleichenden Analyse wurden p-Werte  $\leq 0,01$  (berechnet mit dem Mann-Whitney-Test mit  $n = 48$  für Studie 1 und  $n = 24$  für Studie 2) als statistisch signifikant angesehen. Als differentiell exprimiert galten Massensignale mit Regulationsfaktoren  $\geq 2,0$  oder  $\leq 0,5$ .

## 9 Quantitative MS mittels iTRAQ-Technologie

Der proteolytische Verdau von Leberproteinen und die sich anschließende Derivatisierung der resultierenden Peptide mit iTRAQ-Reagenzien erfolgte unter Verwendung des *iTRAQ Reagent Multi-Plex Kit* (Applied Biosystems).

Angewendet wurde diese Methode zur relativen Proteinquantifizierung auf einzelne Fraktionen der Proteinextrakte, die mittels eines partiellen Extraktionsverfahrens (Abschnitt 3.2) erhalten und anschließend durch Gelfiltration chromatographisch aufgetrennt wurden (Abschnitt 7.2).

### 9.1 Probenvorbereitung

Nach einigen Vorversuchen erwies sich der Einsatz von 20  $\mu\text{g}$  Protein pro fraktionierter Probe als geeignet, um nachfolgend eine gute chromatographische Trennung der derivatisierten Peptide zu erreichen sowie eine möglichst große Anzahl Proteine zu identifizieren. Die Proteine wurden mit 20  $\mu\text{l}$  *Dissolution*-Puffer (0,5 M Triethylammoniumbicarbonat, 0,2% SDS, pH 8,5), 1  $\mu\text{l}$  2%igem SDS sowie 2  $\mu\text{l}$  Reduzierungs-Reagenz (50 mM Tris-(2-Carboxyethyl)phosphine) versetzt und 1 h bei 60°C auf einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurden die freigesetzten Sulfhydrylgruppen durch Zusatz von 1  $\mu\text{l}$  Cystein-Blocking-Reagenz (200 mM Methylmethanthiosulfonat) an der Rückreaktion zu Disulfiden gehindert (10 min bei RT).

Eine der Anzahl an Proben entsprechende Menge Trypsin (Applied Biosystems) wurde in je 25  $\mu\text{l}$  Aqua purificata rekonstituiert und jede Probe mit 10  $\mu\text{l}$  der entstandenen Trypsin-Lösung versetzt. Die enzymatische Spaltung der Proteine erfolgte bei 37°C über Nacht auf dem Thermomixer.

Die lyophilisierten iTRAQ-Reagenzien (114, 115, 116, 117) wurden am nächsten Tag in je 70  $\mu\text{l}$  Ethanol gelöst. Zur Derivatisierung (*Labelling*) der Peptide wurde jede Probe mit einem der gelösten iTRAQ-Reagenzien versetzt und 1 h bei RT inkubiert.



Anschließend wurden alle eingesetzten Proben in einem einzigen Reaktionsgefäß vereinigt und bis zur Beseitigung des Ethanols in der *Speed Vac* (Eppendorf) eingeeengt.

## 9.2 Chromatographische Auftrennung der Peptide

Die derivatisierten Peptide wurden mit einem UltiMate nano LC-System (Dionex) chromatographisch aufgetrennt unter Verwendung einer Kapillar-C18 Umkehrphasen-Säule (PepMap 75 µm Durchmesser, 15 cm, 3 µm, 100 Å, Dionex) mit einer Flussrate von 200 nL/min in Kombination mit einer nano-Vorsäule (PepMap 100, 300 µm x 1 mm, 5 µm, 100 Å, Dionex) bei einer Flussrate von 30 µL/min. Die Entsalzung der Proteine erfolgte über die Dauer von 8 min auf der Vorsäule mit Entsalzungspuffer. Anschließend wurden die Peptide 120 min lang unter Verwendung eines linearen Gradienten von 5% bis 60% Laufpuffer B aufgetrennt. Die Aufzeichnung des Chromatogramms erfolgte bei  $\lambda = 214$  nm. Die Fraktionierung der Peptide startete 12 min nach Beginn des LC-Laufs mit einem Probot Mikro-Fraktionssammler (Dionex). CHCA (Fluka, 2 mg/ml in 70 % ACN) wurde dabei mit Hilfe eines Mischelementes mit einer Flussrate von 800 nL/min kontinuierlich zu dem von der Säule kommenden Eluat gegeben. Jede Fraktion wurde 12,5 Sekunden lang gesammelt und direkt auf eine MALDI-Platte eluiert (576 Spots pro Platte (24x24)).

Laufpuffer A	
5% (v/v)	Acetonitril
0,1% (v/v)	TFA
in	Aqua purificata

Laufpuffer B	
80% (v/v)	Acetonitril
0.085% (v/v)	TFA
in	Aqua purificata

Entsalzungspuffer	
2% (v/v)	Acetonitril
0,1% (v/v)	TFA
in	Aqua purificata

## 9.3 Protein-Identifizierung und -Quantifizierung

MALDI-MS and MS/MS-Analysen der *offline* gespotteten derivatisierten Peptide erfolgten mit dem 4700 Proteomics Analyzer MALDI TOF/TOF Massenspektrometer (Applied Biosystems), dessen Funktionsweise bereits in Abschnitt 6.2.3 beschrieben

wurde. Zunächst wurden von allen LC-MALDI-Probenpositionen PMF-Spektren erstellt, gefolgt von der Fragmentierung automatisch ausgewählter Vorläuferionen. Bei der MS/MS-Datenbanksuche wurde abweichend von den in Abschnitt 6.2.4 gemachten Angaben die Modifizierung der Lysin-N-Termini durch die iTRAQ-Reganzien als fixe Peptid-Modifikation eingesetzt, die Oxidation von Methionin wiederum als mögliche Modifikation. Die Massentoleranz für die Vorläuferionen-Signale wurde auf  $< 35$  ppm beschränkt, die MS/MS Massentoleranz auf  $< 0,2$  Da. Die Quantifizierung der Peptide beruhte auf der Größe der Signalfäche der durch Fragmentierung der Reagenzien detektierten Reporter-Ionen. Die automatische Berechnung der Regulationsfaktoren für die Proteine anhand mindestens eines quantifizierten Peptids im Vergleich zu einer Kontrolle erfolgte mit Hilfe der GPS-Explorer Software v.3.0 (Applied Biosystems). Dabei wurden die einzelnen Expressionswerte aller quantifizierten Peptide eines Proteins jeweils auf den Median normalisiert.

## 10 Elution von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen

Die passive Elution von „unverdauten“ intakten Proteinen erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung komplexer Protein-Gemische aus den resultierenden Banden oder *Spots* der Polyacrylamid-Gele. Dadurch wurden isolierte Proteine der massenspektrometrischen Detektion mittels SELDI-MS zugänglich gemacht. Der enzymatische Verdau der in den Gelstücken verbleibenden Proteine ermöglichte deren Identifizierung durch MALDI-MS und MS/MS. Das Protokoll zur passiven Elution der Proteine wurde im Verlauf der hier vorliegenden Arbeit bezüglich der verwendeten Lösungen sowie der Inkubationszeiten und -temperaturen etabliert.

Die Proteingemische wurden wie unter Abschnitt 5 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend durch eine Färbung detektiert. Hierfür durften nur Färbeprotokolle ohne Fixierungsschritt zur Anwendung kommen, weil sich im Gel fixierte Proteine schlecht eluieren ließen. Färbung mit Ruthenium, wofür Fixierung essentiell ist, war daher nicht möglich.

Die visualisierten Protein-Banden oder -*Spots* wurden ausgeschnitten, in Eppendorf-*Tubes* überführt und gemäß der unter Abschnitt 5.3 beschriebenen Anleitung entfärbt. Mit Hilfe von Mikropistillen (Eppendorf), die exakt die Abmessungen von

Eppendorf-*Tubes* aufwiesen, wurden sie zur Oberflächen-Vergrößerung zerkleinert. Nach 5 min Inkubation bei 50°C auf einem Thermomixer (Eppendorf), wurden die Gelstücke mit 25 µl Elutionslösung versetzt (Elutionslösung 1 oder 2). Anschließend folgten 60 min Inkubation im Ultraschallbad (VWR International) (optionaler Schritt) sowie 4 h Inkubation bei RT und mindestens 600 rpm auf dem Thermomixer. Der Überstand wurde in ein neues *Tube* überführt, die Gelstücke kurz mit 20 µl der jeweiligen Elutionslösung gewaschen und die Waschlösung mit dem Überstand vereinigt. Für weitere Analysen erfolgte die Aufbewahrung der verbleibenden Gelstücke bei -20°C. Das Eluat wurde in einer Speed-Vac (Eppendorf) zur Trockne eingengt, der Rückstand anschließend in 10 µl Aqua purificata aufgenommen. Zur Detektion der eluierten Proteine wurden dann, wie unter Abschnitt 8.1.3 beschrieben, je 1 µl Probe und gesättigte Matrix-Lösung (SPA) auf einen Gold-Chip gegeben, getrocknet und im *ProteinChip Reader* (Ciphergen) vermessen (vgl. Abschnitt 8.3).

<b>Elutionslösung 1 (FAPH)</b>	
50% (v/v)	Ameisensäure
25% (v/v)	Acetonitril
15% (v/v)	Isopropanol
10% (v/v)	Aqua purificata

<b>Elutionslösung 2</b>	
0,25 M	Tris/HCl pH 6,8
0,1% (m/v)	SDS

## 11 Immunoblotting

Die dem *Western Blot* vorangehende Proteintrennung mittels 1D-SDS-PAGE wurde nach dem unter 5.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Der Transfer der Proteine von den Gelen auf Nitrocellulosemembranen (0,45 µm) (Amersham) erfolgte in einer mit *Blotting*-Puffer (1x) gefüllten Kammer (PowerPac 300, BioRad) für ca. 60 min bei einer Spannung von 50 V und einem Stromfluss von 175 mA pro Membran.

Nach Inkubation der Membranen für 1 h unter leichtem Schütteln bei RT in *Coating*-Lösung wurde der jeweilige Primärantikörper (Tabelle C-3), verdünnt in *Coating*-Lösung, zugesetzt, wobei die Inkubationszeiten für den entsprechenden Antikörper optimiert wurden und somit zwischen 1 h und 24 h variierten. Einige Waschschrte schlossen sich an (3-5x 10 min in PBS-Tween-Puffer), gefolgt von 1 h Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Tabelle C-3), verdünnt nach Herstellerangaben ebenfalls in *Coating*-Lösung. Nach Wiederholung der Waschschrte wurde die nach Protokoll des Herstellers gemischte Entwicklerlösung (ECL-Kit, Amersham Biosciences) auf die Membranen gegeben und 1 min lang inkubiert. Die Entwicklung der Membranen erfolgte in einem Hyper processor (Amersham Biosciences) auf entsprechenden Filmen (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences), wobei die Belichtungszeiten der Filme in den Filmkassetten (BioRad) zwischen 5 sec und 5 h variierte.

<b><i>Blotting</i>-Puffer (5x)</b>	
1,55% (m/v)	Tris
7,13% (m/v)	Glycin
91,32% (v/v)	Aqua purificata

<b><i>Blotting</i>-Puffer (1x)</b>	
20% (v/v)	Methanol
20% (v/v)	<i>Blotting</i> Puffer (5x)
60% (v/v)	Aqua purificata

<b>PBS-Tween-Puffer</b>	
10% (v/v)	PBS (10x)
0,1-5% (v/v)	Tween 20
85-89,9% (v/v)	Aqua purificata

<b><i>Coating</i>-Lösung</b>	
5% (m/v)	Magermilchpulver
95% (v/v)	PBS-Tween-Puffer

Tabelle C-3: Liste der für das *Western Blotting* verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper.

Antikörper	Organismus	Hersteller	Verdünnung
<b>Primärantikörper</b>			
Anti-rat $\alpha$ -2u-Globulin (IgG polyklonal)	Ziege	R&D Systems (AF 586)	1:500
Anti-Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1 (PDK-1) (IgG polyklonal)	Hase	Stressgen (KAP-PK112)	1:5000
Anti-human Rho-GDI (IgG polyklonal)	Hase	Upstate Biotechnology (06-730)	1:10.000
Anti-GST-P (Gluathion S-Transferase, placentare Form)	Hase	Biogenex (PU249-UP)	1:500
Anti-cFBPase (cytosolische Fruktose-1,6-bisphosphatase)	Hase	AgriSera (AS04 043)	1:500
Anti-Glycerolkinase	Ziege	USBiological (G8153-06)	1:2000
<b>Sekundärantikörper</b>			
Peroxidase conjugated (HRP) anti-goat IgG	Hase	Rockland (605-4313)	1:10.000 bis 1:15.000
Peroxidase conjugated (HRP) anti-rabbit IgG	Ziege	Sigma-Aldrich (A0545)	1:3000 bis 1:20.000

## 12 Genexpressionsanalyse

Durch Einsatz von TaqMan Real Time-PCR wurde die Expression bestimmter Gene in den NNM-exponierten Leberproben beider Tierstudien untersucht. Die Analyse fokussierte sich für die Tierstudie 1 auf jeweils drei behandelte Proben und eine entsprechende Kontrolle der Zeitpunkte Tag 1, Woche 3 und Woche 25, für Tierstudie 2 auf ebenfalls drei behandelte Proben und jeweils eine Kontrolle der Zeitpunkte Woche 1, Woche 3 und Woche 8.

### 12.1 Isolierung von RNA aus Gewebe

Die Extraktion von RNA aus dem Rattenleber-Gewebe erfolgte unter Verwendung des *RNeasy Mini-Kits* (Quiagen). Je 20-25 mg Lebergewebe wurde unter Zusatz von 600  $\mu$ l RLT-Puffer (mit 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) in einem Potter (B. Braun Biotech International) homogenisiert. Das entstandene Lysat wurde zentrifugiert (Centrifuge 54151, Eppendorf), der Überstand anschließend mit dem gleichen Volumenteil 70%

Ethanol versetzt. 600 µl dieser Lösung wurden auf RNeasy Mini-Säulen (platziert in 2 ml Eppendorf *Tubes*) gegeben, 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Mit der restlichen Lösung wurde in einem zweiten Schritt genauso verfahren. Zur Entfernung von DNA und Proteinen schlossen sich einige Waschschriffe an. Zunächst erfolgte die Zugabe von 700 µl RW1-Puffer und 15 sec Zentrifugation bei 10.000 rpm. Dieser Vorgang wurde wiederholt, wobei der RW1-Puffer durch 500 µl RPE-Puffer ersetzt wurde. Nach erneutem Waschen mit 500 µl RPE-Puffer (2 min bei 10.000 rpm) wurde die isolierte und aufgereinigte RNA mit 30 µl Rnase-freiem Wasser eluiert. Der Elutionsschritt wurde im Anschluss daran mit 20 µl Rnase-freiem Wasser wiederholt. Die vereinigten RNA-Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

## 12.2 Quantifizierung und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der RNA- und cDNA-Konzentration beruhte auf der photometrischen Erfassung der Lichtabsorption bei  $\lambda = 260$  nm. Zusätzlich wurde die Absorption der Proteine bei  $\lambda = 280$  nm bestimmt. Der Quotient für das Verhältnis der optischen Dichte (OD) bei  $\lambda = 260$  nm zu der bei  $\lambda = 280$  nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) gibt Auskunft über das Ausmaß der Verunreinigung eines RNA-Extrakts mit Proteinen. Bei reinen Präparationen sollte der Wert zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Die Durchführung erfolgte mit dem NanoDrop (NanoDrop Technologies), einem Photometer zur Messung im Mikromaßstab. Dazu wurde 1 µl der Probe unverdünnt auf den Messpunkt appliziert, von Greifarmen des NanoDrop eine Flüssigkeitssäule formiert und die RNA- bzw. cDNA-Konzentration auf einer Wegstrecke von 1 mm photometrisch bestimmt.

## 12.3 Reverse Transkription

Vor der Expressionsanalyse einer spezifischen mRNA muss zunächst die in der Probe enthaltene RNA in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben werden. Hierbei werden die Eigenschaften eines viralen Enzyms, der Reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) genutzt, die RNA als Matritze verwenden und in DNA umschreiben kann. Zur reversen Transkription werden Zufalls-Hexamere als *Primer* eingesetzt, die unspezifisch an die RNA binden. Daher wird die gesamte in einer Probe enthaltene RNA in cDNA umgeschrieben.

Zur Durchführung der reversen Transkription wurde das *1st strand cDNA-synthesis Kit* (Roche) nach Anleitung des Herstellers verwendet. In Tabelle C-4 ist die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes beschrieben.

**Tabelle C-4: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die reverse Transkription.**

Komponente	Endkonzentration	V pro Reaktion (µl)
10x Reaktionspuffer	1x	2,0
25 mM MgCl <sub>2</sub>	5 mM	4,0
dNTP-Mix	1 mM	2,0
Random Primer p(dN) <sub>6</sub>	0,08 A <sub>260</sub> units	2,0
RNase Inhibitor	50 units	1,0
AMV Reverse Transkriptase	≥ 20 units	0,8
RNA (Probe)	1000 ng	variabel
RNase-freies Wasser		ad 20 µl

Die reverse Transkription erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem *PCR-Cycler* (Eppendorf):

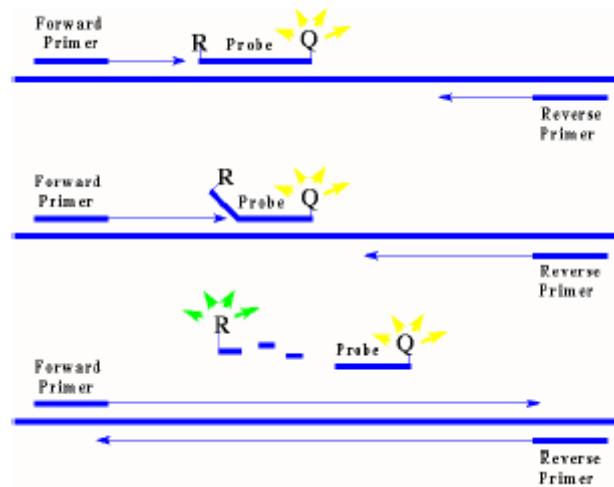
Inkubation:	10 min bei 25°C
RT:	60 min bei 42°C
RT-Inaktivierung:	5 min bei 99°C

Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Bestimmung der cDNA-Konzentration erfolgte wie unter 12.2 beschrieben.

## 12.4 Quantitative *Real-Time* PCR

Für die TaqMan-PCR wurden für die zu amplifizierenden Genabschnitte spezifische Primerpaare eingesetzt, die jeweils rechts und links der sogenannten TaqMan-Sonde binden. Diese Sonde ist an den Enden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, dem Reporter und dem Quencher. Solange sich die beiden Fluoreszenzfarbstoffe auf der intakten Sonde in räumlicher Nähe befinden, kann durch die Anregung mittels einer Halogen-Lampe die Energie des Reporterfarbstoffes R auf den Quencherfarbstoff Q übertragen werden, so dass nur der Quencher Licht emittiert (Fluoreszenz-Energie-Transfer FET, Förster, 1948). Während der PCR werden beide Primer durch die Taq-Polymerase verlängert, bis sie auf die Sonde treffen. Diese wird daraufhin vom DNA-Strang verdrängt, wodurch sich Reporter und Quencher nicht mehr in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Ein Energietransfer kann nicht mehr stattfinden, beide Farbstoffe emittieren Licht

(Schild, 2002). Die Stärke der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes ist dabei proportional zur Menge der amplifizierten DNA (Abbildung C-3).



**Abbildung C-3: Funktionsweise der TaqMan-PCR. (Quelle: [www.vu-wien.ac.at](http://www.vu-wien.ac.at))**

R= Reporterfarbstoff, Q= Quencherfarbstoff. Die Primer binden rechts und links der Sonde, durch Primer-Extension wird die Sonde von der cDNA verdrängt und durch Endonukleasen gespalten. Dadurch wird das Fluoreszenz-Signal des Reporters nicht mehr von Quencher unterdrückt und kann detektiert werden. Die Signalintensität verhält sich proportional zur Menge amplifizierter cDNA.

Die relative Quantifizierung bestimmter Genabschnitte in den mit NNM behandelten Leberproben erfolgte nach der Standardkurven-Methode. Ein Vergleich mit einer jeweils unbehandelten Kontrolle ermöglichte die Erfassung von substanzbedingten Expressionsänderungen. Als endogene Kontrolle (Referenz) diente die parallele Amplifikation von 18s-rRNA, um bei der Quantifizierung der mRNA auf Unterschiede in der Gesamtmenge an RNA zu normalisieren. Dafür mussten Standardkurven sowohl für die endogene Kontrolle als auch für die Zielsequenz erstellt werden. Aus diesen Standardkurven wurden dann für die einzelnen Proben die Mengen an Zielsequenz und endogener Referenz berechnet. Anschließend erfolgte die Normalisierung der Zielsequenzwerte durch Division durch die Menge an endogener Referenz. Als Probenmaterial für die Standardkurve (=Kalibrator) kam die RNA aus unbehandeltem Gewebe zum Einsatz. Um letztlich ein relatives Expressionsniveau auszudrücken, wurden die normalisierten Werte durch den normalisierten Zielsequenzwert des Kalibrators dividiert. Die Probenstartkopienzahl wurde demnach als n-facher Induktionswert bezogen auf den Wert des Kalibrators bestimmt (Schild, 2002).

Für die Standardkurven wurden Verdünnungsreihen der entsprechenden *Template*-DNA erstellt unter Verwendung der gleichen Verdünnungsstufen sowohl für die



Standardkurve der 18s-Referenz als auch für die der Probe (2, 1, 0,5 und 0,25 ng). Allerdings wurden für die Amplifikation der 18s-rRNA auch entsprechende 18s-spezifische Primer und Sonden eingesetzt.

Von den zu quantifizierenden Proben wurden für die PCR jeweils 0,5 ng cDNA pro Reaktion verwendet, wobei zwei getrennte Ansätze für die endogene Kontrolle und die eigentlichen Proben hergestellt wurden (Tabelle C-5). Die AmpliTaq-Polymerase ist im verwendeten *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) enthalten und musste daher nicht separat zugesetzt werden. Die *TaqMan Primer* für die gewünschten Zielsequenzen wurden als *Assay on demand* von Applied Biosystems bezogen. Quantifiziert wurden spezifische Genabschnitte von Annexin A3 (*Assay on demand* Nr. Rn00563181), Annexin A5 (Rn00565571), N-Hydroxyarylamino-Sulfotransferase (Rn00581955) sowie Adenosinkinase (Rn00563677). Für die drei behandelten Proben und die entsprechenden Kontrollen erfolgten jeweils Dreifachbestimmungen.

Die TaqMan-PCR wurde mit dem *ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) unter Einstellung folgender Parameter durchgeführt:

UNG Inkubation: 2 min bei 50°C  
 AmpliTaq Gold Aktivierung: 10 min bei 95°C  
 PCR (40 Zyklen) Denaturierung: 15 sec bei 95°C  
*Annealing/Extension*: 1 min bei 60°C

**Tabelle C-5: Reaktionsansatz für die TaqMan-PCR.**

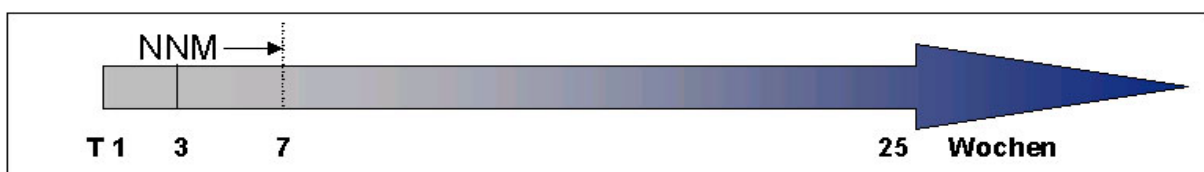
Komponente	Endkonzentration	V pro Reaktion (µl)
<i>TaqMan Universal Master Mix (2x)</i>	1x	12,5
<i>Assay-on-Demand (20x)</i> oder 18s-Referenz (20x)	1x	1,25
RNase-freies Wasser		1,25
cDNA-Probe (in Wasser)		ad 25,0

## D ERGEBNISSE

Während die traditionelle Toxikologie die Prüfung von Substanzen im Tierversuch mit anschließender histopathologischen und klinisch-biochemischen Bewertung der toxischen Effekte vorsieht, werden in die moderne Toxikologie vermehrt Methoden der Proteomforschung integriert. Dies soll zur früheren Detektion kleinster Veränderungen auf molekularem Niveau und damit zur verbesserten Vorhersage toxischer und/oder kanzerogener Effekte beitragen.

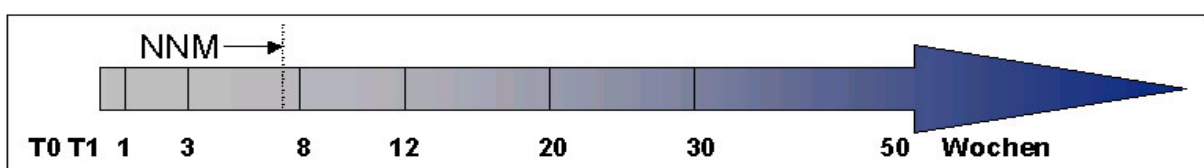
Neben den klassischen histopathologischen Methoden kamen daher in der vorliegenden Arbeit vor allem die 2-D-Elektrophorese, gekoppelt mit MALDI-MS, und SELDI-MS zur proteinanalytischen Untersuchung von Rattenlebergewebe zum Einsatz. Immunoblotting und quantitative MS dienten zur anschließenden Verifizierung der detektierten Expressionsveränderungen. Des Weiteren sollten Genexpressionsanalysen mittels TaqMan-PCR Hinweise auf eine mögliche Korrelation von Gen- und Proteinexpression erlauben.

Grundlage für die Untersuchung von Rattenlebergewebe durch Proteomic-Methoden waren zwei Tierstudien, die bei der Merck KGaA durchgeführt wurden. Hierbei erfolgte die Exposition von Ratten mit unterschiedlichen NNM-Dosierungen. Das Behandlungsschema in beiden Studien wird noch einmal in den beiden folgenden Abbildungen verdeutlicht.



**Abbildung D-1: Behandlungsschema Tierstudie 1.**

Die Behandlung der Tiere mit NNM erfolgte über einen Zeitraum von sieben Wochen, gefolgt von 18 Wochen behandlungsfreier Beobachtungsphase. Die Lebern wurden zu den Zeitpunkten Tag 1, Woche 3 und Woche 25 entnommen.



**Abbildung D-2: Behandlungsschema Tierstudie 2.**

Die NNM-Exposition der Ratten erfolgte über sieben Wochen, gefolgt von 42 Wochen behandlungsfreier Beobachtungsphase. Die Lebern wurden an acht verschiedenen Zeitpunkten entnommen: Tag 1, Wochen 1, 3, 8, 12, 20, 30 und 50.

Während die Tiere in der ersten Studie mit 20 mg/kg NNM behandelt und die Proben von drei Zeitpunkten untersucht wurden (Tag 1, Woche 3 und Woche 25), kam in der zweiten Studie mit 12 mg/kg NNM eine geringere Dosis zum Einsatz. Analysiert wurden hierbei die Proben von acht verschiedenen Zeitpunkten (Tag 1, Wochen 1, 3, 8, 12, 20, 30 und 50).

## **1 Histopathologie**

Das durch Sektion der Tiere erhaltene Lebergewebe wurde von Fachpersonal der Abteilung für Pathologie histopathologisch bewertet. Dies umfasste zum einen die Detektion von makroskopisch sichtbaren Leberveränderungen, zum anderen die mikroskopische Analyse nach Anfärbung des Gewebes mit histochemischen oder immunhistochemischen Methoden. Da die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit unter anderem eine Korrelation der Resultate des Proteomic-Ansatzes mit denen der Pathologie umfasste, soll an dieser Stelle auf die histopathologischen Ergebnisse zusammenfassend eingegangen werden. Es sei an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, dass die histopathologischen Untersuchungen in der Abteilung Pathologie des Instituts für Toxikologie (Merck KGaA) vorgenommen wurden.

### **1.1 Tierstudie 1: Histopathologische Befunde**

Aus der ersten Tierstudie, in der die Ratten mit einer hohen Dosis NNM (20 mg/kg KG) behandelt wurden, erfolgten die weiteren Analysen mit dem Lebergewebe von drei verschiedenen Zeitpunkten (Tag 1, Woche 3 und Woche 25).

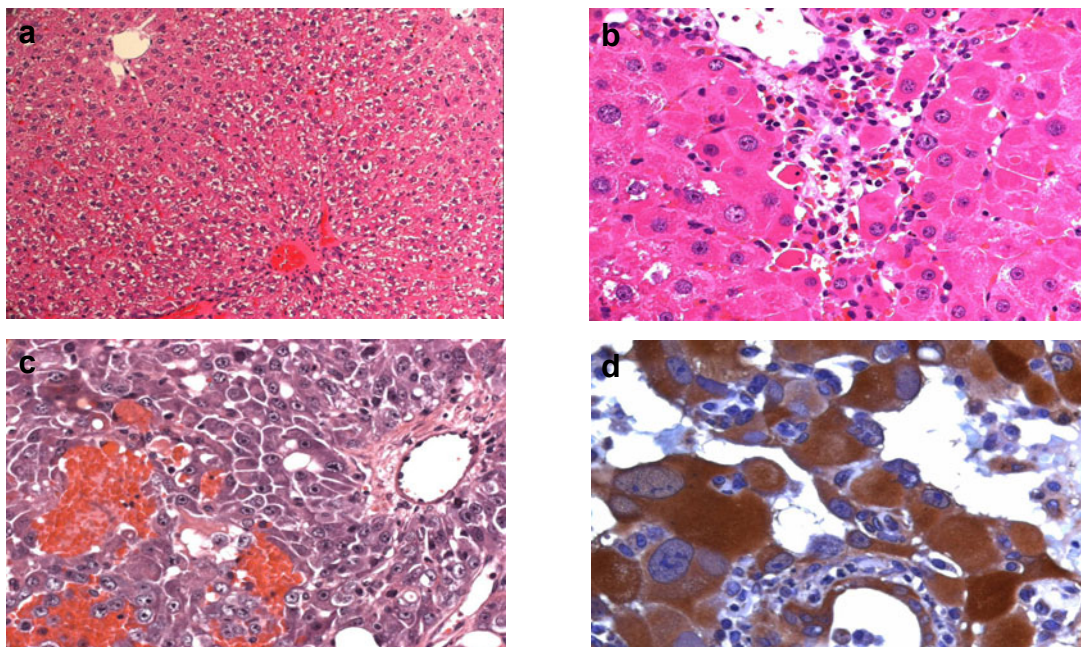
Nach einem Tag der NNM-Exposition konnten weder makroskopisch noch histologisch sichtbare auf die Behandlung mit der Chemikalie zurückzuführende Leberveränderungen festgestellt werden. Nach drei Wochen jedoch wurden akute degenerative und subakute reaktive Schädigungen sichtbar. Diese umfassten ungewöhnlich große Hepatozyten, fokale Nekrosen, entzündliche Infiltrate sowie Gallengangsproliferationen.

Nach sieben Wochen der NNM-Exposition, gefolgt von einer behandlungsfreien Regenerationsphase von 18 Wochen, zeigte das Lebergewebe der letzten Gruppe (Woche 25) gravierende Veränderungen, angefangen von Leberatrophien und Fibrosen über Gallengangsproliferationen bis hin zu regenerativen Knoten und Adenomen. Maligne Leberkarzinome wurden bei vier der sechs behandelten Tiere

diagnostiziert. Tabelle D-1 fasst die histopathologischen Befunde zusammen. Abbildung D-3 zeigt exemplarisch histochemisch und immunhistochemisch gefärbtes Lebergewebe mit unterschiedlichen pathologischen Veränderungen. Nach einem Tag der NNM-Behandlung sind Infiltrate zu erkennen (b), die im Vergleich zur unveränderten Leber (a) den stabilen Zellverband durchbrechen. Abbildung D-3 (c) und (d) zeigen in Proben des letzten Studienzeitpunkts (Woche 25) gebildete Leberkarzinome.

**Tabelle D-1: Zusammenfassung der histopathologischen Befunde für Tierstudie 1.**

Gruppe	NNM (Tage)	Regeneration (Wochen)	Histopathologische Befunde
Tag 1	1	0	Keine Detektion von Abnormalitäten mit Ausnahme einer beobachteten Granulierung der Leberoberfläche in zwei Ratten
Woche 3	21	0	Fokale Nekrosen, entzündliche Infiltrate, Cytomegalie der Hepatozyten, Gallengangsproliferationen
Woche 25	49	18	Fibrosen, Leberatrophie, Gallengangsproliferationen, Regenerative Knoten ( <i>nodules</i> ), Adenome, Karzinome (vier Ratten)



**Abbildung D-3: Histochemisch und immunhistochemisch gefärbtes Lebergewebe von Proben der Tierstudie 1.**

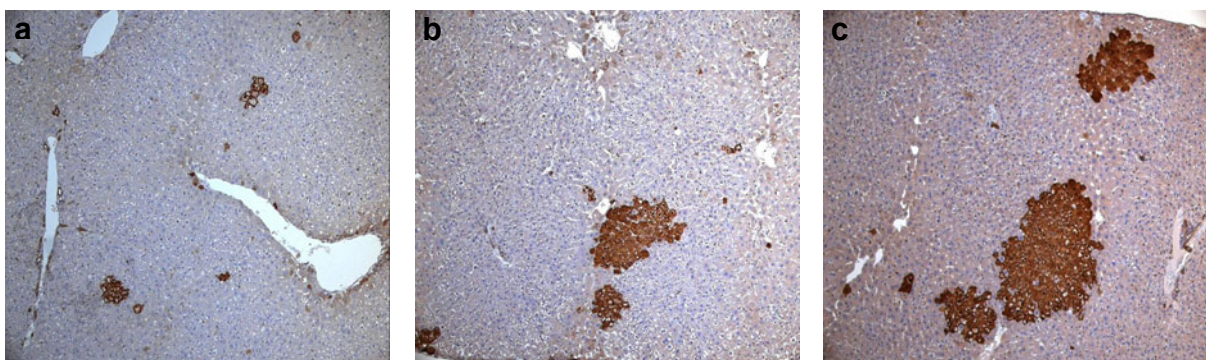
(a) HE-Färbung normale Leber Kontrolltier; (b) HE-Färbung behandeltes Tier Tag 1: zu erkennen sind entzündliche Infiltrate; (c) HE-Färbung behandeltes Tier Woche 25: Leberkarzinom (40fache Vergrößerung); (d) immunhistochemische GST-P-Färbung behandeltes Tier Woche 25: Leberkarzinom (40fache Vergrößerung)

## 1.2 Tierstudie 2: Histopathologische Befunde

In der zweiten Tierstudie wurden die Tiere nur noch mit 12 mg/kg KG behandelt. Im untersuchten Lebergewebe der verschiedenen Zeitpunkte (Tag 1, Wochen 1, 3, 8, 12, 20, 30 und 50) wurden im Vergleich zur Studie 1 erheblich weniger pathologische Leberveränderungen detektiert. Im Hinblick auf das eigentliche Ziel, durch NNM induzierte präneoplastische Veränderungen der Hepatozyten (Foci) über den Verlauf der Zeit beobachten zu können, wurde eine immunhistochemische Färbung des Gewebes mit GST-P vorgenommen. Wie bereits einleitend beschrieben (Kapitel A, Abschnitt 3.3), wird GST-P schon im frühen Kanzerogenese-Prozess exprimiert und daher in der traditionellen Immunhistochemie als Marker für präneoplastische Läsionen favorisiert.

Die Ergebnisse zeigten deutlich einen Anstieg der GST-P-Expression in den Leberzellen mit zunehmender Zeit. Während in den Proben von Woche 8 GST-P nur in Einzelzellen oder allenfalls in kleinen herdförmigen Ansammlungen detektiert werden konnte, wachsen die GST-P-positiven Zell-Areale von Woche 12 über Woche 20 bis hin zum Studienendpunkt in Woche 50 stetig an (Abbildung D-4).

Im Gegensatz zur Studie 1 wurden hier am Endpunkt keine Leberkarzinome/-adenome diagnostiziert.



**Abbildung D-4: Immunhistochemische Leberfärbung von Proben der Tierstudie 2 mit GST-P.**

(a) Woche 8: GST-P-positive Einzelzellen und kleine Herde; (b) Woche 12: anwachsende GST-P-positive Herde; (c) Woche 20: große GST-P-positive Herde.

## 2 2D-Elektrophorese – MALDI-MS

2-DE-Gele wurden zur Ermittlung behandlungsbedingter Veränderungen der Proteinexpression für alle behandelten und unbehandelten Leberproben beider Tierstudien in je vier technischen Replikaten angefertigt. Bei sechs Tieren pro Gruppe (biologische Replikate) resultierte dies für Tierstudie 1 mit drei zu analysierenden Zeitpunkten in 144 Gelen, für Tierstudie 2 mit acht Zeitpunkten in 384 Gelen. Um eine solide Basis für nachfolgende statistische Analysen zu schaffen, wurden die technischen Replikate auf jeweils zwei verschiedene Gelläufe verteilt. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Fluoreszenzfärbung mit Ruthenium (Kapitel C, Abschnitt 5.3.1), eine Bildanalyse mit der Analyse-Software ProteomWeaver schloss sich an (Kapitel C, Abschnitt 5.5). Dabei wurden die Gele für jeden Studienzeitpunkt getrennt ausgewertet.

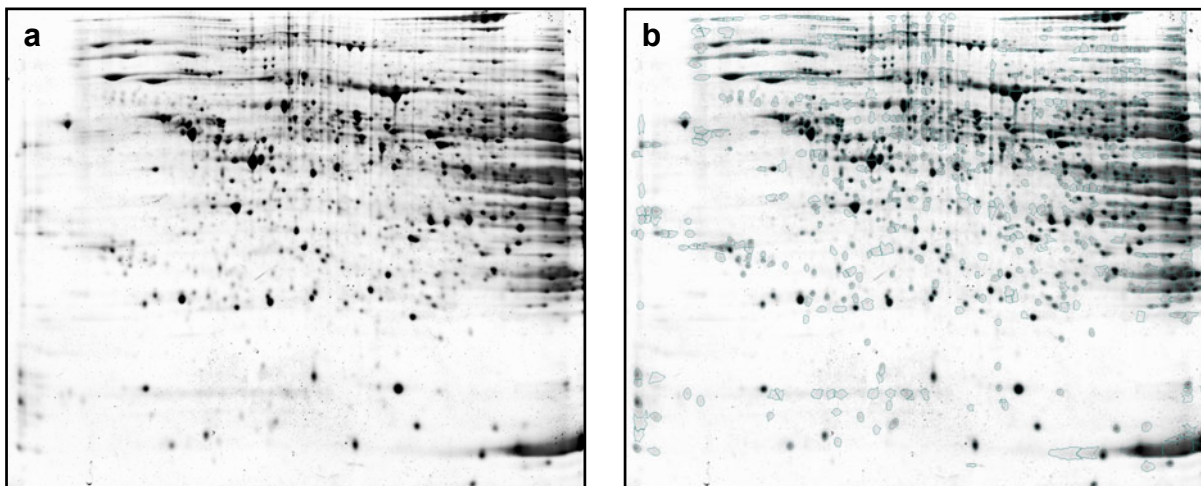
In Anbetracht des enormen Probendurchsatzes mit über 500 2-DE-Gelen wurde auf eine weitergehende Fraktionierung der einzelnen Proben verzichtet, auch wenn dies durch Detektion einer vermehrten Anzahl von Proteinen einen erweiterten Bereich des Proteoms abgedeckt hätte, verbunden mit einer größeren Wahrscheinlichkeit, behandlungsbedingte differentielle Expressionen ausfindig zu machen. Für alle zur Anfertigung der 2-DE-Gele nötigen Prozessierungsschritte, beginnend mit der Proteinextraktion (Kapitel C, Abschnitt, 3.1) über die eigentliche Durchführung der 2-DE (Kapitel C, Abschnitt 5.2) bis hin zur Visualisierung der Proteine durch Ruthenium (Kapitel C, Abschnitt, 5.3.1) wurden Standardprotokolle in Form von *Standard Operating Procedures* (SOP) erarbeitet und zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse strikt eingehalten.

### 2.1 Qualitäts- und Datenanalyse der 2-DE-Gele

#### 2.1.1 Spot-Detektion in 2-DE-Gelen

Bevor eine vergleichende Analyse hinsichtlich expositionsbedingter signifikanter Veränderungen der Proteinexpressionsmuster angestellt werden konnte, wurden die Protein-Spots in den digitalisierten 2-DE-Gel-Bildern durch ProteomWeaver automatisch detektiert und deren Signal-Hintergrund-Verhältnisse als relative Intensitäten angegeben. Je nach Einstellungen der *Software*-Parameter für die Spot-Detektion bezüglich Intensitäts- und Kontrastgrenzen, wurden unterschiedliche Spot-Anzahlen detektiert. So wurden in dem in Abbildung D-5(a) dargestellten

repräsentativen 2-DE-Gel einer Kontrollprobe zunächst 5760 *Spots* detektiert. Nach Optimierung der Einstellungen für fluoreszenzgefärbte Gele verringerte sich die Anzahl auf 996 *Spots* (Abbildung D-5(b)). Diese starke Reduzierung der *Spot*-Anzahl ist dadurch zu erklären, dass ProteomWeaver ursprünglich zur Auswertung von Silber- und Coomassie-gefärbten 2-DE-Gelen entwickelt wurde. Nach der Färbung mit Ruthenium wurden bei genauerer Betrachtung der Gele winzige Farbstoffreste als punktförmige Ablagerungen sichtbar, die allesamt von der *Software* als reelle *Spots* detektiert wurden. Die Optimierung der Einstellungen für Intensitäts- und Kontrastgrenzen führte dazu, dass keine Detektion von Rutheniumablagerungen mehr erfolgte.

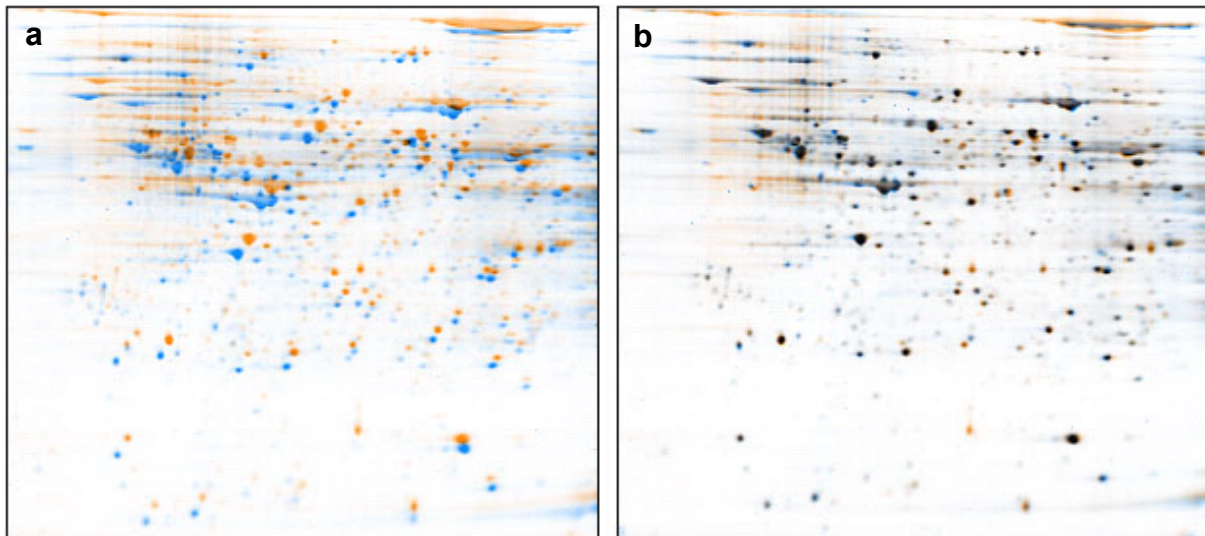


**Abbildung D-5: Repräsentatives 2-DE-Gel einer Kontrollprobe (a) ohne und (b) mit detektierten *Spots*.**

Die Trennung in der ersten Dimension erfolgte auf 24 cm langen Gelstreifen (pH 4-7), gefolgt von der Separation der Proteine in der zweiten Dimension mit 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen (Kapitel C-Abschnitt 5.2). Die Proteine wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ruthenium visualisiert (Kapitel C, Abschnitt, 5.3.1). Nach Optimierung der Detektionsparameter für Fluoreszenzfärbung wurden von der Analyse-*Software* ProteomWeaver 996 *Spots* in dem 2-DE-Gel (b) detektiert.

### 2.1.2 Gel-Matching

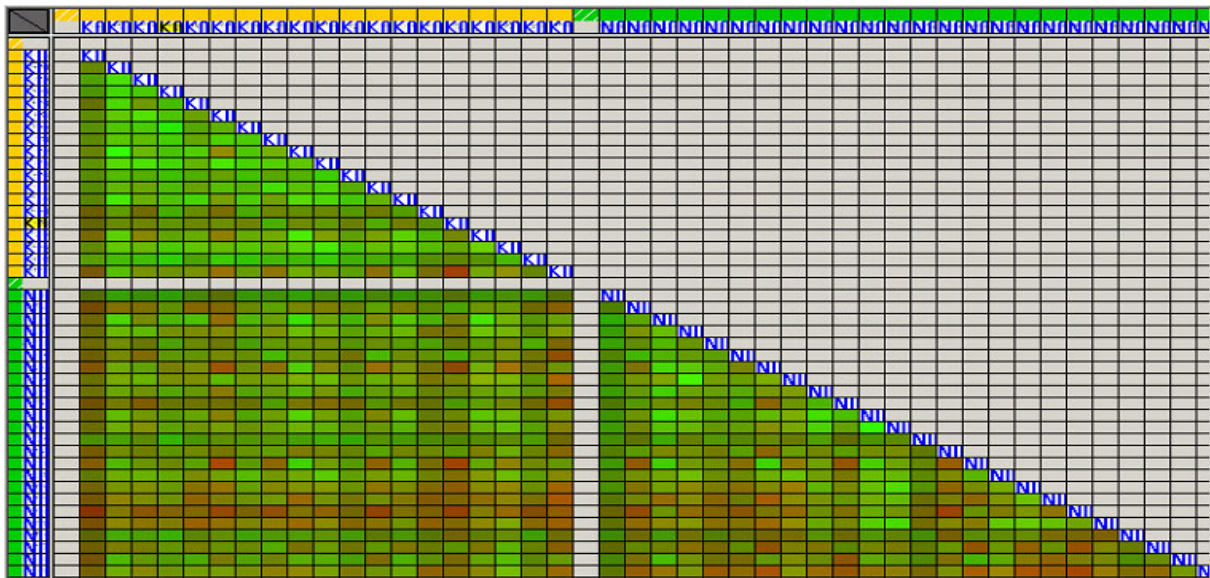
Als weitere Voraussetzung für eine vergleichende Analyse mussten die Gele eines Experiments passend übereinandergelegt werden, um gleiche *Spot*-Muster in allen Gelen ausfindig zu machen (*Gel-Matching*). Da sich das Trennverhalten der Proteine von einem Gel zum anderen leicht unterscheiden kann, beinhaltet die *Software* eine Funktion zur Streckung und Stauchung der einzelnen Gelbilder, bis die *Spot*-Muster genau übereinanderliegen. Der Effekt dieser Anpassung ist exemplarisch an den beiden übereinandergelegten Gelbildern in Abbildung D-6 veranschaulicht.



**Abbildung D-6: Effekt der Anpassung zweier Gelbilder.**

(a) Zwei Gelbilder, von der *Software* jeweils mit roten und blauen *Spots* dargestellt, sind übereinandergelegt, aber noch nicht angepasst; (b) die Gele wurden von der Analyse-*Software* so lange gestreckt oder gestaucht, bis die *Spot*-Muster zur Deckung gebracht werden konnten.

Wie effektiv die *Spot*-Muster zwischen den verschiedenen 2-DE-Gelelen zur Deckung gebracht werden konnten, wurde von ProteomWeaver in einer *Match-Matrix* angezeigt (Abbildungen D-7 und D-8).



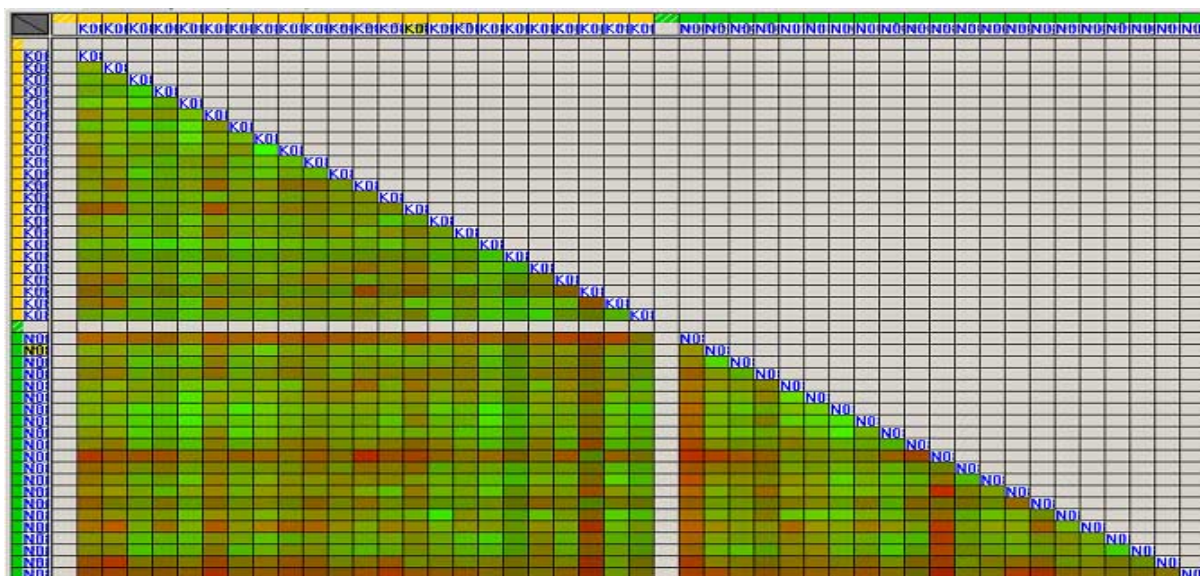
**Abbildung D-7: Match-Matrix aller 2-DE-Gele von Proben der Woche 3 aus Tierstudie 1.**

Hinter jedem Quadranten verbergen sich zwei übereinandergelegte Gelbilder; bei grüner Färbung ließen sich die Gele gut *matchen*, bei Rotfärbung schlechter.

Hinter jedem der Quadranten verbergen sich zwei übereinandergelegte Gelbilder. Je grüner die Färbung, desto besser konnten die *Spots* in den beiden Gelelen übereinandergelegt werden. Rotfärbung dagegen zeigt schlechtes *Matching* an. Bei



750 bis 1050 detektierten *Spots* pro Gel konnten durchschnittlich 500 bis 700 *Spots* mit denen in anderen Gelen zur Deckung gebracht werden. Bei schlechteren *Matching*-Effizienzen für einzelne Gele wurden diese gegebenenfalls aus der Analyse ausgeschlossen bzw. die entsprechenden Gele neu angefertigt.



**Abbildung D-8: Match-Matrix aller 2-DE-Gele von Proben der Woche 8 aus Tierstudie 2.**

Hinter jedem Quadranten verbergen sich zwei übereinandergelegte Gelbilder; bei grüner Färbung ließen sich die Gele gut *matchen*, bei Rotfärbung schlechter.

Die auf der *Match-Matrix* basierende Qualitätskontrolle erfolgte für sämtliche 2-DE-Gele aller Zeitpunkte beider Studien, um der nachfolgenden differentiellen Analyse nur einwandfreie, reproduzierbare Exemplare zuzuführen. Allerdings konnte beobachtet werden, dass die *Matching*-Effizienzen über den Zeitverlauf von 25 bzw. 50 Wochen kontinuierlich schlechter wurden, was auf die zunehmende Variabilität des Proteoms der einzelnen biologischen Replikate zurückzuführen ist.

### 2.1.3 Differentielle Analyse der 2-DE-Gele

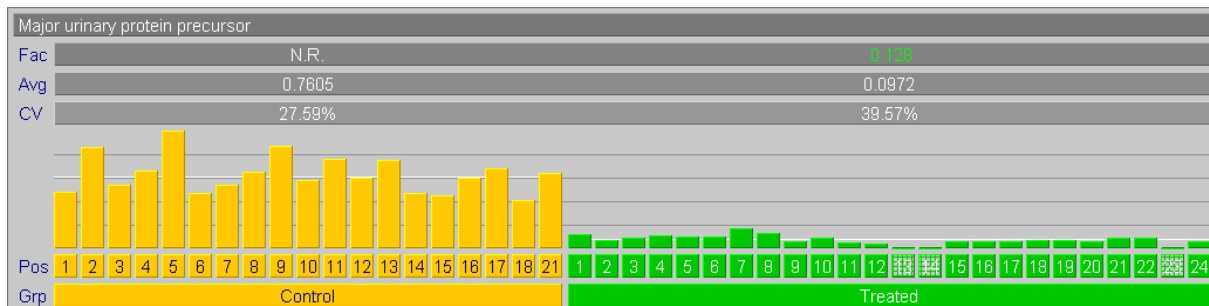
Nach Abschluss des Gel-*Matchings* erfolgte eine automatische Normalisierung der Daten auf den Median der Werte für die relativen *Spot*-Intensitäten. Durch visuelle Überprüfung der einzelnen Gele wurden Kriterien festgesetzt, die eine Auswahl von *Spots* für die differentielle Analyse erlaubten oder ausschlossen. Aus Gründen der Praktikabilität wurden zum einen nur *Spots* mit einbezogen, die relative Intensitäten  $\geq 0,1$  aufwiesen. Bei geringeren Intensitäten waren die *Spots* mit bloßem Auge nicht mehr zu erkennen, was das manuelle Ausschneiden der *Spots* für die nachfolgende MS-Identifizierung unmöglich machte. Zum anderen ergab die visuelle Überprüfung

der Gele, dass von einer verlässlichen, tatsächlichen differentiellen Expression nur gesprochen werden konnte, wenn die entsprechenden *Spots* in mindestens 2/3 der Gele einer Gruppe detektiert wurden. Von der *Software* wurden häufig *Spots* als dereguliert angezeigt, die in nur wenigen Gelen überhaupt vorhanden waren und sich meistens bei näherer Betrachtung als reine Artefakte erwiesen. Die große Anzahl der angefertigten Replikate ermöglichte, p-Werte  $\leq 0,02$  ( $n = 24$ ) als statistische Signifikanzgrenze zu setzen. Vermutlich war ebenfalls in der enormen Gruppengröße und der damit verbundenen Mittelung von Effekten die Tatsache zu begründen, dass dreifache Über- oder Unterexpressionen im Vergleich zu den Kontrollen eher selten zu beobachten waren. Proteine, deren *Spots* in den 2-DE-Gelen Regulationsfaktoren  $\geq 1,7$  oder  $\leq 0,7$  zeigten, erwiesen sich bei Einhaltung der anderen einschränkenden Parameter durchweg als verlässliche differentielle Expressionen. Bezüglich der erlaubten Standardabweichungen für die relativen Intensitäten eines *Spots* innerhalb einer Gruppe wurden weniger stringente Auswahlkriterien gesetzt. Für einzelne *Spots* waren Standardabweichungen zwischen 30% und 50% keine Seltenheit. Letztlich oblag es immer der subjektiven Entscheidung, ob ein *Spot* mit einer hohen Standardabweichung, der alle sonstigen Auswahlkriterien erfüllte, als differentiell exprimiert bezeichnet werden konnte oder nicht.

Die Säulendiagramme in den Abbildungen D-9 und D-10 zeigen als Positiv- und Negativbeispiel die relativen Expressionswerte zweier über alle Gele eines Experiments gematchte *Spots*. Gelb sind dabei die Werte für die Kontrollen, grün die der behandelten Proben dargestellt. In diesem Fall bestand die Kontrollgruppe nur aus 21 anstelle von 24 2-DE-Gelen, da drei Gele nach der Qualitätskontrolle aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Der *Spot*, dessen Expressionswerte in Abbildung D-9 dargestellt sind, wurde mit Ausnahme von drei Gelen aus der behandelten Gruppe (13, 14 und 23) in allen 2-DE-Gelen mit Standardabweichungen (CV) von 28% für die Kontrollgruppe und 40% für die behandelte Gruppe detektiert. Die im Diagramm mit „Avg“ bezeichneten Werte geben die mittleren Expressionswerte an. Aus diesen ergab sich ein Regulationsfaktor von 0,13, also eine deutliche Herunterregulation im Vergleich zu den Kontrollen. Der *Spot* erfüllte alle für die Auswertung gesetzten Kriterien und wurde daher im Folgenden als *Major urinary* Vorläufer-Protein identifiziert.

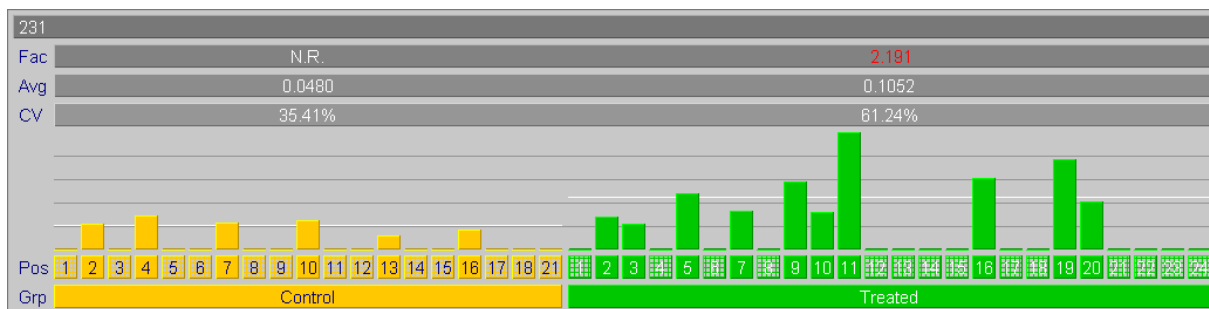
Das zweite Beispiel (Abbildung D-10) zeigt einen *Spot*, der zwar einen eindeutig signifikanten Regulationsfaktor und noch akzeptierbare Standardabweichungen

aufwies, aber nur in wenigen Gelen detektiert wurde. Derartige *Spots* wurden in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.



**Abbildung D-9: Relative Intensitäten eines Spots über alle Gele.**

Auf der x-Achse sind die einzelnen Gele der Kontrollen (gelb) und der behandelten Proben (grün) abgetragen, die y-Achse gibt die relativen Intensitäten des *Spots* in den einzelnen Gelen an. (CV) steht für Standardabweichung, (Avg) für mittlere relative Intensität und (Fac) für Regulationsfaktor (für die Kontrollgruppe als Referenz nicht berechenbar).

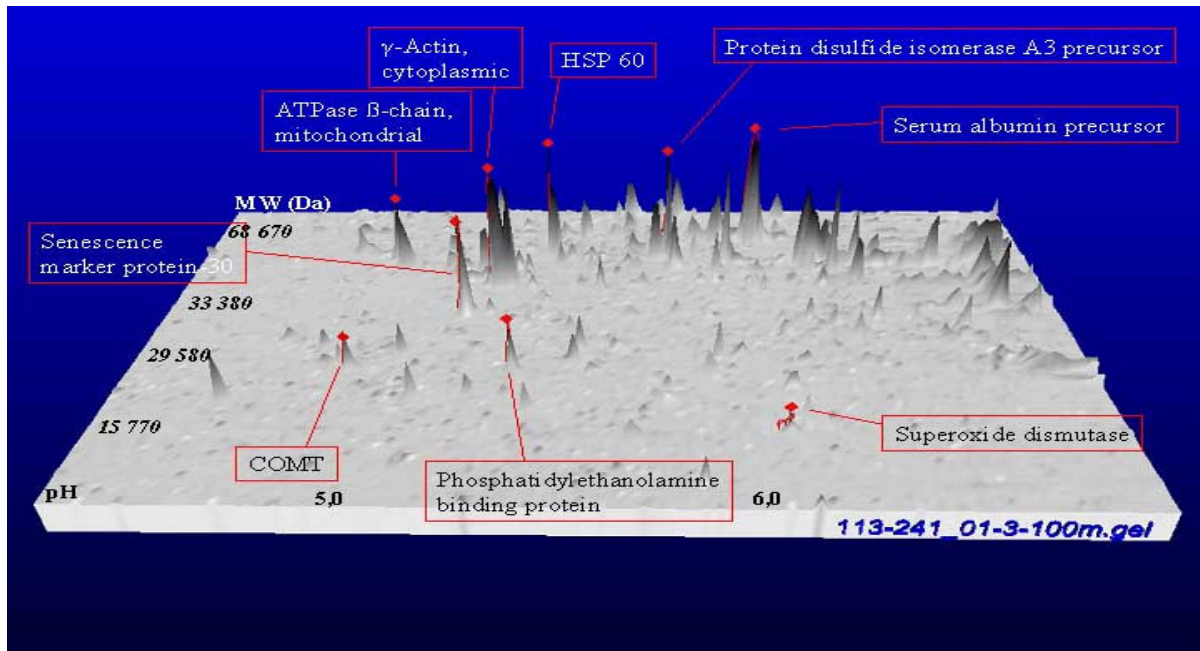


**Abbildung D-10: Relative Intensitäten eines Spots über alle Gele.**

Auf der x-Achse sind die einzelnen Gele der Kontrollen (gelb) und der behandelten Proben (grün) abgetragen, die y-Achse gibt die relativen Intensitäten des *Spots* in den einzelnen Gelen an. (CV) steht für Standardabweichung, (Avg) für mittlere relative Intensität und (Fac) für Regulationsfaktor (für die Kontrollgruppe als Referenz nicht berechenbar).

## 2.2 Protein-Identifizierung aus 2-DE-Gelen zur Standardisierung

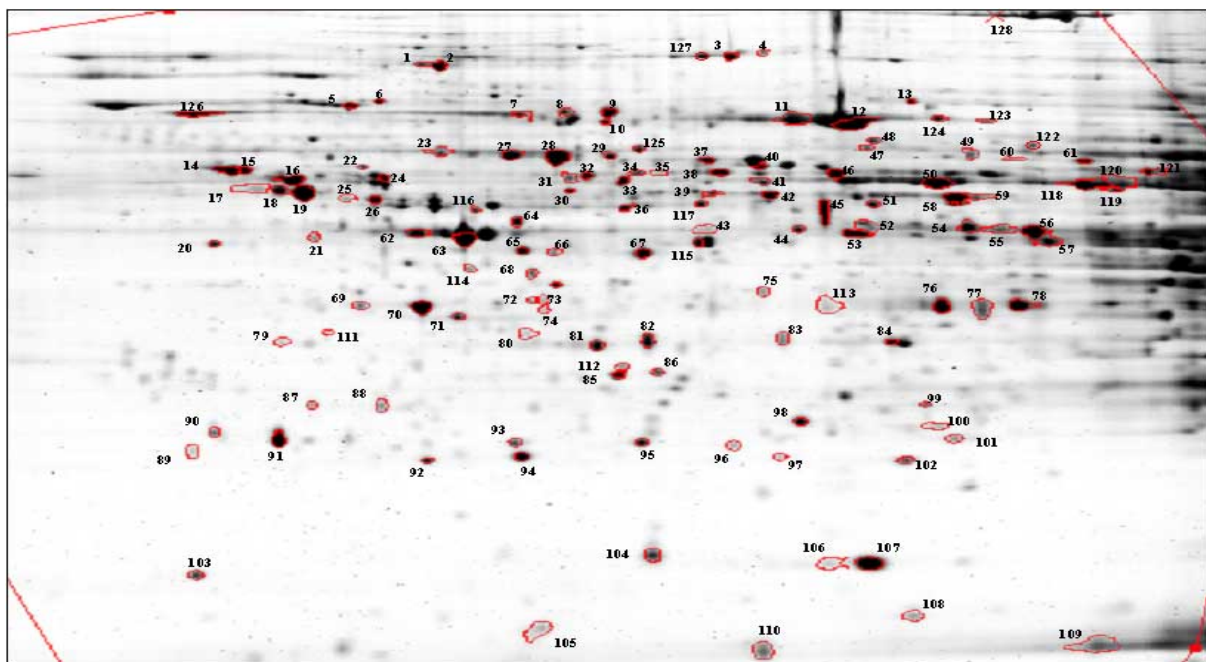
Die Identifizierung der Rattenleber-Proteine aus den 2-DE-Gelen erfolgte nach enzymatischer Spaltung mittels MALDI-MS oder MS/MS. Für eine Erleichterung und Standardisierung aller folgenden vergleichenden Analysen wurden in den Gelen zunächst Proteine zur Orientierung identifiziert. Abbildung D-11 zeigt diese in einem 2-DE-Gel in dreidimensionaler Darstellung.



**Abbildung D-11:** Zur Erleichterung und Standardisierung aller folgenden Analysen identifizierte Proteine im 2-DE-Gel.

Die Abbildung zeigt das Gel in einer dreidimensionalen Darstellung. (HSP60: Hitzeschockprotein 60; COMT: Catechol-O Methyltransferase)

Die große Anzahl der über den Verlauf der vorliegenden Arbeit identifizierten Proteine ermöglichte eine Kartierung des Rattenleberproteoms, dargestellt im 2-DE-Gel der Abbildung D-12. Tabelle I-1 des Anhangs listet die entsprechenden im Gel markierten identifizierten Proteine.



**Abbildung D-12:** Übersicht aller aus 2-DE-Gelen identifizierten Rattenleber-Proteine.

Die Bezeichnungen aller in dem Gel markierten Proteine sind in Tabelle I-1 im Anhang aufgeführt.

## **2.3 Tierstudie 1: Differentielle Analyse der 2-DE-Gele**

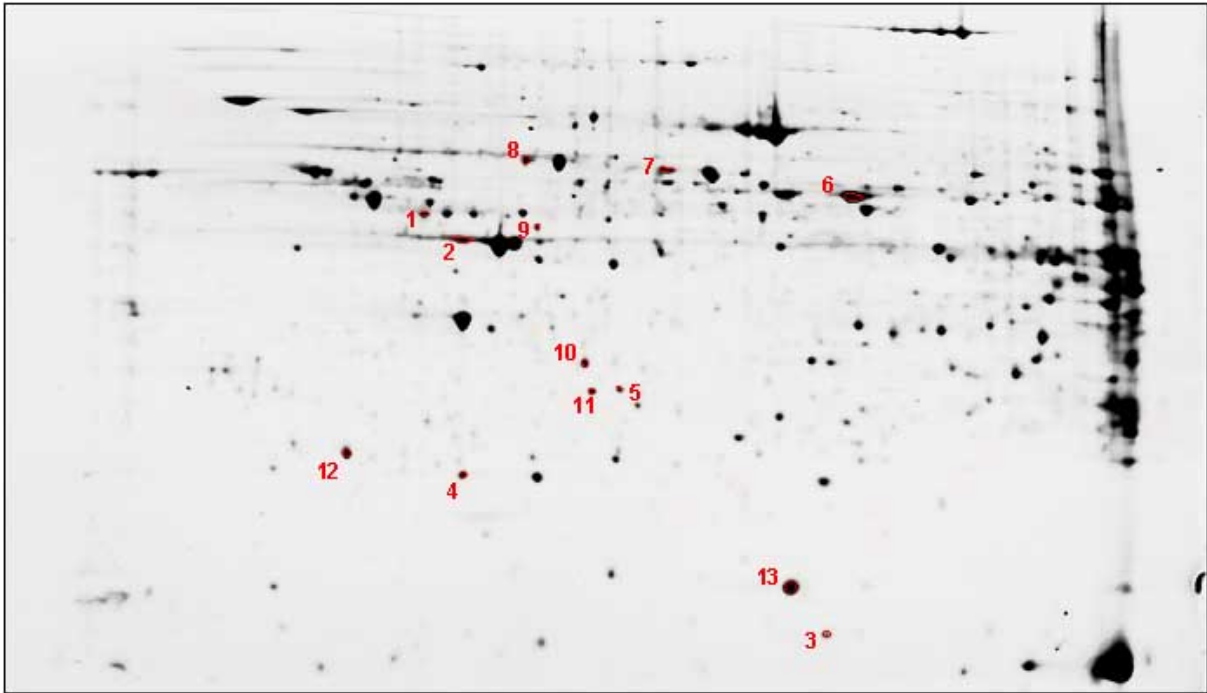
In dieser Studie wurden die Tiere mit der hohen Dosis NNM von 20 mg/kg über einen Zeitraum von sieben Wochen behandelt. Die 2-DE/MS-Analyse des Lebergewebes erfolgte nach einem Tag und nach drei Wochen der Exposition sowie am Studienende im Anschluss an eine behandlungsfreie Zeit nach 25 Wochen.

In den meisten der behandelten Tiere wurden nach 25 Wochen maligne Leberkarzinome diagnostiziert (Abschnitt 1.1). Daher eignete sich dieses Gewebe des Studien-Endpunkts besonders gut, um mittels 2-DE/MS Tumor-spezifische Markerproteine zu identifizieren.

Die Analyse der Proben nach nur einem Tag NNM-Exposition diene zur Detektion von Proteinen, deren Expressionsmuster durch die Chemikalie angestoßene akut toxische Effekte reflektieren. Veränderungen der Proteinexpression nach drei Wochen der NNM-Behandlung wurden untersucht unter der Annahme, einsetzende molekulare Prozesse der Leberkanzerogenese bereits zu diesem frühen Zeitpunkt detektieren zu können.

### **2.3.1 Differentiell exprimierte Proteine Tag 1**

Die Analyse der 2-DE-Gelbilder nach einem Tag der Exposition mit NNM ergab 13 statistisch signifikant ( $p \leq 0,02$ ) hochregulierte Proteine (Regulationsfaktor  $\geq 1,7$ ) in den behandelten Proben im Vergleich zu den Kontrollen. Durch nachfolgende MS und MS/MS-Analysen konnten alle identifiziert werden. Im 2-DE-Gel der Abbildung D-13 sind die differentiell exprimierten Proteine markiert und in Tabelle D-2 entsprechend unter Angabe von p-Werten und Regulationsfaktoren (RF) aufgelistet. Detail-Angaben zu Protein-Scores und MS/MS-Sequenzen sind in der erweiterten Tabelle I-2 des Anhangs zu finden.



**Abbildung D-13: Differenziell exprimierte Proteine in 2-DE-Gelen nach einem Tag NNM-Behandlung (Tierstudie 1).**

Die Spots der deregulierten Proteine sind in dem exemplarisch ausgewählten 2-DE-Gel rot markiert. Der Nummerierung entsprechend sind die Bezeichnungen der Proteine in Tabelle D-2 aufgeführt.

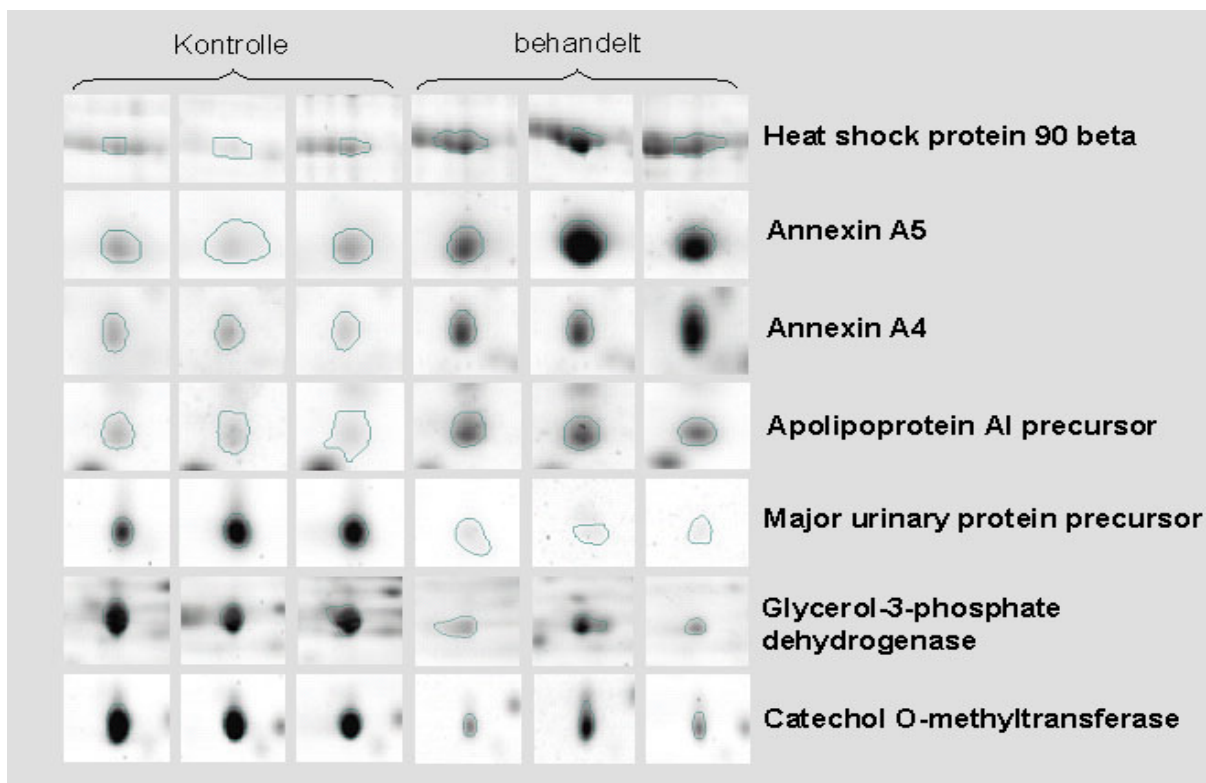
**Tabelle D-2: Differenziell exprimierte Proteine in 2-DE-Gelen nach einem Tag NNM-Behandlung (Tierstudie 1).**

Die Tabelle gibt die Namen der jeweiligen identifizierten Proteine an, wobei sich die Nummerierung auf die Spots im 2-DE-Gel der Abbildung D-13 bezieht. Unter der in Spalte drei angegebenen *Accession Number* (AN) ist das Protein in der Datenbank SwissProt eingetragen mit dem in Spalte 4 aufgeführten theoretischen Molekulargewicht (MW). Regulationsfaktor (RF) und p-Wert (Mann-Whitney-Test, n = 24) resultieren aus der differentiellen Analyse der 2-DE-Gele aller Proben des Studienzeitpunkts.

Spot	Protein	Swiss-Prot AN	MW (Da)	RF	p
1	26S protease regulatory subunit 6B	Q63570	47 379	3,43	0,0015
2	Actin, cytoplasmic 2	P02571	41 766	2,26	0,0118
3	Transthyretin precursor	P02767	15 710	3,70	0,0094
4	Peroxiredoxin 2	P35704	21 770	2,05	0,0069
5	Proteasome activator complex subunit 1	Q63797	28 577	2,31	0,0078
6	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	P11884	56 453	2,21	0,0009
7	Protein disulfide isomerase A3 precursor	P11598	56 588	2,33	0,0089
8	60 kDa heat shock protein	P18687	60 950	2,61	0,0019
9	Eucaryotic initiation factor 4A-II	P10630	46 373	2,95	0,0034
10	3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	P46953	32 561	2,13	0,0034
11	Prohibitin	P24142	29 802	2,06	0,0013
12	Catechol O-methyltransferase	P22734	29 578	2,16	0,0060
13	Superoxide dismutase	P07632	15 771	2,37	0,0167

### 2.3.2 Differentiell exprimierte Proteine Woche 3

Die Leberproben, die drei Wochen lang mit NNM exponiert wurden, zeigten wesentlich mehr Veränderungen im Proteinexpressionsmuster als die Proben von Tag 1. 75 Spots wurden als statistisch signifikant ( $p \leq 0,02$ ) differentiell exprimiert angezeigt, 25 davon hochreguliert ( $\geq 1,7$ ) und 50 herunterreguliert ( $\leq 0,7$ ). Durch PMF oder MS/MS-Analyse konnten 23 der herunterregulierten (92%) und 42 der hochregulierten (84%) Proteine identifiziert werden. Starke Veränderungen der Proteinexpression nach drei Wochen der NNM-Exposition wurden auch dahingehend deutlich, dass von den 65 identifizierten Proteinen 45 (69%) einen  $p$ -Wert  $\leq 10^{-5}$  aufwiesen. Abbildung D-14 zeigt die *Spots* einiger exemplarisch ausgewählter deregulierter Proteine in Ausschnitten der 2-DE-Gele von Kontrollen und behandelten Proben. Tabelle I-3 im Anhang listet alle identifizierten differentiell exprimierten Proteine im Detail.



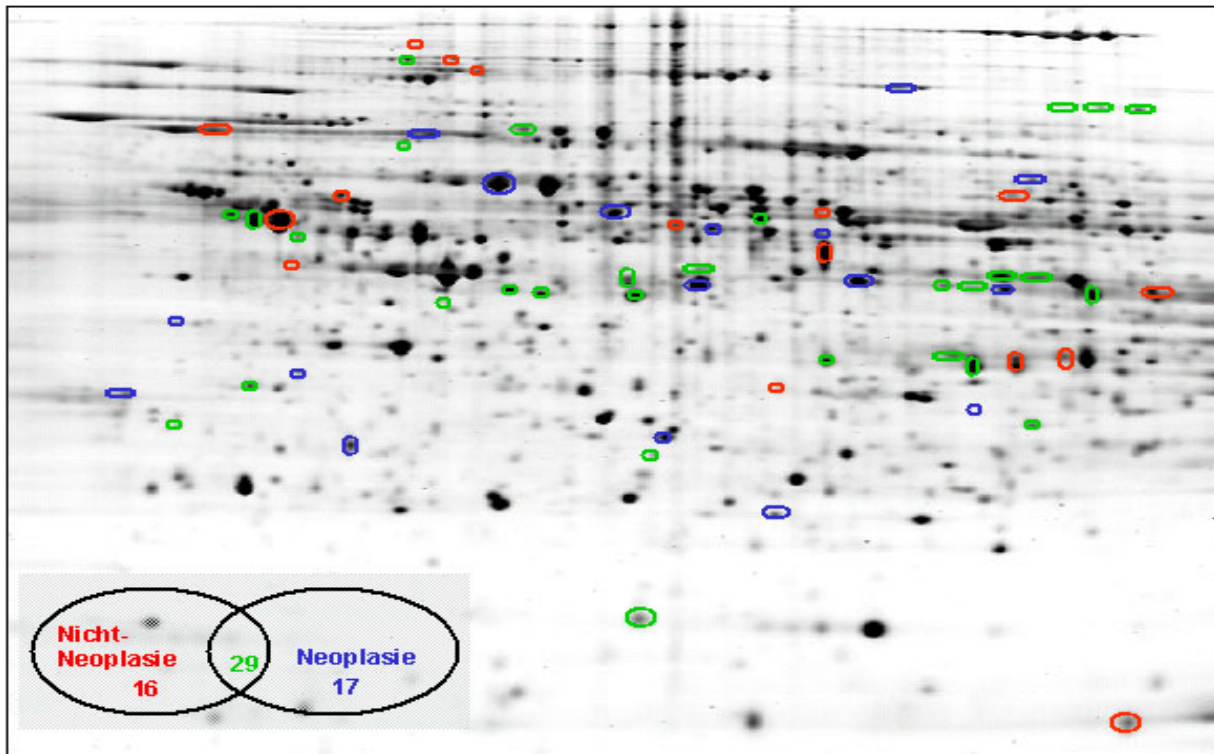
**Abbildung D-14: Auswahl differentiell exprimierter Proteine nach drei Wochen NNM-Behandlung (Tierstudie 1).**

Dargestellt sind die *Spots* in Ausschnitten der 2-DE-Gele von drei behandelten Proben und drei Kontrollen.

### 2.3.3 Differentiell exprimierte Proteine Woche 25

An die Behandlungszeit von sieben Wochen schloss sich eine 18 Wochen dauernde Regenerationsphase an. Durch Analyse der 2-DE-Gele aller biologischen Replikate wurden nach 25 Wochen 45 differentiell exprimierte Proteine detektiert. 11 Proteine waren hochreguliert ( $RF \geq 1,7$ ), 7 davon (64%) konnten durch massenspektrometrische Analyse identifiziert werden. Von den 34 herunterregulierten Proteinen ( $RF \leq 0,7$ ) wurden 28 (82%) durch MS identifiziert. In dieser ersten Auswertung der 2-DE-Pherogramme wurden alle Gele der behandelten und unbehandelten Proben des letzten Studienzeitpunktes berücksichtigt. Da histopathologisch nur in vier der sechs exponierten Tiere Leberkarzinome diagnostiziert wurden (Abschnitt 1.1), erschien eine genauere Betrachtung der Proben von Tieren mit Tumoren sinnvoll, um letztlich spezifische neoplastische Protein-Marker ausfindig machen zu können. Daher fanden in einer verfeinerten zweiten Auswertung nur die Proben der vier Tiere mit Lebertumoren sowie die entsprechenden vier Kontrollproben Berücksichtigung. Die Auswertung der in diesem Fall 16 Gele (jeweils vier technische Replikate) ergab 46 signifikant deregulierte Proteine, 12 davon stärker exprimiert als die Kontrollen, 34 schwächer exprimiert. 7 der hochregulierten (58%) und 27 der herunterregulierten (79%) Proteine konnten massenspektrometrisch identifiziert werden. Tabelle I-4 im Anhang führt alle identifizierten Proteine beider Auswertungsstrategien mit den entsprechenden Regulationsfaktoren, p-Werten, Protein-Scores sowie MS/MS-Sequenzen auf. 24 der dort gelisteten Proteine wurden in beiden Analysen als differentiell exprimiert angezeigt, während 12 Proteine nur in der zweiten verfeinerten Auswertung dereguliert waren und deshalb potentielle Neoplasie-spezifische Marker darstellen. Abbildung D-15 zeigt ein 2-DE-Gel einer Probe aus Woche 25, in dem die Proteine markiert sind, die nur in jeweils einer der Auswertungen dereguliert waren bzw. die überlappenden Proteine aus beiden Analysen.



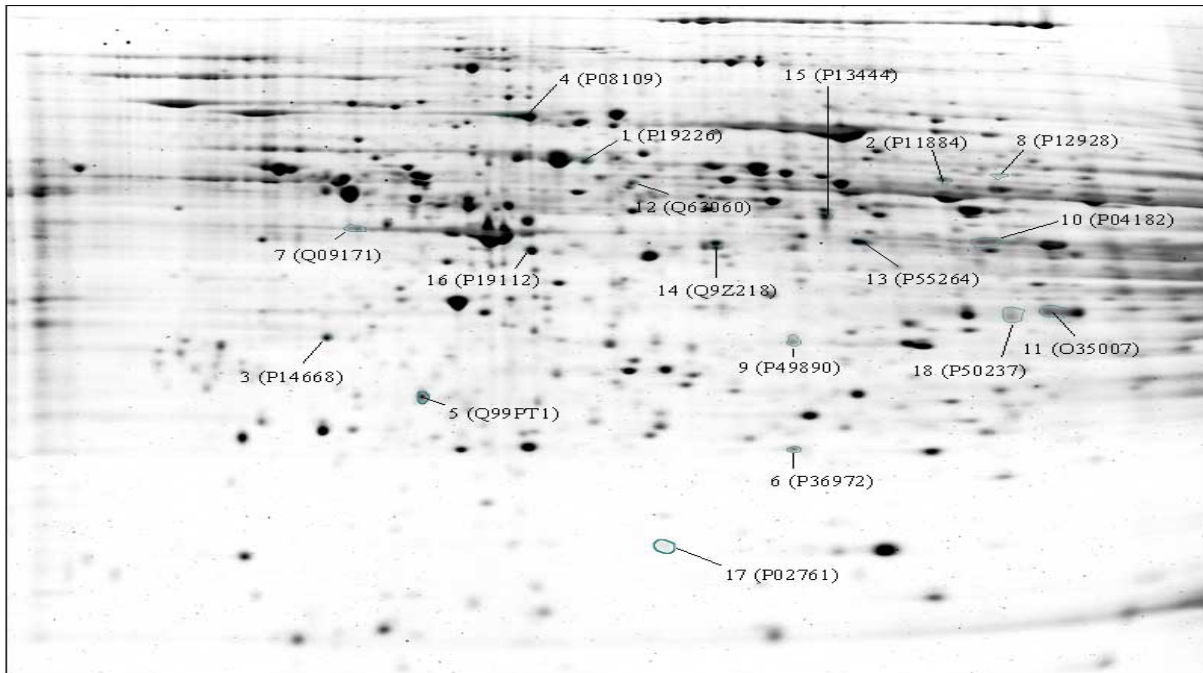


**Abbildung D-15: Differenziell exprimierte Proteine Woche 25 (Tierstudie 1).**

Rot markiert sind die *Spots*, die nur in der Auswertung mit allen Gelen dereguliert waren, während blau markierte *Spots* aus der zweiten Analyse resultierende potentielle Neoplasie-spezifische Marker-Proteine anzeigen. Grün markiert sind die differenziell exprimierten Proteine beider Auswertungsstrategien.

### 2.3.4 Identifizierung prädiktiver Biomarker

Der vorliegenden Arbeit lag die Annahme zugrunde, dass Proteomic-Technologien in der Lage sein könnten, Prozesse der Leberkanzerogenese früher zu erkennen als es mit traditionellen Methoden der Toxikologie bisher möglich ist. Daher stellte sich die Frage, ob die Veränderungen der Proteinexpression in den Proben von Woche 25, in denen größtenteils bereits Tumore aufgetreten waren, bereits nach drei Wochen der Behandlung mit NNM zu detektieren waren. Ein Vergleich der identifizierten Proteine beider Zeitpunkte lieferte 18 Proteine, die sowohl am Endpunkt der Studie wie auch bereits nach drei Wochen differenziell exprimiert waren und daher als potentielle prädiktive Marker für Leberkanzerogenese angesehen werden können. Im 2-DE-Gel in Abbildung D-16 sind diese 18 Proteine markiert. Die p-Werte und Regulationsfaktoren für beide Studienzeitpunkte sind in Tabelle D-3 entsprechend aufgeführt.



**Abbildung D-16: Differenziell exprimierte Proteine Woche 3 und Woche 25 (Tierstudie 1).**

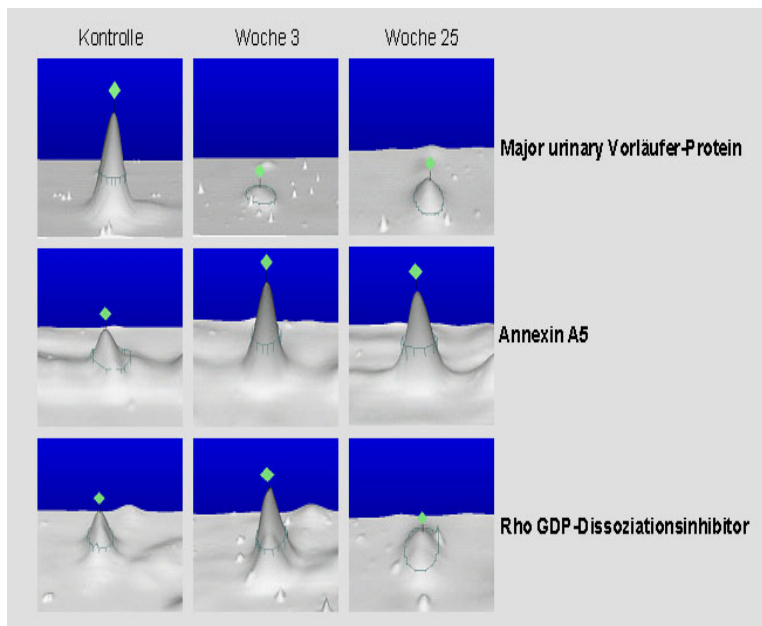
Die im 2-DE-Gel markierten Proteine waren im Lebergewebe beider Studienzeitpunkte dereguliert und können daher als potentielle frühe Biomarker für den Prozess der Leberkanzerogenese angesehen werden. Der Nummerierung sowie der SwissProt *Accession Number* entsprechend sind die Bezeichnungen der Proteine in Tabelle D-3 aufgeführt.

**Tabelle D-3: Differenziell exprimierte Proteine Woche 3 und Woche 25 (Tierstudie 1).**

Die Tabelle gibt die Namen der jeweiligen identifizierten Proteine an, wobei sich die Nummerierung auf die Spots im 2-DE-Gel der Abbildung D-16 bezieht. Unter der in Spalte drei angegebenen *Accession Number* (AN) ist das Protein in der Datenbank SwissProt eingetragen mit dem in Spalte 4 aufgeführten theoretischen Molekulargewicht (MW). Regulationsfaktor (RF) und p-Wert (Mann-Whitney-Test,  $n = 24$ ) resultieren aus der differentiellen Analyse der 2-DE-Gele aller Proben des jeweiligen Studienzeitpunkts.

Spot	Protein	Swiss-Prot AN	Woche 3		Woche 25	
			RF	p	RF	p
1	60 kDa heat shock protein	P19226	4,38	0,0000	0,66	0,0005
2	Aldehyde dehydrogenase	P11884	2,80	0,0000	0,67	0,0001
3	Annexin A5	P14668	2,75	0,0000	2,73	0,0000
4	Heat shock cognate 71 kDa protein	P08109	2,38	0,0002	0,63	0,0103
5	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Q99PT1	1,84	0,0000	0,73	0,0001
6	Adenine phosphoribosyltransferase	P36972	1,70	0,0000	1,71	0,0000
7	Betaine-homocysteine S-methyltransferase	O09171	1,85	0,0007	2,14	0,0019
8	Pyruvate kinase	P12928	0,24	0,0000	0,57	0,0054
9	Estrogen sulfotransferase, isoform 6	P49890	0,47	0,0000	0,66	0,0043
10	Ornithine aminotransferase	P04182	0,53	0,0000	0,57	0,0000
11	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	O35007	0,58	0,0000	0,62	0,0011
12	Glycerol kinase	Q63060	0,50	0,0000	0,69	0,0000
13	Adenosine kinase	P55264	0,41	0,0000	0,65	0,0011
14	Succinyl-CoA ligase	Q9Z218	0,66	0,0000	0,65	0,0008
15	S-adenosylmethionine synthetase alpha	P13444	0,44	0,0000	0,65	0,0177
16	Fructose-1,6-bisphosphatase	P19112	0,64	0,0000	0,68	0,0000
17	Major urinary protein precursor	P02761	0,14	0,0000	0,49	0,0000
18	N-Hydroxyarylamine sulfotransferase	P50237	0,35	0,0000	0,67	0,0013

Abbildung D-17 zeigt exemplarisch die *Spots* von drei potentiellen prädiktiven Biomarkern im 2-DE-Gel einer Probe des entsprechenden Studien-Zeitpunkts in dreidimensionaler Darstellung.



**Abbildung D-17: Exemplarisch ausgewählte differentiell exprimierte Proteine in 2-DE-Gelen von Proben der Woche 3 und Woche 25.**

Die Abbildung zeigt in dreidimensionaler Darstellung die *Spots* der Proteine in Ausschnitten der 2-DE-Gele von Proben des entsprechenden Studienzeitpunkts im Vergleich zum Gel einer Kontrollprobe.

Die Beispiele spiegeln ganz unterschiedliche Expressionsverläufe als Antwort auf NNM induzierte Toxizität

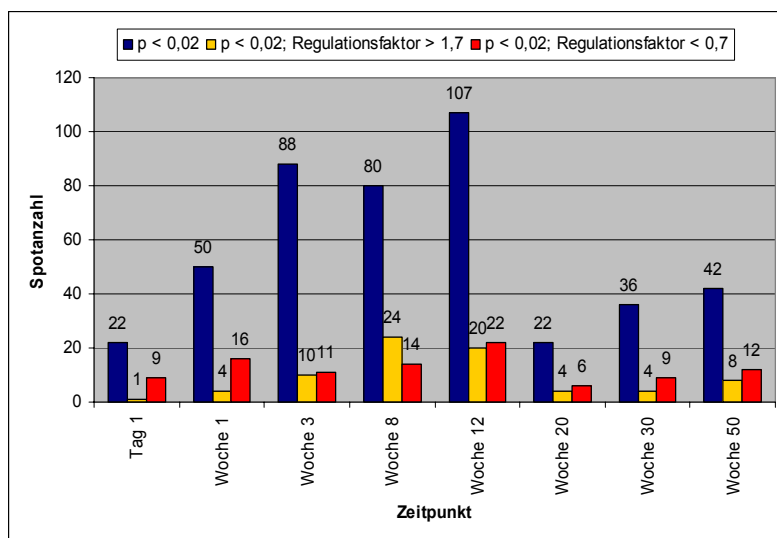
wider. Während das *Major urinary* Vorläufer-Protein in der Probe von Woche 3 fast gar nicht mehr und in der von Woche 25 nur schwach detektierbar ist, also zu beiden Zeitpunkten eine deutliche Herunterregulation stattgefunden hat, ist Annexin A5 sowohl in Woche 3 als auch in Woche 25 im Vergleich zur Kontrollprobe deutlich überexprimiert. Einen weniger kontinuierlichen Verlauf zeigt die Expression des Rho-GDP-Dissoziationsinhibitorproteins, dessen Bildung nach drei Wochen der Behandlung deutlich induziert, zum Endpunkt der Studie allerdings im Vergleich zur Kontrolle erkennbar unterdrückt wurde.

## 2.4 Tierstudie 2: : Differentielle Analyse der 2-DE-Gele

In der zweiten Studie wurden die Tiere sieben Wochen lang mit einer geringeren Dosis NNM behandelt (12 mg/kg). Die Probenentnahme zu acht verschiedenen Zeitpunkten (Tag 1, Wochen 1, 3, 8, 12, 20, 30 und 50) sollte zum einen die Detektion von frühen präkanzerogenen molekularen Prozessen mittels 2-DE/MS ermöglichen, zum anderen eine Beobachtung des Verlaufs der eingetretenen Veränderungen über die Zeit erlauben.

### 2.4.1 Differentiell exprimierte Proteine

Die Analyse der 2-DE-Gele aller Zeitpunkte zeigte einen Anstieg der Anzahl an differentiell exprimierten Proteine von Tag 1 über einige Wochen bis hin zu einem Maximum an detektierten Deregulationen in den Wochen 8 und 12 (Abbildung D-18). In Woche 20 fiel die Anzahl differentiell exprimierter Proteine rapide ab und stieg danach auch nur leicht wieder an. In Woche 50 war etwa das Expressionsniveau von Woche 1 erreicht.



**Abbildung D-18: Tierstudie 2: Anzahl differentiell exprimierter Proteine in den 2-DE-Gelen der Proben aller Studienzeitpunkte (Tag 1 bis Woche 50).**

Insgesamt fiel auf, dass im Verhältnis zu einer großen Anzahl an Spots mit p-Werten  $\leq 0,02$  nur relativ wenige Proteine tatsächlich stark mit Regulations-

faktoren  $\geq 1,7$  oder  $\leq 0,7$  differentiell exprimiert waren. Des Weiteren erwiesen sich selbst die deutlich deregulierten Proteine bei näherer Betrachtung der 2-D-Gele häufig als Artefakt-Spots, die beispielsweise an den äusseren Rändern der 2-DE-Gele falsch detektiert wurden. Daher wurden für die massenspektrometrische Identifizierung nicht nur die tatsächlich differentiell exprimierten Proteine ausgeschnitten und tryptisch verdaut, sondern darüber hinaus teilweise auch Spots, die zwar einen statistisch signifikanten p-Wert aufwiesen, allerdings weniger stark dereguliert waren. Tabelle D-4 führt die identifizierten Proteine aller Zeitpunkte mit Regulationsfaktoren  $\geq 1,4$  oder  $\leq 0,8$  auf. Eine ausführlichere Beschreibung aller identifizierten Proteine der Studie unter Angabe von p-Werten, Regulationsfaktoren sowie Protein-Scores und MS/MS-Sequenzen gibt Tabelle I-5 im Anhang. Für die massenspektrometrisch analysierten Proteine aus den 2-DE-Gelen der verschiedenen Studienzeitpunkte wurden Identifizierungsraten zwischen 64 und 94% erreicht.

**Tabelle D-4: Tierstudie 2: Differentiell exprimierte Proteine in den 2-DE-Gelen der Proben aller Zeitpunkte.**

Die Tabelle gibt die Namen der jeweiligen identifizierten Proteine an. In der Datenbank SwissProt sind die Proteine unter der aufgeführten *Accession Number* (AN) mit einem theoretischen Molekulargewicht (MW) eingetragen. Regulationsfaktor (RF) und p-Wert (Mann-Whitney-Test, n = 24) resultieren aus der differentiellen Analyse der 2-DE-Gele aller Proben des jeweiligen Studienzeitpunkts.

Protein	Swiss Prot AN	MW (Da)	RF	p
<b>Woche 1</b>				
Apolipoprotein A-IV precursor	P02651	44 429	1,59	0,0145
Tubulin beta chain	P04691	50 387	0,56	0,0003
78 kDa glucose-regulated protein precursor	P06761	72 474	0,43	0,0000
Adenosine kinase	Q64640	40 152	0,78	0,0016
S-adenosylmethionine synthetase alpha	P13444	44 240	0,65	0,0003
Mixture <sup>4</sup>			1,43	0,0018
Dimethylargininedimethylaminohydrolase + 60S acidic ribosomal protein P0	O08557 P19945	31 674 34 365		
26S protease regulatory subunit 6A	Q63569	49 415	1,58	0,0028
Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	O88618	59 504	1,48	0,0016
Estrogen sulfotransferase, isoform 6	P19890	35 622	0,54	0,0000
Serum albumin precursor	P02770	70 670	0,62	0,0045
TAR DNA-binding protein-43	Q921F2	44 918	0,56	0,0028
Adenosine kinase	Q64640	40 152	0,73	0,0027
10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	P28037	99 976	2,31	0,0007
<b>Woche 3</b>				
Catechol O-methyltransferase	P22734	29 806	0,76	0,0007
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	O35077	37 869	0,70	0,0082
S-adenosylmethionine synthetase alpha	P13444	44 240	0,79	0,0040
Catechol O-methyltransferase	P22734	29 806	0,78	0,0003
Serum albumin precursor	P02770	70 670	0,73	0,0037
N-Hydroxyarylamine sulfotransferase	P50237	35 855	0,79	0,0085
Gamma actin	P02571	41 766	1,61	0,0004
NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydro	O08557	31 674	1,49	0,0000
Annexin A3	P14669	36 528	1,42	0,0017
4-hydroxyphenylpyruvat dioxygenase	P32755	43 591	0,60	0,0026
Actin, cytoplasmic 2	P02571	42 108	1,58	0,0000
Heat shock cognate 71 kDa protein	P19378	70 989	0,45	0,0056
Aldehyde dehydrogenase family 7 member	Q9DBF1	55 935	1,92	0,0101
Heat shock cognate 71 kDa protein	P19378	70 989	1,52	0,0105
<b>Woche 8</b>				
Betaine-homocysteine S-methyltransferase	O09171	45 404	0,72	0,0123
Catalase	P04762	59 931	1,66	0,0005
Liver carboxylesterase 10 precursor	P16303	62 390	1,47	0,0141
Actin, cytoplasmic	P48975	42 053	1,49	0,0009
3-hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase	P46953	32 846	1,61	0,0026
Guanine deaminase	Q9WTT6	51 554	1,41	0,0038
S-adenosylmethionine synthetase alpha	P13444	44 240	1,40	0,0136
Argininosuccinate lyase	P20673	51 745	0,79	0,0109
Glycine amidinotransferase	P50442	48 724	0,78	0,0107
Betaine-homocysteine S-methyltransferase	O09171	45 404	1,64	0,0006
Enoyl-CoA hydratase	P14604	31 895	0,75	0,0030
Malate dehydrogenase	P14152	51 554	0,69	0,0000
Dihydrolipoamide acetyltransferase	P08461	59 126	1,41	0,0042

<sup>4</sup> Die MS-Analyse dieser Spots mit den angegebenen Regulationsfaktoren und p-Werten resultierte jeweils in der Identifizierung von zwei Proteinen.

Protein	Swiss Prot AN	MW (Da)	RF	p
Phosphoglucomutase	P38652	61 519	0,62	0,0118
Protein disulfide isomerase A3 precursor	P11598	57 044	0,76	0,0059
Estrogen sulfotransferase, isoform 3	P49889	35 735	2,83	0,0000
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	O35077	37 869	0,67	0,0153
Mixture <sup>4</sup>			1,53	0,0000
NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase	O08557	31 674		
60S acidic ribosomal protein P0	P19945	34 365		
Glycerol-3-phosphat dehydrogenase	O35077	37 869	0,63	0,0000
60 S ribosomal protein L36	P39032	12 186	0,75	0,0125
Nicotinamide N-methyltransferase	O55239	30 035	0,78	0,0007
ATP synthase D chain	P31399	18 678	0,79	0,0027
Fructose-1,6-bisphosphatase	P19112	39 909	0,77	0,0000
N-Hydroxyarylamine sulfotransferase	P50237	35 741	0,79	0,0155
Peroxiredoxin 2	P35704	21 770	0,73	0,0010
Protein disulfide isomerase A3 precursor	P11598	57 044	1,63	0,0013
Transthyretin precursor	P02767	15 710	0,72	0,0008
Vimentin	P31000	53 569	1,54	0,0001
<b>Woche 12</b>				
Keratin type II, cytoskeletal 8	Q10758	53 854	1,87	0,0001
Farnesyl pyrophosphate synthetase	P05396	40 804	1,89	0,0003
14-3-3 protein epsilon	P42655	29 327	1,82	0,0000
Tropomyosin alpha 4 chain	P09495	28 550		
Protein disulfide isomerase Erp 72 precursor	gi/423647 <sup>5</sup>	73 131	0,69	0,0002
Beta-actin	P02570	42 052	0,67	0,0000
Catalase	P04762	59 931	0,66	0,0109
Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	O88618	59 504	0,38	0,0000
Tubulin beta chain	P04691	49 905	0,55	0,0002
Serum albumin precursor	P02770	68 674	0,64	0,0009
Keratin	Q10758	53 854	0,62	0,0008
Keratin	Q10758	53 854	0,65	0,0001
Gamma actin	P02571	41 766	0,58	0,0001
Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	O88618	59 504	0,68	0,0029
ATPsynthase beta chain	P10719	56 319	0,66	0,0030
Alpha enolase	P04764	47 382	0,64	0,0000
60 kDa heat shock protein	P19226	60 917	0,68	0,0000
<b>Woche 20</b>				
Estrogen sulfotransferase, isoform 1	P52844	35 828	2,34	0,0049
Aryl sulfotransferase	P17988	34 169	0,63	0,0070
Carbamoyl-phosphate synthetase	P07756	167 476	0,21	0,0003
20-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	P51652	37 732	1,88	0,0023
<b>Woche 30</b>				
3-Hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase	P46953	32 846	0,61	0,0128
Glycogen phosphorylase	P09811	97 877	2,18	0,0000
Aldehyde dehydrogenase	P81178	54 813	0,70	0,0063
Succinyl-CoA ligase	Q9Z218	44 115	0,67	0,0069
Annexin A6	P48037	75 975	0,73	0,0188
Catalase	P04762	59 931	2,01	0,0005
Alpha-actinin 4	P57780	105 368	0,54	0,0007
Serum albumin precursor	P02770	70 670	0,48	0,0001
Hemopexin precursor	P20059	52 000	0,44	0,0001
<b>Woche 50</b>				
Ketohexokinase or	Q02974	33 299	2,06	0,0000
Biliverdin reductase A precursor	P46844	33 716		

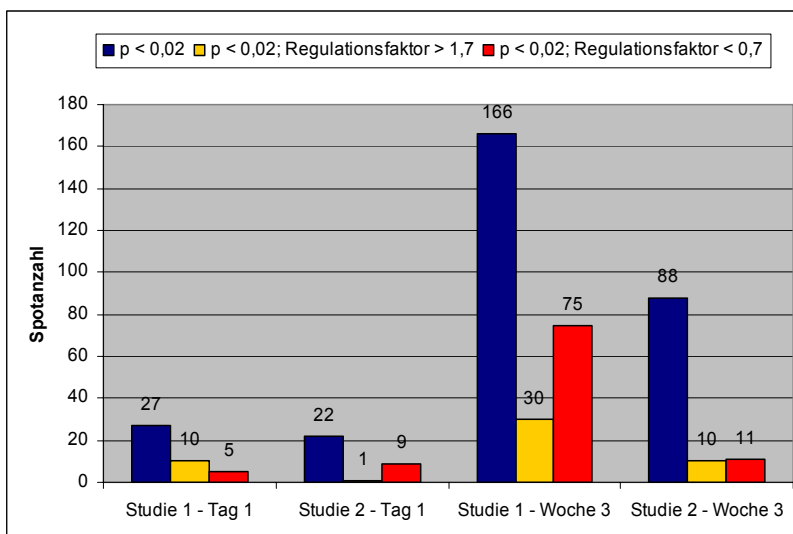
<sup>5</sup> Hierbei handelt es sich um NCBI Nr Accession Numbers.

Protein	Swiss Prot AN	MW (Da)	RF	p
Protein disulfide isomerase A3 precursor	P11598	57 044	2,07	0,0047
Glutathione S transferase, pi 2	P47954	23 551	2,09	0,0001
Protein disulfide isomerase A3 precursor	P11598	57 044	2,93	0,0000
Eucaryotic initiation factor 4A-I	P60843	46 353	0,73	0,0001
Ferritin light chain	P49945	20 756	0,68	0,0130
Chain A, Crystal Structure of Rat Alpha 1-Macroglobulin Receptor Binding Domain	12084772 <sup>5</sup>	15 363	2,12	0,0000
Aflatoxin aldehyde reductase member 2	Q8CG45	41 106	0,66	0,0053
Acyl-CoA dehydrogenase	P70584	48 250	0,60	0,0043

Einige der deregulierten Proteine wurden in den Proben der einzelnen Studienzeitpunkte mehrfach identifiziert. Sie stammten aus unterschiedlichen *Spots* in den 2-DE-Gelen und weisen daher auch abweichende Regulationsfaktoren auf. In Woche 1 konnte dies beispielsweise für Adenosinkinase, in Woche 3 für Catechol O-Methyltransferase und in Woche 8 für Betain-Homocystein S-Methyltransferase, Guanin-Deaminase und Fruktose-1,6-Bisphosphatase beobachtet werden. Da die *Spots* in den 2-DE-Gelen mit annähernd gleichem Molekulargewicht, jedoch unterschiedlichem pI-Wert detektiert wurden, liegen vermutlich verschiedene posttranslationale Modifizierungen der einzelnen Proteine vor.

## 2.5 Deregulierte Proteine zu frühen Zeitpunkten beider Studien

Bei näherer Betrachtung der 2-DE/MS-Ergebnisse beider Tierstudien fiel auf, dass sich die Anzahl differentiell exprimierter Proteine nach einem Tag der NNM-Exposition zwischen beiden Studien trotz Einsatz verschiedener Dosierungen noch nicht wesentlich unterschied (Abbildung D-19). Nach drei Wochen der Behandlung allerdings wurden deutliche Unterschiede in den detektierten Effekten sichtbar.



**Abbildung D-19: Anzahl differentiell exprimierter Proteine in den 2-DE-Gelen der Proben von Tag 1 und Woche 3 beider Tierstudien.**

166 Protein-*Spots* mit statistisch signifikanten p-Werten in den 2-DE-Gelen der Proben von Woche 3 aus Tierstudie 1 standen 88 *Spots* in Tierstudie 2 gegenüber. Noch deutlicher erschienen die Unterschiede bezüglich stark deregulierter Proteine. Studie 1 mit einer hohen NNM-Dosis lieferte insgesamt 105 differentiell exprimierte Proteine ( $RF \geq 1,7$  oder  $\leq 0,5$ ), Studie 2 mit der geringeren Dosis hingegen nur 21. Tabelle D-5 listet die Proteine, die nach drei Wochen der NNM-Behandlung sowohl in Studie 1 wie auch in Studie 2 identifiziert wurden, mit den zugehörigen Regulationsfaktoren. Bei einigen Proteinen, in der Tabelle farbig markiert, fand in beiden Studien eine Regulation in entgegengesetzte Richtungen statt. Bei näherer Betrachtung der Expressionsveränderungen in die gleiche Richtung wurde eine jeweils stärkere Deregulation der Proteine in Studie 1 augenscheinlich.

**Tabelle D-5: Gegenüberstellung der Regulationsfaktoren identifizierter Proteine aus beiden Studien nach drei Wochen NNM-Behandlung.**

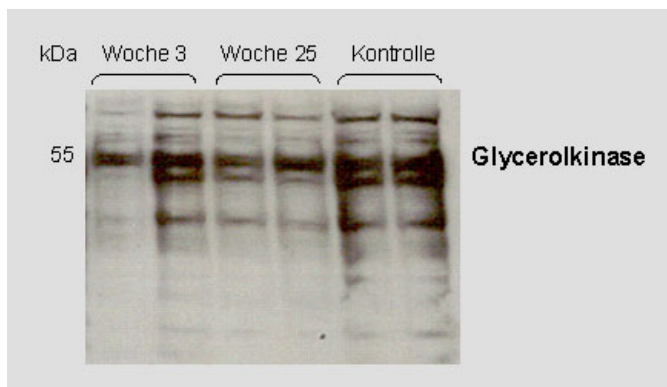
(RF: Regulationsfaktor)

Protein	RF Studie 1 Woche 3	RF Studie 2 Woche 3
Catechol O-methyltransferase	0,44	0,76
Serum paraoxonase/arylesterase	0,59	1,55
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0,58	0,70
S-adenosylmethionine synthetase alpha	0,44	0,79
Senescence marker protein 30	0,69	1,16
3-Hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase	0,58	0,87
Glycerol kinase	0,61	1,17
Apolipoprotein A-I precursor	2,08	0,88
Protein disulfide isomerase precursor	0,59	1,24
N-Hydroxyarylamine sulfotransferase	0,35	0,79
Annexin A3	2,22	1,42
Fructose-1,6-bisphosphatase	0,64	0,84
Heat shock cognate 71 kDa protein	2,38	0,45
Heat shock cognate 71 kDa protein	1,84	1,52
60 kDa heat shock protein	4,38	1,24
Adenosine kinase	0,41	0,83



### 3 Western Blotting

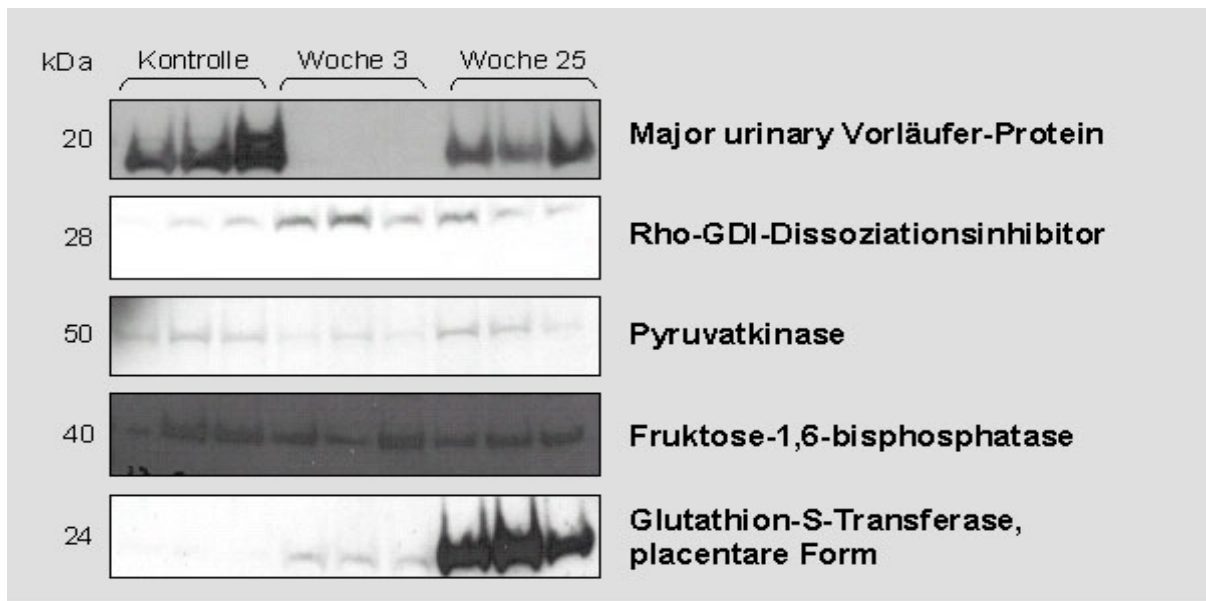
Durch Einsatz von 2-DE/MS wurden potentielle frühe Biomarker für den Prozess der Leberkanzerogenese identifiziert (Abschnitt 2.3.4). Zur Bestätigung der sowohl in Woche drei als auch in Woche 25 der Tierstudie 1 beobachteten Expressionsveränderungen wurde zunächst eine immunologische Detektion der Proteine als Methode herangezogen (Kapitel C, Abschnitt 11). Die Möglichkeiten zum Vergleich der Ergebnisse des *Western Blottings* mit denen der 2-DE/MS-Analyse waren limitiert durch die mangelnde Verfügbarkeit von Antikörpern gegen die 18 potentiellen prädiktiven Markerproteine. Wenn die gewünschten Antikörper erworben werden konnten, zeigten diese mehrfach trotz Optimierung von Waschvorgängen sehr unspezifische Reaktionen, so dass sie sich letztlich für die Bewertung von Expressionsveränderungen als unbrauchbar erwiesen. Abbildung D-20 zeigt exemplarisch den unspezifischen Nachweis von Glycerolkinase.



**Abbildung D-20: Immunologische Detektion von Glycerolkinase.**

Der abgebildete *Western Blot* zeigt einen sehr unspezifischen Nachweis des Proteins in zwei Kontrollen sowie jeweils zwei behandelten Proben von Woche 3 und Woche 25 (Tierstudie 1). Daher erwies sich der Antikörper zur Bewertung von Expressionsveränderungen als ungeeignet.

Die Expression des *Major urinary* Vorläufer-Proteins (Abbildung D-21) wurde in den Proben von Woche 3 so stark verringert, dass es immunologisch nicht mehr nachweisbar war. Zum Studienendpunkt in Woche 25 konnte es dagegen wieder detektiert werden, allerdings schwächer im Vergleich zu den Kontrollproben. Das Rho-GDI-Dissoziationsinhibitor-Protein zeigte in Woche 3 eine deutlich verstärkte, in Woche 25 eine leicht verstärkte bis unveränderte Expression. Die Bildung von Pyruvatkinase war in den Proben von Woche 3 verringert, in Woche 25 dagegen im Vergleich zur Kontrolle unverändert.



**Abbildung D-21: Immunologische Detektion von Proteinen in Proben der Tierstudie 1.**

Die *Western Blots* zeigen die differentielle Expression von fünf Proteinen in jeweils drei behandelten Proben von Woche 3 und Woche 25 im Vergleich zu Kontrollen.

Für die Fruktose-1,6-Bisphosphatase konnte sowohl in Woche 3 als auch in Woche 25 eine leicht verringerte Expression nachgewiesen werden. Die placentare Form der Glutathion-S-Transferase (GST-P), die bereits in der Immunhistochemie als Marker für präneoplastische Veränderungen in den Proben der Tierstudie 2 verwendet wurde (Abschnitt 1.2), zeigte auch hier in den Proben der Tierstudie 1 einen starken Anstieg der Expression von Woche 3 nach Woche 25. In den Kontrollproben dagegen war GST-P nicht nachweisbar.

## 4 Quantitative Massenspektrometrie

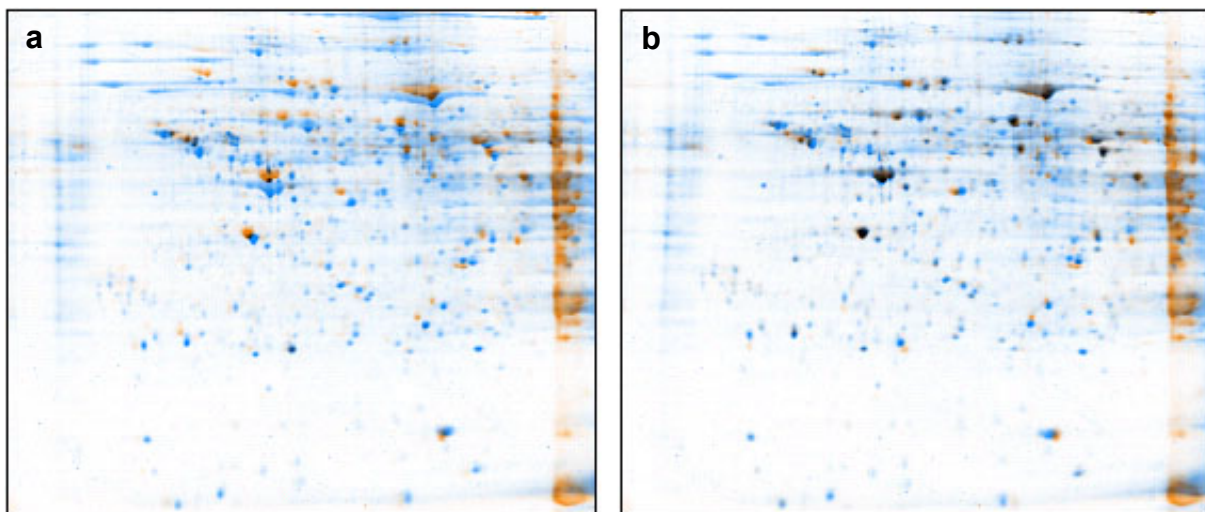
Der Einsatz der iTRAQ-Technologie als massenspektrometrische Methode zur relativen Quantifizierung von Proteinen diente zum einen der weiteren Detektion von behandlungsbedingten Expressionsveränderungen in den Leberproben von Woche 3 der Tierstudie 1. Des Weiteren konnte wiederum ein Abgleich mit den ermittelten 2-DE/MS-Ergebnissen stattfinden, um die potentiellen prädiktiven Markerproteine möglicherweise in ihrer Regulation zu bestätigen.

Da die Analyse von kompletten nicht fraktionierten Zell-Lysaten mit iTRAQ-Reagenzien bisher nur für die Anwendung auf Hefezellen erfolgreich beschrieben war (Ross, 2004), außerdem die hohen Anteile an Harnstoff, Thioharnstoff und Detergenzien in dem bisher in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lysispuffer (Kapitel C, Abschnitt 3.1) Störfaktoren bei der massenspektrometrischen Analyse darstellen, wurde ein neues Aufschluss-Verfahren adaptiert. Die Proteine aller Leberproben wurden für die iTRAQ-Analyse nach dem Protokoll der partiellen Extraktion (Kapitel C, Abschnitt 3.2) unter Verwendung eines Phosphatpuffers extrahiert. Zur weiteren Reduktion der Probenkomplexität erfolgte eine Fraktionierung der Proteinextrakte durch Größenausschlusschromatographie.

### 4.1 Einfluss des Extraktions-Verfahrens auf die quantitative MS

Während das Verfahren der kompletten Extraktion danach strebt, möglichst alle in einer Zelle enthaltenen Proteine zu solubilisieren, gehen durch die Wahl weniger stringenter Pufferbedingungen bei der partiellen Extraktion vorrangig die cytosolischen Proteine in Lösung. Gerade im Hinblick darauf, dass ein Vergleich der mittels iTRAQ-Technologie erhaltenen Ergebnisse mit denen des 2-DE/MS-Ansatzes erfolgen soll, sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass aufgrund unterschiedlicher Extraktionsbedingungen auch verschiedene Proteome für die Analyse vorlagen. Um einen Eindruck über den Einfluss des gewählten Aufschluss-Verfahrens auf die Zusammensetzung des Proteoms zu erhalten, wurden von den nach partieller Extraktion erhaltenen Leberlysate nach dem in Kapitel C, Abschnitt 5.2 beschriebenen Protokoll 2-DE-Gele angefertigt und die aufgetrennten Proteine durch Färbung mit Ruthenium visualisiert (Kapitel C, Abschnitt 5.3.1). Nach Analyse der Gelbilder mit ProteomWeaver stellte sich heraus, dass sich die eigentliche Anzahl an detektierten *Spots* in den 2-DE-Gelen nach partieller Extraktion nicht

wesentlich von der in Gelen nach kompletter Extraktion unterschied. So wurden in dem Gel einer mit Phosphatpuffer extrahierten Kontrollprobe 1006 *Spots* detektiert, die Extraktion derselben Probe unter stringenten Bedingungen lieferte 1045 *Spots*. Erst bei genauerer Betrachtung der *Spot*-Intensitäten traten deutliche Unterschiede hervor. Während im 2-DE-Gel nach partieller Extraktion fast die Hälfte aller *Spots* relative Intensitäten  $\leq 0,1$  aufwies, wurden nach kompletter Extraktion über 90% der *Spots* mit relativen Intensitäten  $\geq 0,1$  detektiert. Abbildung D-22 zeigt diese beiden Gele in übereinandergelagerter Darstellung. Im linken Teil der Abbildung hat noch keine Anpassung stattgefunden, das Gel nach kompletter Extraktion ist mit blauen *Spots* dargestellt, das nach partieller Extraktion rot. Im rechten Teil der Abbildung liegen beide Gele genau übereinander. Dabei wird augenscheinlich, dass relativ wenige Mischfarben entstanden sind, vielmehr die intensiveren *Spots* des blau gefärbten Gels dominieren.

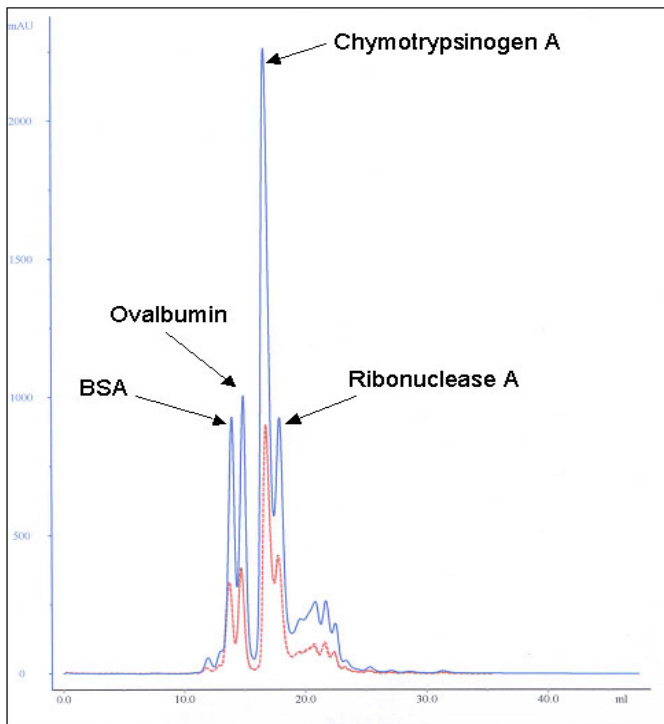


**Abbildung D-22: Anpassung zweier 2-DE-Gele einer Kontrollprobe, angefertigt nach unterschiedlichen Extraktionsverfahren.**

Die 2-DE-Gele wurden nach dem in Kapitel C, Abschnitt 5.2 beschriebenen Protokoll angefertigt und die Proteine mit Ruthenium visualisiert (C, 5.3.1). Die Proteine wurden aus beiden Proben mit unterschiedlichen Extraktionsverfahren gewonnen. Die von ProteomWeaver generierte übereinandergelegte Darstellung zeigt das Gel nach kompletter Extraktion der Proteine (C, Abschnitt 3.1) mit blauen *Spots*, das Gel nach partieller Extraktion dagegen (C, 3.2) mit roten *Spots*. In (a) sind die beiden Gele nicht angepasst, in (b) dagegen wurden die *Spot*-Muster zur Deckung gebracht. Hier dominieren die blau dargestellten *Spots* des Gels nach kompletter Extraktion der Proteine.

## 4.2 Vorfraktionierung durch Gelfiltration

Die Vorfraktionierung der Leberproben durch Gelfiltration sollte nach Möglichkeit in demselben Puffersystem erfolgen, das auch zur Extraktion der Proteine eingesetzt wurde. Dadurch sollten Änderungen des Solubilisierungsverhalten der Proteine und damit verbundene mögliche Ausfällungen auf der Säule vermieden werden. Die Eignung des gewählten Phosphatpuffers zur reproduzierbaren Separation von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht konnte anhand der Auftrennung von Standardproteinmischungen demonstriert werden. Abbildung D-23 zeigt die übereinandergelagerten Chromatogramme von drei Trennläufen, bei denen die Säule mit unterschiedlichen Konzentrationen des Standardgemischs beladen wurde. Die beste Separation der Proteine wurde bei einer Flussrate von 0,4 ml/min erreicht.



**Abbildung D-23: Übereinandergelagerte Chromatogramme nach Auftrennung von Standardproteinen mittels Gelfiltration.**

**HPLC-System:** ÄKTA Purifier (Amersham)  
**Säule:** Superdex 200 10/300 Tricorn (Amersham)

**Probe:**

1. BSA (67.000 Da) 5 mg/ml
2. Ovalbumin (43.000 Da) 5 mg/ml
3. Chymotrypsinogen A (25.000 Da) 5 mg/ml
4. Ribonuclease A (13.700 Da) 5 mg/ml

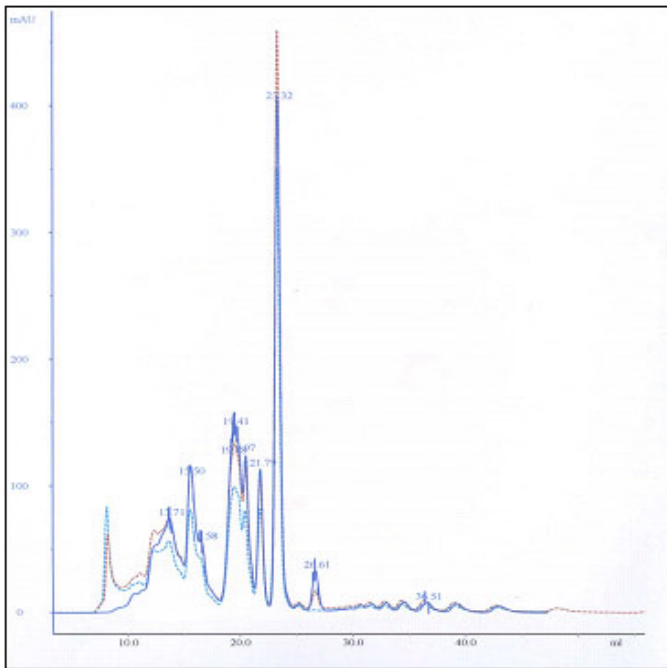
**Probenvolumen:** Lauf 1 (blau): 300 µl, Lauf 2 und 3 (rot und braun (deckungsgleich)): je 100 µl

**Laufmittel:** 20 mM Kaliumphosphat pH 7,0, 10 mM KCl, 10 mM NaCl

**Flussrate:** 0,4 ml/min, RT

**Detektion:**  $\lambda = 280 \text{ nm}$

Anschließend wurde unter Verwendung der ermittelten Bedingungen ein Leberextrakt mittels Gelfiltration dreifach aufgetrennt und Fraktionen von 0,5 ml Größe gesammelt, wobei die Fraktionierung nach 0,3 Säulenvolumen verzögert einsetzte. Abbildung D-24 zeigt anhand der übereinandergelagerten Chromatogramme der drei Läufe die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und Signalintensitäten.



**Abbildung D-24: Übereinandergelagerte Chromatogramme nach dreifacher Trennung eines Leberlysats.**

**HPLC-System:** ÄKTA Purifier (Amersham)  
**Säule:** Superdex 200 10/300 Tricorn (Amersham)

**Probe:** Rattenleber-Proteinextrakt 9 mg/ml (partielle Extraktion nach Kapitel C, Abschnitt 3.2)

**Probenvolumen:** 100  $\mu$ l pro Lauf

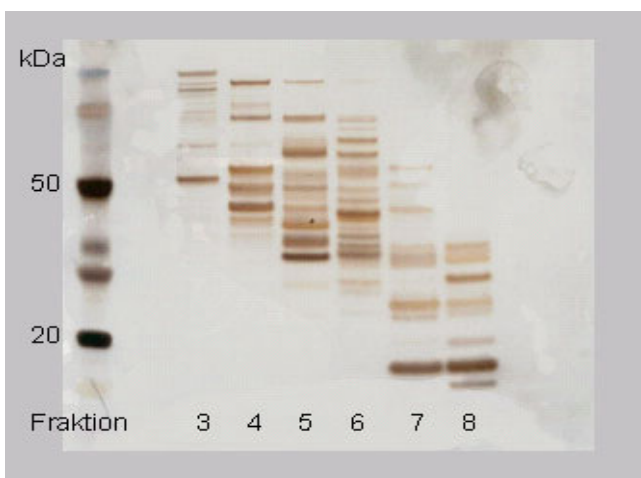
**Laufmittel:** 20 mM Kaliumphosphat pH 7,0, 10 mM KCl, 10 mM NaCl

**Flussrate:** 0,5 ml/min, RT

**Fraktionsgröße:** 0,5 ml

**Detektion:**  $\lambda = 280$  nm

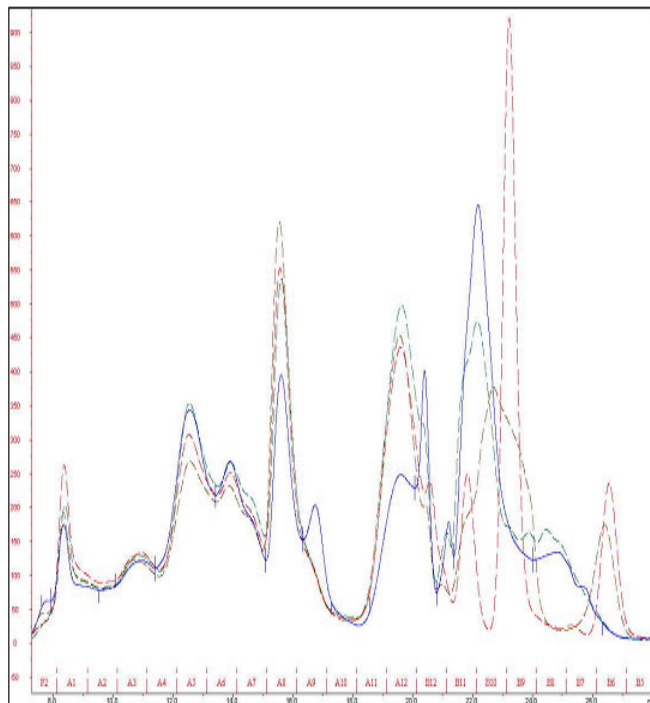
Die in den Fraktionen 3-8 enthaltenen Proteine ließen sich mittels 1-D-SDS-PAGE separieren (Kapitel C, Abschnitt 5.1) und anschließend durch Silber-Färbung (Kapitel C, Abschnitt 5.3.2) detektieren (Abbildung D-25). Hierbei wurde eine gute Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht deutlich. In den übrigen Fraktionen (1 und 2, sowie ab Fraktion 9) konnten keine Proteine nachgewiesen werden. In allen Fraktionen wurde offensichtlich die Detektionsgrenze für die Gehaltsbestimmung durch die Bradford-Methode (Kapitel C, Abschnitt 4) unterschritten, so dass sogar für die im Gel durch Silberfärbung visualisierten Proteine auch nach Einengung der Lösung keine Konzentration ermittelt werden konnte.



**Abbildung D-25: 1D-SDS-PAGE der Leberlysats-Fraktionen nach Separation durch Gelfiltration.**

Die Fraktionen wurden nach der in Abbildung D-24 dargestellten Auftrennung eines Leberprotein-Extrakts durch Gelfiltration erhalten. Nur in den Fraktionen 3 bis 8 konnten durch Silberfärbung Proteine detektiert werden. Eine saubere Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wird deutlich. In den Fraktionen 1 und 2 sowie ab Fraktion 9 waren dagegen keine Proteine nachweisbar.

Daher wurden alle folgenden Trennungen der Proben für die iTRAQ-Analyse mit einer erhöhten Proteinmenge von 2 mg in 350 µl durchgeführt und Fraktionen von 1 ml Volumen gesammelt. Abbildung D-26 zeigt die übereinandergelagerten Chromatogramme der Trennungen einer Kontrollprobe von Woche 3 sowie die drei behandelten Proben. Über die Retentionszeiten der ersten zehn gesammelten Fraktionen waren die Läufe gut reproduzierbar. Da ab der elften Fraktion selbst nach starker Einengung keine Konzentrationsbestimmung (Bradford-Methode) möglich war, wurden für jede Probe die zehn vorderen Fraktionen zu vier Fraktionen vereinigt, eingengt und für die iTRAQ-Analyse verwendet. Abbildung D-27 zeigt die für jede der vier Leberproben erhaltenen vier Fraktionen nach Auftrennung der enthaltenen Proteine mittels 1D-SDS-PAGE (Kapitel C, Abschnitt 5.1) und Detektion durch Silberfärbung (Kapitel C, Abschnitt 5.3.2). Eine unter Anwendung der Gelfiltration reproduzierbare Separation der Proteine über alle vier Proben wird dabei augenscheinlich. In den vereinigten und eingengten Fraktionen war nun eine Konzentrationsbestimmung nach der Bradford-Methode (Kapitel C, Abschnitt 5) möglich.



**Abbildung D-26: Chromatogramme der Trennung einer Kontrollprobe und drei behandelter Proben von Woche 3 (Tierstudie 1) durch Gelfiltration.**

**HPLC-System:** ÄKTA Purifier (Amersham)

**Säule:** Superdex 200 10/300 Tricorn (Amersham)

**Proben:** Kontrolle und drei behandelte Proben Woche 3, Tierstudie 1 (partielle Extraktion nach Kapitel C, Abschnitt 3.2)

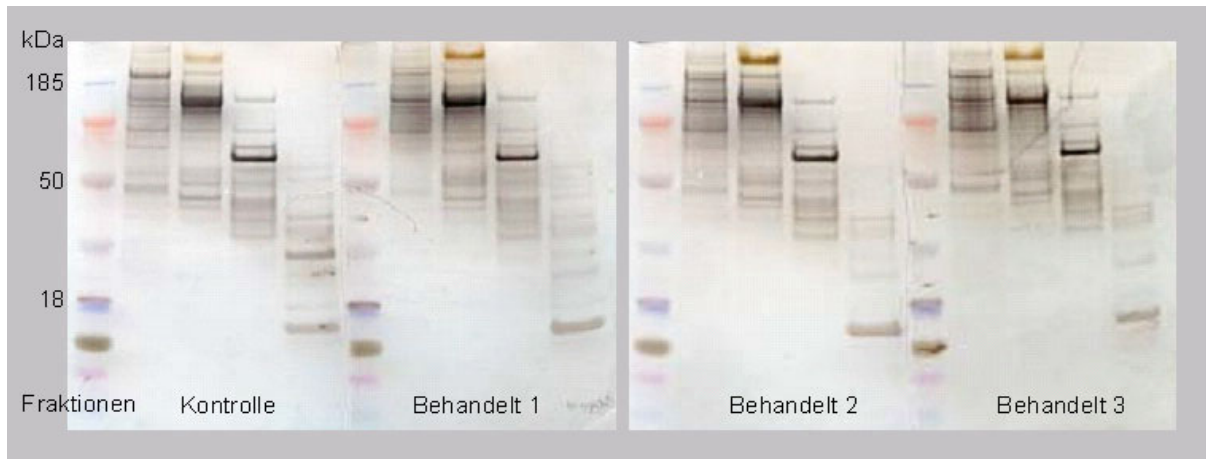
**Probenvolumen:** 350 µl pro Lauf (2 mg Protein)

**Laufmittel:** 20 mM Kaliumphosphat pH 7,0, 10 mM KCl, 10 mM NaCl

**Flussrate:** 0,5 ml/min, RT

**Fraktionsgröße:** 1,0 ml, vereinigt wurden Fraktionen A1+A2, A3+A4+A5, A6+A7 und A8+A9+A10

**Detektion:**  $\lambda = 280 \text{ nm}$



**Abbildung D-27: SDS-PAGE der nach Gelfiltration erhaltenen vereinigten Fraktionen der Proben von Woche 3 (Tierstudie 1).**

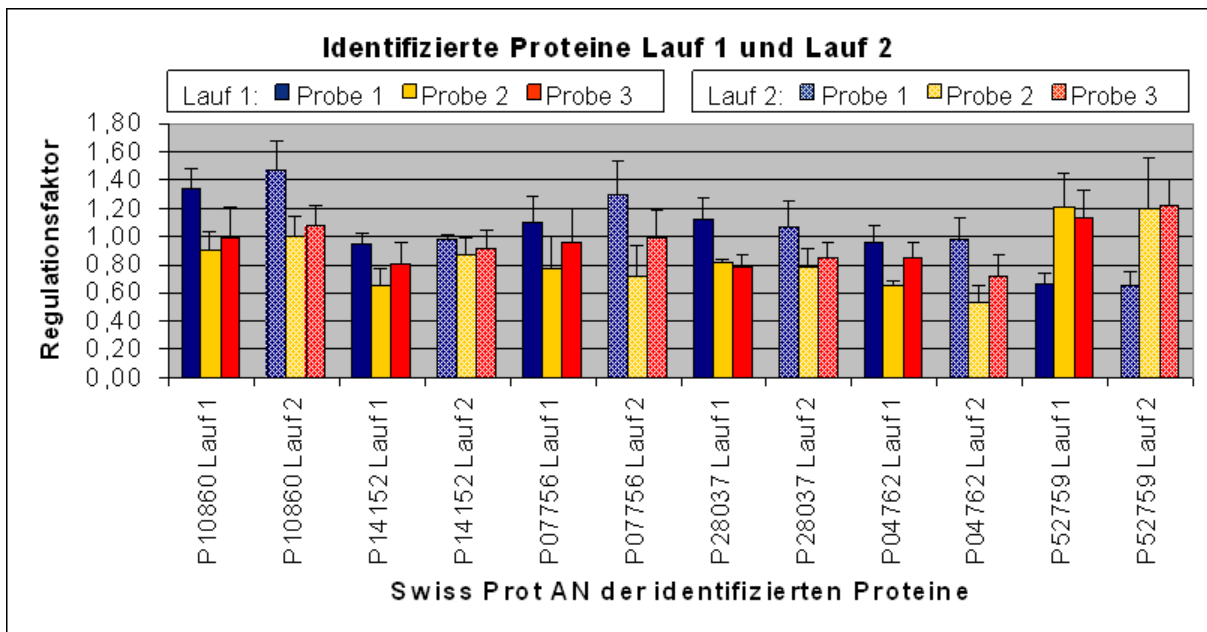
Die Proteine einer Kontrolle sowie drei behandelter Proben aus Woche 3 der Tierstudie 1 wurden wie in Abbildung D-26 dargestellt durch Gelfiltration separiert und fraktioniert. Die Fraktionen 1-10 wurden ebenfalls wie zu Abbildung D-26 erläutert zu vier Fraktionen vereinigt, eingeengt und mittels 1D-SDS-PAGE weiter aufgetrennt. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Silber. Die Abbildung der resultierenden Gele zeigt, dass die Proteine durch Gelfiltration reproduzierbar separiert werden konnten.

### 4.3 Ermittlung der Reproduzierbarkeit der iTRAQ-Methode

Um die Reproduzierbarkeit der iTRAQ-Methode und damit die Verlässlichkeit der erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen, wurde ein Test-Experiment im Duplikat durchgeführt. Jeweils 20 µg Protein von vier Test-Leberlysaten (Referenzprobe sowie Proben 1, 2 und 3) wurden nach enzymatischer Spaltung mit einem der vier iTRAQ-Reagenzien derivatisiert. Die Referenzprobe wurde dazu mit dem Reagenz derivatisiert, das ein Ionensignal bei 114 Da erzeugt, die Proben 1 bis 3 wurden entsprechend mit den in Signalen bei 115, 116 und 117 Da resultierenden Reagenzien umgesetzt. Nach erfolgter massenspektrometrischer Identifizierung und Quantifizierung wurde das Experiment mit denselben Proben wiederholt. 101 identifizierten Proteinen des ersten Ansatzes standen 130 des folgenden Ansatzes gegenüber. 88 dieser Proteine wurden in beiden Experimenten identifiziert. Die Quantifizierung der Proteine bzw. Peptide basierte auf dem Vergleich der Flächen der Ionensignale bei 115, 116 und 117 Da (Proben 1 bis 3) mit der Fläche des Signals bei 114 Da (Referenzprobe). Im Diagramm in Abbildung D-28 sind für einige exemplarisch ausgewählte Proteine die aus beiden Läufen für die Proben 1, 2 und 3 im Vergleich zur Referenzprobe ermittelten mittleren Regulationsfaktoren dargestellt. Der Vergleich der für die drei Proben innerhalb eines Laufs resultierenden Regulationsfaktoren zeigt eine hohe Variabilität zwischen den Proben, was aber an



dieser Stelle aufgrund der Wahl von Test-Leberlysaten nicht von Relevanz ist. Die für die jeweiligen technischen Replikate in Lauf 1 und Lauf 2 ermittelten Werte jedoch zeigen eine gute Übereinstimmung. Die gute technische Reproduzierbarkeit der iTRAQ-Methode konnte auch über die exemplarisch gewählten Proteine hinaus beobachtet werden. Die im Diagramm der Abbildung D-28 für die mittleren Regulationsfaktoren angegebenen Fehlerbalken resultieren daraus, dass die Proteine anhand mehrerer Peptide quantifiziert werden konnten.



**Abbildung D-28: Mittlere Regulationsfaktoren mittels iTRAQ-Analyse identifizierter und quantifizierter Proteine in Lauf 1 und dem wiederholenden Lauf 2.**

Angegeben sind die SwissProt *Accession Numbers* (AN) der exemplarisch ausgewählten Proteine. Eine Referenzprobe sowie die Proben 1, 2 und 3 wurden jeweils mit einem der vier iTRAQ-Reagenzien derivatisiert, im Folgenden identifiziert und quantifiziert (Lauf 1). Anschließend wurde das Experiment mit denselben Proben wiederholt (Lauf 2). Die Quantifizierung erfolgte für alle drei Proben im Vergleich zur Referenz. Die mittleren Regulationsfaktoren der jeweiligen technischen Replikate aus Lauf 1 und Lauf 2 zeigen eine gute technische Reproduzierbarkeit (jeweils Vergleich von einheitlich gefärbtem Balken in Lauf 1 mit straffiertem Balken derselben Farbe in Lauf 2). Die Fehlerbalken resultieren daraus, dass die jeweiligen Proteine anhand mehrerer Peptide quantifiziert wurden. Für jedes Peptid wurde daher ein Regulationsfaktor im Vergleich zum Referenzpeptid ermittelt.

#### 4.4 Differentielle Analyse mittels iTRAQ-Reagenzien

Die Analyse der Leberproben von Woche 3 aus Tierstudie 1 (eine Kontrolle und drei behandelte Proben) mittels iTRAQ-Reagenzien zur Protein-Identifizierung und relativen Quantifizierung erfolgte mit jeweils zwei der nach Gelfiltration erhaltenen Fraktionen der Proben. Diese Fraktionen wurden gewählt, da die Proteine am besten die auch auf 2-DE-Gelen darstellbare Molekulargewichtsverteilung repräsentieren. Im Hinblick auf das Ziel, iTRAQ- und 2-DE-Ergebnisse miteinander zu vergleichen, erschien diese Wahl sinnvoll.

Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden nach dem unter Kapitel C, Abschnitt 9.1 beschriebenen Protokoll enzymatisch gespalten und die entstandenen Peptide mit jeweils einem der iTRAQ-Reagenzien umgesetzt. Die Kontrolle wurde dabei mit dem Reagenz markiert, das im MS/MS-Spektrum ein Ionen-Signal bei 114 Da ergibt. Die behandelten Proben wurden mit den in den Signalen bei 115, 116 oder 117 Da resultierenden Reagenzien derivatisiert. Nach weiterer chromatographischer Trennung auf einer Umkehrphasen-Säule (nach Kapitel C, Abschnitt 9.2) erfolgte die Identifizierung und relative Quantifizierung der Proteine mittels MALDI-MS/MS-Analyse.

In Abhängigkeit von den gewählten *Software*-Einstellungen bei der Datenbanksuche variierte die Anzahl der identifizierten Proteine. Mit einer Einstellung des Vertrauensintervalls C.I.% (*Confidence Interval*, GPS Explorer Software, Applied Biosystems) auf mindestens 10 wurden 500 Proteine in Fraktion 1 und 436 Proteine in Fraktion 2 identifiziert. Tabelle D-6 zeigt die Anzahl der identifizierten Proteine mit Änderung des C.I.-Werts. Um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu verbessern, wurde für die weitere Auswertung der C.I.-Wert auf 50% erhöht. Auf diese Weise konnten 374 Proteine in Fraktion 1 und 311 Proteine in Fraktion 2 identifiziert werden.

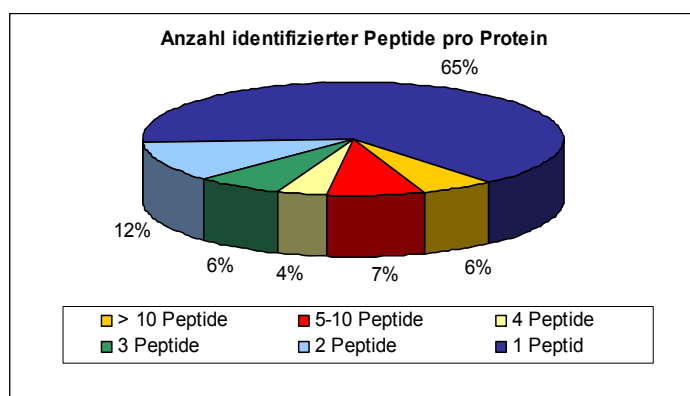
**Tabelle D-6: Anzahl mittels iTRAQ-Technologie identifizierter Proteine.**

In Abhängigkeit von den Einstellungen für das Vertrauensintervall variierte die Anzahl der identifizierten Proteine in den beiden analysierten Fraktionen.

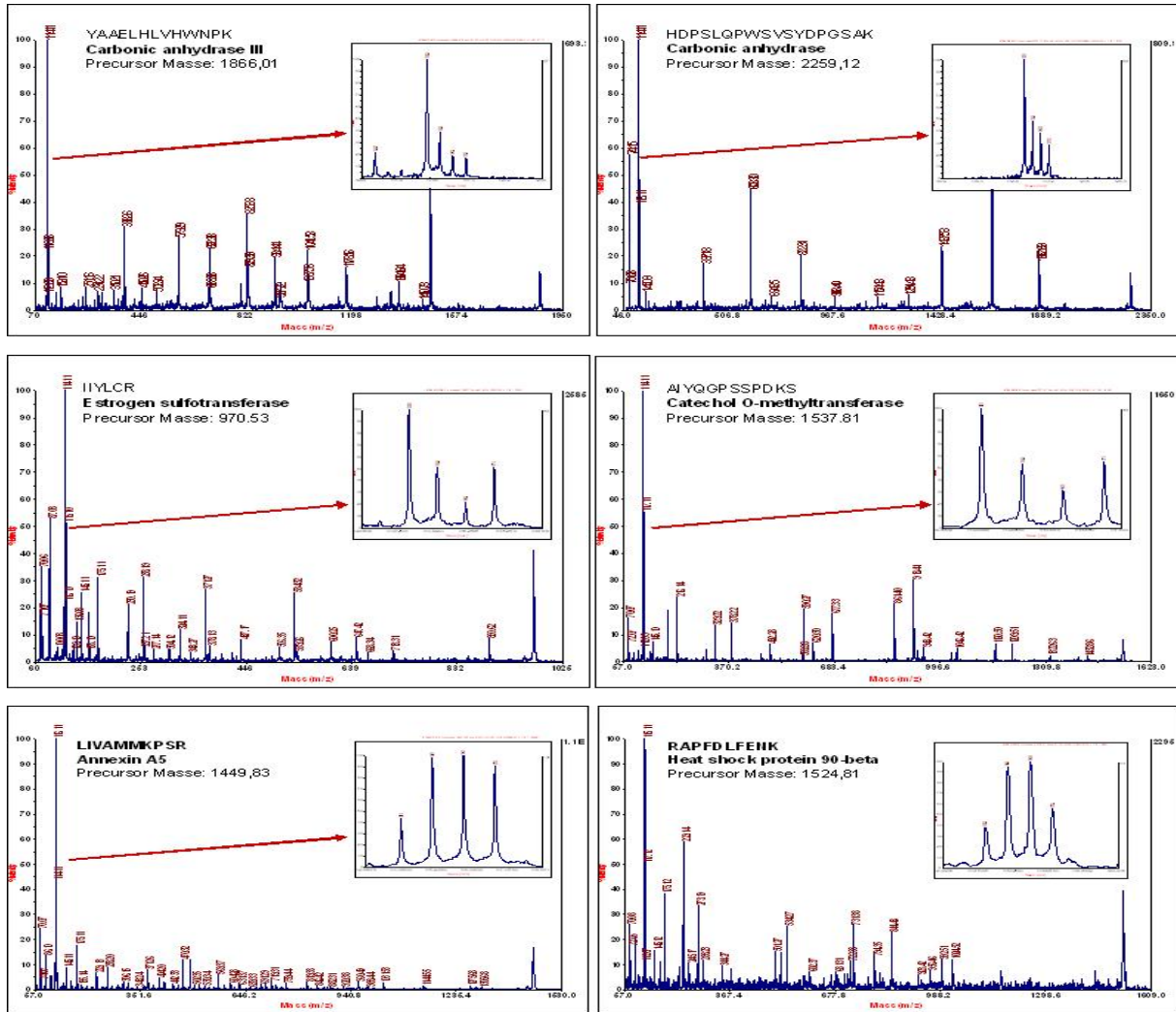
Vertrauensintervall (CI) (%)	Anzahl identifizierter Proteine	
	Fraktion 1	Fraktion 2
10	500	436
50	374	311
90	209	166
95	191	143
99	154	121
100	103	89

Von den 374 Proteinen der Fraktion 1 waren 48 Proteine (13%) differentiell exprimiert: 14 hochreguliert mit einem Regulationsfaktor  $\geq 1,5$  und 34 herunterreguliert mit einem Regulationsfaktor  $\leq 0,6$ . In Fraktion 2 waren 50 der 311 Proteine (16%) differentiell exprimiert, 26 hoch- und 24 herunterreguliert. In Tabelle I-6 im Anhang sind alle 98 deregulierten Proteine unter Angabe der Regulationsfaktoren für die einzelnen iTRAQ-Reporter-Signale sowie deren Standardabweichungen und Protein-Scores aufgeführt. Nur 43 Proteine wurden in beiden Fraktionen identifiziert, was insgesamt in 642 unterschiedlichen identifizierten Protein-Spezies resultierte.

Bei Identifizierung und Quantifizierung mehrerer Peptide eines Proteins wurde der Regulationsfaktor als Median der Einzelwerte berechnet. Das Vertrauen in die Korrektheit der Ergebnisse erhöhte sich dadurch signifikant. Wie das Diagramm in Abbildung D-29 veranschaulicht, wurden 35% der identifizierten Proteine anhand mehrerer Peptide quantifiziert. Die Abbildung D-30 zeigt exemplarisch die MS/MS-Spektren einiger identifizierter, differentiell exprimierter Peptide. Zur Veranschaulichung der Quantifizierung wurde dabei der Massenbereich der Reporter-Signale hervorgehoben.

**Abbildung D-29: Prozentuale Verteilung identifizierter Peptide pro Protein.**

35% der Proteine wurden anhand mehrerer Peptide quantifiziert.



**Abbildung D-30: MS/MS-Spektren ausgewählter identifizierter, differentiell exprimierter Proteine.**

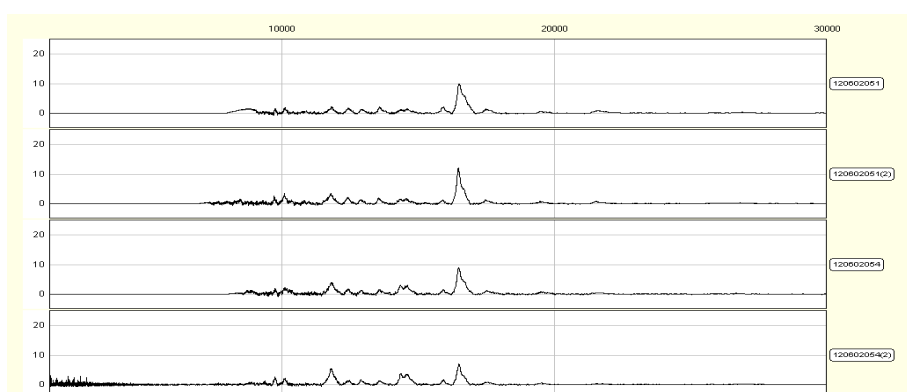
Hervorgehoben ist der Massenbereich der einzelnen *Reporter*-Signale, anhand derer die Quantifizierung erfolgte.

## 5 SELDI-MS

Um durch NNM ausgelöste Expressionsveränderungen zu Beginn und Ende der Studie zu detektieren, wurden mittels SELDI-TOF-MS Proteinprofile der Proben von Tag 1 und Woche 25 der Tierstudie 1 in jeweils acht technischen Replikaten erstellt. Die Proben aus der Tierstudie 2 - mit der geringeren Dosis NNM - wurden zur Beobachtung der Effekte über den Verlauf der Zeit für alle Zeitpunkte in vier technischen Replikaten analysiert. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der *ProteinChip Software* hinsichtlich statistisch signifikanter Intensitätsunterschiede der detektierten m/z-Signale zwischen Kontrollen und behandelten Proben.

### 5.1 Ermittlung der geeigneten Chip-Präparationsbedingungen

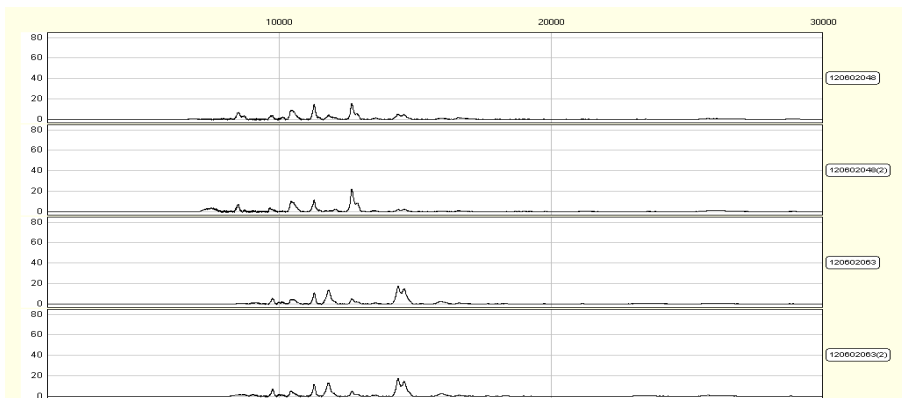
Zur Ermittlung der geeigneten chromatographischen Oberfläche wurden zunächst Proteinprofile von Leberextrakten auf verschiedenen Chips mit unterschiedlichen Bedingungen für die Pufferzusammensetzung und den pH-Wert erstellt. Zunächst wurden die Chips gemäß des in Kapitel C, Abschnitt 8.1.1 beschriebenen Protokolls präaktiviert. Die Abbildungen D-31 zeigt vier technische Replikatspektren einer Leberprobe, die im Anschluss an die Präaktivierung auf einem Anionentauscher (SAX)-Chip in einem Puffersystem bei pH 8,5 (Kapitel C, Abschnitt 8.1.1.) inkubiert und nachfolgend im *ProteinChip Reader* vermessen wurde. Hierbei wurden verhältnismäßig wenige Signale mit geringen Signalintensitäten detektiert.



**Abbildung D-31: Proteinprofil eines Leberlysats in vier Replikaten auf einem SAX-Chip (Inkubationsbedingungen bei pH 8,5).**

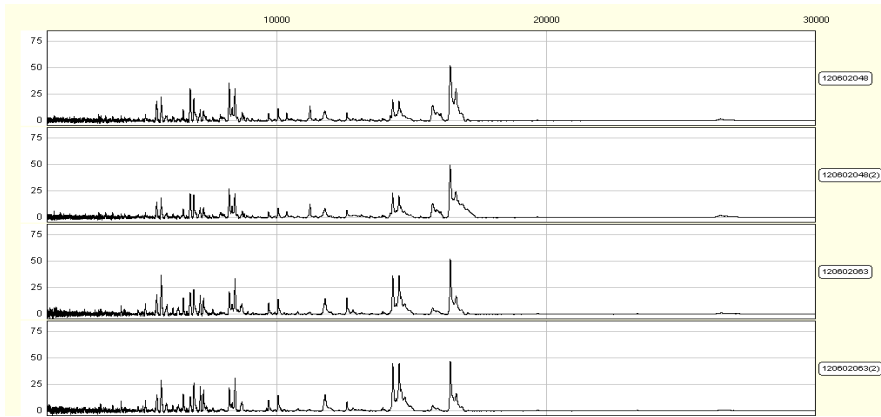
Die Präaktivierung der Chipoberfläche sowie die Inkubation der Proben (Proteinkonzentration 150 µg/ml) erfolgte in einem Puffersystem bei pH 8,5 (100 mM Tris-HCl pH 8,5, 0,05% Triton X-100). Auf der y-Achse sind die relativen Signalintensitäten gegen die m/z-Werte auf der x-Achse abgetragen.

Leicht erhöhte Signalintensitäten ergaben sich bei Vermessung desselben Proteinextrakts auf einem Kationentauscher (WCX)-Chip nach Inkubation in einem Puffersystem ebenfalls bei pH 8,5 (Abbildung D-32). Die besten und reproduzierbarsten Spektren bezüglich der Menge detektierter Signale sowie deren Auflösung und relativer Intensitäten wurden allerdings nach Inkubation der Proben auf dem WCX-Chip bei pH 4,5 erreicht (Kapitel C, Abschnitt 8.1.1). Die erhaltenen Spektren in Abbildung D-33 verdeutlichen zudem, dass erheblich mehr Signale im Massenbereich zwischen 5 und 10 kDa detektiert werden konnten. Demzufolge wurden der Kationentauscher-Chip mit Inkubationsbedingungen bei pH 4,5 für die nachfolgende differentielle Analyse der Leberextrakte ausgewählt.



**Abbildung D-32: Proteinprofil eines Leberlysats in vier Replikaten auf einem WCX-Chip (Inkubationsbedingungen bei pH 8,5).**

Die Präaktivierung der Chipoberfläche sowie die Inkubation der Proben (Proteinkonzentration 150 µg/ml) erfolgte in einem Puffersystem bei pH 8,5 (100 mM Tris-HCl pH 8,5, 0,05% Triton X-100). Auf der y-Achse sind die relativen Signalintensitäten gegen die m/z-Werte auf der x-Achse abgetragen.

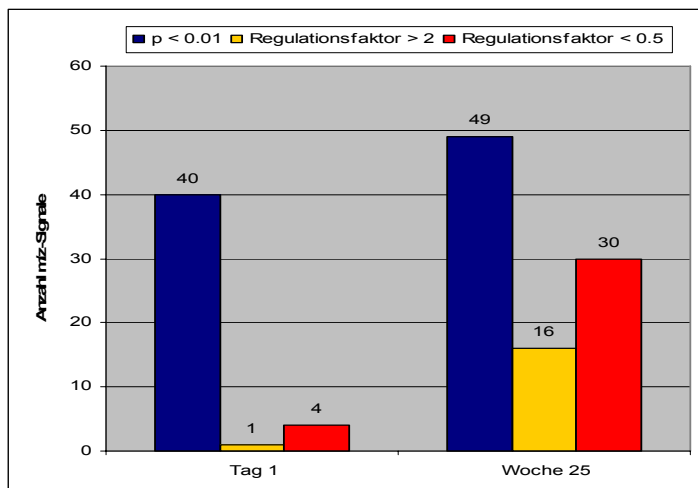


**Abbildung D-33: Proteinprofil eines Leberlysats in vier technischen Replikaten auf einem WCX-Chip (Inkubationsbedingungen pH 4,5).**

Die Präaktivierung der Chipoberfläche erfolgte mit 10 mM HCl, die Inkubation der Proben (Proteinkonzentration 150 µg/ml) in einem Puffersystem bei pH 4,5 (0,1 M Natriumacetat pH 4,5, 0,05% Triton X-100). Auf der y-Achse sind die relativen Signalintensitäten gegen die m/z-Werte auf der x-Achse abgetragen.

## 5.2 Tierstudie 1: Differentielle Analyse der Proteinprofile

Die Analyse der in jeweils acht technischen Replikaten erstellten Proteinprofile der Proben aus Tierstudie 1 lieferte eine Reihe m/z-Signale, die deutliche Intensitätsunterschiede zwischen Kontrollen und behandelten Proben aufwiesen und damit differentiell exprimierte Proteine repräsentierten. Während sich die Anzahl statistisch signifikant deregulierter Proteine ( $p \leq 0,01$ ) zwischen den Proben von Tag 1 und Woche 25 nur wenig unterschied, waren in Woche 25 wesentlich mehr Proteine stark differentiell exprimiert mit Regulationsfaktoren  $\geq 2,0$  und  $\leq 0,5$ . Wie das Diagramm in Abbildung D-34 veranschaulicht, stehen 5 deregulierten Proteinen nach einem Tag NNM-Behandlung 46 in Woche 25 gegenüber.



**Abbildung D-34: Anzahl differenziell exprimierter Proteine in den SELDI-Profilen der Proben von Tag 1 und Woche 25 (Tierstudie 1).**

In Tabelle D-7 sind für beide Studienzeitpunkte die m/z-Werte der Signale, für die beim Vergleich zwischen Spektren der behandelten Proben mit denen der Kontrollen statistisch signifikante Intensitätsveränderungen festgestellt werden konnten, zusammen mit den entsprechenden Regulationsfaktoren aufgeführt. Einige Signale wurden nur in den Proben eines der beiden Zeitpunkte detektiert. Weiterhin konnten manche Signale nur in Spektren von Kontrollen oder nur in denen von behandelten Proben nachgewiesen werden. Die in den Spektren der Proben beider Studienzeitpunkte detektierten Signale wurden im Rahmen der Analyse der Spektren durch den *Biomarker-Wizard* (Kapitel C, Abschnitt 8.3) mit einer tolerierten Abweichung von 0,3% jeweils demselben Massen-Cluster zugeordnet.

**Tabelle D-7: m/z-Signale mit statistisch signifikanten Intensitätsunterschieden zwischen den Spektren von Kontrollen und behandelten Proben von Tag 1 und Woche 25 der Tierstudie 1.**

Zusätzlich sind die resultierenden Regulationsfaktoren angegeben. Alle aufgeführten Werte weisen einen p-Wert  $\leq 0,01$  auf. Rot gekennzeichnete m/z-Werte wurden in mindestens 50% aller Spektren detektiert, schwarz markierte dagegen in weniger als 50%. Blau gekennzeichnete Werte kamen nur in Spektren behandelter Proben vor, grüne nur in denen von Kontrollproben. Bei für beide Zeitpunkte angegebenen Werten wurden die entsprechenden m/z-Werte im Rahmen der Spektren-Analyse vom *Biomarker-Wizard* mit einer tolerierten Abweichung von 0,3% demselben Massen-Cluster zugeordnet.

Tag 1		Woche 25	
m/z	RF	m/z	RF
2545,4	1,3	2549,7	0,4
2593,6	1,3		
3191,8	1,2	3194,3	0,3
		3268,6	-
3353,9	1,6	3356,3	0,8
3369,7	-		
3425,0	1,5	3427,1	0,5
		3497,8	-
		3763,9	-
3836,9	1,4	3840,6	0,4
4017,2	1,7	4019,4	0,5
		4061,5	-
4105,4	1,4	4108,7	0,3
		4414,0	-
4444,7	1,8		
4968,4	0,8	4971,8	0,3
5123,6	1,5	5126,4	0,7
5313,2	0,8		
5405,2	0,8	5408,9	0,5
5485,9	0,8		
5517,1	-	5521,4	0,5
5562,0	2,0	5562,2	0,6
5635,2	0,8	5648,0	0,3
		6177,4	0,3

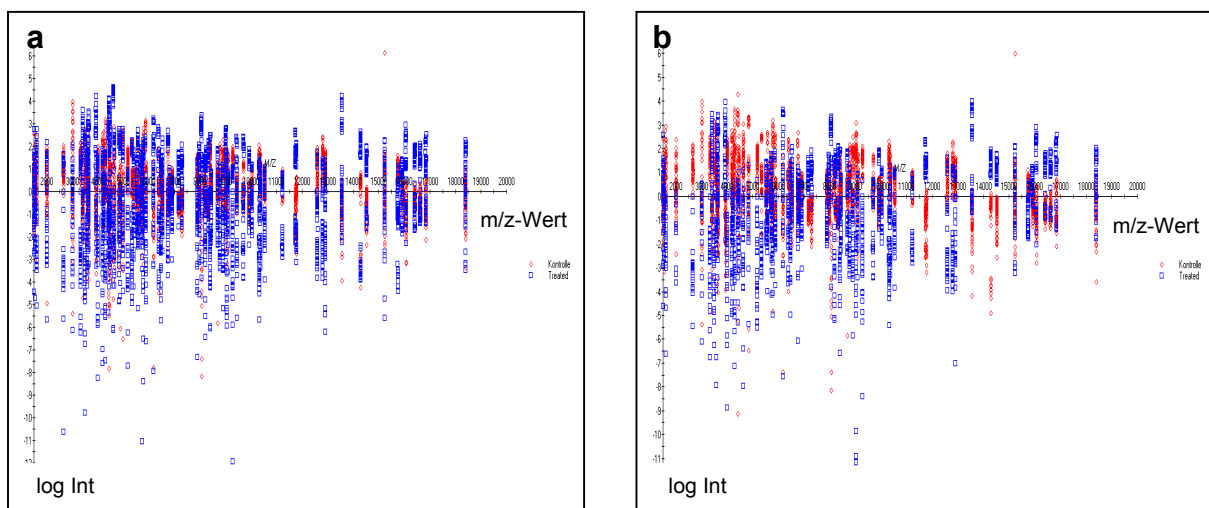
Tag 1		Woche 25	
m/z	RF	m/z	RF
		7602,7	0,4
		7753,8	-
		7894,5	0,6
7881,8	0,7	7923,7	2,5
		8028,1	-
8085,4	0,8	8092,2	0,4
		8128,2	0,7
8121,6	0,8		
8364,7	0,8	8454,8	-
		8569,6	0,4
8697,6	0,8	8703,9	0,4
8925,3	0,7	8931,6	0,3
9167,1	-		
9345,8	1,6		
9663,4	0,7	9669,6	0,8
9936,1	0,8	9944,2	0,4
		9983,2	-
10143,0	0,8	10151,1	0,6
10810,0	0,8	10816,6	0,7
		11310,8	-
		11354,7	-
12129,4	0,8	12137,2	-
12341,6	0,8	12348,7	-
12432,5	0,8		



Tag 1		Woche 25	
m/z	RF	m/z	RF
6220,3	0,8		
6542,9	0,8	6545,9	0,8
6647,9	0,8	6653,5	0,6
		6893,1	-
7018,5	0,8	7014,4	2,2
7159,0	0,9		

Tag 1		Woche 25	
m/z	RF	m/z	RF
		13073,5	-
13769,0	0,8	13779,5	2,7
		13895,6	2,8
13999,9	0,8	14008,4	2,5
		15197,6	0,4
		15503,5	-

Histopathologisch wurden in vier der sechs behandelten Tiere von Woche 25 maligne Lebertumore diagnostiziert (Abschnitt 1.1). Wie bereits zur Auswertung der 2-DE-Gele praktiziert, erfolgte ebenfalls eine verfeinerte Analyse der SELDI-Spektren des Studienendpunktes unter alleiniger Berücksichtigung der Proben mit Lebertumoren. Wie die durch den in die *Software* integrierten *Biomarker-Wizard* generierte Darstellung in Abbildung D-35 zeigt, wurden erst durch die verfeinerte Analyse Spektren der Kontrollgruppe anhand der Unterschiede in den Signalintensitäten von denen der behandelten Gruppe deutlich abgegrenzt. Die Unterschiede waren so deutlich, dass sie zu einer augenscheinlichen Abgrenzung zwischen Kontrollgruppe (rot) und behandelter Gruppe (blau) führten.

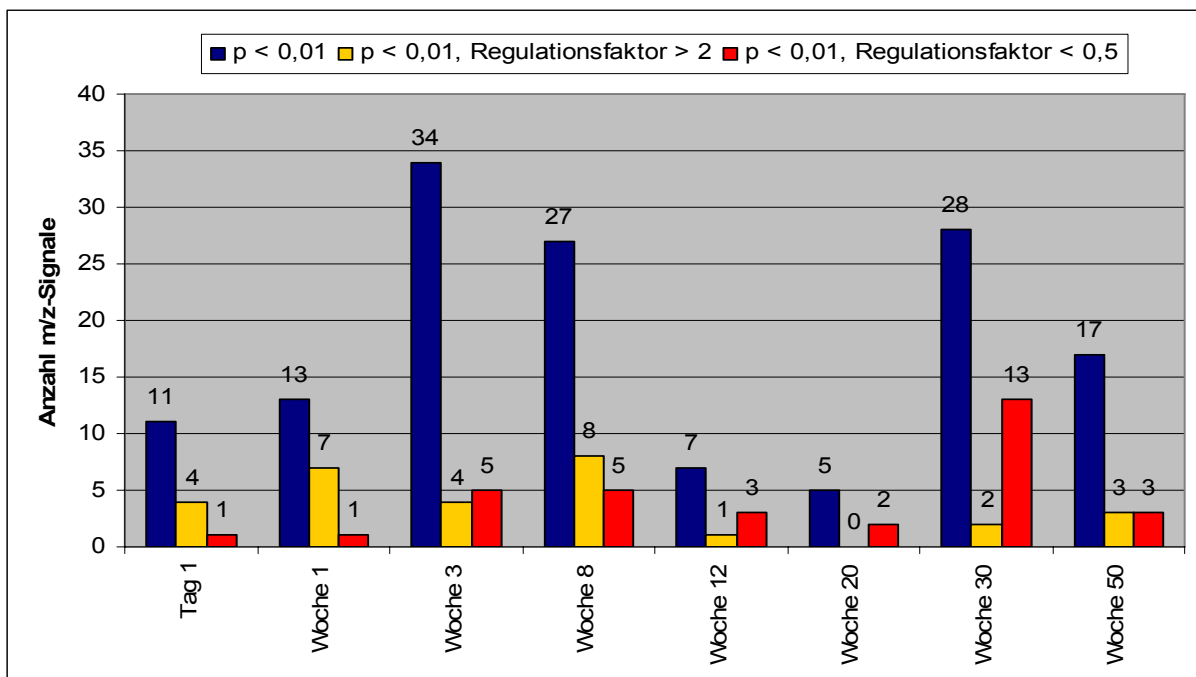


**Abbildung D-35:** Durch den *Biomarker-Wizard* generierte Darstellung der Intensitätswerte aller in den SELDI-Spektren der Proben aus Woche 25 auftretenden Massencluster.

Der Biomarker-Wizard ordnet die detektierten m/z-Werte über alle zu analysierenden Spektren Massen-*Clustern* zu, um die Intensitäten der einzelnen Signale vergleichen zu können (C, 8.3). Auf der y-Achse ist die Signalintensität halblogarithmisch aufgetragen, auf der x-Achse die m/z-Werte der einzelnen Massen-*Cluster*. Blau dargestellt sind die Intensitätswerte von behandelten Proben, rot die von Kontrollen. (a) Die Spektren aller Proben sind in der Analyse berücksichtigt. (b) Bei alleiniger Betrachtung der Proben mit Tumoren grenzen sich die Proteinprofile der Kontrollen deutlich von denen der behandelten Proben ab.

### 5.3 Tierstudie 2: Differentielle Analyse der Proteinprofile

Die Analyse der in jeweils vier technischen Replikaten erstellten Proteinprofile der Proben aller Zeitpunkte aus Tierstudie 2 zeigte ähnlich dem in der Auswertung der 2-DE-Gele beobachteten Verlauf einen Anstieg der Anzahl von Signalen, die statistisch signifikante Intensitätsunterschiede zwischen den Spektren von Kontrollen und behandelten Proben zeigten. Wie das Diagramm in Abbildung D-34 veranschaulicht, wurde ein Maximum der durch die Signale repräsentierten differentiell exprimierten Proteine in den Proben der Wochen 3 und 8 erreicht. Danach fiel die Anzahl deregulierter Proteine rapide ab. Erst zu den späten Zeitpunkten in den Wochen 30 und 50 war wieder ein Anstieg zu verzeichnen. Ebenfalls korrelierend zu den 2-DE-Ergebnissen konnten im Vergleich zu relativ vielen statistisch signifikanten Expressionsveränderungen mit p-Werten  $\leq 0,01$  kaum wirklich stark deregulierte Proteine mit Regulationsfaktoren  $\geq 2$  oder  $\leq 0,5$  detektiert werden. Tabelle I-7 im Anhang zeigt die mit statistisch signifikanten Intensitätsunterschieden detektierten m/z-Signale aller Studienzeitpunkte.



**Abbildung D-36: Tierstudie 2: Anzahl differentiell exprimierter Proteine in den SELDI-Profilen der Proben aller Studienzeitpunkte.**

Ein Maximum der Anzahl deregulierter Proteine (bzw. m/z-Signale mit statistisch signifikanten Intensitätsunterschieden zwischen den Spektren von Kontrollen und behandelten Proben des jeweiligen Studienzeitpunkts) wurde in den Proben der Wochen 3 und 8 erreicht. Nach einem dann folgenden rapiden Rückgang deregulierter Proteine war in den Spektren der Proben von Woche 30 und 50 wieder ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen.

## **6 Ansätze zur Identifizierung von Proteinen, repräsentiert durch Signale in SELDI-Spektren**

Die durch SELDI-MS erstellten Proteinprofile der Leberproben lieferten im Massenbereich von 4 bis etwa 25 kDa zahlreiche m/z-Signale, deren Signalintensitäten sich unter dem Einfluss der NNM-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollproben signifikant änderten (Abschnitt 5.2 und 5.3). Da in das SELDI-System keine Möglichkeiten zur Fragmentierung von Ionen und damit zur weiteren Analyse integriert sind, war eine direkte Identifizierung der in den detektierten Signalen repräsentierten differentiell exprimierten Proteine nicht möglich. Auch wenn das System mittlerweile mit Hochleistungs-Massenspektrometern gekoppelt werden kann, beschränkt sich der Massenbereich für die Fragmentierung immer noch auf maximal 4 kDa. Deshalb wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit andere Methoden herangezogen, entwickelt und optimiert, die letztlich eine Protein-Identifizierung der Signale von Interesse über Umwege ermöglichen sollten. Das Schema in Abbildung D-39 fasst die in den beiden folgenden Abschnitten beschriebenen eingesetzten Methoden und deren Kombinationen vereinfacht zusammen.

### **6.1 Chromatographische Trennung zur Identifizierung von Proteinen aus SELDI-Signalen**

Zur Verringerung der Probenkomplexität wurden chromatographische Trennungen vorgenommen. Dabei kam zunächst eine zweidimensionale Separation mittels Kationenaustausch-, gefolgt von Umkehrphasenchromatographie zum Einsatz (Kapitel C, Abschnitt 7.1). Abbildung D-37 zeigt das Chromatogramm nach Auftrennung eines Leberlysats (Proteinextraktion nach dem Protokoll der kompletten Extraktion, Kapitel C, Abschnitt 3.1) auf der Ionentauschersäule mit einem 10-stufigen Gradienten. Neun der gesammelten Fraktionen wurden anschließend auf der Umkehrphasensäule weiter separiert. Die übereinandergelagerten Chromatogramme dieser neun Läufe in Abbildung D-38 verdeutlichen, dass kaum eine Trennung des komplexen Proteingemisches stattgefunden hat.

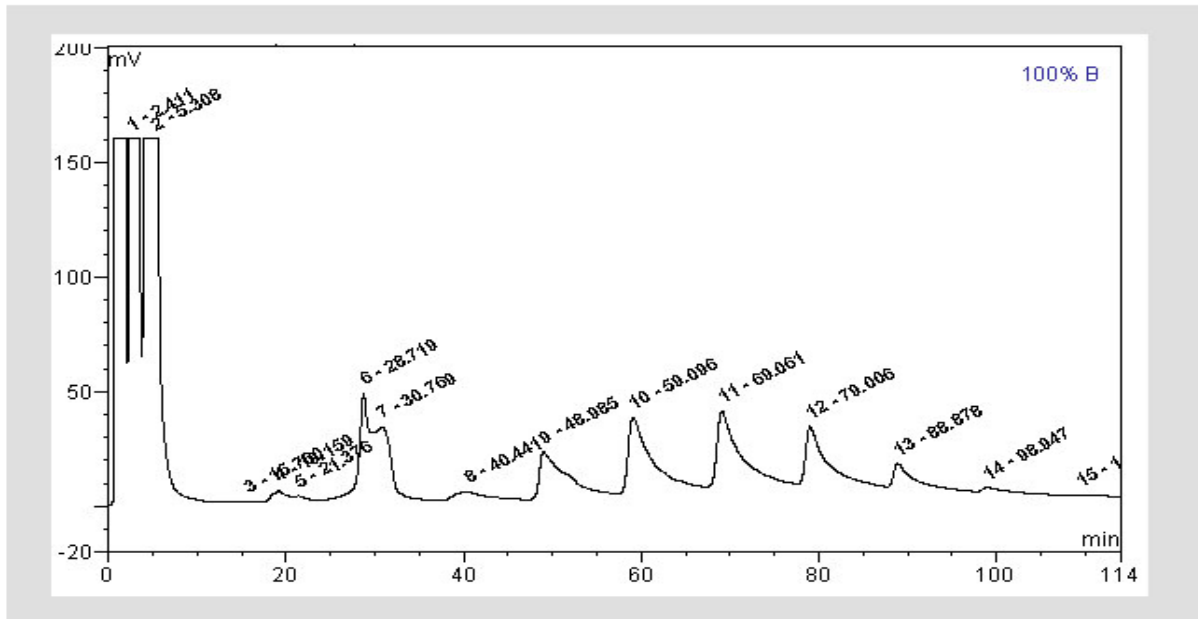
Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass in den SELDI-Profilen vorrangig niedermassige Proteine im Molekulargewichtsbereich von 3 bis 25 kDa detektiert werden, erschien eine Anreicherung von kleineren Proteinen mittels Gelfiltration

---

sinnvoll (C, Abschnitt 7.2). Die erfolgreiche Separation der Leberproben nach Größe der Proteine wurde bereits im Kapitel 4.2 beschrieben. Im Vergleich zur zweidimensionalen Chromatographie zeigte sie eine verbesserte Trennung. Im Hinblick auf die erwünschte Korrelation einzelner angereicherter Proteine mit SELDI-Ionensignalen erschien diese Methode zudem zielführender, da speziell Fraktionen mit kleineren Proteinen zur weiteren Analyse ausgewählt werden konnten.

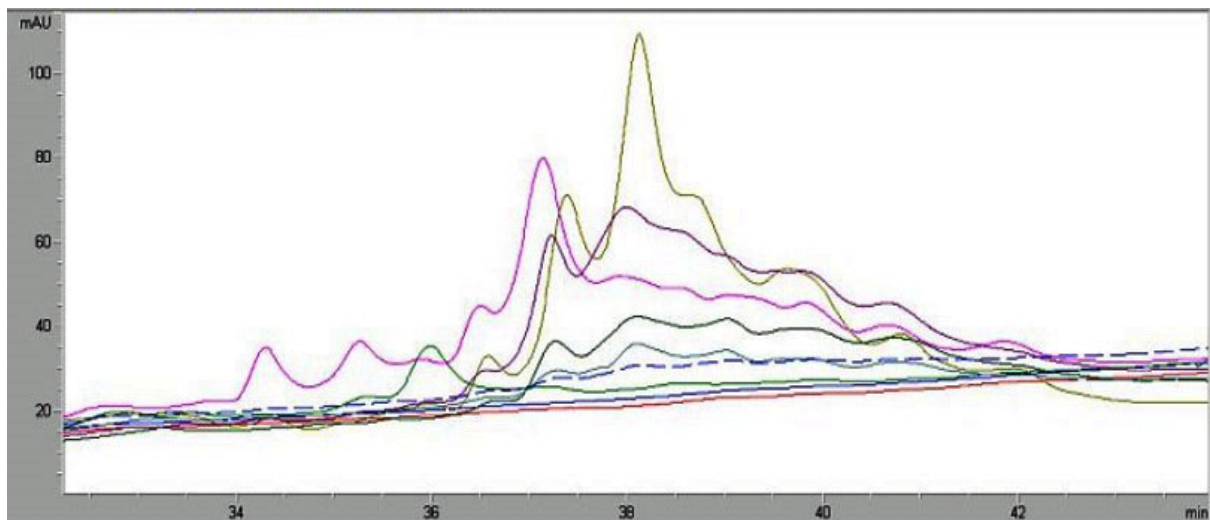
Unabhängig von der gewählten chromatographischen Trennmethode schlossen sich unterschiedliche Vorgehensweisen zur Protein-Identifizierung an (Abbildung D-39). Von den jeweiligen Fraktionen wurde zunächst ein Verdau der enthaltenen Proteine in Lösung (Kapitel C, Abschnitt 6.1.2) vorgenommen, bevor die massenspektrometrische Identifizierung möglichst vieler der verdauten Proteine erfolgte. Parallel wurden von den in den Fraktionen enthaltenen Proteinen SELDI-Profile erstellt (Kapitel C, Abschnitt 8.1.1), um die  $m/z$ -Werte der detektierten Signale mit dem nach MALDI-MS und Datenbanksuche erhaltenen Molekulargewicht der identifizierten Proteine zu korrelieren. Die Auftrennung der chromatographisch generierten Fraktionen mittels SDS-PAGE, gefolgt vom Verdau und der massenspektrometrischen Identifizierung der Proteine in spezifischen Gel-Banden oder *Spots*, lieferte eine weitere Möglichkeit zum Abgleich des durch Datenbanksuche erhaltenen theoretischen Molekulargewichts mit den tatsächlich detektierten  $m/z$ -Werten in den SELDI-Spektren der Fraktionen (Abbildung D-39).

Nach Evaluierung der oben beschriebenen Verfahren zur Auftrennung der komplexen Proteingemische sowie zur Identifizierung der durch die SELDI-Signale repräsentierten Proteine, wurde ein weiterer im folgenden Abschnitt beschriebener methodischer Ansatz verfolgt.



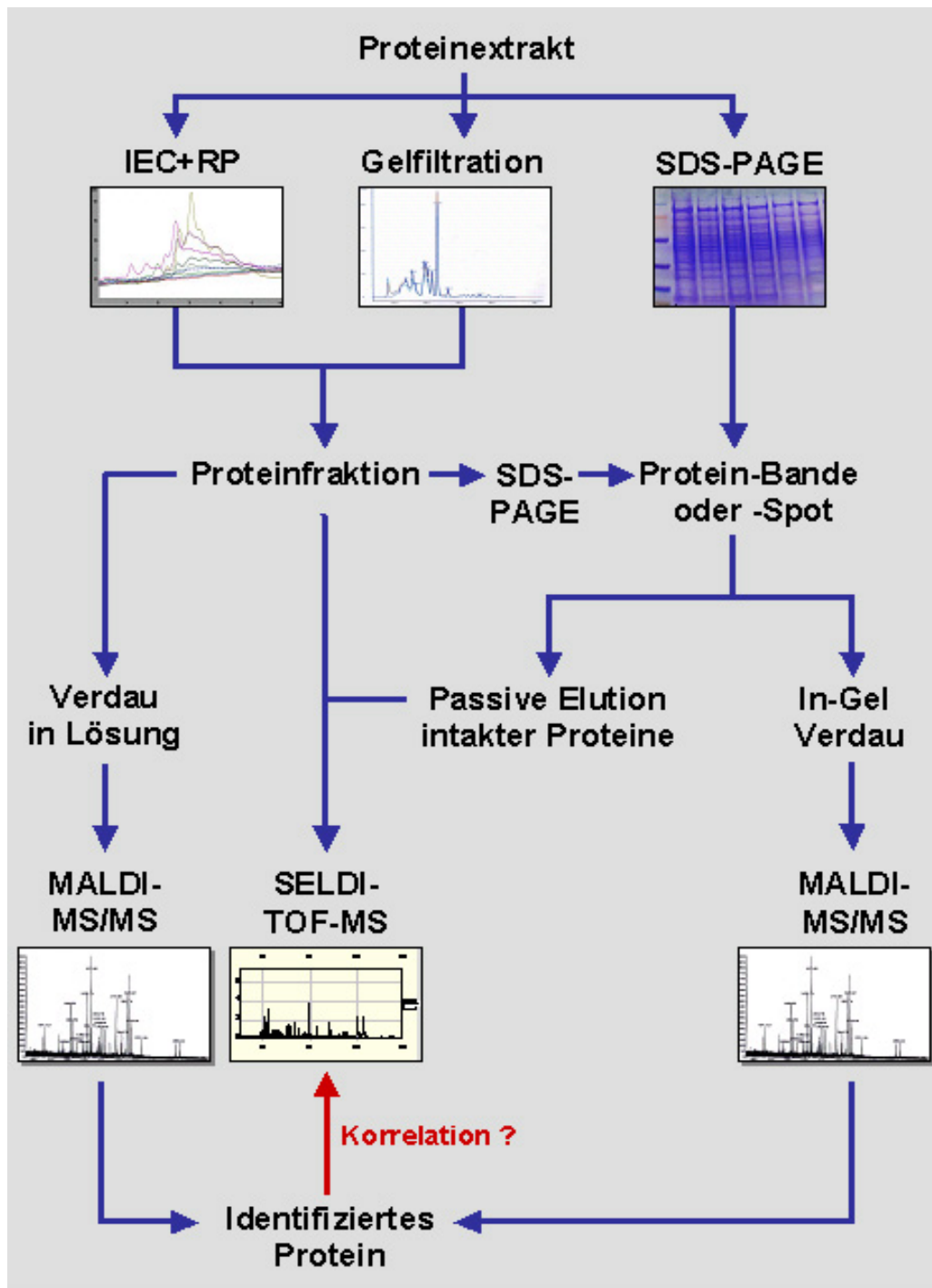
**Abbildung D-37: Kationenaustausch-Chromatogramm nach Auftrennung eines Leberlysats.**

**HPLC-System:** Jasco 1580 (Dionex); **Säule:** Resource S 1 ml (Amersham); **Probe:** Rattenleberextrakt (komplette Extraktion) 0,5 mg/ml; **Probenvolumen:** 2 ml; **Laufmittel A:** 0,025 M Natriumacetat pH 4,5, 8 M Harnstoff, **Laufmittel B:** 0,025 M Natriumacetat pH 4,5, 8 M Harnstoff, 1 M NaCl; **Flussrate:** 1,0 ml/min, RT; **Detektion:**  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ; **Fraktionierung:** manuell nach Retentionszeiten der Signale (9 Hauptfraktionen).



**Abbildung D-38: Übereinandergelagerte Umkehrphasen-Chromatogramme der Auftrennung der durch Ionenaustauschchromatographie erhaltenen neun Fraktionen.**

**HPLC-System:** HP 1090 II (Agilent); **Säule:** Säule Resource RPC 3 ml (Amersham); **Proben:** Fraktionen des mittels Ionenaustauschchromatographie getrennten Lysats; **Probenvolumen:** 1-2 ml; **Laufmittel A:** 0,05% TFA in Aqua purificata; **Laufmittel B:** 0,065% TFA in ACN; **Flussrate:** 1,0 ml/min, RT; **Detektion:**  $\lambda = 220 \text{ nm}$ ; **Fraktionierung:** manuell nach Retentionszeiten der Signale



**Abbildung D-39: Schematische Darstellung der eingesetzten Methoden zur Identifizierung von Proteinen, abgebildet in SELDI-Signalen.**

Die kompletten Proteinextrakte wurden über 1D- oder 2D-SDS-PAGE, mittels Gelfiltration oder 2D-Chromatographie aufgetrennt. Die Proteine in den nach chromatographischer Separation gewonnenen Fraktionen wurden verdaut und mittels MALDI-MS/MS-Analyse identifiziert, um das nach Datenbanksuche erhaltene theoretische Molekulargewicht (MW) mit den Signalen im SELDI-Spektrum der Fraktionen zu korrelieren. In einem alternativen Ansatz wurden die Proteinfraktionen mittels SDS-PAGE weiter aufgetrennt und die Proteine aus spezifischen Banden oder Spots eluiert. Dieser Weg wurde auch für die elektrophoretisch separierten Gesamtproteinextrakte beschriftet. Die eluierten Proteine wurden dann einerseits mittels SELDI detektiert, andererseits erfolgte aus den nach passiver Elution verbleibenden Gelstücken nach enzymatischer Spaltung die Identifizierung des jeweiligen Proteins mittels MALDI-MS. Dies ermöglichte die direkte Korrelation des theoretischen Molekulargewichts mit dem m/z-Wert des im SELDI-Spektrum detektierten Signals.

## 6.2 Elution von intakten Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen

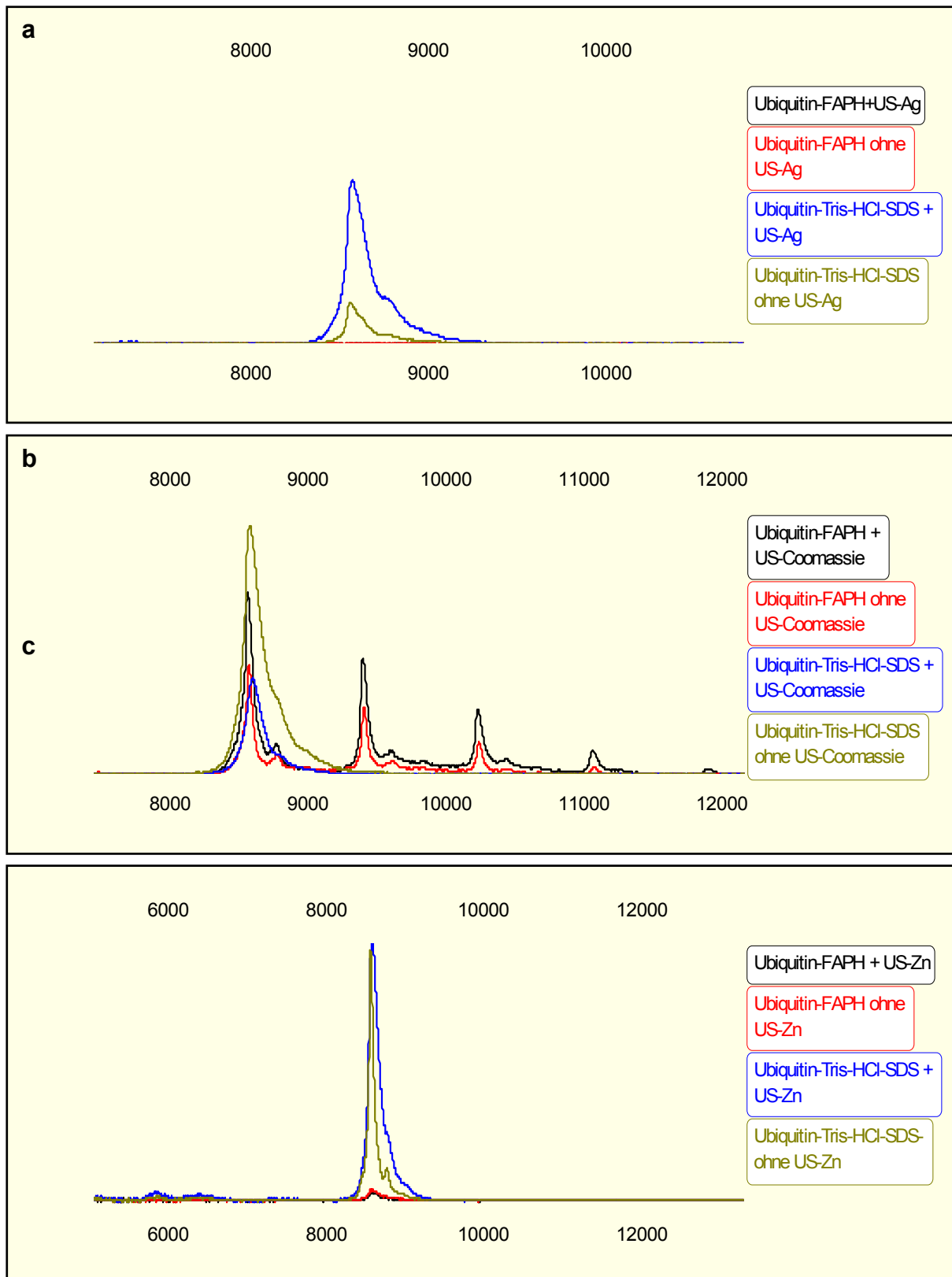
Ein vielversprechender Ansatz zur Identifizierung der in den SELDI-Signalen dargestellten Proteine ergab sich aus der passiven Elution von intakten Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen (Abbildung D-39). Das Protokoll hierzu wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit etabliert. Komplette Leberextrakte oder deren chromatographisch getrennte Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE weiter separiert und die Proteine ohne vorangegangene enzymatische Spaltung aus spezifischen Gel-Banden oder *Spots* eluiert. Anschließend wurde durch SELDI-TOF-MS der  $m/z$ -Wert des jeweiligen eluierten und ionisierten Proteins detektiert, während der im Gel verbleibende Anteil des Proteins verdaut und durch MALDI-MS identifiziert wurde. Dadurch war aus derselben Gel-Bande oder aus demselben *Spot* eine direkte Korrelation des nach Datenbanksuche erhaltenen Molekulargewichts des identifizierten Proteins mit dem detektierten  $m/z$ -Wert im SELDI-Spektrum möglich.

Zur Etablierung der geeigneten Methode zur passiven Elution von intakten Proteinen wurden zunächst einige Standardproteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit unterschiedlichen Färbemethoden (Silber, kolloidales Coomassie oder Zink) visualisiert. Dabei durfte die Färbung nicht mit einem Fixierungsschritt verbunden sein, da sich sonst die Proteine nicht mehr aus dem Gel eluieren ließen. Die eigentliche passive Elution aus den unterschiedlich gefärbten Gelen erfolgte entweder mit Elutionslösung 1 (FAPH) oder 2 (Tris-HCl-SDS pH 6,8), jeweils mit oder ohne 60 min Inkubation im Ultraschallbad (Kapitel C, Abschnitt 10). Durch Vermessung der erhaltenen Eluate auf einem Gold-Chip im *ProteinChip Reader* wurden die  $m/z$ -Werte der ionisierten Proteine detektiert. Die Abbildungen D-40, D-41 und D-42 zeigen die SELDI-Spektren der jeweiligen im Gel unterschiedlich angefärbten und nach leicht variierenden Verfahren eluierten Standardproteine. Die Diagramme in der Abbildung D-43 verdeutlichen die relative Intensität der detektierten Signale. Insgesamt wurden die größten Signalintensitäten nach Anwendung der Elutionsmethode mit Tris-HCl-SDS-Puffer bei pH 6,8 erreicht. Dies steht im Gegensatz zur gängigen Meinung in Publikationen, in denen meist die Verwendung von FAPH als Elutionslösung beschrieben ist (Galvani, 2000, Ehring, 1997, Cohen und Chait, 1997). Die effektivste Elution der Standardproteine wurde nach deren Visualisierung mit Zink erreicht, gefolgt von der Färbung mit Coomassie und Silber. Im Spektrum des mit Coomassie gefärbten Ubiquitins (Abbildung D-40b) wurden zusätzlich zum Signal des einfach positiv geladenen Proteins Addukte von

Ubiquitin mit Coomassie detektiert. Ein signifikanter Einfluss der Ultraschallbehandlung auf das Elutionsverhalten der Proteine konnte nicht beobachtet werden. Allerdings wurde eine Abnahme der Signalintensitäten der eluierten Proteine mit steigendem Molekulargewicht offensichtlich, was die Annahme bestätigt, dass sich kleinere Proteine effektiver aus der Polyacrylamid-Gelmatrix eluieren lassen.

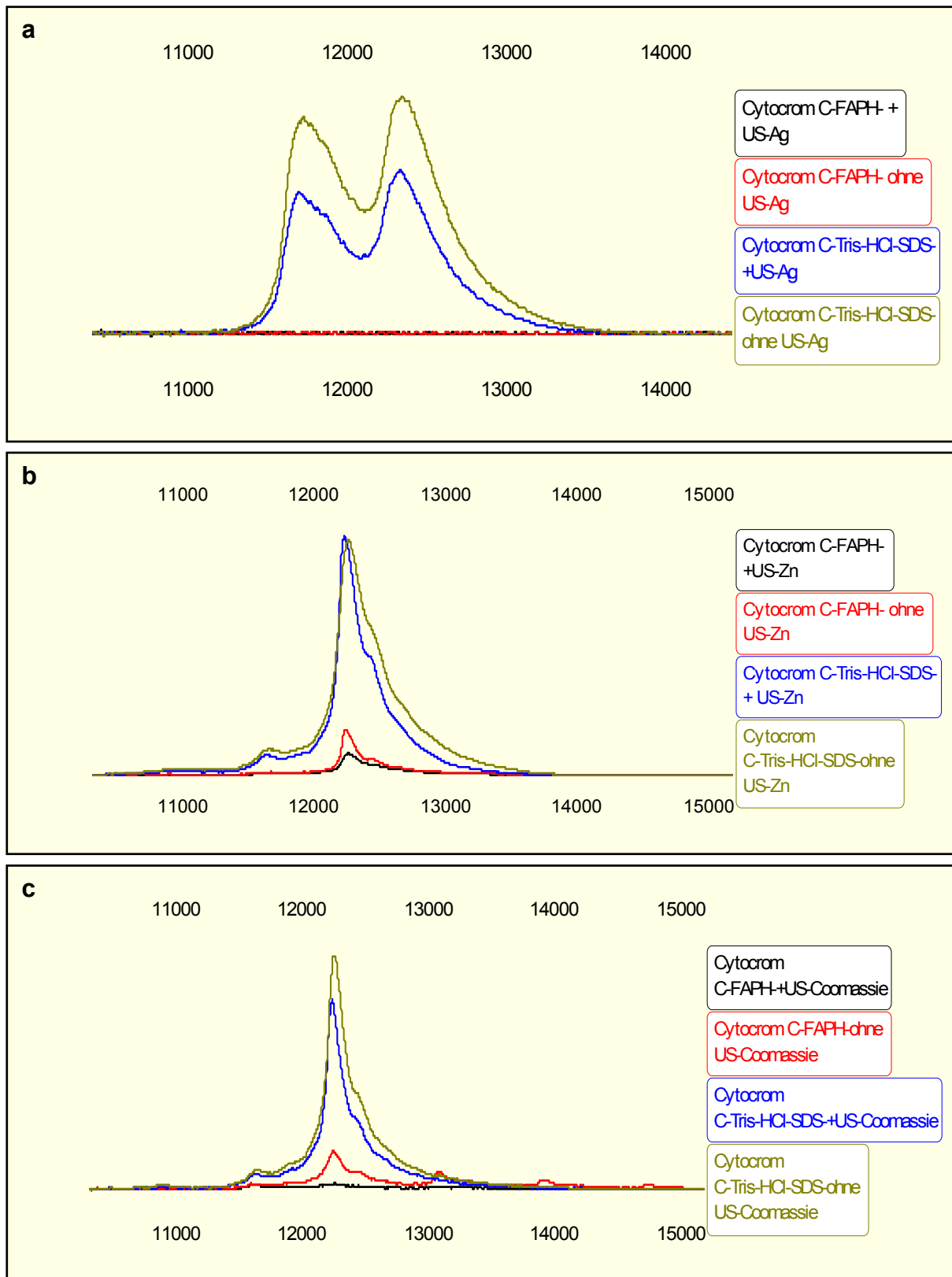
Auch wenn die Ergebnisse zeigen, dass sich die Färbung von Proteinen mit Zink für nachfolgende Elutionsverfahren am besten eignete, so bleibt doch festzuhalten, dass mit dieser Methode der Negativfärbung detektierte Proteine im Gel zum einen schnell nachfärben und zum anderen für das menschliche Auge vor einem dunklen Hintergrund nur schwer zu erkennen sind. Aus Gründen der Praktikabilität kamen daher für die Elution von unbekanntem Proteinen vorrangig Silber- und Coomassie-Färbung zum Einsatz.





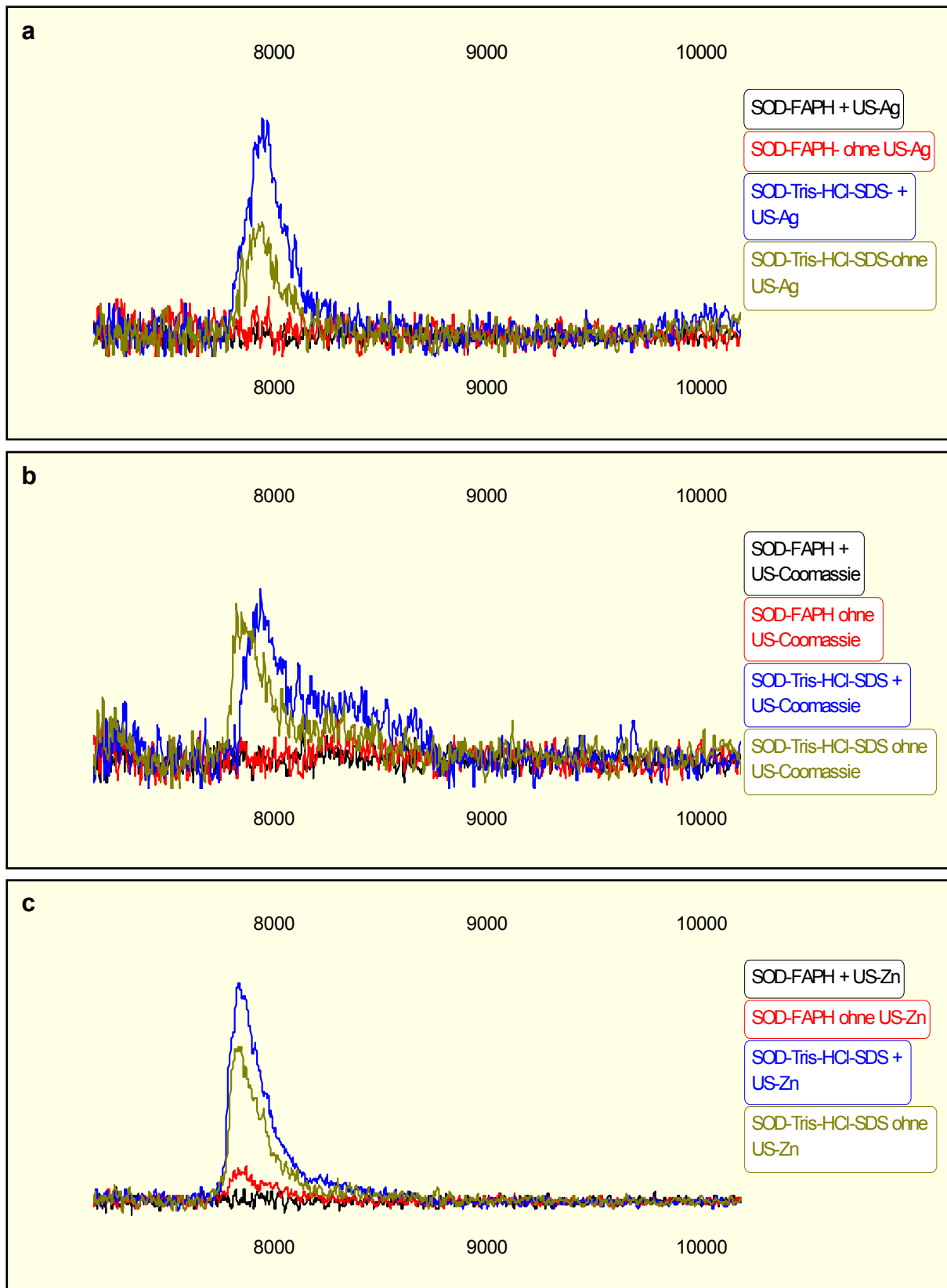
**Abbildung D-40: Detektion von ionisiertem Ubiquitin im SELDI-Spektrum nach passiver Elution aus SDS-PAGE-Gelen unter Variation der Elutionsmethoden.**

Die Elution erfolgte mit FAPH + Ultraschallbehandlung (US) (schwarze Signale), mit FAPH ohne US (rote Signale), mit Tris-HCl-SDS (pH 6,8) + US (blaue Signale) oder mit Tris-HCl-SDS (pH 6,8) ohne US (grüne Signale) jeweils aus einem mit (a) Silber (b) kolloidalem Coomassie und (c) Zink gefärbten Gel. Im Fall der Coomassie-Färbung wurden zusätzlich zum Signal des einfach positiv geladenen Standardproteins dessen Addukte mit Coomassie detektiert.



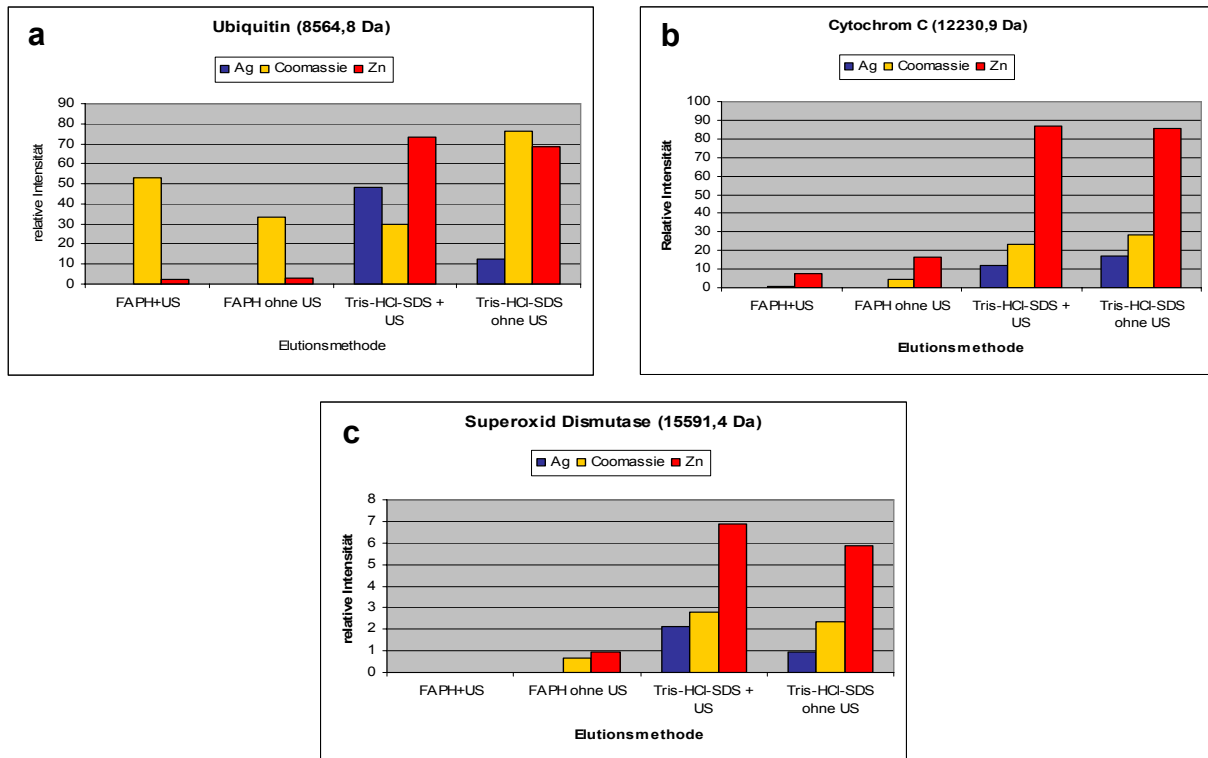
**Abbildung D-41: Detektion von ionisiertem Cytochrom C im SELDI-Spektrum nach passiver Elution aus SDS-PAGE-Gelen unter Variation der Elutionsmethoden.**

Die Elution erfolgte mit FAPH + Ultraschallbehandlung (US) (schwarze Signale), mit FAPH ohne US (rote Signale), mit Tris-HCl-SDS (pH 6,8) + US (blaue Signale) oder mit Tris-HCl-SDS (pH 6,8) ohne US (grüne Signale) jeweils aus einem mit (a) Silber (b) kolloidalem Coomassie und (c) Zink gefärbten Gel.



**Abbildung D-42: Detektion von ionisierter Superoxid Dismutase im SELDI-Spektrum nach passiver Elution aus SDS-PAGE-Gelen unter Variation der Elutionsmethoden.**

Die Elution erfolgte mit FAPH + Ultraschallbehandlung (US) (schwarze Signale), mit FAPH ohne US (rote Signale), mit Tris-HCl-SDS (pH 6,8) + US (blaue Signale) oder mit Tris-HCl-SDS (pH 6,8) ohne US (grüne Signale) jeweils aus einem mit (a) Silber (b) kolloidalem Coomassie und (c) Zink gefärbten Gel.



**Abbildung D-43: Relative Signalintensitäten ionisierter Standardproteine im SELDI-Spektrum in Abhängigkeit von der Elutionsmethode.**

Relative Signalintensitäten nach Elution von (a) Ubiquitin, (b) Cytochrom C und (c) Superoxid Dismutase aus Gelen, gefärbt mit Silber (Ag, blau), Coomassie (gelb) oder Zink (Zn, rot). Die Signalintensitäten variierten in Abhängigkeit vom eingesetzten Elutionsverfahren (FAPH oder Tris-HCl-SDS pH 6,8 jeweils mit oder ohne Ultraschall-Behandlung (US)). Die höchsten Intensitäten wurden nach Elution mit Tris-HCl-SDS pH 6,8 aus Zn- und Ag-gefärbten Gelen erreicht.

Tabelle D-8 a bis c listet die nach den unterschiedlichen Färbe- und Elutionsmethoden im SELDI-Spektrum detektierten mittleren m/z-Werte der einfach oder zweifach positiv geladenen Ionen der Proteine. Dabei konnten Abweichungen im Bereich von 0,2% vom tatsächlichen Molekulargewicht beobachtet werden. In Einzelfällen, vor allem nach Elution der Proteine aus Silber-gefärbten Gelen lagen die Abweichungen allerdings auch höher.

**Tabelle D-8: Im SELDI-Spektrum detektierte mittlere m/z-Werte nach Elution von unterschiedlich gefärbten Standardproteinen aus SDS-PAGE-Gelen.**

Detektierte m/z-Werte nach Elution von (a) Ubiquitin, (b) Cytochrom C und (c) Superoxid Dismutase aus SDS-Polyacrylamidgelen. Berücksichtigt ist die prozentuale Abweichung des Werts vom tatsächlichen Molekulargewicht.

<b>a Ubiquitin (M= 8564,8 Da)</b>		
<b>Färbemethode</b>	<b>m/z</b>	<b>Abweichung [%]</b>
Silber	4287,6	0,10
	8567,9	0,02
Coomassie	4295,3	0,28
	8576,4	0,12
Zink	4291,0	0,18
	8580,5	0,17

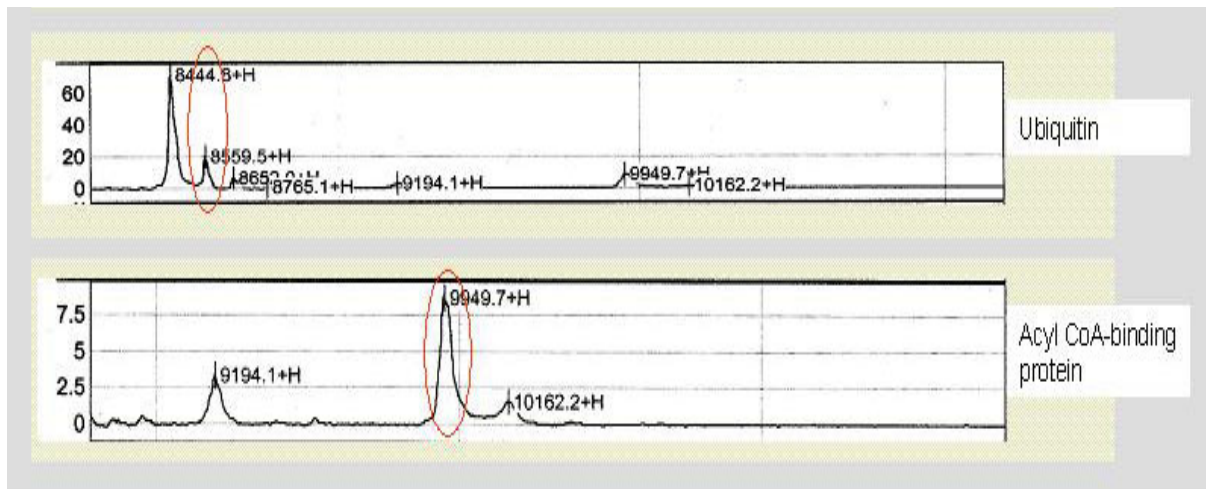
<b>b Cytochrom C (M= 12230,9 Da)</b>		
<b>Färbemethode</b>	<b>m/z</b>	<b>Abweichung [%]</b>
Silber	6171,2	0,90
	12339,8	0,88
Coomassie	6130,7	0,23
	12252,2	0,17
Zink	6130,2	0,22
	12252,9	0,17

<b>c Superoxid Dismutase M= 15591,4 Da</b>		
<b>Färbemethode</b>	<b>m/z</b>	<b>Abweichung [%]</b>
Silber	7944,3	1,89
	15855,8	1,69
Coomassie	7824,7	0,36
	15738,4	0,94
Zink	7834,2	0,48
	15346,2	1,58

### 6.3 Korrelation von identifizierten Proteinen mit SELDI-Signalen

Ziel des Einsatzes der beschriebenen Methoden und deren Kombinationen war die Identifizierung von im SELDI-Spektrum durch spezifische Ionensignale repräsentierten Proteinen. Die Verbindung von zweidimensionaler HPLC als Maßnahme zur Reduktion der Probenkomplexität mit der massenspektrometrischen Analyse der in den gesammelten Fraktionen enthaltenen Proteine führte zu einer Reihe von Identifizierungen. Dabei wurden die Proteine der Fraktionen entweder direkt in Lösung enzymatisch gespalten oder erst nach weiterer SDS-PAGE-Auftrennung im Gel trypsinisiert und nachfolgend identifiziert. Unter den identifizierten Proteinen war lediglich für Acyl-CoA Bindeprotein, Ubiquitin und 10 kDa Hitzeschockprotein eine Korrelation des nach Datenbanksuche erhaltenen theoretischen Molekulargewichts mit den m/z-Werten in den SELDI-Profilen der Fraktionen möglich (Abbildung D-44). Allerdings bleibt festzuhalten, dass das

theoretische Molekulargewicht nicht zwangsläufig dem tatsächlichen entsprechen muss.



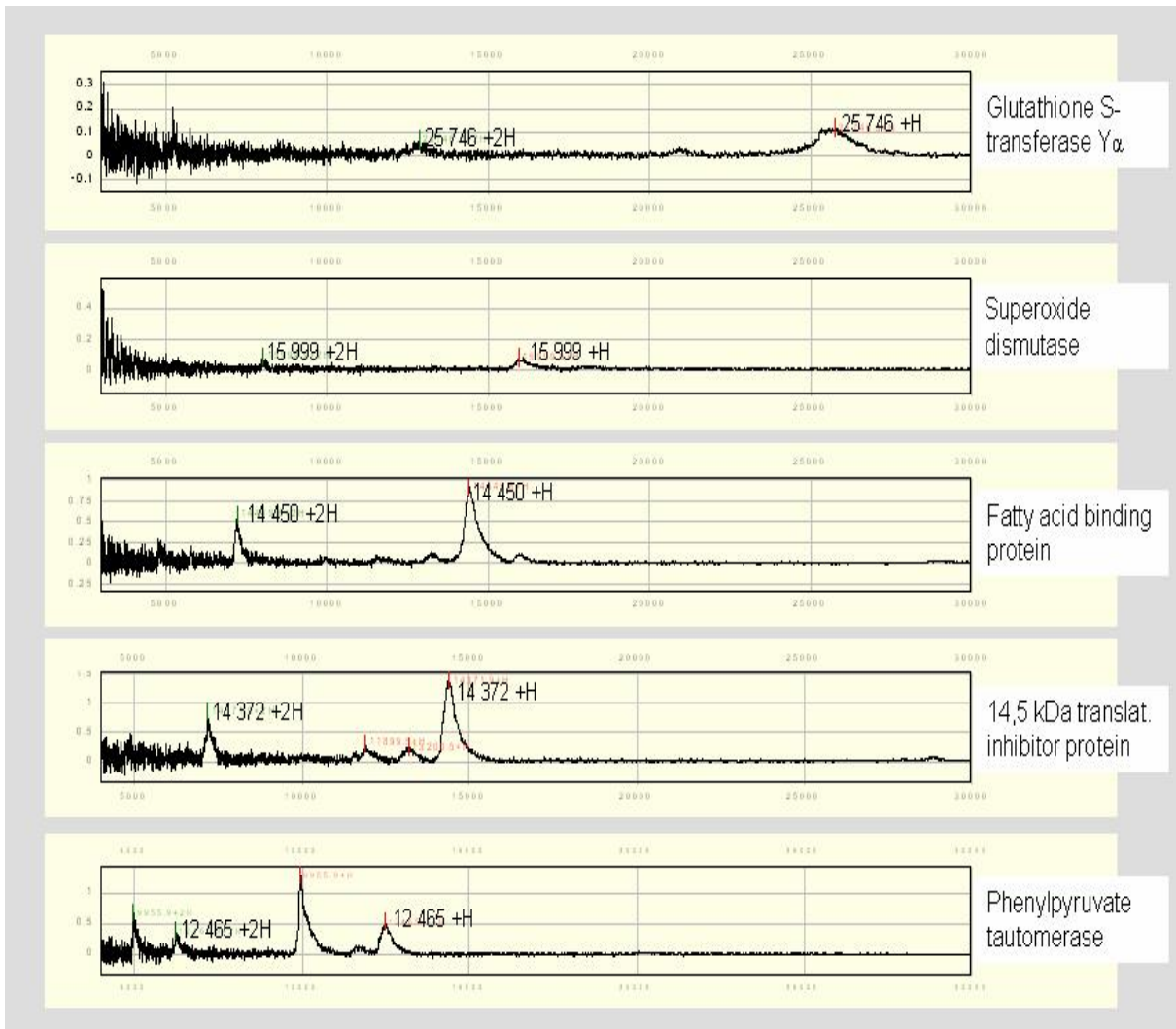
**Abbildung D-44: SELDI-Spektren (WCX-Chips) von Fraktionen chromatographisch aufgetrennter Leberlysate.**

Die Proteinextrakte wurden mittels 2D-Chromatographie (Kapitel C, Abschnitt 5.2) separiert und fraktioniert. Die Identifizierung der in den Fraktionen enthaltenen Proteine erfolgte durch MALDI-MS/MS-Analysen. Das Molekulargewicht einiger der identifizierten Proteine konnte mit einzelnen Signalen in den SELDI-Spektren der Fraktionen korreliert werden (markierte Signale).

Weitaus mehr Proteine konnten nach passiver Elution der intakten Proteine aus SDS-PAGE-Gelen massenspektrometrisch identifiziert und den entsprechenden m/z-Werten im SELDI-Profil des jeweiligen Eluats zugeordnet werden. Dies lässt sich vor allem darauf zurückführen, dass jeweils nur ein einzelnes Protein eluiert wurde, das nachfolgend sowohl im SELDI-Spektrum detektiert wie auch tryptisch gespalten und durch MALDI-MS identifiziert wurde. Daher war eine eindeutige Korrelation zwischen dem m/z-Wert im SELDI-Profil und dem theoretischen Molekulargewicht möglich. Einige exemplarisch ausgewählte SELDI-Spektren von eluierten und identifizierten Proteinen sind in Abbildung D-45 dargestellt. Tabelle D-9 fasst alle Proteine, die durch Einsatz der unterschiedlichen etablierten Methoden und deren Kombinationen identifiziert werden konnten, zusammen. In Tabelle I-8 des Anhangs sind darüber hinaus Detailangaben zu den Protein-Scores und MS/MS-Sequenzen aufgeführt.

**Tabelle D-9: Zusammenfassung identifizierter Proteine, deren Molekulargewichte spezifischen Signalen in SELDI-Spektren zugeordnet werden konnten.**

Protein	MW (Da)	Strategie zur Identifizierung
10 kDa heat shock protein	10 764	2D-HPLC zur Fraktionierung; Identifizierung aus Bande eines 1-DE-Gels der Fraktionen
Ubiquitin	8 560	2D-HPLC zur Fraktionierung; Identifizierung nach Verdau in Lösung
Acyl-CoA-binding protein	9 890	
Hemoglobin $\alpha$ und $\beta$	15 188 15 838	
Hemoglobin $\alpha$ und $\beta$	15 188 15 838	Passive Elution (Tris-HCl-SDS) aus 2-DE-Gel eines Gesamtlysats (Zinkfärbung)
Superoxide dismutase	15 942	
Phosphatidylethanolamine-binding protein	20 771	
Superoxide dismutase	15 942	Passive Elution (Tris-HCl-SDS) aus 2-DE-Gel eines Gesamtlysats (Silberfärbung)
Cytochrome b5	15 101	
CCG1-interacting factor B	22 551	
Superoxide dismutase	15 942	Passive Elution (Tris-HCl-SDS) aus 1-DE-Gel eines Gesamtlysats (Silber- oder Coomassiefärbung)
Fatty acid-binding protein	14 320	
Glutathione S-transferase Yb-1	25 766	
Glutathione S-transferase Yc-1	25 172	
Actin	41 765	
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	35 682	
Nuclease precursor	28 927	
Superoxide dismutase	15 942	Gelfiltration zur Fraktionierung; passive Elution (Tris-HCl-SDS) aus 1-DE-Gel der Fraktionen (Silberfärbung)
Fatty acid-binding protein	14 320	
Glutathione-S-transferase Y $\alpha$	25 360	
Catechol O-methyltransferase	24 960	
14.5 kDa translational inhibitor protein	14 352	
Phenylpyruvate tautomerase	12 612	



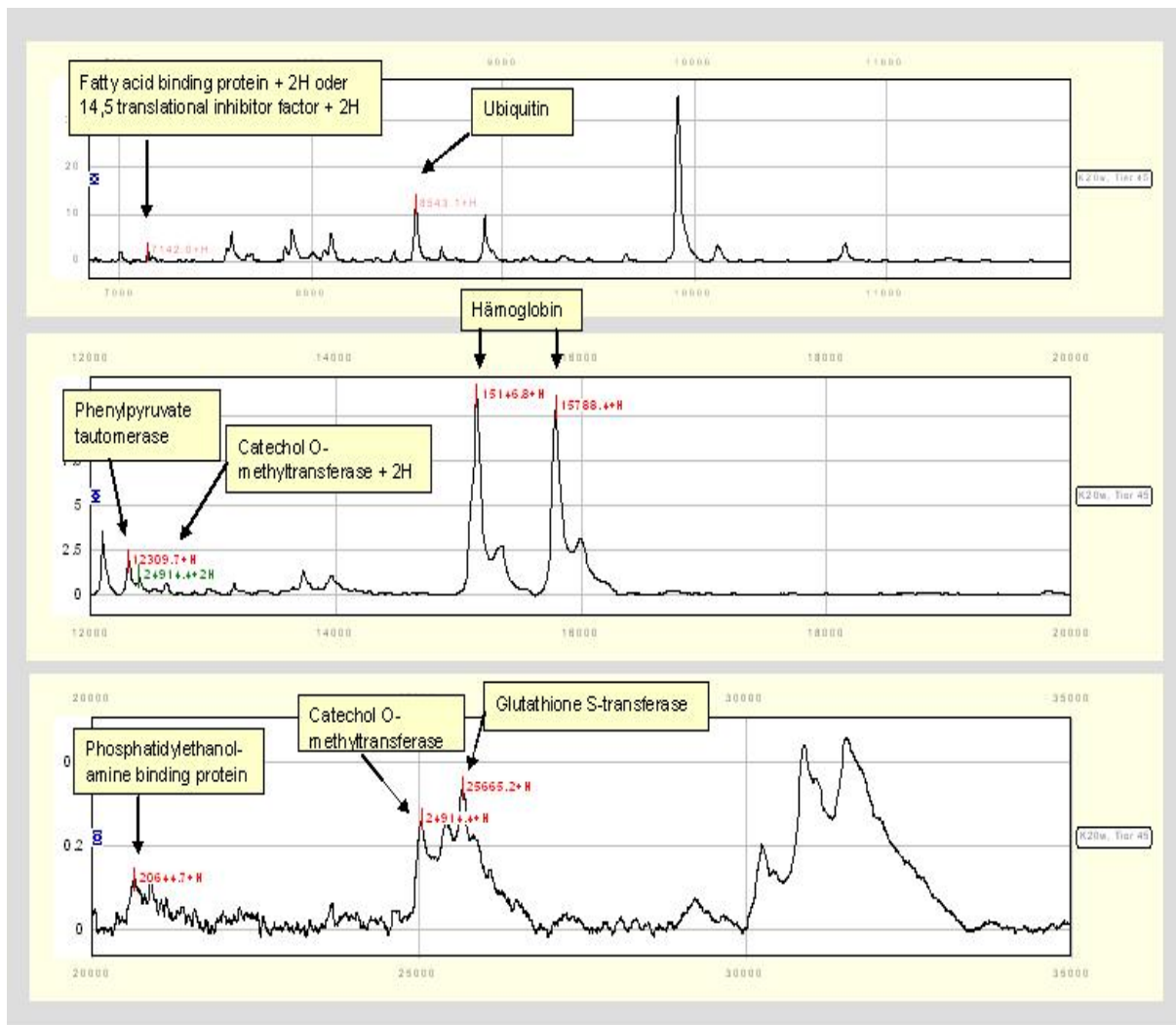
**Abbildung D-45: SELDI-Spektren (Gold-Chip) nach passiver Elution der Proteine aus SDS-PAGE-Gelen.**

Die Elution der Proteine erfolgte aus unterschiedlich gefärbten 1D- und 2D-Gelen. Die durch SELDI-MS detektierten m/z-Werte konnten direkt mit dem jeweiligen Molekulargewicht des mittels MALDI-MS identifizierten Proteins korreliert werden.

Um letztlich Aufschluss über die Identität der durch die m/z-Signale repräsentierten differentiell exprimierten Proteine in den vergleichenden SELDI-Profilen der Gesamtproteinextrakte (vergleiche Kapitel 5) zu erhalten, musste ein Abgleich der Molekulargewichte der einzelnen identifizierten Proteine mit den im Gesamtspektrum detektierten m/z-Werten erfolgen. Der Versuch einer solchen Zuordnung ist in den SELDI-Spektren der Abbildung D-46 für einige Proteine unter Berücksichtigung möglicher Abweichungen zwischen theoretischem und tatsächlichem Molekulargewicht vorgenommen. Allerdings bleibt zum einen festzuhalten, dass eine Korrelation der Einzelmassen mit den m/z-Signalen des komplexen SELDI-Proteinprofils (Gesamtextrakte) schwierig bis teilweise unmöglich war. Zum zweiten



zeigte keines der wenigen Signale in den Profilen der Gesamtextrakte, denen letztlich ein identifiziertes Protein potentiell zugeordnet werden konnte, eine differentielle Expression. Hingegen erwies sich die Catechol O-Methyltransferase (Abbildung D-46) nach Analyse der 2-DE-Gele sehr wohl als dereguliert.



**Abbildung D-46: Versuch der Zuordnung identifizierter Proteine zu den entsprechenden m/z-Signalen im SELDI-Profil eines kompletten Leberlysats.**

Da keine Identifizierung der Proteine, repräsentiert durch die Signale im SELDI-Spektrum eines kompletten Leberlysats, direkt vom Chip erfolgen konnte, handelt es sich lediglich um potentielle Korrelationen zwischen den Signalen und den über „Umwege“ identifizierten Proteinen.

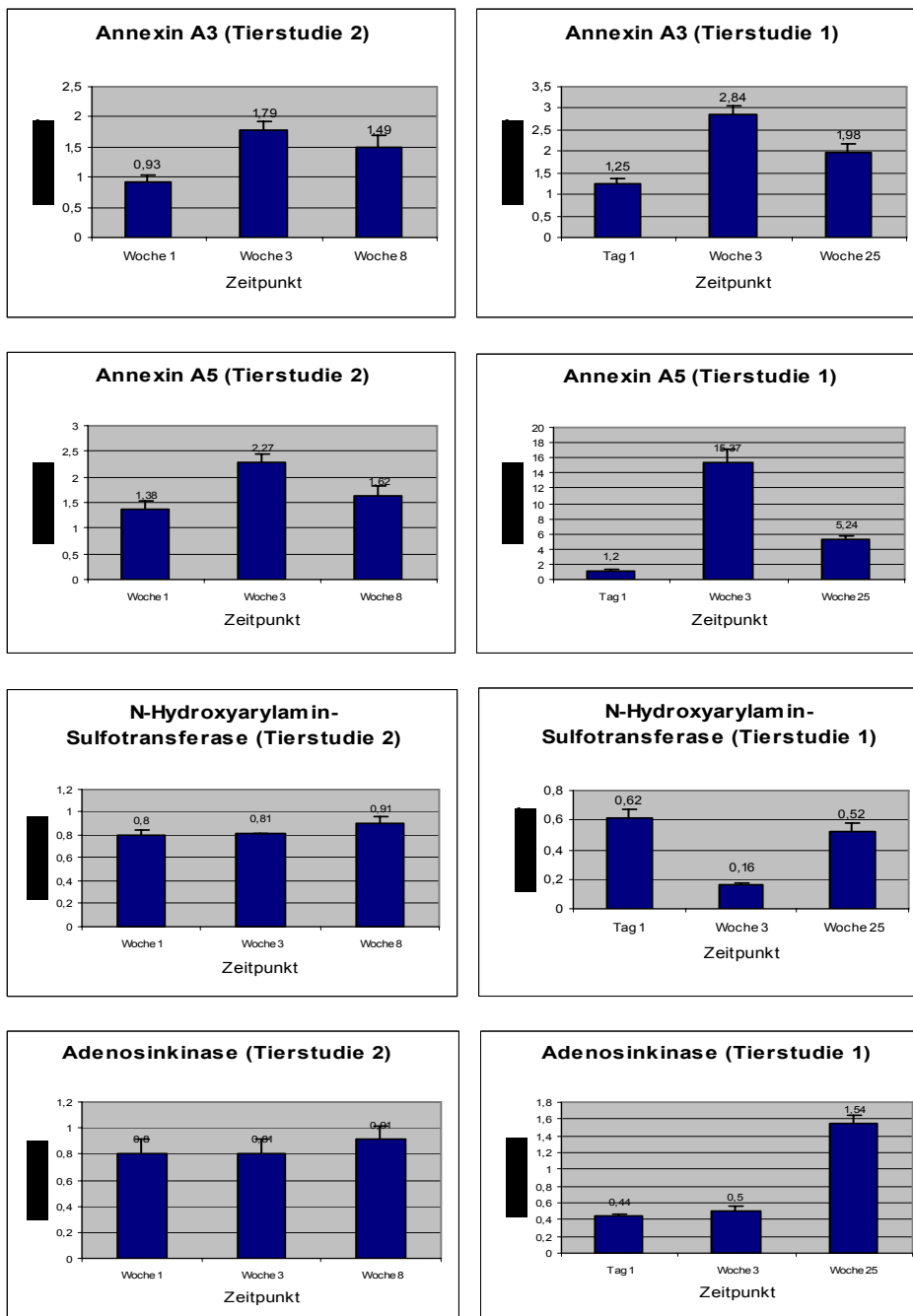
## 7 Genexpressionsanalyse

Der Einsatz von 2-DE/MS als klassische Methode der Proteomforschung lieferte nach Analyse des NNM-exponierten Lebergewebes beider Tierstudien eine Vielzahl differentiell exprimierter Proteine, die potentielle Biomarker für den Prozess der Leberkanzerogenese darstellen (Abschnitt 2). Trotzdem stellt sich häufig die Frage (Tian, 2004) nach der Korrelation von behandlungsbedingten Deregulationen auf Proteinebene mit Expressionsveränderungen auf dem Niveau der entsprechenden Gene. Für wirklich robuste Biomarker, die in der Zukunft zur Verkürzung konventioneller Toxizitätsprüfungen beitragen könnten, wäre eine parallele Deregulation sowohl auf Transkriptions- wie auch auf Translationsebene wünschenswert. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression einiger Gene mittels TaqMan-PCR ermittelt.

Ausgewählte Gensequenzen wurden in den Leberproben von Tag 1, Woche 3 und Woche 25 der Tierstudie 1 und in den Proben der Wochen 1, 3 und 8 der Tierstudie 2 amplifiziert und quantifiziert; die Expressionswerte in den behandelten Proben wurden mit denen der entsprechenden Kontrollen verglichen. Es wurden nur Zielgene untersucht, deren Translationsprodukte aus der 2-DE/MS-Analyse als differentiell exprimiert und daher als potentielle Biomarker für Kanzerogenese-Prozesse hervorgegangen waren (vergleiche Abschnitt 2).

Die TaqMan-PCR wurde wie in Kapitel C, Abschnitt 12 beschrieben für drei behandelte Proben und ein Kontrolle pro Studienzeitpunkt mit Zielsequenzen von Annexin A3 und A5, N-Hydroxyarylamino-Sulfotransferase (SUAC) sowie Adenosinkinase durchgeführt. Die Diagramme in Abbildung D-47 zeigen die nach Dreifachbestimmung resultierenden mittleren Regulationsfaktoren für die Gene in den behandelten Proben der einzelnen Studienzeitpunkte im Vergleich zur Kontrolle. Während Annexin A3 und A5 in den Proben von Woche 3 und Woche 25 der Studie 1 sowie von Woche 3 und Woche 8 der Studie 2 im Vergleich zur Kontrolle überexprimiert waren, erwies sich SUAC durchgehend als herunterreguliert. Adenosinkinase war nach einem Tag und drei Wochen der Behandlung in den Proben der Studie 1 deutlich herunterreguliert, zum Studienendpunkt in Woche 25 leicht hochreguliert. Dagegen war in sämtlichen untersuchten Proben der Studie 2 eine Deregulation kaum festzustellen. Ähnlich zu den Ergebnissen aus der 2-DE/MS-Analyse fiel auf, dass die untersuchten Gene in den Proben von Woche 3 der Tierstudie 1 jeweils stärker dereguliert waren als in Woche 3 der Tierstudie 2. In der

ersten Studie wurden die Tiere mit einer erheblich höheren Dosis NNM behandelt als in der zweiten. Ein Vergleich der durch TaqMan-PCR gelieferten Ergebnisse mit den Resultaten aus der im Rahmen des BMBF-Projektes bei der Bayer AG durchgeführten globalen Genexpressionsanalyse mittels cDNA-Chiptechnologie zeigte eine erstaunlich gute Korrelation der mit beiden Methoden ermittelten Expressionswerte.



**Abbildung D-47: Mittlere Regulationsfaktoren (RF) der durch TaqMan-PCR quantifizierten Genabschnitte im Vergleich zur Kontrolle.**

Untersucht wurden für Tierstudie 1 Proben von Tag 1, Woche 3 und Woche 25, für Tierstudie 2 Proben der Wochen 1, 3 und 8 (pro Zeitpunkt eine Kontrolle und drei behandelte Proben). Quantifiziert wurden Zielsequenzen von Annexin A3 und A5, N-Hydroxyarylaminsulfotransferase und Adenosinkinase (Dreifachbestimmungen).

## 8 Zusammenführung von Einzelergebnissen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedenste Expressionsanalysen durchgeführt, die durch Anwendung von Methoden der Proteomforschung vorrangig auf der Ebene der Proteine als Translationsprodukte erfolgten. Dennoch wurde auch die Expression einiger spezifischer Gene untersucht. Die differentielle Analyse des unterschiedlich lang mit verschiedenen Dosierungen von NNM behandelten Lebergewebes mittels 2-DE/MS stand im Vordergrund dieser Arbeit, während der Einsatz von *Western Blotting* und quantitativer Massenspektrometrie vorrangig der Prävalidierung der aus der 2-DE/MS-Analyse hervorgegangenen potentiellen Biomarker für Prozesse der Leberkanzerogenese diente. Ob eine Korrelation zwischen Protein- und Genexpression bestand, wurde mittels TaqMan-PCR überprüft. Als Ausgangsmaterial für sämtliche Analysen diente mit dem linken Leberlappen der jeweiligen Tiere stets ein und dasselbe Gewebe. Aus den verschiedenen Technologien erhaltene übereinstimmende Resultate erhöhen daher das Vertrauen in die Korrektheit und Validität der Ergebnisse sowie der eingesetzten Techniken signifikant.

### 8.1 Ergebnisse der 2-DE/MS-Analyse und des Western Blottings

Der immunologische Nachweis von Proteinen in den Leberproben von Woche 3 und Woche 25 der Tierstudie 1 erfolgte vorrangig, um die mittels 2-D-Elektrophorese beobachtete differentielle Expression von potentiellen Biomarkern früher Kanzerogeneseprozesse zu bestätigen. Nur vier aller getesteten Antikörper zeigten spezifische Reaktionen mit erkennbaren Expressionsunterschieden zwischen Kontrollen und behandelten Proben. Die mit beiden Methoden ermittelte Regulation dieser vier Proteine ist in Tabelle D-10 für beide Studienzeitpunkte aufgezeigt. Die mittels 2-DE/MS detektierte verminderte Expression des *Major urinary* Vorläufer-Proteins, die in den Proben der Woche 3 stärker ausfiel als in denen der Woche 25, konnte durch *Western Blotting* ebenso bestätigt werden wie die zu beiden Zeitpunkten beobachtete Herunterregulation von Fruktose-1,6-Bisphosphatase. Eine mit beiden Methoden übereinstimmende Regulation zeigte sich für Pyruvatkinase und Rho-GDI Dissoziationsinhibitor allerdings nur für die Proben aus Woche 3. Während sowohl Rho-GDI Dissoziationsinhibitor wie Pyruvatkinase nach 2-DE/MS-Analyse zum Studienendpunkt mit einer verminderten Expression detektiert wurden, zeigte sich für Rho-GDI Dissoziationsinhibitor auf dem *Western Blot* eine leicht

erhöhte bis unveränderte Expression und für Pyruvatkinase keine erkennbare Deregulation.

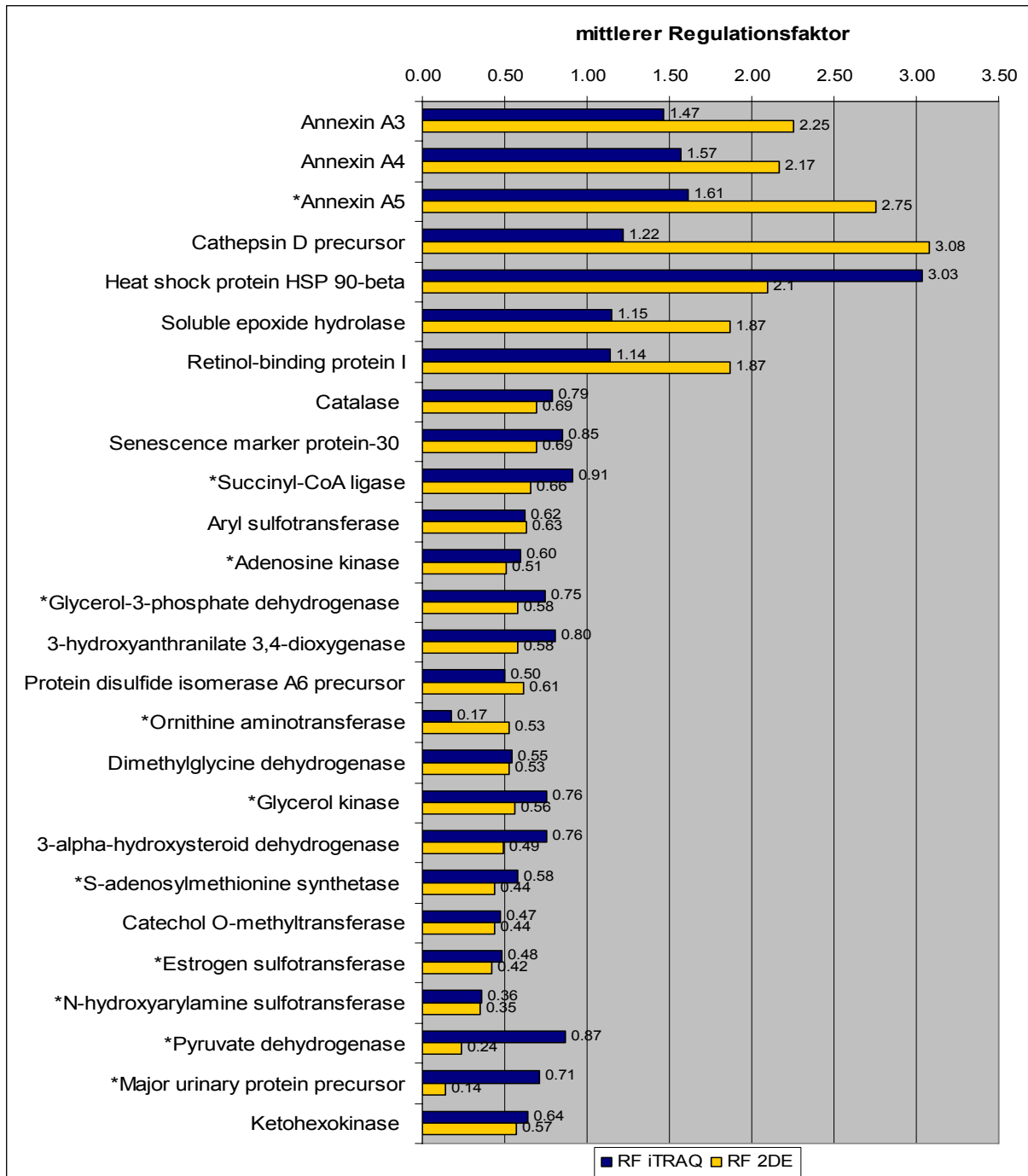
**Tabelle D-10: Durch 2-DE/MS-Analyse und Western Blotting beobachtete Expressionsveränderungen von Proteinen.**

Die Pfeile deuten auf die mit der jeweiligen Methode beobachtete Richtung der Regulation der vier aufgelisteten Proteine im Vergleich zu Kontrollproben.

Protein	2-DE		Western Blot	
	Woche 3	Woche 25	Woche 3	Woche 25
<i>Major urinary</i> Vorläufer-Protein	↓	↓	↓	↓
Rho-GDI Dissoziationsinhibitor	↑	↓	↑	↑ bis ± 0
Pyruvatkinase	↓	↓	↓	± 0
Fruktose-1,6-Bisphosphatase	↓	↓	↓	↓

## 8.2 Ergebnisse der 2-DE/MS- und iTRAQ-Analyse

Durch 2-DE/MS-Analyse der Proben von Woche 3 der Tierstudie 1 konnten 57 verschiedene differentiell exprimierte Proteine identifiziert werden (Abschnitt 2.3.3). Die Regulation dieser potentiellen Biomarker, die schon zu einem frühen Zeitpunkt Hinweise auf einsetzende Prozesse der Krebsentstehung geben könnten, sollte durch differentielle Analyse mittels quantitativer MS bestätigt und damit prävalidiert werden. Den 57 2-DE/MS-Biomarkern stehen aus der Analyse der Proben durch Einsatz der iTRAQ-Technologie 98 deregulierte Proteine gegenüber. Von den 57 potentiellen Marker-Proteinen wurden 36 (63%) auch durch iTRAQ-Analyse identifiziert, wobei 26 der Proteine (46%) in ihrer im 2-DE-Gel beobachteten Regulation bestätigt werden konnten. Hiervon wurden 20 Proteine anhand mehrerer Peptide quantifiziert, was die Signifikanz der Ergebnisse erhöhte. Das Diagramm in Abbildung D-48 zeigt für die 26 Proteine die aus den beiden Analysemethoden resultierenden Regulationsfaktoren. Die Regulation der unter Abschnitt 2.3.5 beschriebenen potentiellen frühen Markerproteine, die in den 2-DE-Gelen sowohl in Woche 3 als auch am Studienendpunkt in Woche 25 differentiell exprimiert waren, konnte für 11 der Proteine mittels iTRAQ-Technologie untermauert werden. Diese sind in dem Diagramm in Abbildung D-48 gesondert hervorgehoben (\*).



**Abbildung D-48: Regulation der Biomarker-Proteine nach 2-DE/MS- und iTRAQ-Analyse.**

Das Diagramm zeigt die Regulationsfaktoren von 26 differentiell exprimierten Proteinen, die nach drei Wochen der NNM-Behandlung mit beiden Methoden identifiziert wurden. Die 11 gesondert hervorgehobenen Proteine (\*) waren nach 2-DE/MS-Analyse nicht nur in den Proben der Woche 3, sondern auch in Woche 25 signifikant dereguliert.

### 8.3 Ergebnisse der 2-DE/MS- und Genexpressionsanalyse

Der Fragestellung folgend, ob die durch 2-DE/MS-Analyse beobachtete Deregulation von Proteinen auch mit Expressionsveränderungen auf transkriptioneller Ebene einhergeht, wurden einige Gensequenzen von potentiellen Marker-Proteinen durch Anwendung von TaqMan-PCR amplifiziert und quantifiziert. In Tabelle D-11 sind die für die Zielgene in den behandelten Proben beider Tierstudien ermittelten Regulationsfaktoren denen aus dem 2-DE/MS-Ansatz gegenübergestellt.

**Tabelle D-11: Regulation von Proteinen bzw. den entsprechenden Genen nach 2-DE/MS-Analyse und TaqMan-PCR.**

Angegeben sind die mit beiden Methoden in den Proben der verschiedenen Studienzeitpunkte ermittelten Regulationsfaktoren (RF) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. Wenn in der Spalte der 2-DE-Ergebnisse kein Wert angegeben ist, konnte das Protein in den Proben des entsprechenden Studien-Zeitpunkts nicht als differentiell exprimiert identifiziert werden.

<b>Annexin A3</b>						
<b>Studie 1</b>	<b>RF RT-PCR</b>	<b>RF 2-DE</b>		<b>Studie 2</b>	<b>RF RT-PCR</b>	<b>RF 2-DE</b>
Tag 1	1,25	-		Woche 1	0,93	-
Woche 3	2,84	2,25		Woche 3	1,79	1,42
Woche 25	1,98	-		Woche 8	1,49	-
<b>Annexin A5</b>						
Tag 1	1,20	-		Woche 1	1,38	-
Woche 3	15,37	2,75		Woche 3	2,27	-
Woche 25	5,24	2,73		Woche 8	1,62	-
<b>N-Hydroxyarylamino-Sulfotransferase (SUAC)</b>						
Tag 1	0,62	-		Woche 1	0,80	-
Woche 3	0,16	0,35		Woche 3	0,81	0,79
Woche 25	0,52	0,67		Woche 8	0,91	0,79
<b>Adenosinkinase</b>						
Tag 1	0,44	-		Woche 1	0,80	0,75
Woche 3	0,50	0,5		Woche 3	0,81	0,83
Woche 25	1,54	0,41		Woche 8	0,91	0,83

Während die Quantifizierung mittels TaqMan-PCR Expressionswerte für die Gene aller untersuchten Proben lieferte, wurde bei der Auswertung der 2-DE-Pherogramme häufig keine differentielle Expression detektiert und daher auch keine weitere Analyse und Identifizierung vorgenommen. Dies erklärt, weshalb für die Proteine nicht zu allen Zeitpunkten Expressionsdaten vorhanden sind. Für Annexin

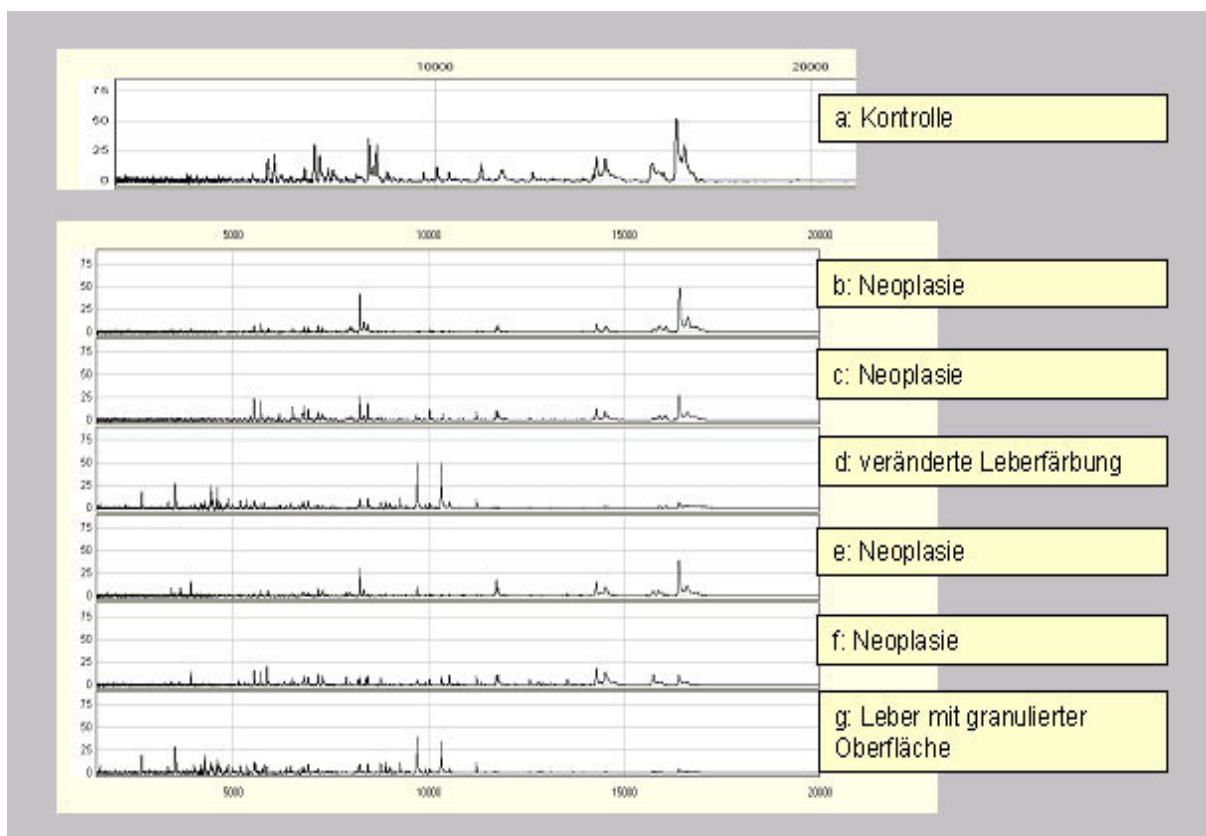
---

A3 allerdings konnten sowohl auf Protein- wie auch auf Genebene für die Proben aus Woche 3 beider Studien eine verstärkte Expression mit ähnlich Regulationsfaktoren ermittelt werden. Die mittels 2-DE/MS-Analyse detektierte Herunterregulation von SUAC, die vor allem nach drei Wochen der Behandlung in den Proben der Studie 1 stärker ausfiel als zum Ende der Studie in Woche 25, konnte auch für das entsprechende Gen bestätigt werden. Für Annexin A5 ergab sich aus beiden Ansätzen eine Übereinstimmung der Richtung der Regulation, allerdings war laut den Resultaten aus der TaqMan-PCR das Gen im Vergleich zur Kontrolle deutlich stärker überexprimiert als das Protein. Abweichungen in der Regulationsrichtung konnten nur für Adenosinkinase festgestellt werden, das nach 2-DE/MS-Analyse der Proben aus Studie 1 sowohl in Woche 3 wie auch in Woche 25 herunterreguliert war, auf Genebene allerdings für den Studienendpunkt eine leicht verstärkte Expression zeigte.



## 8.4 Ergebnisse der SELDI-Analyse und der histopathologischen Untersuchungen

Bei der Analyse der mittels SELDI-TOF-MS erstellten Proteinprofile der Proben aus Woche 25 der Tierstudie 1 fielen starke Unterschiede insbesondere zwischen den Spektren der behandelten Tiere auf. Eine Korrelation mit den für die einzelnen Tiere erhobenen histopathologischen Befunden zeigte, dass anhand der SELDI-Profile eindeutig zwischen neoplastischem, nicht-neoplastischem und Gewebe mit anderen Befunden unterschieden werden konnte (Abbildung D-49). Während die Spektren von Proben Neoplasie-tragender Tiere (b, c, e, f) annähernd gleiche Signalmuster zeigen, weisen die SELDI-Profile von Proben mit anderen histopathologischen Befunden (d, g) davon stark abweichende Expressionsprofile auf.



**Abbildung D-49: Korrelation von SELDI-Profilen mit den für die entsprechenden Proben erhobenen histopathologischen Befunden.**

Dargestellt sind die SELDI-Profile der behandelten Proben aus Woche 25 der Tierstudie 1 unter Angabe der in den jeweiligen Tieren beobachteten Leberveränderungen; (a) Spektrum eines Kontrolltiers; (b, c, e und f) Spektren von Tieren mit neoplastischen Veränderungen der Leber; (d, g) Spektren von Proben ohne neoplastischen Befund.

## E DISKUSSION

Die behördlich geforderte Prüfung von Chemikalien und potentiellen neuen Arzneimitteln auf kanzerogene Stoffeigenschaften stellt die industrielle Toxikologie vor einen langwierigen Prozess mit einem hohen Bedarf an Versuchstieren. Die Verpflichtung der modernen Toxikologie an das 3-R-Konzept (Russel und Burch, 1959), welches den Ersatz von Tierversuchen, eine Verringerung der Anzahl an Versuchstieren sowie die Minderung ihres Leidens und eine verbesserte Versuchsdurchführung fordert, zeigt die Bestrebungen, Kanzerogenstudien zu verkürzen, wenn nicht gar zu ersetzen. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwieweit molekulare Prozesse der chemisch induzierten Leberkanzerogenese durch Einsatz von Methoden der Proteomforschung früher detektierbar sind, als dies mit traditionellen toxikologischen Methoden möglich ist.

### 1 Tierstudie und Histopathologie

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Lebergewebe für proteinanalytische Untersuchungen stammte aus zwei Studien, in denen die Versuchstiere mit unterschiedlichen Dosierungen der kanzerogenen Chemikalie NNM behandelt wurden. Beide Studien erfolgten unter hoch standardisierten Bedingungen. Die industrielle Toxikologie ist zur Durchführung von Tierstudien den Grundsätzen der „Guten Laborpraxis“ (GLP) verpflichtet. Dabei handelt es sich um ein EU-weit geltendes Qualitätssicherungssystem [<sup>6,7</sup>], das sich mit dem organisatorischen Ablauf und den Rahmenbedingungen befasst, unter denen Tierstudien zur toxikologischen Prüfung von Substanzen geplant, durchgeführt, überwacht und dokumentiert werden. Dadurch wurden optimale Voraussetzungen für reproduzierbare Ergebnisse aus den folgenden Proteinexpressions-Analysen geschaffen. In Tierstudie 1 erfolgte die Applikation der höheren Dosis NNM mit 20 mg/kg KG, in Studie 2 hingegen wurde die niedrigere Dosis von nur 12 mg/kg KG verabreicht. Die Dosierungsunterschiede spiegeln sich deutlich in den Befunden der histopathologischen Untersuchung des unterschiedlich lang behandelten Lebergewebes wider (Kapitel D, Abschnitt 1). Die Proben aus Studie 1 zeigten schon

---

<sup>6</sup>European Community Directive 2004/10/EC on the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of GLP.

<sup>7</sup>European Community Directive 2004/9/EC on the inspection and verification of GLP.

nach drei Wochen der Behandlung mit NNM deutliche akute degenerative und subakute reaktive Leberzellschädigungen, die zum Endpunkt der Studie nach der behandlungsfreien Phase von 18 Wochen in gravierenden Veränderungen resultierten. Diese äußerten sich als Leberatrophien und Fibrosen, regenerative Knoten und Adenome. Maligne Leberkarzinome wurden bei vier der sechs behandelten Tiere diagnostiziert.

Demgegenüber stehen die Proben der verschiedenen Zeitpunkte aus Tierstudie 2, in denen nur wenige pathologische Veränderungen festgestellt werden konnten. Die immunhistochemische Analyse des Gewebes zeigte erst nach acht Wochen der Behandlung erste kleine Herde GST-P-positiver Zellen. Obwohl die behandlungsfreie Phase auf 42 Wochen verlängert wurde, entwickelte keines der Tiere bis zum Endpunkt der Studie Lebertumore. Dies lässt vermuten, dass im Fall der niedrigeren Dosierung von NNM der Studienendpunkt für eine Detektion von Adenomen oder Karzinomen zu früh gewählt war.

## 2 2-D-Elektrophorese/MALDI-MS

### 2.1 Methodik

Die 2-DE repräsentiert eine hochauflösende Methode zur Darstellung komplexer Proteingemische (vergleiche Kapitel A, Abschnitt 2.1). Allerdings stellt die Durchführung der 2-DE einen sehr arbeitsintensiven Prozess dar, der, gerade durch die mangelnden Automatisierungs-Möglichkeiten, einer Vielzahl von Fehlerquellen ausgesetzt ist, die vor allem die Reproduzierbarkeit der Methode beeinflussen (Rabilloud, 2002, Lottspeich, 1999). Den im Folgenden aufgeführten möglichen Fehlerquellen wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine umfassende Standardisierung aller zur Anfertigung der 2-DE-Gele nötigen Prozessierungsschritte entgegengewirkt. Sämtliche Protokollabschnitte wurden optimiert, in *Standard Operation Procedures* (SOP) festgeschrieben und zur Herstellung der mehr als 500 2-DE-Gele strikt eingehalten.

Ein besonders kritischer Schritt für die Anfertigung von reproduzierbaren 2-DE-Gelen ist in der Probenvorbereitung zu sehen (Görg, 2004), da Proteine schnell durch Proteasen degradiert werden und in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von chaotropen Substanzen, Reduktionsmitteln und Detergenzien in ihrem Solubilisierungsverhalten stark variieren können. Die rasche Durchführung der Proteinextraktion aus dem Lebergewebe bei niedrigen Temperaturen mit über den gesamten Zeitverlauf der Tierstudien gleichbleibend zusammengesetzten Lysis-Puffern (Kapitel C, Abschnitt 3.1) sollte hierbei geringe Variabilitäten der 2-DE-Pherogramme gewährleisten. Durch Zugabe von Protease-Inhibitoren wurde der unerwünschte Abbau der Proteine verhindert. Die Proteintrennungen in der ersten wie auch der zweiten Dimension wurden stets bei gleichbleibender Temperatur mit konstanten Programmen für die Spannungs-Einstellungen durchgeführt. Während für die isoelektrische Fokussierung kommerziell erhältliche IPG-Streifen verwendet wurden und die Separation der Proteine im pH-Gradienten nach sauberem Probenauftrag kaum noch beeinflussbar war, wurde beim Herstellen der SDS-PAGE-Gele auf eine möglichst konstante Gießhöhe geachtet, um eine gleichbleibende Trennstrecke für die Proteine zu erhalten. Große Variationen der Trennstrecke würden in der nachfolgenden Bildauswertung beim Übereinanderlegen der Gele Probleme bereiten und so gruppenweise Vergleiche deutlich erschweren oder sogar unmöglich machen.

Zur Visualisierung der Proteine in den 2-DE-Gelen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ruthenium (Rabilloud, 2001) verwendet. Fluoreszenzfarbstoffe färben Proteine linear in einem großen dynamischen Konzentrationsbereich. Gegenüber der Färbung mit Coomassie (Neuhoff, 1988) zeichnen sie sich durch eine erhöhte Sensitivität aus. Während mit Coomassie Proteinkonzentrationen von 8-10 ng gerade noch detektierbar sind, liegt die untere Nachweisgrenze mit Fluoreszenzfarbstoffen bei ca. 0,5 ng (Lauber, 2001). Die Silberfärbung stellt zwar eine in der Sensitivität mit den Fluoreszenzfarbstoffen vergleichbare, wenn nicht gar überlegene Visualisierungsmethode dar, ist aber aufgrund des nichtlinearen dynamischen Bereichs und der Eigenschaften des Silbers, Proteine in Abhängigkeit ihrer Modifizierungen und Aminosäurezusammensetzung unterschiedlich stark anzufärben, für Quantifizierungen nicht geeignet (Lauber, 2001). Außerdem ist die Farbtiefe stark abhängig von Entwicklungsdauer und Temperatur (Lottspeich, 1999), was die Standardisierung dieser Methode im Vergleich zur Fluoreszenzfärbung deutlich erschwert. Aufgrund der dargelegten Nachteile von Coomassie- und Silberfärbung wurde in der vorliegenden Arbeit die Visualisierung der Proteine mit Ruthenium bevorzugt.

Die Verwendung von tierischem Gewebe als Ausgangsmaterial für Proteomanalysen mittels 2-DE stellte eine größere Herausforderung dar als beispielsweise der Einsatz von Zellkulturen, da die Versuchstiere bei aller Standardisierung ihrer Haltung und der Versuchsdurchführung sehr individuelle Proteinexpressionsmuster aufweisen können, die sich im 2-DE-Gel widerspiegeln (Lottspeich, 1999). Um diese biologische Variabilität auszugleichen, wurden sechs Tiere pro Gruppe eingesetzt. Demgegenüber steht die aus den genannten Fehlerquellen bedingte Variabilität der Methode selbst, die durch die Anfertigung von vier Replikat-Gelen pro Probe weiter reduziert wurde. Die einzelnen technischen Replikate wurden zudem auf unterschiedliche Gelläufe verteilt, um eventuell auftretende Variationen zu streuen. Pro Studienzeitpunkt wurden insgesamt 48 Gele angefertigt, je 24 für die Gruppe der behandelten Proben und die entsprechende Kontrollgruppe.

Bei der computergestützten Auswertung der digitalisierten 2-DE-Gele mit der *Software* ProteomWeaver Version 2.0 (Definiens) zeigte sich, wie reproduzierbar gearbeitet wurde. Nach der automatischen *Spot*-Detektion erfolgte das *Matching* der 2-DE-Gele, was bedeutet, dass jedes Gel mit jedem anderen übereinandergelegt wurde, um korrespondierende *Spot*-Muster ausfindig zu machen. Dieses *Matching*

erfolgte umso effizienter, je reproduzierbarer sich die *Spot*-Muster bezüglich ihrer x- und y-Koordinaten auf den einzelnen Gelen gestalteten. Durchschnittlich konnten knapp 70% aller detektierten Spots mit anderen zur Deckung gebracht werden (Kapitel D, Abschnitt 2.1.2). Falsch detektierte oder fehlerhaft zugeordnete *Spots* wurden gegebenenfalls manuell korrigiert. Allerdings wurde die Nachbearbeitung auf ein Minimum reduziert, da sie einerseits bei 48 Gelen pro analysiertem Studienzeitpunkt mit einem immensen Zeitaufwand verbunden war. Andererseits richtet sich eine manuelle Bearbeitung nach subjektiven Gesichtspunkten, die eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse von einem zum anderen Experiment erschwert hätte. Qualitativ schlechte 2-DE-Gele, die sich nur schwer mit anderen *matchen* ließen, wurden erneut angefertigt und nicht manuell nachbearbeitet.

Trotz Optimierung einiger *Software*-Parameter (vgl. Kapitel D, Abschnitt 2.1) bleibt in Übereinstimmung mit einigen Autoren (Lottspeich, 1999, Harry, 2000) festzuhalten, dass bei aller Tendenz zur Automatisierung auch bei der Auswertung von 2-DE-Gelen mit ProteomWeaver der Experimentator letztlich entscheidenden Einfluss besitzt. Ob es sich bei den von der *Software* selektierten *Spots* tatsächlich um differentielle Expressionen oder aber um Artefakte handelte, musste in jedem Experiment erneut subjektiv entschieden werden.

Nach Standardisierung aller Prozessierungsschritte wurden die 2-DE-Gele der Leberproben aus beiden Tierstudien angefertigt. Die durchweg reproduzierbaren 2-DE-Pherogramme ermöglichten eine differentielle Analyse zu den einzelnen Behandlungszeitpunkten. Allerdings stellt auch ein optimiertes 2-DE-Gel immer nur einen Ausschnitt des kompletten tatsächlich vorhandenen Proteoms dar. Vuong und Mitarbeiter (Vuong, 2000) gehen basierend auf der Tatsache, dass ein Gen mehrere Proteine kodieren kann, davon aus, dass jedes Gen einer Säuger-Zelle durchschnittlich in fünf Protein-*Spots* resultiert. Mit angenommenen 10.000 aktiven Genen pro Zelle führt dies zu 50.000 möglichen Protein-*Spots* pro Zelle, was die Detektionsgrenzen von 2-DE-Gelen bei weitem übersteigt (Issaq, 2001). Des Weiteren sind niedrig abundante Proteine auf 2-DE-Gelen schwer visualisierbar (Harry, 2000). Beiden Aspekten hätte in der vorliegenden Arbeit mit einer verbesserten Auflösung durch geeignete Vorfraktionierung der Proben Rechnung getragen werden können (Harry, 2000, Lottspeich, 1999). Aufgrund des immensen Zeitaufwands für die Analyse der großen Anzahl von Proben wurde allerdings darauf verzichtet. Aus den gleichen Gründen wurde auch die Separation der Proteine auf

mehreren IPG-Streifen mit unterschiedlichen pH-Gradienten zur verbesserten Detektion von stark sauren oder basischen sowie niedrig abundanten Proteinen (Harry, 2000) nicht durchgeführt.

Die mittels 2-DE-Elektrophorese detektierten differentiell exprimierten Proteine wurden aus den 2-DE-Gelen ausgeschnitten, mit Trypsin proteolytisch gespalten und massenspektrometrisch identifiziert. Kombinierte MALDI-MS und MS/MS-Analysen sämtlicher Proteine aus den 2-DE-Gelen der Proben aller Studienzeitpunkte und Abgleich der erhaltenen m/z-Werte mit den Datenbanken SwissProt oder NCBI (vorrangig SwissProt) führte zu einer durchschnittlichen Identifizierungsrate von 83,7%. Erfolgreiche Identifizierungen könnten mit unvollständigen Datenbankeinträgen zu der entsprechenden Peptid-Sequenz zu erklären sein (Lottspeich, 1999). Die außerdem durch die Verwendung von nur einer Protease bedingte unvollständige Sequenzabdeckung könnte durch Wiederholung des Verdaus mit Proteasen unterschiedlicher Spaltspezifität verbessert werden. Auf die weitere Analyse möglicher posttranslationaler Modifizierungen wurde in Anbetracht des großen Probendurchsatzes und der ohnehin schon sehr hohen Identifizierungsrate verzichtet.

## **2.2 Differentielle Expressionsanalyse**

Die 2-DE/MS-Analyse wurde durchgeführt, um durch die genotoxische Chemikalie NNM ausgelöste Veränderungen im Proteinexpressionsmuster der unterschiedlich lang behandelten Proben zu detektieren. Dies sollte zur Identifizierung neuer Protein-Biomarker führen, die den Prozess der chemisch induzierten Leberkanzerogenese auf molekularer Ebene charakterisieren. Vor allem im Hinblick auf die Korrelation der 2-DE-Ergebnisse mit den histopathologischen Befunden erschien es wichtig, die Funktionen der in dem Gewebe der einzelnen Studienzeitpunkte identifizierten differentiell exprimierten Proteine zu recherchieren und ihre biologische Relevanz im molekularen Mechanismus der Krebsentstehung aufzuzeigen. Da in den Proben des Endpunkts der Studie 1 in den meisten Tieren histopathologisch Lebertumore diagnostiziert wurden, eignete sich dieses Gewebe besonders, um Tumorspezifische Marker zu identifizieren. Die Analyse der Proben nach einem Tag der NNM-Exposition diente zur Detektion von Proteinen, deren Expression akut toxische

Behandlungs-Effekte reflektiert. Da eines der Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit darin bestand, zu untersuchen, ob Proteomanalysen molekulare Prozesse der Leberkanzerogenese früher abbilden können als dies mit traditionellen toxikologischen und histopathologischen Methoden möglich ist, erfolgte eine starke Fokussierung auf das Lebergewebe nach drei Wochen der Behandlung. Zu diesem Zeitpunkt sollten akut toxische Effekte abgeklungen, frühe präkanzerogene Prozesse allerdings bereits initiiert sein.

Da sowohl die histopathologischen Befunde als auch die 2-DE/MS-Analyse für die Proben der Tierstudie 1 eine stärkere Ausprägung der behandlungsbedingten Effekte aufzeigen konnten, werden im folgenden Abschnitt zunächst die in dem Gewebe dieser Studie differentiell exprimierten Proteine näher charakterisiert. Dazu erfolgt eine Gliederung der Expressions-Veränderungen in akut toxische sowie subchronische und chronische Effekte von NNM. Abschließend erfolgt ein Vergleich mit den Resultaten aus Tierstudie 2.

### **2.2.1 Akut toxische NNM-Effekte**

Nach einem Tag der Behandlung mit NNM sollten durch Proteomanalyse des Lebergewebes molekulare Vorgänge detektierbar sein, die zelluläre Reaktionen auf akut toxische Schädigungen, induziert durch die Chemikalie, reflektieren. Wie bereits in Kapitel A, Abschnitt 3.2 beschrieben, wird die Genotoxizität von NNM über mikrosomale Oxidation der Substanz (Manson, 1978) und darauffolgende Adduktbildung reaktiver Zerfallsprodukte der oxidierten Verbindung mit DNA (Loeppky, 2002) vermittelt. Solche DNA-Schädigungen stoßen in der Zelle molekulare Reparatur-Mechanismen an (Evans, 2004). Als sekundäre Reaktionen auf den zellulären Stress, induziert durch toxische Agenzien, führen oxidative mikrosomale und cytoplasmatische Reaktionen zur Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS, *reactive oxygen species*), die ihrerseits toxisches Potential besitzen und daher vielfache Zellschädigungen auslösen können (Evans, 2004, Kohen und Nyska, 2002). Die Schädigungen werden dabei vor allem durch die Interaktion der verschiedenen reaktiven Sauerstoff-Verbindungen mit DNA, Proteinen und Lipiden vermittelt. Peroxiredoxin 2, das nach differentieller Analyse der 2-DE-Gele in den behandelten Proben als signifikant hochreguliert angezeigt wurde, spielt eine wichtige Rolle bei der Eliminierung der ROS, in dem es, eingebunden in das Thioredoxin-System, die reaktiven Verbindungen reduziert (Rhee, 2001, Miranda-Vizueté, 2000). Dadurch geht deren zellschädigendes Potential verloren. Die



beobachtete erhöhte Expression von Superoxid Dismutase, einem Enzym, das Superoxid-Radikale, eine bestimmte Form reaktiver Sauerstoffverbindungen, reduziert und dadurch detoxifiziert (Desideri, 2003, Bannister, 1987), reflektiert ebenfalls den akuten oxidativen Stress, dem die Leberzellen nach bereits einem Tag der Behandlung mit NNM ausgesetzt waren.

Es wird angenommen, dass die beschriebenen angestoßenen Prozesse und Reaktionen auch in Modifizierungen des Energie-Stoffwechsels der geschädigten Leberzellen resultierten (Bannasch, 1996). Dies wird in der veränderten Expression von Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), Catechol O-Methyltransferase (COMT), Transthyretin Vorläufer-Protein und 3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase (3-HAO) reflektiert. Eine Intensivierung der Synthese wie auch des Abbaus von Proteinen unter den induzierten Stress-Bedingungen zeigte sich in der verstärkten Detektion von Hitzeschockprotein 60 (HSP 60), Protein-Disulfidisomerase (PDI) sowie der 26S Protease regulierenden Untereinheit 6B. HSP 60 und PDI sind als typische Chaperone an der korrekten Faltung von Proteinen beteiligt (Gupta, 2005, Noiva, 1999), während die 26S Protease ein Bestandteil des Protein-degradierenden Multienzymkomplexes, des Proteasoms, darstellt (Wolf, 2004). Des Weiteren könnte die gesteigerte Bildung von HSP 60 auf eine Induktion von apoptotischen Prozessen, des programmierten Zelltods, als Reaktion auf irreversible Zellschädigung hinweisen (Chandra, 2003).

Prohibitin, dessen Expression in dem mit NNM behandelten Lebergewebe ebenfalls signifikant verstärkt wurde, ist als potentiell Tumor-Suppressor-Protein beschrieben (Fusaro, 2003). Es wird durch apoptotische und Stress-bedingte molekulare Stimuli aus den Kernen von Brustkrebszellen freigesetzt, verhindert die weitere Zellproliferation und interagiert mit dem Tumorsuppressor p53 (Fusaro, 2003). Eine vermehrte Expression in Ratten-Harnblasen- und humanen Gebärmutterkrebszellen (Asamoto, 1994, Cliby, 1993) konnte ebenfalls nachgewiesen werden. In welchem Zusammenhang die Überexpression von Prohibitin in Rattenleber nach NNM-Exposition mit einer frühen Phase der Leberkanzerogenese steht, ist ungeklärt. Dennoch sollte Prohibitin als potentieller einzelner Biomarker für frühe kanzerogene Prozesse betrachtet werden.

Die Resultate zeigen, dass durch 2-DE/MS-Analyse nach nur einem Tag der NNM-Behandlung Veränderungen der Proteinexpression detektiert werden konnten, die einerseits Reaktionen auf akute Toxizität charakterisieren, andererseits

möglicherweise mit frühen kanzerogenen Prozessen assoziierbar sind. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung, in der keine Abnormalitäten festgestellt werden konnten.

### **2.2.2 Subakute und chronisch toxische NNM-Effekte**

Nach drei Wochen der Behandlung mit NNM wurden in dem exponierten Lebergewebe mittels 2-DE/MS erheblich mehr differentiell exprimierte Proteine detektiert als nach einem Tag (vergleiche Kapitel D, Abschnitt 2.3.1 und Abschnitt 2.3.2). Effekte, die im Zusammenhang mit der zellulären Antwort auf induzierten toxischen Stress stehen, ließen sich auch noch nach drei Wochen anhand der verstärkten Expression von HSP 60, HSP 90 $\beta$  und einem HSP-verwandten Protein von 71 kDa beobachten (Liang und MacRae, 1997, Callahan, 2002). Als in dem behandelten Lebergewebe ebenfalls hochreguliert erwies sich die lösliche Epoxidhydrolase, ein wichtiges Enzym zur Detoxifizierung intermediärer Epoxid-Verbindungen im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus (vergleiche Kapitel A, Abschnitt 3.2).

Zusätzlich zu den beobachteten Veränderungen der Proteinexpression am Beginn der Studie, waren die durch zellulären Stress bedingten induzierten Prozesse nach drei Wochen der Behandlung vermehrt begleitet von Deregulationen im Bereich des anabolen und katabolen Energie-Stoffwechsels. So wurden ALDH, COMT, Adenosinkinase (ADK) und Glycerolkinase zu diesem Zeitpunkt als differentiell exprimiert detektiert. Die Expressionsveränderungen von Kethexokinase, Pyruvatkinase und Fruktose-1,6-Bisphosphatase (F16P), alles Schlüsselenzyme der Glykolyse, weisen auf deutliche Veränderungen des Energie-Stoffwechsels hin. Besonders die Herunterregulation von F16P charakterisiert eine Verschiebung des metabolischen Gleichgewichts von der Glukoneogenese hin zur Glykolyse. Die Zellen gewinnen dadurch Energie, die sie für verstärkte Regeneration und Proliferation nutzen können (Bannasch, 1997, Bannasch, 2001, Steiner, 2000).

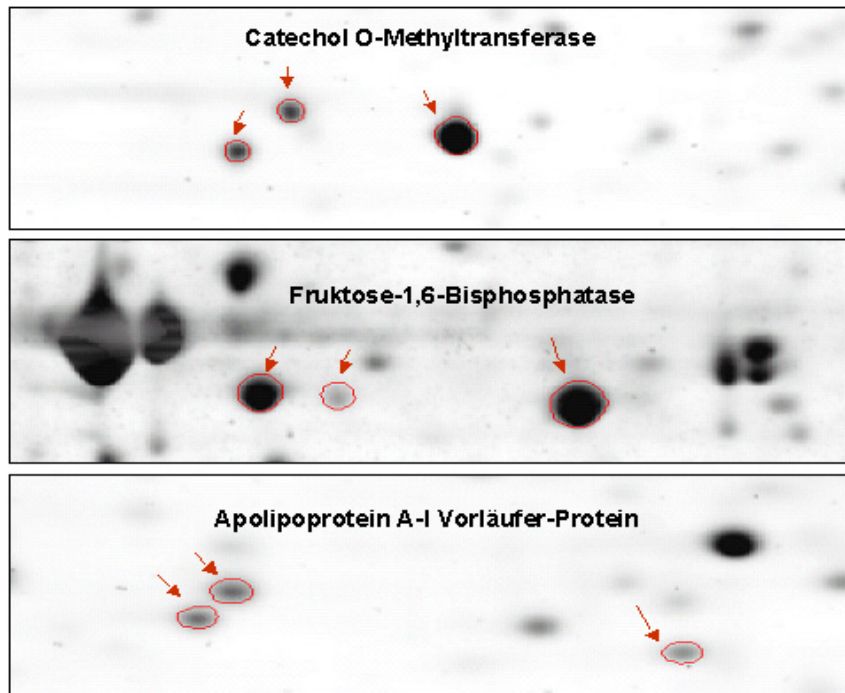
Im bereits in Kapitel A, Abschnitt 3.3 beschriebenen Rattenleber-Foci-Test (*Rat Liver Foci Bioassay*, RLFB), in dem die kanzerogenen Eigenschaften von Substanzen mit Wirkung auf die Rattenleber in einem verkürzten Prüfsystem ermittelt werden (Bannasch, 1986, Ito, 1989, Williams, 1982), ist die Bildung von phänoptisch veränderten Hepatozyten als präkanzerogenes Ereignis beschrieben. Diese Zellen treten in Abhängigkeit von der gewählten Dosierung einige Wochen nach einer NNM-Behandlungsphase von sieben Wochen als herdförmige Ansammlungen (Foci) auf

und zeichnen sich durch immunhistochemisch detektierbare Veränderungen im Energie-Stoffwechsel aus (Weber, 1994b). Im Gegensatz dazu wurden durch Einsatz von 2-DE/MS diese Modifikationen des zellulären Stoffwechsels, von denen angenommen wird, dass sie der Bildung von Adenomen und Karzinomen vorausgehen (Bannasch, 2003), bereits nach drei Wochen der Behandlung mit NNM detektiert. Die frühe Detektion möglicher molekularer Prozesse der Leberkanzerogenese zeigt an dieser Stelle das Potential von Proteomic-Methoden, konventionelle Toxikologie zu unterstützen und langwierige Kanzerogenesestudien zu verkürzen.

Darüber hinaus wurden in dem Lebergewebe nach drei Wochen NNM-Exposition mit einer verminderten Expression von Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDA) sowie Deregulationen der Vorläuferproteine von Apolipoprotein A-I und A-IV Veränderungen im Fettstoffwechsel angezeigt (Kim, 2002, Steiner, 2001). GPDA katalysiert die Umwandlung von Glycerol-3-Phosphat in Dihydroxyacetonphosphat und spielt damit eine Rolle beim Abbau von durch Lipolyse freigesetztem Glycerol. Durch die verminderte Expression des Enzyms ist eine Störung des Glycerol-Abbaus, unter Umständen verbunden mit einer Anhäufung von Fettsäuren, denkbar (Kim, 2002). Eine Akkumulation von Fettsäuren und Lipiden in Leberkarzinomzellen ist beschrieben (Gibson, 1978). Apolipoproteine sind an dem Transport von Cholesterol aus dem Gewebe in die Leberzellen beteiligt, damit es dort metabolisiert und ausgeschieden werden kann. Auffällig war, dass zwei Protein-*Spots*, im 2-DE-Gel in unterschiedlichen Regionen isoelektrisch fokussiert, als Vorläuferprotein von Apolipoprotein A-I mit Regulationen in die jeweils entgegengesetzten Richtungen identifiziert wurden. Möglicherweise repräsentieren diese *Spots* unterschiedliche Modifizierungen des Proteins, deren Höhe des Expressionsniveaus durch NNM induziert sein könnte (Abbildung E-1).

Das beschriebene Phänomen, dass mehrere *Spots*, im 2-DE-Gel mit nahezu identischem Molekulargewicht aber unterschiedlichen pH-Werten detektiert, ein und dasselbe Protein repräsentierten, wurde in den Proben aller Studienzeitpunkte häufiger beobachtet. Wie die Abbildung E-1 zeigt, handelte es sich um klar definierte *Spots* und nicht um unsaubere Trennungen eines Proteins während der isoelektrischen Fokussierung. Daher muss davon ausgegangen werden, dass es sich tatsächlich um unterschiedliche posttranslationale Modifizierungen handelt, die unter dem Einfluss von NNM möglicherweise induziert und verringert werden. In

Anbetracht des hohen Probendurchsatzes wurde allerdings auf eine weitere Charakterisierung der möglichen Modifizierungen verzichtet.



**Abbildung E-1: Identifizierte Proteine, repräsentiert durch mehrere 2-DE-Gel-Spots.**

Die Spots wurden in den 2-DE-Gelen bei annähernd gleichem Molekulargewicht und unterschiedlichen pI-Werten detektiert und repräsentieren vermutlich unterschiedliche posttranslationale Modifizierungen des jeweiligen Proteins.

Die weitere 2-DE/MS-Analyse der Proben nach drei Wochen der NNM-Exposition zeigte eine signifikant erhöhte Expression von drei Proteinen der Annexin-Familie (Annexin A3, A4, A5). Annexine sind als Kalzium-abhängige Phospholipid-bindende Proteine beschrieben, die an mehreren zellulären Funktionen wie Adhäsion, Exozytose, Zell-Zell-Kommunikation und der Interaktion mit Proteinen des Cytoskeletts beteiligt sind (Rhee, 2000, Raynal, 1994, Steiner, 2000). Detailliertere Funktionen der Annexine im Zusammenhang des Kanzerogenese-Prozesses müssten weiter untersucht werden.

Mit der verminderten Bildung von N-Hydroxyarylamin-Sulfotransferase (SUAC), Aryl-Sulfotransferase und mehreren Isoformen der Estrogen-Sulfotransferase wurde die Deregulation von Proteinen detektiert, die an der Biotransformation endogener wie exogener Stoffe beteiligt sind (Steiner, 2000, Pacifici, 2004).

Als auffällig stark herunterreguliert erwiesen sich das *Major urinary* Vorläufer-Protein (MUP) und – wenn auch nicht ganz so deutlich – das *Senescence Marker* Protein (SMP-30). Die Expressionsverringerung beider Proteine ist im Zusammenhang mit Alterung und damit verbundener Entartung von Hepatozyten beschrieben (van

---

Bezooijen, 1994, Fujita, 1996). Auf dieser Basis könnte die beobachtete Deregulation als frühes Ereignis im Prozess der Krebsentstehung erklärt werden.

Der Exposition der Tiere mit NNM über den Zeitraum von sieben Wochen schloss sich eine behandlungsfreie Phase von 18 Wochen an. Die 2-DE/MS-Analyse des Lebergewebes nach 25 Wochen zeigte, dass erheblich weniger Proteine differentiell exprimiert waren als nach drei Wochen der Behandlung (Kapitel D, Abschnitt 2.3.2 und 2.3.3). 75 signifikant deregulierten Proteinen in den Proben der Woche 3 standen nur noch 45 in den Proben der Woche 25 gegenüber. Die nähere Betrachtung der differentiell exprimierten Proteine ließ den Schluss zu, dass sich die Leberzellen nach Abbruch der Behandlung und demzufolge nach dem Entzug des akut toxischen Stimulus in den folgenden 18 Wochen erholen und regenerieren konnten. Zumindest waren einige durch zellulären Stress induzierbare Proteine wie das Stress-70 Protein und das Vorläufer-Protein eines HSP von 47 kDa in den Proben der Woche 25 vermindert exprimiert. Als ebenfalls herunterreguliert erwies sich das HSP-verwandte Protein von 71 kDa, das in den Proben der Woche 3 noch mehr als zweifach überexprimiert war.

Die bereits nach drei Wochen detektierten Veränderungen des anabolen und katabolen Energie-Stoffwechsels schienen sich bis in Woche 25 fortzusetzen, angedeutet in der erneut detektierten verminderten Expression von F16P, ADK, Pyruvatkinase und Glycerolkinase.

Allerdings wurden in vier der sechs Proben der Woche 25 Karzinome diagnostiziert, so dass die 2-DE/MS-Analyse auch Tumor-spezifische Marker-Proteine liefern sollte. Vimentin, ein Intermediärfilament des Cytoplasmas mit Funktionen bei Adhäsion und der Beweglichkeit von Zellen (Hu, 2004), wurde in den behandelten Proben der Woche 25 stärker exprimiert. Dies steht in Einklang mit der Literatur, in der die Überexpression von Vimentin in verschiedenen Tumor-Arten, angefangen vom hepatozellulären Karzinom (Hu, 2004), über Brustkrebs (Hendrix, 1997) und Zervixkarzinom (Gilles, 1996) bis hin zum Nierenzellkarzinom (Moch, 1999) beschrieben ist. Dabei wird davon ausgegangen, dass die verstärkte Bildung des Filaments mit Veränderungen der Zelladhäsion verbunden ist und dadurch zur Metastasierung von Krebszellen beiträgt (Hu, 2004).

In einer zweiten, verfeinerten Analyse fanden zur verbesserten Detektion Tumorspezifischer Markerproteine nur die 2-DE-Gele von Proben der vier Tiere mit

Lebertumoren sowie die entsprechenden vier Kontrollproben Berücksichtigung. Dabei wurde eine verminderte Expression des Rho-GDI-Dissoziationsinhibitor-Proteins, des HSP 60 und dem Caspase-8 Vorläufer-Protein festgestellt, die alle an der Kontrolle der Apoptose-Regulation beteiligt sind (Schramek, 1997, Degterev, 2003). Eine Herunterregulation dieser Proteine könnte eine Hemmung oder zumindest eine Variation apoptotischer Vorgänge bedeuten und damit das unkontrollierte Wachstum der Tumorzellen fördern. Veränderungen des Apoptose-Mechanismus während der Entdifferenzierung sowie malignen Transformation von Hepatozyten sind bekannt und zusammenfassend von Jones und Gores beschrieben (Jones und Gores, 1997).

Des Weiteren legte die verfeinerte Analyse erneut die Deregulation von Proteinen des Energiestoffwechsels (ALDH, F16P, Malatdehydrogenase) offen. Die Veränderungen der Expressionsniveaus dieser Proteine konnte unabhängig vom Status der malignen Zelltransformation detektiert werden und scheinen daher nicht nur maligne Schädigungen der Zellen nach Exposition mit NNM zu reflektieren.

Der zweite Ansatz zur Analyse der 2-DE-Gele unter alleiniger Berücksichtigung der Proben mit Lebertumoren war nur mit Kenntnis der histopathologischen Befunde möglich. Nur durch Kombination von modernen Methoden der Proteom-Forschung mit traditionellen Verfahrensweisen der Toxikologie war die Detektion Tumorspezifischer Markerproteine möglich, was an dieser Stelle die Notwendigkeit und vor allem das Potential integrativer Datenanalyse hervorhebt.

### **2.2.3 Prädiktive Protein-Biomarker**

Eines der Hauptziele der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung früher Biomarker – wenn nicht gar ganzer Biomarker-Signaturen – über die Detektion molekularer Effekte, die dem Auftreten von Neoplasien vorausgehen und schon zu einem frühen Zeitpunkt spätere Stadien der Leberkanzerogenese reflektieren. Diese Protein-Biomarker sind es, die in der Zukunft traditionelle toxikologische Prüfsysteme mit einer verbesserten Vorhersage kanzerogener Effekte von Chemikalien und Arzneistoffkandidaten unterstützen könnten. Damit werden Voraussetzungen geschaffen, zeitaufwändige Kanzerogenesestudien mittelfristig zu verkürzen und Versuchstiere einzusparen. Aus diesem Grund erschien es in einem weitergehenden Schritt sinnvoll, die Analyse der 2-DE-Gele auf Proteine zu fokussieren, die in dem Lebergewebe sowohl nach drei Wochen der NNM-Exposition wie auch zum

Endpunkt der Studie nach 25 Wochen differentiell exprimiert waren (vergleiche Abbildung D-16 und Tabelle D-3). Zunächst einmal wurden mit der Herunterregulation von F16P, Glycerolkinase, ADK und Pyruvatkinase die mehrfach als präkanzerogene Effekte beschriebenen Veränderungen des zellulären Energie-Stoffwechsels in den Proben beider Studienzeitpunkte detektiert. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach 25 Wochen durch eine verringerte Expression des HSP-verwandten Proteins von 71 kDa, des HSP60 und des Rho-GDI-Dissoziationsinhibitor-Proteins eine weniger sensitive Antwort auf zellulären Stress sowie eine verminderte oder veränderte apoptische Aktivität (Abschnitt 2.2.1). Alle diese Proteine waren nach drei Wochen der NNM-Exposition signifikant hochreguliert.

Die angesprochenen möglichen Veränderungen im Fettsäurestoffwechsel durch eine deutliche Deregulation von GPDA sowie die differentielle Expression von Enzymen der Biotransformation endogener und exogener Stoffe (SUAC, Estrogen-Sulfotransferase) wurde wiederum in den Proben beider Studienzeitpunkte detektiert. Annexin A5 erwies sich zu beiden Zeitpunkten stabil überexprimiert, Ornithinaminotransferase und MUP dagegen jeweils herunterreguliert. Für MUP fiel allerdings auf, dass es in den Proben der Woche 3 mit einem Regulationsfaktor von 0,14, also einer mehr als siebenfach verringerten Expression, in den 2-DE-Gelen mit bloßem Auge kaum noch erkennbar war, während in den Proben der Woche 25 nur noch eine zweifache Herunterregulation festgestellt wurde.

Zusammenfassend lieferte die Analyse 18 Proteine, differentiell exprimiert sowohl in den Proben nach drei Wochen NNM-Behandlung wie auch zum Studienendpunkt nach 25 Wochen. Die biologische Relevanz ihrer veränderten Expression wurde aufgezeigt. Daraus resultiert, dass diese Proteine als einzelne frühe Biomarker oder sogar gemeinsam als charakteristische Signatur zur verbesserten Vorhersage von Prozessen der chemisch induzierten Leberkanzerogenese herangezogen werden könnten. Allerdings sei an dieser Stelle angemerkt, dass diese potentiellen Biomarker als NNM-spezifisch angesehen werden müssen. Eine Evaluierung der Marker in verändertem Gewebe, resultierend aus weiteren Studien mit unterschiedlichen Kanzerogenen, ist daher zur abschließenden Bewertung erforderlich.

## 2.2.4 NNM-Effekte in Tierstudie 2

### 2.2.4.1 Effekte im Verlauf der Zeit

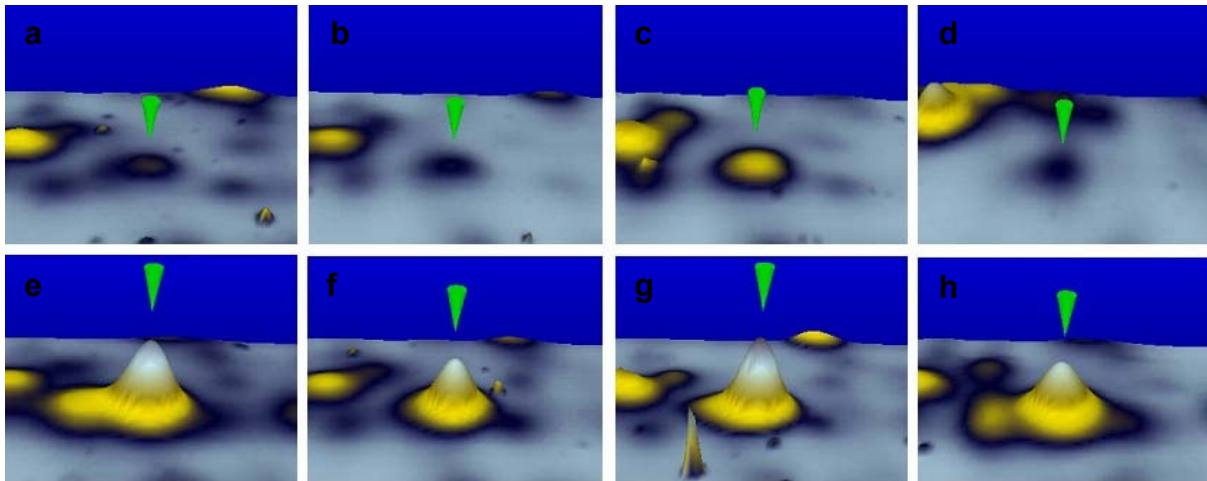
Die 2-DE/MS-Analyse der Leberproben von neun verschiedenen Zeitpunkten der Tierstudie 2, in der die Versuchstiere mit einer geringeren Dosis NNM behandelt wurden, sollte die Beobachtung früh eintretender präkanzerogener molekularer Effekte über den Verlauf der Zeit ermöglichen. Die Auswertung zeigte einen Anstieg der Anzahl differentiell exprimierter Proteine in den Proben von Tag 1 bis hin zu Woche 12, während sich das Expressionsniveau in Woche 20 wieder auf dem von Tag 1 befand und erst danach bis zum Studienendpunkt in Woche 50 wieder leicht anstieg (vergleiche Diagramm in Abbildung D-18). Dies deckt sich mit den Beobachtungen in der ersten Studie und lässt den Schluss zu, dass die Leberzellen während der Behandlung mit NNM über den Zeitraum von sieben Wochen akut toxischem Stress ausgesetzt waren, der mehr und mehr von adaptiven frühen kanzerogenen Prozessen begleitet wurde. Nach Absetzen des NNM erfolgte in den Leberzellen ein Regenerationsprozess, was in der verminderten Anzahl differentiell exprimierter Proteine reflektiert wurde.

Insgesamt wurden sehr viele der in den Proben der Tierstudie 1 deregulierten Proteine auch hier in den Proben der Tierstudie 2 identifiziert. Für einige Proteine wie ADK, SUAC, F16P und das Vorläuferprotein von Apolipoprotein A-I konnte eine differentielle Expression zu mehreren Zeitpunkten festgestellt werden. Für keines der Proteine allerdings konnte das Expressionsniveau in den Proben aller Zeitpunkte ermittelt werden. Hier liegt vermutlich ein großer Nachteil von proteomischen Untersuchungsmethoden im Vergleich zu beispielsweise globalen Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Chiptechnologie. Während letztere immer sämtliche Expressionsdaten aller auf den Chips vorhandenen Genen liefert, muss die differentielle Analyse von 2-DE-Gelen erst Regulationsveränderungen von spezifischen *Spots* offen legen, bevor diese ausgeschnitten, enzymatisch gespalten und letztlich identifiziert werden.

Mit der mehr als zweifachen Überexpression von GST-P in den Proben des Studienendpunkts nach 50 Wochen lieferte die 2-DE/MS-Analyse ein wichtiges Marker-Protein für kanzerogene Prozesse (Sato, 1984, Ito, 1988), das auch schon zur immunhistochemischen Färbung des Lebergewebes zum Einsatz kam (vergleiche Kapitel D, Abschnitt 1.2). Abbildung E-2 zeigt das Protein in



dreidimensionaler Darstellung in den 2-DE-Gelen von vier behandelten Proben (e-h) und den entsprechenden vier Kontrollen (a-d). Warum allerdings in den Proben von Woche 25 der Tierstudie 1 keine erhöhte Expression von GST-P festgestellt werden konnte, bleibt unklar.



**Abbildung E-2: Überexpression von GST-P in behandelten Proben der Woche 50 (Studie 2).**

Dreidimensionale Darstellung der Protein-Spots in den 2-DE-Gelen von (a-d) vier Kontrollen und (e-h) vier behandelten Proben.

#### 2.2.4.2 Dosisabhängigkeit der NNM-Effekte

Die Auswertung der 2-DE-Pherogramme der Leberproben aus Tierstudie 2 lieferte wie bereits beschrieben eine ganze Reihe statistisch signifikant differentiell exprimierter Proteine. Bei genauerer Betrachtung viel jedoch auf, dass wenige dieser Proteine tatsächlich stark dereguliert waren mit Regulationsfaktoren  $\geq 1,7$  oder  $\leq 0,7$ . Noch offensichtlicher wurde diese Diskrepanz beim Vergleich der in den Proben der Woche 3 beider Tierstudien detektierten Effekte. 105 deutlich deregulierten Proteine in Studie 1 standen 21 in Studie 2 gegenüber (vergleiche Abbildung D-19). Einige dieser Proteine waren in beiden Studien in entgegengesetzte Richtungen reguliert, bei Regulation in die gleiche Richtung jedoch erwiesen sich die Proteine aus Studie 1 deutlich stärker dereguliert (vergleiche Tabelle D-5). Während beispielsweise COMT, SUAC, F16P und ADK in den Proben der Studie 1 mehr als zweifach herunterreguliert waren, ergaben sich für dieselben Proteine in Studie 2 nur Regulationsfaktoren zwischen 0,75 und 0,85, also Werte, bei denen sich die Frage aufdrängte, ob es sich überhaupt um biologisch relevante differentielle Expressionen handelte. Die Ergebnisse zeigen deutlich eine Abhängigkeit der mittels 2-DE/MS detektierbaren NNM-induzierten Effekte von der eingesetzten Dosierung. Eine hohe

Dosis NNM korrelierte mit einer großen Anzahl eindeutiger Effekte auf molekularer Ebene, während die niedrigere NNM-Konzentration erheblich weniger Veränderungen hervorrief. Einerseits beweist dies, dass durch Anwendung von Proteomic-Methoden verschiedene Dosisgruppen anhand der Stärke der detektierten Effekte unterscheidbar sind. Andererseits zeigt sich gerade im Hinblick auf das Ziel, Kanzerogenesestudien zu verkürzen, die Relevanz der richtigen Dosiswahl. Wenn Protein-Biomarker als molekulare Signaturen das kanzerogene Potential einer Substanz innerhalb einer reduzierten Prüfdauer von beispielsweise vier Wochen voraussagen sollen, muss eine ausreichend hoch gewählte Dosierung innerhalb kürzester Zeit zur Auslösung früher kanzerogener Prozesse führen.

## 3 SELDI

### 3.1 Methodik

Die mittels SELDI-TOF-MS erstellten Proteinprofile der Leberproben aus beiden Tierstudien sollten die Detektion von  $m/z$ -Signalen ermöglichen, deren Expressionsniveaus die durch NNM induzierten toxischen Effekte reflektieren. Eine verlässliche differentielle Analyse setzt dabei die größtmögliche Reproduzierbarkeit der SELDI-Spektren voraus. Daher wurden, wie auch schon zur Anfertigung der 2-DE-Gele durchgeführt, für alle zur Generierung von SELDI-Profilen nötigen Prozessierungsschritte standardisierte Protokolle erarbeitet und angewendet. Dieselben Proteinextrakte, die mittels 2-DE separiert wurden, kamen für die SELDI-Analyse zum Einsatz. Wie so oft, stellte auch hier die Probenentnahme und Probenvorbereitung einen kritischen Parameter dar. Die Verwendung von Leberproben, gewonnen aus standardisiert durchgeführten Tierversuchen, erwies sich dabei als Vorteil gegenüber der für SELDI-Analysen vielfach eingesetzten humanen Serum-, Plasma- oder Urinproben von Patienten aus klinischen Studien (Li, 2002, Petricoin, 2002, Zhang, 2004 und andere). Für die Entnahme und direkte Weiterverarbeitung von menschlichen Körperflüssigkeiten existieren meist keine standardisierten Protokolle (Veenstra, 2004), was bei wenn auch nur kurzzeitiger unsachgemäßer Lagerung zur Degradation der Proteine führen kann. Solche Degradationsprodukte sind dann im Folgenden als Artefakte in den SELDI-Spektren detektierbar (Veenstra, 2004).

Als geeigneter Chiptyp zur Retention definierter Proteingruppen bezüglich der Anzahl detektierter Signale und ihrer relativen Intensität erwiesen sich die Chips mit Kationenaustauscheroberfläche, die für alle weiteren Analysen verwendet wurden. Eine Fraktionierung der Proben und ihre Profilierung auf verschiedenen chromatographischen Oberflächen hätte durch Verringerung des dynamischen Bereichs sowie durch Erfassung von Proteinen mit anderen physikalisch, chemischen Eigenschaften die Wahrscheinlichkeit zur Detektion signifikant differentiell exprimierter Proteine, repräsentiert in den Signalen der Spektren, erhöht. Allerdings wurde in Anbetracht der großen Probenzahl, verbunden mit einem erhöhten Zeit- und Kostenaufwand, darauf verzichtet. Die Inkubation der Proben auf den Chips, die Dauer und Anzahl der Waschvorgänge zur Beseitigung aller nicht gebundenen Proteine und Verunreinigungen sowie die Wahl der

Pufferzusammensetzungen erfolgte ebenso nach standardisierten Anweisungen wie die Vermessung der Proben selbst. Dazu wurden stets gleiche Geräteeinstellungen bezüglich Laserintensität, der Anzahl aufaddierter Laserschüsse und des Musters der Abrasterung der *Spots* durch den Laser gewählt. Allerdings sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass eine über die Zeit auftretende gewisse „Abnutzung“ des SELDI-Massenspektrometers (Baggerly, 2004) unvermeidlich zu leichten Veränderungen in den Proteinprofilen der Proben aus den jeweiligen Studienzeitpunkten führt. Dies erschwerte vor allem die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Proben aus sehr frühen (ein Tag) und sehr späten (25 bzw. 50 Wochen) Zeitpunkten. Der Einsatz von internen Standards zur Verbesserung der Daten-Normalisierung hätte hierbei unter Umständen Abhilfe schaffen können.

Die Detektion von Signalen im SELDI-Spektrum beschränkt sich auf den Massenbereich von 2 bis ungefähr 20kDa. Daher wird die Technologie häufig als komplementär zur 2-DE angesehen, die kleine Proteine eher schlecht visualisiert (Sato, 2001, von Eggeling, 2001). Einerseits bietet sich daher eine Quelle, noch unentdeckte niedermassige Biomarker ausfindig zu machen (Tirumalai, 2003), andererseits stellt sich die Frage, warum große Proteine, die höchstwahrscheinlich gemäß ihrer Bindungseigenschaften auch auf der Chipoberfläche retentiert werden, nicht detektiert werden können.

Die Proteinprofile der Proben aus beiden Tierstudien lieferten eine Reihe signifikant deregulierter Signale, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen werden soll. Ein großer Nachteil der Technologie allerdings liegt in der fehlenden Möglichkeit zur direkten Identifizierung der Proteine aus komplexen Gemischen (Wetmore und Merrick, 2004). Die Klassifizierung von Krankheiten bzw. Endpunkte der Toxizität beruht auf der reproduzierbaren Veränderung von Signalintensitäten oder sogar dem neuen Erscheinen oder kompletten Verlust ganzer Gruppen von Ionensignalen im SELDI-Spektrum, was den häufig verwendeten Begriff des *Protein-Fingerprintings* (Veenstra und Conrads, 2003) verständlich macht. In vielen Studien, von denen einige bereits beispielhaft angeführt wurden (Li, 2002, Petricoin, 2002), wurde Patientenserum oder -plasma anhand eines charakteristischen Signalmusters nach Krankheiten klassifiziert. Genauso ist in der heutigen modernen Toxikologie die Erstellung einer Datenbank mit Proteinprofilen, die unterschiedliche Mechanismen einzelner Substanzklassen mit gleichem Endpunkt der Toxizität charakterisieren, denkbar. Durch Abgleich der Proteinprofile, resultierend aus Versuchstieren nach

Exposition mit einer unbekanntem Substanz, könnte eine Klassifizierung der jeweiligen Substanz erfolgen. Hinweise auf die Art der induzierten Toxizität zu einem frühen Zeitpunkt im Verlauf einer Tierstudie könnten in der Toxikologie genutzt werden, um Tierversuche weiter zu verkürzen und Versuchstiere einzusparen. Trotzdem stellt sich die Frage, ob das Muster von Signalen allein ausreicht, Effekte vorherzusagen oder gar zu diagnostizieren (Diamandis, 2004, Veenstra, 2003). Vor allem in der klinischen Forschung hätte eine falsche Diagnose, basierend auf einer Ansammlung von Massenwerten, fatale Folgen für den entsprechenden Patienten. Dies unterstreicht den Wert von beispielsweise Immunoassays, die bei Kenntnis der Zielproteine als diagnostische Tests erheblich zur Validierung der Ergebnisse aus SELDI-Analysen beitragen könnten (Baggerly, 2004). Auch in der Toxikologie wäre eine Identifizierung der Signale wünschenswert, um weiter zur Aufklärung molekularer Mechanismen der Toxizität oder der Krebsentstehung beitragen zu können. Dennoch könnten die mittels SELDI-MS erzeugten Proteinprofile in der Arzneimittelentwicklung der Pharmaindustrie einen wesentlichen Beitrag zur toxikologischen Risikoabschätzung liefern. In einer sehr frühen Phase der Entwicklung ist ein Einsatz der SELDI-Technologie trotz der genannten Limitationen durchaus denkbar. Wenn nach dem Hochdurchsatz-*Screening* mehrere Arzneistoff-Kandidaten für eine Weiterentwicklung zur Verfügung stehen, könnten aus SELDI-Analysen gewonnene Verdachtsdaten bezüglich einer bestehenden Lebertoxizität oder gar Kanzerogenität bei der Priorisierung der Substanzen im Hinblick auf die weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden.

### **3.2 Differenziell exprimierte Signale**

Aus Tierstudie 1 wurden die Proben des Start- und Endpunkts der Studie mittels SELDI-TOF-MS analysiert, um charakteristische Signale für induzierte akute Toxizität sowie für chronische Effekte zu ermitteln.

Die Proben der Woche 25 zeigten wesentlich mehr m/z-Signale mit deutlichen Intensitätsunterschieden zwischen Kontrollen und behandelten Proben (Regulationsfaktor  $\leq 0,5$  oder  $\geq 2,0$ ) als die von Tag 1 (Abbildung D-34), was auf die heterogene Zusammensetzung des zum Teil maligne entarteten Lebergewebes zum Studienendpunkt hinweisen könnte. Unabhängig vom untersuchten Zeitpunkt wurden einige Signale nur in dem Gewebe von Kontrollen bzw. nur in den Proben

behandelter Tiere detektiert. Die NNM-Exposition könnte daher zur Induktion bzw. vollständigen Unterdrückung einiger Proteine geführt haben.

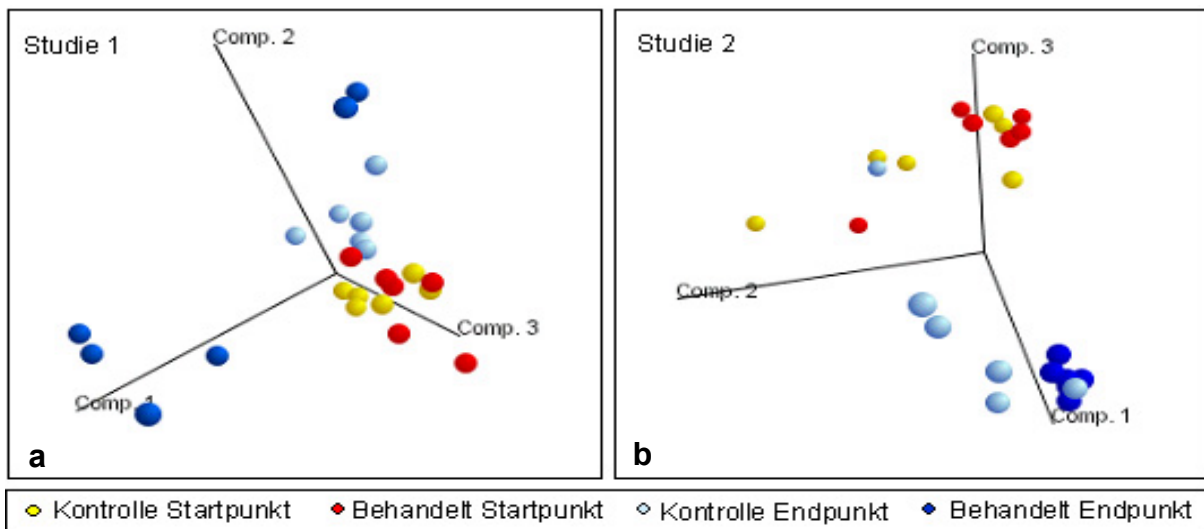
Die verfeinerte Analyse der Spektren von Proben aus Woche 25 unter alleiniger Berücksichtigung der Proben mit Tumoren und der entsprechenden Kontrollen zeigte eindrucksvoll, dass sich einzelne Massen-*Cluster* von Tumor-Proben bezüglich ihrer Signalintensitäten deutlich von den Kontrollproben abgrenzen ließen (Abbildung D-35). Die Signalmuster ermöglichten also eine deutliche Unterscheidung zwischen Tumor- und Kontrollgewebe. Darüber hinaus äußerte sich die Heterogenität des behandelten Lebergewebes in Woche 25 in der Detektion sehr unterschiedlicher Proteinprofile für die einzelnen Proben. Ein Abgleich mit den für die jeweiligen Tiere erhobenen histopathologischen Befunden zeigte, dass durch Einsatz der SELDI-Technologie nicht nur Kontrollen von behandelten Proben unterschieden werden können, sondern anhand der SELDI-Profile der behandelten Proben vielmehr deren Klassifizierung in Neoplasiegewebe, Nicht-Neoplasie-Gewebe und Gewebe mit anderen makroskopischen Befunden möglich war (Abbildung D-49). An dieser Stelle tritt einmal mehr der Wert interdisziplinärer Datenanalyse in den Vordergrund.

Die SELDI-Profile der Proben aus Tierstudie 2 sollten analog zu dem 2-DE/MS-Ansatz die Beobachtung eingetretener Expressionsveränderung über die Zeit erlauben. Auch hier zeigte sich, ähnlich dem durch 2-DE/MS-Analyse beobachteten Verlauf, ein Anstieg der Anzahl differentiell exprimierter Protein-Signale von Tag 1 bis zu einem Maximum in den Proben der Wochen 3 und 8 (Abbildung D-36). Nach Abbruch der NNM-Behandlung und somit nach dem Entzug des toxischen Stimulus wurde die Regenerationsphase in einem rapiden Rückgang deregulierter Proteine in den Wochen 12 und 20 deutlich. Mögliche Prozesse der Krebsentstehung könnten durch den erneuten Anstieg differentieller Expressionen gegen Ende der Studie charakterisiert sein. Dies deckt sich mit den histopathologischen Befunden, die einen Anstieg der Anzahl und Größe GST-P-positiver Zell-Herde mit zunehmender Zeit zeigen konnten (Kapitel D, Abschnitt 1.2).

Wiederum in Einklang mit den Ergebnissen der 2-DE/MS-Analyse, lieferten die SELDI-Spektren der Proben aus Studie 2 zwar einige statistisch signifikante Signale, nur wenige davon waren aber im Vergleich zur Studie 1 stark dereguliert mit Regulationsfaktoren  $\leq 0,5$  oder  $\geq 2,0$ . So zeigt sich auch hier die besondere Bedeutung der richtigen Dosiswahl zur Detektion signifikanter Effekte, die eine

verlässliche Vorhersage toxischer und kanzerogener Effekte und damit die Unterstützung traditioneller toxikologischer Testsysteme ermöglichen könnten.

Der Wert der SELDI-Technologie für die industrielle Toxikologie zum vergleichenden *Screening* und letztlich zur Klassifizierung von Substanzen wurde auch nach der im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes erfolgten biostatistischen Auswertung der Daten deutlich. Die in Abbildung E-3 dargestellte Komponenten-Analyse, in die jeweils die Expressionswerte der SELDI-Spektren aller Proben von Start- und Endpunkt beider Studien eingegangen sind, zeigt eine deutliche Abgrenzung der Proteinprofile von vier behandelten Proben aus Woche 25 der Studie 1 gegenüber den restlichen Proben (a). Hierbei handelte es sich um die vier Tiere, in denen histopathologisch Lebertumore diagnostiziert wurden. Die Profile der beiden verbleibenden behandelten Proben des Studienendpunkts, die weniger gravierende Leberveränderungen aufzeigten, weisen auch nach Komponenten-Analyse große Ähnlichkeiten auf, unterscheiden sich aber deutlich von den Spektren der Tumor-Proben. Für Studie 2 konnten die Profile der Kontrollen sowie die der behandelten Proben des Studienendpunkts (Woche 50) zwar voneinander abgegrenzt werden, jedoch fallen die Unterschiede wesentlich schwächer aus als in Studie 1. So zeigte auch die Komponentenanalyse der SELDI-Profile eine deutliche Dosisabhängigkeit der detektierbaren Effekte.



**Abbildung E-3: Komponentenanalyse der SELDI-Profile beider Studien.**

In die Analyse eingegangen sind die Daten der SELDI-Spektren aller Proben von Start- und Endpunkt der Studien, d.h. für Studie 1 (a) Tag 1 und Woche 25, für Studie 2 (b) Tag 1 und Woche 50. Jede Kugel der dreidimensionalen Diagramme repräsentiert die Werte aus allen technischen Replikaten einer Probe. Die Kontrollen und behandelten Proben von Tag 1 sind in gelb und rot dargestellt, Kontrollen und behandelte Proben aus Woche 25 bzw. Woche 50 in hell- und dunkelblau. Je größer die Expressions-Unterschiede zwischen zwei Proben ausfallen, desto weiter ist auf den Achsen ihr Abstand voneinander.

### 3.3 SELDI und Proteinidentifizierung

Wie bereits unter Abschnitt 3.1 beschrieben, würde die Kenntnis über die Identität der in den SELDI-Signalen repräsentierten differentiell exprimierten Proteine ermöglichen, einen biologischen Zusammenhang zwischen dem jeweiligen identifizierten Protein und den induzierten NNM-Effekten herzustellen. Neben der Erfüllung der Forderung nach Biomarkern mit biologischer Relevanz könnte damit zur Aufklärung toxischer Mechanismen beigetragen werden. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit einige experimentelle Ansätze zur Identifizierung verfolgt. Zunächst sollte eine zweidimensionale chromatographische Auftrennung über Kationentauscher- und Umkehrphasensäule die Komplexität des Proteinlysats verringern, um dann anschließend die in den Fraktionen enthaltenen Proteine nach Verdau in Lösung mittels MALDI-MS/MS zu identifizieren. Im Folgenden sollten die nach Datenbanksuche erhaltenen theoretischen Molekulargewichte der Proteine mit den im SELDI-Spektrum der Fraktionen detektierten  $m/z$ -Werten korreliert werden. Als erste Hürde des Vorhabens erwies sich die Fraktionierung der Proben, da keine saubere zweidimensionale Trennung der Proteine erreicht wurde (Abbildung D-38). Die Gründe hierfür sind nicht eindeutig, ein Erklärungsansatz liegt in der enormen Probenkomplexität. Aus den erhaltenen RP-Fraktionen ließen sich SELDI-Profile der enthaltenen Proteine erstellen sowie nach enzymatischer Spaltung eine beachtliche Anzahl Proteine identifizieren. Allerdings war die Korrelation der theoretischen Molekulargewichte mit den  $m/z$ -Werten der Signale im SELDI-Spektrum nur für Acyl-CoA Bindeprotein, Ubiquitin und 10 kDa Hitzeschockprotein möglich. Dies lässt sich vor allem dadurch erklären, dass mit MALDI-MS/MS-Analyse der Fraktionen hauptsächlich Proteine mit einem hohen Molekulargewicht ( $> 30$  kDa) identifiziert wurden. Große Proteine lieferten durch tryptischen Verdau mehr Peptide als kleine, waren somit bei der Datenbanksuche überrepräsentiert und wurden daher mit größerer Wahrscheinlichkeit identifiziert als ebenfalls in den Fraktionen enthaltene kleine Proteine. Allerdings sind nur die kleinen Proteine durch SELDI-TOF-Analyse detektierbar. Mit beiden Technologien wurden Proteine aus grundsätzlich verschiedenen Betrachtungsfenstern überrepräsentiert, was eine Korrelation der Ergebnisse erheblich erschwerte. Daher war dieser Identifizierungs-Ansatz wenig zielführend.

Als weitere Möglichkeit zur Identifizierung sollte eine bereits beschriebene Anreicherung spezifischer Proteine auf der SELDI-Chipoberfläche durch Optimierung



von pH-Wert und Salzkonzentration erfolgen (Weinberger, 2002). Diese selektiven Bedingungen sollten dann auf ein LC-System übertragen und die auf der Säule angereicherten Proteine zur weitergehenden Identifizierung eluiert werden. Allerdings scheiterte der erläuterte Versuchsansatz schon daran, dass aufgrund der Komplexität der Probe und damit auch des SELDI-Spektrums keine selektive Anreicherung von einzelnen Proteinen erreicht werden konnte.

Vielversprechender erschien dagegen die Identifizierung nach passiver Elution von intakten Proteinen aus SDS-PAGE-Gelen. Aus dem Eluat konnte im SELDI-Spektrum der  $m/z$ -Wert des jeweiligen ionisierten Proteins detektiert, aus dem verbleibenden Gelstück dagegen das Protein nach tryptischem Verdau durch MALDI-MS identifiziert werden. Dies ermöglichte eine direkte und eindeutige Korrelation des im SELDI-Spektrum detektierten  $m/z$ -Werts mit dem nach Datenbanksuche erhaltenen theoretischen Molekulargewicht. Ein Protokoll zur optimalen passiven Protein-Elution sowie zur parallelen Durchführung der Detektion des jeweiligen Proteins im SELDI-Spektrum und dessen Identifizierung wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit entwickelt (Kapitel D, Abschnitt 6.2). Die Elution mit Tris-HCl in Kombination mit 0,1% SDS erwies sich als weitaus effektiver im Vergleich zur vielfach als geeignete Methode beschriebenen Elution mit FAPH (Galvani, 2000, Ehring, 1997, Cohen und Chait, 1997). Die passive Elution von unbekanntem Proteinen mit dem erarbeiteten Protokoll führte zur Identifizierung einer ganzen Reihe von Proteinen wie Superoxid Dismutase, *Fatty acid binding protein*, Phosphatidylethanolamin-Bindeprotein, Phenylpyruvat-Tautomerase, Glutathion S-Transferase, COMT und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Allerdings konnten letztlich nur wenige der identifizierten Proteine den Signalen im komplexen Gesamtspektrum eines kompletten Leberextraktes zugeordnet werden. Diese fehlende Zuordnung stellt das eigentliche Problem bei der Identifizierung von Proteinen, repräsentiert in SELDI-Signalen, dar. Während nach passiver Elution das jeweilige Protein in isolierter Form auf dem SELDI-Chip detektiert wird, kann das entsprechende Signal im Spektrum des kompletten Leberlysats nicht mehr auffindig gemacht werden. Dies lässt sich vermutlich damit erklären, dass in der Gesamtprobe einige Proteine vorrangig ionisiert und damit detektiert werden bzw. dass sich aufgrund der enormen Komplexität des Proteingemischs Signale teilweise auch überlagern können. Für keines der wenigen Signale des Gesamtspektrums, denen letztlich ein identifiziertes Protein zugeordnet werden konnte, wurde nach

---

Auswertung der Proteinprofile eine differentielle Expression nachgewiesen, obwohl sich beispielsweise COMT nach 2-DE/MS-Analyse durchaus als dereguliert erwiesen hatte.

Als Schlussfolgerung nach näherer Betrachtung der Ergebnisse lässt sich festhalten, dass das SELDI-System eine brauchbare Technologie darstellt, vergleichende Proteinprofile einer großen Anzahl von Proben innerhalb relativ kurzer Zeit zu erstellen und Biomarker-Signaturen ausfindig zu machen, die zur Klassifizierung von Kontrollgewebe oder behandelten Proben herangezogen werden konnten. Dies erscheint vielversprechend in Bezug auf die Integration der SELDI-Technologie in toxikologische Prüfsysteme zum vergleichenden *Screening* von Testsubstanzen. Die Identifizierung differentiell exprimierter Proteine, repräsentiert in einer ganzen Reihe Signale, gestaltete sich allerdings weniger erfolgreich und ist zudem mit einem enormen Zeitaufwand verbunden. Wie bereits erwähnt, sollten sich Biomarker-Proteine durch ihre biologische Relevanz auszeichnen, die in diesem Fall aufgrund mangelnder Identifizierung aussteht. Vielversprechender könnte die Identifizierung unter anderem durch Anwendung von passiver Elution dann sein, wenn bekannte, spezifische einzelne diagnostische Marker gesucht werden. Hierbei wäre sogar eine immunologische Immobilisierung auf Chips mit speziellen Oberflächen denkbar.

## 4 Prävalidierung der 2-DE/MS-Biomarker

Proteomic-Technologien halten in immer mehr Forschungsgebiete Einzug (Hanash, 2003). Wissenschaftler erhoffen sich dadurch ein vertieftes Verständnis der den verschiedensten Krankheiten zugrunde liegenden pathogenen Mechanismen, eine schnellere und verbesserte Diagnose der Krankheiten sowie Fortschritte in der Arzneistoffentwicklung durch Identifizierung neuer Zielstrukturen. Auch in der Toxikologie wächst der Einsatz von Methoden der Proteomforschung, wie einige Übersichtsartikel eindrucksvoll belegen (Wetmore und Merrick, 2004, Kennedy, 2002). Im Vordergrund steht bei den meisten „Toxicoproteomic“-Studien die Identifizierung einer ganzen Reihe von Proteinen, die als Biomarker einen bestimmten Mechanismus der Toxizität charakterisieren (Wetmore und Merrick, 2004). Allerdings sollte die reine Identifizierung der Proteine nur den Beginn eines längeren Prozesses darstellen (Srinivas, 2001). Eine genaue Analyse der Daten ist dahingehend erforderlich, die identifizierten Proteine in einen biologischen Zusammenhang mit den für die untersuchte Substanz charakteristischen Toxizitäts-Mechanismen zu stellen. Außerdem sollten die potentiellen neuen Biomarker einer Prävalidierung durch andere, unabhängige Methoden unterzogen werden, um die Ergebnisse eines einzelnen Proteomic-Ansatzes mit anderen zu untermauern (Bouchie, 2004, Walgren und Thompson, 2004).

In der vorliegenden Arbeit führte der Einsatz der 2-D-Elektrophorese, gekoppelt mit MALDI-MS, zur Identifizierung einer beträchtlichen Anzahl von Protein-Biomarkern, deren möglicher Beitrag zu Mechanismen der Leberkanzerogenese bereits ausführlich beschrieben wurde (vergleiche Abschnitt 2.2). Zur Bestätigung der mittels 2-DE/MS-Analyse detektierten Expressionsveränderungen in NNM-exponiertem Lebergewebe kamen nun als weitere proteomische Methoden der immunologische Nachweis der Biomarker-Proteine durch *Western Blotting* sowie die MS-basierte Quantifizierung mittels iTRAQ-Technologie zur Anwendung. Im Vordergrund des Interesses stand hierbei eine Prävalidierung der potentiellen frühen Biomarker, die in den Proben der Tierstudie 1 sowohl nach drei Wochen der Behandlung wie auch zum Studienendpunkt in Woche 25 differentiell exprimiert waren. Inwieweit einige der ermittelten Proteinexpressionsdaten mit der Expression auf Genebene korrelierte, wurde durch TaqMan-PCR überprüft.

## 4.1 Prävalidierung durch Western Blotting

Als erste Hürde des immunologischen Nachweises der differentiell exprimierten Proteine erwies sich die Tatsache, dass nur gegen acht der 18 potentiellen frühen 2-DE/MS-Biomarker Antikörper kommerziell erhältlich waren. Nur wenige davon zeigten trotz eingehender Optimierung von Inkubationszeiten, Waschvorgängen und Pufferzusammensetzungen eine spezifische Anfärbung des jeweiligen Proteins. Lediglich MUP, F16P, Pyruvatkinase und Rho-GDI-Dissoziationsinhibitor wurden von den Antikörpern mit erkennbaren Expressionsveränderungen detektiert (Abbildung D-21). Ein Vergleich mit den aus der 2-DE/MS-Analyse resultierenden Expressionsdaten zeigte (Tabelle D-10), dass die Herunterregulation von MUP in den Proben der Woche 3 und Woche 25 durch *Western Blotting* bestätigt werden konnte. Vor allem für die Proben der Woche 3 zeigte die Auswertung der 2-D-Gele mit einem Regulationsfaktor von 0,17 eine stark verminderte Expression des Proteins, was sich im *Western Blot* dahingehend bestätigte, dass MUP in den Proben dieses Zeitpunkts gar nicht detektiert werden konnte. Für die Proben der Woche 25 legte der immunologische Nachweis im Vergleich zu den Kontrollen eine leicht verminderte Expression des Proteins offen, was mit dem aus der Analyse der 2-DE-Gele resultierenden Regulationsfaktor von 0,49 korrelierte.

Für F16P wurde mittels *Western Blotting* für die Proben beider Zeitpunkte eine leicht verminderte Expression festgestellt, was sich weitestgehend mit den Daten aus dem 2-DE/MS-Ansatz deckte. Aus diesem resultierten für das Protein Regulationsfaktoren von 0,64 für die Proben aus Woche 3 und 0,68, 0,69 und 0,68 für drei *Spots* in den Gelen der Proben aus Woche 25. Im Gegensatz dazu konnten die Regulationsveränderungen von Pyruvatkinase und Rho-GDI-Dissoziationsinhibitor nur für die Proben aus Woche 3 annähernd bestätigt werden. Pyruvatkinase zeigte in den 2-DE-Gelen der Proben aus Woche 3 eine deutlich verringerte, in denen der Proben des Studienendpunkts eine leicht verringerte Expression. Der immunologische Nachweis des Proteins bestätigte die Herunterregulation nach drei Wochen der NNM-Behandlung, am Studienendpunkt jedoch konnte für das Protein auf dem *Western Blot* keine differentielle Expression festgestellt werden. Ebenso konnte die durch 2-DE/MS-Analyse ermittelte Hochregulation des Rho-GDI-Dissoziationsinhibitors in den Proben der Woche 3 durch *Western Blotting* gezeigt werden, die erwartete verringerte Expression am Studienendpunkt hingegen jedoch nicht.

Zusammenfassend konnten durch *Western Blotting* nur zwei der potentiellen frühen Biomarker für beide Studienzeitpunkte in ihrer Regulation bestätigt und damit prävalidiert werden. Die Tatsache, dass viele der gewünschten Antikörper gar nicht verfügbar waren und sich außerdem die meisten vorhandenen Antikörper nach zeitaufwändigen Optimierungsmaßnahmen aufgrund mangelnder Spezifität für weitergehende Experimente als ungeeignet erwiesen, ließen Zweifel an der Eignung des *Western Blottings* als Methode zur Prävalidierung einer relativ großen Palette potentieller Biomarker aufkommen.

## 4.2 Prävalidierung durch quantitative MS

Vielversprechender erschien eine Prävalidierung der 2-DE/MS-Biomarker durch Einsatz der iTRAQ-Technik. Sie ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung von Hunderten Proteinen in bis zu vier Proben gleichzeitig. Dies wird als Vorteil gegenüber anderen MS-basierten Quantifizierungsstrategien wie beispielsweise ICAT gesehen (Ross, 2004), bei denen zwei sich in ihrer Isotopenzusammensetzung unterscheidende Reagenzien zur Derivatisierung der Proteine oder Peptide zur Verfügung stehen, so dass sich der simultane Vergleich der Proteinexpression nur auf zwei Proben beschränkt. Zwar können auch nach differentieller Analyse mittels ICAT-Reagenzien im Endeffekt mehrere Experimente miteinander verglichen werden, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit groß, dadurch in den einzelnen Ansätzen unterschiedliche Peptide und Proteine zu identifizieren (Ross, 2004).

Da die iTRAQ-Reagenzien mit jeder freien Aminogruppe reagieren können, wird die iTRAQ-Technologie im erneuten Vergleich mit ICAT als globalere Derivatisierungs-Strategie betrachtet. ICAT-Reagenzien derivatisieren durch eine Reaktion mit Sulfhydrylgruppen nur Cystein-haltige Peptide, was die Anzahl an Proteinen, die letztlich der Analyse zugänglich gemacht werden, enorm verringert (DeSouza, 2004). Alle mittels iTRAQ-Reagenzien derivatisierten Peptide sind isobar und daher weder chromatographisch noch im PMF-Spektrum unterscheidbar (Ross, 2004), ergeben aber nach Fragmentierung im MS/MS-Modus niedermassige Ionensignale, anhand derer die individuellen Bestandteile der einzelnen Proben identifiziert und quantifiziert werden können. Die Komplexität der Massenspektren wird durch die iTRAQ-Reagenzien nicht zusätzlich erhöht (Ross, 2004), was wiederum im Gegensatz zur ICAT-Strategie steht, bei der die derivatisierten Peptidionen desselben Proteins mit unterschiedlichen  $m/z$ -Werten detektiert werden. Ein Nachteil der iTRAQ-Technik ist

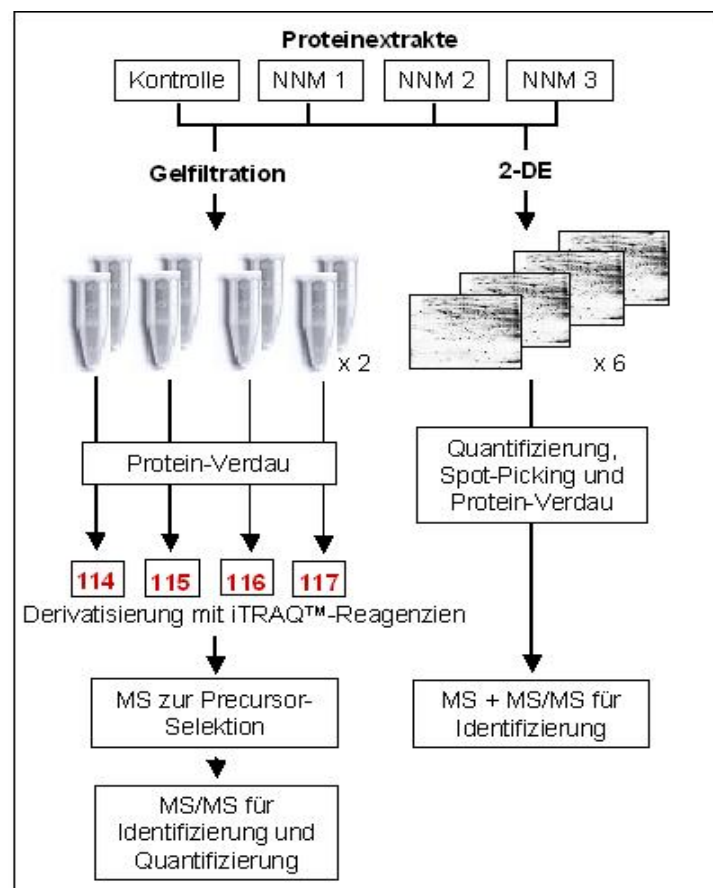
allerdings, dass von allen Signalen MS/MS-Spektren aufgenommen werden müssen unabhängig davon, ob tatsächlich eine differentielle Expression vorliegt oder nicht (Ross, 2004). Dadurch wird die Durchführung eines iTRAQ-Experiments sehr zeitintensiv und ist zudem, wenn für die Generierung der MS/MS-Spektren sowie für die sich anschließende Analyse kein hoher Automatisierungsgrad vorliegt, mit einem enormen Arbeitsaufwand verbunden.

Die Reproduzierbarkeit der Methode konnte anhand eines Testexperimentes gezeigt werden, das in der vorliegenden Arbeit mit vier Proben im Duplikat durchgeführt wurde. Mit 101 Proteinen im ersten und 130 im zweiten Ansatz wurde annähernd die gleiche Anzahl an Proteinen identifiziert. Die weitere Auswertung verdeutlichte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse insofern, als die für die einzelnen Proteine im Vergleich zu einer Referenzprobe ermittelten Regulationsfaktoren in beiden Experimenten nahezu identisch waren (Abbildung D-28).

Die iTRAQ-Technik wurde vorrangig zur Prävalidierung der Ergebnisse der 2-DE/MS-Analyse der Proben aus Woche 3 eingesetzt. Die dabei ermittelten potentiellen frühen Biomarker-Proteine sollten in ihrer Regulation überprüft und gegebenenfalls bestätigt werden. Dazu wurden drei biologische Replikate aus Woche 3 mit einer entsprechenden Kontrollprobe in einem experimentellen Ansatz vergleichend analysiert. Die Abbildung E-3 zeigt zusammenfassend den experimentellen Ablauf für die iTRAQ- sowie der 2-DE/MS-Analyse der Proben aus Woche 3. Für den iTRAQ-Ansatz erfolgte eine Vorfraktionierung der Proben durch Gelfiltration. Einerseits wurden dabei durch die Verwendung eines Phosphatpuffers bei pH 7,0 keine beim Verdau, beim Derivatisierungsprozess oder bei der folgenden massenspektrometrischen Vermessung störenden Bestandteile eingebracht. Andererseits ermöglichte die Vorfraktionierung durch Gelfiltration für die weitere Analyse die Auswahl von Fraktionen, deren enthaltene Proteine am besten mit der auch auf den 2-DE-Gelen darstellbaren Molekulargewichtsverteilung korrelierten. Im Hinblick auf den qualitativen als auch quantitativen Vergleich zwischen den Ergebnissen aus iTRAQ- und 2-DE/MS-Analyse erschien dies sinnvoll. Die Analyse der beiden daraufhin ausgewählten Fraktionen führte bei einer Einstellung des Vertrauensintervalls auf 50% zur Identifizierung und Quantifizierung von insgesamt 650 Proteinen (vergleiche Kapitel D, Abschnitt 4.4). Nur 46 Proteine wurden in beiden Fraktionen detektiert, was auf eine saubere Vorfraktionierung hinweist. 35%

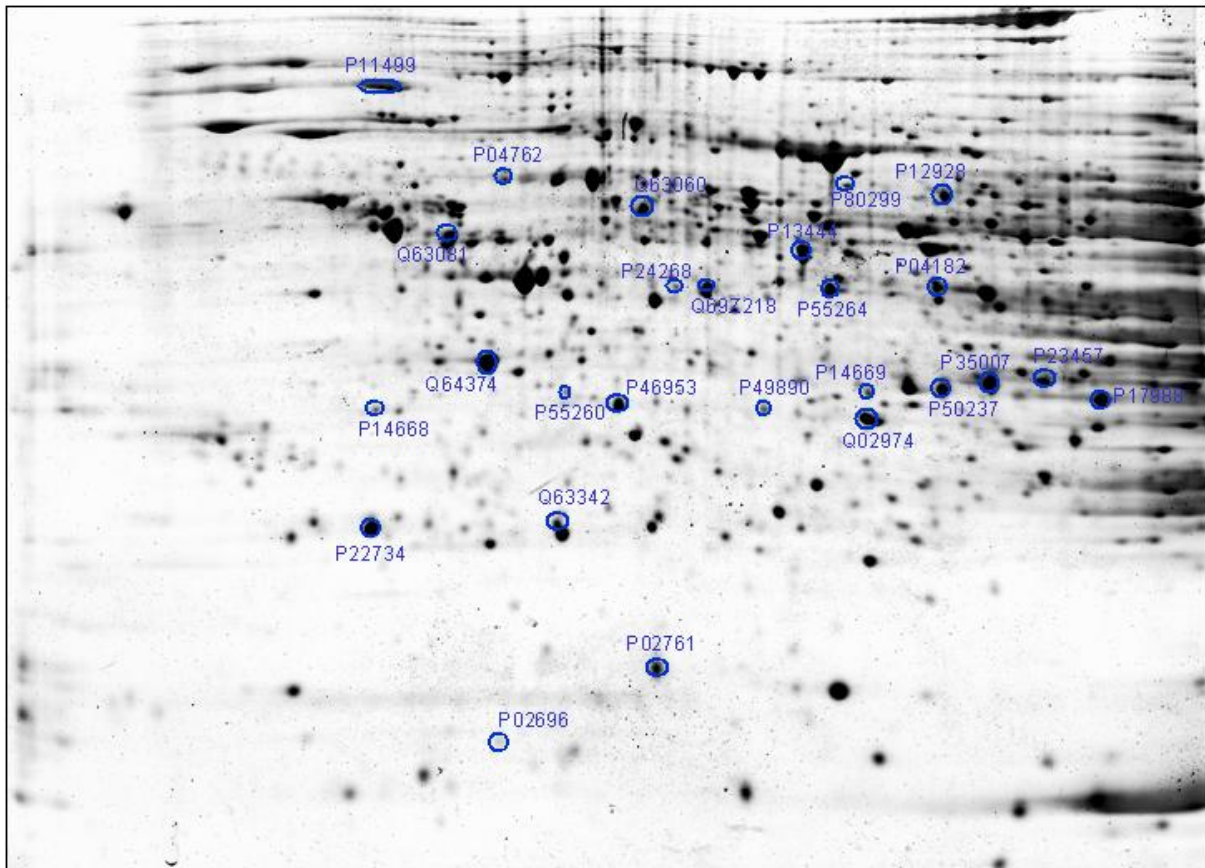
der Proteine wurden anhand mehrerer Peptide identifiziert, was das Vertrauen in die Korrektheit dieser Ergebnisse signifikant erhöhte.

In den Proben der Woche 3 wurden durch 2-DE/MS-Analyse 65 differentiell exprimierte Proteine identifiziert. Da einige davon in den 2-DE-Gelen durch mehrere Spots repräsentiert und daher wiederholt identifiziert wurden, resultierten nach Abzug dieser Mehrfachidentifizierungen noch 57 deregulierte unterschiedliche Protein-Spezies. Davon wurden 36 (63%) Proteine auch mit iTRAQ-Analyse detektiert, 26 (46%) konnten bezüglich ihrer im 2-DE-Gel beobachteten Regulation bestätigt werden (vergleiche Abbildung D-48). Abbildung E-4 zeigt die prävalidierten Biomarker-Proteine in dem 2-DE-Gel einer Probe aus Woche 3.



**Abbildung E-4: Experimenteller Ablauf der 2-DE/MS- und der iTRAQ-Analyse.**

Für die iTRAQ-Analyse wurden die Proben mittels Gelfiltration vorfraktioniert. Zwei Fraktionen jeder Probe wurden ausgewählt, die enthaltenen Proteine trypsinisiert und die Peptide anschließend mit den vier verschiedenen Reagenzien derivatisiert. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte im MS/MS-Modus nach Auswahl der zu fragmentierenden Vorläuferionen. Die 2-DE-Gele wurden ohne vorangehende Fraktionierung in vier technischen Replikaten angefertigt, gefolgt von der differentiellen Analyse zur Quantifizierung und dem enzymatischen Verdau deregulierter Proteine. Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch kombinierte MALDI-MS und MS/MS-Analysen.



**Abbildung E-5: Mittels iTRAQ-Technologie prävalidierte frühe Biomarker.**

Die Regulation der aus der 2-DE/MS-Analyse der Proben aus Woche 3 hervorgegangenen frühen Biomarker-Proteine konnte durch Einsatz der iTRAQ-Technologie bestätigt werden.

Vor allem die Regulation von HSP 90 $\beta$ , das in Folge des durch NNM induzierten zellulären Stresses vermehrt gebildet wurde (Liang und MacRae, 1997), sowie die erhöhte Expression der Annexine (A3, A4, A5) konnten durch Anwendung der iTRAQ-Technologie eindrucksvoll bestätigt werden. Ebenso zeigten die in den anabolen und katabolen Energie-Stoffwechsel involvierten Proteine wie ADK, COMT, Kethexokinase sowie die an der Metabolisierung endogener und exogener Stoffe beteiligten Enzyme SUAC, Aryl-Sulfotransferase und Estrogen-Sulfotransferase mit beiden Quantifizierungsstrategien nahezu identische Regulationsfaktoren. Der Beitrag dieser Proteine zum Prozess der Leberkanzerogenese wurde in Abschnitt 2.2.2 bereits ausführlich beschrieben.

Insgesamt konnte die Regulation der 18 potentiellen prädiktiven Biomarkern, die sowohl in den Proben der Woche 3 als auch zum Studienendpunkt in Woche 25 differentiell exprimiert waren, mittels iTRAQ-Technologie für 11 der Proteine untermauert werden (Abbildung D-48).



20 der auf den 2-DE-Gelen deregulierten Proteine wurden durch iTRAQ-Analyse nicht identifiziert. Dies ist sicherlich einerseits dadurch zu erklären, dass die Proteine aus dem Lebergewebe für die Anwendung beider Methoden mit unterschiedlich zusammengesetzten Puffern extrahiert wurden. Der Einsatz des für die 2-DE verwendeten Harnstoff/Thioharnstoff-Lysispuffers, der eine stringente Extraktion von möglichst allen im Gewebe enthaltenen Proteine ermöglichte, war für die iTRAQ-Technologie aufgrund der sowohl bei der chromatographischen Vorfraktionierung wie auch der späteren MS-Analyse störenden Inhaltsstoffe nicht möglich. Andererseits wurden insgesamt nur zwei der nach Gelfiltration erhaltenen Fraktionen analysiert, so dass ein endgültiger Vergleich der mit beiden Methoden identifizierten Proteine daher erst nach Analyse der übrigen Fraktionen möglich wäre. Obwohl durch Gelfiltration eine gute Auftrennung des komplexen Leberlysats erreicht werden konnte, wäre für folgende Experimente eine noch effektivere Vorfraktionierung über IEF-Säulen denkbar. Separierte Proteine aus dem gleichen pH-Bereich wie die für die 2-DE verwendeten IPG-Streifen sollten eine bessere Korrelation liefern. Dieser Ansatz würde eine effektivere Überschneidung der mit beiden Strategien betrachteten Proteom-Ausschnitte bedingen und daher die Voraussetzungen für den Vergleich beider Technologien weiter optimieren.

10 der auch durch den iTRAQ-Ansatz identifizierten Proteine konnten bezüglich der im 2-DE-Gel beobachteten Regulation nicht bestätigt werden. Verschiedene posttranslationale Modifizierungen können im 2-DE-Gel zu einer Repräsentation desselben Proteins durch mehrere *Spots* führen. Durch differentielle Analyse der Gelbilder kann die Regulation jeder einzelnen modifizierten Form des jeweiligen Proteins ermittelt werden. Eine Deregulation der einen Variante bei gleichzeitiger unveränderter Expression der anderen ist durchaus denkbar und wurde auch im Verlauf der vorliegenden Arbeit mehrfach beschrieben. Die mit den iTRAQ-Reagenzien derivatisierten Peptide lassen sich allerdings chromatographisch nicht zwangsläufig aufgrund kleiner molekularer Veränderungen trennen, so dass unterschiedlich modifizierte Peptide unter Umständen gemeinsam identifiziert und vor allem quantifiziert werden. Abweichende Regulationen der modifizierten Formen in die eine oder die andere Richtung könnten sich so gegebenenfalls aufheben, was eine Bestätigung der im 2-DE-Gel beobachteten Regulation der einzelnen modifizierten Varianten erschweren würde. Diese Betrachtung liefert auch einen Erklärungsansatz für das beobachtete Phänomen, dass einige der mittels iTRAQ-Analyse

identifizierten Proteine in der Tendenz weniger stark dereguliert waren als im 2-DE-Gel.

Vom vorrangigen Ziel der Prävalidierung der 2-DE/MS-Biomarker einmal abgesehen, sollte an dieser Stelle bemerkt werden, dass die Analyse der Proben aus Woche 3 mittels iTRAQ-Technologie insgesamt annähernd 100 differentiell exprimierte Proteine mit Regulationsfaktoren  $\geq 1,5$  und  $\leq 0,6$  lieferte. Darunter befanden sich Aflatoxin B1 Aldehyd-Reduktase, GST-P und Carbonic-Anhydrase, alles Proteine, deren Expressionsveränderungen ein wesentlicher Beitrag zum Prozess der Leberkanzerogenese zugeschrieben wird (Kelly, 2000, Sato, 1984, Ito, 1988, Kuo, 2003). Die Ergebnisse unterstreichen den Wert der iTRAQ-Technologie als weitere Methode der Proteomforschung zur Identifizierung neuer Biomarker. Allerdings würde im Fall der vorliegenden Arbeit der Einsatz dieser Quantifizierungsstrategie für eine umfassende, statistisch fundierte, differentielle Analyse ein anderes experimentelles Design in Form einer erhöhten Anzahl biologischer wie technischer Replikate erforderlich machen. Für das vorrangige Ziel der Prävalidierung bereits identifizierter Biomarker jedoch sollte der verwendete Versuchsaufbau ausreichend gewesen sein.

### **4.3 Vergleich der Gen- und Proteinexpression**

Die Gensequenzen einiger ausgewählter mittels 2-DE/MS detektierter Protein-Biomarker wurden unter Einsatz von TaqMan-PCR amplifiziert und quantifiziert, um einen Vergleich der Gen- und Proteinexpressionsdaten anzustellen. Mit dem vermehrten Einsatz von Methoden der Proteomforschung zur Identifizierung neuer Protein-Biomarker stellt sich häufig die Frage, ob eine detektierte Expressionsveränderung auf Ebene des translatierten Proteins zwangsläufig auch mit der differentiellen Expression des entsprechenden Gens einhergehen muss (Ideker, 2001, Griffin, 2002, Chen, 2002, Tian, 2004). Die alleinige Deregulation eines Proteins durch beispielsweise eine posttranslational verstärkte oder verringerte Bildung einer modifizierten Variante ist durchaus denkbar (Parekh und Rohlf, 1997). Allerdings würde die simultane Expressionsveränderung auf Protein- und Genniveau in der Identifizierung wirklich robuster Biomarker resultieren, die definierte molekulare Prozesse valide charakterisieren (Griffin, 2002).

Die TaqMan-PCR-Analyse erfolgte für Zielsequenzen von SUAC, Annexin A3 und A5 sowie Adenosinkinase in Proben der Zeitpunkte Tag 1, Woche 3 und Woche 25 der Studie 1 sowie Woche 1, Woche 3 und Woche 8 der Tierstudie 2.

Für einzelne Studienzeitpunkte lieferte die Analyse der 2-DE-Gele für die jeweiligen Proteine keine Expressionswerte, was an dieser Stelle den bereits unter 2.2.4.1 beschriebenen Nachteil der 2-DE/MS-Technologie aufzeigt, dass Proteine nur identifiziert werden, wenn sie im Verlauf der Auswertung der 2-DE-Pherogramme als dereguliert detektiert wurden. Wenn allerdings beide Expressionswerte zur Verfügung standen, zeichnete sich durchweg eine gute Korrelation der Ergebnisse aus 2-DE/MS-Analyse und TaqMan-PCR ab (Tabelle D-11). So wurde beispielsweise für Annexin A3 im 2-DE-Gel der Proben von Woche 3 (Tierstudie 1) ein Regulationsfaktor von 2,25 und durch TaqMan-PCR ein Faktor von 2,84 ermittelt. Korrespondierend dazu ergab sich für das Protein in den Proben des gleichen Zeitpunkts der Studie 2 durch 2-DE ein Faktor von 1,42, durch PCR ein Faktor von 1,79. An dieser Stelle sei zusätzlich angemerkt, dass die im Rahmen des BMBF-Verbundprojekts bei der Bayer AG durchgeführte globale Genexpressionsanalyse mittels cDNA-Chiptechnologie für Annexin A3 ebenfalls nahezu identische Expressionswerte lieferte. Annexin A5 wurde sowohl mit TaqMan-PCR als auch durch die globale Genexpressionsanalyse um ein Vielfaches stärker differentiell exprimiert angezeigt als durch 2-DE/MS-Analyse, allerdings war die Richtung der Regulation in allen drei Ansätzen gleich. Gute Korrelationen zwischen den Ergebnissen aller drei Technologien ergaben sich des Weiteren für SUAC und Adenosinkinase. Letzteres wurde lediglich für die Proben aus Woche 25 der Studie 1 durch TaqMan-PCR und 2-DE/ME-Analyse mit Regulationen in entgegengesetzte Richtungen detektiert.

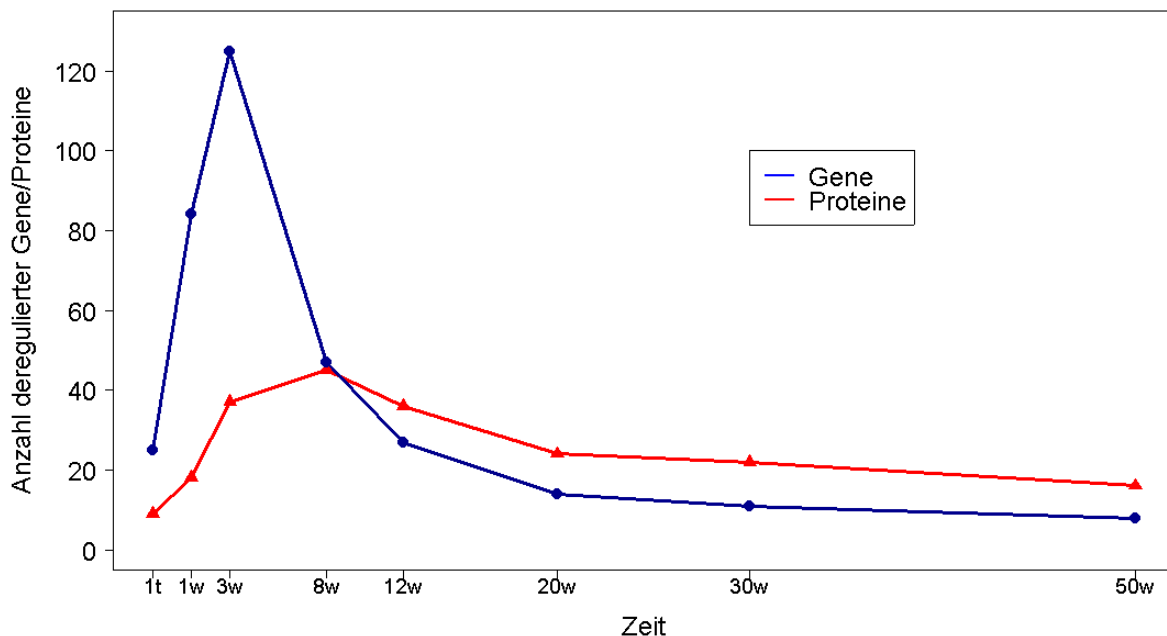
Übereinstimmend mit den Resultaten der 2-DE/MS- und der SELDI-Analyse wurden auch durch TaqMan-PCR in den Proben aus Woche 3 der Tierstudie 1 jeweils stärkere Deregulation der Gene als in Studie 2 detektiert (Abbildung D-47 und Tabelle D-11). Als Beispiel seien hier die Regulationen von Annexin A5 und SUAC genannt. Annexin A5 war nach drei Wochen der Behandlung in Studie 1 im Vergleich zur Kontrolle 15fach überexprimiert, in Studie 2 dagegen nur etwas mehr als zweifach. Eine ähnliche Diskrepanz zeigte sich für SUAC, das in Studie 1 sechsfach, in Studie 2 dagegen nur 1,2fach herunterreguliert war. So reflektieren auch die

Resultate der Genexpressionsanalyse eine deutliche Dosisabhängigkeit der detektierten Effekte.

In der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund der Fokussierung auf proteomische Untersuchungsmethoden nur wenige Gene quantifiziert. Allerdings lieferten die globalen Genexpressionsanalysen bei Bayer Daten, die an dieser Stelle ebenfalls zu einem Vergleich mit den Proteinexpressionwerten herangezogen werden sollen. Mit dem vorrangigen Anliegen, die durch 2-DE/MS-Analyse detektierten frühen Biomarker in ihrer Regulation zu bestätigen, zielt dieser Abgleich erneut auf die Expressionsveränderung nach drei Wochen NNM-Behandlung (Studie 1). Tabelle E-1 führt die mittels cDNA-Chiptechnologie ermittelten Regulationsfaktoren für die Gene der 2-DE/MS-Biomarker vergleichend auf. 14 der Proteine standen auf den cDNA-Chips, die insgesamt 8000 verschiedene Gensequenzen repräsentierten, nicht als Genabschnitt zur Verfügung, so dass in diesem Fall keine Expressionswerte ermittelt werden konnten. Die vergleichende Analyse der Quantifizierungsergebnisse der Proteine bzw. Gene ergab für die Expressionswerte eine Korrelation von 63%, wenn auch mehrfach eine deutlich stärkere Deregulation auf Genebene deutlich wurde (Annexin A5 und A3, SUAC, Ornithinaminotransferase). Für einige Proteine bzw. Gene unter den verbleibenden 37% stimmte die Richtung der Regulation mit beiden Technologien zwar überein, jedoch waren die Werte für die Gene dabei statistisch nicht signifikant (in der Tabelle gesondert gekennzeichnet (\*)). Mit 63% erwies sich die Übereinstimmung von Gen- und Proteinexpression unerwartet hoch. Die gute Korrelation könnte in dem fundierten experimentellen Aufbau begründet sein. Dieser wurde zum einen durch den Einsatz ausreichend großer Mengen biologischer wie technischer Replikate gewährleistet. Zum anderen erfolgten die proteomischen und genomischen Analysen mit Gewebe aus demselben Leberlappen, was die Wahrscheinlichkeit zur Detektion übereinstimmender Resultate erhöht. Für einen Folgeversuch des dieser Arbeit zugrunde liegenden BMBF-Projekts ist zudem die simultane Extraktion von Proteinen und RNA aus demselben Gewebestück in Planung, was die Voraussetzungen zum Vergleich von Protein- und Genexpression noch einmal entscheidend verbessern würde. Allerdings ist bei der ermittelten Korrelation von 63% zu bedenken, dass in diesem Fall die Regulation einer relativ kleinen Menge differentiell exprimierter Proteine mit den Resultaten der globalen Genexpressionsanalyse verglichen wurde, die im Verhältnis wesentlich

mehr deregulierte Gene lieferte. Der umgekehrte Abgleich aus Sicht der Genexpressionsdaten hätte vermutlich weniger Übereinstimmungen gezeigt.

Das Diagramm in Abbildung E-6, das für alle Zeitpunkte der Tierstudie 2 die Anzahl differentiell exprimierter Proteine und Gene aufführt, verdeutlicht auch, dass die Genexpressionsanalyse vor allem zu den frühen Zeitpunkten wesentlich mehr Deregulationen lieferte als der Proteomics-Ansatz. Mit fortschreitender Zeit gleicht sich die Menge der deregulierten Proteine und Gene immer mehr an. Zudem zeigt das Diagramm im Vergleich zu den früh einsetzenden Veränderungen auf Genniveau einen zeitverzögerten Anstieg differentiell exprimierter Proteine. Dies deckt sich mit den Erwartungen, da die Transkription spezifischer Genabschnitte schneller abläuft als deren Translation in Proteine.



**Abbildung E-6: Anzahl deregulierter Gene und Proteine in den Proben aller Zeitpunkte der Tierstudie 2.**

Vor allem in den Proben der frühen Zeitpunkte sind wesentlich mehr Gene dereguliert als Proteine. Der Anstieg der Anzahl differentiell exprimierter Proteine erfolgt im Vergleich zu den Genen zeitverzögert.

**Tabelle E-1: Vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse aus 2-DE und cDNA-Chiptechnologie.**

Den Regulationsfaktoren (RF) der in Woche 3 der Studie 1 differentiell exprimierten Proteine sind die Werte aus der globalen Genexpressionsanalyse gegenübergestellt. Statistisch signifikante übereinstimmende Deregulationen von Proteinen und Genen sind in rot hervorgehoben (63%). Einige Proteine waren mit ihren Gensequenzen auf den cDNA-Chips nicht präsentiert und standen somit für einen Vergleich nicht zur Verfügung. Daher konnte in diesem Fall kein RF für die Gene ermittelt werden. Die mit (\*) gekennzeichneten Werte sind statistisch nicht signifikant.

Protein/Gen	RF 2-DE	RF cDNA-Chip
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	3,09	0,99
Cathepsin D precursor	3,08	2,23
Aldehyde dehydrogenase	2,80	0,49
Annexin A5	2,75	21,56
LIM domain kinase 2	2,26	2,07
Annexin A3	2,25	5,03
Apolipoprotein A-I precursor	2,22 2,08 0,42	2,06
Annexin A4	2,17	2,91
Retinol-binding protein I	1,87	1,37*
Soluble epoxide hydrolase	1,87	2,35*
Guanine nucleotide-binding protein	1,80	3,4
Serum albumin precursor	1,72	0,91
Betaine-homocysteine S-methyltransferase	2,00 0,65	0,12
Pyruvate kinase, isozymes R/L	0,24	0,44
Liver carboxylesterase 10 precursor	0,43	0,16
Estrogen sulfotransferase, isoform 1	0,37	0,76*
Apolipoprotein AIV precursor	0,46	0,10
3-Alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	0,49	1,47
Ornithine aminotransferase	0,53	0,11
Vitamin D-binding precursor	0,54	0,76*
10-Formyltetrahydrofolate dehydrogenase	0,55	0,55
Protein disulfide isomerase A6 precursor	0,61	0,68
Ketohexokinase	0,57	0,32
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0,58	1,25
Propionyl-CoA carboxylase alpha chain	0,59	0,44
Serum paraoxonase/arylesterase	0,59	0,35
Peroxisomal bifunctional enzyme	0,61	0,44
Glycerol kinase	0,61	1,01
Adenosine kinase	0,51	0,41
Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase	0,62	0,79*
Aryl sulfotransferase	0,63	0,77
Alpha enolase	0,67	0,74
S-adenosylmethionine synthetase alpha	0,44	0,88*
3-Hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase	0,58	0,44
Catechol O-methyltransferase	0,44	0,37
Catalase	0,69	0,45
Dimethylglycine dehydrogenase	0,53	0,42
Fructose-1,6-bisphosphatase	0,64	0,61
Major urinary protein precursor	0,14	0,16
N-Hydroxyarylamine sulfotransferase	0,35	0,13
Protein disulfide isomerase precursor	0,59	1,36
Tubulin beta chain	0,51	1,01
Senescence marker protein	0,69	-
Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	0,29	-
Inorganic pyrophosphatase	0,68	-
Ubiquinol Cyt.C reductase complex	0,70	-

Protein/Gen	RF 2-DE	RF cDNA-Chip
Succinyl-CoA ligase	0,66	-
Adenosylhomocysteinase	0,68	-
Estrogen sulfotransferase, isoform 6	0,47	-
60 kDa heat shock protein	4,38	-
Protein c20orf178 homolog	1,80	-
Potassium voltage-gated channel subfamily	1,72	-
Adenine phosphoribosyltransferase	1,70	-
Rho-GDP-dissociation inhibitor	1,84	-
Heat shock cognate 71 kDa protein	2,11	-
Heat shock protein HSP 90-beta	2,10	-

Zusammenfassend lieferten die mittels TaqMan-PCR und cDNA-Chiptechnologie durchgeführten Genexpressionsanalysen Daten, die über die Erwartung hinaus gut mit den Werten aus 2-DE/MS-Analyse korrelierten. Damit wurden also einige der potentiellen Biomarker-Proteine in ihrer durch NNM induzierten differentiellen Expression auch auf Genebene bestätigt, was ebenfalls als Prävalidierung angesehen werden kann.

#### 4.4 Fazit der Biomarker-Prävalidierung

In der vorliegenden Arbeit führte der Einsatz von 2-DE-Elektrophorese und MALDI-MS für die Analyse des mit NNM behandelten Lebergewebes zur Identifizierung zahlreicher Protein-Biomarker, deren mechanistischer Beitrag zu Prozessen der Leberkanzerogenese ausführlich beschrieben wurde. Vor allem 18 Proteine, die in den Proben der Studie 1 sowohl nach drei Wochen der NNM-Exposition wie auch zum Endpunkt der Studie in Woche 25 differentiell exprimiert waren, wurden als potentielle frühe Biomarker charakterisiert. Diese Proteine reflektieren bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt des Tierversuchs induzierte präkanzerogene Effekte, so dass sie einen signifikanten Beitrag zur Unterstützung traditioneller toxikologischer Methoden und zur Verkürzung langwieriger Kanzerogenesestudien leisten könnten. Durch Analyse derselben Proben unter Einsatz von *Western Blotting* und quantitativer MS konnten die Expressionsveränderungen der meisten potentiellen frühen 2-DE/MS-Biomarker bestätigt werden. Zusätzlich zeigten Genexpressionsanalysen mittels TaqMan-PCR und der bei der Bayer AG durchgeführten cDNA-Chiptechnologie in vielen Fällen eine gute Korrelation zwischen Gen- und Proteinexpression. Die Übereinstimmung der Ergebnisse aus Analysen desselben Lebergewebes mit voneinander unabhängigen Technologien führt somit zu robusten, prävalidierten Protein-Biomarkern mit Potential, in der Zukunft toxikologische Prüfsysteme zu verbessern. Tabelle E-2 führt von den 18 potentiellen frühen 2-

DE/MS-Biomarker 13 Proteine auf, die mit mindestens einer anderen Methode in ihrer Regulation untermauert werden konnten. Hierzu bleibt noch anzumerken, dass sowohl mit *Western Blotting* als auch mit TaqMan-PCR lediglich die Expression einzelner Proteine bzw. Gene untersucht wurde. Genauso standen von sechs der 18 Biomarker-Proteine die entsprechenden Gene auf den cDNA-Chips für eine Analyse nicht zur Verfügung, so dass in diesen Fällen keine Expressionswerte ermittelt werden konnten (vgl. Tabelle E-1).

**Tabelle E-2: Prävalidierte potentielle frühe Biomarker.**

Die durch 2-DE/MS-Analyse der Proben nach drei Wochen NNM-Behandlung (Tierstudie 1) ermittelte differentielle Expression der 18 potentiellen frühen Biomarker konnte für die aufgeführten 13 Proteine mit mindestens einer anderen unabhängigen Technologie bestätigt werden. Angegeben ist der Name des jeweiligen Biomarker-Proteins mit der dazugehörigen SwissProt *Accession Number* (AN). (RF: Regulationsfaktor; GlobGenEx: Globale Genexpressionsanalyse)

Biomarker	AN	RF 2-DE (Woche 3, Studie 1)	Prävalidierung/Bestätigung durch
Annexin A5	P14668	2,75	iTRAQ TaqMan-PCR GlobGenEx
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Q99PT1	1,84	Western Blot
Pyruvate kinase	P12928	0,24	iTRAQ Western Blot GlobGenEx
Estrogen sulfotransferase	P49890	0,47	iTRAQ GlobGenEx (isoform 1)
Ornithine aminotransferase	P04182	0,53	iTRAQ GlobGenEx
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	O35007	0,58	iTRAQ
Glycerol kinase	Q63060	0,50	iTRAQ
Adenosine kinase	P55264	0,41	iTRAQ TaqMan-PCR GlobGenEx
Succinyl-CoA ligase	Q9Z218	0,66	iTRAQ
S-adenosylmethionine synthetase $\alpha$	P13444	0,44	iTRAQ GlobGenEx (nicht signifikant)
Fructose-1,6-bisphosphatase	P19112	0,64	Western Blot GlobGenEx
Major urinary protein precursor	P02761	0,14	iTRAQ Western Blot GlobGenEx
N-Hydroxyarylamine sulfotransferase	P50237	0,35	iTRAQ TaqMan-PCR GlobGenEx



## F AUSBLICK

Durch Einsatz von Methoden der Proteomforschung zur Analyse veränderten Lebergewebes wurden Protein-Biomarker identifiziert, die bestimmte Stadien im Prozess der Leberkanzerogenese charakterisieren. Vor allem konnte gezeigt werden, dass die behandlungsbedingten Veränderungen der Proteinexpression mit den proteomischen Analyse-Verfahren zum Teil früher detektiert werden konnten, als es mit konventionellen histopathologischen Methoden möglich ist. Dies unterstreicht das Potential der Proteomic-Forschung, traditionelle Toxikologie in der Zukunft dahingehend zu unterstützen, dass langwierige Testsysteme – allen voran Kanzerogenitätsstudien – verkürzt werden und die Anzahl an Versuchstieren verringert werden könnten. Ethischen Grundsätzen würde damit besser gerecht, von der damit verbundenen Kosten- und Zeitersparnis einmal abgesehen. Allerdings wurden durch Analyse des mit der Modellsubstanz NNM behandelten Lebergewebes in einem ersten Schritt lediglich Biomarker identifiziert, die den Mechanismus der Tumorinduktion durch eine genotoxische Chemikalie, speziell der Substanzklasse der Nitrosamine, reflektieren. Um in der Zukunft unbekannte Stoffe anhand prädiktiver Biomarker in die verschiedenen Mechanismen der Krebsentstehung einordnen zu können, sollten für eine weitaus größere Anzahl von Modellsubstanzen unterschiedlichster Toxizitätskategorien charakteristische Biomarker-Signaturen ermittelt werden. In einem Folgeprojekt dieser Arbeit, das ebenfalls vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert wird, werden derzeit erste Ansätze zu diesem Anliegen verwirklicht. Hier werden neun Modellsubstanzen aus drei unterschiedlichen Wirkkategorien (genotoxisch und kanzerogen, nicht-genotoxisch und kanzerogen sowie lebertoxisch und nicht-kanzerogen) über einen Zeitraum von nur vier Wochen an Versuchstiere verabreicht und die Leber als Zielorgan der toxischen Wirkungen anschließend mit Proteomics-Methoden zur Identifizierung weiterer für die einzelnen Wirkkategorien charakteristischer Biomarker analysiert. Dadurch, dass jede Wirkkategorie durch drei verschiedene Modellchemikalien repräsentiert wird, sollte die Detektion substanzspezifischer Effekte ausbleiben. Die Resultate aus der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass eine Identifizierung prädiktiver Biomarker des Kanzerogeneseprozesses bereits nach drei Wochen der Behandlung möglich ist. Diese Erkenntnis hat entscheidenden Einfluss auf die Planung des Folgeprojekts genommen und war ausschlaggebend

dafür, dass die Expositionszeit auf vier Wochen verkürzt wurde. Neben der damit verbundenen Einsparung von Versuchstieren wäre eine Implementierung von Resultaten aus Proteomics- sowie Genomics-Ansätzen, die aus solchen verkürzten Studien gewonnen werden, in regulatorisch festgeschriebene Studien wie den „28-Tage-Test“ denkbar.

Nicht zuletzt zeigten die erarbeiteten Resultate aus den Proteomics-Analysen, dass die ausreichend hohe Dosierung der Modellchemikalie nach drei Wochen der Behandlung zu großen molekularen Veränderungen in der Leber geführt hatte. Derartig starke Effekte sollten erwartungsgemäß auch im Blut der jeweiligen Versuchstiere abbildbar sein. Daher wird in der Folgestudie die 2-DE/MS-Analyse von Serumproben durchgeführt, um auf nicht invasivem Weg für die einzelnen Substanzklassen charakteristische Surrogatmarker ausfindig zu machen. Sollte dieser Ansatz positive Resultate liefern, wäre ein weiterer Schritt zur Erfüllung des 3-R-Konzepts getan, das eine verbesserte Versuchsdurchführung sowie eine Minderung des Tierleidens fordert.

## G ZUSAMMENFASSUNG

N-Nitrosomorpholin (NNM), ein bekanntes Leberkanzerogen, diente in der vorliegenden Dissertation als Modellsubstanz zur Abbildung des Kanzerogeneseprozesses. Zur Induktion von Lebertumoren sowie frühen präneoplastischen Veränderungen wurden Ratten in zwei Tierstudien über definierte Zeiträume mit zwei unterschiedlichen Dosierungen NNM behandelt. Das nach verschiedenen Behandlungszeitpunkten gewonnene Lebergewebe diente als Ausgangsmaterial für die nachfolgenden proteomischen, genomischen und histopathologischen Analysen. Diese verfolgten das Ziel, expositionsbedingte Änderungen im Protein- sowie Genexpressionsmuster zu detektieren und einen mechanistischen Zusammenhang zu Prozessen der Leberkanzerogenese herzustellen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten proteomischen Untersuchungsmethoden erfolgten zunächst unter Einsatz der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) zur Separation der aus dem Lebergewebe gewonnenen komplexen Proteinextrakte. Die sich anschließende vergleichende Auswertung der 2-DE-Pherogramme lieferte differentiell exprimierte Proteine, die durch MALDI-Massenspektrometrie (MALDI-MS) und Tandem-MS (MS/MS)-Analysen identifiziert wurden. Eine Literatur-basierte Charakterisierung der identifizierten Proteine bezüglich ihres mechanistischen Beitrags zum Prozess der Leberkanzerogenese schloss sich an. Einerseits konnten Proteine identifiziert werden, deren vermehrte Expression die nach einem Tag der Behandlung mit NNM ausgelösten akut toxischen Effekte der Chemikalie in der Leber reflektierten (z.B. Peroxiredoxin 2, Hitzeschockprotein 60 (HSP 60), Superoxid Dismutase). Andererseits lieferte die Analyse von Proben, in denen nach 25 Wochen Lebertumore diagnostiziert wurden, differentiell exprimierte Proteine, die als Tumor-spezifische Markerproteine charakterisiert werden konnten (Vimentin, Rho-GDI-Dissoziationsinhibitor-Protein, Caspase-8 Vorläufer-Protein). Im Hinblick auf das vorrangige Ziel der Arbeit, neue Biomarker zu identifizieren, die schon zu einem frühen Zeitpunkt des Tierversuchs bereits einsetzende kanzerogene Prozesse aufzeigen und damit in der Zukunft einen Beitrag leisten könnten, konventionelle toxikologische Prüfmethode zu unterstützen oder gar zu verkürzen, erfolgte eine Fokussierung der Analyse auf Proben von Tieren, die drei Wochen lang mit NNM behandelt wurden. Einerseits führte dies zur Identifizierung von Proteinen, die in Anlehnung an die Beobachtungen nach einem

Tag der Exposition den durch NNM induzierten zellulären Stress reflektierten (HSP 60, HSP 90  $\beta$ , Epoxidhydrolase). Andererseits wurden schon zu diesem Zeitpunkt vor allem mit der Detektion von Veränderungen des Energie-Stoffwechsels, die eindeutig auf eine Verschiebung des metabolischen Gleichgewichts hin zu Energie-liefernden Prozessen hinwiesen, frühe mit dem Mechanismus der Krebsentstehung vereinbare molekulare Vorgänge offensichtlich (z.B. Fruktose-1,6-Bisphosphatase (F16P), Kethexokinase, Pyruvatkinase). Vor allem 18 Proteine, die sich in den Proben nach drei Wochen der NNM-Behandlung wie auch in dem Gewebe von Tieren mit Tumoren als dereguliert erwiesen, wurden als potentielle frühe Biomarker mit einem enormen Potential zur verbesserten Vorhersage von Leberkanzerogenese charakterisiert. Exemplarisch seien hier Annexin A5, Ornithinaminotransferase (OAT), *Major urinary* Vorläufer-Protein (MUP), F16P, Pyruvatkinase, Adenosinkinase (ADK) und N-Hydroxyarylamino-Sulfotransferase (SUAC) genannt.

Als weitere proteomische Untersuchungsmethode wurden aus den Leberextrakten unter Einsatz der SELDI (*Surface Enhanced Laser Desorption and Ionisation*)-Technologie Proteinprofile erstellt und für die verschiedenen durch NNM-Behandlung aufgetretenen Leberveränderungen charakteristische Signalmuster ermittelt. Basierend auf chromatographischen Trennverfahren und im Verlauf der Arbeit optimierten Methoden zur Elution von intakten Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen folgte der Versuch, die in den einzelnen Ionensignalen repräsentierten differentiell exprimierten Proteine zu identifizieren und in einen biologischen Zusammenhang zum Mechanismus der Krebsentstehung zu stellen. Zwar konnten durch Einsatz der genannten Methoden einige Proteine aus den komplexen Gemischen isoliert und nachfolgend sowohl mittels SELDI-MS detektiert als auch durch MALDI-MS und MS/MS-Analysen identifiziert werden (z.B. Ubiquitin, 10 kDa Hitzeschockprotein, Superoxid Dismutase, *Fatty acid-binding protein*), doch war eine Korrelation der identifizierten Proteine mit Signalen in den komplexen Spektren der Leberlysate nur in wenigen Fällen möglich (z.B. Catechol O-Methyltransferase, Ubiquitin). Keines der Ionensignale, dem letztlich ein identifiziertes Protein zugeordnet werden konnte, wies nach Auswertung der Proteinprofile eine differentielle Expression auf.

Um die durch 2-DE/MS-Analyse ermittelten potentiellen frühen Biomarker für Prozesse der Leberkanzerogenese in ihrem detektierten Regulationsmuster zu bestätigen und damit das Vertrauen in die 2-DE/MS-Ergebnisse zu erhöhen, erfolgte

eine Prävalidierung der Markerproteine mit unabhängigen Methoden. Hierfür wurde der immunologische Nachweis der Proteine in Form des *Western Blottings* sowie eine MS-basierte Quantifizierung unter Anwendung der iTRAQ-Technik herangezogen. Des Weiteren sollte die Amplifikation und Quantifizierung spezifischer Gensequenzen, deren Translationsprodukte aus der 2-DE/MS-Analyse als differentiell exprimiert hervorgegangen waren, durch Anwendung quantitativer PCR (Polymerasekettenreaktion) -Strategien (TaqMan-PCR) zeigen, inwieweit die Expression von Proteinen und Genen korrelierte.

Während durch *Western Blotting* nur vier der 18 potentiellen frühen 2-DE/MS-Biomarker in ihrer nach drei Wochen Behandlung beobachteten Regulation bestätigt werden konnten (MUP, F16P, Rho-GDI Dissoziationsinhibitor und Pyruvatkinase), wurden durch Einsatz der iTRAQ-Technik 11 der Biomarker prävalidiert (z.B. Annexin A5, OAT, MUP, ADK, SUAC, Estrogen-Sulfotransferase). Die Expression der vier mittels TaqMan-PCR quantifizierter Genabschnitte (Annexin A3 und A5, SUAC, ADK) zeigte fast durchweg eine gute Korrelation mit den Daten der 2-DE/MS-Analyse. Darüber hinaus legte ein Vergleich der Regulationsfaktoren der frühen 2-DE/MS-Biomarkern mit den Werten der globalen Genexpressionsanalysen, die bei Bayer in Form der cDNA-Chiptechnologie durchgeführt wurden, für 63% der Proteine eine übereinstimmende Deregulation auf Genniveau offen.

Insgesamt wurden 13 der 18 potentiellen frühen 2-DE/MS-Biomarker durch mindestens eine weitere unabhängige Technologie in ihrer im 2-DE-Gel beobachteten Expressionsveränderung bestätigt.

Zusammenfassend lieferte die 2-DE/MS-Analyse des durch NNM veränderten Lebergewebes zahlreiche Protein-Biomarker, die auf molekularer Ebene sowohl frühe als auch späte Stadien der Leberkanzerogenese reflektieren. Vor allem die charakterisierten potentiellen frühen Biomarkern weisen ein signifikantes Potential auf, in der Zukunft konventionelle toxikologische Prüfsysteme zu unterstützen und möglicherweise einen Beitrag zur Verkürzung von Tierstudien und damit zur Einsparung von Versuchstieren zu leisten. Durch Prävalidierung der meisten der frühen Markerproteine durch unabhängige Methoden wurde dieses Potential als auch der Wert von Methoden der Proteomforschung zur allgemeinen Unterstützung der prädiktiven Toxikologie noch einmal unterstrichen.

## H LITERATURVERZEICHNIS

- Aebersold, R., Mann, M.** Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **2003**, *422*, 198-207.
- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D.** Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **1973**, *70*, 2281–2285.
- Anderson, N.G., Anderson, N.L.** Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1853-1861.
- Altmann, H.W.** Hepatic neoforations. *Pathology – Research and Practice*. **1994**, *190*, 513-577.
- Asamoto, M., Cohen, S.M.** Prohibition gene is overexpressed but not mutated in rat bladder carcinomas and cell lines. *Cancer Letters* **1994**, *83*, 201-207.
- Baggerly, K.A., Morris, J.S., Coombes, K.R.** Reproducibility of SELDI-TOF Protein Patterns in Serum: Comparing Data Sets from Different Experiments. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 777-785.
- Bandara, L.R., Kennedy, S.** Toxicoproteomics – a new preclinical tool. *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 411-418.
- Bannasch, P., Mayer, D., Hacker, H.J.** Hepatocellular glycogenesis and hepatocarcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1980**, *605*, 217-245.
- Bannasch, P.** Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing I. Hepatic preneoplasia. *Carcinogenesis* **1986**, *7*, 689-695.
- Bannasch, P.** Pathogenesis of hepatocellular carcinoma: sequential cellular, molecular, and metabolic changes. *Progresses in Liver Disease* **1996**, *14*, 161-197
- Bannasch, P., Jahn, U-R., Hacker, H.J., Su, Q., Hofmann, W., Oichlmayr, R., Otto, G.** Focal hepatic glycogenesis: A putative preneoplastic lesion associated with neoplasia and cirrhosis in explanted human livers. *International Journal of Oncology* **1997**, *10*, 261-268.
- Bannasch, P., Klimek, F., Mayer, D.** Early Bioenergetic Changes in Hepatocarcinogenesis: Preneoplastic Phenotypes Mimic Responses to Insulin and Thyroid Hormone. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **1997**, *29*, 303-312.
- Bannasch, P., Nehrass, D., Kopp-Schneider, A.** Significance of Hepatic Preneoplasia for Cancer Chemoprevention. In: *Biomarkers in Cancer Chemoprevention, IARC Scientific Publications* **2001**, *154*, 223-240.
- Bannister, J.V., Bannister, W.H., Rotilio, G.** Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **1987**, *22*, 111–180.
- Bouchie, A.** Cancer trials get set for biomarkers. *Nature Biotechnology* **2004**, *22*, 6-7.
- Bradford, M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248-254.
- Callahan, M.K., Chaillot, D., Jacquin, C., Clark, P.R., Ménoret, A.** Differential Acquisition of Antigenic Peptides by Hsp70 and Hsc70 under Oxidative Conditions. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 33604–33609.
- Carrette, O., Demalte, I., Scherl, A., Yalkinoglu, O., Corthals, G., Burkhard, P., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.C.** A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Proteomics* **2003**, *3*, 1486-1494.

- Chandra, D., Tang, D.G.** Mitochondrially Localized Active Caspase-9 and Caspase-3 Result Mostly from Translocation from the Cytosol and Partly from Caspase-mediated Activation in the Organelle. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 17408–17420.
- Chen, G., Gharib, T.G., Huang, C.C., Taylor, J.M., Misek, D.E., Kardia, S.L., Giordano, T.J., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., Hanash, S.M., Beer, D.G.** Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Molecular and Cellular Proteomics* **2002**, *1*, 304–313.
- Clauser, K.R., Baker, P., Burlingame, A.L.** Role of Accurate Mass Measurement (+/-10 ppm) in Protein Identification Strategies Employing MS or MS/MS and Database Searching. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 2871-2882.
- Cliby, W., Sarkar, G., Ritland, S.R., Hartmann, L., Podratz, K.C., Jenkins, R.B.** Absence of Prohibitin Gene Mutations in Human Epithelial Ovarian Tumors. *Gynecol. Oncol.* **1993**, *50*, 34-37.
- Cohen, S.L., Chait, B.T.** Mass Spectrometry of Whole Proteins Eluted from Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis Gels. *Analytical Biochemistry* **1997**, *247*, 257–267.
- Degterev, A., Boyce, M., Yan, J.** A decade of caspases. *Oncogene* **2003**, *22*, 8543-8567.
- Desideri, A., Falconi, M.** Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. *Biochemical Society Transactions* **2003**, *31*, 1322-1325.
- DeSouza, L., Diehl, G., Rodrigues, M.J., Guo, J., Romaschin, A.D., Colgan, T.J., Siu, K.W.M.** Search for Cancer Markers from Endometrial Tissues Using Differentially Labeled Tags iTRAQ and cIAT with Multidimensional Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research* **2005**, *4*, 377-386.
- Diamandis, E.P.** Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. *Molecular and Cellular Proteomics* **2004**, *3*, 367-378.
- Eaton, D.L., and Gallagher, E.P.** Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Reviews in Pharmacologic Toxicology* **1994**, *34*: 135–172.
- Ehring, H., Strömberg, S., Tjernberg, A., Noren, B.** Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins Extracted Directly from Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gels. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 1867–1873.
- Eisenbrand, G., Metzler, M.** Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner, Wiley-Vch Verlag GmbH, Weinheim, **2002**.
- Emmelot, P., Scherer, E.** The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis. A quantitative approach. *Biochimica et Biophysica Acta* **1980**, *605*, 247-304.
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S.** Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research* **2004**, *567*,1-61.
- Farber, E.** The sequential analysis of liver cancer induction. *Biochimica et Biophysica Acta* **1980**, *605*, 149-166.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M.** Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, *246*, 64-71.
- Fenyo, D., Qin, J., Chait, B.T.** Protein identification using mass spectrometric information. *Electrophoresis* **1998**, *9*, 998-1005.
- Ficarro, S.B., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., White, F.M.** Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 301-305.
- Förster, V.T.** Zwischenmolekulare Energie-Wanderung und Fluoreszenz. *Analys of Physics* (Leipzig) **1948**, *2*, 55-75.

- Fujita, T., Shirasawa, T., Uchida, K., Maruyama, N.** Gene regulation of senescence marker protein-30 (SMP30): Coordinated up-regulation with tissue maturation and gradual down-regulation with aging. *Mechanisms of Ageing and Development* **1996**, *87*, 219-229.
- Fusaro, G., Dasgupta, P., Rastogi, S., Joshi, B., Chellappan, S.** Prohibitin Induces the Transcriptional Activity of p53 and Is Exported from the Nucleus upon Apoptotic Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 47853–47861.
- Galvani, M., Bordini, E., Piubelli, C., Hamdan, M.** Effect of experimental conditions on the analysis of sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis separated proteins by matrix-assisted laser desorption/ ionisation mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *14*, 18–25.
- Geng, M., Ji, J., Regnier, F.** Signature-peptide approach to detecting proteins in complex mixtures. *Journal of Chromatography A* **2000**, *870*, 295-313.
- Gilles, C., Polette, M., Piette, J., Delvigne, A.C., Thompson, E.W., Foidart, J.M., Birembaut, P.** Vimentin Expression in Cervical Carcinomas: Association with Invasive and Migratory Potential. *The Journal of Pathology* **1996**, *180*, 175-180.
- Görg, A., Postel, W., Günther, S.** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **1988**, *9*, 531-546.
- Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J.** Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **2004**, *4*, 3665-3685.
- Gössner, W., Friedrich-Freksa, H.** Histochemische Untersuchungen über die Glucose-Phosphatase in der Rattenleber während der Kanzerisierung der Nitrosamine. *Zeitschrift für Naturforschung* **1964**, *19b*, 862-863.
- Griffin, T. J., Gygi, S. P., Ideker, T., Rist, B., Eng, J., Hood, L., Aebersold, R.** Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Proteomics* **2002**, *1*, 323–333.
- Groopman, J.D., Cain, L.G., Kensler, T.W.** Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer. *CRC Critical Reviews in Toxicology* **1988**, *19*, 113–145.
- Gupta, S., Knowlton, A.A.** HSP60, Bax, apoptosis and the heart. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2005**, *9*, 51-58.
- Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., Aebersold, R.** Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* **1999**, *17*, 994-999.
- Hacker, H.J., Moore, M.A., Mayer, D., Bannasch, P.** Correlative histochemistry of some enzymes of carbohydrate metabolims in preneoplastic and neoplastic lesions in the rat liver. *Carcinogenesis* **1982**, *3*, 1265-1272.
- Hanash, S.** Disease proteomics. *Nature* **2003**, *422*, 226-32.
- Harrison, P.M., Kumar, A., Lang, N., Snyder, M., Gerstein, M.** A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30*, 1083-1090.
- Harry, J.L., Wilkins, M.R., Herbert, B.R., Packer, N.H., Gooley, A.A., Williams, K.L.** Proteomics: capacity versus utility. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1071-1081.
- Hartung, T., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Fortaner, S., Gribaldo, L., Halder, M., Roi, A.J., Prieto, P., Sabbioni, E., Worth, A., Zuang, V.** ECVAM's Response to the Changing Political Environment for Alternatives: Consequences of the European Union Chemicals and Cosmetics Policies. *ATLA* **2003**, *31*, 473-481.



- Hendrich, S., Glauert, H.P., Pitot, H.C.** The phenotypic stability of altered hepatic foci: effects of withdrawal and subsequent readministration of Phenobarbital. *Carcinogenesis* **1986**, *7*, 2041-2045.
- Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Seftor, R.E., Trevor, K.T.** Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *American Journal of Pathology* **1997**, *150*, 483-495.
- Henzel, W.J., Stults, J.T., Watanabe, C.** *Proceedings of the Third Symposium of the Protein Society*, Seattle, WA, **1989**.
- Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., Watanabe, C.** Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **1993**, *90*, 5011-5015.
- Heukeshoven, J., Dernick, R.** Improved silver stain procedure for fast staining in Phastsystem development unit; staining of sodium dodecylsulfate gels. *Electrophoresis* **1988**, *9*, 28-32.
- Hochstrasser, D.F., Williams, K.L.** Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology Genetic Engineering Reviews* **1996**, *13*, 19-50.
- Hoffmann, D., Wynder, E.L.** Chemical constituents and bioactivity of tobacco smoke. *IARC Scientific Publications* **1986**, *74*, 145-165.
- Hu, L., Lau, S.H., Tzang, C., Wen, J., Wang, W., Xie, D., Huang, M., Wang, Y., Wu, M., Huang, J., Zeng, W., Sham, J.S.T., Yang, M., Guan, X.** Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene* **2004** *23*, 298-302.
- Hutchens, T.W., Yip, T.T.** New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1993**, *7*, 576-580.
- ICH – International Conference on Harmonisation.** Proceedings of the Second International Conference on Harmonisation, Orlando **1993**. Antrim, N. Irland: Greystone Books Ltd.
- Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J.A., Christmas, R., Buhler, J., Eng, J.K., Bumgarner, R., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Hood, L.** Integrated Genomic and Proteomic Analyses of a Systematically Perturbed Metabolic Network. *Science* **2001**, *292*, 929-934.
- Issaq, H.J.** The role of separation science in proteomics research. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3629-3638.
- Issaq, H.J., Conrads, T.P., Janini, G.M., Veenstra, T.D.** Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3048-3061.
- Ito, N., Tsuda, H., Tatematsu, M., Inoue, T., Tagawa, Y., Aoki, T., Uwagawa, S., Kagawa, M., Ogiso, T., Masui, T.** Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rat - an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis* **1988**, *9*, 387-394.
- Ito, N., Imaida, K., Hasegawa, R., Tsuda, H.** Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. *Critical Reviews in Toxicology* **1989**, *19*, 386-415.
- Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Mann, M.** Identification of the components of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 4741-4750.
- Ji, J., Chakraborty, A., Geng, M., Zhang, X., Amini, A., Bina, M., Regnier, F.** Strategy for qualitative and quantitative analysis in proteomics based on signature peptides. *Journal of Chromatography B* **2000**, *745*, 197-210.
- Jones, B.A., Gores, G.J.** Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *American Journal of Physiology* **1997**, *273*, G1174-1188.

- Kalengayi, M.M.R., Ronchi, G., Desmet, V.J.** Histochemistry of gamma-glutamyl transpeptidase in rat liver during aflatoxin B<sub>1</sub>-induced carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* **1975**, *55*, 579-588.
- Karas, M., Hillenkamp, F.** Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 2299-2301.
- Karas, M., Glückmann, M., Schäfer, J.** Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 1-12.
- Kelly, V.P., Ellis, E.M., Manson, M.M., Chanas, S.A., Moffat, G.J., McLeod, R., Judah, D.J., Neal, G.E., Hayes, J.D.** Chemoprevention of aflatoxin B<sub>1</sub> hepatocarcinogenesis by coumarin, a natural benzopyrone that is a potent inducer of aflatoxin B<sub>1</sub>-aldehyde reductase, the glutathione S-transferase A5 and P1 subunits, and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in rat liver. *Cancer Research* **2000**, *60*, 957-69.
- Kennedy, S.** The role of proteomics in toxicology: identification of biomarkers of toxicity by protein expression analysis. *Biomarkers* **2002**, *7*, 269-290.
- Kim, J., Kim, S.H., Lee, S.U., Ha, G.H., Kang, D.K., Ha, N., Ahn, J.S., Cho, H.Y., Kang, S., Lee, Y., Hong, S.C., Ha, W.S., Bae, J.M., Lee, C., Kim, J.W.** Proteome analysis of human liver tumor tissue by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of disease-related proteins. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 4142-4156.
- Klimek, F., Mayer, D., Bannasch, P.** Biochemical microanalysis of glycogen content and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in focal lesions of the rat liver induced by N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis* **1984**, *5*, 265-268.
- Klose, J.** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **1975**, *26*, 231-243.
- Klose, J., Kobalz, U.** Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* **1995**, *16*, 1034-1059.
- Knochenmuss, R., Dubois, F., Dale, M.J., Zenobi, R.** The Matrix Suppression Effect and Ionization Mechanisms in Matrix assisted Laser Desorption Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10*, 871-877.
- Kohen, R., Nyska, A.** Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology* **2002**, *30*, 620-650.
- Kramer, P.J., von Landenberg F.** in: Marquardt, Schäfer (Hrsg.), Lehrbuch der Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2004**.
- Kramer, P.J.** Vortrag auf dem EFPIA-Jahrestreffen (*European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations*), Brüssel, Juni **2005**
- Kuo, W.-H., Chiang, W.-L., Yang, S.-F., Yeh, K.-T., Yeh, C.-M., Hsieh, Y.-S., Chu, S.-C.** The differential expression of cytosolic carbonic anhydrase in human hepatocellular carcinoma. *Life Sciences* **2003**, *73*, 2211-2223.
- Lauber, W.M., Carroll, J.A., Dufield, D.R., Kiesel, J.R., Radabaugh, M.R., Malone, J.P.** Mass spectrometry compatibility of two-dimensional gel protein stains. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 906-918.
- Li, J., Zhang, Z., Rosenzweig, J., Wang, Y.Y., Chan, D.W.** Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clinical Chemistry* **2002**, *48*, 1296-1304.
- Liang, P., MacRea, T.H.** Molecular chaperones and the cytoskeleton. *Journal of Cell Science* **1997**, *110*, 1431-1440.

- Liebler, D.C.** Introduction to Proteomics. Tool for the New Biology. **2002**, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Lill, J.** Proteomic tools for quantitation by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2003**, *22*, 182–194.
- Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., Yates, J.R.** Direct analysis of large protein complexes using mass spectrometry. *Nature Biotechnology* **1999**, *17*, 676-682.
- Loepky, R.N., Ye, Q., Goelzer, P., Chen, Y.** DNA Adducts from N-Nitrosodiethanolamine and Related beta-Oxidized Nitrosamines in Vivo: 32P-Postlabeling Methods for Glyoxal- and O6-Hydroxyethyldeoxyguanosine Adducts. *Chemical Research in Toxicology* **2002**, *15*, 470-482.
- Lottspeich, F.** Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angewandte Chemie International Edition*. **1999**, *38*, 2476-2492.
- Manson, D., Cox, P.J., Jarman, M.** Metabolism of N-Nitrosomorpholine by the rat in vivo and by rat liver microsomes and its oxidation by the fenton system. *Chemical and Biological Interactions* **1978**, *20*, 341-354.
- Marquardt, H., Pfau, W.** in: Marquardt, Schäfer (Hrsg.), Lehrbuch der Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2004**.
- Medzihradzky, K.F., Campbell, J.M., Baldwin, M.A., Falick, A.M., Juhasz, P., Vestal, M.L., Burlingame, A.L.** The Characteristics of Peptide Collision-Induced Dissociation Using a High-Performance MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 552-558.
- Melnick, R.L., Huff, J.** Liver carcinogenesis is not a predicted outcome of chemically induced hepatocyte proliferation. *Toxicology and Industrial Health* **1993**, *9*, 415-438.
- Merchant, M., Weinberger, S.** Recent advancements in surface enhanced laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1164-1167.
- Merrill, C.M., Switzer, R.C., van Keuren, M.L.** Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **1979**, *76*, 4335-4339.
- Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A.E., Spyrou, G.** The mitochondrial thioredoxin system. *Antioxid. Redox Signal*. **2000**, *2*, 801-810.
- Moch, H., Schraml, P., Bubendorf, L., Mirlacher, M., Kononen, J., Gasser, T., Mihatsch, M.J., Kallioniemi, O.P., Sauter, G.** High-Throughput Tissue Microarray Analysis to Evaluate Genes Uncovered by cDNA Microarray Screening in Renal Cell Carcinoma. *American Journal of Pathology* **1999**, *154*, 981-986.
- Moore, A.V., Jorgenson, J.W.** Rapid comprehensive two-dimensional separations of peptides via RPLC-optically gated capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 3448-3455.
- Moore, A.V., Jorgenson, J.W.** Comprehensive three-dimensional separation of peptides using size exclusion chromatography/reversed phase liquid chromatography/optically gated capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 3456-3463.
- Murray, C.J., Lopez, A.D.** Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* **1997**, *349*, 1436–1442.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W.** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **1988**, *9*, 255-262.
- Noiva, R.** Protein disulfide isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Cell and Developmental Biology* **1999**, *10*, 481-493.

- Oda, Y., Huang, K., Cross, F.R., Cowburn, D. Chait, B.T.** Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **1999**, *96*, 6591-6596.
- O'Farrell, P.H.** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1975**, *250*, 4007-4021.
- OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development).** Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Valification and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. ENV/MC/CHEM/TG(96)9, OECD Publications Office, Paris, **1996**.
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M.** Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* **2002**, *1*, 376-386.
- Opiteck, G.J., Lewis, K.C., Jorgenson, J.W., Anderegg, R.J.** Comprehensive online LC/LC/MS of proteins. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 1518-1524.
- Opiteck, G.J., Ramirez, S.M., Jorgenson, J.W., Moseley, M.A.** Comprehensive Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography for the Isolation of Overexpressed Proteins and Proteome Mapping. *Analytical Biochemistry* **1998**, *258*, 349-361.
- Pacifici, G.M.** Inhibition of human liver and duodenum sulfotransferases by drugs and dietary chemicals: a review of the literature. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **2004**, *42*, 488-95.
- Parekh, R.B., Rohlf, C.** Post-translational modification of proteins and the discovery of new medicine. *Current Opinion in Biotechnology* **1997**, *8*, 718-723.
- Patton, W.F.** A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1123-1144.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S.** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-3567.
- Petricoin, E.F., Ardekani, A.M., Hitt, B.A., Levine, P.J., Fusaro, V.A., Steinberg, S.M., Mills, G.B., Simone, C., Fishman, D.A., Kohn, E.C., Liotta, L.A.** Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* **2002**, *359*, 572-577.
- Pitot, H.C., Sirica, A.E.** The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1980**, *605*, 191-215.
- Pitot, H.C., Beer, D., Hendrich, S.** Multistage carcinogenesis: the phenomenon underlying the theories. in: Iversen, O. (Hrsg.) *Theories of Carcinogenesis*, Hemisphere Press, Washington, DC, **1988**, 159-177.
- Rabilloud, T., Strub, J., Luche, S., van Dorselaer, A., Lunardi, J.** A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **2001**, *1*, 699-704.
- Rabilloud, T.** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* **2002**, *2*, 3-10.
- Raynal, P., Pollard, H.B.** Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1994**, *1197*, 63-93.
- Rhee, H.J., Kim, G., Huh, J.W., Kim, S., Na, D.S.** Annexin I is a stress protein induced by heat, oxidative stress and a sulfhydryl-reactive agent. *European Journal of Biochemistry* **2000**, *267*, 3220-3225.

- Rhee, S.G., Kang, S.W., Chang, T.-S., Jeong, W., Kim, K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* **2001**, *52*, 35-41.
- Rosenblatt, K.P., Bryant-Greenwood, P., Killian, J.K., Mehta, A., Geho, D., Espina, V., Petricoin, E.F., 3<sup>rd</sup>, Liotta, L.A. Serum proteomics in cancer diagnosis and management. *Annual Review of Medicine* **2004**, *55*, 97-112.
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlett-Jones, M., He, F., Jacobson, A., Pappin, D.J. Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-Reactive Isobaric Tagging Reagents. *Molecular and Cellular Proteomics* **2004**, *3*, 1154-1169.
- Rosty, C., Christa, L., Kuzdal, S., Baldwin, W., Zahurak, M., Carnot, F., Chan, D., Canto, M., Lillemoe, K., Cameron, J., Yeo, C., Hruban, R., Goggins, M. Identification of hepatocarcinoma-interstine-pancreas/pancreatitis-associated protein 1 as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Research* **2002**, *62*, 1868-1875.
- Russel, W.M.S., Burch, R.L. in: *The Principles of Human Experimental Technique* Methuen and Co. Ltd.; London **1959**.
- Ryan, T.E., Patterson, S.D. Proteomics in Drug Target Discovery – High-Throughput meets high-efficiency. *Drug Discovery World Winter* **2001**, *2*, 43-52.
- Sato, K., Kitahara, A., Satoh, K., Ishikawa, T., Tatematsu, M., Ito, N. The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Gann* **1984**, *75*, 199-202.
- Sato, K., Sasaki, K., Akiyama, Y., Yamaguchi, K. Mass spectrometric high-throughput analysis of serum-free conditioned medium from cancer cell lines. *Cancer Letters* **2001**, *170*, 153-159.
- Schild, T. A. Einführung in die Real-TimeTaqMan PCR-Technologie. Applied Biosystems **2002**, Version 2.1.
- Schmidt, A., Kellermann, J. Lottspeich, F. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* **2005**, *5*, 4-15.
- Schnolzer, M., Jedrzejewski, P., Lehmann, W.D. Protease-catalyzed incorporation of <sup>18</sup>O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* **1996**, *17*, 945-953.
- Schramek, H., Schumacher, M., Wilflingseder, D., Oberleithner, H., Pfaller, W. Differential expression and activation of MAP kinases in dedifferentiated MDCK-focus cells. *American Journal of Physiology* **1997**, *272*, C383-391.
- Schrattenholz, A. Proteomics: how to control highly dynamic patterns of millions of molecules and interpret changes correctly. *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, *1*, 1-8.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, J.V.. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1967**, *28*, 815-820.
- Sperling, K. From proteomics to genomics. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 2835-2837.
- Spielmann, H. in: Gruber, F.P., Spielmann, H. (Hrsg.) Alternativen zu Tierexperimenten, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg, Oxford, **1996**.
- Spielmann, H. in: Marquardt, Schäfer (Hrsg.), Lehrbuch der Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2004**.
- Srinivas, P.R., Srivastava, S., Hanash, S., Wright, G.L. Jr. Proteomics in early detection of cancer. *Clinical Chemistry* **2001**, *47*, 1901-1911.

- Srinivas P.R., Verma, M., Zhao, Y., Srivastava, S.** Proteomics for cancer biomarker discovery. *Clinical Chemistry* **2002**, *48*, 1160-1169.
- Steiner, S., Gatlin, C.L., Lennon, J.J., McGrath, A.M., Aponte, A.M., Makusky, A.J., Rohrs, M.C., Anderson, N.L.** Proteomics to display lovastatin-induced protein and pathway regulation in rat liver. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2129-2137.
- Stocklin, R., Arrighi, J.F., Hoang-van, K., Vu, L., Cerini, F., Gilles, N., Genet, R., Markussen, J., Offord, R.E., Rose, K.** Positive and negative labeling of human proinsulin insulin and C-peptide with stable isotopes. *Methods of Molecular Biology* **2002**, *146*, 293-315.
- Su, Q., Bannasch, P.** Relevance of Hepatic Preneoplasia for Human Hepatocarcinogenesis. *Toxicologic Pathology* **2003**, *31*, 126-133.
- Tian, Q., Stepaniants, S.B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M.C., Doyle, M.J., Yi, E.C., Dai, H., Thorsson, V., Eng, J., Goodlett, D., Berger, J.P., Gunter, B., Linseley, P.S., Stoughton, R.B., Aebersold, R., Collins, S.J., Hanlon, W.A., Hood, L.E.** Integrated Genomic and Proteomic Analyses of Gene Expression in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Proteomics* **2004**, *3*, 960-969.
- Tirumalai, R.S., Chan, K.C., Prieto, D.A., Issaq, H.J., Conrads, T.P., Veenstra, T.D.** Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Molecular and Cellular Proteomics* **2003**, *2*, 1096-1103.
- Strupat, K., Karas, M., Hillenkamp, F.** 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry Ion Proc.* **1991**, *111*, 89-102.
- Svensson, H.** Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases. *Acta Chemica Scandinavica* **1961**, *15*, 325-341.
- Van Bezooijen, R.L., Wang, R.K., Lechner, M.C., Schmucker, D.L.** Aging effects on hepatic NADPH cytochrome P450 reductase, CYP2B1&2, and polymeric immunoglobulin receptor mRNA's in male Fischer 344 rats. *Experimental Gerontology* **1994**, *29*, 187-195.
- Veenstra, T.D., Conrads, T.P.** Serum protein fingerprinting. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* **2003**, *5*, 584-593.
- Veenstra, T.D., Prieto, D.A., Conrads, T.P.** Proteomic patterns for early cancer detection. *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 889-897.
- von Eggeling, F., Junker, K., Fiedler, W., Wollscheid, V., Dürst, M., Claussen, U., Ernst, G.** Mass spectrometry meets chip technology: A new proteomic tool in cancer research? *Electrophoresis* **2001**, *22*, 2898-2902.
- Vuong, G.L., Weiss, S.M., Kammer, W., Priemer, M., Vingron, M., Nordheim, A., Cahill, M.A.** Improved sensitivity proteomics by postharvest alkylation and radioactive labeling of proteins *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2594-2605.
- Walgren, J.L., Thompson, D.C.** Application of proteomic technologies in the drug development process. *Toxicology Letters* **2004**, *149*, 377-385.
- Washburn, M.P., Wolters, D. Yates, J.R.** Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 242-247.
- Wang, S., Regnier, F.** Proteomics based on selecting and quantifying cysteine containing peptides by covalent chromatography. *Journal of Chromatography A* **2001**, *924*, 345-357.
- Weber, E., Bannasch, P.** Dose and time dependence of the cellular phenotype in rat hepatic preneoplasia induced by single oral exposures to N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis* **1994a**, *15*, 1219-1226.

**Weber, E., Bannasch, P.** Dose and time dependence of the cellular phenotype in rat hepatic preneoplasia induced in stop experiments by oral exposure to N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis* **1994b**, *15*, 1227-1234.

**Weber, E., Bannasch, P.** Dose and time dependence of the cellular phenotype in rat hepatic preneoplasia induced by continuous oral exposure to N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis* **1994c**, *15*, 1235-1242.

**Weinberger, S.R., Boschetti, E., Santambien, P., Brenac, V.** Surface-enhanced laser desorption–ionization retentate chromatography<sup>TM</sup> mass spectrometry (SELDI–RC–MS): a new method for rapid development of process chromatography conditions. *Journal of Chromatography B* **2002**, *782*, 307–316.

**Wetmore, B.A., Merrick, B.A.** Toxicoproteomics: Proteomics Applied to Toxicology and Pathology. *Toxicologic Pathology* **2004**, *32*, 619–642.

**Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphrey-Smith, I., Hochstrasser, D., F., Williams, K.L.** Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **1996**, *13*, 19-50.

**Williams, G.M.** Phenotypic properties of preneoplastic rat liver lesions and applications to detection of carcinogens and tumor promoters. *Toxicologic Pathology* **1982**, *10*, 3-10.

**Wolf, D.H., Hilt, W.** The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochimica et Biophysica Acta* **2004**, *29*, 19-31.

**Yates, J.R., Eng, J.K., McCormack, A.L., Schieltz, D.** Method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 1426-1436.

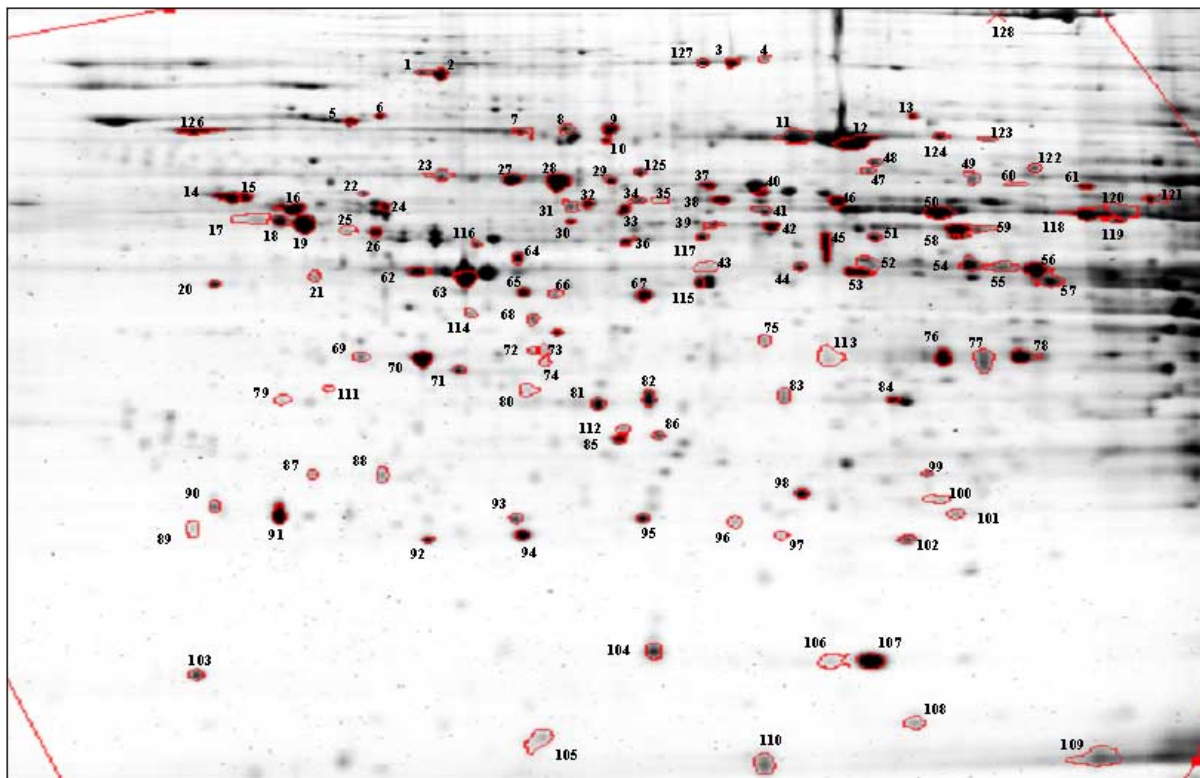
**Yates, J.R.** Mass spectral analysis in proteomics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2004**, *33*, 297-316.

**Zhang, Z., Bast, R.C., Jr., Yu, Y., Li, J., Sokoll, L.J., Rai, A.J., Rosenzweig, J.M., Cameron, B., Wang, Y.Y., Meng, X., Berchuck, A., van Haaften-Day, C., Hacker, N.F., de Bruijn, H.W.A., van der Zee, A.G.J., Jacobs, I.J., Fung, E.T., Chan, D.W.** Three Biomarkers Identified from Serum Proteomic Analysis for the Detection of Early Stage Ovarian Cancer. *Cancer Research* **2004**, *64*, 5882–5890.

# I ANHANG

## Abbildung I-1: Übersicht aller aus 2-DE-Gelen identifizierten Rattenleber-Proteine.

Die Bezeichnungen aller in dem Gel markierten Proteine sind in Tabelle I-1 aufgeführt.



**Tabelle I-1: Aus 2-DE-Gelen identifizierte Rattenleber-Proteine.**

Die Tabelle gibt die Namen und die Kurzbezeichnung der jeweiligen identifizierten Proteine an, wobei sich die Nummerierung auf die *Spots* im 2-DE-Gel der Abbildung I-1 bezieht. Unter der in Spalte fünf angegebenen *Accession Number* (AN) ist das jeweilige Protein in der Datenbank SwissProt eingetragen mit dem in Spalte 4 aufgeführten theoretischen Molekulargewicht (MW).

Spot	Name	Kurzform	MW (Da)	Swiss Prot Accession Nr.
1	Translational endoplasmatic reticulum ATPase	TERA	89 977	P46462
2	Translational endoplasmatic reticulum ATPase	TERA	89 977	P46462
3	10-Formyltetrahydrofolate dehydrogenase	FTDH	99 976	P28037
4	10-Formyltetrahydrofolate dehydrogenase	FTDH	99 976	P28037
5	Protein disulfide isomerase Erp72 precursor		73 131	gi/423647 <sup>8</sup>
6	Dipeptidyl-peptidase III	DPP3	83 386	O55096
7	Heat shock cognate 71 kDa protein	HS7C	70 989	P08109
8	Stress-70 protein	GR75	73 970	P48721
9	Stress-70 protein	GR76	74 970	P48721
10	Annexin A6	ANX6	75 975	P48037

<sup>8</sup> NCBI Nr Accession Number



Spot	Name	Kurzform	MW (Da)	Swiss Prot Accession Nr.
11	Serum albumin precursor	ALBU	68 674	P02770
12	Serum albumin precursor	ALBU	69 674	P02770
13	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain	PCCA	78 289	P14882
14	Protein disulfide isomerase precursor	PDI	57 315	P04785
15	Protein disulfide isomerase precursor	PDI	58 315	P04785
16	Tubulin beta chain	TBB1	49 905	P04691
17	ATPsynthase beta chain	ATPB	56 319	P56480
18	ATPsynthase beta chain	ATPB	57 319	P10719
19	ATPsynthase beta chain	ATPB	58 319	P10719
20	40S ribosomal protein SA	RSP4	32 918	P38983
21	Apolipoprotein A-IV precursor	APA4	44 429	P02651
22	Vimentin	VIME	53 569	P31000
23	Catalase	CATA	59 931	P04762
24	Tubulin alpha-6 chain	TBA6	50 532	P05216
25	Protein disulfide isomerase A6 precursor	PDA6	47 590	Q63081
26	Protein disulfide isomerase A6 precursor	PDA7	48 590	Q63081
27	60kDa heat shock protein	CH60	60 917	P19226
28	60kDa heat shock protein	CH61	61 917	P19226
29	Protein disulfide isomerase A3 precursor	PDA3	57 044	P11598
30	Glutathione synthetase	GSHB	52 597	P46413
31	Glycerol kinase	GLPK	57 477	Q63060
32	Vitamin D-binding protein precursor	VTDB	55 106	P04276
33	Glycerol kinase	GLPK	57 477	Q63060
34	Keratin, type II cytoskeletal 8	K2C8	53 854	Q10758
35	Keratin, type II cytoskeletal 8	K2C9	54 854	Q10758
36	Guanine deaminase	GUAD	51 554	Q0WTT6
37	Protein disulfide isomerase A3 precursor	PDA3	57 044	P11598
38	Keratin	K2C8	53 854	Q10758
39	Phenylalanine-4-hydroxylase	PH4H	52 303	P04176
40	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	FTCD	59 504	O88618
41	Aldehyde dehydrogenase	DHAM	56 966	P81178
42	Phenylalanine-4-hydroxylase	PH4H	52 303	P04176
43	Betaine-homocysteine S-methyltransferase	BHMT	45 404	O09171
44	Succinyl-CoA ligase beta chain	SCB1	46 557	Q9Z219
45	S-adenosylmethionine synthetase alpha	METL	44 240	P13444
46	Keratin	K2C8	53 854	Q10758
47	Soluble epoxide hydrolase	HYES	62 927	P80299
48	T-complex protein 1, alpha subunit B	TCPE	60 042	P11983
49	Pyruvate kinase	KPYR	62 162	P12928
50	Aldehyde dehydrogenase	DHAM	56 966	P11884
51	Rab GDP dissociation inhibitor beta-2	GDIC	51 166	P50399
52	Adenosine kinase	ADK	40 152	Q64640
53	Adenosine kinase	ADK	41 152	Q64640
54	Ornithine aminotransferase	OAT	48 701	P04182
55	2-Oxoisovalerate dehydrogenase	ODBA	50 418	P11960
56	Adenosylhomocysteinase	SAHH	47 889	P10760
57	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	IVD	46 406	P12007

Spot	Name	Kurzform	MW (Da)	Swiss Prot Accession Nr.
58	Alpha enolase	ENOA	47 382	P04764
59	Alpha enolase	ENOA	48 382	P04764
60	Liver carboxylesterase 10 precursor	ES10	62 390	P16303
61	Liver carboxylesterase 10 precursor	ES11	63 390	P16303
62	Gamma actin	ACTG	41 766	P02571
63	Gamma actin	ACTG	42 766	P02571
64	Eucaryotic initiation factor 4A-II	IF42	46 373	P10630
65	Fructose-1,6-bisphosphatase	F16P	39 909	P19112
66	Fructose-1,6-bisphosphatase	F16P	40 909	P19112
67	Fructose-1,6-bisphosphatase	F16P	41 909	P19112
68	Farnesyl pyrophosphate synthetase	FPPS	41 146	P05369
69	Senescence marker protein-30	SM30	33 385	Q64374
70	Senescence marker protein-30	SM31	34 385	Q64374
71	Inorganic pyrophosphatase	IPYR	32 844	P37980
72	Serine/Threonine protein phosphatase 2A	P2AA	36 156	P13353
73	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta	ODPB	39 336	P49432
74	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta	ODPB	40 336	P49432
75	Dimethylargininedimethylaminohydrolase + 60S acidic ribosomal protein P0 <sup>9</sup>	DDH1+RLAO	31 674+34 365	O08557 P19945
76	Malate dehydrogenase	MDHC	36 494	P14152
77	N-Hydroxyarylamine sulfotransferase	SUAC	35 855	P50237
78	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GPDA	37 869	O35007
79	Annexin 5	ANX5	35 648	P14668
80	Annexin A4	ANX4	36 063	P55260
81	3-Hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase	3HAO	32 846	P46953
82	Estrogen sulfotransferase, isoform 1	SUO1	35 828	P52844
83	Estrogen sulfotransferase, isoform 6	SUP6	35 622	P49890
84	Ketohexokinase	KHK	33 299	Q02974
85	Prohibitin	PHB	29 802	P24142
86	Proteasome activator complex subunit1	PSE1	28 730	Q63797
87	Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	30 035	O55239
88	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	GDIR	23 450	Q99PT1
89	Catechol O-methyltransferase	COMT	29 806	P22734
90	Catechol O-methyltransferase	COMT	30 806	P22734
91	Catechol O-methyltransferase	COMT	31 806	P22734
92	Peroxiredoxin 2	PDX2	21 770	P35704
93	Dimethylglycine dehydrogenase	M2GD	96 273!	Q63342
94	Phosphatidylethanolamine binding protein	PEBP	20 788	P31044
95	Apolipoprotein A-I precursor	ADA1	30 126	P04639
96	UMP-CMP kinase	KCY	22 379	Q9DBP5
97	Adenine phosphoribosyltransferase	APT	19 762	P47956
98	Antioxidant protein 2	AOP2	24 729	O35244
99	Peroxiredoxin 4	PDX4	31 261	O08807
100	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	PDX3	28 338	P20108

<sup>9</sup> In diesem Fall wurden aus einem 2-DE-Gel-Spot zwei Proteine identifiziert.

<b>Spot</b>	<b>Name</b>	<b>Kurzform</b>	<b>MW (Da)</b>	<b>Swiss Prot Accession Nr.</b>
101	Epididymal-retinoic acid binding protein	ERBP	20 828	P06911
102	ATPsynthase D chain	ATPQ	18 678	P31399
103	Cytochrome b5	CYB5	15 242	P00173
104	Major urinary protein precursor	MUP	21 009	P02761
105	D-dopachrome tautomerase	DOPD	13 108	P80254
106	Nucleoside diphosphate kinase A	NDKA	17 296	Q05982
107	Superoxide dismutase	SODC	15 942	P07632
108	Transthyretin precursor	TTHY	15 710	P02767
109	14,5kDa translational inhibitor protein	UK14	14 221	P52759
110	D-dopachrome tautomerase	DOPD	13 108	P80254
111	Coatomer epsilon subunit	COPE	34 598	Q60445
112	Proteasome activator complex subunit2	PSE2	26 840	Q63798
113	Malate dehydrogenase	MDHC	36 494	P14152
114	Farnesyl pyrophosphate synthetase	FPPS	40 804	P05396
115	Succinyl-CoA ligase	SCB2	44 115	Q9Z218
116	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein	ROF	45 985	P52597
117	Actin-like protein 3	ARP3	47 797	P32391
118	Aldehyde dehydrogenase, E3 isozyme	DHAG	54 410	P49489
119	Serine hydroxymethyltransferase	GLYC	53 430	P35623
120	Aldehyde dehydrogenase family 7 member	D7A1	25 313?	Q64057
121	Cytosol aminopeptidase	AMPL	52 985	Q9CPY7
122	Phosphoglucomutase	PGMU	61 519	P38652
123	Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1	66 018	P04264
124	Serum albumin precursor	ALBU	70 670	P02770
125	T-complex protein 1	TCPE	60 042	P80316
126	Heat shock cognate 71 kDa protein	HS7C	71 082	P11142
127	10-Formyltetrahydrofolate dehydrogenase	FTDH	99 976	P28037
128	Carbamoyl-phosphate synthetase	CPSM	164 476	P07756

**Tabelle I-2: Tierstudie 1: Differentiell exprimierte Proteine in den 2-DE-Gelen der Proben von Tag 1.**

Die Tabelle gibt die Namen der jeweiligen identifizierten Proteine an, wobei sich die Nummerierung auf die Spots im 2-DE-Gel der Abbildung D-13 bezieht. Unter der in Spalte 3 angegebenen *Accession Number* (AN) ist das Protein in der Datenbank SwissProt eingetragen mit dem in Spalte 4 aufgeführten theoretischen Molekulargewicht (MW). Regulationsfaktor (RF) und p-Wert (Mann-Whitney-Test, n = 24) resultieren aus der differentiellen Analyse der 2-DE-Gele aller Proben nach einem Tag der NNM-Behandlung. Spalte 7 gibt den *Probability based Mowse Score* an. Wenn MS/MS-Analysen durchgeführt wurden, führt Spalte 8 die identifizierten Peptid-Sequenzen auf.

Spot	Protein	Swiss-Prot AN	MW (Da)	RF	p	Protein Score	MS/MS-Sequenz
1	26S protease regulatory subunit 6B	Q63570	47 379	3,43	0,0015	58	
2	Actin, cytoplasmic 2	P02571	41 766	2,26	0,0118	164	SYELPDGQVITIGNER AVFPSIVGRPR
3	Transthyretin precursor	P02767	15 710	3,70	0,0094	94	
4	Peroxiredoxin 2	P35704	21 770	2,05	0,0069	160	SLSQNYGVLNDEGIAYR QITVNDLPVGR
5	Proteasome activator complex subunit 1	Q63797	28 577	2,31	0,0078	92	
6	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	P11884	56 453	2,21	0,0009	223	
7	Protein disulfide isomerase A3 precursor	P11598	56 588	2,33	0,0090	93	
8	60 kDa heat shock protein	P18687	60 950	2,61	0,0019	35	
9	Eucaryotic initiation factor 4A-II	P10630	46 373	2,95	0,0034	75	
10	3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	P46953	32 561	2,13	0,0034	129	TGKPNPDQLLKEPPFPLSTR QGEIFLLPARVPHSPQR
11	Prohibitin	P24142	29 802	2,06	0,0013	332	NVPVITGSKDLQNVNITLR ILFRPVASQLPR
12	Catechol O-methyltransferase	P22734	29 578	2,16	0,0060	277	KGTVLLADNVIVPGTPDFLAYVR GTVLLADNVIVPGTPDFLAYVR
13	Superoxide dismutase	P07632	15 771	2,37	0,0167	94	VISLSGEHSIIGR DGVANVSIEDRVISLSGEHSIIGR

**Tabelle I-3: Tierstudie 1: Differentiell exprimierte Proteine in den 2-DE-Gelen der Proben von Woche 3.**

Die Tabelle gibt die Namen der jeweiligen identifizierten Proteine an. Unter der in Spalte 2 angegebenen *Accession Number* (AN) ist das Protein in der Datenbank SwissProt eingetragen mit dem in Spalte 3 aufgeführten theoretischen Molekulargewicht (MW). Regulationsfaktor (RF) und p-Wert (Mann-Whitney-Test, n = 24) resultieren aus der differentiellen Analyse der 2-DE-Gele aller Proben nach drei Wochen der NNM-Behandlung. Spalte 6 gibt den *Probability based Mowse Score* an. Wenn MS/MS-Analysen durchgeführt wurden, führt Spalte 7 die identifizierten Peptid-Sequenzen auf.

Protein	Swiss-Prot AN	MW (Da)	RF	p	Protein Score	MS/MS-Sequenz
60 kDa heat shock protein	P19226	61 088	4,38	0,0000	49	
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	P07379	70 112	3,09	0,0000	58	
Cathepsin D precursor	P24268	45 165	3,08	0,0000	95	NIFS FYLNR
Aldehyde dehydrogenase	P11884	56 966	2,80	0,0000	35	
Annexin A5	P14668	35 648	2,75	0,0000	197	NFATSLYSMIK VFDKYMTISGFQIEETIDR
Heat shock cognate 71 kDa protein	P08109	71 055	2,38	0,0002	118	TVTNAVVTVPAYFNDSQR ARFEELNADLFR
LIM domain kinase 2	P53670	73 524	2,26	0,0000	39	
Annexin A3	P14669	36 527	2,25	0,0000	49	GTINNYPGFNPSVDAEAIR GTINNYPGFNPSVDAEAIK
Apolipoprotein A-I precursor	P04639	30 126	2,22	0,0000	37	
Annexin A4	P55260	36 063	2,17	0,0000	144	
Heat shock protein HSP 90-beta	P11499	83 484	2,10	0,0000	81	
Apolipoprotein A-I precursor	P04639	30 126	2,08	0,0000	57	FGLYSDQMR
Retinol-binding protein I, cellular	P02696	15 864	1,87	0,0000	50	
Soluble epoxide hydrolase	P80299	62 927	1,87	0,0000	125	YQIPALAQAGFR
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Q99PT1	23 450	1,84	0,0000	116	VAVSADPNVNPVIVTR AEEYEFLTPMEEAPK
Heat shock cognate 71 kDa protein	P08109	71 055	1,84	0,0019	150	TVTNAVVTVPAYFNDSQR ARFEELNADLFR
Guanine nucleotide-binding protein G(i)	P04897	40 912	1,80	0,0011	102	IAQSDYIPTQQDVLR EYQLNDSAAYYLNDLER
Protein c20orf178 homolog	Q9D8B3	24 921	1,80	0,0001	37	
Potassium voltage-gated channel subfamily	Q9JJV7	12 050	1,72	0,0000	53	
Serum albumin precursor	P02770	70 670	1,72	0,0007	197	DVFLGTFLYEYSR
Adenine phosphoribosyltransferase	P36972	19 762	1,70	0,0000	130	SFPDFPIPGVLFRR
Betaine-homocysteine S-methyltransferase	O09171	45 404	1,85	0,0007	31	QGFIDLPEFPFGLLEPR
Pyruvate kinase, isozymes R/L	P12928	62 504	0,24	0,0000	251	IGPEGLVTEVEHGGILGSR

Protein	Swiss-Prot AN	MW (Da)	RF	p	Protein Score	MS/MS-Sequenz
						SAQLLSQYRPR EATESFATSPLSYRPVAIALDTK
Liver carboxylesterase 10 precursor	P16303	62 390	0,28	0,0000	59	
Estrogen sulfotransferase, isoform 1	P52844	35 828	0,37	0,0000	119	LIEFLERDPSAELVDR
Apolipoprotein AI precursor	P04639	30 126	0,42	0,0000	133	DSGRDYVSQFESSTLGK FGLYSDQMRENLAQR
Apolipoprotein AIV precursor	P02651	44 429	0,46	0,0004	61	
Estrogen sulfotransferase, isoform 6	P49890	35 622	0,47	0,0000	98	
Protein disulfide isomerase Erp72 precursor	gi/423647 <sup>10</sup>	73 131	0,47	0,0000	175	
3-Alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	P23457	35 517	0,49	0,0000	107	
Ornithine aminotransferase	P04182	48 701	0,53	0,0000	97	
Vitamin D-binding protein precursor	P04276	55 106	0,54	0,0000	58	
10-Formyltetrahydrofolate dehydrogenase	P28037	99 976	0,55	0,0008	211	ANATEFGLASGVFTR DLGEAALNEYLR
Protein disulfide isomerase A6 precursor	Q63081	47 590	0,55	0,0000	76	
Ketohexokinase (hepatic)	Q02974	33 299	0,57	0,0000	154	
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	O35007	37 869	0,58	0,0000	113	
Liver carboxylesterase 10 precursor	P16303	62 390	0,58	0,0005	108	
Propionyl-CoA carboxylase alpha chain	P14882	78 289	0,59	0,0000	90	
Serum paraoxonase/arylesterase	P55159	39 568	0,59	0,0001	138	IFFYDSENPPGSEVLR
Mixture <sup>11</sup>			0,61	0,0017	128	
Trifunctional enzyme alpha subunit	Q64428	82 202			75	
Peroxisomal bifunctional enzyme	P07896	79 048			68	
Glycerol kinase	Q63060	58 238	0,61	0,0000	93	
Adenosine kinase	P55264	31 426	0,61	0,0001	63	
Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase	Q62651	36 491	0,62	0,0039	54	
Aryl sulfotransferase	P17988	34 169	0,63	0,0000	96	
Succinyl-CoA ligase	Q9Z218	44 115	0,66	0,0000	100	
Protein disulfide isomerase A6 precursor	Q63081	47 590	0,67	0,0000	217	
Alpha-Enolase	P04764	47 382	0,67	0,0094	115	
Adenosylhomocysteinase	P10760	47 889	0,68	0,0032	96	

<sup>10</sup> NCBI Inr Accession Number

<sup>11</sup> Aus demselben 2-DE-Gel-Spot wurden in diesem Fall zwei Proteine identifiziert.

Protein	Swiss-Prot AN	MW (Da)	RF	p	Protein Score	MS/MS-Sequenz
Ubiquinol-cytochrome C reductase complex core protein	Q9CZ13	53 420	0,70	0,0000	32	
S-adenosylmethionine synthetase alpha	P13444	44 240	0,44	0,0000	62	
3-Hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase	P46953	32 846	0,58	0,0000	122	QGEIFLLPAR TGKPNPDQLLKEPPFPLSTR
Adenosine kinase	Q64640	40 152	0,41	0,0000	73	
Catechol O-methyltransferase	P22734	29 806	0,44	0,0000	208	KGTVLLADNVIVPGTPDFLAYVR GTVLLADNVIVPGTPDFLAYVR
Catalase	P04762	59 931	0,69	0,0083	96	
Dimethylglycine dehydrogenase	Q63342	96 273	0,53	0,0001	35	
Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	O88318	59 504	0,29	0,0000	64	TQAALVLGSLEAR
Fructose-1,6-bisphosphatase	P19112	39 909	0,64	0,0000	161	DFDPAINEYIQR
Glycerol kinase	Q63060	57 477	0,50	0,0000	125	
Heat shock protein-60	P19226	60 917	0,58	0,0000	144	KPLVIAEDVDGEALSTLVLNR
Inorganic pyrophosphatase	P37980	32 844	0,68	0,0000	146	
Major urinary protein precursor	P02761	21 009	0,14	0,0000	182	TPEDGEYFVEYDGGNTFTILK
N-Hydroxyarylamine sulfotransferase	P50237	35 855	0,35	0,0000	35	
Protein disulfide isomerase precursor	P04785	57 315	0,59	0,0008	81	ILFIFIDSDHTDNQR
Senescence marker protein-30	Q64374	33 385	0,69	0,0000	163	IFYYIDSLSYTVDAFDYDLPTGQI SNR
Tubulin beta chain	P04691	49 905	0,51	0,0002	51	

**Tabelle I-4: Tierstudie 1: Differentiell exprimierte Proteine in den 2-DE-Gelen der Proben von Woche 25.**

Die Tabelle gibt die Namen der jeweiligen identifizierten Proteine an. Unter der in Spalte 2 angegebenen *Accession Number* (AN) ist das Protein in der Datenbank SwissProt eingetragen mit dem in Spalte 3 aufgeführten theoretischen Molekulargewicht (MW). Regulationsfaktor (RF) und p-Wert (Mann-Whitney-Test) resultieren aus der differentiellen Analyse der 2-DE-Gele aller Proben des Studienendpunkts (Woche 25). RF1 und p1 (n = 24) beziehen sich auf die Auswertung mit den 2-DE-Gelen aller Proben von Woche 25, RF2 und p2 (n = 16) resultieren aus einer verfeinerten zweiten Analyse nur mit Gelen von Tieren mit Tumoren und den zugehörigen Kontrollen. Spalte 8 gibt den *Probability based Mowse Score* an. Wenn MS/MS-Analysen durchgeführt wurden, führt Spalte 9 die identifizierten Peptid-Sequenzen auf.

Protein	Swiss Prot AN	MW (Da)	RF1	p1	RF2	p2	Protein Score	MS/MS-Sequenz
Annexin V	P14668	35 648	2,73	0,0000	3,00	0,0000	117	
Fructose-1,6-bisphosphatase	P19112	39 909	1,81	0,0001	1,71	0,0106	79	
14-3-3 protein beta/alpha (Protein kinase C inhibitor)	P35213	28 020	1,86	0,0004	2,15	0,0000	125	AVTEQGHLSNEER TAFDEAIAELDTLNEESYK
Heat shock protein 70-related protein	Q61316	94 872	1,95	0,0000	1,82	0,0019	38	EFSITDVVPYPISLR VREFSITDVVPYPISLR
Damaged-DNA recognition protein 1	Q91YC8	111 986	1,74	0,0004	-	-	57	
Vimentin	P31000	53 569	1,99	0,0000	-	-	234	
Betaine-homocysteine S-methyltransferase	O09171	45 404	2,14	0,0019	-	-	47	LNAGEVWIGDGGFVFALEKR
Succinyl-CoA ligase	Q9Z2I8	44 115	0,66	0,0082	0,59	0,0019	75	INFDDNAEFR
Major urinary protein precursor	P02761	20 724	0,49	0,0000	0,44	0,0001	73	
Fructose-1,6-bisphosphatase	P19112	39 453	0,68	0,0000	0,59	0,0000	168	
Ornithine aminotransferase	P04182	48 701	0,57	0,0000	0,50	0,0000	80	HQVLFIADIEIQTGLAR
Aldehyde dehydrogenase	P81178	54 299	0,67	0,0001	0,53	0,0000	64	
Fructose-1,6-bisphosphatase	P19112	39 453	0,69	0,0000	0,63	0,0000	161	DFDPAINIYIQR
Fructose-1,6-bisphosphatase	P19112	39 453	0,68	0,0027	0,54	0,0001	57	
ATP synthase beta chain	P10719	56 318	0,56	0,0005	-	-	64	
Malate dehydrogenase	P14152	36 494	0,58	0,0000	0,53	0,0000	115	FVEGLPINDFSR
14,5 kDa translational inhibitor protein	P52759	14 221	0,69	0,0177	-	-	37	
S-adenosylmethionine synthetase alpha	P13444	44 240	0,65	0,0177	-	-	99	
ATP synthase beta chain	P10719	56 318	0,50	0,0000	0,42	0,0000	163	
Estrogen sulfotransferase, isoform 6	P49890	35 622	0,66	0,0043	-	-	98	
N-hydroxyarylamine sulfotransferase	P50237	35 741	0,67	0,0013	-	-	94	
Isovaleryl-CoA dehydrogenase	P12007	46 406	0,63	0,0000	0,54	0,0000	81	
Betaine-homocysteine S-methyltransferase	O09171	45 404	0,65	0,0001	0,63	0,0007	39	QGFIDLPEFPFGLEPR



Protein	Swiss Prot AN	MW (Da)	RF1	p1	RF2	p2	Protein Score	MS/MS-Sequenz
47 kDa heat shock protein precursor	P19324	46 674	0,43	0,0008	0,36	0,0114	30	
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	O35077	37 869	0,62	0,0011	-	-	67	IVGSNASQLAHFDPR
ATP synthase beta chain	P56480	56 300	0,43	0,0006	0,37	0,0034	100	
Dimethylglycine dehydrogenase	Q63342	96 273	0,67	0,0156	0,48	0,0008	128	NITDELGVLGVAGPYAR NYPATIIQEPLVLTEPTR
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	P32755	43 591	0,61	0,0106	-	-	120	FLPGFEPTYKDTLLPK FWSVDDTQVHTEYSSLR
Dimethylglycine dehydrogenase	Q63342	96 273	0,59	0,0070	0,46	0,0080	191	NITDELGVLGVAGPYAR NYPATIIQEPLVLTEPTR
Dimethylglycine dehydrogenase	Q63342	96 273	0,66	0,0061	0,50	0,0111	35	NYPATIIQEPLVLTEPTR NITDELGVLGVAGPYAR
Pyruvate kinase, isozymes R/L	P12928	62 162	0,57	0,0054	-	-	76	
2-Oxoisovalerate dehydrogenase	P11960	50 418	0,64	0,0001	0,44	0,0000	61	
Stress-70 protein, mitoch, precursor	O35501	73 970	0,49	0,0000	0,56	0,0007	59	AQFEGIVTDLIKR
Phenylalanine-4-hydroxylase	P04176	52 303	0,70	0,0143	-	-	101	TFAATIPRPFSVR
Heat shock cognate 71 kDa protein	P19378	70 989	0,63	0,0103	-	-	157	
Adenine phosphoribosyltransferase	P47956	19 871	-	-	1,71	0,0000	99	SFPDFPIPGVLFRR LGPVPFFSLLQYE
Keratin, type I cytoskeletal 14	Q61781	53 176	-	-	1,87	0,0000	67	IRDWYQR
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Q99PT1	23 450	-	-	0,73	0,0001	103	VAVSADPNVNPVIVTR
Coatomer epsilon subunit	Q60445	34 598	-	-	1,79	0,0007	38	YGVVLDEIKPSSAPELQAVR
60 kDa heat shock protein	P18687	61 122	-	-	0,66	0,0005	51	
Phenylalanine-4-hydroxylase	P04176	52 303	-	-	0,65	0,0000	32	
Glycerol kinase	Q64516	58 219	-	-	0,69	0,0152	68	
Adenosine kinase	Q64640	40 152	-	-	0,65	0,0011	73	
TFIIH basal transcription factor complex	O08811	87 571	-	-	0,59	0,0015	49	
Caspase-8 precursor	O89110	56 291	-	-	0,56	0,0051	37	
Succinyl-CoA ligase	Q9Z218	44 115	-	-	0,65	0,0008	66	
Heat shock cognate 71 kDa protein	P19378	70 989	-	-	0,45	0,0001	88	

**Tabelle I-5: Tierstudie 2: Aus 2-DE-Gelen der Proben aller Zeitpunkte identifizierte Proteine.**

Die Tabelle gibt die Namen der jeweiligen identifizierten Proteine an. Unter der in Spalte 2 angegebenen *Accession Number* (AN) ist das Protein in der Datenbank SwissProt eingetragen mit dem in Spalte 3 aufgeführten theoretischen Molekulargewicht (MW). Regulationsfaktor (RF) und p-Wert (Mann-Whitney-Test, n = 24) resultieren aus der differentiellen Analyse der 2-DE-Gele der Proben des jeweiligen Studienzeitpunkts. Spalte 6 gibt den *Probability based Mowse Score* an. Wenn MS/MS-Analysen durchgeführt wurden, führt Spalte 7 die identifizierten Peptid-Sequenzen auf.

Protein	Swiss Prot AN	MW (Da)	RF	p	Protein Score	MS/MS-Sequenz
<b>Identifizierte Proteine Woche 1</b>						
Apolipoprotein A-IV precursor	P02651	44 429	1,59	0,0145	61	
Tubulin beta chain	P04691	50 387	0,56	0,0003	227	FPGQLNADLR ISEQFTAMFR LHFFMPGFAPLTSR
Apolipoprotein A-I precursor	P04639	30 126	1,24	0,0189	150	DSGRDYVSQFESSTLGK VVAEEFRDR FGLYSDQMRENLAQR
78 kDa glucose-regulated protein precursor	P06761	72 474	0,43	0,0000	170	IEIESFFEGEDFSETLTR
Phenylalanine-4-hydroxylase	P04176	52 303	0,80	0,0087	133	DFLGGLAFR
Adenosine kinase	Q64640	40 152	0,78	0,0016	63	
S-adenosylmethionine synthetase alpha	P13444	44 240	0,65	0,0003	140	FVIGGPQGDAGVTGR NFDLRPGVIVR 15,10,03
Mixture			1,43	0,0018	143	
Dimethylargininedimethylaminohydrolase	O08557	31 674			73	
+ 60S acidic ribosomal protein P0	P19945	34 365			71	
26S protease regulatory subunit 6A	Q63569	49 415	1,58	0,0028	43	
Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit	P48508	30 871	1,37	0,0000	154	LFIVGSNSSSTR QFDIQLLTHNDPK
D-dopachrome tautomerase	P80254	13 108	0,83	0,0177	49	
Apolipoprotein A-I precursor	P04639	30 126	1,29	0,0037	133	DSGRDYVSQFESSTLGK FGLYSDQMRENLAQR
Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	O88618	59 504	1,48	0,,0016	90	IIEYLVPDSGPEQSLLDASLR
Estrogen sulfotransferase, isoform 6	P19890	35 622	0,54	0,0000	98	
Serum albumin precursor	P02770	70 670	0,62	0,0045	146	FPNAEFAEITK LGEYGFQNAVLVR
TAR DNA-binding protein-43	Q921F2	44 918	0,56	0,0028	61	FGGNPGGFGNQGGFGNSR

Protein	Swiss Prot AN	MW (Da)	RF	p	Protein Score	MS/MS-Sequenz
Adenosine kinase	Q64640	40 152	0,74	0,0027	63	
10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	P28037	99 976	2,32	0,0007	211	ANATEFGLASGVFTR DLGEAALNEYLR
Superoxide dismutase	P07632	15 942	0,86	0,0189	94	VISLSGEHSIIGR DGVANVSIEDRVISLSGEHSIIGR
Catechol O-methyltransferase	P22734	31 806	0,82	0,0014	208	KGTVLLADNVIVPGTPDFLAYVR GTVLLADNVIVPGTPDFLAYVR
Keratin, type II cytoskeletal 8	Q10758	53 854	1,33	0,0040	59	
<b>Identifizierte Proteine Woche 3</b>						
Catechol O-methyltransferase	P22734	29 806	0,76	0,0007	277	KGTVLLADNVIVPGTPDFLAYVR GTVLLADNVIVPGTPDFLAYVR
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	O35077	37 869	0,70	0,0082	41	
S-adenosylmethionine synthetase alpha	P13444	44 240	0,79	0,0040	140	FVIGGPQGDAGVTGR NFDLRPGVIVR
Alpha-1-antiproteinase precursor	P17475	46 278	1,24	0,0026	23	VFNNDADLSGITEDAPLK ISSNLADFAFSLYR
Senescence marker protein-30	Q64374	33 385	1,16	0,0009	163	IFYYIDSLSYTVDAFDYDLPTGQISNR
3-Hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase	P46953	32 846	0,87	0,0001	129	TGKPNPDQLLKEPPFPLSTR QGEIFLLPARVPHSPQR
Tubulin alpha-6 chain	P05216	50 532	1,31	0,0131	137	
Catechol O-methyltransferase	P22734	29 806	0,78	0,0003	208	KGTVLLADNVIVPGTPDFLAYVR GTVLLADNVIVPGTPDFLAYVR
Serum paraoxonase/arylesterase	P55159	39 568	1,11	0,0160	138	IFFYDSENPPGSEVLR
Serum albumin precursor	P02770	70 670	0,73	0,0037	48	
Glycerol kinase	Q63060	57 477	1,17	0,0051	93	
Apolipoprotein A-I precursor	P04639	30 126	0,88	0,0013	133	DSGRDYVSQFESSTLGK FGLYSQDMRENLAQR
Protein disulfide isomerase precursor	P04785	57 315	1,24	0,0011	81	ILFIFIDSDHTDNQR
N-Hydroxyarylamine sulfotransferase	P50237	35 855	0,79	0,0085	35	
Actin	P48975	42 053	1,35	0,0005	32	
Gamma actin	P02571	41 766	1,61	0,0004	164	SYELPDGQVITIGNER AVFPSIVGRPR
Senescence marker protein-30	Q64374	33 385	1,25	0,0146	49	VGVDAPVSSVALR
NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydro	O08557	31 674	1,50	0,0000	68	
D-dopachrome tautomerase	P80254	13 108	0,86	0,0024	75	

Protein	Swiss Prot AN	MW (Da)	RF	p	Protein Score	MS/MS-Sequenz
Annexin A3	P14669	36 528	1,42	0,0017	68	
Tubulin alpha-6 chain	P05216	50 532	1,39	0,0001	67	
Fructose-1,6-bisphosphatase	P19112	39 909	0,84	0,0000	161	DFDPAINEYIQR
4-hydroxyphenylpyruvat dioxygenase	P32755	43 591	0,60	0,0026	61	
Proteasome activator complex subunit1	Q63797	28 730	1,11	0,0139	92-	
Actin, cytoplasmic 2	P02571	42 108	1,58	0,0000	138	
Guanine deaminase	Q0WTT6	51 554	1,17	0,0071	178	
Heat shock cognate 71 kDa protein	P19378	70 989	0,50	0,0056	133	
60kDa heat shock protein	P19226	60 917	1,24	0,0035	49	
Adenosine kinase		40 152	0,83	0,0011	63	
Protein disulfide isomerase A3 precursor	P11598	57 044	1,29	0,0146	95	
Aldehyde dehydrogenase family 7 member	Q9DBF1	55 935	1,93	0,0101	33	
Heat shock cognate 71 kDa protein	P19378	70 989	1,52	0,0105	209	TVTNAVVTVPAYFNDSQR ARFEELNADLFR
<b>Identifizierte Proteine Woche 8</b>						
Betaine-homocysteine S-methyltransferase	O09171	45 404	0,73	0,0123	78	
Glutathione synthetase	P46413	52 597	1,19	0,0109	104	
Catalase	P04762	59 931	1,66	0,0005	46	
Peroxiredoxin 4	O08807	31 261	0,86	0,0052	54	
Liver carboxylesterase 10 precursor	P16303	62 390	1,47	0,0141	32	
Actin, cytoplasmic	P48975	42 053	1,49	0,0009	85	
3-hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase	P46953	32 846	1,61	0,0026	52	
Annexin A4	P55260	36 063	1,19	0,0015	109	
Guanine deaminase	Q9WTT6	51 554	1,41	0,0038	43	
S-adenosylmethionine synthetase alpha	P13444	44 240	1,40	0,0136	33	FVIGGPQGDAGVTGR NFDLRPGVIVR
Argininosuccinate lyase	P20673	51 745	0,79	0,0109	132	INVLPLGSGAIAGNPLGVDR
Glycine amidinotransferase	P50442	48 724	0,80	0,0107	37	
Betaine-homocysteine S-methyltransferase	O09171	45 404	1,64	0,0006	46	
Protein C7orf24 homolog	Q9D7X8	21 438	0,84	0,0012	63	LQDFKLDFGNFQGK
Enoyl-CoA hydratase	P14604	31 895	0,75	0,003	48	
Guanine deaminase	Q9WTT6	51 554	1,37	0,0016	109	
Malate dehydrogenase	P14152	51 554	0,70	0,0000	33	
Dihydrolipoamide acetyltransferase	P08461	59 126	1,41	0,0042	66	
Phosphoglucomutase	P38652	61 519	0,62	0,0118	128	NIFDFNALK

Protein	Swiss Prot AN	MW (Da)	RF	p	Protein Score	MS/MS-Sequenz
						FYMTEAIQLIVR
Protein disulfide isomerase A3 precursor	P11598	57 044	0,76	0,0059	64	
Estrogen sulfotransferase, isoform 3	P49889	35 735	2,83	0,0000	47	
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	O35077	37 869	0,67	0,0153	40	
Senescence marker protein 30	Q03336	33 938	1,19	0,0056	51	
Mixture <sup>12</sup>			1,53	0,0000	143	
NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase	O08557	31 674			73	
60S acidic ribosomal protein P0	P19945	34 365			71	
T-complex protein 1, epsilon subunit	P80316	60 042	1,21	0,0155	58	
Glycerol-3-phosphat dehydrogenase	O35077	37 869	0,63	0,0000	?	
60 S ribosomal protein L36	P39032	12 186	0,75	0,0125	45	
Carbohydrate kinase-like protein	Q9D5J6	51 783	1,34	0,0038	65	
Adenosine kinase	Q64640	40 152	0,83	0,0166		
Apolipoprotein A-I precursor	P04639	30 126	0,85	0,0008	150	DSGRDYVSQFESSTLGK VVAEEFRDR FGLYSDQMRENLAQR
Nicotinamide N-methyltransferase	O55239	30 035	0,78	0,0007	74	
ATP synthase D chain	P31399	18 678	0,79	0,0027	55	
Adenosine kinase	Q64640	40 152	0,83	0,0001	73	
Catalase	P04762	59 931	1,36	0,0029	96	
Dimethylglycine dehydrogenase	Q63342	96 273!	0,86	0,0034	35	
Fructose-1,6-bisphosphatase	P19112	39 909	0,77	0,0000	103	
Fructose-1,6-bisphosphatase	P19112	39 909	0,82	0,0001	95	
N-Hydroxyarylamine sulfotransferase	P50237	35 741	0,79	0,0155	35	
Peroxiredoxin 2	P35704	21 770	0,73	0,0010	160	SLSQNYGVLKNDEGIAYR QITVNDLPVGR
Phosphatidylethanolamine binding protein	P31044	20 788	0,88	0,0027	136	GNDISSGTVLSEYVGSPPKDTGLHR
Protein disulfide isomerase A3 precursor	P11598	57 044	1,63	0,0013	67	FLQEYFDGNLKR
Transthyretin precursor	P02767	15 710	0,72	0,0008	94	
Vimentin	P31000	53 569	1,54	0,0001	234	
<b>Identifizierte Proteine Woche 12</b>						
Keratin type II, cytoskeletal 8	Q10758	53 854	1,87	0,0001	59	

<sup>12</sup> Aus demselben 2-DE-Gel-Spot wurden in diesem Fall zwei Proteine identifiziert.

Protein	Swiss Prot AN	MW (Da)	RF	p	Protein Score	MS/MS-Sequenz
Farnesyl pyrophosphate synthetase	P05396	40 804	1,89	0,0003	74	GLTVVQTFQELVEPR
14-3-3 protein epsilon	P42655	29 327	1,82	0,0000	98	
Tropomyosin alpha 4 chain	P09495	28 550			97	
Protein disulfide isomerase Erp 72 precursor	gi/423647 <sup>13</sup>	73 131	0,69	0,0002		
Beta-actin	P02570	42 052	0,67	0,0000	141	
Catalase	P04762	59 931	0,66	0,0109	96	
Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	O88618	59 504	0,38	0,0000	278	
Tubulin beta chain	P04691	49 905	0,55	0,0002	51	
Serum albumin precursor	P02770	68 674	0,64	0,0009	62	FPNAEFAEITK
Keratin	Q10758	53 854	0,62	0,0008	65	ATLEAAIADAEQRGELAVK
Keratin	Q10758	53 854	0,65	0,0001	168	LEGLTDEINFLR ATLEAAIADAEQRGELAVK
Gamma actin	P02571	41 766	0,58	0,0001	164	SYELPDGQVITIGNER AVFPSIVGRPR
Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	O88618	59 504	0,68	0,0029	65	TQAALVLGSLEAR
ATPsynthase beta chain	P10719	56 319	0,66	0,0030	163	FTQAGSEVSALLGR
Alpha enolase	P04764	47 382	0,64	0,0000	41	
60 kDa heat shock protein	P19226	60 917	0,68	0,0000	68	
<b>Identifizierte Proteine Woche 20</b>						
Estrogen sulfotransferase, isoform 1	P52844	35 828	2,34	0,0049	119	LIEFLERDPSAELVDR
Aryl sulfotransferase	P17988	34 169	0,63	0,0070	64	KILEFLGR
Carbamoyl-phosphate synthetase	P07756	167 476	0,21	0,0003	59	
20-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	P51652	37 732	1,88	0,0023	36	
<b>Identifizierte Proteine Woche 30</b>						
3-Hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase	P46953	32 846	0,61	0,0128	30	
Glycogen phosphorylase	P09811	97 877	2,18	0,0000	34	
Aldehyde dehydrogenase	P81178	54 813	0,70	0,0063	53	
Succinyl-CoA ligase	Q9Z2I8	44 115	0,67	0,0069	47	
Annexin A6	P48037	75 975	0,73	0,0188	166	
Catalase	P04762	59 931	2,01	0,0005	109	
Alpha-actinin 4	P57780	105 368	0,55	0,0007	42	
Serum albumin precursor	P02770	70 670	0,48	0,0001	70	DVFLGTFLYEYSR

<sup>13</sup> NCBI Inr Accession Number

Protein	Swiss Prot AN	MW (Da)	RF	p	Protein Score	MS/MS-Sequenz
						LPCVEDYLSAILNR GLVLIAFSQYLQK
Hemopexin precursor	P20059	52 000	0,44	0,0001	99	
<b>Identifizierte Proteine Woche 50</b>						
Ketohexokinase or Biliverdin reductase A precursor	Q02974 P46844	33 299 33 716	2,06	0,0000	130 144	IEQYNATQPLQK FTASPLEEER
Protein disulfide isomerase A3 precursor	P11598	57 044	2,07	0,0047	210	IFRDGEEAGAYDGPR AASNLRDNYR
Galactokinase	Q9R0N0	42 549	1,11	0,0107	80	
Glutathione S transferase, pi 2	P47954	23 551	2,09	0,0001	167	FEDGDLTYQSNAILR PPYTIVYFPVR
Protein disulfide isomerase A6 precursor	Q63081	47 590	1,21	0,0009	409	GSFSEQQINEFLR GSTAPVGGGSFPNITPR LAAVDATVNQVLASR
Protein disulfide isomerase A3 precursor	P11598	57 044	2,93	0,0000	331	AASNLRDNYR LAPEYAAAATR
Eucaryotic initiation factor 4A-I	P60843	46 353	0,73	0,0001	164	VLITTDLLAR GIYAYGFEKPSAIQQR
Fructose-1, 6-bisphosphatase	P19112	39 909	0,86	0,0012	319	KFPPDNSAPYGAR SRPSLPLPQSR
Ferritin light chain	P49945	20 756	0,68	0,0130	103	QNYSTEVEAAVNR
Chain A, Crystal Structure of Rat Alpha 1- Macroglobulin Receptor Binding Domain	12084772 <sup>13</sup>	15 363	2,12	0,0000	76	
ATP-dependent chromatin remodelling protein SNF2H	34851567 <sup>13</sup>	121 560	1,34	0,0041	102	
Aflatoxin aldehyde reductase member 2	Q8CG45	41 106	0,66	0,0053	113	QVETELLPCLR
Acyl-CoA dehydrogenase	P70584	48 250	0,60	0,0043	118	LVEAGRPFIK

**Tabelle I-6: Differentiell exprimierte Proteine in Proben der Woche 3 von Tierstudie 1; identifiziert und quantifiziert mittels iTRAQ-Analyse.**

Die Tabelle gibt den Namen des jeweiligen identifizierten Proteins mit der zugehörigen SwissProt *Accession Number* an. Die iTRAQ-Analyse erfolgte mit zwei nach Gelfiltration der Leberlysate erhaltenen Fraktionen (Spalte 1). Spalte 4 führt die Anzahl identifizierter Peptide pro Protein auf. Die Regulationsfaktoren (RF1, RF2 und RF3) beziehen sich auf die Quantifizierung der Peptide in den drei behandelten Proben im Vergleich zu einer Kontrolle und resultieren in dem in Spalte 9 angegebenen mittleren RF. Bei Quantifizierung eines Proteins anhand mehrerer Peptide ergeben sich demzufolge auch drei Standardabweichungen (SA1, SA2 und SA3). (C.I. = *Confidence Interval*)

Fraktion	Protein	C.I. (%)	Total Ion Score	Peptide	RF1 115/114	RF2 116/114	RF3 117/114	mittlerer RF	SA1 115/114	SA1 116/114	SA1 117/114	mittlere SA
1	(P70555) Parathyroid hormone receptor precursor	58.388	18	1	10.93	6.43	5.74	7.70	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(Q9CQI6) Coactosin-like protein	60.96	18	1	4.16	2.97	1.98	3.04	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(P34058) Heat shock protein HSP 90-beta	63.59	18	1	3.26	3.87	1.98	3.03	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(P38918) Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 1	100	181	5	2.94	3.10	1.77	2.60	1.011	1.576	0.787	1.125
1	(P51647) Aldehyde dehydrogenase 1A1	100	145	3	2.15	2.80	2.35	2.43	1.550	1.129	1.147	1.275
2	(Q9WUR2) Peroxisomal 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase	99.968	49	1	2.03	3.38	1.71	2.37	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(P45479) Palmitoyl-protein thioesterase 1 precursor	97.932	31	1	2.74	2.18	2.14	2.35	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(P47954) Glutathione S-transferase P	100	133	3	2.75	2.18	1.80	2.24	1.702	1.287	0.930	1.306
2	(P60843) Eukaryotic initiation factor 4A-I	99.832	42	1	1.78	2.63	2.03	2.14	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(O89040) 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta 2	72.615	20	1	2.89	1.66	1.34	1.96	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(Q60954) Homeobox protein Meis1	85.02	22	1	2.17	2.16	1.54	1.96	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q07116) Sulfite oxidase, mitochondrial precursor	88.76	23	1	2.87	2.15	0.80	1.94	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q64727) Vinculin	99.92	45	1	1.87	2.37	1.53	1.92	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(P46413) Glutathione synthetase	99.999	66	2	1.89	2.33	1.48	1.90	0.647	0.510	0.402	0.519
1	(P38918) Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 1	100	355	7	2.16	2.42	1.06	1.88	0.830	1.219	0.410	0.820
2	(P52847) DOPA/tyrosine sulfotransferase	100	143	3	2.25	1.65	1.50	1.80	0.325	0.530	1.072	0.642
2	(Q9WUS0) Adenylate kinase isoenzyme 4,	100	108	2	1.65	1.90	1.84	1.80	0.085	1.332	0.042	0.486
1	(P52955) Transcription factor LBX1	58.484	18	1	1.85	2.05	1.46	1.79	0.000	0.000	0.000	0.000



Fraktion	Protein	C.I. (%)	Total Ion Score	Peptide	RF1 115/114	RF2 116/114	RF3 117/114	mittlerer RF	SA1 115/114	SA1 116/114	SA1 117/114	mittlere SA
2	(P13472) Thymosin beta-10	100	90	2	2.43	1.37	1.42	1.74	0.460	0.286	0.075	0.274
2	(P45592) Cofilin	100	168	2	2.52	1.38	1.29	1.73	0.896	0.220	0.422	0.513
1	(Q61694) 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type V	61.344	18	1	1.78	1.94	1.44	1.72	0.807	0.677	0.155	0.546
1	(P36552) Coproporphyrinogen III oxidase	80.175	21	1	1.99	1.64	1.45	1.69	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(O09131) Glutathione transferase omega 1	77.327	20	1	1.40	1.77	1.90	1.69	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q9EPE9) Probable cation-transporting ATPase 13A	76.438	20	1	2.24	1.72	1.05	1.67	0.562	0.318	0.331	0.404
2	(Q8K314) Rab effector MyRIP	59.681	18	1	1.66	1.66	1.58	1.63	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(P15791) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta chain	52.52	17	1	1.82	1.81	1.26	1.63	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(P97924) Huntingtin-associated protein-interacting protein	80.161	21	1	1.82	1.81	1.26	1.63	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(P48036) Annexin A5	99.79	41	2	1.77	1.76	1.30	1.61	0.384	0.320	0.667	0.457
2	(Q61881) DNA replication licensing factor MCM7	69.344	19	1	1.76	1.49	1.46	1.57	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(P55260) Annexin A4	76.476	20	1	1.15	2.07	1.49	1.57	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(P08503) Acyl-CoA dehydrogenase	99.988	53	1	1.96	1.62	1.11	1.57	0.067	0.337	0.108	0.170
2	(O70591) Prefoldin subunit 2	56.442	18	1	2.04	1.14	1.49	1.56	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(Q80XC6) Protein C14orf102 homolog	66.805	19	1	2.04	1.14	1.49	1.56	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(Q9CU62) Structural maintenance of chromosome 1-like 1 protein	79.532	21	1	2.04	1.14	1.49	1.56	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(Q9R269) Periplakin	63.266	18	1	2.04	1.14	1.49	1.56	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(Q9WVA4) Transgelin 2	100	79	3	1.71	1.86	1.08	1.55	0.135	0.291	0.477	0.301
1	(O09174) Alpha-methylacyl-CoA racemase	100	134	2	2.18	1.47	0.97	1.54	0.683	0.482	0.206	0.457
1	(O89017) Legumain precursor	98.192	31	1	1.53	2.14	0.96	1.54	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(P60335) Poly(rC)-binding protein 1	79.274	21	1	2.87	1.21	0.52	1.54	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(O89017) Legumain precursor	100	90	1	1.71	1.64	1.21	1.52	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(P04182) Ornithine aminotransferase	99.998	61	2	0.27	0.17	0.08	0.17	0.086	0.037	0.076	0.066
2	(O70418) Zinc finger protein 179	65.445	19	1	0.33	0.20	0.12	0.22	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(P14141) Carbonic anhydrase III	100	231	4	0.37	0.24	0.21	0.27	0.157	0.099	0.163	0.139

Fraktion	Protein	C.I. (%)	Total Ion Score	Peptide	RF1 115/114	RF2 116/114	RF3 117/114	mittlerer RF	SA1 115/114	SA1 116/114	SA1 117/114	mittlere SA
1	(P50237) N-hydroxyarylamine sulfotransferase	99.985	52	2	0.36	0.29	0.43	0.36	0.322	0.179	0.245	0.249
2	(P30904) Macrophage migration inhibitory factor	100	80	2	0.43	0.46	0.30	0.40	0.357	0.199	0.230	0.262
1	(P57769) Sorting nexin 16	95.623	28	1	0.39	0.59	0.28	0.42	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q64611) Cysteine sulfinic acid decarboxylase	100	91	3	0.51	0.47	0.35	0.44	0.402	0.339	0.221	0.321
1	(P05545) Contrapsin-like protease inhibitor 1 precursor	99.999	66	1	0.44	0.54	0.35	0.44	0.281	0.024	0.055	0.120
1	(P38652) Phosphoglucomutase	97.622	30	1	0.64	0.40	0.35	0.46	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(P22734) Catechol O-methyltransferase	100	207	3	0.45	0.38	0.58	0.47	0.062	0.139	0.143	0.114
2	(P52845) Estrogen sulfotransferase, isoform 2	100	208	6	0.55	0.24	0.66	0.48	0.177	0.204	0.153	0.178
2	(P04550) Parathymosin	99.612	38	1	0.68	0.46	0.31	0.48	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q9JI57) General transcription factor II-I repeat domain-containing protein 1	98.717	33	2	0.44	0.38	0.64	0.49	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(O88799) Zonadhesin precursor	77.894	21	1	0.54	0.51	0.42	0.49	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(P10686) 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma 1	62.631	18	1	0.54	0.51	0.42	0.49	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(P30276) G2/mitotic-specific cyclin B2	79.274	21	1	0.54	0.51	0.42	0.49	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q9DCV6) Protein KIAA0141 homolog	52.987	17	1	0.75	0.71	0.04	0.50	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(Q63081) Protein disulfide isomerase A6 precursor	95.403	27	1	0.49	0.57	0.45	0.50	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q8CBY1) Sterile alpha motif domain containing protein 4	57.069	18	1	0.62	0.48	0.43	0.51	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q925F4) RING finger protein 37	82.412	21	1	0.57	0.59	0.38	0.51	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(P12785) Fatty acid synthase	62.57	18	1	0.59	0.62	0.32	0.51	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(O35188) Fractalkine precursor	63.254	18	1	0.33	0.77	0.44	0.51	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q9DBF1) Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	99.995	57	2	0.41	0.57	0.59	0.53	0.233	0.218	0.228	0.226
2	(O35156) UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase 1	90.635	24	1	0.55	0.56	0.48	0.53	0.065	0.010	0.028	0.034

Fraktion	Protein	C.I. (%)	Total Ion Score	Peptide	RF1 115/114	RF2 116/114	RF3 117/114	mittlerer RF	SA1 115/114	SA1 116/114	SA1 117/114	mittlere SA
2	(P97430) Antileukoproteinase 1 precursor	90.635	24	1	0.55	0.56	0.48	0.53	0.065	0.010	0.028	0.034
2	(Q9ES63) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 29	90.635	24	1	0.55	0.56	0.48	0.53	0.065	0.010	0.028	0.034
2	(Q9R0A5) Serine/threonine-protein kinase Nek3	90.635	24	1	0.55	0.56	0.48	0.53	0.065	0.010	0.028	0.034
1	(P13255) Glycine N-methyltransferase	100	325	6	0.59	0.58	0.41	0.53	0.286	0.238	0.097	0.207
1	(Q9QZZ4) Myosin XV	98.643	33	2	0.73	0.42	0.44	0.53	0.060	0.107	0.079	0.082
2	(P02692) Fatty acid-binding protein	100	541	8	0.59	0.49	0.56	0.55	0.116	0.190	0.138	0.148
1	(Q63342) Dimethylglycine dehydrogenase	100	299	7	0.52	0.65	0.47	0.55	0.229	0.173	0.165	0.189
1	(Q64458) Cytochrome P450 2C29	53.952	17	1	0.37	0.38	0.90	0.55	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(P19226) 60 kDa heat shock protein	100	112	2	0.66	0.47	0.53	0.55	0.176	0.304	0.074	0.184
1	(P97382) Voltage-gated potassium channel beta-3 subunit	77.756	20	1	0.41	0.73	0.53	0.56	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(P35293) Ras-related protein Rab-18	87.654	23	1	0.61	0.55	0.51	0.56	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(Q03114) Cell division protein kinase 5	87.654	23	1	0.61	0.55	0.51	0.56	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(Q9CQC1) Crooked neck-like protein 1	87.654	23	1	0.61	0.55	0.51	0.56	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q08782) Small inducible cytokine A2 precursor	75.497	20	1	0.53	0.69	0.46	0.56	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(O88587) Catechol O-methyltransferase	100	75	3	0.84	0.56	0.31	0.57	0.247	0.301	0.100	0.216
1	(Q9QXZ0) Microtubule-actin crosslinking factor 1	79.225	21	1	0.55	0.64	0.51	0.57	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q91ZU6) Bullous pemphigoid antigen 1, isoforms 1/2/3/4	99.807	41	2	0.63	0.64	0.43	0.57	0.037	0.116	0.097	0.083
1	(O08522) 28 kDa Golgi SNARE protein	79.573	21	1	0.61	0.70	0.39	0.57	0.025	0.091	0.082	0.066
2	(Q8VCR7) CCG1-interacting factor B	99.997	59	1	0.62	0.56	0.54	0.57	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(P46844) Biliverdin reductase A precursor	58.292	18	1	0.68	0.60	0.43	0.57	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(P59529) Probable taste receptor type 2 member 18	67.773	19	1	0.68	0.53	0.52	0.58	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q8CHG7) PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor 1	67.773	19	1	0.68	0.53	0.52	0.58	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q9QYI3) DnaJ homolog subfamily C member 7	67.773	19	1	0.68	0.53	0.52	0.58	0.000	0.000	0.000	0.000

Fraktion	Protein	C.I. (%)	Total Ion Score	Peptide	RF1 115/114	RF2 116/114	RF3 117/114	mittlerer RF	SA1 115/114	SA1 116/114	SA1 117/114	mittlere SA
1	(P20059) Hemopexin precursor	100	165	4	0.66	0.65	0.43	0.58	0.244	0.112	0.217	0.191
1	(O70157) DNA topoisomerase III alpha	98.554	32	2	0.55	0.72	0.47	0.58	0.346	0.776	0.096	0.406
2	(P98197) Potential phospholipid-transporting ATPase IH	56.797	18	1	0.64	0.47	0.63	0.58	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q9WVK7) Short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	100	243	5	0.56	0.63	0.55	0.58	0.313	0.280	0.181	0.258
1	(P13444) S-adenosylmethionine synthetase	100	201	7	0.59	0.62	0.54	0.58	0.160	0.303	0.147	0.203
1	(P48004) Proteasome subunit alpha type 7	50.087	17	1	0.89	0.48	0.39	0.59	0.000	0.000	0.000	0.000
2	(O35625) Axin 1	52.3	17	1	0.71	0.51	0.54	0.59	0.000	0.000	0.000	0.000
1	(Q61153) Type I iodothyronine deiodinase	96.641	29	1	0.53	0.65	0.60	0.60	0.174	0.061	0.072	0.102
2	(P55264) Adenosine kinase	100	72	2	0.60	0.55	0.65	0.60	0.087	0.278	0.103	0.156

**Tabelle I-7: : Tierstudie 2: m/z-Signale in SELDI-Spektren mit statistisch signifikanten Intensitätsunterschieden zwischen den Spektren von Kontrollen und behandelten Proben aller Zeitpunkte.**

Alle Signale weisen einen p-Wert  $\leq 0,01$  auf. Rot gekennzeichnet sind die m/z-Werte von Signalen, die in den Spektren aller Proben des entsprechenden Zeitpunkts detektiert wurden; die Signale schwarz markierter Werte wurden in weniger als 50% der Spektren detektiert; grüne Werte wurden nur in den Spektren von Kontrollproben, blaue nur in denen von behandelten Proben detektiert.

m/z-Wert							
Tag 1	Woche 1	Woche 3	Woche 8	Woche 12	Woche 20	Woche 30	Woche 50
	2547,8		2541,3				
	2563,1						
							2816,6
						2890,1	
3193,2	3194,4						
	3356,4		3356,2				
		3450,4	3428,7				
			3653,3			3653,2	
	3839,5		3839,6				
			3896,4				
3961,9							
	4019,8		4019,7				
			4062,7		4063,7	4064,2	
	4108,0		4108,0				
							4227,1
		4282,7				4285,2	
			4402,7				
		4463,8	4449,4				
					4726,5		
			4778,8			4779,2	
		4970,0				4929,7	4971,0
	5125,7		5127,3				
5189,7							
		5314,7					
		5407,3					
		5487,3				5489,0	
			5517,4				
			5560,9			5561,8	
						5638,9	5637,9
		5904,2				5846,6	5844,1
						6180,0	
6228,6						6223,5	6222,0
		6277,6		6276,1		6281,0	
		6534,5		6545,3		6544,6	
		6649,5		6643,8		6652,3	
6892,4		6887,5					
		6912,8					6914,7
		7013,1	7021,7				7013,7
7107,8							
		7161,2	7165,3			7163,2	
7241,2							
							7577,3
						7601,8	7600,1
							7703,9
						7920,4	
						8029,9	
						8089,7	
	8366,2	8363,8					

m/z-Wert							
Tag 1	Woche 1	Woche 3	Woche 8	Woche 12	Woche 20	Woche 30	Woche 50
	8453,8		8452,9				8452,1
		8564,7	8567,7			8568,4	
		8770,1	8766,6				
		8927,0					
		9167,1					9169,8
	9341,7	9326,9	9351,1				
						9474,4	
		9665,3					
		9936,5					9938,7
		10145,0			10150,6		10146,3
		10359,9					
	10816,6	10810,4	10817,1				10812,0
				11549,1		11541,6	
12137,0		12128,5			12138,7		
12439,2			12433,0				
		13208,5		13214,1			
13782,1		13771,2					
14009,7		13999,6					
			14345,0				
			15197,4			15196,5	
			15387,5	15386,0		15389,8	
	15843,6		15839,1			15835,4	
						16038,1	
						16807,1	
				18728,5			
					19885,5		19861,1

**Tabelle I-8: Mittels MALDI-MS und MS/MS-Analysen identifizierte Proteine nach deren Elution aus Polyacrylamid-Gelen.**

Vergleichend zum theoretischen Molekulargewicht der Proteine ist der mittels SELDI-TOF-MS detektierte m/z-Wert in den Spektren der Eluate angegeben.

Protein	Protein Score	MW (Da) MALDI-MS	m/z SELDI	MS/MS-Sequenz
Hemoglobin beta chain	201	15952,2	15969,4	LLVVYPWTQR VNPDDVGGEALGR
Hemoglobin alpha-1 and alpha-2 chains	169	15358,8	15386,6	IGGHGGEYGEALQR TYFSHIDVSPGSAQVK
Superoxide dismutase	495	15941,8	16001,2	HVGDLGNVAAGK VISLSGEHSIIGR GDGPVQGVHFEQK HVGDLGNVAAGKDGVANVSIEDR
Phosphatidylethanolamin e-binding protein	249	20771,4	20922,6	FKVESFR GNDISSGTVLSEYVGSPPK
Fatty acid-binding protein	379	14320,3	14340,5	GVSEIVHEGK AMGLPEDLIQK YQVQSQENFEPFMK YQVQSQENFEPFMK
Cytochrome b5	171	15100,5	15303,6	TYIIGELHPDDR FLEEHPGGEEVLR EQAGGDATENFEDVGHSTDR
CCG1-interacting factor B	63	22550,6	22777,2	
Superoxide dismutase	145	15941,8	16099,5	VISLSGEHSIIGR GDGPVQGVHFEQK

Protein	Protein Score	MW (Da) MALDI-MS	m/z SELDI	MS/MS-Sequenz
Catechol O-methyltransferase	212	24959,5	24957,0	GTVLLADNVIVPGTPDFLAYVR KGTVLLADNVIVPGTPDFLAYVR
Superoxide dismutase	313	16176,9	16049,2	HVGD LGNVAAGK VISLSGEHSIIGR GDGPVQGVIIHFEQK
Beta 2 globin	291	15965,3	15968,6	LLVVYPWTQR YFDSFGDLSSASAIMGNPK
Fatty acid binding protein	184	14320,3	14402,6	YQVQSQENFEPFMK SVTEFNGDTITNTMTLGDIVYKR
14.5 kDa translational inhibitor protein	218	14351,6	14371,9	APAAIGAYSQAVLVDR GSRIEIEAIAVQGPFTTAGL
Glutathione-S-transferase	221	25360,3	25651,4	SHGQDYLVGNR PGKPVLYHFDGR
Phenylpyruvate tautomerase	94	12612,3	12465,3	PMFIVNTNVPR
Actin	93	41764,7	41837,1	SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	96	35682,2	36227,1	LVINGKPITIFQER LISWYDNEYGYSNR VIISAPSADAPMFVMGVNHEK
Nuclease precursor	422	28926,6	26888,3	SDLNQGAWAR AHTIPSAYWK FANWVAYHITK ADISSVYTVTGPLYER TGLIIWAGLPDDVQASLK
Glutathione S-transferase Yb-1	157	25766,1	25959,9	YAMGDAPDYDR LLELYTDSSYEEKR LGLDFPNLPYLIDGSR
Glutathione S-transferase Yc-1	85	25172,3	26017,1	SHGQDYLVGNR
Superoxide dismutase	186	15770,8	15883,7	HVGD LGNVAAGK VISLSGEHSIIGR
Hemoglobin alpha-1 and alpha-2 chains	228	15187,7	15986,8	IGGHGGEYGEEALQR TYFSHIDVSPGSAQVK
Fatty acid-binding protein	86	14263,3	14399,6	YQVQSQENFEPFMK

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Kerstin Eleonore Fella  
Geburtstag: 2. Juni 1977  
Geburtsort: Offenbach am Main  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1983-1987 Grundschule: Adalbert-Stifter Schule, Heusenstamm  
1987-1996 Gymnasium: Marienschule der Ursulinen, Offenbach  
1996 Allgemeine Hochschulreife

### Studium

1996-2001 Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe  
Universität, Frankfurt  
1999 1. Staatsexamen  
2001 2. Staatsexamen  
2002 3. Staatsexamen und Approbation als Apothekerin

### Promotion

08/2002-07/2005 Dissertation bei Merck, Darmstadt, am Institut für Toxikologie,  
Abteilung, Toxikoproteomics; Betreuung durch Prof. Dr. Michael  
Karas, Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann  
Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt

### Berufliche Tätigkeiten

05/2001-10/2001 Pharmaziepraktikum Struwelpeter Apotheke, Frankfurt  
11/2001-04/2002 Pharmaziepraktikum Novartis Pharma, Basel, Forschung und  
Entwicklung, Abteilung Transplantation und Immunologie  
07/2002-06/2005 Tätigkeit als Apothekerin, Apotheke am Torbau, Heusenstamm  
seit 07/2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin Merck, Darmstadt, Abteilung  
Zentrale Produktanalytik, Bereich Proteinbiochemie



## Publikationen

### Artikel

**Michaela Kröger, Jürgen Hellmann, Luca Toldo, Matthias Glückmann, Bettina von Eiff, Kerstin Fella, Peter-Jürgen Kramer.** Toxikoproteomics: Erste Erfahrungen in einer BMBF-Studie. *ALTEX* 21, Suppl. Linz 03/2004, 28-40.

**Kerstin Fella, Matthias Glückmann, Volker Krufft, Peter-Jürgen Kramer, Michaela Kröger.** Die Vorteile von molekularen Biomarkern für die Toxikologie. *Biospektrum* Sonderausgabe 2004, 10. Jahrgang, 561-563.

**Kerstin Fella, Matthias Glückmann, Volker Krufft, Peter-Jürgen Kramer, Michaela Kröger.** Identifizierung von Protein-Biomarkern in der Toxikologie zur verbesserten Vorhersage von Kanzerogeneseprozessen. Angenommen zur Publikation in *Chemickelisty (Tschechische Zeitschrift für Proteomforschung)*

**Kerstin Fella, Matthias Glückmann, Jürgen Hellmann, Michael Karas, Peter-Jürgen Kramer, Michaela Kröger.** Use of two-dimensional gel-electrophoresis in predictive toxicology: Identification of potential early protein biomarkers in chemically induced hepatocarcinogenesis. *Proteomics* 2005, 5, 1914-1927.

**Kerstin Fella, Matthias Glückmann, Jürgen Hellmann, Michael Karas, Peter-Jürgen Kramer, Michaela Kröger.** Proteom-Profiling im Toxikologie-Screening. *Laborwelt* 3/2005, 6, 34-36.

**Kerstin Fella, Matthias Glückmann, Dietmar Waidelich, Dietrich Merkel, Volker Krufft, Peter-Jürgen Kramer, Yvonne Walter, Jürgen Hellmann, Michael Karas, Michaela Kröger.** Prevalidation of potential protein biomarkers in toxicology using iTRAQ™ reagent technology. Eingereicht zur Publikation in *Proteomics*.

### Posterbeiträge

ISPPP Heidelberg 2002:

**Ute Knapp, Kerstin Fella, Bettina von Eiff, Matthias Glückmann, Michaela Kröger.** Biomarker Identification in Toxicology.

DGPT-Tagung Mainz 2003:

**Kerstin Fella, Ute Knapp, Bettina von Eiff, Matthias Glückmann, Jürgen Hellmann, Michaela Kröger.** Biomarker Identification in Toxicology by 2-DE.

DGPT-Tagung Mainz 2003:

**Ute Knapp, Kerstin Fella, Bettina von Eiff, Luca Toldo, Michaela Kröger.** Biomarker Identification in Toxicology by SELDI.

Liebig-Symposium Giessen 2003:

**Kerstin Fella, Bettina von Eiff, Michaela Kröger, Matthias Glückmann.** Identification of Biomarkers in Toxicology by MALDI mass spectrometry in combined MS and MS/MS experiments.

Proteomic Forum München 2003:

**Kerstin Fella, Yvonne Walter, Suse Beyer, Peter-Jürgen Kramer, Michaela Kröger.** Identification of tumor markers in toxicology by non-gel based proteomic approaches.

DGPT-Tagung Mainz 2004:

**Kerstin Fella, Matthias Glückmann, Bettina von Eiff, Jürgen Hellmann, Peter-Jürgen Kramer, Michaela Kröger.** Is Predictive Toxicology Possible With Proteomic Approaches?

BTS 2004, Edingborough:

**Jürgen Beigel, Kerstin Fella, Claudia Klement, Michaela Kröger, Peter-Jürgen Kramer, Philip G. Hewitt.** Gene and Protein Expression Analysis of Cultured Primary hepatocytes.

DGPT-Tagung Mainz 2005:

**C. Ittrich, A. Oberemm, A. Herzig, H.-B. Richter-Reichhelm, U. Gundert-Remy, K. Kalenberg, E. Krause, M. Kröger, K. Fella, J. Hellmann, P.-J. Kramer, M. Glückmann, H. Ellinger-Ziegelbauer, H.-J. Ahr, G. Scholz, E. Kiss, A. Kopp-Schneider.** Correlation of N-Nitrosomorpholine induced changes in rat liver transcriptome and proteome.

ASMS San Antonio, USA 2005:

**Kerstin Fella, Dietmar Waidelich, Dietrich Merkel, Volker Kruft, Michael Karas, Michaela Kroeger, Matthias Glueckmann.** Use of iTRAQ-technology for prevalidation of protein biomarkers identified by 2-dimensional gel electrophoresis and MALDI-MS.

### Vorträge

SELDI-User Meeting Jena, 2004:

**Kerstin Fella, Suse Beyer, Yvonne Walter, Jürgen Hellmann, Peter-Jürgen Kramer, Michaela Kröger.** Biomarker-Identifizierung in der industriellen Toxikologie.

DGPT-Tagung Mainz 2005:

**Kerstin Fella, Matthias Glückmann, Dietmar Waidelich, Dietrich Merkel, Volker Kruft, Michael Karas, Peter-Jürgen Kramer, Michaela Kröger.** iTRAQ<sup>TM</sup> – A new Biomarker Technology utilized in Molecular Toxicology.