Aus der Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie und Biomaterialbanken Leiter: Prof. Dr. Dr. med. Jens K. Habermann Klinik für Chirurgie Direktor: Prof. Dr. med. Tobias Keck der Universität zu Lübeck

# Vergleichende Proteomanalyse von Zelllinien und Humanproben fetaler Osteoblasten, des Osteosarkoms und pulmonaler Metastasen

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von Franziska Halina Epping aus Würzburg

Lübeck 2015

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens K. Habermann PhD
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Arndt-Peter Schulz
- 3. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ferdinand von Eggeling

Tag der Verteidigung:	20.09.2016	
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	20.09.2016	
- Promotionskommission der Sektion Medizin -		

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitur	ıg	4
1.1 Einfi	ihrung	4
1.2 Das 1	Krankheitsbild des Osteosarkoms	5
1.2.1	Klinische Präsentation	5
1.2.2	Histopathologische Klassifikation	7
1.2.3	Pathogenese und Ätiologie	7
1.2.4	Tumorstadien	8
1.2.5	Diagnose und Therapie	9
1.2.6	Prognose	9
1.3 Frage	estellung	10
2 Material	und Methoden	11
2.1 Chen	nikalien und Materialien	11
2.1.1	Chemikalien	11
2.1.2	Puffer und Lösungen	14
2.1.	2.1 Puffer und Lösungen für die Zellkultur	14
2.1.	2.2 Äquilibrierlösungen	15
2.1.	2.3 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE	16
2.1.	2.4 Puffer und Lösungen für den Western-Blot	17
2.1.	2.5 Reagenzienset/ Kit für die Immunhistochemie	18
2.1.	2.6 Stammlösungen für die Immunhistochemische Färbung	18
2.1.3	Zellkulturen	19
2.1.4	Antikörper für den Western-Blot und die immunhistochemischen Färbunge 20	en
2.1.5	Tissue Microarrays	21
2.1.6	Materialien	23
2.1.7	Geräte	24
2.2 Meth	oden	25
2.2.1	Kultivierung der Zellen	25
2.2.2	Prinzip der zweidimensionalen Gelelektrophorese	25
2.2.	2.1 Aufbereitung der Zellen für die zweidimensionale Gelelektrophorese	27
2.2.	2.2 Proteingehaltsbestimmung nach Bradford	27
2.2.	2.3 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung	28
2.2.	2.4 Zweite Dimension: SDS-PAGE	28
2.2.	2.5 Silberfärbung der Polyacrylamidgele	29
2.2.	2.6 Scan-Prozess	30

2.2.3 Dokumentation und Auswertung der Gele	30
2.2.3.1 Auswertung anhand der PDQuest Software	31
2.2.3.1.1 Statistische Auswertung der PDQuest Analyse	32
2.2.3.2 Auswertung anhand der Progenesis SameSpot Software	33
2.2.4 Erstellung eines Minimal-Data Sets	35
2.2.5 Manuelles Spot-Picking und Entfärbung	35
2.2.6 MALDI-MS (Matrix assistiente Laser Desorption/Ionisation)- Massenspektrometrie (MS)	36
2.2.6.1 In-Gel-Verdau der ausgeschnittenen Gelstücke	37
2.2.6.2 MALDI-Targetbelegung	37
2.2.6.3 Massenspektrometrische Identifizierung	37
2.2.7 Signalweg-Analyse	39
2.2.8 Validierung der 2-DE Ergebnisse mittels Western-Blot	39
<ul><li>2.2.8.1 Aufbereitung der Zellen und Proteingehaltsbestimmung für den Wes</li><li>Blot 40</li></ul>	tern-
2.2.8.2 Validierung mittels Western-Blot	40
2.2.9 Prinzip der Cytospins	41
2.2.9.1 Durchführung und Herstellung der Cytospins	41
2.2.10 Prinzip des Tissue Microarray (TMA)	41
2.2.10.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	42
2.2.11 Immunhistochemische Färbung zur Detektion von CTSD und RanBP1.	42
2.2.11.1 Immunhistochemische Färbung der Cytospins	43
2.2.11.2 Immunhistochemische Färbung der TMAs	43
2.2.11.3 Mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbunge	n44
2.2.11.4 Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	44
2.2.12 Graphische Zusammenfassung der Methodik	45
3 Ergebnisse	46
3.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese	46
3.2 Ergebnisse der softwaregestützten 2-DE-Gel-Auswertung	46
3.2.1 PDQuest Analyseergebnisse	46
3.2.2 SameSpot Analyseergebnisse	46
3.2.3 Übereinstimmungen der beiden Softwareergebnisse	46
3.3 Massenspektrometrische Identifizierung signifikanter Proteine	48
3.3.1 Proteinidentitäten	49
3.3.1.1 Proteinidentitäten und Expressionsmuster	50
3.4 Systembiologische Signalweg-Analyse mittels Ingenuity Pathway Analyse	52

3.5 Valid	ierung mittels Western-Blot	. 54
3.6 Immunhistochemische Färbung der Cytospins		
3.6.1	CTSD	. 57
3.6.2	RanBP1	. 58
3.7 Klinis Tissue M	sche Validierung mittels Immunhistochemischer Färbung des erworbenen icroarrays	. 59
3.7.1	Auswertung der immunohistochemischen Färbung des erworbenen TMA	. 60
3.8 Klinis hergestel	sche Validierung mittels Immunhistochemischer Färbung des <i>laborintern</i> Iten Tissue Microarrays	. 61
3.9 Grapl	nische Zusammenfassung der Ergebnisse	. 62
4 Diskussio	n	. 63
4.1 Diskı	ssion der Methodik	. 63
4.1.1	Versuchsaufbau	. 63
4.1.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	. 63
4.1.3	Software	. 64
4.1.4	Minimal Data Set und Western-Blot	. 65
4.1.5	Immunhistochemie von Cytospins und TMAs	. 65
4.2 Bede	utung der Signalweganalyse	. 67
4.3 Biolo	gische Bedeutung von GLO1, STMN1 und UCH-L1, RanBP1 und CTSD	. 68
4.3.1	GLO1, STMN1 und UCH-L1	. 68
4.3.2	Ran-specific GTPase-Activating Protein (RanBP1)	. 70
4.3.3	Cathepsin D (CTSD)	.71
5 Zusamm	enfassung	.74
6 Aussicht		.75
7 Literatur	verzeichnis	.76
8 Abbildun	gsverzeichnis	.94
9 Tabellen	verzeichnis	.95
10 Abkürz	ungsverzeichnis	.96
11 Anhang		.97
12 Danksagung10		104
13 Lebenslauf 105		
14 Publika	tionen	106

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Das Osteosarkom ist der häufigste diagnostizierte primär maligne Knochentumor und tritt vornehmlich bei Jugendlichen auf (Unni, 1988; Kaatsch et al., 2000). In den vergangenen 15 Jahren haben sich die verfügbaren Therapiemöglichkeiten gegen das Osteosarkom kaum erweitert. Die mit den üblichen Medikamenten erreichbaren Ergebnisse scheinen derzeit weitestgehend ausgereizt (Bielack et al., 2006) und seit Mitte der 80er Jahre verbessern sich die Überlebensraten nicht (Stiller et al., 2001). Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt derzeit bei 65,3% (Bielack et al., 2002; Folio et al., 2011).

Trotz zahlreicher molekularbiologischer und zytogenetischer Untersuchungen ist es einheitliches bislang nicht gelungen. ein Bild der führenden molekularen Pathomechanismen des Osteosarkoms zu erstellen (Letson und Muro-Catcho, 2001; Ragland et al., 2002; Fuchs und Pritchard, 2002). Bis heute bleibt ungeklärt, ob krankheitsspezifische Proteine für das Osteosarkom existieren und wie diese die Entstehung, das Fortschreiten der Erkrankung und deren Prognose beeinflussen. Die Untersuchung von Proteinexpressionprofilen (Komparative Proteomanalyse) humaner Tumoren bietet hier die Möglichkeit, die molekularen Hintergründe neoplastischer Erkrankungen und deren Metastasierung zu analysieren (Alaiya et al., 2005). Entsprechende Proteinanalysen konnten bereits erfolgreich u.a. für Kolon-, Ovarial-, Lungen- und Prostatakarzinome angewandt werden (Alaiya et al., 2000; Alaiya et al., 2003; Roblick et al., 2004; Roblick et al., 2008; Gemoll et al., 2011). Einige wenige Studien haben sich bereits mit Proteomanalysen des Osteosarkoms befasst. Unter den durchgeführten Studien zum Thema sind vornehmlich die Arbeiten von Spreafico et al., 2006, Guo et al., 2007 und Liu et al., 2009 zu nennen.

Liu et al. verglichen in ihrer Arbeit Osteosarkomzelllinien und humane primär kultivierte Osteoblasten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2-DE). Hierbei detektierten sie im Osteosarkom neun signifikant höhere Proteinlevel und drei signifikant erniedrigte Proteinlevel. Drei der hoch exprimierten Proteine UQCRC1 (Ubiqinol-Cytochrome-C-Reductase Core Protein 1), PRDX4 (Peroxiredoxin 4) und UCH-L1 wurden zur Validierung an acht primären Osteosarkomgeweben mittels Western Blot ausgewählt und in ihrem Expressionsniveau bestätigt.

1 Einleitung

In der vergleichenden Proteomanalyse von Guo et al. wurden drei Osteosarkomzelllinien einer Osteoblastenzelllinie gegenübergestellt, wobei 26 signifikant hoch exprimierte Proteine identifiziert werden konnten, von denen AHA1 (Activator of 90kDa HSP ATPase Homolog 1) und SLP-2 (Stomatin like Protein 2) mittels Western Blot validiert wurden. 2006 untersuchten Spreafico et al. die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und verglichen zudem eine Osteosarkomzelllinie mit reifen Osteoblasten. Letztere wurden hierbei aus Knochengewebe eines 35-jährigen männlichen Patienten gewonnen. Identifiziert wurden 17 hoch exprimierte Proteine in ausgereiften Osteoblasten, die als Differenzierungsmarker gewertet wurden. Weitere acht hochregulierte Proteine wurden in der Osteosarkomzelllinie identifiziert, welche als Proliferations- und Tumorindikationsmarker interpretiert wurden. Eine Validierung der Ergebnisse wurde nicht durchgeführt.

Keiner der identifizierten Marker wird derzeit routinemäßig bei der Diagnose oder im Verlauf eines Osteosarkoms bestimmt. Knochentumore, insbesondere das Osteosarkom gehören somit aus Sicht der Proteomforschung zu den am wenigsten studierten Tumoren (Byrum et al., 2010; Bhattacharyya et al., 2007). Es war daher das Ziel dieser Arbeit mit Hilfe von Proteinprofilen von Osteosarkomzelllinien neue Biomarker für eine verbesserte individualisierte Medizin dieses Krankheitsbildes zu identifizieren.

### 1.2 Das Krankheitsbild des Osteosarkoms

#### 1.2.1 Klinische Präsentation

Das Osteosarkom ist definiert als ein knochenbildender, primär maligner Tumor mesenchymalen Ursprungs. Mit einem Anteil von nur etwa 0,1% aller Krebserkrankungen handelt es sich dabei um eine seltene Tumorerkrankung. Seine Inzidenz beträgt in Deutschland, Europa und den USA 2 bis 3 pro Millionen Einwohner pro Jahr (Link und Eilber, 1993; Kaatsch et al., 2000; Stiller, 2002).

Allgemein können Tumore des Knochens in primäre (gutartige und bösartige) sowie sekundäre Neoplasien (Skelettmetastasen) eingeteilt werden. Primäre Knochentumore sind insgesamt selten, wobei gutartige schätzungsweise drei- bis viermal häufiger auftreten als bösartige. Sekundäre Knochentumore treten etwa zweieinhalbmal häufiger auf als primäre Knochentumore (Böcker et al., 2004).

Interessanter Weise stellt das Osteosarkom im Alter von 15-19 Jahren 5% aller Neoplasien dar (Bielack et al., 2006). Betroffen sind somit überwiegend Jugendliche mit einem Altersmedian von 18 Jahren. Insgesamt werden mehr als 80% der Osteosarkome vor dem

Seite 5

40. Lebensjahr diagnostiziert (Bielack et al., 2006, Böcker et al., 2004). Das Verhältnis von Jungen zu Mädchen beträgt 3:2 (Riede et al., 2004). Darüberhinaus wird ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Osteosarkoms und den hormonellen Veränderungen während der Pubertät vermutet, da der Inzidenzhöhepunkt des Osteosarkoms bei Mädchen (ebenso wie der frühzeitigere Beginn der Pubertät) um das 12. Lebensjahr und bei Jungen um das 16. Lebensjahr liegt (dos Santos und Swerdlow, 1993 Mirabello et al., 2009).

Der Primärtumor entsteht meist in der Metaphyse eines langen Röhrenknochens und über die Hälfte aller Tumore finden sich in der Knieregion. Die Patienten klagen zunächst über zunehmende, oft als belastungsabhängig empfundene Schmerzen in der betroffenen Region. Meist erst später kommt es zu einer lokalen Schwellung und unter Umständen zur Bewegungseinschränkung im benachbarten Gelenk. Bei einigen Patienten stellt eine pathologische Fraktur das erste Symptom dar. Allgemeinsymptome fehlen meist und deuten dann auf eine fortgeschrittene Metastasierung hin (AWMF Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2010; Bielack et al., 2006).

Bei etwa 10-20% der Patienten lassen sich zum Diagnosezeitpunkt bereits Metastasen nachweisen. Diese beschränken sich in 80% der Fälle auf die Lunge. Metastasierungen in andere Organe finden sich seltener (Kager et al., 2003). Wird keine Therapie eingeleitet, kommt es auch bei zunächst metastasenfreien Patienten innerhalb weniger Monate zu einer rasch fortschreitenden Metastasierung mit schlechten Heilungschancen.

#### 1.2.2 Histopathologische Klassifikation

Das Osteosarkom wird nach histopathologischen Gesichtspunkten klassifiziert. Eine Übersicht der Klassifikation gemäß der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) findet sich in Tabelle 1. Die "konventionellen", hochmalignen Osteosarkome machen dabei etwa 80-90% aller Osteosarkome aus (Fletcher, 2002).

WHO-Klassifikation	Malignität
Konventionelles Osteosarkom*	
chondroblastisch	haah
• fibroblastisch	noch
• osteoblastisch	
Teleangiektatisches Osteosarkom	hoch
Kleinzelliges Osteosarkom	hoch
Niedrigmalignes zentrales Osteosarkom	niedrig
Sekundäres Osteosarkom	in der Regel hoch
Parossales Osteosarkom	in der Regel niedrig
Periostales Osteosarkom	intermediär
Hochmalignes Oberflächenosteosarkom	hoch

Tab. 1.: Übersicht der WHO-Klassifikation der Osteosarkome (Nach Fletcher, 2002)

\* Der Gruppe der konventionellen Osteosarkome werden nach WHO weitere, seltene Varianten zugerechnet (sklerosierende osteoblastische Osteosarkome, Osteoblastom-, Chondromyxoidfibrom-, malignes fibröses Histiozytom- oder Chondroblastom-ähnliche Osteosarkome, riesenzellreiche und epitheloidzellige Osteosarkome)(Fletcher, 2002).

#### 1.2.3 Pathogenese und Ätiologie

Osteosarkome entstehen meist spontan und bevorzugt an Stellen mit hoher mitotischer Aktivität und somit im Bereich des Knochenwachstums. Dazu zählen in erster Linie die Metaphysen des distalen Femurs und der proximalen Tibia (Riede, 2004). Nahezu alle Osteosarkome weisen zytogenetisch komplexe nummerische und strukturelle chromosomale Aberrationen auf (Bielack, 2006; Böcker, 2004).

Die Datenlage deutet darauf hin, dass der Dysregulation des Zellzyklus am Übergang von der G1- zur S-Phase eine erhebliche Bedeutung für die Entstehung chromosomaler Aberrationen und genetischer Veränderungen zukommt. So werden in sporadisch auftretenden Osteosarkomen z.B. oft Amplifikationen von CDK4 (Cyclin-dependent kinase 4), *MDM2* (E3 ubiquitin-protein ligase and p53-Regulator), *Cyclin D1*, *INK4A*<sup>p16</sup> (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A p16) bzw. Defekte des Retinoblastom-Gens (*Rb*-Gen, Zellzyklus-Regulator) und des *p53*-Gens (p 53 Tumorsuppressor-Gen) gefunden (Lohmann, 1999; Birch et al., 2001). Die beiden letztgenannten Gene erklären auch,

weshalb Patienten mit einem Retinoblastom oder dem Li-Fraumeni-Syndrom (p53-Gendefekt) häufiger an einem Osteosarkom erkranken (Wang et al., 2001; Fletcher, 2002). Insgesamt lassen sich nur für eine kleine Subgruppe der Osteosarkompatienten (weniger als 10%) eindeutige genetische oder exogene Risikofaktoren für die Tumorgenese finden. Der wichtigste exogene Risikofaktor ist die Belastung mit ionisierenden Strahlen, welche dosisabhängig das Osteosarkomrisiko erhöhen (Tucker et al., 1987; Hawkins et al., 1996; Kuttesch et al., 1996).

#### 1.2.4 Tumorstadien

Die Tumorstadien des Osteosarkoms können anhand der TNM-Klassifikation nach der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (Union internationale contre le cancer, UICC) und des American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Sobin, 2011; Greene, 2002) eingeteilt werden (siehe Tabelle 2 und 3). Über 80% der Osteosarkome manifestieren sich im Stadium II.

Primärtu	mor (T)
TX:	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung des Primärtumors sind nicht erfüllt
T0:	Kein Anhalt für einen Primärtumor
T1:	Größte Tumorausdehnung $\leq 8$ cm
T2:	Größte Tumorausdehnung > 8 cm
T3:	Diskontinuierliche Tumoren in der primär befallenen Knochenregion
Regionäre	e Lymphknoten (N)
NV.	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung der regionären Lymphknoten sind
INA.	nicht erfüllt
N0:	Kein Anhalt für den Befall regionärer Lymphknoten
N1:	Befall regionärer Lymphknoten
Fernmeta	stasen (M)
MV	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung von Fernmetastasen sind nicht
MA.	erfüllt
M0:	Kein Anhalt für Fernmetastasen
	Fernmetastasen sind vorhanden
M1:	M1a: Lunge
	M1b: andere Fernmetastasen
Histopath	ologisches Grading
GX:	Die Minimalerfordernisse für das Grading sind nicht erfüllt
G1:	Gut differenziert
G2:	Mäßig differenziert
G3:	Schlecht differenziert
G4:	Undifferenziert

Tab. 2.: TNM-Klassifikation der Knochentumoren (Nach Sobin, 2011; Greene, 2002)

Stadium				
Stadium IA	T1	N0	M0	G1,2 (niedrig maligne)
Stadium IB	T2	N0	M0	G1,2 (niedrig maligne)
Stadium IIA	T1	N0	M0	G3,4 (hoch maligne)
Stadium IIB	T2	N0	M0	G3,4 (hoch maligne)
Stadium III	T3	N0	M0	jedes G
Stadium IVA	jedes T	N0	Mla	jedes G
Stadium IVB	jedes T	N1	jedes M	jedes G
	jedes T	jedes N	M1b	jedes G

Tab. 3.: Einteilung der Erkrankungsstadien (Nach Sobin, 2011; Greene, 2002)

#### 1.2.5 Diagnose und Therapie

Die Bilddiagnostik umfasst zunächst Röntgen- und Schnittbilduntersuchungen der Primärtumorregion (Bloem et al., 1988; Gillespy et al., 1988; Hogeboom et al., 1992; Davies, 1998; Sanders und Parsons, 2001), wobei die Diagnose stets histologisch durch eine Biopsie des Primärtumors gesichert werden muss (EMSOS, 1990; Saeter, 2003).

Die Suche nach Metastasen kann im Regelfall auf die Lunge und das Skelettsystem beschränkt werden, wobei die wichtigsten Untersuchungen Nativröntgen und CT-Thorax darstellen. Des Weiteren sollte zum Ausschluss von Knochenmetastasen eine Skelettszintigraphie durchgeführt werden (Davies, 1998; Franzius et al., 2000; Sanders und Parsons, 2001). Alle hochmalignen Osteosarkome bedürfen eines multimodalen therapeutischen Ansatzes aus Chemotherapie (i.d.R. prä- und postoperativ) und Operation (Kempf-Bielack et al., 2005; Bielack et al., 2004). Die Therapie sollte grundsätzlich im Rahmen prospektiver Studien erfolgen. Derzeit beinhalten fast alle Therapieprotokolle die Chemotherapeutika Doxorubicin, Cisplatin, Hochdosis-Methotrexat und Ifosfamid. Ergänzend sollten vorhandene Lungenmetastasen, gegebenenfalls auch mehrfach, operiert werden (Kempf-Bielack et al., 2005). In Einzelfällen kann es nützlich sein, inoperable Herde zu bestrahlen (Ozaki et al., 2003; Kempf-Bielack et al., 2005). Eine intensive Verlaufsbeobachtung zur lokalen Tumorkontrolle und Überwachung möglicher systemischer Ausbreitungen ist unerlässlich.

### 1.2.6 Prognose

Laut der kooperativen Osteosarkomstudie (Cooperative Osteosarcoma Study Group, COSS) liegt die 5- bzw. 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei 65,3% und 59,8% (Bielack et al., 2002). Die Prognose wird beeinflusst durch die Tumorgröße, die Lokalisation und den Status der Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose des

Primärtumors. Zudem sind die therapieabhängigen Faktoren von erheblichem Einfluss auf die Prognose. So muss zum einen die komplette chirurgische Sanierung aller klinisch oder bildgebend fassbaren Tumormanifestationen als Heilungsvoraussetzung gelten, zum anderen ist das histologisch gemessene Ansprechen auf die Chemotherapie von entscheidender Bedeutung (Rosen et al., 1981; Davis et al., 1994; Arndt und Christ, 1999; Bielack et al., 2002). Rezidive eines Osteosarkoms sind mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert. Die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit wird derzeit auf 17,0  $\pm$  4,3% geschätzt (Saeter, 2003; Kempf-Bielack et al., 2005; Leary et al., 2013). Versuche, die Prognose von Patienten mit schlechtem Tumoransprechen durch Modifikationen der postoperativen Chemotherapie zu verbessern, sind bislang erfolglos geblieben (Stiller et al., 2001; Hawkins und Arndt, 2003). Vor diesem Hintergrund ist die klinische Notwendigkeit ersichtlich, Entstehung, Progression und Metastasierung des Osteosarkoms molekularpathologisch intensiver zu erforschen, um hieraus Biomarker für eine verbesserte Diagnostik und individualisierte Therapie ableiten zu können.

#### **1.3 Fragestellung**

Proteine, deren Expression während Karzinogenese und Progression variieren, können Erkenntnisse zu den molekularen Hintergründen der Osteosarkomentstehung liefern, sowie Grundlagen für neue Diagnose- und Therapiemöglichkeiten bilden. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, Proteinexpressionsunterschiede zwischen Zelllinien fetaler Osteoblasten, Osteosarkomen und pulmonalen Metastasen zu finden. Folgenden Fragestellungen wurden dabei betrachtet:

- Können mittels vergleichender Proteomanalyse (Zweidimensionale Gelektrophorese, Massenspektrometrie) biologisch bedeutsame Proteine identifiziert werden, welche einen signifikanten Expressionsunterschied in Zelllinien des Osteosarkoms im Vergleich zu Zelllinien fetaler Osteoblasten und pulmonaler Metastasen aufweisen?
- Sind diese Expressionsunterschiede durch technische Validierung (Western-Blot, Immunhistochemische Färbung an Cytospins) validierbar?
- Lassen sich diese Ergebnisse darüber hinaus auf klinische Proben übertragen und ergeben sich somit neue Ansätze für Diagnostik und individualisierte Therapie des Osteosarkoms?
- Wie verhalten sich beim Osteosarkom differentiell regulierte Proteine im Vergleich zu anderen Knochenerkrankungen?

# 2 Material und Methoden

# 2.1 Chemikalien und Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

#### Tab. 4.: Verwendete Chemikalien

Produkt	Hersteller
2,6-Di-butyl-4-methylphenol (BHT)	Sigma-Aldrich, München
3-(3-Cholamidopropyl)dimethyl-	Sigma-Aldrich, München
ammonio-1-propansulfat (CHAPS)	
4-(2-Hydoxyethyl)-piperazin-1-	USB, Staufen
ethansulfonsäure (HEPES)	
Aceton (100%)	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Acetonitril	Sigma-Aldrich, München
Acrylamid	BioRad, München
AEC Substrat	DAKO, Carpinteria USA
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat (APS)	GE Healthcare, München
Ammoniumphosphat	GE Healthcare, München
Antibody Diluent	DAKO, Carpinteria USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München
Aquatex <sup>®</sup> Eindeckmedium	Merck, Darmstadt
Assay-Reagenz zur Proteinbestimmung	BioRad, München
Benzamid	Sigma-Aldrich, München
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	BioRad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	BioRad, München
DNAse I	Worthington Biochemical Co., NJ, USA
Dulbecco's Eagle Kulturmedium	PAA Laboratories, Cölbe
Dulbecco's PBS (1x) ohne $Ca^{2+}$ & Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories, Cölbe
Eagle Kulturmedium	PAA Laboratories, Cölbe
Eosin G Lösung 0,5% wässrig	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (95%)	Merck, Darmstadt
Ethanol (100%) vergällt	Ethanol UKSH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fetales Kälber-Serum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd (37%)	Riedel-de-Haën, Seelze
Glycerin	Sigma-Aldrich, München
Glycin	BioRad, München
Hämalaunlösung (sauer nach Mayer)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ham's F-12 Kulturmedium	PAA- Laboratories, Cölbe
Harnstoff	BioRad, München
Iodacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich, München

Tab. 4.: Verwendete Chemikalien

Produkt	Hersteller
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, München
Kaliumcarbonat	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, München
Kaliumferricyanid (K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])	Sigma-Aldrich, München
Kaliumpyrosulfit ( $K_2S_2O_5$ )	Sigma-Aldrich, München
Kaliumtetrathionat (KTT)	Merck, Darmstadt
Laemmli-Puffer	BioRad, München
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Leibovitz's (L-15) Kulturmedium	PAA-Laboratories, Cölbe
Leupeptin	Sigma-Aldrich, München
Luminol	Millipore, Schwalbach
Magnesiumchlorid-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
$(MgCl_2*5H_2O)$	
McCoy's 5A Kulturmedium	PAA-Laboratories, Cölbe
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	GE Healthcare, München
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumdisulfid (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	Sigma-Aldrich, München
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, München
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, München
Natriumpyrophosphat (Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	Sigma-Aldrich, München
Natriumthiosulfat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> *5H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Nomidet P40 (NP-40)	USB, Staufen
Pararosanilin	Sigma-Aldrich, München
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Peroxide	Millipore, Schwalbach
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Phosphat buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich, München
Piperazindiacrylamid (PDA)	BioRad, München
RNAse I	Worthington Biochemical Co., NJ, USA
RPMI 1640 Kulturmedium	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe

#### Tab. 4.: Verwendete Chemikalien

Produkt	Hersteller
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	GE Healthcare, München
Thioharnstoff	Riedel-de-Haën, Seelze
Trifluoressigsäure (TFA)	BioRad, München
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
TRIS-Buffered-Saline (TBS)	BioRad, München
TRIS-Buffered-Saline mit Tween 20	Cell Signaling, MA, USA
(TBST)	
TRIS/Glycin/SDS	BioRad, München
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-	BioRad, München
Salzsäure (TRIS-HCl)	
Triton-X-100	USB, Staufen
Trypsin	PAA Laboratories, Cölbe
Xylol	J.T. Baker, Deventer, NL
Wasser, dest.	Millipore, Schwalbach
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt
Ziegennormalserum	DAKO Denmark A/S, Glostrup, DK

# 2.1.2 Puffer und Lösungen

# 2.1.2.1 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Puffer/Lösung	Ansatz
10x Trypsin/EDTA-Lösung:	0,5% (w/v) Trypsin
	0,2% (w/v) EDTA
Fixierlösung (40mL):	30mL Methanol, konz.
	10mL Essigsäure, konz.
2-D Lysepuffer:	100mL PBS (1x)
	5mM Natriumpyrophosphat
	100µM Natriumorthovanadat
	5mM Natriumfluorid
	830µM Benzamid
2-D Lysepuffer + Proteinaseinhibitoren	2-D Lysepuffer
(PIH):	Aprotinin (1:1000)
	Leupeptin (1:1000)
	PMSF (1:50)
SDS/Mercaptoethanol-Lösung (10mL):	1g SDS in 5mL dest. Wasser lösen und
	über 0,45µm filtrieren. Zugabe von 3,33mL
	Mercaptoethanol und auf 10mL mit dest.
	Wasser auffüllen.
DNAse I / RNAse I Lösung:	1mg/mL DNAse I
	500μg/mL RNAse I
	10mM TRIS (pH 7)
	50mM Magnesiumchlorid
Denaturierungspuffer (80mL):	43,2g Harnstoff
	0,8g DTT
	30mg EDTA
	4mL 10% (w/v) CHAPS
	2,8mL 1M Natriumhydroxid
	80µL 0,2M PMSF in 96% Ethanol
	800µL 0,23M BHT in Isopropanol
	24mL dest. Wasser
Rehydratisierungslösung (50mL):	21g Harnstoff
	7,6g Thioharnstoff
	2g CHAPS
	2mL 10% (v/v) Triton-X-100
	250µL IPG-Puffer (BioRad)
	14mg DTT (kurz vor Gebrauch) pro 5mL

Tab. 5.: Puffer und Lösungen für die Zellkultur

# 2.1.2.2 Äquilibrierlösungen

Τ.ὄςμησ	Ansatz
Lösung I (400mL):	13,4mL 1,5M TRIS (pH 8,8) 144,14g Harnstoff 138mL 87% (w/v) Glycerin 8g SDS
	Die Lösung auf 400mL mit dest. Wasser auffüllen. Zugabe von 0,1g DTT pro 10mL Äquilibrierlösung kurz vor Gebrauch.
Lösung II (400mL):	13,4mL 1,5M TRIS (pH 8,8) 144,14g Harnstoff 138mL 87% (w/v) Glycerin 8g SDS Bromphenolblau
	Die Lösung auf 400mL mit dest. Wasser auffüllen. Zugabe von 0,25g Iodacetamid pro 10mL Äquilibrierlösung kurz vor Gebrauch.

# 2.1.2.3 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Puffer/Lösung	Ansatz
Elektrodenpuffer (10x):	0,25mM TRIS (pH 8,6)
	1,92M Glycin (pH 8,6)
	Über 0,45µm filtrieren.
Elektrodenpuffer (1x, 20L):	2L Elektrodenpuffer (10x)
	200mL 10% (w/v) SDS
	17,8L dest. Wasser
Fixierlösung (4L):	1,5L 95% (v/v) Ethanol
	0,5L Essigsäure, konz.
	3L dest. Wasser
Sensitivierungslösung (2L):	98,2g Kaliumacetat
	422 mL 95% (v/v) Ethanol
	5g KTT
	1538mL dest. Wasser
Inkubationslösung (2L):	4g Silbernitrat
	10mL 1M HEPES
	1,4mL 37% (v/v) Formaldehyd
Entwicklungslösung (4L):	120g Kalimcarbonat
	50mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat
	1mL 37% (v/v) Formaldehyd
Stop-Lösung (5L):	250g TRIS (pH 8,6)
	50mL Essigsäure, konz.
	4950mL dest. Wasser
Lagerlösung (5L):	200mL Glycerin
	500mL 95% (v/v) Ethanol
	1g Natriumazid
	4,3L dest. Wasser

Tab. 7.: Puffer und Lösungen für die SDS-Page

# 2.1.2.4 Puffer und Lösungen für den Western-Blot

Puffer/Lösung	Ansatz
Trenngel-(12%)-Lösung (96mL):	38,4mL Acrylamid
	24mL 1,5M TRIS-HCl (pH 8,8)
	12mL Glycerin
	19,08mL dest. Wasser
	1920µL (w/v) 10% SDS-Lösung
	erst kurz vorm Gelgießen hinzufügen:
	600μL (w/v) 10% APS-Lösung
	60μL TEMED
Sammelgel-(5%)-Lösung (20,8mL):	3,95mL Acrylamid
	5,0625mL 0,5M TRIS-HCL (pH 6,8)
	11,1861mL dest. Wasser
	405µL 10% SDS-Lösung
	erst kurz vorm Gelgießen hinzufügen:
	202,5µL 10% APS-Lösung
	20,25µL TEMED
Probenverdünnungspuffer (200mL):	90mL Millipore
	10mL TBS (Tris-Buffered Saline)-Puffer
Laufpuffer (1L):	900mL Millipore
	100mL Tris/Glycin/SDS-Puffer
Laemmli-Puffer (400µl):	380µl Laemmli-Puffer
	20µl Mercaptoethanol
Blotting Puffer (1L):	3g 25mM Tris (Merck)
	14,4g 192mM Glycin
	800mL Millipore
	200mL 20% Methanol
Milchpulverlösung (100mL):	200 mL Probenverdünnungspuffer
	10g Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry
	Milk
TBST-Waschlösung (2L):	1800mL Millipore
	200mL TBST
HRP-Substrat (4mL)	2mL Luminol-Enhancer Lösung
	2mL Peroxide-Lösung

Tab. 8.: Puffer und Lösungen für den Western-Blot

## 2.1.2.5 Reagenzienset/ Kit für die Immunhistochemie

In dieser Arbeit wurde ein Reagenzienset für die Immunhistochemische (IHC-)Färbung nach der Avidin-Biotin-Methode benutzt (Vectastain® Elite ABC Kit von Vector Laboratories Burlingame, USA). Es enthält Lösungen zum Ansatz der Blockierungslösung des biotinylierten Sekundärantikörpers und des Avidin-Biotin-Komplexes.

### 2.1.2.6 Stammlösungen für die Immunhistochemische Färbung

Lösung	Ansatz
0,1% Triton	0,1% (v/v) Triton X-100
	10% / v/v Ziegennormalserum in PBS (1x)
	ohne $\operatorname{Ca}^{2+}$ & Mg <sup>2+</sup>
3% Wasserstoffperoxid in Methanol	10% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) in Methanol
10mM Zitronensäurepuffer pH 6,0	0,2% (w/v) Zitronensäure-Monohydrat in
	Millipore H <sub>2</sub> O

Tab. 9.: Stammlösungen für die Immunhistochemische Färbung

## 2.1.3 Zellkulturen

Für diese Studie wurden etablierte humane Zelllinien verwendet, die über die American Culture Collection (ATCC, Promochem®) Type bezogen wurden (http://www.lgcstandards-atcc.org). Dabei handelte sich um eine fetale es Osteoblastenzelllinie (CRL 11372), drei Osteosarkomzelllinien (CRL 7023, CRL 7134, CRL 7140), sowie drei Zelllinien aus pulmonalen Metastasen (CRL 7595, CRL 7631, CRL 7645). Tabelle 10 zeigt eine Übersicht der verwendeten Zelllinien.

Zelltyp	Fetale				Pulmo	nale Metastase	nzelllinien
	Osteoblasten-	Osteosarkomzelllinien			abgesiedelt		
	zelllinie					vom Osteosark	com
ATCC#	11372	7032	7134	7140	7595	7631	7645
Zelllinie	hFOB 1.19	Hs 39.T	Hs 184.T	Hs 188.T	Hs 860.T	Hs 894(A).T	Hs 899(D).T
Organismus	Homo sapiens	Homo sapiens			Imomosapiens         Homosapiens		5
Alter	Fetus	17 Jahre 21 Jahre 18 Jahre		22 Jahre	20 Jahre	20 Jahre	
Geschlecht	Keine Angabe	Männlich	Männlich	Männlich	Männlich	Männlich	Männlich
Besonderheit	Spontanabort SV 40 TAntigen	Kaukasier		Kaukasier			
	transfiziert						
Organquelle	Knochen	Knochen				Lunge	
Krankheit	-	Osteosarkom			Osteosarkom		
Medium	1:1 Ham's F12	Dulbecco's Modifiziertes Eagle		Dulbecco	's Modifiziertes E	Eagle Medium	
	Medium und	Medium					
	Dulbecco's						
	Modifiziertes						
	Eagle Medium						

Tab. 10.: Übersicht der verwendeten Zelllinien

#### 2.1.4 Antikörper für den Western-Blot und die immunhistochemischen Färbungen

Zum Nachweis der Ziel-Antigene mittels Western-Blot wurden folgende primäre Antikörper bezogen (Tabelle 11). Cathepsin D und RanBP1 wurden desweiteren zum Nachweis für die immunhistochemischen Färbungen der Cytospins und Tissue Microarrays verwendet.

Antikörper	Klonalität	Wirt	Spezifität	Hersteller
Anti-Cathepsin D	monoklonal	Maus	Maus,	Abcam®, Cambridge, UK
			Mensch	
Anti-GLO1	monoklonal	Maus	Maus,	Abcam®, Cambridge, UK
			Mensch	
Anti-RanBP1	polyklonal	Kaninchen	Maus,	Abcam®, Cambridge, UK
			Mensch	
Anti-Stathmin1	monoklonal	Kaninchen	Kaninchen,	Abcam <sup>®</sup> , Cambridge, UK
			Maus,	
			Mensch	
Anti-Beta-Actin	monoklonal	Maus	Maus,	Abcam <sup>®</sup> , Cambridge, UK
			Mensch	

Tab. 11.: Antikörper für den Western-Blot und die Immunhistochemie

#### 2.1.5 Tissue Microarrays

Von dem Unternehmen US Biomax, Inc. (Bestellnummer BO2081, Rockville, USA) wurde ein Knochentumor Tissue Microarray (TMA) mit einem Spektrum an Gewebeproben von Knochenerkrankungen erworben. Untersucht wurden 176 Stanzen (1mm Durchmesser, 5µm Schnittdicke) als Duplikate von 88 Patientenproben. Nach der Färbung konnten 24 Fälle von Osteosarkomen, 9 Chondrosarkome, 9 Myelome, 2 Ewing Sarkome, 11 Riesenzelltumore, 9 invasive Riesenzelltumore, 2 Chordome, 8 Adamantinome, 6 Knochenzysten und 8 tumorangrenzende Normalgewebe ausgewertet werden. Die klinischen Patientendaten sind Tabelle 12 zu entnehmen.

	Geschlecht		Durchschnittsalter	Altersspanne
	Männlich	Weiblich	(Jahre)	(Jahre)
Osteosarkom	15	9	24,9	10-69
Chondrosarkom	7	2	31,2	13-47
Myelom	7	2	53,8	39-69
Ewing Sarkom	0	2	54,5	15-94
Riesenzelltumor	3	8	36,2	17-60
Invasiver	6	3	36,0	20-50
Riesenzelltumor				
Chordome	1	1	47,0	44-50
Adamantinome	5	3	42,3	11-70
Knochenzysten	1	5	27,3	16-45
Tumorangrenzendes	6	2	60,9	41-75
Normalgewebe				

Tab. 12.: Patientendaten des erworbenen Tissue Microarrays (BO2081)

Um das Metastasierungspotential zu ergründen, wurde darüberhinaus ein zweiter laborintern hergestellter Tissue Microarray untersucht, welcher 4 Stanzen von ossärem Normalgewebe, 17 Osteosarkome und 5 pulmonale Metastasen enthält (Tabelle 13). Der gesamte Array enthielt überdies fetale Osteoblasten, welche sich jedoch nicht anfärben ließen, sodass sie nicht in die weitere Analyse miteinbezogen wurden.

Probe	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Histologie (Primarius)
Normalgewebe				
1	Männlich	39	Tibia	-
2	Männlich	68	Femur	-
3	Männlich	59	Tibia	-
4	Männlich	27	Femur	-
Osteosarkom				
1	Männlich	14	Humerus	Teleangiektatisch
2	Weiblich	59	Femur	Chondroblastisch
3	Männlich	39	Femur	Fibroblastisch
4	Weiblich	89	Femur	Fibroblastisch
5	Männlich	35	Mandibula	Chondroblastisch
6	Weiblich	75	Tibia	Riesenzellreich
7	Männlich	64	Mandibula	
8	Männlich	12	Tibia	Osteoblastisch
9	Weiblich	14	Fibula	Teleangiektatisch
10	Männlich	38	Tibia	Osteoblastisch
11	Männlich	67	Kalotte	Osteoblastisch
12	Männlich	25	Tibia	Osteoblastisch
13	Männlich	74	Mandibula	Chondroblastisch
14	Männlich	27	Femur	Osteoblastisch
15	Männlich	21	Femur	Chondroblastisch
16	Männlich	21	Femur	Chondroblastisch
17	Männlich	55	Tibia	
Pulmonale Metastase				
1	Männlich	14	Lungenunterlappen	Teleangiektatisch (Humerus)
2	Männlich	10	Lungenunterlappen	Chondroblastisch (Femur)
3	Männlich	17	Lungenoberlappen	Chondroblastisch (Femur)
4	Weiblich	12	Lungenoberlappen	Osteosarkom (Tibia)
5	Weiblich	41	Lungenoberlappen	Osteoblastisch (Tibia)

Tab. 13.: Patientendaten des laborintern hergestellten Tissue Microarrays

# 2.1.6 Materialien

Tab. 14.: Materialien

Materialien	Hersteller
Aluminiumfolie	Quickpack, Renningen
Cellstar® Tube,15mL	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen
Deckgläser	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Eppendorf-Gefäße, Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Färbekammern	VWR, Darmstadt
Filter	Whatman, Dassel
Filter HVLP 0,45µm	Millipore, Schwalbach
Filteraufsatz	Millipore, Schwalbach
IPG-Streifen pH 4-7, 17cm	BioRad, München
Kunststoffspatel	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mikrotiterplatten (96-Well)	Nunc, Wiesbaden
Objektträger Superfrost	Fisher Scientific, Schwerte
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pinzette	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
10-13% Precast Gele	Nextgenscience, MI, USA
Roti-PVDF (Transfermembran)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Wägeschälchen	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg

# **2.1.7** Geräte

Tab. 15.: Geräte

Geräte	Hersteller
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Heraeus, Hanau
Densitometer GS-710 (Scanner)	BioRad, München
Dako-Pen	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
Ettan Dalt rack (Geltrockner)	GE Healthcare, München
Färbeeinsatz	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Färbeküvette nach Hellendahl	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Färbetrog mit Deckel	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Galaxy 16D1 (Zentrifuge)	VWR, Darmstadt
Gefrierschrank	Bosch, Stuttgart
Gel doc XR 170-8170 (Western-Blot	BioRad, München
Detektor)	
Glasplatten	BioRad, München
HYRAX M 55, motorisiertes	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Rotationsmikrotom	
KIMAX-Röhrchen (20cm)	Kimble, NJ, USA
Kühlschrank LABEX®-85	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg
Laborschüttler KS 250 basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikrowelle	Miele & Cie. KG, Gütersloh
Milli-Q System	Millipore, Schwalbach
Multiscan MS (Multiplattenleser)	Labsystem, Quickborn
Nikon Eclipse Ci	Nikon GmbH, Düsseldorf
Pannoramic DESK	3DHistech Kft., Budapest HU
pH-Meter	Metrohm, Herisau, Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Promax 2020 (Gelschüttler)	Heidolph, Schwalbach
PROTEAN IEF Cell	BioRad, München
(Fokussierungssystem)	
PROTEAN Pkus Dodeca Cell	BioRad, München
(Elektrophoresekammer)	
Quellkammer für IPG-Streifen	BioRad, München
Reax Top (Vortexer)	Heidolph, Schwalbach
SpeedVac SPD 111V	Thermo Scientific, MA, USA
Sterilwerkbank BSB4a	Gelaire, Sydney, Australien
Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, München
(Blotkammer)	
UltraFlex III TOF/TOF	Bruker Daltonics, Bremen
Massenspektrometer	
Universalmikroskop Axioplan	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Ventilator	Clatronic, Kempen
Vıbrax-VXR (Schüttler)	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Vıbrıfix VF1 Electronic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waagen	Mettler-Toledo, Giessen

# 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinien wurden unter standardisierten Bedingungen gemäß der Protokolle des Herstellers (ATCC-Promochem, www.lgcpromochem-atcc.com) kultiviert. Als Kulturmedien wurden die der Tabelle 10 zu entnehmenden Lösungen verwendet. Die Ernte der Zellen erfolgte zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten, sodass jeweils drei biologische "Repeats" für die weitere Analyse zur Verfügung standen.

#### 2.2.2 Prinzip der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) dient der Auftrennung komplexer Proteingemische nach zwei unabhängigen Kriterien. Zunächst werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (1. Dimension) und im zweiten Schritt nach ihrer Molekularmasse (2. Dimension) aufgetrennt.

Die erste Publikation zur hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese stammt von O'Farrell et al., die die Grundlage für weitere Entwicklungen und Verbesserungen hinsichtlich Auflösungsvermögen und Reproduzierbarkeit bot (O'Farrell, 1975; Anderson und Anderson, 1978; Görg, 1991). Bei der Separation der Proteine in der ersten Dimension macht man sich die als isoelektrische Fokussierung (IEF) bezeichnete Technik zunutze. Die Nettoladung eines Proteins ändert sich mit dem pH der umgebenden Lösung. Sobald das Protein seinen charakteristischen isoelektrischen Punkt (pI) erreicht hat, weist es keine Nettoladung mehr auf und wandert daher nicht mehr im elektrischen Feld. Zur Fokussierung werden die Proteine zunächst in einem nichtionischen Detergens, dem Denaturierungsmittel Harnstoff sowie DTT in Lösung gebracht (Denaturierungspuffer). Die Elektrophorese erfolgt dann auf Polyacrylamidstreifen, die einen immobilisierten pH-Gradienten enthalten (IPG-Streifen).

Nach Umpufferung wird in der zweiten Dimension anschließend der IPG-Streifen auf ein SDS-Gel appliziert, so dass die Proteine durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in ihrer Größe aufgetrennt werden können. Hierbei wandern die durch das beigefügte Detergens Natrium-Dodecylsulfat (SDS) negativ geladenen Proteine zur Anode. Kleinere Proteine können das Polyacrylamidgel schneller durchwandern und es kommt somit zu einer zusätzlichen Separation der Proteine nach Molekülmasse. Die IEF und SDS-

PAGE wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt (Gemoll et al., 2011). In Abbildung 1 wird das Prinzip der zweidimensionalen Gelelektrophorese veranschaulicht.



*Abb. 1.: Prinzip der zweidimensionalen Gelelektrophorese.* Links: Trennung der Proteine nach dem isoelektrischen Punkt (IP) in der ersten Dimension. Rechts: Anschließende Auftrennung nach der Molekülmasse in der zweiten Dimension. Rechts unten: Exemplarisches 2-DE-Gel (7595 A) aus dem vorliegenden Versuchsaufbau (Abb. modifiziert nach Kalbitzer und Petrides, 2007).

## 2.2.2.1 Aufbereitung der Zellen für die zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Zellkulturen wurden in 150cm<sup>2</sup> Kulturschalen kultiviert und bei 70%-80% Konfluität geerntet. Hierzu wurden das Medium abgegossen, die Zellen zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen und nach Zugabe von 2,5mL kaltem Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren mit einem Zellschaber von ihrem Untergrund abgelöst. Das Zellgemisch wurde daraufhin in vorher abgewogene Eppendorfgefäße gegeben und 3min bei 2.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nochmals in 1mL 2-D Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren gelöst, worauf ein weiterer Zentrifugationsschritt (5min bei 5.700rpm und 4°C) folgte. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Nassgewicht (Wet weight, WW) des Pellets bestimmt und dieses bei -80 °C eingefroren.

Um jede Proben nachfolgend für die 2-DE zugänglich zu machen, wurde jedes Pellet aufgetaut und in 1,89µL destilliertem Wasser pro mg WW resuspendiert. Anschließend wurde das Zellgemisch viermal hintereinander in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei RT aufgetaut. SDS-Mercaptoethanol (0,089µL x WW) und 0,329µL pro WW DNAse I/RNAse I-Lösungen wurden hinzugesetzt, um nichtkovalente Bindungen aufzuheben und störende Nukleinsäuren zu entfernen (Celis et al., 1984). Alle Proben wurden daraufhin lyophilisiert und mittels Denaturierungspuffer (6µL pro WW [mg]) resuspendiert.

### 2.2.2.2 Proteingehaltsbestimmung nach Bradford

Um zu gewährleisten, dass für den quantitative Vergleich gleiche Proteinmengen auf die Gele geladen werden, ist die Ermittlung der Proteinkonzentration der Proben notwendig. Die Ermittlung des Proteingehaltes erfolgte mit der Methode nach Bradford (Bradford et al., 1976). Diese beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 (CBBG) sein Absorptionsmaximum nach der Bindung an Proteine in saurer Lösung von 470nm auf 595nm verschiebt.

Zunächst wurde nach Verdünnung von 1µl der vorbehandelten Proteinlösung in 100µl destiliertem Wasser jeder Probe auf einer 96-Loch Mikrotiterplatte 25µl konzentriertes Assay-Reagenz hinzugefügt. Die Dreifach-Bestimmung der Proteinkonzentration wurde in einem Multiscan-Reader unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von Rinderserumalbumin gegen eine Standardkurve ermittelt.

## 2.2.2.3 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung wurde die "Protean IEF Cell" der Firma BioRad verwendet. Es wurde jeweils 75µg Protein jeder Probe mit Rehydrierungspuffer auf ein Gesamtvolumen von 300µl verdünnt. Um eine hohe Auflösung auch im hochmolekularen Bereich zu bekommen, fand die Fokussierung mittels aktiver Rehydrierung bei 50V auf einem 17cm langen Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten (pH-Wert 4 bis 7) statt. Die Suspensionsproben wurden auf die Streifen geladen und mit Mineralöl-Lösung bedeckt, um diese vor Austrocknung bzw. Auskristallisation zu schützen. Dann wurde der Protean IEF Cell-Einsatz mit einem Deckel verschlossen und für ca. 10,5h in der IEF-Kammer fokussiert, in der 52.900Vhr erreicht wurden. Die Temperatur innerhalb des Gerätes lag während des gesamten Vorganges bei 20°C. Nach Beendigung der Fokussierung wurden die IPG-Streifen in eine Klarsichthülle eingeschweißt und bis zur weiteren Verwendung für die SDS-PAGE bei -80°C gelagert.

Um einen erfolgreichen Transfer der Proteine aus dem IPG-Streifen in das SDS-Gel zu gewährleisten, ist eine Äquilibrierung (Umpufferung) der Gelstreifen notwendig. Diese erfolgte zweimal für 15min durch Zugabe von je 10mL SDS-Elektrophoresepuffer in 20cm langen Glasröhrchen. Zuerst wurden hierbei die Proteine mittels DTT (Äquilibrierlösung I) reduziert, um dann mit Iodacetamid (Äquilibrierlösung II) alkyliert zu werden. Im zweiten Schritt wurde außerdem das DTT neutralisiert, um vertikale Streifen im silbergefärbten Gel zu vermeiden (Görg et al., 1987).

### 2.2.2.4 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Für die zweite Dimension wurden vorgefertigte Gele mit einem 10-13%igen Acrylamidgradienten der Firma Nextgenscience verwendet (230\*200\*1,5mm). Für die Gelelektrophorese wurde die Apparatur ProteanPlus® Dodeca<sup>™</sup> Cell der Firma BioRad verwendet.

Die IPG-Streifen aus der ersten Dimension wurden vorsichtig auf die Geloberfläche appliziert und dort mit zuvor aufgewärmter 0,5%iger Agarose fixiert. Nach dem Aushärten der Agarose wurde das SDS-Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und die Elektrophorese gestartet. Diese lief dann für 18-20h bei 100V bei einer konstanten Temperatur von 12°C bis der Kontrollfarbstoff in der Lauffront das Gel durchlaufen hat.

# 2.2.2.5 Silberfärbung der Polyacrylamidgele

Die Färbung der Gele erfolgte dem der Tabelle 16 zu entnehmenden Protokoll in einer Plastikschale unter gleichmäßigem Schwenken.

Arbeitsschritt:	Lösung:	Zeitregime:
1. Fixierung	30% (v/v) Ethanol (95% (v/v))	3 x 30min
	10% (v/v) Essigsäure	
	60% (v/v) dest. Wasser	
2. Sensitivierung	0,5M Kaliumacetat	Über Nacht
	20% Ethanol (95% (v/v))	
	8,3mM KTT	
3. Waschen	dest. Wasser	6 x 20min
4. Inkubation	12mM Silbernitrat	1 x 2h
	5mM HEPES	
	0,026% Formaldehyd (37% (v/v))	
5. Entwicklung	0,22M Kaliumcarbonat	2 x 5min
	0,05mM Natriumthiosulfat	
	0,009% Formaldehyd (37% (v/v))	
6. Stop	1% (v/v) Essigsäure	1 x 10min
	50g/L TRIS	
7. Waschen	dest. Wasser	4 x 5min
8. Lagerung	200mL Glycerin	
	500mL Ethanol (95% (v/v))	
	1g Natriumazid	
	4,3L dest. Wasser	

Tab. 16.: Protokoll der Silberfärbung der Polyacrylamidgele

#### 2.2.2.6 Scan-Prozess

Um die Gele computergestützt auswerten zu können, wurden sie mithilfe des Densitometers GS-710 über die Software Quantity One 4.6.1 (BioRad, München) digitalisiert. Das Einscannen erfolgte mit einer Auflösung von 12bit.

#### 2.2.3 Dokumentation und Auswertung der Gele

Die 21 Gele wurden im Anschluss zwei verschiedenen Software-Analysen unterzogen (PDQuest: BioRad, Hercules, CA, USA, Version 8.0.1; und Progenesis SameSpot: Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, Version 4.0), um softwarebedingte Fehler zu minimieren und ein sogenanntes "Minimal Data Set" (Minimale Datenschnittmenge) zu erstellen. Dieses sollte dann Proteine enthalten, die durch beide Softwareprogramme überlappend als signifikant identifiziert wurden.

PDQuest ist eine weit verbreitete Software zur computergestützten Bildauswertung von zweidimensionalen Gelen. Obwohl diese im Laufe der Jahre gravierenden Änderungen unterzogen wurde, ist die Grundidee der Analyse dieselbe geblieben. Die Spotdetektion ist der fundamentale Schritt der Software. Alle darauffolgenden Prozessierungen basieren auf der resultierenden Liste der Spotcharakteristika des sogenannten "künstlichen Bildes" ("synthetic image"). Progenesis SameSpot hingegen ist eine neuere Software, die eine vollautomatisierte Prozessierung der Gelbilder ermöglicht und sich durch hochwertige Visualisierung der Daten und integrierte Statistikelemente auszeichnet (Rosengren et al., 2003).

# 2.2.3.1 Auswertung anhand der PDQuest Software

Die wesentlichen Schritte der PDQuest Analyse sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

Tab. 17.: Übersicht der wesentlichen Analyseschritte der PDQuest Software

Analyseschritt:	Bemerkung / Einstellungen:
1. Filterungsprozess:	
Auswahl eines Filtertyps zur Beseitigung	Gewählte Methode: "Median-Filter" mit
kleiner Störerscheinungen (z.B.:	einer Größe von 5x5 Pixeln
fleckförmiger Artefakte)	
2. Spotdetektion: "Spot detection Wizard"	
Erstellung von benutzerdefinierten	Alle unter den gleichen
Parameter-Sets unter Verwendung eines	Versuchsbedingungen hergestellten,
Korrespondenz-Gels:	gefärbten und gescannten Gele werden auf einheitlichem Level vorverarbeitet.
<ul> <li>Manuelle Markierung eines besonders schwachen ("faint spot") Spots, eines kleinen ("small but not faint") Spots, sowie der größten Spotgruppe ("largest spot cluster")</li> </ul>	
Wahl der gewünschten Methode zur Subtraktion des Hintergrundes	Gewählte Methode: "floating ball" Die "floating ball" Methode basiert auf dem Prinzip, dass das Gel in vertikalen Säulen durch eine rotierende Scheibe abgetastet wird, deren Radius automatisch auf dem größten Spot basierend kalkuliert wird. Es ergibt sich eine Dichtemessung mit Maximal- und Minimalwerten. Verbindet man die Basis aller Maximalwerte zu einem Graphen, werden alle Werte unterhalb des Graphen als Hintergrund definiert und rechnerisch subtrahiert.
• Manuelle Veränderung der Sensitivität zur Bestimmung der minimalen Signalintensität, die als Spot erkannt werden soll ("find spot centers")	
Prozessierung aller Gele	
Automatische Spotdetektion:	Interpretation der Proteinspots als Gaußverteilung. Benachbarte "Peaks" (Absorptionsmaxima) werden zur zweidimensionalen Darstellung der Spots verkettet und mit Algorithmen zur Beschreibung der Spots bestimmt.
3. "Matching":	
Zuordnung gleicher Proteine einer Gelserie	Gewählte Methode: "Classic Matching", bei
durch Erstellung eines sog. "Match-Sets"	der manuell Orientierungsspots gesetzt werden
Auswahl eines virtuellen Referenzgels	Ausgewähltes Referenzgel: CRL 11372B
in Form einer zusätzlichen Gel-Spot-	Proteine einer Gelserie, die nicht im
Datei	Referenzgel enthalten sind, werden manuell
	eingetügt, sodass das Referenzgel am Ende
	die Gesamtneit aller Proteine einer
	Gervergieichsserie ("Watch-Set") verwaltet.

Tab. 17.: Übersicht der wesentlichen Anal	yseschritte der PDQuest Software
---	----------------------------------

• Auswahl von ca. 50 Orientierungsspots	Besonders charakteristische Spots werden
(,,landmarks")	in allen Mitgliedern der Gelserie markiert,
	um weitere unmarkierte Spots in der Nähe
	zur Deckung zu bringen.
4. "Editing"	
Manuelle Überprüfung und Überarbeitung	Letzter und mit Abstand aufwendigster
der bei der automatischen Spotdetektion	Schritt der Gelanalyse. Die Kontrolle ist
und dem Spotmatching entstandenen	unbedingt erforderlich, da derzeit keine der
Fehler.	Analysesoftwares völlig fehlerfrei arbeitet.
Hinzufügen von Spots	PDOuest eignet sich für diesen
Löschen von vermeintlichen Spots	Kontrollschritt besonders, da es manuelle
Zusammenführen von Spots	Eingriffe in die Analyse ermöglicht.
• Veränderung der Zuordnung von Spots	
("Matchen")	
	Match symbols (matched:15 unmatched:0) Match symbols (matched:13 unmatched:0)
11372 C 25082008 v1 (Raw 2-D Image) 7023 A 28072008 v1 (Raw 2-D Image)	11372 C 25082008 v1 (Raw 2-D Image) 7023 A 28072008 v1 (Raw 2-D Image)
7134 C 25082008 v1 (Raw 2-D Imaze) 7140 A 28072008 v1 (Raw 2-D Imaze)	Match symbols (matched:13 unmatched:0) Match symbols (matched:12 unmatched:0) 7134 C 25082008 v1 (Raw 2-D Imaga) 7140 A 28072008 v1 (Raw 2-D Imaga)
Exemplarische Darstellung der	Exemplarische Darstellung der
Benutzeroberfläche (unbearbeitet)	Benutzeroberfläche (bearbeitet)

Für die nicht erwähnten Einstellungsmöglichkeiten wurden die Grundeinstellungen ("default settings") gewählt.

### 2.2.3.1.1 Statistische Auswertung der PDQuest Analyse

Die Expressionsdaten der Proteine wurden von der PDQuest Software normalisiert. Im Anschluss wurden die Daten folgenden Vorbereitungsschritten unterworfen. Die Messwerte wurden zunächst logarithmiert, um eine symmetrische Häufigkeitsverteilung der beobachteten Proteinexpression zu erhalten. Nicht quantifizierbaren Spots (Wert Null) wurde die minimale Expression des jeweiligen Proteins als Messwert zugeordnet. Saturierte Spots (Wert -3) wurden mit maximalen Expressionsmessungen bewertet.

Für jedes Protein wurde ein gemischtes Modell angepasst, da es sich um ein verschachteltes ("nested") Design handelt. Dieses Modell enthielt den Typ, den Zeitpunkt sowie die entsprechende Wechselwirkung als feste Effekte, während die Zelllinie als

zufälliger Effekt modelliert wurde. War die Wechselwirkung nicht signifikant, wurde ein Modell ohne diese Wechselwirkung geschätzt und neben den p-Werten auch die Effektschätzer angegeben.

Für die Proteine, die in den verschiedenen Gruppen (fetale Osteoblasten, Osteosarkom, Metastase) unterschiedlich waren, galten folgende Kriterien:

- p-Wert (Typ) < 0.05
- mindestens ein Mittelwertsunterschied  $\geq 1$
- maximaler Effekt des Typs größer als maximaler Effekt des Zeitpunktes.

Um die Diskrimination der drei unterschiedlichen Gruppen zu untersuchen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) aller signifikanten und identifizierten Proteine angefertigt. Die statistische Auswertung der PDQuest-Daten wurde von Frau Dr. Silke Szymczak aus dem Institut für Medizinische Informatik und Statistik, UKSH, Campus Kiel durchgeführt.

## 2.2.3.2 Auswertung anhand der Progenesis SameSpot Software

Die Analyseschritte sind in Tabelle 18 zusammengestellt. Die statistische Auswertung ist hierbei in der Softwareanalyse enthalten.

Analyseschrift:	Bemerkung / Einstellungen:
1. Automatische Qualitätskontrolle der Gele:	
In die Analyse eingeschlossene importierte	
Gelbilder werden u.a. folgenden Kontrollen	
unterzogen:	
• Bilder enthalten keine Komprimierung,	
die die Präzision beeinflusst hat.	
• Bilder sind nicht gesättigt.	
• Bilder sind grauskaliert.	
• Intensitätslevel > 8bit	
2. Auswahl Referenz Gel	
3. "Mask of Interest":	
Umgrenzung des Gelareals, welches	
interessant für die Analyse erscheint.	
4. "Alignement":	
Semi-automatische Ausrichtung der Gele	Möglichkeit zur manuellen Überprüfung
miteinander mittels Vektoren.	der automatisch gesetzten Vektoren.
In diesem Schritt sind neben dem	
automatischem "Alignement",	
Spotdetektion und Normalisierung	
enthalten und ergeben 100% "Matching".	
Exemplarische Darstellung der Benutzeroberfläche vor "Alignement"         5. "Prefiltering":	Exemplarische Darstellung der Benutzeroberfläche nach "Alignement"
Spots die nicht mit in die Analyse	
übernommen werden sollen können an	
dieser Stelle entfernt werden	
6. Gruppierung der Gele:	
	Die Gele wurden in die Gruppen fetale
	Osteoblasten" Osteosarkom" und
	"Pulmonale Metastasen" eingeteilt.
7. Ergebnisse der Statistik:	

 Tab. 18.: Übersicht der Analyseschritte der SameSpot Software

Resultate der softwareinternen Analyse

können durchgesehen werden.
#### 2.2.4 Erstellung eines Minimal-Data Sets

Die Ergebnisse der beiden Software-Analysen wurden miteinander verglichen. Hierbei wurde jeder signifikante Spot in beiden Software-Programmen visuell überprüft und in Deckung gebracht. Da beide Software-Programme unterschiedliche Analyseschritte durchlaufen und keine der uns bekannten Analyseprogramme fehlerfrei zu arbeiten scheint, wurde so eine "Minimal Data Set" gebildet, welches nur die Proteinspots enthält, die von beiden Softwareprogrammen überlappend als signifikant detektiert wurden.

#### 2.2.5 Manuelles Spot-Picking und Entfärbung

Zunächst wurden die zu identifizierenden Proteine nach der Analyse manuell in einer sterilen Werkbank ausgeschnitten und in eine 96-Well Platte übertragen. Die Gelstücke wurden dann mit 50µL einer Stammlösung aus 300µL Kaliumferricyanid und 300µL Natriumthiosulfat einige Minuten vom Silber entfärbt, drei- bis viermal mit 100µL Wasser bis zur vollständigen Entfärbung gewaschen und im Anschluss der massenspektrometrischen Analyse zugeführt (Gharahdaghi et al., 1999).

## 2.2.6 MALDI-MS (Matrix assistierte Laser Desorption/Ionisation)-Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektrometrie (MS) ist die Standardmethode zur exakten Massenbestimmung von Proteinen. Hierbei werden nur sehr kleine Mengen benötigt, wie sie in einer Bande auf einem Gel typischerweise enthalten sind. Die Massenbestimmung erreicht eine Genauigkeit von über 0,1Da. In Abbildung 2 ist schematisch das Prinzip einer massenspektrometrischen Analysetechnik dargestellt.



*Abb. 2.: Prinzip der MALDI-Massenspektrometrie.* Beim MALDI-TOF-Verfahren werden die in der Probe enthaltenen Proteine zusammen mit Matrixmolekülen auf einem Träger getrocknet und mit Hilfe eines gepulsten Lasers ionisiert. Die dabei entstehenden positiv geladenen Ionen werden anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt und durchlaufen anschließend eine sog. Driftstrecke. Ihre Flugzeit wird mittels Detektor gemessen und ist dem Quotienten aus Masse und Ladung (m/z) proportional. (Abb. aus Kalbitzer und Petrides, 2007)

Eine Möglichkeit der Ionenerzeugung ist das MALDI (Matrix assistierte Laser Desorption Ionisations)-Verfahren. Eine Methode zur Trennung und Analyse der geladenen Proteinionen ist die TOF (time of flight)-Massenspektrometrie, bei der die Flugzeit der verschiedenen Ionen bestimmt wird. Für eine Sequenzanalyse ist die geschilderte Ermittlung der Gesamtmasse nicht ausreichend. Das Protein muss gezielt fragmentiert werden, um dann die Fragmente analysieren zu können. Dies kann im Massenspektrometer durch das Einfügen einer mit Heliumgas gefüllten Kollisionszelle erreicht werden, mit der ein Massenpeak gezielt fragmentiert und weiter analysiert wird (CID, collision induced dissociation).

## 2.2.6.1 In-Gel-Verdau der ausgeschnittenen Gelstücke

Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden jeweils dreimal alternierend mit 25mM Ammoniumbicarbonat und dann mit 50% Acetonitril in 25mM Ammoniumbicarbonat gewaschen. Jeder Waschschritt bestand aus einer Inkubation für 5-10min und einer anschließenden Zentrifugation für 2min bei 200xg. Danach wurden die Gelstückchen durch Zugabe von 100% Acetonitril entwässert und 10min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Gelstückchen für 15min getrocknet und mit je 7µL der aktivierten Trypsinlösung [3,5ng/µL Trypsin] für 30min bei 4°C inkubiert. Nach Trypsinierung der Proben bei 37°C für 4h, folgte die Extraktion der Peptide mittels 10µL 1% TFA bei 30min RT.

## 2.2.6.2 MALDI-Targetbelegung

 $4\mu$ L der extrahierten Peptide wurden direkt nach der Gewinnung auf das Prespotted AnchorChip<sup>TM</sup> MALDI Target mit HCCA-Matrix pipettiert. Nach dem Antrocknen der Proben auf dem MALDI-Target wurden  $4\mu$ L einer 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) und 10mM Ammoniumphosphat monobasic Lösung auf die noch feuchte Probe gegeben und zusammen quantitativ abgenommen. Abschließend wurde das gesamte MALDI-Target nochmals mit der 0,1% TFA und 10mM Ammoniumphosphat monobasic Lösung großflächig gespült. Nach dem Trocknen bei RT wurde das MALDI-Target im UltraFlex III TOF/TOF Massenspektrometer vermessen.

## 2.2.6.3 Massenspektrometrische Identifizierung

Zur Identifizierung der Peptide wurde das präparierte MALDI-Target im UltraFlex III TOF/TOF Massenspektrometer im Reflektormodus gemessen. Zur Steuerung und Analyse wurde die Software Compass 1.3 (Bruker Daltonics) benutzt. Die Proben wurden im Automatik-Modus mit 25kV Beschleunigungsspannung im positiven Ionenmodus vermessen. Zur Sequenzierung der MS-Daten wurden zusätzlich Fragmentspektren (MS/MS-Analysen) ausgewählter Peptide erstellt. Die Datenanalyse erfolgte im Automatikmodus (on the fly) mittels Biotools 3.2 (Bruker Daltonics).

Als Datenbankbrowser wurde eine lokale Version von MASCOT Version 2.2 (Matrix Science Ltd, London, UK, www.matrixscience.com) verwendet. Zur Identifizierung der generierten Peptidspektren wurde die Datenbank SwissProt (<u>http://ca.expasy.org/sprot/</u>) mit der Sub-Datenbank Homo Sapiens (Version 57.8, 20.401 protein entries)

herangezogen. Bei den Peptidmassen wurde davon ausgegangen, dass sie in monoisotopischer Form und als protonierte molekulare Ionen vorlagen. Die Suchkriterien umfassten die Carbamidomethylierung von Cystein als feststehende Modifikation sowie die Oxidation von Methionin als variable Modifikationen. Eine nicht geschnittene Peptidbindung durch Trypsin wurde toleriert. Berücksichtigt wurden nur Treffer, welche drei oder mehr passende Peptidmassen und eine Sequenzdeckung von mindestens 10% aufwiesen. Eine interne Kalibrierung wurde durch eine Analyse von autolytischen Trypsinprodukten durchgeführt, die eine Genauigkeit von  $\pm 0.04$ Da gewährleistet. Das Signifikanzniveau basierte auf dem erwarteten Wert, der Anzahl passender Peptidmassen und der Übereinstimmung zwischen experimentellen und theoretischen Eigenschaften des Proteins.

## 2.2.7 Signalweg-Analyse

Um das Zusammenspiel der identifizierten Proteine untereinander und in bekannten Signalwegen und Netzwerken zu untersuchen, wurden die Proteinidentitäten mit der Software Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com,) analysiert.

IPA ist eine weitverbreitete Datenbank und Software, die auf der Ingenuity Pathway Knowledge Base (IPKB) aufbaut (Ficenec et al., 2003; Calvano et al., 2005). Sie ermöglicht zum einen die Zuordnung zu bekannten metabolischen Signalkaskaden als auch zu indirekten Interaktionen zwischen den untersuchten Identitäten. Die von der IPA Software generierten Netzwerke werden in einer Rangfolge bewertet. Die Werte errechnen sich aus dem negativen Logarithmus des P-Wertes. Dieser gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass die untersuchten Identitäten zufällig in einem gemeinsamen Netzwerk auftauchen. Ein Wert von  $\geq 5$  wird hierbei als signifikant betrachtet.

#### 2.2.8 Validierung der 2-DE Ergebnisse mittels Western-Blot

Für die Validierung von identifizierten Proteinen dient im ersten Schritt die Western-Blot Technik. Hierbei werden die zu untersuchenden Proteinproben zunächst mit Hilfe der Gelelektrophorese in einer Trägermatrix (diskontinuierliche SDS-PAGE, Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese) entsprechend ihrer Molekülmasse in Proteinbanden aufgetrennt und dann auf eine Polyvinylidenfluoridmembran übertragen ("geblottet"). Diese wird mit einem Antikörper inkubiert, welcher sich spezifisch an die entsprechende Proteinbande anlagert. Die Komplexe können durch die nachfolgende Inkubation mit sekundären Antikörpern, die gegen den Fc-Teil des ersten Immunglobulins gerichtet und an ein Markerenzym HRP (Horseradish Peroxidase, Meerretichperoxidase) gekoppelt sind, nachgewiesen werden. Nach Zugabe eines unlöslichen Substrats des Markerenzyms kommt es zur Emission von Licht, sodass die Protein-Antikörper-Komplexe sichtbar werden. Als Ladekontrolle dient β-Actin (ACTB) (Burnette, 1981; Towbin et al., 1979).

# 2.2.8.1 Aufbereitung der Zellen und Proteingehaltsbestimmung für den Western-Blot

Die Zellen wurden vor der Validierung erneut wie in Absatz 2.2.2.1 beschrieben aufbereitet. Ebenso wurde von den gewonnenen Proteinpellets eine Proteingehaltsbestimmung (Absatz 2.2.2.2) durchgeführt, um zu gewährleisten, dass gleiche Proteinmengen auf die Gele geladen werden.

## 2.2.8.2 Validierung mittels Western-Blot

Die Polyacrylamid-Gele mit einer Größe von 235\*150\*15mm wurden mit einem Gradienten von 12% hergestellt. Hierzu wurden zunächst die Trenngellösung und dann die Sammelgellösung zwischen zwei, sich in einer Gießvorrichtung befindlichen, Glasplatten pipettiert und mit einem Slot-Kamm versehen. Die Polymerisation erfolgte über Nacht bei 4°C.

Alle Proteinproben wurden mit Probenverdünnungspuffer auf 15µL entsprechend verdünnt und jeweils mit 7,5µL Laemmli-Puffer versetzt. Daraufhin wurden die Proben erst 5min bei 95°C, dann 5min bei 4°C inkubiert und im Anschluss 2min bei 10.000xg zentrifugiert. Während die aufgetragene Proteinmenge bei CTSD, GLO1, RANBP1 und ACTB jeweils 10µg betrug, wurden bei STMN1 50µg für die Detektion von Banden eingesetzt. Die 80minütige Auftrennung der Proteine erfolgte bei 35mA. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel für 30min in Blotpuffer äquilibriert. Die zugeschnittene PVDF-Membran wurde 15s in 100% Methanol aktiviert, 2min mit Millipore gewaschen und dann ebenfalls mit Blotpuffer äquilibriert. Sie wurde auf das Gel aufgebracht und im Anschluss in einer Haltevorrichtung in die Blotkammer eingesetzt. Das elektrische Feld wurde bei 150mA für 80min angelegt. Nach Ablauf des Blots wurde die Membran zweimal mit Millipore gewaschen und 60min mit Magermilch inkubiert. Daraufhin wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Antikörper-Milchpulverlösung (1. Antikörper) inkubiert. Die Konzentration des 1. Antikörpers betrug bei CTSD 1:1.000, bei GLO1 1:600, bei RanBP1 1:1.000 und bei STMN1 1:250.

Als Ladekontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper der Maus gegen beta-Actin der Firma Abcam verwendet (Konzentration ACTB: 10µL auf 5ml Milchpulver).

Es folgten drei Waschschritte à 15min mit TBST-Waschlösung. Die Membran wurde anschließend 1h mit dem 2. Antikörper (3,75µL HRP-linked und 0,75µL Strept actin) inkubiert und dann erneut mit TBST-Waschlösung gewaschen.

Zur Detektion der Proteinbanden wurden 2mL Luminol/Enhancer Lösung mit 2mL Peroxidase verdünnt und auf die Membran gegeben. Nach etwa 4min wurde die Membran im Detektor mit der Software Quantity One von BioRad eingelesen. Für jede Bande auf dem jeweiligen Western Blot wurde die Software IQTL für die Quantifizierung verwendet und im Anschluss die Signifikanzen mittels einseitigem Mann-Whitney U-Test berechnet. Zwischen mehreren ungebundenen Gruppen wurden die Signifikanzen mittels Kruskal-Wallis-Tests ermittelt.

## 2.2.9 Prinzip der Cytospins

Mittels Cytofuge werden bei der Herstellung von Cytospins kultivierte Zellen durch Zentrifugation auf einem Objektträger fixiert, welches in der Folge die Möglichkeit bietet, immunhistochemische oder Immunfluoreszenzfärbungen, sowie auch Fluoreszenz-in-situ Hybridisierungen (FISH) durchzuführen. Die Zellen wurden wie in Absatz 2.2.2.1 beschrieben aufbereitet.

## 2.2.9.1 Durchführung und Herstellung der Cytospins

Mittels Trypsinierung oder Ablösung mithilfe eines Zellschabers erfolgte die Zellernte. Die Zellen wurden zentrifugiert und das Pellet anschließend mit PBS 1x derart gelöst, dass eine dünne Zellsuspension entstand. Dies diente zur Vorbeugung einer Überladung der Cytospins mit einer sehr hohen Zellkonzentration. Die Supension wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Zum Aufbau der Cytospinvorrichtung wurde eine Filterauflage und ein Plastiktrichter auf die Oberseite eines Cytospin-Objektträgers positioniert, sodass die Lochvorgaben aller drei Ebenen miteinander in Deckung kamen. Die Vorrichtung wurde sodann mithilfe einer Metallklemme fixiert und in die Cytofuge gestellt. Nach Beladung jedes Plastiktrichters mit 100µL Zellsuspension erfolgte die Zentrifugation bei 700rpm für 5 Minuten. Mikroskopisch wurde überprüft, ob die Zellen separiert und einschichtig vorlagen. Gegebenenfalls erfolgte eine erneute Verdünnung der Zellsuspension. Die Cytospins wurden anschließend lichtgeschützt über Nacht getrocknet, in Aluminiumfolie gewickelt und bei -80°C gelagert.

## 2.2.10 Prinzip des Tissue Microarray (TMA)

Tissue Microarrays (TMAs) zählen zu den Hochdurchsatz-Verfahren in der Tumorforschung. Mittels immunhistochemischer Färbungen erlauben sie eine schnelle,

vergleichende Visualisierung von Zielmolekülen in bis zu tausenden Gewebeproben. (Kallioniemi et al., 2001). Vorteile dieser Methode sind die beschleunigte Analyse einer Vielzahl von Proben, die geringe Menge an benötigtem Probenmaterial, sowie die Standardisierung der Untersuchungsbedingungen (alle Proben werden mit denselben Reagenzien bei identischen Temperaturen und Inkubationszeiten untersucht) (Giltnane und Rimm, 2004). Zur Herstellung eines TMAs werden ausgestanzte Gewebezvlinder unterschiedlicher Donorblöcke auf einem leeren Paraffinblock (Empfängerblock) zusammengesetzt, sodass üblicherweise 200-800 Gewebeproben auf einem Empfängerblock zusammenkommen. Dieser wird mit einem Mikrotom wiederum in dünne Scheiben geschnitten und auf einem Objektträger fixiert. In der zugrunde liegenden Arbeit wurde ein kommerziell erhältlicher TMA (BO2081 von Biomax mit 176 Proben) und ein laborintern hergestellter TMA mit 26 Proben für die klinische Validierung verwendet (siehe Tabelle 12 und 13).

## 2.2.10.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Vor der immunhistochemischen Färbung wurde ein TMA-Schnitt als Übersichtspräparat für die morphologische Charakterisierung mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Hämatoxylin ist ein basischer, blauer Farbstoff, welcher insbesondere zur Kernfärbung eingesetzt wird. Eosin ist ein saurer, rötlicher Farbstoff, welcher im Wesentlichen zytoplasmatische Proteine färbt. Der in Paraffin eingebetteten TMA wurde zuvor mit Xylol entparaffiniert und mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Nach erfolgter Färbung wurde das Präparat wiederum dehydriert, mit Xylol geklärt und mit dem Eindeckmedium Eukitt und einem Deckgläschen versehen.

## 2.2.11 Immunhistochemische Färbung zur Detektion von CTSD und RanBP1

Die Immunhistochemie gehört zu den zentralen Methoden der modernen histopathologischen Forschung und funktioniert nach dem Antigen-Antikörper-Reaktionsprinzip. Strukturen, in dieser Arbeit Proteine, gegen die Antikörper gebildet werden, können somit hochspezifisch nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Färbung erfolgte durch eine indirekte Nachweismethode mit hoher Sensitivität, der Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode = Avidin-Biotin-Complex). Hierbei macht man sich die hohe Affinität des Glykoproteins Avidin zu dem Vitamin Biotin zunutze. Die mit Biotin konjugierten Sekundärantikörper binden an antigenspezifische Primärantikörper. Zugleich wird ein Markerenzym (eine biotinylierte Peroxidase, z.B. Meerrettichperoxidase) mit Avidin präinkubiert. Avidin besitzt vier irreversible Bindungsstellen für Biotin, sodass der gebildete Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex mit seinen freien Bindungsstellen an den Sekundärantikörper bindet. Unter Zugabe von Wasserstoffperoxid als Substrat für die Peroxidase entstehen nun Protonen, welche in der Folge farblose Chromophore (z.B. 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol oder 3,3'-Diaminobenzoltetrahydrochlorid) oxidieren. Somit kommt es zu einem Farbumschlag des Gewebes, an das der Primärantikörper gebunden hat (Guesdon et al., 1979).

## 2.2.11.1 Immunhistochemische Färbung der Cytospins

Die bei -80° gelagerten Cytospins wurden zunächst aufgetaut und anschließend mit 100% Aceton fixiert. Um endogene Peroxidasen zu inaktivieren und einer unspezifischen Reaktion mit der AEC-Substratlösung vorzubeugen, folgte die Inkubation der Präparate in 3% Wasserstoffperoxid über 10min, gefolgt von drei PBS-Waschschritten. Um die Permeabilität der Zellmembranen für die Antikörper zu erhöhen, wurden die Zellen dann mit 0,1% Triton über 10min inkubiert und erneut gewaschen. Vor Zugabe der Primärantikörper (60min) wurden die Präparate über 25min mit Ziegennormalserum blockiert, um eine unspezifische Anlagerung der Primärantikörper zu verhindern. Nach weiteren drei Waschschritten wurde der biotinylierte Sekundärantikörper hinzugefügt und über 30min inkubiert. Es folgten weitere Waschschritte, sowie eine Inkubation mit dem ABC-Reagenz. Zur Induktion der Chromogenreaktion erfolgte die Zugabe der AEC-Substratlösung, um anschließend nach Einsetzen der rötlichen Antigenfärbung mit Hämalaunlösung die Zellkerne blau-violett gegen zu färben. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer, die Waschschritte in einer Küvette auf dem Schüttler.

## 2.2.11.2 Immunhistochemische Färbung der TMAs

Die in Paraffin eingebetteten TMAs wurden zunächst wie bei der HE-Färbung entparaffiniert und rehydriert. Aufgrund der Fixierung der Tissue Microarrays mit Formalin vor Paraffineinbettung kommt es zu einer Vernetzung der Proteine, sodass die Epitope von Antiköpern nur unzureichend detektiert werden können. Zur sogenannten Antigendemaskierung erfolgte daher eine Hitzebehandlung mittels elektromagnetischer Wellen im Mikrowellenofen in 10mM Zitronensäurepuffer bei zunächst 900Watt über 5min und später bei 750Watt über 2x10min. Die Primär- und Sekundärantikörper-Inkubation, sowie die Chromogenreaktion und Gegenfärbung erfolgte wie bei der Cytospinfärbung beschrieben.

## 2.2.11.3 Mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen der TMAs wurden mithilfe eines automatisierten Computerprogrammes erfasst. Von einem robotisierten Mikroskop (Pannoramic DESK, 3D, Ungarn) wurde jede Stanze mit repräsentativem Gewebe gescannt und mit dem Softwareprogramm Image Scope (Aperio, U.S.A., Version 9.1) quantitativ ausgewertet. Es erfolgte eine Vermessung der Immunopositivität der einzelnen Gewebestanzen, welche von 0 bis 1 reichten. Alle HE-Färbungen wurden jeweils durch Prof. Dr. med. Christoph Thorns aus dem hiesigen Institut für Pathologie überprüft.

#### 2.2.11.4 Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Mithilfe des Statistikprogrammes GraphPad Prism wurden die Ergebnisse der automatischen Analyse der IHC-Färbungen von den Cytospins zunächst auf Normalverteilung untersucht (Shapiro-Wilk-Test und Kolmogorow-Smirnow-Test). Da mindestens eine Gruppe im Gruppenvergleich nichtparametrisch vorlag, wurden Signifikanzen zwischen zwei ungebundenen Gruppen mittels einseitigen U-Tests und zwischen mehreren ungebundenen Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Tests ermittelt.

Die Ergebnisse des TMA-Scorings wurden mittels einseitigen U-Tests mit der Alternativhypothese basierend auf den unterschiedlichen Expressionen der Immunopositivität berechnet, wobei bei TMA Duplikaten der Mittelwert zugrunde lag.



#### 2.2.12 Graphische Zusammenfassung der Methodik

Abb. 3.: Graphische Zusammenfassung der Methodik. Bei der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Zelllinien von fetalen Osteoblasten, Osteosarkomen und pulmonalen Metastasen kultiviert (1.) und in ihrem Proteom mittels zweidimensionaler Gelelektrophoresen aufgetrennt (2.). Die erstellten 21 Gele wurden dann mithilfe zweier Softwareprogramme analysiert (3.), ein "Minimal data set" erstellt (4.), signifikante in beiden Software übereinstimmende Proteinspots manuell ausgeschnitten (5.) und massenspektrometrisch identifiziert (6.). Die identifizierten Spots wurden einer Signalweganalyse unterzogen (7.) und ausgewählte Proteine mittels Western Blot validiert (8.). Zuletzt erfolgte eine immunhistochemische Färbung an Cytospins der Zelllinien, einem kommerziell erworbenen und einem laborintern hergestellten Tissue Microarray (9.).

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Um zu ergründen, ob es mittels zweidimensionaler Gelektrophorese und massenspektrometrischer Identifizierung möglich ist, signifikante, biologisch bedeutsame und reproduzierbare Unterschiede in der Proteinexpression von Zelllinien des Osteosarkoms im Vergleich zu Zelllinien fetaler Osteoblasten und pulmonaler Metastasen zu identifizieren, erfolgte die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) für sieben Zelllinien (1 fetale Osteoblastenzelllinie, 3 Osteosarkomzelllinien, 3 pulmonale Metastasenzelllinien). Die Triplikate sind im Weiteren durch A, B und C gekennzeichnet). Somit standen 21 Gele für die weitere Analyse zur Verfügung.

## 3.2 Ergebnisse der softwaregestützten 2-DE-Gel-Auswertung

## 3.2.1 PDQuest Analyseergebnisse

Mithilfe der PDQuest Software wurde ein Datensatz von 1.791 Proteinspots detektiert. Diese Expressionswerte wurden jeweils zur Basis 2 logarithmiert und nach Ausschluss von Spots mit fehlenden Werten standen 1.108 Proteine in allen 21 Gelen für die weitere Auswertung zur Verfügung. 64 Proteine waren im 3-Gruppenvergleich (Fetale Osteoblasten, Osteosarkom, pulmonale Metastase) signifikant unterschiedlich exprimiert.

#### 3.2.2 SameSpot Analyseergebnisse

Mithilfe der SameSpot Software wurde eine Gesamtzahl von 1.114 Proteinspots detektiert, die vollständig in weitere Analysen eingingen, da keine fehlenden Werte auftraten. 174 Proteine waren in den 3 verschiedenen Gruppen signifikant unterschiedlich.

#### 3.2.3 Übereinstimmungen der beiden Softwareergebnisse

Da keine der uns bekannten Analyseprogramme völlig fehlerfrei arbeiten, wurde jeder signifikante Spot visuell überprüft. Übereinstimmend fanden sich 34 signifikante Proteine ("Minimal Data Set") in beiden Software-Programmen, welche im Folgenden der massenspektrometrischen Analyse zugeführt wurden.

Die Hauptkomponentenanalyse ("Principal Component Analysis", PCA) der Expressionsdaten dieser 34 Proteine zeigte eine deutliche Trennung der unterschiedlichen Zellliniengruppen voneinander (Abbildung 4).

#### 3 Ergebnisse



*Abb. 4: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Expressionsdaten.* Die Hauptkomponentenanalyse zeigt das Clusterverhalten der 3 Gruppen; fetale Osteoblasten (schwarz), Osteosarkom (rot) und die pulmonalen Metastasen (grün). Eingegangen in die Analyse sind die 34 signifikanten (A) und die daraus 17 identifizierten (B) Spots. Evaluiert wurden alle Triplikate der Zelllinien (A, B, C).

## 3.3 Massenspektrometrische Identifizierung signifikanter Proteine

Von den 34 Proteinspots konnten 17 identifiziert werden, wobei ein Protein zweimal identifiziert wurde. Sie sind graphisch mit ihrer Lage auf einem exemplarischen 2-DE-Gel in Abbildung 5 dargestellt. Alle Identitäten sind in Tabelle 19 zusammengefasst. In Tabelle 20a sind die Regulationen der für den Western-Blot ausgewählten Proteine dargestellt. Die weiteren Proteinidentäten mit ihren 2-DE-Expressionsmustern finden sich ergänzend im Anhang (Tab. 20b).



*Abb. 5: 17 signifikante Spots exemplarisch dargestellt in einem der 2-DE-Gele (7595 A)* 738: Cathepsin D, 811: Ran-specific GTPase activating Protein, 817: Pre-mRNA-splicing factor SPF27, 850: Ubiquitin carboxyl-terminal Hydrolase, 860: Putative high mobility group protein-like, 966:Lactoylglutathion Lyase, 1072: Heat shock protein beta 6, 1104: Stathmin OS, 1255: Histon H4, 1509: Heat shock protein beta-1, 1511: Cathepsin A, 1515: Selenium-binding protein, 1523: Predicted:similar to hCG1654128, 1524: Ring finger protein 170, 1619: Actin-related protein 2/3 complex subunit, 1678: Keratin Typ A, 1773: Ubiquitin carboxyl-terminal Hydrolase

## 3.3.1 Proteinidentitäten

Tab. 19.: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine der unterschiedlich exprimierten Proteinspots

Nr.	Protein Name	SameSpot	PDQuest	Gensymbol	Chromosomen-	Sequenz-	Mascot	Theoretische	Observierte
		#	#		abschnitt	deckung (%)	Score	Masse (kDa)	Masse (kDa)
1	Cathepsin D	738	6227	CTSD	11p15.5	28	122	55	45
2	Ran-specific GTPase activating Protein	811	4224	RANBP1	22q11.21	18	120	51	23
3	Pre-mRNA-splicing factor SPF27	817	5222	BCAS2		11	87	51	26
4	Ubiquitin carboxyl-terminal Hydrolase	850	5207	UCHL1	4p14	36	115	49	25
5	Putative high mobility group protein-like	860	8206	LOC100130		21	51	48	24
6	Lactoylglutathion Lyase	966	3140	GLO1	6p21.3-21.1	19	78	42	21
7	Heat shock protein beta 6	1072	8104	HSPB6		21	90	17	17
8	Stathmin OS	1104	5122	STMN1	1p36.1-35	9	74	32	17
9	Histone H4	8012	1104	HIST2H4A	12p12.3	29	54	20	11
10	Heat shock protein beta-1	1509	6214	HSPB1	7q11.23	48	155	50	23
11	Cathepsin A	1511	2207	CTSA		11	71	54	32
12	Selenium-binding Protein	1515	8503	SELENBP1		22	156	52	53
13	Predicted:similar to hCG1654128	1523	2052	-		7	62	unbekannt	12
14	Ring finger protein 170	1524	3141	RNF170		10	50	29	30
15	Actin-related protein 2/3 complex subunit	1619	6108	ARPC3		40	143	20	16
16	Keratin Typ A	1678	2420	KRT10		16	107	58	59
17	Ubiquitin carboxyl-terminal Hydrolase	1773	5227	UCHL1	4p14	52	172	49	25

## 3.3.1.1 Proteinidentitäten und Expressionsmuster

Proteinidentität SameSpot Exemplarische Spotbilder (SameSpot) Expressionsmuster der 2-DE-Analyse: # (Gensymbol) 6,76(±8,25g-002) 6,66(±6,84e-002) **Cathepsin D** 738 6,53(±0,31) (CTSD) Pulmonale Metastase Fetaler Osteoblast Osteosarkom Fetale Ostenblasten Pulmonale Metastasen Ostensarkonzellen 6,47(±0,44 Lactoylglutathion-6,31(±0,12) 966 lyase (GLO1) 6,11(±0,13) Fetaler Osteoblast Osteosarkom Pulmonale Metastase Fetale Ostenblas Ostensariomzeli Pulmonale Metastaser

Tab. 20a: Proteinidentitäten und Expressionsmuster (ausgewählte Proteine für den Western-Blot, die übrigen Proteinidentitäten finden sich im Anhang)

Proteinidentität SameSpot Exemplarische Spotbilder Expressionsmuster der 2-DE-Analyse: # (Gensymbol) 58(±8,41e-002) **Ran-specific** 6,52(±4,88e-00 og Normalised Volu GTPase-activating 811 protein (RanBP1) 6,36(±9,48e-002) . Osteosarkom Fetaler Osteoblast Pulmonale Metastase Fetale Ostenblasten Ostensarkomzellen Pulmonale Metastasen 6,41(±5,17e-002) og Normalised Volur **Stathmin OS** 1104 (STMN1) 5,96(±0,12) 5,82(±0,14) Fetaler Osteoblast Osteosarkom Pulmonale Metastase Fetale Ostenblasten Osteosarikomzellen Pulmonale Metastasen

Tab. 20a: Proteinidentitäten und Expressionsmuster (Fortsetzung, ausgewählte Proteine für den Western-Blot, die übrigen Proteinidentitäten finden sich im Anhang)

## 3.4 Systembiologische Signalweg-Analyse mittels Ingenuity Pathway Analyse

Um die gemeinsamen Signalwege und Netzwerke der 17 identifizierten Proteine zu untersuchen, wurde die Software Ingenuity Pathways Analysis (IPA) verwendet. Netzwerke mit einem "Score"  $\geq$ 5 wurden als signifikant betrachtet.

13 der 17 Proteinidentitäten bildeten die Grundlage eines gemeinsamen Netzwerkes. Dieses wurde mit einem Score von 37 gewichtet und umfasste folgende 13 Proteine: Actinrelated protein 2/3 complex subunit (ARPC3), Cathepsin A (CTSA), Cathepsin D (CTSD), Lactoylglutathionlyase (GLO1), Histone H4 (HIST2H4A), Heat shock protein beta-1 (HSPB1), Heat shock protein beta-6 (HSPB6), Selenium-binding protein 1 (SELENBP1), Ubiquitin carboxy-terminal Hydrolase L1 (UCHL1), Stathmin OS (STMN1), Ran-specific GTPase-activating protein (RANBP1), Keratin, type I (KRT10), Pre-mRNA-splicing factor SPF27 (BCAS2).

Diese Proteine sind assoziiert mit Signalwegen von Apoptose, Tumorgenese und hämatologischen Erkrankungen und umfassen biologische Funktionen zur Tumorentstehung, gastrointestinalen Erkrankungen, genetischen Störungen, Zellaufbau, sowie Zellorganisation und -morphologie mit Signifikanzen im Bereich von 0,0492 . V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC), STMN1, CTSD und das Tumor Protein 53 (TP53) stellen die zentralen Knotenpunkte des Netzwerkes dar. Die graphische Veranschaulichung der Signalweg-Analyse ist in Abbildung 6 dargestellt.



Abb. 6: Graphische Veranschaulichung der IPA-basierten Signalweg-Analyse. Die Abbildung zeigt die mittels Software generierte Übersicht des detektierten Netzwerkes. Rot gekennzeichnet sind Proteine mit der Tendenz einer Hochregulierung, grün gekennzeichnet sind Proteine mit der Tendenz einer Runterregulierung in den 2-DE-Analysen. Gelb umrahmte Proteine wurden für die anschließenden Validierungsstudien selektiert.

## **3.5** Validierung mittels Western-Blot

Zur Validierung wurden vier Proteine ausgewählt. In Anbetracht der Expressionsmuster, der Signalweganalyse, der molekularen Funktionen der Proteine sowie der Verfügbarkeit entsprechender Antikörper fiel die Auswahl auf Cathepsin D (CTSD), Lactoylglutathionlyase (GLO1), Ran-specific GTPase-activating protein (RanBP1) und Stathmin (STMN1). Die Software IQTL wurde für die Quantifizierung der detektierbaren Banden verwendet, die im Anschluss mit Bezug auf die 2-DE Ergebnisse statistisch ausgewertet wurden.

Dies erbrachte eine Überexpression von CTSD im Sarkom (p=0,0083) sowie in den pulmonalen Metastasen (p=0,0061) im Vergleich zu den fetalen Osteoblasten. Auch der Vergleich von Osteosarkom zu Metastase (p=0,0030), sowie der Vergleich zwischen allen drei Gruppen (p=0,0002) erwies sich als signifikant.

Im Falle von RanBP1 fand sich eine Überexpression in den fetalen Osteoblasten im Vergleich zum Osteosarkom (p=0,0083), sowie im Vergleich zu den pulmonalen Metastasen (p=0,0424). Der Vergleich von Osteosarkom zu pulmonaler Metastase erwies sich als nicht signifikant unterschiedlich (p=0,4601). Der Vergleich aller drei Gruppen erbrachte im Falle von RanBP1 keine signifikanten Unterschiede (p=0,0591).

GLO1 und STMN1 zeigten andere Expressionsmuster als in der 2-DE-Analyse und wurden daher nicht weiter untersucht.

Cathepsin D und RanBP1 wurden nachfolgend zur klinischen Validierung ausgewählt. In Abbildung 7 sind die Western-Blots der vier Proteine aufgeführt. In Abbildung 8 finden sich ergänzend die Boxplots der Western-Blot-Analyse von CTSD und RanBP1.

#### 3 Ergebnisse

	Fetale Osteoblasten	Osteosarkomzellen	Pulmonale Metastasen	Expositions-
	11372A 11372B 11372C	7023B 7023C 7140A 7140B 7140C 7134A 7134B	7645A 7645B 7645C 7595A 7595B 7613A 7631B 7631C	zeit
CTSD				0 Sek.
GLO1				45 Sek.
RanBP1				20 Sek.
STMN1				120 Sek.
ACTB				5 Sek.

*Abb. 7: Western-Blot ausgewählter signifikanter Proteine.* Die Abbildung zeigt die Western-Blots der vier untersuchten Proteine: Cathepsin D (CTSD), Lactoylglutathion-Lyase (GLO1), Ran-specific GTPase-activating protein (RanBP1), Stathmin (STMN1) sowie der Ladekontrolle β-Actin (ACTB). Die Zahlen stehen für die jeweilig zugrundeliegende Zelllinie (z.B. 11372), die Kennzeichnung A, B und C für die Triplikate. Für die Zelllinien 7023, 7134 und 7595 sind jeweils nur 2 Triplikate in die Analyse des Western Blots eingegangen.



*Abb. 8: Boxplots der Western-Blot-Analyse von CTSD (links) und RanBP1(rechts).* Die Graphen zeigen die Proteinexpressionen der einzelnen Proben (wobei der Maximalwert gegen ACTB normalisiert wurde) sowie den Median und den Streuungsbereich zwischen dem oberen und unteren Quartil. (\*\*\*: 0,0001<p<0,001; \*\*: 0,001<p<0,001; \*: 0,01<0,05).

## 3.6 Immunhistochemische Färbung der Cytospins

Zwei Proteine (**CTSD** und **RanBP1**) wurden mittels immunhistochemischer Färbungen anhand von Cytospins der Zelllinientriplikate weitergehend untersucht.

## 3.6.1 CTSD

Bei der IHC-Färbung zur Detektion von CTSD wurde bei allen Präparaten eine granuläre Färbung im Cytoplasma und in Plasmamembrannähe der Zellen beobachtet (Abbildung 9). Intensität und Ausprägung jedoch variierte, so färbten sich die Zellen der fetalen Osteoblastenzelllinie sehr schwach oder gar nicht an, wohingegen die Osteosarkomzellen und die Zellen der pulmonalen Metastasen eine intensive Anfärbung aufwiesen.



*Abb. 9: Exemplarische Cytospinpräparate gefärbt mit Anti-CTSD-Antikörper bei 100facher Vergrößerung.* Die Zahlen stehen für die jeweilig zugrundeliegende Zelllinie, die Kennzeichnung A für das erste Triplikat. Für die Zelllinien 7134 standen nur 2 Triplikate für die Analyse der Cytospins zu Verfügung. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (blau). Die Messbalken entsprechen 50µm.



*Abb.* 10: Boxplots der Cytospinpräparate gefärbt mit Anti-CTSD-Antikörper. (\*\*\*: 0,0001<p<0,001; \*: 0,001<p<0,001; \*: 0,001<p<0,005).

Die automatisierte Auswertung der Färbung mithilfe der Image Scope Software (Aperio, U.S.A., Version 9.1) bestätigte den visuellen Eindruck. So ergab der mediane Wert der zytoplasmatischen Färbung für fetale Osteoblasten 0,0586; für das Osteosarkom 0,3886 und 0,5046 für die pulmonalen Metastasen (siehe Abbildung 10). Diese Unterschiede waren signifikant im Vergleich von fetalen Osteoblasten und Osteosarkomen (p=0,0061), zwischen fetalen Osteoblasten und pulmonalen Metastasen (p=0,0045), sowie auch im Vergleich aller drei Gruppen (p=0,0127).

#### 3.6.2 RanBP1

Bei der IHC-Färbung zur Detektion von RanBP1 wurde bei allen Präparaten eine cytoplasmatische Färbung sichtbar, welche insbesondere in den Osteosarkom- und Metastasenzellen auffällig wurde. Insgesamt fiel bei der Betrachtung der Färbung jedoch eine deutlich stärkere Inhomogenität innerhalb der Gruppen ins Auge. Die statistische Analyse erbrachte weder im Vergleich zweier Gruppen noch im Dreigruppenvergleich Signifikanz und zeigte keine Korrelation mit den Expressionsmustern aus der 2-DE und der Western-Blot Analyse. RanBP1 wurde somit von der weiteren klinischen Validierung ausgeschlossen.

# 3.7 Klinische Validierung mittels Immunhistochemischer Färbung des erworbenen Tissue Microarrays

Die immunhistochemische Färbung des erworbenen Tissue Micrarray BO2081 diente der Beurteilung der Expression von CTSD in klinischen Osteosarkomproben. Im Vorfeld erfolgte eine HE-Färbung eines TMA-Schnittes zur Beurteilung der Morphologie der Gewebestanzen (Abbildung 11). Proben, welche kein repräsentatives Tumorgewebe aufwiesen, wurden nicht weiter berücksichtigt. Das Normalgewebe bestand zum Großteil aus Knochenmark und Knochensubstanz, wobei keine Osteoblasten in den Gewebestanzen zu finden waren. Vereinzelnd liessen sich jedoch Osteozyten, welche von adulten Osteoblasten abstammen, ausmachen und zur Auswertung verwenden.



*Abb. 11: Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Knochentumor-Tissue Microarray BO2081.* Oben: Darstellung des gesamten Schnittes (Messbalken: 5000µm), unten: 100-fache Vergrößerung von Ausschnitten aus Osteosarkom- und Normalgewebe (Messbalken 50µm). Im Normalgewebe zeigte sich deutlich das löchrige, zellreiche Knochenmark links und die zellarme Knochensubstanz rechts. Mit dem Pfeil ist ein Osteozyt markiert.

#### 3.7.1 Auswertung der immunohistochemischen Färbung des erworbenen TMA

Einbezogen in die Auswertung der IHC-Färbungen wurden 176 Stanzen (darunter Duplikate der Proben von 24 Osteosarkomen, 9 Chondrosarkomen, 9 Myelomen, 2 Ewing Sarkomen, 11 Riesenzelltumoren, 9 invasiven Riesenzelltumoren, 2 Chordomen, 8 Adamantinomen, 6 Knochenzysten und 8 Knochennormalgewebestanzen).

In der Auswertung der mit Anti-CTSD immunhistochemisch gefärbten Gewebestanzen fanden sich keine Osteoblasten in den Normalgewebestanzen, sodass Osteozyten betrachtet wurden. Im Osteosarkom fand sich ein Immunopositivitätswert (IP) von 0,2234 im Vergleich zum ossären Normalgewebe (IP=0,0450; p=0,0024) und im Vergleich zu den Osteozyten, welches sich allesamt nicht anfärbten (p<0,0001).

Darüberhinaus fand sich im Vergleich zum Normalgewebe eine höherer Expressionswert im Chondrosarkom (IP=0,4166; p=0,0039), im Myelom (IP= 0,2305; p=0,0076), , im Riesenzelltumor (IP=0.3946; p=0.0004), im invasiven Riesenzelltumor (IP=0.3991; p=0.0002), im Chordom (IP=0.5234; p=0.0022), im Adamantinom (IP=0.2952; p=0.0023) und in den Knochenzysten (IP=0.5392; p=0.0013), jedoch nicht im Ewing Sarkom (IP=0,1613; p=0,2667).



Abb. 12: Boxplots der Immunopositivitätswerte (IP) von CTSD der unterschiedlichen Entitäten des erworbenen Tissue Microarray. Die gestrichelte Linie stellt den Median des Knochennormalgewebe dar. (\*\*\*: 0,0001<p<0,001; \*\*: 0,001<p<0,01; \*: 0,01<0,05).

## **3.8** Klinische Validierung mittels Immunhistochemischer Färbung des *laborintern hergestellten* Tissue Microarrays

Um eine höhere Expression von CTSD im Osteosarkom und in pulmonalen Metastasen im Vergleich zu ossärem Normalgewebe auch an klinischem Gewebe zu untersuchen, wurde der laborintern hergestellte Tissue Microarray mit 26 Proben untersucht.

Hierbei fand sich im Normalgewebe ein Immunopositivitätswert von IP=0,5214, im Osteosarkom ein IP von 0,6472 und in den pulmonalen Metastasen von 0,7216. Somit zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Normalgewebe und Osteosarkom (p=0,0237) und zwischen Normalgewebe und pulmonalen Metastasen (p=0,0079). Auch im Vergleich aller drei Gruppen fand sich ein signifikanter Regulationsunterschied (p=0,0391) und bestätigte somit die Ergebnisse aus den 2-DE Profilen, dem Western-Blot und den Cytospins.



Abb. 13: Boxplots der Immunopositivitätswerte (IP) von CTSD des laborintern hergestellten Tissue Microarrays. (\*\*\*: 0,0001<p<0,001; \*\*: 0,001<p<0,01; \*: 0,01<0,05).

## 3.9 Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse



*Abb. 14: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse.* Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsschritte. Die mit \* versehenen Zielproteine erreichten Signifikanz in den jeweiligen Validierungsschritten.

# 4 Diskussion

## 4.1 Diskussion der Methodik

#### 4.1.1 Versuchsaufbau

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Schritt ein Versuchsaufbau mit drei Gruppen basierend auf Zellkulturmodellen gewählt, welche die Malignitätsstadien des Osteosarkoms repräsentieren; die gesunden Knochenzellen (fetale Osteoblasten), der Primärtumor (das Osteosarkom) sowie die sekundären Absiedlungen (pulmonale Metastasen). Keine der uns bekannten Arbeiten zur komparativen Proteomanalyse des Osteosarkoms wies einen direkt vergleichbaren Versuchsaufbau auf. In der vorliegenden Arbeit wurde im Bezug auf die Ergebnisse der 2-DE-Analyse die Signifikanz der Proteinexpression in allen drei Gruppen betrachtet, sodass keine statistische Aussage über die Signifikanz im 2-Gruppen-Vergleich (z.B. Vergleich zwischen der Gruppe der fetalen Osteoblasten und der Osteosarkome) gemacht werden konnte. Im Zuge der weiteren Validierung mittels Western-Blots, Cytospins und Tissue Micro Arrays wurden ergänzend statistische Berechnungen zu 2-Gruppenvergleichen ergänzt. Das besondere Augenmerk dieser Arbeit wurde auf das Verständnis der dynamischen Proteinexpression im Rahmen der Tumorprogression und Metastasierung gelegt.

#### 4.1.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) mit ihrer Fähigkeit komplexe Gemische intakter Proteine aufzutrennen, stellt einen Hauptbestandteil dieser Arbeit dar. Trotz der breiten Anwendung und steter Verbesserungen der Technik bringt die laborintensive Methode mit sich, dass Expressionsschwankungen einzelner Proteine sich auch bei völlig gleich behandelten Proben nicht gänzlich vermeiden lassen (Rabilloud, 2002). Auf der einen Seite sind der Genauigkeit gerätetechnisch Grenzen gesetzt, da alle verwendeten Geräte mit einem systematischen Fehler (wie z.B. Pipetten) arbeiten. Auf der anderen Seite birgt die manuelle Ausführung der notwendigen Arbeitsschritte Fehlerquellen. Ein besonders fehleranfälliger Arbeitsschritt stellt zum Beispiel die Übertragung des IPG-Streifens auf die SDS-Gele der zweiten Dimension dar. Ein weiteres methodisches Problem ist, dass sich stark saure oder basische Proteine nicht gut bzw. gar nicht voneinander trennen. Auch Proteine mit stark wasserabweisendem Charakter (z.B. Membranproteine) sind im wässrigen Milieu des Trenngels nur schwer einer Separation zugänglich (Haynes und Yates, 2000; Rabilloud, 2009). Bei der Färbung der Proteinspots verhalten sich die Proteine darüber hinaus sehr unterschiedlich, so dass die gemessenen Farbintensitäten und Proteinmengen nicht bei allen Proteinen im gleichen Verhältnis zueinander stehen (Haynes und Yates, 2000). Dennoch bietet die 2-DE gegenüber anderen Analyseverfahren entscheidende Vorteile: es ist die einzige Methode, eine reproduzierbare Auftrennung komplexer intakter Proteingemische unter Beibehaltung der quantitativen Verhältnisse durchzuführen (Rabilloud, 2002). Vorteilhaft an dieser Methode ist außerdem die Möglichkeit Proteine in großer Anzahl simultan zu untersuchen und hierbei auch posttranslationale Modifikationen zu berücksichtigen (Wilkins et al., 1999; Rabilloud und Lelong, 2011).

#### 4.1.3 Software

Wie in der vorliegenden Arbeit verdeutlicht wurde, unterscheiden sich die Ergebnisse der beiden unterschiedlich arbeitenden Softwareprogramme zur Auswertung der 2-DE Ergebnisse. Von 64 (PDQuest) bzw. 174 (SameSpot) signifikanten Proteinspots sind in beiden Softwareprogrammen nur 34 übereinstimmend. Beide Softwareprogramme haben ihre Vor- und Nachteile.

Als ein Nachteil der PDQuest Software ist zu vermerken, dass auch nach zeitintensiver, manueller Überprüfung aller Spots auf allen 21 Gelen noch immer fehlende Werte auftauchen. Diese gehen nicht in die weitere Analyse ein, da sie zu einer Verfälschung der Statistik führen würden. Auch handelt es sich bei dieser Software um ein älteres, jedoch etabliertes Programm, welches zum einen in der Bedienbarkeit Einarbeitung bedarf, zum anderen aber auch die Möglichkeit bietet, sehr gut die Deckung der Gele manuell zu überprüfen und zu bearbeiten.

SameSpot hingegen zeichnet sich durch seine sehr einfache Bedienbarkeit und Übersichtlichkeit aus. Manuelle Überprüfungen sind ebenfalls möglich (z.B. bei der Überprüfung der Vektoren und Bearbeitung der Spots), jedoch nicht unbedingt und in großem Umfang notwendig. Die statistischen Auswertungen sind sehr anschaulich visualisiert, bieten in der Version, die in dieser Arbeit verwendet wurde, jedoch nicht die Möglichkeit die Statistik streng an den Versuchsaufbau anzupassen. Da in der Gruppe der fetalen Osteoblasten nur eine Zelllinie zur Verfügung stand, könnte dieser Zustand eine Erklärung für die deutlich höhere Anzahl an signifikanten Proteinen in den Ergebnissen dieser Software erklären.

#### 4.1.4 Minimal Data Set und Western-Blot

Die Unterschiede in den Softwareprogrammen sowie die methodenbedingten Fehlerquellen verdeutlichen die Wichtigkeit der Validierung, die in dieser Arbeit zum einen durch die Erstellung eines Minimal Data Sets (durch die Verwendung und den Abgleich zweier Programme) vollzogen wurde und zum anderen durch den Western-Blot, die Cytospins und die klinische Validierung mittels Tissue Microarrays ergänzt wurde.

Kritisch zu bedenken bei der Erstellung eines Minimal Data Sets ist jedoch der mögliche Verlust an Informationen, da in jedem Analyseschritt die Zahl der zu betrachtenden Proteine eingeschränkt wurde. Umso bemerkenswerter ist, dass sich die 13 Proteine, die in die Pathwayanalyse eingespeist wurden, in einem gemeinsamen biologisch relevanten Netzwerk zusammenfinden.

Die Western-Blot Technik ist eine Methode, die in der molekularbiologischen und medizinischen Forschung sowie in der Diagnostik breite Anwendung findet. Um ein zufriedenstellendes Ergebnis zu erzielen, ist insbesondere die Verfügbarkeit von geeigneten primären Antikörpern eine Grundvoraussetzung. So zeigte sich in der vorliegenden Arbeit vor allem die Validierung des Stathmins als besondere Herausforderung, da extrem hohe Proteinmengen und Antikörperkonzentrationen zum Nachweis des Proteins erforderlich waren.

#### 4.1.5 Immunhistochemie von Cytospins und TMAs

Die immunhistochemischen Färbungen der Cytospins (Zellmonolayer) erfolgten ergänzend zur Validierung der signifikanten Proteinexpressionsmuster vorangegangener Untersuchungen. Hierbei war von besonderer Wichtigkeit, dass die Zellen möglichst nicht überlappend vorlagen, da in Zellclustern eine Ansammlung von Antikörpern möglich ist, die zu einer falsch positiven Färbung führen kann. Desweiteren scheint ein Unterschied zwischen zytoplasmatischen und in anderen Zellkompartimenten angesiedelten Proteinen zu bestehen. So bestätigten sich bei dem lysosomalen Cathepsin D die Western-Blot Ergebnisse auch in den immunhistochemischen Färbungen der Cytospins, wohingegen sich die Ergebnisse bei RanBP1 nicht bestätigten. Die Ursache hierfür könnte bei den Cytospin-Präparaten liegen. Bei deren Auswertung fiel interessanterweise eine andersartige Morphologie der fetalen Osteoblasten ins Auge. Im Gegensatz zu den runden Tumorzellen erschienen die Knochenzellen mit langen, zum Teil blasenförmigen Ausstülpungen. Als mögliche Ursache hierfür wäre denkbar, dass die Membran der Osteoblasten während des Zentrifugationsvorgangs leichte Schädigungen erfahren hat, während die robusteren Tumorzellen unversehrt blieben. Der so entstehende teilweise Austritt des Cytoplasmas mit den darin enthaltenen Proteinen, könnte die geringe Anfärbung des zytoplasmatischen RanBP1 insbesondere in den Osteoblastenzellen erklären. Proteine in anderen Zellkompartimenten sind durch eine zusätzliche Membranschicht umgeben und können aufgrund ihrer Größe poröse Zellmembranen nicht so leicht passieren. Es ist somit anzunehmen, dass das lysosomale CTSD von diesem Phänomen nicht betroffen war.

Anhand von immunhistochemisch gefärbter TMAs erfolgte die Validierung an klinischen Gewebeproben. Hierbei sind bei der Auswertung der Ergebnisse jedoch einige biologische, sowie methodische Grenzen zu berücksichtigen. Zum Einen waren auf den Normalgewebestanzen des erworbenen TMAs keine Osteoblasten zu finden, sodass alternativ Osteozyten als Referenz dienten. Diese sind zwar Abkömmlinge der Osteoblasten, jedoch aufgrund ihrer Funktion nicht gänzlich vergleichbar. Zum Anderen bleibt bei morphologisch heterogenen Tumoren wie dem Osteosarkom die Frage, ob Gewebestanzen von 1mm Durchmesser die Eigenschaften des gesamten Tumors hinreichend erfassen (Eckel-Passow et al., 2010). Aus diesem Grunde ist eine hohe Fallzahl an Proben essenziell, welche für einige der weiteren auf dem TMA enthaltenden Knochenerkrankungen zum Teil nicht der Fall war. Aus diesem Grunde und zum Teil in Folge von Verlust während des Färbevorgangs sind einige Entitäten nicht in die weitere Analyse mit eingegangen. Im Falle des laborintern hergestellten Tissue Microarrays, welcher zur Validierung der erhöhten Expression von CTSD im Rahmen der Tumorprogression diente, konnten die Stanzen der fetalen Osteoblasten wegen fehlender Anfärbbarkeit nicht ausgewertet werden, sodass als Referenz Stanzen von tumorangrenzendem Normalgewebe dienten. Zusammengefasst konnte somit die klinische Validierung nicht streng gemäß dem 2-DE-Versuchsaufbau gestaltet werden. Umso bemerkenswerter ist, dass CTSD sich in beiden Tissue Microarrays als signifikant hochreguliertes Protein bestätigte.

#### 4.2 Bedeutung der Signalweganalyse

Die systembiologische Signalweganalyse erleichtert die komplexen Zusammenhänge von Proteinen zu ergründen. Dabei ist anzumerken, dass die verwendete Software von einer Firma hergestellt wurde und kein Einblick in die zugrunde liegende Datenbank möglich ist. Die Software erleichtert den Überfluss an Informationen zu bündeln und potentielle Netzwerke oder Signalwege zu erforschen.

Bemerkenswert ist, dass sich die eingespeisten Proteine in einem einzelnen mit Neoplasien assoziierten Netzwerk zusammenfinden. Die Tatsache, dass das Tumorsuppressionsprotein 53 (TP53) eine zentrale Rolle im Netzwerk einnimmt, unterstreicht zudem die Bedeutung der identifizierten Proteine. Der Transkriptionsfaktor P53 reguliert unter anderem Reaktionen diverser zellulärer Stressfaktoren, welche Zellzyklusarreste, Apoptose, Zellalterung, DNA Reparatur und metabolische Veränderungen hervorrufen (Caelles et al., 1994; Bunz et al., 1998; Matheu et al., 2007). P53 gilt als Tumorsuppressor, welcher in mehr als 50% aller Tumore genetisch verändert ist und bereits mit dem Osteosarkom in Verbindung gebracht wurde (Chen et al., 1990; Iavarone et al., 1992; Montenarh, 2007).

Darüberhinaus findet sich in der Signalweganalyse das MYC Protoonkogen Protein. Es handelt sich um ein multifunktionelles, nukleäres Phosphoprotein mit Einfluss auf die Zellzyklusprogression, Apoptose, sowie Zelltransformation und fungiert überdies als Transkriptonsfaktor. Mutationen, Überexpression und Translokationen des kodierenden Gens sind assoziiert mit zahlreichen hämatopoetischen Tumoren wie dem Burkitt und B-Zell Lymphom, sowie mit dem Mamma-, Prostata-. Kolorektalen und Adenobronchialkarzinom (Hann et al., 1988; Zhou et al., 2014; Said et al., 2014; Terunuma et al., 2014; Fromont et al., 2013; Toon et al., 2014; Seo et al., 2014).

# 4.3 Biologische Bedeutung von GLO1, STMN1 und UCH-L1, RanBP1 und CTSD

Die mittels Western-Blot analysierten Proteine sowie das bereits von Liu et al. (2009) validierte UCH-L1 werden im Folgenden näher betrachtet.

#### 4.3.1 GLO1, STMN1 und UCH-L1

Die Lactovlglutathione Lvase oder auch Glyoxalase I (GLO1) ist ein zytoplasmatisches Protein mit einem Molekulargewicht von 21kDa. Das kodierende Gen ist auf Chromosom 6p21.3-p21.1 lokalisiert (Bender und Grzeschik, 1976; Ranganathan et al., 1993). GLO1 ist ein Glutathion-bindendes Protein, welches in der Entgiftung von Methylglyoxal, einem Nebenprodukt der Glykolyse (Ranganathan et al., 1999) involviert ist. Interessanterweise soll die Inhibition von Glyoxalase zur Hemmung der Osteoklastengenese führen (Kawatani et al, 2007). Des Weiteren ist dieses Protein assoziiert mit dem Vorkommen von diversen neoplastischen Erkrankungen, wie z.B. dem Malignen Melanom und dem Mammakarzinom (Thornalley, 1995; Santarius et al., 2010; Bair et al., 2010).

GLO1 steigt unserer 2-DE-Analyse zufolge in ihrer Expression im Laufe der Tumorentstehung und Metastasierung stetig an und könnte somit die unterschiedlichen Malignitätsstadien (siehe Tabelle 20a) reflektieren. Aufgrund des fast linearen Anstieges und der oben erwähnten Zusammenhänge schien dieses Protein als klinischer Marker sowohl für Frühdiagnose als auch für die Nachsorge hochinteressant, zeigte jedoch im Western-Blot keine Signifikanz und einen Expressionsabfall in den pulmonalen Metastasen (siehe Abbildung 7). Dies könnte sich zum einen durch ein erneut aufbereitetes Probenkollektiv erklären oder aber auch dadurch, dass das Protein als Dimer in der zweidimensionalen Gelelektrophorese vorlag. Die Western-Blot Ergebnisse ergaben jedoch einen Anstieg der Expression von den fetalen Osteoblasten zum Osteosarkom, sodass nach wie vor zu überprüfen wäre, ob GLO1 sich als klinischer Marker zur Frühdiagnose des Osteosarkoms eignen könnte.

Das **Onkoprotein 18 (Stathmin, STMN1)** ist ein ubiquitär vorkommendes, zytoplasmatisches Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 19kDa. Es stellt eine wichtige intrazelluläre Schaltstelle (stathmos = *griech*. Schaltstelle) zur Integration diverser Regulationssignale innerhalb der Zelle dar (Sobel et al., 1989). So ist es beteiligt an der Regulation des Mikrotubulusfilamentsystems, wobei es den Aufbau der Mikrotubuli unterbindet und deren Abbau unterstützt (Sobel et al., 1989; Sobel, 1991; Gavet et al.,

1998). Das kodierende Gen ist auf der chromosomalen Region 1p36.1-35 lokalisiert (Ferrari et al., 1990).

Eine erhöhte Expression von STMN1 wurde in Karzinomen des Kolons, der Leber, der Mamma, der Ovarien und diversen anderen Neoplasien festgestellt (Wie et al., 2008; Hsieh et al., 2010; Xu et al., 2010; Zheng et al., 2010). Zudem wurde STMN1 bereits mit dem Osteoblastenstoffwechsel in Verbindung gebracht. So sollen humane wie auch Osteoblasten-ähnliche Zellen der Ratten STMN1 exprimieren und eine Rolle in der Wachstumsregulation dieser Zellen spielen (Kumar und Haugen, 1994).

STMN1 zeigt unserer 2-DE-Analyse nach einen Abfall vom Gesunden zum Tumor und steigt dann im Rahmen der Metastasierung wieder leicht an (siehe Tabelle 20a).

Im Western-Blot zeigt sich eine ähnliche Tendenz, jedoch ohne statistische Signifikanz (siehe Abbildung 7). Die zweimalige Aufbereitung der Zellen könnte auch hier die Erklärung sein. Möglicherweise würde sich STMN1 als ergänzender zusätzlicher Marker zur Frühdiagnostik eignen.

Die Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1 (UCH-L1) ist ein zytoplasmatisches Protein mit einem Molekulargewicht von 25kDa. Dieses Enzym fungiert als Thiolprotease, welche die Peptidbindung am C-terminalen Glycin des Ubiqitins hydrolysiert (Doran et al., 1983; Wilkinson et al., 1989; Edwards et al., 1991). Es wird mit zellulären Signalwegen wie Apoptose, Zellmigration und Proliferation in Verbindung gebracht (Fang et al., 2010). Bekannt ist das Enzym zudem durch seine hohe Expression im zentralen und peripheren Nervensystem (Doran et al., 1983). Seine veränderte Funktion wird mit neurologischen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Alzheimer assoziiert (Liu et al., 2002; Gong et al., 2006).

Das kodierende Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 (4p14) lokalisiert (Setsuie und Wada, 2007). In Karzinomen wird für das Gen eine recht variable Rolle diskutiert (Orr et al., 2011). So scheint es in einigen Tumoren als Tumorsuppressor (Tokumaru et al., 2008) zu fungieren und ist im Ovarialkarzinom und im kolorektalen Karzinom ganz supprimiert (Okochi-Takada et al., 2006). Interessanter Weise ist aber auch bei zahlreichen Neoplasien eine Überexpression des Proteins bekannt, so z.B. bei dem Neuroblastom (Ootsuka et al., 2008), dem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Hibi et al., 1999), dem Myelom (Otsuki et al., 2004), dem Prostatakarzinom (Leiblich et al., 2007) und dem Pankreaskarzinom (Tezel et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde UCH-L1 wie zuvor von Liu et al. beschrieben als hochreguliertes Protein im Osteosarkom identifiziert (Liu et al., 2009). Da sich in unseren Untersuchungen überdies zeigte, dass es sowohl von der fetalen Zelle zum Sarkom als auch vom Sarkom zur Metastase zu einer vermehrten Expression des Proteins kommt, scheint dieses Protein nicht nur im Rahmen der Tumorentstehung, sondern auch bei der Progression und für die Metastasierung eine bedeutende Rolle zu spielen.

Ergänzend dazu zeigte sich auch in der Proteomanalyse von Spreafico et al., dass im Zuge der Ausreifung von Osteoblasten eben dieses Protein hochreguliert wird, sodass anzunehmen ist, dass UCH-L1 auch im neoplastischen Knochenstoffwechsel des Osteosarkoms eine entscheidende Rolle einnimmt (Spreafico et al., 2006; Suong et al., 2014).

#### 4.3.2 Ran-specific GTPase-Activating Protein (RanBP1)

Das Ran-spezifische GTPase-Aktivierungsprotein (RanBP1) ist ein 23kDA großes, zytoplasmatisches Protein, dessen kodierendes Gen auf Chromosom 22q11.21 lokalisiert ist (Coutavas et al., 1993; Bischoff et al., 1995). Es aktiviert spezifisch die an das Rasrelated nuclear protein (RAN) gebundene GTPase und ist beteiligt an der Reorganisation des Spindelapparates und dem weiteren Progress der Mitose, wobei nicht alle Mechanismen voll verstanden sind (Coutavas et al., 1993; Di Fiore et al., 2003; Tedeschi et al., 2007). Die GTPase Ran spielt eine wichtige Rolle im Transport von Tumorsuppressoren, Protoonkogenen, Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren. Es wird angenommen, dass eine dysregulierte Aktivität von Ran und seiner Effektoren zu den Signalwegen von Zelltransformationen beiträgt und somit die Tumorprogression unterstützt (Rensen et al., 2008). Doherty et al. sehen Ran-bindende Proteine und deren Netzwerke als logisches molekulares Ziel für die Inhibition von Ran-Signalwegen innerhalb von Tumorzellen (Doherty et al., 2011).

Unserer 2-DE- und Western-Blot-Analyse zufolge sinkt RanBP1 im Laufe der Tumorentstehung und Metastasierung ab (siehe Tabelle 20a und Abbildung 7), jedoch konnten diese Ergebnisse in den IHC-Färbungen der Zellinien nicht bestätigt werden.

Neben den bereits in Abschnitt 4.1.5 diskutierten möglichen Ursachen der fehlenden Anfärbung der Zelllinien, könnte auch die mittels Trypsinierung herbeigeführte Zellernte Ursache sein. Das zytoplasmatische RanBP könnte im Gegensatz zum lysosomalen CTSD durch die möglicherweise zu intensive Behandlung mit Trypsin geschädigt worden sein.

Eine weitere Erklärung der inkongruenten Ergebnisse von 2-DE- und Western-Blot-Analyse gegenüber der IHC- Färbungen könnten (vor dem Hintergrund des oben erwähnten Zusammenhanges von RanBP1 und dem Zellzyklus) genomische Instabilitäten
sein. Daher erscheint eine zellzyklusabhängige Überprüfung der Ergebnisse in geeignetem Kontrollmaterial inklusive fetaler Osteoblasten sinnvoll.

Interessanterweise führt eine Runterregulierung von RanBP1 zu einem sensibleren Ansprechen auf spezielle Chemotherapeutika, welche durch die Stabilisierung der Mikrotubuli zur Hemmung der Depolymerisation führen (Rensen et al., 2009). Diese sogenannten Taxane, wie beispielsweise Paclitaxel oder Docetaxel, könnten für die Therapie des Osteosarkoms von besonderer Bedeutung sein, da diese relativ neue, vielversprechende Zytostatika-Klasse bislang nicht in den Chemotherapieprotokollen des Osteosarkoms enthalten ist (Liu et al, 2010).

#### 4.3.3 Cathepsin D (CTSD)

Cathepsin D (CTSD) ist ein Protein, welches nach der Synthese als inaktives Proenzym von 53kDa in das endoplasmatische Retikulum gelangt. Dort wird es zum zunächst enzymatisch inaktiven Proenzym von 48kDa prozessiert, welches schlussendlich im lysosomalen Kompartiment zu einer nicht-kovalent gebundenen Form mit einer N-terminal 15kDa leichten und C-terminal 33kDa schweren Kette konvertiert wird (Horst und Hasilik, 1991; Baldwin et al., 1993; Steinfeld et al., 2006). Es gehört zu den lysosomalen Aspartyl-Proteasen, wird ubiquitär exprimiert, und ist wie auch UCH-L1 beteiligt an der proteolytischen Zelldegradation, der Zellinvasion und der Apoptose (Barrett, 1977; Steinfeld et al., 2006).

Das kodierende Gen ist auf Chromosom 11p15.5 lokalisiert (Hasilik et al., 1982; Faust et al., 1985; Henry et al. 1989). Mutationen in diesem Gen sind beteiligt an der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen (Tyynelä et al., 2000; Siintola et al., 2006). Darüberhinaus finden sich erhöhte Konzentrationen von CTSD während ischämischer, inflammatorischer und regenerativer Prozesse wie beispielsweise bei der koronaren Herzkrankheit, den entzündlichen Darmerkrankungen, im Wundheilungsprozess und epidermaler Differenzierung (Egberts et al., 2004; Hausmann et al., 2004; Vivanco et al., 2005; Steinfeld et al., 2006).

Hervorzuheben sind die Zusammenhänge von CTSD und neoplastischen Erkrankungen (Bröker et al., 2005). So wurde eine Hochregulierung von Cathepsin D bereits in zahlreichen Tumoren wie dem malignen Melanom, dem Magenkarzinom, dem Ovarialkarzinom, bei Kopf-Hals-Tumoren und beim Kolorektalen Karzinom beschrieben (Allgayer et al., 1997; Bartenjev et al., 2000; Lösch et al., 2004; Zeillinger et al., 2006; Kirana et al., 2012).

4 Diskussion

Beim Mammakarzinomen stellt diese Protease einen unabhängigen Marker für eine schlechte Prognose dar und ist korreliert mit der Inzidenz von Metastasen (Foekens et al., 1999; Barthell et al., 2007; Abbott et al., 2010; Jakobson-Raber et al., 2011).

Cathepsin D scheint somit eine bedeutende Rolle bei der Proliferation, Invasivität und Metastasierung im Rahmen von malignen Tumoren einzunehmen (Garcia et al., 1990, Vigneswaran et al., 2000, Nomura et al., 2005; Liaudet-Coopmann et al., 2006).

Es wird postuliert, dass Cathepsin D das Tumorwachstum zum Einen direkt dadurch vorantreibt, dass es zur Degradation und Umbildung der Basalmembran und dem den Primärtumor umgebenden interstitiellen Stroma führt (Berchem et al., 2002). Zum Anderen stimuliert es indirekt die Proteolyse und führt zu Wechselwirkungen mit weiteren Enzymen und anderen Cathepsinen im Rahmen des Tumorwachstums (Krepela, 2001).

Eine Hochregulierung von Cathepsin D in Osteosarkomzelllinien mit starkem Metastasierungspotential wurde bereits auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen, jedoch bislang nicht näher hinterleuchtet (Husmann et al., 2008).

Passend zu diesen Zusammenhängen steigt CTSD unseren Untersuchungen zufolge (2-DE, Western-Blot) in seiner Expression im Laufe der Tumorentstehung an und fällt im Laufe der Metastasierung wieder leicht ab. Somit kann Cathepsin D die unterschiedlichen Differenzierungsstadien (siehe Tabelle 20a, sowie Abb. 7) voneinander abgrenzen.

Diese Tendenz konnte auch in der IHC der Cytospins bestätigt werden (Abb. 8), wobei der leichte Abfall der Expression von Cathepsin D vom Osteosarkom zu den pulmonalen Metastasen nicht beobachtet wurde. Allerdings bestand auch kein signifikanter Unterschied zwischen der Färbung dieser beiden Gruppen.

Besonders bemerkenswert ist, dass sich oben genannte Ergebnisse auch in der klinischen Validierung mittels laborintern hergestelltem Tissue Microarrays bestätigten. Sowohl das Osteosarkom als auch die pulmonalen Metastasen wiesen einen signifikant erhöhte Expression im Vergleich zum Normalgewebe auf.

Desweiteren zeigte sich auch in dem kommerziell erworbenen TMA eine signifikant erhöhte Expression von CTSD in Osteosarkomgewebestanzen im Vergleich zu Osteozyten und ossärem Normalgewebe. CTSD erwies sich darüber hinaus auch signifikant erhöht in weiteren Knochentumoren, wie dem Chondrosarkom, der zweithäufigsten malignen Knochenneoplasie, dem Myelom, dem häufigsten Knochentumor, sowie dem Riesenzelltumor.

An dieser Stelle seien nochmals die in der Signalweganalyse hervorstechenden Zusammenhänge von CTSD mit dem Tumorsuppressionsprotein 53 (TP53) sowie mit dem MYC Protoonkogen Protein erwähnt, welche die bedeutsamen molekularen Zusammenhänge mit Knochentumoren untermauern (Morrison et al., 2005; Dai et al., 2011; Yang et al., 2013) und die mögliche klinische Relevanz der vorliegenden Arbeit weiter stützen.

Zusammengefasst könnte sich CTSD somit idealerweise als klinischer Parameter zur Frühdiagnose und Verlaufsbeobachtung des Osteosarkoms eignen. Im Falle des malignen Melanoms konnte bereits gezeigt werden, dass die Expressionslevel von Cathepsin D im peripheren Blut das Überleben von Patienten vorhersagen können, welche mit Tremelimumab behandelt werden (Saenger et al., 2014). Zusammengefasst bindet Tremelimumab, ein menschlicher monoklonaler Antikörper, an das Oberflächenprotein CTLA-4 von aktivierten T-Lymphozyten, welches die Elimination von Tumorzellen unterbindet und somit das Autoimmunsystem in der Bekämpfung neoplastischer Zellen unterstützen soll (Ribas et al., 2007; Blank und Enk, 2015). Bislang ist es nicht in den Chemotherapieprotokollen des Osteosarkoms enthalten.

### 5 Zusammenfassung

Vergleichende Proteinexpressionsstudien über das Osteosarkom, den am häufigsten diagnostizierten malignen Knochentumor, sind rar. Um die bislang nicht verstandenen Pathomechanismen des Osteosarkoms zu ergründen, diagnostische Parameter zu prüfen und gegebenenfalls neue therapeutische Ansätze zu finden, beschäftigte sich diese Arbeit mit der Frage, ob es signifikante und biologisch bedeutsame Unterschiede bei der Proteinexpression im Laufe der Tumorentstehung und Metastasierung gibt.

Hierzu wurden fetale Osteoblastenzelllinien (als Referenz), Zelllinien des Osteosarkoms, und Zelllinien pulmonaler Metastasen miteinander verglichen. Diese wurden kultiviert und in ihrem Proteom mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. 34 in den drei unterschiedlich Zelllinien exprimierte Proteinspots. welche sich in zwei Softwareprogrammen (PDQest®, SameSpot®) übereinstimmend als signifikant erwiesen, wurden der massenspektrometrischen Untersuchung zugeführt. Insgesamt konnten hierbei 17 Proteine identifiziert werden, die daraufhin einer Signalweganalyse unterzogen wurden, um die Bedeutung einzelner Proteine in komplexen Systemen zu beleuchten und ihre Wechselwirkung mit anderen identifizierten Proteinen in Zusammenhang zu bringen. Vier signifikante Proteine (CTSD, RanBP1, GLO1 sowie STMN1) wurden zur anschliessenden Validierung mittels Western-Blot ausgewählt, wobei CTSD und RanBP1 auch hierbei statistisch signifikante Expressionsmuster zeigten. In den anschließenden immunhistochemischen Färbungen an Cytospins erwies sich CTSD als signifikant hochexprimiert sowohl im Vergleich von fetalen Osteoblasten zum Osteosarkom (p=0,0061), als auch von fetalen Osteoblasten zu den pulmonalen Metastasen (p=0,0045). Abschliessend erfolgte eine Validierung an klinischem Material. Im laborintern hergestellten Tissue microarray (TMA) zeigte sich CTSD sowohl im Osteosarkom (p=0,0237), als auch in den pulmonalen Metastasen (p=0,0079) signifikant hochexprimiert im Vergleich zu ossärem Normalgewebe. Passend dazu fand sich auch im erworbenen TMA eine signifikant erhöhte Expression von CTSD im Vergleich von Normalgewebe zum Osteosarkom (p=0,0010) und weiteren malignen Knochentumoren, wie z.B. im Chondrosarkom, Myelom und Riesenzelltumoren. Zusammenfassend könnte CTSD somit als neuer Biomarker für das Osteosarkom und andere Knochentumore dienen und eröffnet Ansätze zur individualisierten Therapie.

#### 6 Aussicht

**Cathepsin D (CTSD)** zeigt interessante Zusammenhänge besonders im Hinblick auf den Knochenstoffwechsel und könnte sich unseren Untersuchungen zufolge als laborchemischer Parameter zur Frühdiagnose und Verlaufsbeobachtung des Osteosarkoms und weiterer Knochentumore eignen. Da sich die klinischen Untersuchungen dieser Arbeit bislang auf eine relativ kleine Fallzahl stützen, sollten diese Ergebnisse zum Anlass genommen werden, weiterführende klinische Untersuchungen mit größeren Fallzahlen zu generieren.

Es bleibt darüber hinaus zu untersuchen, ob gezielte Medikamente wie zum Beispiel monoklonale Antikörper (Tremelimumab) das Fortschreiten und die Prognose des Osteosarkoms beeinflussen könnten.

**RanBP1** beeinflusst die im Zusammenhang von neoplastischen Stoffwechselvorgängen vielmals untersuchte GTPase Ran und zeigt auch in seinem Einfluss auf die Chemosensibilität des Osteosarkoms interessante Zusammenhänge. Eine zellzyklusabhängige Überprüfung der immunhistochemischen Ergebnisse in geeignetem Kontrollmaterial inklusive fetaler Osteoblasten erscheint daher sinnvoll.

Da es sich bei CTSD und RanBP1 um eine Erstbeschreibungen im Zusammenhang mit dem Tumorprogress des Osteosarkom handelt, bleibt eine weiterführende Verifizierung der vorliegenden Ergebnisse an einem größeren Probenkollektiv (beispielsweise auch im Rahmen klinischer Studien) im Hinblick auf die klinischen Relevanz zu ergründen.

### 7 Literaturverzeichnis

- Abbott DE, Margaryan NV, Jeruss JS, Khan S, Kaklamani V, Winchester DJ, Hansen N, Rademaker A, Khalkhali-Ellis Z, Hendrix MJC (2010): Reevaluating cathepsin D as a biomarker for breast cancer: serum activity levels versus histopathology. Cancer Biology and Therapy 9, 23–30
- 2 Alaiya A, Al-Mohanna M, Linder S (2005): Clinical Cancer Proteomics: Promises and Pitfalls. Journal of Proteome Research 4, 1213-1222
- Alaiya A, Roblick UJ, Egevad L, Carlsson A, Franzén B, Volz D, Huvendieck
   S, Linder S, Auer G (2000): Polypeptide expression in prostate hyperplasia and prostate adenocarcinoma. Analytical Cell Pathology 21, 1-9
- 4 Alaiya A, Roblick UJ, Franzén B, Bruch HP, Auer G (2003): Protein patterns in human lung, breast, bladder, renal, colorectal and ovarian cancers – Cancer Proteomics updates. Journal of Chromatography. B, Analytical technologies in the Biomedical and Life Sciences 787, 207-222
- 5 Allgayer H, Babic R, Grützner KU, Beyer BC, Tarabichi A, Wilhelm Schildberg F, Heiss MM (1997): An immunohistochemical assessment of cathepsin D in gastric carcinoma: its impact on clinical prognosis. Cancer 80, 179– 187
- 6 Anderson NG, Anderson NL (1978): Analytical techniques for cell fractions. Two-dimensional analysis of serum and tissue proteins: multiple isoelectric focussing. Analytical Biochemistry 85, 331-354
- 7 Arndt CA, Crist WM (1999): Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. The New England Journal of Medicine 341, 342-352
- 8 AWMF Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (2010): Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie: Osteosarkome, AWMF Registriernummer: 025/005, http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/025-005.html (Tag des Zugriffs 30.12.2011)
- 9 Bair WB 3rd, Cabello CM, Uchida K, Bause AS, Wondrak GT (2010): GLO1 overexpression in human malignant melanoma. Melanoma Research 20, 85-96
- 10 Baldwin ET, Bhat TN, Gulnik S, Hosur MV, Sowder RC 2nd, Cachau RE, Collins J, Silva AM, Erickson JW (1993): Crystal structures of native and

inhibited forms of human cathepsin D: implications for lysosomal targeting and drug design. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 6796-6800

- 11 Barret AJ (1977): Proteinase. In: Barret J (Hrsg.): Proteinases in Mammalian Cells and Tissues. 2. Aufl., 209-248, North Holland, New York, Amsterdam
- 12 Bartenjev I, Rudolf Z, Stabuc B, Vrhovec I, Perkovic T, Kansky A (2000): Cathepsin D expression in early cutaneous malignant melanoma. International Journal of Dermatology 39, 599–602
- 13 Barthell E, Mylonas I, Shabani N, Kunze S, Kuhn C, Jeschke U, Friese K (2007): Immunohistochemical visualisation of cathepsin-D expression in breast cancer. Anticancer Research, 27, 2035–2039
- 14 Battistoni A, Guarguaglini G, Degrassi F, Pittoggi C, Palena A, Di Matteo G, Pisano C, Cundari E, Lavia P (1997): Deregulated expression of the RanBP1 gene alters cell cycle progression in murine fibroblasts. Journal of Cell Science 110, 2345-2357
- 15 Bender K, Grzeschik KH (1976): Assignment of the genes for human glyoxalase I to chromosome 6 and for human esterase D to chromosome 13. Cytogenetics and Cell Genetics 16, 93-96
- Berchem G, Glondu M, Gleizes M, Brouillet JP, Vignon F, Garcia M, Liaudet-Coopmann E (2002): Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis. Oncogene 21, 5951–5955
- 17 Bhattacharyya S, Byrum S, Siegel ER, Suva LJ (2007): Proteomic analysis of bone cancer: a review of current and future developments. Expert Review in Proteomics 4, 371-378
- 18 Bielack S, Kempf-Bielack B, Delling G, et al. (2002): Prognostic factors in highgrade osteosarcoma of the extremities or trunk. An analysis of 1702 patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. Journal of Clinical Oncology 20, 776-790
- Bielack S, Zoubek A, Kotz R (2006): Osteosarkom. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (Hrsg.): Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie. 4.Aufl., 5157-5191, Springer, Berlin Heidelberg
- 20 Bielack SS, Machatschek JN, Flege S, Jürgens H (2004): Delaying surgery with chemotherapy for osteosarcoma of the extremities. Expert Opinion on Pharmacotherapy 5, 1243-56

- 21 Birch JM, Alston RD, McNally RJ (2001): Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. Oncogene 20, 4621-4628
- 22 Bischoff FR, Krebber H, Smirnova E, Dong W, Ponstingl H (1995): Coactivation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. The EMBO Journal 14, 705-715
- 23 Blank CU, Enk A (2015): Therapeutic use of anti-CTLA-4 antibodies. International Immunology 27, 3-10
- 24 Bloem JL, Taminiau AHM, Eulderink F et al (1988): Radiologic staging of primary bone sarcoma: MR imaging, scintigraphy, angiography and CT correlated with pathologic examination. Radiology 169, 805-810
- 25 Böcker W, Denk H, Heitze P (2004): Pathologie. 3.Auflage, 1046-1050, Urban&Fischer, Elsevier München
- 26 Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method fort the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254
- 27 Bröker LE, Kruyt FA, Giaccone G (2005): Cell death independent of caspases: a review. Clinical Cancer Research 11, 3155–3162
- 28 Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B (1998): Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. Science 282, 1497-1501
- 29 Burnette WN (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Analytical Biochemistry 112, 195-203
- **30** Byrum S, Montgomery CO, Nicholas RW, Suva LJ (2010): The promise of bone cancer proteomics. Annals of the New York Academy of Sciences 1192, 222-229
- **31** Caelles C, Helmberg A, Karin M (1994): p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. Nature 370, 220-223
- 32 Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, Chen RO, Brownstein BH, Cobb JP, Tschoeke SK, Miller-Graziano C, Moldawer LL, Mindrinos MN, Davis RW, Tompkins RG, Lowry SF (2005): A network based analysis of systemic inflammation in humans. Nature 437, 1032-1037

- 33 Celis JE, Bravo R, Larsen PM, Fey SJ (1984): Cyclin: a nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. Leukemia research 8, 143-157
- 34 Chen PL, Chen Y, Bookstein R, Lee WH (1990): Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. Science 250, 1576-1580
- 35 Chi NC, Adam EJ, Visser GD, Adam SA (1996): RanBP1 stabilizes the interaction of Ran with p97 nuclear protein import. Journal of Cell Biology 135, 559-569
- 36 Coutavas E, Ren M, Oppenheim JD, D'Eustachio P, Rush MG (1993): Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4. Nature 366, 585-587
- 37 Dai X, Ma W, He X, Jha RK (2011): Review of therapeutic strategies for osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma. Medical Science Monitor, 17, 177-190
- 38 Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Hauel N, Kauffmann I, Priepke H, Niestroj C, Daiber C, Enenkel B, Guilliard B, Lauritsch I, Muller E, Pascolo E, Sauter G, Pantic M, Martens UM, Wenz C, Lingner J, Kraut N, Rettig WJ, Schnapp A (2001): A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. The EMBO Journal 20, 6958-6968
- **39 Davies AM (1998):** Bildgebung beim primären Osteosarkom. Radiologe 38, 492-501
- **40 Davis AM, Bell RS, Goodwin PJ (1994):** Prognostic factors in osteosarcoma: A critical review. Journal of Clinical Oncology 12, 423-431
- Di Fiore B, Ciciarello M, Mangiacasale R, Palena A, Tassin AM, Cundari E, Lavia P (2003): Mammalian RanBP1 regulates centrosome cohesion during mitosis. Journal of cell science 116, 3399-3411
- 42 Doherty KJ, McKay C, Chan KK, El-Tanani MK (2011): RAN GTPase as a Target for Cancer Therapy: Ran Binding Proteins.\_Current Molecular Medicine 11, 686-695
- **43 Doran JF, Jackson P, Kynoch P, Thompson RJ (1983):** Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high resolution two-dimensional electrophoresis. Journal of Neurochemistry 40, 1542-1547
- 44 dos Santos Silva I, Swerdlow AJ (1993): Sex differences in the risk of hormonedependent cancers. American Journal of Epidemiology 138, 10-28

- 45 Eckel-Passow JE, Lohse CM, Sheinin Y, Crispen PL, Krco C, Kwon ED (2010): Tissue microarrays: one size does not fit all. Diagnostic Pathology 5, 1-10
- **46** Edwards YH, Fox MF, Povey S, Hinks LJ, Thompson RJ, Day IN (1991): The gene for human neurone specific ubiquitin C-terminal hydrolase (UCHL1, PGP9.5) maps to chromosome 4p14. Annals of Human Genetics 55, 273-8
- 47 Egberts F, Heinrich M, Jensen JM, Winoto-Morbach S, Pfeiffer S, Wickel M,
   Schunck M, Steude J, Saftig P, Proksch E, Schutze S (2004): Cathepsin D is
   involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation.
   Journal of Cell Science 117, 2295–2307
- **48 European Musculo-Skeletal-Oncology-Society (EMSOS) (1990)**: Aufruf der Europäischen Gesellschaft für muskuloskeletale Tumoren (EMSOS) an die Chirurgen, Orthopäden and Praktiker: Zentralisierung von Diagnose und Therapie maligner Knochen- and Weichteiltumoren. Deutsches Ärzteblatt 87, 224-225
- **49** Fang Y, Fu D, Shen XZ (2010): The potential role of ubiquitin c-terminal hydrolases in oncogenesis. Biochimica et Biophysica Acta 1806, 1-6
- 50 Faust PL, Kornfeld S, Chirgwin JM (1985): Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82, 4910-4914
- Ferrari AC, Seuanez HN, Hanash SM, Atweh GF (1990): A gene that encodes for a leukemia-associated phosphoprotein (p18) maps to chromosome bands 1p35-36.1. Genes, Chromosomes & Cancer 2, 125-129
- 52 Ficenec D, Osborne M, Pradines J, Richards D, Felciano R, Cho RJ, Liefeld T, Owen J, Ruttenberg A, Reich C, Horvath J, Clark T (2003): Computational knowledge integration in biopharmaceutical research. Briefings in Bioinformatics 4, 260-278
- Fletcher CDM (2002): Osteogenic Sarcomas. In: Fletcher CDM, Unni K, Mertens K (Hrsg.): WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. 2.Aufl., 259-284, IARC Press, Lyon
- Foekens JA, Look MP, Bolt-De Vries J, Meijer-Van Gelder ME, Van Putten WLJ, Klijn JGM (1999): Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. British Journal of Cancer 79, 300–307
- 55 Folio C, Mora MI, Zalacain M, Corrales FJ, Segura V, Sierrasesumaga L, Toledo G, San-Julian M, Patino-Garcia A (2009): Proteomic Analysis of

Chemonaive Pediatric Osteosarcomas and corresponding normal bone reveal multiple altered molecular targets. Journal of Proteome Research 8, 3882-88

- 56 Folio C, Zalacain M, Zandueta C, Ormazabal C, Sierrasesumaga L, Julian MS, de Las Rivas J, Toledo G, Lecanda F, Patino-Garcia A (2011): Cortactin (CTTN) overexpression in osteosarcoma correlates with advanced stage and reduced survival. Cancer Biomarkers 10, 35-41
- 57 Franzen B, Linder S, Okuzawa K, Kato H, Auer G (1993): Nonenzymatic extraction of cells from clinical tumor material for analysis of gene expression by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis 14, 1045-1053
- **58** Franzius C, Sciuk J, Daldrup-Link HE, Jürgens H, Schober O (2000): FDG-PET for detection of osseus metastases from malignant primary bone tumours: comparison with bone scintigraphy. European Journal of Nuclear Medicine 27, 1305-1311
- 59 Fritz P (1992): Quantitative Immunohistochemistry: Theoretical Background and its Application in Biology and Surgical Pathology. In: Fritz P, Tuczek HV, Multhaupt H, Hoenes J, Lutz D, Doerrer R, Schwarzman P, (Hrsg.): Progress in Histochemistry and Cytochemistry. 24. Aufl., 1-53, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- 60 Fromont G, Godet J, Peyret A, Irani J, Celhay O, Rozet F, Cathelineau X, Cussenot O (2013): 8q24 amplification is associated with Myc expression and prostate cancer progression and is an independent predictor of recurrence after radical prostatectomy. Human Pathology 44, 1617-1623
- 61 Fuchs B, Pritchard DJ (2002): Etiology of osteosarcoma. Clinical Orthopaedics & Related Research 397, 40-52
- 62 Garcia M, Derocq D, Pujol P, Rochefort H (1990): Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency. Oncogene 5, 1809-1814
- 63 Gavet O, Ozon S, Manceau V, Lawler S, Curmi P, Sobel A (1998): The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. Journal of Cell Science 111, 3333-3346
- 64 Gemoll T, Habermann J (2009): Protein-Profiling diploider und aneuploider kolorektaler Karzinome am Zelllinien-Modell. Masterarbeit im Rahmen des Masterstudiengangs Molecular Life Science der Universität zu Lübeck, 1-96

- 65 Gemoll T, Roblick UJ, Szymczak S, Braunschweig T, Becker S, Igl BW, Bruch HP, Ziegler A, Hellman U, Difilippantonio MJ, Ried T, Jörnvall H, Auer G, Habermann JK (2011): HDAC2 and TXNL1 distinguish aneuploid from diploid colorectal cancers. Cellular and Molecular Life Sciences 68, 3261-3274
- Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai BS, Mische SM (1999):
   Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide
   gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. Electrophoresis,
   20, 601-605
- Gillespy T, Manfrini M, Ruggieri P, Spanier SS, Petterson H, Springfield DS (1988): Staging of intraosseus extent of osteosarcoma: correlation of preoperative CT and MR imaging with pathologic macroslides. Radiology 167, 765-768
- **68 Giltnane JM, Rimm DL (2004):** Technology Insight: Identification of Biomarkers with tissue microarry technology. Nature Clinical Practice. Oncology 2, 104-111
- 69 Gong B, Cao Z, Zheng P, Vitolo OV, Liu S, Staniszewski A, Moolman D, Zhang H, Shelanski M, Arancio O (2006): Ubiquitin hydrolase Uch-L1 rescues beta-amyloid-induced decreases in synaptic function and contextual memory. Cell 126, 775-788
- 70 Görg A (1991): Two-dimensional electrophoresis. Nature 349, 545-546
- 71 Görg A, Postel W, Gunther S (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH-gradients. Electrophoresis 9, 531-546
- 72 Görg A, Postel W, Weser J, Günther S, Strahler JR, Hanash SM, Somerlot L (1987): Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodacetamid to the equilibration buffer. Electrophoresis 8, 122-124
- 73 Greene FL (2002): AJCC Cancer Staging Handbook from the AJCC Cancer Staging Manual. In: Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG (Hrsg.). 6.Auflage. Springer Verlag, New York
- 74 Guesdon JL, Ternyck T, Avrameas S (1979): The Use of Avidin-Biotin Interaction in Immunoenzymatic Techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1131-1139
- 75 Guo QC, Shen JN, Jin S, Wang J, Huang G, Zhang LJ, Yin JQ, Zou CY, Li MT (2007): Comparative proteomic analysis of human osteosarcoma and SV40immortalized normal osteoblastic cell lines. Acta Pharmacolica Sinica 28, 850-858
- 76 Gygi SP, Aebersold R (2000): Mass spectrometry and proteomics. Current Opinion in Chemical Biology 4, 489-494

- 77 Hann SR, King MW, Bentley DL, Anderson CW, Eisenman RN (1988): A non-AUG translational inititation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. Cell 52, 185-195
- 78 Hasilik A, von Figura K, Grzeschik KH (1982): Assignment of a gene for human cathepsin D to chromosome 11. Cytogenetic Cell Genetic 32, 284-289
- 79 Hausmann M, Obermeier F, Schreiter K, Spottl T, Falk W, Scholmerich J, Herfarth H, Saftig P, Rogler G (2004): Cathepsin D is up-regulated in inflammatory bowel disease macrophages. Clininal and Experimental Immunology 136, 157–167
- 80 Hawkins DS, Arndt CA (2003): Pattern of disease recurrence and prognostic factors in patients with osteosarcoma treated with contemporary chemotherapy. Cancer 98, 2447-2456
- 81 Hawkins MM, Wilsom LM, Burton HS, Potok MH, Winter DL, Marsden HB, Stovall MA (1996): Radiotherapy, alkylating agents, and risk of bone cancer after childhood cancer. Journal of the National Cancer Institute 88, 270-278
- Haynes PA, Yates JR 3rd (2000): Proteome profiling-pitfalls and progress. Yeast 17, 81-87
- Henry I, Puech A, Antignac C, Couillin P, Jeanpierre M, Ahnine L, Barichard F, Boehm T, Augereau P, Scrable H, Rabbitts T. H., Rochefort H, Cavenee W, Junien C. (1989): Subregional mapping of BWS, CTSD, MYOD1, and a T-ALL breakpoint in 11p15. Cytogenetic Cell Genetic 51, 1013-1019
- 84 Hibi K, Westra WH, Borges M, Goodman S, Sidransky D, Jen J (1999):
   PGP9.5 as a candidate tumor marker for non-small-cell lung cancer. The Amercian Journal of Pathology 155, 711-715
- 85 Hogeboom WR, Hoenstra HJ, Mooyart EL, Freling NJ, Veth RP, Postma A, Schraffordt Kopps H (1992): MRI or CT in the preoperative diagnosis of bone tumor. European Journal of Surgical Oncology 18, 67-72
- **86** Horst M, Hasilik A (1991): Expression and maturation of human cathepsin D in baby-hamster kidney cells. The Biochemical Journal 273, 355-361
- 87 Hsieh SY, Huang SF, Yu MC, Yeh TS, Chen TC, Lin YJ, Chang CJ, Sung CM, Lee YL, Hsu CY (2010): Stathmin1 overexpression associated with polyploidy, tumor-cell invasion, early recurrence, and poor prognosis in human hepatoma. Molecular Carcinogenesis 49, 476-487

- **88** http://www.ca.expasy.org/sprot (Tag des Zugriffs: 17.04.2013)
- **89** http://www.lgcstandards-atcc.org (Tag des Zugriffs: 14.03.2015)
- **90 Husmann K, Muff R, Bolander M, Sarkar G, Born W, Fuchs B (2008):** Cathepsins and Osteosarcoma: Expression Analysis Identifies Cathepsin K as an Indicator of Metastasis. Molecular Carcinogenesis 47, 66-73
- **91 Iavarone A, Matthay KK, Steinkirchner TM, Israel MA (1992):** Germ-line and somatic p53 mutations in multifocal osteogenic sarcoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1, 4207-4209
- 92 Jacobson-Raber G, Lazarev I, Novack V, Mermershtein W, Baumfeld Y, Geffen DB, Sionvardy N, Ariad S (2011): The prognostic importance of cathepsin D and E-cadherin in early breast cancer: a single-institution experience. Oncology Letters 2, 1183–1190
- 93 Kaatsch P, Spix C, Michaelis M (2000): Jahresbericht 1999. Deutsches Kinderkrebsregister. Mainz, Johannes-Gutenberg-Universität, Institut für Medizinische Statistik und Information
- 94 Kager L, Zoubek A, Pöttschger U, Kastner U, Flege S, Kempf-Bielack B, Branscheid D, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Winkelmann W, Jundt G, Kabisch H, Reichardt P, Jürgens H, Gadner H, Bielack SS (2003): Primary metastatic osteosarcoma: presentation and treatment of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. Journal of Clinical Oncology, 2011-2018
- **95 Kalbitzer HR, Petrides PE (2007)**: Proteine. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg.): Biochemie und Pathobiochemie. 8. Aufl., 56-98, Springer, Heidelberg
- **96 Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G (2001):** Tissue microarry technology for high-throughput molecular profiling of cancer. Human Molecular Genetics 10, 657-662
- 97 Kawatani M, Okumura H, Honda K, Kanoh N, Muroi M, Dohmae N, Takami M, Kitagawa M, Futamura Y, Imoto M, Osada H (2008): The identification of an osteoclastogenesis inhibitor through the inhibition of glyoxalase I. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 11691-11696
- 98 Kempf-Bielack B, Bielack S, Jürgens H, Branscheid D, Berdel WE, Exner GU, Göbel U, Helmke K, Jundt G, Kabisch H, Kevric M, Klingebiel T, Kotz R, Maas R, Schwarz R, Semik M, Treuner J, Zoubek A, Winkler K (2005):

Osteosarcoma relapse after combined modality therapy: An analysis of unselected patients in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS). Journal of Clinical Oncology 230, 559-568

- 99 Kirana C, Shi H, Laing E, Hood K, Miller R, Bethwaite P, Keating J, Jordan TW, Hayes M, Stubbs R (2012): Cathepsin D Expression in Colorectal Cancer: From Proteomic Discovery through Validation Using Western Blotting, Immunohistochemistry, and Tissue Microarrays. International Journal of Proteomics 2012, 1-10
- **100 Krepela E (2001):** Cysteine proteinases in tumor cell growth and apoptosis: minireview. Neoplasma 48, 332–349
- 101 Kumar R, Haugen JD (1994): Human and rat osteoblast-like cells express stathmin, a growth-regulatory protein. Biochemical and Biophysical Research Communications 15, 861-865
- 102 Kuttesch JF Jr, Wexler LH, Marcus RB, Fairclough D, Weaver-McClure L, White M, Mao L, Delaney TF, Pratt CB, Horowitz ME, Kun LE (1996): Second malignancies after Ewing's sarcoma: radiation dose-dependency of secondary sarcomas. Journal of clinical oncology 14, 2818-2825
- Leary SES, Wozniak AW, Billups CA, Wu J, McPherson V, Neel MD, Rao BN,
   Daw NC (2013): Survival of pediatric patients after relapsed osteosarcoma: St.
   Jude Children's Research Hospital experience. Cancer, 119, 2645-2653
- 104 Leiblich A, Cross SS, Catto JW, Pesce G, Hamdy FC, Rehman I (2007): Human prostate cancer cells express neuroendocrine cell markers PGP 9.5 and chromogranin A. Prostate 67, 1761-1769
- **105** Letson GD, Muro-Catcho CA (2001): Genetic and molecular abnormalities in tumors of the bone and soft tissues. Cancer Control 8, 239-251
- 106 Li Y, Liang Q, Wen YQ, Chen LL, Wang LT, Liu YL, Luo CQ, Liang HZ, Li MT, Li Z (2010): Comparative proteomics analysis of human osteosarcomas and benign tumor of bone. Cancer Genetics and Cytogenetics 198, 97-106
- 107 Liaudet-Coopman E, Beaujouin M, Derocq D, Garcia M, Glondu-Lassis M, Laurent-Matha V, Prebois C, Rochefort H, Vignon F (2006): Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. Cancer letters 237, 167-179

- 108 Link MP, Eilber F (1993): Osteosarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG (Hrsg.): Principles and Practice of Pediatric Oncology. 2.Aufl., 841-887, Lippincott Philadelphia
- 109 Liu SY, Song SX, Lin L, Liu X (2010): Molecular mechanism of cell apoptosis by paclitaxel and pirarubicin in a human osteosarcoma cell line. Chemotherapy 56, 101-107
- 110 Liu X, Zeng B, Ma J, Wan C (2009): Comparative Proteomic Analysis of Osteosarcoma Cell and Human Primary Cultured Osteoblastic Cell. Cancer Investigation 27, 345-352
- 111 Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr. (2002): The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. Cell 111, 209-218
- **112 Lohmann DR (1999):** RB1 gene mutations in retinoblastoma. Human Mutation 14, 283-288
- 113 Lösch A, Schindl M, Kohlberger P, Lahodny J, Breitenecker G, Horvat R, Birner P (2004): Cathepsin D in ovarian cancer: prognostic value and correlation with p53 expression and microvessel density. Gynecologic Oncology 92, 545–552
- 114 Maire G, Yoshimoto M, Chilton-MacNeill S, Zielenska M, Squire JA (2011): Analysis of miRNA-gene expression-genomic profiles reveals complex mechanisms of microRNA deregulation in osteosarcoma. Cancer Genetics 204, 138-146
- 115 Matheu A, Maraver A, Klatt P, Flores I, Garcia-Cao I, Borras C, Flores JM, Vina J, Blasco MA, Serrano M (2007): Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. Nature 448, 375-379
- Maynadier M, Farnoud R, Lamy PJ, Laurent-Matha V, Garcia M, Rochefort H (2013): Cathepsin D stimulates the activities of secreted plasminogen activators in the breast cancer acidic environment. International Journal of Oncology 43, 1683-1690
- 117 Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA (2009): Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer 115, 1531-1543
- Montenarh M (2007): Replikation und Gentechnik In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg.): Biochemie und Pathobiochemie. 8.Auflage., 286-324, Heidelberg

- 119 Morrison C, Radmacher M, Mohammed N, Suster D, Auer H, Jones S, Riggenbach J, Kelbick N, Bos G, Mayerson J (2005): MYC amplification and polysomy 8 in chondrosarcoma: array comparative genomic hybridization, fluorescent in situ hybridization, and association with outcome. Journal of Clinical Oncology 23, 9369-9376
- 120 Nomura T, Katunuma N (2005): Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. The Journal of Medical Investigations 52, 1–9
- 121 O'Farrell PH (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. The Journal of Biological Chemistry 250, 4007-4021
- 122 Okochi-Takada E, Nakazawa K, Wakabayashi M, Mori A, Ichimura S, Yasugi T, Ushijima T (2006): Silencing of the UCHL1 gene in human colorectal and ovarian cancers. International Journal of Cancer 119, 1338-1344
- 123 Okuzawa K, Franzen B, Lindholm J, Linder S, Hirano T, Bergman T, Ebihara Y, Kato H, Auer G (1994): Characterization of Gene expression in clinical lung cancer materials by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis 15, 382-390
- 124 Ootsuka S, Asami S, Sasaki T, Yoshida Y, Nemoto N, Shichino H, Chin M, Mugishima H, Suzuki T (2008): Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma. Biological & Pharmaceutical Bulletin 31, 1071-1074
- 125 Orr KS, Shi Z, Brown WM, O'Hagan KA, Lappin TR, Maxwell P, Percy MJ (2011): Potential prognostic marker ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-L1 does not predict patient survival in non-small cell lung carcinoma. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 30, 79-85
- Otsuki T, Yata K, Takata-Tomokuni A, Hyodoh F, Miura Y, Sakaguchi H, Hatayama T, Hatada S, Tsujioka T, Sato Y, Murakami H, Sadahira Y,
   Sugihara T (2004): Expression of protein gene product 9.5 (PGP9.5) / Ubiquitin-C- terminal hydrolase 1 (UCHL-1) in human myeloma cells. British Journal of Haematology 127, 292-298
- 127 Ozaki T, Flege S, Kevric M, Lindner N, Maas R, Delling G, Schwarz R, von Hochstetter AR, Salzer-Kuntschik M, Berdel WE, Jürgens H, Exner GU, Reichardt P, Mayer-Steinacker R, Ewerbeck V, Kotz R, Winkelmann W,

**Bielack SS. (2003):** Osteosarcoma of the pelvis: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS). Journal of Clinical Oncology 21, 334-341

- 128 Pruitt FL, He Y, Franco OE, Jiang M, Cates JM, Hayward SW (2013): Cathepsin D acts as an essential mediator to promote malignancy of benign prostatic epithelium. The Prostate 73, 476-488
- **129 Rabilloud T (2002):** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. Proteomics 2, 3-10
- **Rabilloud T (2009):** Membrane proteins and proteomics: love is possible, but so difficult. Electrophoresis 30, 174–80
- **131 Rabilloud T, Lelong C (2011):** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. Journal of Proteomics 74, 1829-1841
- **132** Ragland BD, Bell WC, Lopez RR, Siegal GP (2002): Cytogenetics and molecular biology of osteosarcoma. Laboratory Investigation 82, 365-373
- Ranganathan S, Ciaccio PJ, Walsh ES, Tew KD (1999): Genomic sequence of human glyoxalase-I: analysis of promoter activity and its regulation. Gene 15, 149-155
- **134** Ranganathan S, Walsh ES, Godwin AK, Tew KD (1993): Cloning and characterization of human colon glyoxalase-I. The Journal of Biological Chemistry 268, 5661-5667
- 135 Ren M, Coutavas E, D'Eustachio P, Rush MG (1994): Effects of mutant Ran/TC4 proteins on cell cycle progression. Molecular and Cellular Biology 14, 4216-4224
- Rensen WM, Mangiacasale R, Ciciarello M, Lavia P (2008): The GTPase Ran:
   regulation of cell life and potential roles in cell transformation. Frontiers of
   Bioscience 13, 4097–4121
- 137 Rensen WM, Rosciolo E, Tedeschi A, Mangiacasale R, Ciciarello M, Di Gioia SA, Lavia P (2009): RanBP1 downregulation sensitizes cancer cells to taxol in a caspase-3-dependent manner. Oncogene 16, 1748-58
- 138 Ribas A, Hanson DC, Noe DA, Millham R, Guyot DJ, Bernstein SH, Canniff PC, Sharma A, Gomez-Navarro J (2007): Tremelimumab (CP-675,206), a cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 blocking monoclonal antibody in clinical development for patients with cancer. Oncologist 12, 873-883
- 139 Riede U (2004): Osteosarkom. In: Riede U, Werner M, Schaefer H (Hrsg.):Allgemeine und spezielle Pathologie. 5.Auflage, 1154-1156, Thieme, Stuttgart

- Roblick UJ, Bader FG, Hammarstedt L, Habermann JK, Hellman U, Becker S, Sundmacker A, Gemoll T, Zimmermann K, Auer G, Munck-Wikland E (2008): Proteomic analysis of protein expression in human tonsillar cancer: differentially expressed proteins characterize human tonsillar cancer. Acta Oncologica 47, 1493-501
- Roblick UJ, Hirschberg D, Habermann JK, Palmberg C, Becker S, Krüger S, Gustafsson M, Bruch HP, Franzén B, Ried T, Bergmann T, Auer G, Jörnvall H (2004): Sequential proteome alterations during genesis and progression of colon cancer. Cellular and Molecular Life Science 61, 1246-55
- 142 Rosen G, Nirenberg A, Caparros B, Juergens H, Kosloff C, Mehta BM, Marcove RC, Huvos AG (1981): Osteogenic sarcoma: eight-percent, three-year, disease-free survival with combination chemotherapy (T-7). National Cancer Institute Monograph 56, 213-220
- Rosengren AT, Salmi JM, Aittokallio T, Westerholm J, Lahesmaa R, Nyman T, Nevalainen OS (2003): Comparison of PDQuest and Progenesis software packages in the analysis of two-dimensional electrophoresis gels. Proteomics 3, 1936-1946
- Saenger Y, Magidson J, Liaw B, de Moll E, Harcharik S, Fu Y, Wassmann K,
   Fisher D, Kirkwood J, Oh WK, Friedlander P (2014): Blood mRNA Expression
   Profiling Predicts Survival in Patients Treated with Tremelimumab. Clinical Cancer
   Research 20, 3310-3318
- 145 Saeter G (2003): ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of osteosarcoma. Annals of Oncology 14, 1167-1168
- 146 Said J, Lones M, Yea S (2014): Burkitt lymphoma and MYC: what else is new? Advances in Anatomic Pathology 3, 160-165
- 147 Sanders TG, Parsons TW III. (2001): Radiographic imaging of musculosceletal neoplasia. Cancer Control 8, 221-231
- 148 Santarius T, Bignell GR, Greenman CD, Widaa S, Chen L, Mahoney CL, Butler A, Edkins S, Waris S, Thornalley PJ, Futreal PA, Stratton MR (2010): GLO1-A novel amplified gene in human cancer. Genes, Chromosomes & Cancer 49, 711-725
- 149 Seo AN, Yang JM, Kim H, Jheon S, Kim K, Lee CT, Jin Y, Yun S, Chung JH, Paik JH (2014): Clinicopathologic and prognostic significance of c-MYC copy number gain in lung adenocarcinomas. British Journal of Cancer 110, 2688-2699

- **150** Setsuie R, Wada K (2007): The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. Neurochemistry International 51, 105-111
- 151 Shen D, Chang HR, Chen Z, He J, Lonsberry V, Elshimali Y, Chia D, Seligson D, Goodglick L, Nelson SF, Gornbein JA (2005): Loss of annexin A1 expression in human breast cancer detected by multiple high-throughput analyses. Biochemical and biophysical research communications 326, 218-227
- 152 Siintola E, Partanen S, Stromme P, Haapanen A, Haltia M, Maehlen J, Lehesjoki AE, Tyynelä J (2006): Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis. Brain 129, 1438-1445
- 153 Sobel A (1991): Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction? Trends in Biochemical Sciences 16, 301-305
- 154 Sobel A, Boutterin MC, Beretta L, Chneiweiss H, Doye V, Peyro-Saint-Paul, H (1989): Intracellular substrates for extracellular signaling: characterization of a ubiquitous, neuron-enriched phosphoprotein (stathmin). Journal of Biological Chemistry 264, 3765-3772
- Sobin LH (2011): Bone and Soft Tissue Tumours. In: Sobin LH, Gospodarowicz M, Wittekind C (Hrsg.): UICC TNM Classification of Malignant Tumors. 7. Auflage, Wiley-Blackwell, New York
- 156 Spreafico A, Frediani B, Capperucci C, Chellini F, Paffetti A, D'Ambrosio C, Bernardini G, Mini R, Collodel G, Scaloni A, Marcolongo R, Santucci A (2006): A proteomic study on human osteoblastic cells proliferation and differentiation. Proteomics 6, 3520-3532
- 157 Steinfeld R, Reinhardt K, Schreiber K, Hillebrand M, Kraetzner R, Bruck W, Saftig P, Gartner J (2006): Cathepsin D deficiency is associated with a human neurodegenerative disorder. American Journal of Human Genetics 78, 988-998
- 158 Stiller C (2002): Epidemiology of cancer in adolescents. Medical and Pediatric Oncology 39, 149-155
- **159** Stiller CA, Craft AW, Corazziari I, EUROCARE Working Group (2001): Survival of children with bone sarcoma in Europe since 1978: results from EUROCARE study. European Journal of Cancer 37, 760-766
- 160 Suong DN, Thao DT, Masamitsu Y, Thuoc TL (2014): Ubiquitin carboxyl hydrolase L1 significance for human diseases. Protein and Peptide Letters 21, 624-630
- 161 Tedeschi A, Ciciarello M, Mangiacasale R, Roscioli E, Rensen WM, Lavia P.

(2007): RANBP1 localizes a subset of mitotic regulatory factors on spindle microtubules and regulates chromosome segregation in human cells. Journal of Cell Science 120, 3748-61

- 162 Terunuma A, Putluri N, Mishra P, Mathé EA, Dorsey TH, Yi M, Wallace TA, Issaq HJ, Zhou M, Killian JK, Stevenson HS, Karoly ED, Chan K, Samanta S, Prieto D, Hsu TY, Kurley SJ, Putluri V, Sonavane R, Edelman DC, Wulff J, Starks AM, Yang Y, Kittles RA, Yfantis HG, Lee DH, Ioffe OB, Schiff R, Stephens RM, Meltzer PS, Veenstra TD, Westbrook TF, Sreekumar A, Ambs S (2014): MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. The Journal of Clinical Investigation 124, 398-412
- **163** Tezel E, Hibi K, Nagasaka T, Nakao A (2000): PGP9.5 as a prognostic factor in pancreatic cancer. Clinical Cancer Research 6, 4764-4767
- 164 Thornalley PJ (1995): Advances in glyoxalase research. Glyoxalase expression in malignancy, anti- proliferative effects of methylglyoxal, glyoxalase I inhibitor diesters and S-D-lactoylglutathione, and methylglyoxal-modified protein binding and endocytosis by the advanced glycation endproduct receptor. Critical Reviews in Oncology/Hematology 20, 99–128
- 165 Tokumaru Y, Yamashita K, Kim MS, Park HL, Osada M, Mori M, Sidransky D (2008): The role of PGP9.5 as a tumor suppressor gene in human cancer. International Journal of Cancer 123, 753-759
- 166 Toon CW, Chou A, Clarkson A, DeSilva K, Houang M, Chan JC, Sioson LL, Jankova L, Gill AJ (2014): Immunohistochemistry for myc predicts survival in colorectal cancer. PLoS One 9, 1-7
- 167 Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76, 4350-4354
- 168 Tucker MA, D'Angio GJ, Boice JD Jr, Strong LC, Li FP, Stovall M, Stone BJ (1987): Bone sarcomas linked to radiotherapy and chemotherapy in children. New England Journal of Medicine 317, 588-593
- 169 Tyynelä J, Sohar I, Sleat DE, Gin RM, Donnelly RJ, Baumann M, Haltia M, Lobel PA (2000): A Mutation in the ovine cathepsin D gene causes a congenital lysosomal storage disease with profound neurodegeneration. EMBO Journal 19, 2786-2792

- 170 Unni KK (1988): Osteosarcoma of Bone. In: Unni KK (Hrsg.): Bone tumors. 1.Aufl., 107-133, Churchill Livingsstone, New York
- 171 Vigneswaran N, Zhao W, Dassanayake A, Muller S, Miller DM, Zacharias W
   (2000): Variable expression of cathepsin B and D correlates with highly invasive and metastatic phenotype of oral cancer. Human pathology 31, 931-937
- 172 Vivanco F, Martin-Ventura JL, Duran MC, Barderas MG, Blanco- Colio L, Darde VM, Mas S, Meilhac O, Michel JB, Tunon J, Egido J (2005): Quest for novel cardiovascular biomarkers by proteomic analysis. Journal of Proteome Research 4, 1181–1191
- Wang LL, Levy ML, Lewis RA, Chintagumpala MM, Lev D, Rogers M, Plon SE (2001): Clinical manifestation in a cohort of 41 Rothmund-Thomson syndrome patients. American Journal of Medical Genetics 102, 11-17
- 174 Wei SH, Lin F, Wang X, Gao P, Zhang HZ (2008): Prognostic significance of stathmin expression in correlation with metastasis and clinicopathological characteristics in human ovarian carcinoma. Acta Histochemica 110, 59-65
- 175 Wilkins MR, Gasteiger E, Gooley AA, Herbert BR, Molloy MP, Binz PA, Ou K, Sanchez JC, Bairoch A, Williams KL, Hochstrasser DF (1999): High-throughput mass spectrometric discovery of protein post-translational modifications. Journal of Molecular Biology 289, 645-657
- Wilkinson KD, Lee KM, Deshpande S, Duerksen-Hughes P, Boss JM, Pohl J (1989): The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. Science 246, 670-672
- 177 Wittmann-Liebold B, Graack HR, Pohl T (2006): Two dimensional gel electrophoresis as a tool for proteomic studies in combination with protein identification by mass spectrometry. Proteomics 6, 4688-4703
- 178 Xu SG, Yan PJ, Shao ZM (2010): Differential proteomic analysis of a highly metastatic variant of human breast cancer cells using two-dimensional differential gel electrophoresis. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 136, 1545-1556
- **179** Yang J, Zhang W (2013): New molecular insights into osteosarcoma targeted therapy. Current Opinion in Oncology 25, 398-406
- 180 Zeillinger R, Swoboda H, Machacek E, Nekahm D, Sliutz G, Knogler W, Speiser P, Swoboda E, Kubista E (1992): Expression of cathepsin D in head and neck cancer. European Journal of Cancer 28, 1413-1415

- 181 Zheng P, Liu YX, Chen L, Liu XH, Xiao ZQ, Li gQ, Zhou J, Ding YQ, Li JM (2010): Stathmin, a new target of PRL-3 identified by proteomic methods, plays a key role in progression and metastasis of colorectal cancer. Journal of Proteome Research 9, 4897-4899
- 182 Zhou M, Wang J, Ouyang J, Xu JY, Chen B, Zhang QG, Zhou RF, Yang YG, Shao XY, Xu Y, Chen YM, Fan XS, Wu HY (2014): MYC protein expression is associated with poor prognosis in diffuse large B cell lymphoma patients treated with RCHOP chemotherapy. Tumour Biology, 35, 6757-6762

# 8 Abbildungsverzeichnis

Abb.1.:	Prinzip der zweidimensionalen Gelelektrophorese (Modifiziert	28
	nach Kalbitzer und Petrides, 2007)	
Abb.2.:	Prinzip der MALDI-Massenspektrometrie (aus Kalbitzer und	38
	Petrides, 2007)	
Abb.3.:	Graphische Zusammenfassung der Methodik	47
Abb.4.:	Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Expressionsdaten	49
Abb.5.:	17 signifikante Spots exemplarisch dargestellt in einem der 2-DE-	50
	Gele (7585A)	
Abb.6.:	Graphische Veranschaulichung der IPA-basierten Signalweg-	55
	Analyse	
Abb.7.:	Western-Blot ausgewählter signifikanter Proteine	57
Abb.8.:	Boxplots der Western-Blot-Analyse von CTSD (links) und	58
	RanBP1 (rechts)	
Abb.9.:	Exemplarisches Cytospinpräparat gefärbt mit Anti-CTSD-	59
	Antikörper bei 100-facher Vergrößerung	
Abb.10.:	Boxplots der Cytospinpräparate gefärbt mit Anti-CTSD-	60
	Antikörper	
Abb.11.:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Knochentumor Tissue	61
	Microarray BO2081	
Abb.12.:	Boxplots der Immunopositivitätswerte (IP) von CTSD der	62
	unterschiedlichen Entitäten des erworbenen Tissue Microarrays	
Abb.13.:	Boxplots der Immunopositivitätswerte (IP) von CTSD des	63
	laborintern hergestellten Tissue Microarrays	
Abb.14:	Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse	64

## 9 Tabellenverzeichnis

Tab.1.:	Übersicht der WHO-Klassifikation der Osteosarkome	9
	(Nach Fletcher, 2002)	
Tab.2.:	TNM-Klassifikation der Knochentumoren	10
	(Nach Sobin, 2011; Greene, 2002)	
Tab.3.:	Einteilung der Erkrankungsstadien	11
	(Nach Sobin, 2011; Greene, 2002)	
Tab.4.:	Verwendete Chemikalien	13-15
Tab.5.:	Puffer und Lösungen für die Zellkultur	16
Tab.6.:	Äquilibrierlösungen	17
Tab.7.:	Puffer und Lösungen für die SDS-Page	18
Tab.8.:	Puffer und Lösungen für den Western-Blot	19
Tab.9.:	Stammlösungen für die Immunhistochemische Färbung	20
Tab.10.:	Übersicht der verwendeten Zelllinien	21
Tab.11.:	Antikörper für den Western-Blot und die Immunhistochemie	22
Tab.12.:	Patientendaten des erworbenen Tissue Microarrays (BO2081)	23
Tab.13.:	Patientendaten des laborintern hergestellten Tissue Microarrays	24
Tab.14.:	Materialien	25
Tab.15.:	Geräte	26
Tab.16.:	Protokoll der Silberfärbung der Polyacrylamidgele	31
Tab.17.:	Übersicht der wesentlichen Analyseschritte der PDQuest Software	33-34
Tab.18.:	Übersicht der wesentlichen Analyseschritte der SameSpot	36
	Software	
Tab.19.:	Massenspektrometrisch identifizierte Proteine der unterschiedlich	51
	exprimierten Proteinspots	
Tab.20a.:	Proteinidentitäten und Expressionsmuster	52-53
Tab.20b.:	Proteinidentitäten und Expressionsmuster (Fortsetzung Tabelle	99-105
	21a)	

# 10 Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumen/Volumen
$(\mathbf{w}/\mathbf{v})$	Gewicht/Volumen
°C	Grad Coloins
2-DE	
2-DE-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BHT	2,6-Di-butyl-4-methylphenol
ca.	cirka
CBBG	Coomassie Brilliant Blue G 250
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio-1-propansulfat
dest	destilliert
dim	Dimension
	Dimension Deservite and (Deservite and line ärme)
DNA	Deoxyribonucieic acid (Desoxyribonukieinsaure)
DNAse I	Desoxyribonuklease I
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälber-Serum
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IP IP	Immunonositivitätswert
	immobilized nH gradient (immobilisierter nH Gradient)
	Kite Delter
kDa KTT	Kilo-Dalton
KII	Kaliumtetrathionat
m	Mıllı
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
n	Nano
NP-40	Nomidet P40
Nr	Nummer
DRS	Phoenhata huffered saling
	Principal Component Analysis (Haunthemponentanonalyse)
PCA	Principal Component Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PDA	Piperazindiacrylamid
pH	pH-Wert
pl	Isoelektrischer Punkt
PIH	Proteaseinhibitoren
PMSF	Phenylmethylsulfonylsulfat
RNAse A	Ribonuklease A
rpm	rounds per minute
<b>R</b> T	Raumtemperatur
S	Sekunden
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Tab	Tabelle
TEMED	Tatramathylathylandiamin
	Trie(hardreamenthal) amin an ath an
1 K15	i iis(iiyaroxymetnyi)-aminometnan
u.a.	unter anderem
V	Volt
WW	Nassgewicht
μ	Mikro

## 11 Anhang

Tab. 21b: Proteinidentitäten und Expressionsmuster (Fortsetzung Tabelle 21a)

SameSpot #	Proteinidentität (Gensymbol)	Exemplarische Spotbilder (SameSpot)	Expressionsmuster der 2-DE-Analyse:
817	Pre-mRNA-splicing factor SPF27 (BCAS2)	Fetaler Osteoblast     Osteosarkom     Pulmonale Metastase	Build State         State         State         State         State         Putranele         Metastasen
850	Ubiquitin carboxyl- terminal Hydrolase (UCHL1)	Fetaler Osteoblast Osteosarkom Pulmonale Metastase	6,37(20,12) 5,32(20,13) 5,02(20,25) Fite: Otenbistin Colorationuclin Definition Defi

 Tab. 21b: Proteinidentitäten und Expressionsmuster (Fortsetzung Tabelle 21a)

SameSpot #	Proteinidentität (Gensymbol)	Exemplarische Spotbilder (SameSpot)	Expressionsmuster der 2-DE-Analyse:
860	Putative high mobility group protein 1-like (LOC1001305)	Fetaler Osteoblast Osteosarkom Pulmonale Metastase	0         6,54(±5,88+.002)           6,54(±5,88+.002)         6,54(±5,88+.002)           Fistale Odmobiotem         Odmocarkonuckin
1072	Heat shock protein beta-6 (HSPB6)	Fetaler Osteoblast     Osteosarkom     Pulmonale Metastase	6,51(±0,12) 6,51(±0,12) Fitale Oduskieten Oduskieten Pairwale Metazzen

Tab. 21b: Proteinidentitäten und Expressionsmuster (Fortsetzung Tabelle 21a)

SameSpot #	Proteinidentität (Gensymbol)	Exemplarische Spotbilder (SameSpot)	Expressionsmuster der 2-DE-Analyse:
1255	Histone H4 (HIST2H4A)	Fetaler Osteoblast Osteosarkom Pulmonale Metastase	aurono         5,39(10,1)           5,18(10,15)         6,15(10,17)           Friske Ostenskaten         Ostensarkamusten
1509	Heat shock protein beta-1 (HSPB1)	Fetaler Osteoblast     Osteosarkom     Pulmonale Metastase	90000         6,47(±5,45±-002)           6,42(±5,32e-002)         6,11(±0,2)           Friele Otenblacten         Otenserkemuziken         Pulmanie Metestasen

Tab. 21b: Proteinidentitäten und Expressionsmuster (Fortsetzung Tabelle 21a)

SameSpot #	Proteinidentität (Gensymbol)	Exemplarische Spotbilder (SameSpot)	Expressionsmuster der 2-DE-Analyse:
1511	Cathepsin A (CTSA)	Fetaler Osteoblast     Osteosarkom     Pulmonale Metasta	Se Fridae Ostoskietom Ostosseriomuzikm Paimanake Meteoteom
1515	Selenium-binding protein 1 (SELENBP1)	Fetaler Osteoblast Osteosarkom Pulmonale Metastas	aug         5,35(20,13)           5,21(±0,17)         5,09(±0,19)           Fiside Otstablectan         Ostanarkonuzdan

Tab. 21b: Proteinidentitäten und Expressionsmuster (Fortsetzung Tabelle 21a)

SameSpot #	Proteinidentität (Gensymbol)	Exemplarische Spotbilder	(SameSpot)	Expressionsmuster der 2-DE-Analyse:
1523	Predicted:similar to hCG1654128 (LOC100132713)	Fetaler Osteoblast Osteosarkom	Pulmonale Metastase	aurony para         5;84:40,12)           5;84:40,12)         6,05(±0,1)           5;85(±5,32e=002)         5;85(±5,32e=002)           Fortile Ostenbloten           Ostenzerkonuzilin           Painunde Metactacen
1524	RING finger protein 170 (RNF170)	Fetaler Osteoblast     Osteosarkom	Pulmonale Metastase	aurijo         6,27(±0,17)           6,27(±0,17)         6,27(±0,17)           51(±0,26)         0/tercertamuden

Tab. 21b: Proteinidentitäten und Expressionsmuster (Fortsetzung Tabelle 21a)

SameSpot #	Proteinidentität (Gensymbol)	Exemplarische Spotbilder (SameSpot)	Expressionsmuster der 2-DE-Analyse:
1619	Actin-related protein 2/3 complex subunit (ARPC3)	Fetaler Osteoblast     Osteosarkom     Pulmonale Metastase	0         6,59(±5,54e-002)         6,58(±5,02e-002)           6,39(±5,34e-002)         6,38(±5,02e-002)         6,38(±5,02e-002)           Fridae Ostenskiesten         Ostensorkanzellen         Painsnale Metastaan
1678	Keratin, type A (KRT10)	Fetaler Osteoblast Osteosarkom Pulmonale Metastase	autro         0,36(±4,30+.002)           b         6,11(±0,16)           c         6,00(±0,17)           Fiside Ostenblasten         Ostenovfanustion

Tab. 21b: Proteinidentitäten und Expressionsmuster (Fortsetzung Tabelle 21a)



### 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt und motiviert haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. med Jens K. Habermann, Leiter der Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie & Biomaterialbanken für die Ausgabe der Arbeit und die fachkundige Unterstützung, sowie meinem wissenschaftlichen Betreuer Dr. M. Sc. Timo Gemoll, für die geduldige, stets hilfreiche und zeitintensive Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. H.-P. Bruch, dem ehemaligen Direktor der Klinik für Chirurgie.

Ich danke Prof. Dr. med. Andreas Paech, Chefarzt der Sektion für Unfallchirurgie, für die stimulierende interdisziplinäre Zusammenarbeit und Unterstützung meines Projektes.

Darüberhinaus danke ich Prof. Ulf Hellmann vom Ludwig Cancer Institut in Uppsala, Schweden für die herzliche und geduldige Unterstützung beim Erlernen und Durchführen der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Ich danke überdies Dr. rer. nat. Sonja Hartwig und Dr. rer. nat. Christoph Lehr aus dem German Diabetes Center in Düsseldorf für die Unterstützung bei den massenspektrometrischen Untersuchungen.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Silke Szymczak aus dem Institut für medizinische Biometrie und Statistik der Universität Lübeck für die Erstellung der Statistik der PDQuest Daten und der Western Blots.

Ich danke Lisa Heinrich für die Erstellung der Cytospins und der Tissue Microarrays.

Ich danke Prof. Dr. med. Christoph Thorns aus dem Institut für Pathologie für die Unterstützung bei der Analyse der Tissue Microarrays.

Ich möchte mich zudem bei allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Labors bedanken, die mich bei meiner Forschung unterstützt haben, insbesondere bei Regina Kaatz und Sarah Matula, die das Arbeiten im Labor immer zu einer Freude gemacht haben.

Herzlicher Dank gilt auch der Ad Infinitum Foundation ohne deren finanzielle Unterstützung meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt zu guter Letzt meinem Vater PD Dr. med. Johannes Epping, meiner Mutter Dr. med. Dorothea Menges, meinem Bruder Paul, sowie meiner langjährigen Freundin Pia-Luisa Lenz, die mich während meines gesamten Studiums und darüber hinaus mit Vertrauen, Optimismus und Humor begleitet haben.



## 13 Lebenslauf

#### PERSÖNLICHE DATEN

EPPING
Franziska Halina
9. August 1985
Würzburg

#### AKADEMISCHER UND BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 2015	Assistenzärztin in der Klinik für Neurochirurgie, St. Gertrauden Krankenhaus, Berlin
2013-2014	Assistenzärztin in der Klinik für Neurologie, Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin
2005-2012	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
07/2003	Praktikum am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Labor für Molekulare und strukturelle Biophysik (PD Dr. Bayer), Dortmund
2002-2003	Einjähriges Auslandsjahr, Brooks School, North Andover (MA), USA
1996-2005	Abitur, Mallinckrodt Gymnasium, Dortmund

## 14 Publikationen

- 1. Epping F, Gemoll T, Roblick U, Hartwig S, Szymczak S, Fritzsche B, Matula S, Bruch HP, Lehr S, Ziegler A, Hellmann U, Paech A, Habermann JK (2011): Comparative proteome analysis of fetal osteoblastic human osteosarcoma and pulmonal metastasis cell lines (*Posterpräsentation beim Proteomics Forum in Berlin*)
- 2. Timo Gemoll, Franziska Epping, Lisa Heinrich, Britta Fritzsche, Uwe J. Roblick, Silke Szymczak, Sonja Hartwig, Reinhard Depping, Hans-Peter Bruch, Christoph Thorns, Stefan Lehr, Andreas Paech, and Jens K. Habermann (2015): Comparative proteomic analysis of human osteosarcoma and pulmonal metastasis (*Posterpräsentation beim Proteomics Forum in Berlin*)
- 3. Gemoll T, Epping F, Heinrich L, Fritzsche B, Roblick U, Szymczak S, Hartwig S, Depping R, Bruch HP, Thorns C, Lehr S, Paech A, Habermann J (2015): Increased Cathepsin D protein expression is a biomarker for osteosarcomas, pulmonal metastases and other bone malignancies. *Oncotarget 6, 16517-16526*